

**Molekulare Mechanismen während der  
Anheftung und Biofilmbildung in  
*Shewanella oneidensis* MR-1**

**- Die Tücken des Besiedelns -**

**Dissertation**

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

dem  
Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Julia Gödeke**  
aus Hattingen

Marburg an der Lahn, 2011



Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2007 bis März 2011 am Max-Planck-Institut für Terrestrische Mikrobiologie unter der Leitung von Dr. Kai Thormann durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen  
am: 02.05.2011

Erstgutachter: Prof. Dr. Erhard Bremer

Zweitgutachter: Dr. Kai M. Thormann

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juli 2011



Die während der Promotion erzielten Ergebnisse sind zum Teil in folgenden Originalpublikationen veröffentlicht:

**1. Phage-induced lysis enhances biofilm formation in *Shewanella oneidensis***

**MR-1**

Gödeke J., K. Paul, J. Lassak & K.M. Thormann.

Isme J.2011 **5**: 613–626

**2. Role of two extracellular endonucleases in *Shewanella oneidensis* MR-1**

Gödeke J., M. Heun, S. Bubendorfer, K. Paul & K.M. Thormann.

eingereicht bei Appl Environ Microbiol, 22.03.2011

Ergebnisse aus in dieser Dissertation nicht erwähnten Projekten sind in folgenden Originalpublikationen veröffentlicht:

**3. Crenarchaeal biofilm formation under extreme conditions**

Koerdt A, J. Gödeke, J. Berger, K. M. Thormann & S. V. Albers.

PLoS One 2010 **5**:e14104



Ich versichere, dass ich meine Dissertation:

**„Molekulare Mechanismen während der Anheftung und Biofilmbildung  
in *Shewanella oneidensis* MR-1  
- Die Tücken des Besiedelns –“**

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 28.03.2011

---

Julia Gödeke



*meinen Eltern*



## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>11</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>14</b>
<b>1 Abstract</b> .....	<b>15</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>16</b>
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1 Das Leben in der Gemeinschaft – Der Biofilm</b> .....	<b>17</b>
2.1.1 Initiale Anheftung.....	18
2.1.2 Ausbildung von Mikrokolonien.....	19
2.1.3 Biofilmmreifung .....	19
2.1.4 Ablösen von Zellen aus dem Biofilm .....	20
2.1.5 Die Zusammensetzung der Biofilm-Matrix.....	22
2.1.6 Zellyse.....	24
<b>2.2 Der Genus Shewanella</b> .....	<b>27</b>
2.2.1 Historie der <i>Shewanellaceae</i> .....	28
2.2.2 respiratorische Diversität.....	28
2.2.3 Regulation .....	30
2.2.4 Kohlenstoff-Metabolismus .....	31
2.2.5 <i>S. oneidensis</i> MR-1.....	31
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>34</b>
<b>3.1 Charakterisierung der Biofilmbildung von <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1</b> .....	<b>34</b>
3.1.1 Biofilmentwicklung in <i>S. oneidensis</i> MR-1 unter hydrodynamischen und statischen Bedingungen.....	34
3.1.2 Mikroskopische Analysen von <i>S. oneidensis</i> MR-1 Zellen während der Oberflächen-Anheftung und Biofilmbildung .....	35
<b>3.2 Transkriptom-Analysen von <i>S. oneidensis</i> MR-1 während des Übergangs zum sessilen Lebensstil</b> .....	<b>37</b>
3.2.1 Etablierung eines hydrodynamischen Zellerntesystems .....	37
3.2.2 Differentielle Genexpression während erster Anheftungsprozesse auf einer Glas-Oberfläche unter hydrodynamischen Bedingungen.....	38
3.2.3 Differenzielle Genexpression während erster Anheftungsprozesse auf einer metabolisch zugänglichen Oberfläche unter hydrodynamischen Bedingungen.....	44
3.2.4 Differenzielle Genexpression während erster Anheftungsprozesse auf einer Oberfläche unter statischen Bedingungen.....	47
3.2.5 Charakterisierung dreier konservierter Proteine unbekannter Funktion, deren Gene in Oberflächen-assoziierten Zellen differenziell reguliert wurden.....	52

<b>3.3</b>	<b>Rolle der Phagen-induzierten Zellyse für die Anheftung und die Biofilm-entwicklung in <i>S. oneidensis</i> MR-1 .....</b>	<b>55</b>
3.3.1	Identifizierung von Phagen-induzierten Zellyse-Prozessen in Biofilmen von <i>S. oneidensis</i> MR-1 .....	56
3.3.2	Einfluss der Prophagen auf die Populationsdynamik in <i>S. oneidensis</i> MR-1 Kulturen.....	59
3.3.3	Detektion von infektiösen Phagenpartikeln in <i>S. oneidensis</i> MR-1 Biofilmen .....	60
3.3.4	Die Rolle der Prophagen in <i>S. oneidensis</i> MR-1 Biofilmen .....	64
<b>3.4</b>	<b>Charakterisierung von extrazellulärer DNA in <i>S. oneidensis</i> MR-1 Biofilmen .....</b>	<b>67</b>
3.4.1	Effekt von DNase I-Behandlung auf die Biofilmbildung von <i>S. oneidensis</i> MR-1 .....	67
3.4.2	Detektion von eDNA in der Biofilm-Matrix von <i>S. oneidensis</i> MR-1.....	69
<b>3.5</b>	<b>Identifizierung von zwei extrazellulären Endonukleasen in <i>S. oneidensis</i>.....</b>	<b>70</b>
3.5.1	Nuklease-abhängige Verwertung von extrazellulärer DNA als Nahrungsquelle in <i>S. oneidensis</i> MR-1 .....	72
3.5.2	Rolle von ExeM und ExeS in <i>S. oneidensis</i> MR-1 Biofilmen.....	73
3.5.3	Regulierung der Expression von <i>exeM</i> und <i>exeS</i> in <i>S. oneidensis</i> MR-1 Biofilmen.....	75
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>76</b>
<b>4.1</b>	<b>Auswirkungen der Umweltbedingungen auf die Biofilmbildung von <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 .....</b>	<b>76</b>
<b>4.2</b>	<b>Spezifische genetische Antwort auf initiale Anheftung in <i>S. oneidensis</i> MR-1.....</b>	<b>76</b>
4.2.1	Eisen(hydr)oxid-induzierte transkriptionelle Veränderungen in adhärirten <i>S. oneidensis</i> MR-1 Zellen .....	77
4.2.2	Anpassung von <i>S. oneidensis</i> MR-1 an Sauerstoff-Limitierung während der Anheftungsphase.....	78
4.2.3	Universelle zelluläre Prozesse während der Anheftungsphase in <i>S. oneidensis</i> MR-1.....	81
<b>4.3</b>	<b>Extrazelluläre DNA als essenzieller Faktor für Oberflächen-Anheftung und Biofilmbildung in <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1.....</b>	<b>83</b>
<b>4.4</b>	<b>Phagen-induzierte Zellyse in der Oberflächen-Anheftung und Biofilmbildung in <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1.....</b>	<b>84</b>
<b>4.5</b>	<b>Funktionen zweier extrazellulären Endonukleasen in der Biofilmbildung von <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 .....</b>	<b>86</b>
<b>5</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>90</b>
<b>5.1</b>	<b>Chemikalien und Material .....</b>	<b>90</b>
5.1.1	Bakterienstämme und Plasmide.....	90
5.1.2	verwendete Oligonukleotide .....	92
5.1.3	Nährmedien .....	93
5.1.4	Chemikalien .....	94
5.1.5	Antibiotika und Medienzusätze .....	94

---

5.1.6	Enzyme.....	95
5.1.7	Kits.....	95
5.1.8	Puffer.....	96
5.1.9	Geräte.....	96
<b>5.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>97</b>
5.2.1	Konstruktion rekombinanter Bakterienstämme.....	97
5.2.2	Lebendfluoreszenzmarkierung von <i>S. oneidensis</i> MR-1 .....	97
5.2.3	Isolierung von extrazellulärer DNA aus dem Überstand von Biofilmkulturen .....	98
5.2.4	Quantifizierung der extrazellulären DNA aus dem Überstand.....	98
5.2.5	Nichtradioaktive Markierung von DNA mit Digoxigenin.....	98
5.2.6	Southern-Blot-Analyse.....	99
5.2.7	Extraktion von Gesamt-RNA .....	99
5.2.8	Erstellung von Expressionsprofilen .....	99
5.2.9	Quantitative RealTime-PCR.....	100
<b>5.3</b>	<b>Mikrobiologische Methoden .....</b>	<b>101</b>
5.3.1	Kultivierung von Bakterien.....	101
5.3.2	Zellernte von an Oberflächen angehefteten <i>S. oneidensis</i> MR-1 Zellen .....	101
5.3.3	Kultivierung von <i>S. oneidensis</i> MR-1 Biofilmen .....	102
5.3.4	Mikroskopie und Bildbearbeitung.....	103
5.3.5	Elektronenmikroskopie .....	103
5.3.6	Untersuchung der lytischen Aktivität von Phagen in Biofilm-Überständen.....	104
5.3.7	Bestimmung der relativen Lebendzellzahl in Biofilmen.....	104
<b>5.4</b>	<b>Biochemische Methoden.....</b>	<b>105</b>
5.4.1	Überproduktion und Aufreinigung rekombinanter Proteine .....	105
5.4.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	105
5.4.3	Produktion von Antikörpern.....	105
5.4.4	Western-Blot-Analysen.....	106
5.4.5	Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität im Überstand von Biofilmen.....	106
5.4.6	Bestimmung der Nuklease-Aktivität in <i>S. oneidensis</i> MR-1 .....	106
<b>6</b>	<b>Quellen .....</b>	<b>107</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>107</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>107</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Bp	Basenpaare
c-di-GMP	zyklisches di-Guanosinmonophosphat
CFP	Blau-fluoreszierendes Protein
DAP	2,6-Diaminopimelinsäure
DDAO	7-hydroxy-9H-(1,3-dichloro-9,9-dimethylacridin-2-one)
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Exe	Extrazelluläre Endonuklease
FC	Regulationsfaktor („fold change“)
GDP/GTP	Guanosindi- /Guanosintriphosphat
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
h	Stunde(n)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
KI	Komplementation („knock-in“)
LB	Luria-Bertani-Medium
LM	Laktat-Medium
log <sub>2</sub> FC	log <sub>2</sub> -fache Veränderung („log <sub>2</sub> fold change“)
min	Minute
oD	optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid
PCR	Polymerasekettenreaktion
rpm	Umdrehung pro Minute („rounds per minute“)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SET	Salz-EDTA-Tris-Puffer
SOB	„Super optimal broth“
SOC	„Super optimal broth with catabolite repression“
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
TB	Transformationspuffer
TE	Tris-EDTA
YFP	Gelb-fluoreszierendes Protein
λ	Lambda

## 1 Abstract

Microbes in nature are commonly found in surface-associated communities, now often referred to as biofilms, leading to drastically altered properties compared to planktonic cells. The biofilm formation is strongly dependent on the environmental conditions such as nutrient and oxygen supply. Its developmental program can be divided into several phases. Initial attachment marks the onset of a bacterial life style switch, where single cells attach to a substratum initially in a transiently associated manner before becoming permanently immobilized. The permanent attachment sets the base for subsequent production of extracellular polymeric substances (biofilm matrix) and biofilm formation. However, signals and regulatory events underlying these initial processes are still mostly unknown.

The dissimilatory iron-reducing bacterium *Shewanella oneidensis* MR-1 forms biofilms in hydrodynamic and static systems, reflecting different natural habitats. Under static conditions, biofilm development occurs entirely different from hydrodynamically-grown biofilm as the cells form a flexible sturdy network of cells without the characteristic three-dimensional structures that are typical for flow-cell cultured biofilms.

To identify genetic requirements for the cellular attachment – as first step in the biofilm formation – in different environments through transcriptome analyses, a novel system for harvesting surface-attached cells under hydrodynamic conditions was successfully established. The microarray analyses of attached cells in static and hydrodynamic environments revealed that transition between the planktonic compartment and the surface leads to dramatic changes in the expression profile of the surface-associated cells. While reduction of motility and rapid adaption to changes in oxygen levels represent an ubiquitous stage-specific genetic requirement, the initial attachment of the cells can also entail substrate-specific genetic responses. Therefore, the attachment to the redox-active substratum iron (hydr)oxide results in a drastically reduced synthesis of cytochromes and transporters, but leads to the induction of stress-dependent sigma factors. Hence, the genetic changes in initially attached *S. oneidensis* MR-1 cells improve the adaptation to the sessile life style.

Following initial attachment, *S. oneidensis* MR-1 cells start forming biofilm structures and are encased in a self-produced sticky biofilm matrix with extracellular DNA (eDNA) as a major component. The eDNA not only serves as structural component in all stages of biofilm formation under static and hydrodynamic conditions, but is also required for proper attachment of the cells in different environments. The release of eDNA during early and later stages of biofilm formation is mediated via cell lysis of a subpopulation of biofilm cells through the lytic activity of the three *S. oneidensis* MR-1 prophages, MuSo1, MuSo2 and LambdaSo. However, mutant analyses and infection studies revealed that only LambdaSo and MuSo2 form infectious phage particles. A mutant lacking all three prophages is defective in all stages of biofilm formation. Thus, the prophage-mediated lysis result in the release of crucial attachment- and biofilm-promoting factors, in particular eDNA.

In addition to the function of eDNA, the role of two extracellular endonucleases, ExeM and ExeS, was analyzed. While ExeM is involved in degrading external DNA as sole source of phosphorus, ExeS does not seem to have a function in utilizing DNA in *S. oneidensis* MR-1. However, both nucleases are likely to be involved in degrading eDNA within the matrix of biofilms. This process is essential for detachment events in biofilms giving rise to viable planktonic cells capable of attaching to non-occupied areas on the surface of the habitat.

## Zusammenfassung

Grenzflächenbesiedlung durch robuste Bakteriengemeinschaften – sogenannten Biofilmen – stellt die ubiquitär verbreitete Lebensform von Mikroorganismen dar, um einer Vielzahl von Stressfaktoren zu widerstehen. Das Entwicklungsprogramm solcher Biofilme lässt sich in mehrere distinkte Schritte unterteilen, wobei zu Anfang eine zunächst transiente Anheftung Oberflächen-assoziiertes Zellen steht, auf die eine irreversible Interaktion mit dem Substratum folgt. Nach der Bildung von Mikrokolonien entstehen im weiteren Verlauf drei-dimensionale Strukturen, die als charakteristisches Merkmal für Biofilme gelten.

Das dissimilatorisch Metallionen-reduzierende Bakterium *Shewanella oneidensis* MR-1 bildet Biofilme unter statischen wie hydrodynamischen Bedingungen aus. Die Ausprägungsformen des Biofilms unterscheiden sich jedoch stark in Abhängigkeit von den vorherrschenden Bedingungen. So bildet *S. oneidensis* MR-1 unter statischen Bedingungen eine eher lockere netzartige Biofilmstruktur, durch die sich Zellen bewegen können. Hydrodynamische Bedingungen haben zur Folge, dass sich turmartige Strukturen, welche vornehmlich durch klonales Wachstum entstehen, ausbilden, die von einer dichtgepackten, widerstandsfähigen Matrix zusammengehalten werden.

Um zelluläre Prozesse während der Oberflächen-Anheftung in Abhängigkeit der vorherrschenden Bedingung mit Hilfe von Transkriptom-Analysen zu identifizieren, wurde ein System zur Isolierung von Oberflächen-assoziierten Zellen in einem hydrodynamischen Umfeld etabliert. Die Transkriptom-Analysen adhärirter Zellen unter statischen und hydrodynamischen Bedingungen zeigten, dass die initiale Anheftung dieses Organismus, als erster Schritt in die Richtung eines sessilen Lebensstils im Biofilm, weitreichende Veränderungen des Transkriptoms nach sich zieht. Dabei lässt sich zwischen einer allgemeinen, jedoch umweltabhängigen Anpassung, die vor allem eine Reduzierung der Motilität und – unter statischen Bedingungen – eine rapide wie effiziente Umstellung auf anaeroben Stoffwechsel beinhaltet, und einer Substrat-spezifischen Adaption unterscheiden. So hat beispielsweise eine Anheftung an eine Eisen(hydr)oxid-Oberfläche zur Folge, dass – wahrscheinlich aufgrund des Überangebots an Elektronenakzeptoren – besonders Transportsysteme und Cytochrome reprimiert, dagegen stressabhängige Sigmafaktoren induziert werden.

Im weiteren Verlauf der Anheftung und Biofilmentwicklung produzieren die *S. oneidensis* MR-1 Zellen eine Biofilm-Matrix, die zu einem entscheidenden Teil aus extrazellulärer DNA (eDNA) besteht. Als strukturgebendes Element spielt die eDNA in Biofilmen sowohl unter statischen, als auch unter hydrodynamischen Bedingungen eine wichtige Rolle. Die Herkunft dieser eDNA konnte auf zelllytische Prozesse – ausgelöst durch Phagen-induzierte Lyse einer Subpopulation von Zellen – zurückgeführt werden. Die durch die lytische Aktivität der drei *Shewanella*-eigenen Prophagen (MuSo1, MuSo2 und LambdaSo) freigesetzte DNA ist bereits in den ersten Schritten der Anheftung essenziell. Eine Mutante, in der alle drei Prophagen deletiert wurden, wies massive Defekte in allen Stadien der Biofilmbildung auf. Mutanten-Analysen und Infektionsstudien zeigten des Weiteren, dass nur die Prophagen MuSo2 und LambdaSo in den lytischen Lebenszyklus konvertieren und infektiöse Viruspartikel assemblieren können.

Um die dynamische Besiedelung einer Oberfläche zu gewährleisten, gehen einige Zellen während aller Entwicklungsstufen der Biofilmbildung zu einem erneut planktonischen Lebensstil über. Dieser kontrollierte Übergang scheint unter anderem auch die Fähigkeit zur Degradierung von Komponenten der Biofilm-Matrix – insbesondere eDNA – vorauszusetzen. Zwei Kandidaten für solche DNA-degradierenden Prozesse stellen die extrazellulären Endonukleasen ExeM und ExeS dar, die vermutlich sowohl die Akkumulation, als auch das Ablösen von Biofilm-Biomasse aktiv mitgestalten, und zusätzlich – zumindest bei ExeM – in der Verwertbarkeit von DNA als Phosphatquelle eine Rolle spielen.

## 2 Einleitung

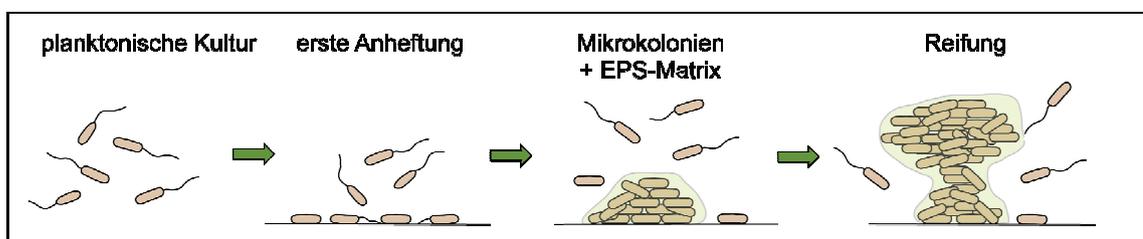
### 2.1 Das Leben in der Gemeinschaft – Der Biofilm

In der Natur leben Bakterien beinahe ausschließlich in mikrobiellen Gemeinschaften, die eine hervorragende Anpassung an die harschen Bedingungen des natürlichen Umfelds der Population darstellen. Diese Gemeinschaften werden als Biofilme bezeichnet [40, 46]. Über die Definition des „Biofilms“ wurde sehr lange diskutiert. Der Begriff setzt sich aus den Bestandteilen „Bio“, also bezogen auf lebendes Material, und „Film“ zusammen, einen dünnen Überzug auf Oberflächen. Per Definition nach Costerton und Kollegen handelt es sich bei Biofilmen um eine, in einer Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingeschlossene, Bakterienpopulation, deren Zellen aneinander und an einer Oberfläche oder Phasengrenzfläche gebunden sind [42]. Diese Definition beinhaltet auch bakterielle Flocken, sowie mikrobielle Aggregate.

Seit der ersten Beschreibung von „Anhäufungen von bakteriellen Zellen aus Meerwasser-Proben an Glasoberflächen“ 1936 [288] und der Bestätigung der Allgegenwärtigkeit des Phänomens der vermehrten Oberflächen-Anheftung von bakteriellen Gemeinschaften in der Natur 1978 [41] wurden intensive Forschungsarbeiten durchgeführt, um Licht in die Entstehung und das Wachstum dieser mikrobiellen Gemeinschaften zu bringen. Die Biofilmbildung als bakterieller Entwicklungszyklus wurde erstmals im Jahr 2000 von O’Toole und Kollegen in Analogie zum multizellulären Entwicklungsprogramm der Ausbildung von Fruchtkörpern in *Myxococcus xanthus* beschrieben [181].

Das Leben in der Gemeinschaft innerhalb von Biofilmen vermittelt den Bakterien Vorteile gegenüber eines planktonischen Lebensstils. In der Nähe der Oberfläche ist die Konzentration von Nährstoffen oft höher als im aquatischen umgebenden Milieu. Des Weiteren begünstigt der enge Zusammenschluss der Zellen den Austausch von genetischem Material und die umgebende Matrix vermittelt einen erhöhten Schutz vor antimikrobiellen Substanzen und, im Fall von pathogenen Bakterien, den Schutz vor der Immunantwort des besiedelten Wirts [56, 145, 237].

Grundsätzlich können sich Biofilme auf allen Grenzphasen zwischen zwei Aggregatzuständen, wie die Luft-Wasser-Interphase, sowie auf abiotischen Substraten, wie Mineralien, und auf biotischen Oberflächen, wie Pflanzen, Mikroben und Organen bilden [5, 46, 150, 165]. Auch auf und im menschlichen Körper bevölkern Bakterien ihre ökologische Nische in Form von Biofilmen. Beispiele hierfür sind pathogene und nicht-pathogene Hautflora, kommensale und pathogene intestinale Flora und Zahnkaries [5, 119].



**Abb. 1: Modell der Biofilmentwicklung unter hydrodynamischen Bedingungen.** Planktonische Zellen adhären an das Substrat, zuerst reversibel, später irreversibel, durch die Transition zu einem sessilen Lebensstils. Durch klonales Wachstum und weiteres Anheften von Zellen entstehen Mikrokolonien. In dieser Phase beginnen die Zellen, Komponenten der Biofilm-Matrix zu synthetisieren und sekretieren. Im Laufe seiner Entwicklung bildet der Biofilm drei-dimensionale Strukturen aus. In einem dynamischen Prozess können sich in allen Phasen der Biofilmbildung Zellen vom Biofilm aktiv ablösen um neue Oberflächen zu kolonisieren.

Der Prozess der Biofilmbildung kann in verschiedenen Stufen unterteilt werden: die initiale Anheftung planktonischer Zellen an eine Oberfläche, die Ausbildung von Mikrokolonien und letztendlich die Reifung des Biofilms [77, 159, 161, 234] (Abb. 1). Während dieser Entwicklungsschritte kommt es immer wieder zu einem Ablösen von einzelnen planktonischen Zellen oder ganzen Zellaggregaten. Die Oberflächen-Anheftung, die Biofilmentwicklung und das aktive Ablösen der Zellen werden durch eine Vielzahl von Umweltbedingungen, inter- wie intrazellulären Signalen und Regulationskaskaden reguliert.

### 2.1.1 Initiale Anheftung

Der erste Schritt der Biofilmentwicklung beinhaltet die Adhäsion von planktonischen Bakterien an eine Oberfläche. Die intra- und interzellulären Vorgänge und Signale, die zu einer Anheftung von bakteriellen Zellen an eine Oberfläche führen, sind bis heute noch nicht vollständig geklärt. Durch aktive Bewegung gelangen Zellen in die Nähe der Oberfläche, wo sie durch Van-der-Waals-Kräfte, elektrostatische Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen adhären können [74, 128, 185]. In vielen Bakterien, wie *Escherichia coli* oder *Pseudomonas aeruginosa* wird die Bewegung zur Oberfläche, sowie die Adhäsion, durch Flagellen vermittelt [46, 119, 193]. Diese Adhäsion ist zunächst transient, d. h., Zellen können sich immer wieder von der Oberfläche ablösen. Während der Anheftung spielt dabei die Regulierung der Flagellenrotation eine wichtige Rolle. In *E. coli* ist die Umkehrung der Flagellenrotation und der damit verbundene kurze Halt in der Bewegung der bakteriellen Zelle für die transiente Anheftung an eine Oberfläche von entscheidender Bedeutung [151]. Neben der Flagelle sind auch andere adhäsive Strukturen wie Pili und Fimbrien wichtig für die transiente Anheftung [19, 182, 193]. In *Vibrio cholerae* wird die erste Adhäsion der Zellen an eine Oberfläche durch die Ausprägung eines Mannose-sensitiven Hämagglutinin Typ IV Pilus (MSHA) vermittelt [163, 250].

Im weiteren Verlauf der Biofilmentwicklung vollzieht eine adhärenzte Subpopulation der Bakterien einen Wechsel zu einer permanenten Anheftung an die Oberfläche [100, 119, 161, 185, 253]. Dieser Wechsel von der reversiblen Adhäsion zu einer irreversiblen Zell-Oberflächen-Assoziation wird vermutlich durch Umweltsignale induziert.

In *V. cholerae* führt die Interaktion der Flagelle mit der Oberfläche und der daraus resultierende Stillstand zu einer Hyperpolarisation der bakteriellen Zellmembran. Diese Veränderung des Membranpotenzials ist verantwortlich für die Transition zu einer permanenten Anheftung [253]. Im Fall von *P. aeruginosa* heften sich die Zellen zunächst mit dem flagellierten Pol an eine Oberfläche. Im Anschluss wird die Interaktion mit der Oberfläche durch das irreversible Anheften des Bakteriums entlang seiner Längsachse stabilisiert [180]. In dieser Spezies, wie auch in vielen weiteren Prokaryoten favorisiert eine Anstieg der intrazellulären Konzentration des sekundären Botenstoffes bis-(3',5')-zyklischem di-Guanosinmonophosphat (c-di-GMP) den Wechsel zu einem sessilen Lebensstil [98, 116, 127, 227] (siehe dazu auch Kapitel 2.1.3).

Weitere Untersuchungen zeigten, dass unter bestimmten Bedingungen synthetisierte Proteine und Polysaccharide, sogenannte Adhäsine, die Bindung der Zellen an die Oberfläche stabilisieren. Beispiele hierfür sind das sekretierte Protein LapA aus *Pseudomonas fluorescens* [100, 160] oder das Exopolysaccharid PGA aus *E. coli* [2].

Die wohl am besten untersuchte adhäsive Substanz ist die Schicht aus N-Acetylglukosamin am Haftorgan von *Caulobacter crescentus* [115]. Mittels dieses „Klebstoffes“ können sich mobile Schwärmer-Zellen und Stiel-Zellen an eine Oberfläche permanent anlagern. Durch weitere

Anheftung von Zellen kann eine einzellige Schicht aus Bakterien (engl. „Monolayer“) auf der Oberfläche entstehen.

Mit Hilfe von Transkriptom-Analysen sollen Veränderungen in der Genexpression als Antwort auf den veränderten Lebensstil während der Anheftung aufgespürt werden. Untersuchungen an *V. cholerae* zeigten, dass Zellen im Monoschicht-Biofilm die Expression von Genen, kodierend für Flagellen, reprimieren, während Gene, die für Komponenten in der Synthese der Biofilm-Matrix kodieren, aktiviert werden [163, 164]. Des Weiteren wird ebenfalls die Expression der Gene, deren Produkte am Formiat-Nitrat-Elektronentransportweg beteiligt sind, induziert. Dies deutet darauf hin, dass sich die Zellen auf eine anaerobe Respiration einstellen. Die Gründe für diese Umstellung sind allerdings noch unklar [163, 164].

Diese Untersuchungen machen deutlich, dass die initiale Anheftung der Zellen und die Ausprägung einer adhärennten Einzelzellschicht auf der Oberfläche ein klar abgegrenzter Lebensstil gegenüber der planktonischen Lebensweise der Zellen darstellt.

### 2.1.2 Ausbildung von Mikrokolonien

Nach einer stabilen Anheftung bilden die Bakterien im nächsten Schritt der Biofilmbildung sogenannte Mikrokolonien, eine Gemeinschaft von Zellen mit einer etwa 2-5 Zellschichten-Dicke [46]. Dabei sind sowohl klonales Wachstum, als auch stabile Zell-Zell-Interaktionen von entscheidender Bedeutung [204]. Das klonale Wachstum wird vor allem durch die Präsenz von ausreichenden Nährstoffen reguliert, während die Zell-Zell-Interaktion meist durch Ausbildung von adhäsiven Strukturen, z. B. eine Typ IV Pilus-abhängige Interaktion von *P. aeruginosa* Zellen [182], und die Produktion von extrazellulären polymeren Stoffen vermittelt wird.

Diese, im weiteren Verlauf dieser Dissertation auch als extrazelluläre polymere Substanz (EPS-) oder Biofilm-Matrix bezeichnete, Zell-umgebende Substanz kann sich, je nach Bakterienspezies, aus Exopolysacchariden, Proteinen und extrazellulärer DNA (eDNA) zusammensetzen [25, 60, 240]. Die Synthese dieser Matrix ist dabei streng reguliert, um die energetischen Kosten für die bakterielle Zelle gering zu halten. Im Abschnitt 2.1.5 werden die Regulation der Produktion, sowie die Zusammensetzung und die Aufgaben der Biofilm-Matrix gesondert behandelt.

### 2.1.3 Biofilmreifung

Durch den Ausbau der umgebenden Biofilm-Matrix, dem weiteren Anheften von planktonischen Zellen an die Mikrokolonien und dem klonalen Wachstum „reift“ der Biofilm und es entsteht eine drei-dimensionale Biofilmarchitektur. Dabei kann sich der Biofilm zu einem dicken homogenen „Teppich“, oder, wie im Falle von *Shewanella oneidensis* MR-1 oder *P. aeruginosa*, zu komplexen Strukturen mit hohen, pilz- oder turmartigen Konstruktionen und Kanälen ausbilden [46, 250]. Die Form der Strukturen ist dabei von den Umweltbedingungen, wie der Flussrate und dem Nährstoffangebot abhängig [197]. In hydrodynamischen Systemen wird die Ausprägung von dichten Biofilmstrukturen mit engen Zell-Zell-Interaktionen favorisiert, während unter statischen Bedingungen keine – durch den Mediumfluss induzierte – Scherkräfte vorliegen, die eine enge interzelluläre Verbindung nötig machen würden [232].

Die Reifung des Biofilms wird durch verschiedene Signale gesteuert [119]. Neben der Osmolarität [183], der Anwesenheit von antimikrobiellen Substanzen [102] oder Wirts-spezifischen Signalen [109] spielt vor allem die Verfügbarkeit von Nährstoffen eine große Rolle. In *Salmonella enterica* serovar Typhimurium wird ein mehrschichtiger Biofilm nur unter Nährstoffmangel-Bedingungen ausgebildet [71]. Hier aktiviert der Sigma-Faktor RpoS die Expression von Genen, die für die Formung des Biofilms notwendig sind [70]. Im Falle von *P. aeruginosa* dagegen reprimiert RpoS als Antwort auf Nährstoffmangel die Reifung des Biofilms [275].

Auch die Anwesenheit von verschiedenen Zuckern kann Einfluss auf die Biofilmbildung nehmen. Durch Glukose oder Mannose im Medium wird die Biofilmentwicklung in *V. cholerae* induziert, indem das Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase System (PTS) durch eine Regulationskaskade Einfluss auf die Expression der *pts*-Gene nimmt [107, 120]. Dieser Locus kodiert für die Exopolysaccharide der Biofilm-Matrix in diesem Organismus [284].

Neben veränderten Umweltbedingungen übernehmen auch interzelluläre Signale eine Aufgabe in der Regulation der Biofilmentwicklung. Mit Hilfe von Quorum Sensing (QS) Signalen können Bakterien die Expression von verschiedenen Genen in Anhängigkeit der Zelldichte koordinieren. Sekretierte „Autoinducer“ dienen dabei als Botenstoff zwischen den einzelnen Zellen. Ein bekannter bakterieller Vertreter, der QS Signale nutzt, ist *Vibrio fischeri*. Dieses Bakterium lebt in Symbiose mit einem Tintenfisch und kolonisiert dessen Leuchtorgan in Form von Biofilmen, deren Aufbau durch QS positiv beeinflusst wird [152, 211, 279]. In anderen Fällen, wie in *V. cholerae* oder *Staphylococcus aureus*, wird die Biofilmentwicklung durch QS negativ reguliert, z.B. indem durch eine Regulationskaskade die Expression von Genen, kodierend für Matrix-degradierende Enzyme, induziert werden kann [20, 287].

Zudem kontrollieren auch viele intrazelluläre Botenstoffe und regulatorische Netzwerke die Biofilmentwicklung. Als ein Beispiel hierfür soll die Rolle des sekundären Botenstoffes c-di-GMP in der Biofilm-Ausbildung dienen. Dieses Nukleotid wird von Diguanylat-Zyklasen aus zwei Guanosintriphosphaten (GTP) synthetisiert und von Phosphodiesterasen zu zwei Guanosinmonophosphaten (GMP) degradiert. Über die Konsensus-GGDEF-Domäne für die Zyklasen und die Konsensus-EAL- / HD-GYP-Domäne für die Esterasen können diese Enzyme leicht identifiziert werden [227, 252].

Wie bereits erwähnt, spielt dieser Botenstoff in vielen Organismen eine wichtige Rolle bei dem Übergang von einem mobilen zu einem sessilen Lebensstil [98, 116, 127, 227] und kann eine Vielzahl von Funktionen in der Zelle, wie Differenzierung, Aggregation, Adhäsion und Virulenz, regulieren [3, 39, 55, 116, 243]. Seit den letzten Jahren und intensiven Studien gilt c-di-GMP als ein zentraler Regulator in der Biofilmbildung [116, 227, 252]. Dabei spielt die Konzentration des Botenstoffs in der Zelle eine wichtige Rolle. So fördern niedrige Konzentrationen von c-di-GMP eine Flagellen-abhängige Bewegung der Zellen, während hohe Konzentrationen – unter anderem durch Induktion der Synthese von Matrix-Komponenten – die Zellaggregation und Biofilmbildung, also ein sessiles Verhalten, begünstigen [127, 227].

#### 2.1.4 Ablösen von Zellen aus dem Biofilm

Während aller Phasen der Biofilmentwicklung lösen sich einzelne Zellen oder ganze Zellverbände immer wieder von der Oberfläche und aus den Biofilmstrukturen ab [86, 119, 124, 161, 232]. Dieses Ablösen ist für das Bestehen der Bakterienpopulation essenziell, da auf diese

Weise neue Oberflächen kolonisiert werden können. Dabei müssen die Bakterien eine physiologische Differenzierung vollziehen und können als flagellierte Zellen den Biofilm aktiv verlassen und zu freien Oberflächen gelangen. Purevdorj-Gage und Kollegen beschrieben 2005 eine Form der Ablösung, bei der *P. aeruginosa* Zellen das Innere von drei-dimensionalen Strukturen verlassen, in denen sie eine große Höhle zurücklassen [196]. Dieser Prozess scheint über QS Signale reguliert zu werden. In *S. aureus* wird das Agr-QS System in ausgereiften Biofilmen durch ein unbekanntes Signal aktiviert und löst ein nachfolgendes Ablösen von Biofilm-Biomasse aus [20].

Doch nicht nur scheinbar zufällige Prozesse einzelner Zellen führen zum Ablösen aus dem Biofilm. Auch Veränderungen der Umweltbedingungen können zu einem drastischen Freisetzen von beweglichen Zellen aus der Gemeinschaft führen [75, 220, 251]. So kann ein plötzlicher Abfall von molekularem Sauerstoff, hervorgerufen beispielsweise durch ein Abstoppen des Mediumflusses in hydrodynamischen Systemen, in *S. oneidensis* MR-1 ein massives Ablösen von 50 % bis 80 % der Biomasse vom Biofilm induzieren [251].

In *P. aeruginosa* führt ein starker Anstieg der Kohlenstoff-Konzentration im Medium zu einer 80 %igen Reduktion der Oberflächen-assoziierten Biofilm-Biomasse [220]. Transkriptom-Analysen dieser abgelösten Zellen deckten eine klare physiologische Differenzierung der freigesetzten Zellen gegenüber Biofilm-assoziierten Zellen auf. So wurden in abgelösten Zellen die Expression von Genen kodierend für die Flagelle und ribosomale Proteine induziert, während Gene des, für die Anheftung wichtigen, Typ IV Pilus, reduziert wurden [220]. Auch Zellyse, teils Phagen-induziert wie im Beispiel von *P. aeruginosa*, kann zu einem massiven Ab- und Auflösen von Biofilmen führen [10, 146, 271]. Dabei werden physiologische Bedingungen, die eine SOS-Antwort der Zellen auslösen können, als Aktivatoren der Phagen-induzierten Zellyse angesehen [271]. Die Rolle der Zellyse in der Biofilmbildung soll im Abschnitt 2.1.6 näher beleuchtet werden.

Neueste Studien weisen darauf hin, dass sich Zellen verschiedener bakterieller Spezies aus dem Biofilm „herausschneiden“ können, indem sie die Zell-umgebende Biofilm-Matrix mittels neu synthetisierter Enzyme degradieren [75, 119]. Manche dieser Enzyme zielen auf die Proteinkomponente der Matrix [75], andere degradieren Polysaccharide [23, 118]. So wird beispielsweise das Biofilmexopolysaccharid Alginate in *P. aeruginosa* Stämmen durch eine sekretierte Alginate-Lyase abgebaut [23]. In *S. aureus* degradieren extrazelluläre Proteasen Matrix-Proteine und begünstigen so die Freisetzung von Zellen aus dem Biofilm [20]. In einer kürzlich veröffentlichten Studie zeigten Mann und Kollegen, dass die Thernonuklease Nuc ebenfalls die Biofilmentwicklung von *S. aureus* beeinflusst, indem sie scheinbar die Zerstreung von Biofilm-Biomasse begünstigt [149].

Diese Studien weisen darauf hin, dass sich Biofilm-assoziierte Zellen sehr schnell an Umweltveränderungen anpassen können, um sich bei ungünstigen Bedingungen wieder zu planktonischen Zellen zu differenzieren. Dabei sind die Signale und die Regulation der inter- und intrazellulären Vorgänge während der Ablösung noch nicht vollständig bekannt. Allerdings scheint auch hier der Botenstoff c-di-GMP eine große Rolle zu spielen [75]. In *S. oneidensis* MR-1 führt eine Reduktion der c-di-GMP Konzentration zu einer verminderten Biofilmbildung und einem vermehrten Freisetzen der Biofilm-Biomasse [249]. Dabei ist die Konzentrationsveränderung für die Induktion der Flagellen-abhängigen Motilität und die Repression der Exopolysaccharid-Synthese verantwortlich. Auch Fettsäuren wie *cis*-2-Decensäure können die Freisetzung von Biofilm-assoziierten Zellen von *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* und *S. aureus* induzieren [47].

Zusammenfassend zeigen diese Forschungsergebnisse, dass die Ausbildung und die Reifung des Biofilms, aber auch das Ab- und Auflösen von Biofilm-Strukturen einer großen Vielzahl von Signalen und ständigen Regulationskaskaden unterliegen, die es der Population ermöglichen, sich optimal an die vorherrschende Bedingungen anzupassen. Das Leben in Biofilmen ist ein hochgradig regulierter und dynamischer Prozess, der je nach Spezies und multizellulärer

Zusammensetzung variiert. Aus diesem Grunde gibt es keine allgemeingültigen Aussagen über den Aufbau der Biofilme und es erschwert Forschungen zur Prävention und Behandlung von pathogenen Biofilmen in der Medizin.

### 2.1.5 Die Zusammensetzung der Biofilm-Matrix

Die Biofilmentwicklung verläuft bei den meisten Bakterienarten in den gleichen Stufen. Die makroskopische Ausprägung eines Biofilms hängt jedoch sehr von der jeweiligen Biofilmkultur und den Umweltbedingungen ab. Ein wichtiger Grund für diese Diversität ist die heterogene Zusammensetzung der Biofilm-Matrix. Hierbei handelt es sich um ein extrazelluläres hydriertes Material, das von den Bakterien produziert wird, die Biofilmkultur umschließt und so als Gerüst für die Gemeinschaft dient [60, 61]. Dabei immobilisiert die Biofilm- oder auch EPS-Matrix die Biofilmzellen und unterstützt so einen engen Zell-Zell-Kontakt. Neben dieser Funktion als Stabilisator des Biofilms kann die Matrix auch die Adhäsion der Zellen an eine Oberfläche vermitteln und dient als schützende Barriere vor antimikrobiellen Substanzen und Scherkräften. Des Weiteren kann sie auch selbst als Nährstoffquelle für Kohlenstoff, Phosphor und Stickstoff dienen [61].

Die Biofilm-Matrix kann zu unterschiedlichen Teilen aus Polysacchariden, extrazellulären Proteinen und DNA (eDNA) bestehen [25, 60, 239]. Der Hauptanteil, in manchen Biofilmen bis zu 97 %, besteht jedoch aus Wasser [239]. Das Exopolysaccharid  $\beta$ -1,6-*N*-Acetyl-D-Glukosamin ist wohl der häufigste Zucker-Vertreter in der EPS-Matrix. Diverse Bakterien, wie *E. coli*, *S. aureus*, *Actinobacillus* spp. und *Bordetella* spp., verwenden es zum Aufbau ihrer Matrix [112, 113, 187, 268]. In *B. subtilis* besteht die EPS-Matrix aus diversen Exopolysacchariden und dem sekretierten Protein TasA [24]. Das Exopolysaccharid Alginate ist in nicht-mucoiden *P. aeruginosa* Stämmen zwar nicht für die Bildung des Biofilms essentiell [280], beeinflusst aber stark das makroskopische Erscheinungsbild des Biofilms. Im Gegensatz dazu vermitteln die Exopolysaccharide Pel und Psl sowohl die Zell-Oberflächen-Interaktion, als auch den Zell-Zell-Kontakt [65, 212, 255].

Der Protein-Anteil der Biofilm-Matrix kann sich aus EPS-modifizierenden Enzymen, die damit auch häufig für die Ablösung von Zellen verantwortlich sind, und aus strukturellen Proteinen zusammensetzen. So sind Fimbrien und Typ IV Pili in *E. coli*, *Salmonella* spp. und Pseudomonaden ein wichtiger Teil der EPS-Matrix [69, 100, 194].

Wurden extrazelluläre Proteine und Exopolysaccharide in Biofilmen schon früh identifiziert, machten erst Forschungen in den letzten Jahren deutlich, dass auch extrazelluläre DNA ein entscheidendes Element der Biofilm-Matrix darstellt, indem es dem Biofilm strukturelle Stabilität verleiht und die Zellen vor antimikrobiellen Substanzen schützen kann [53, 166, 274]. Im folgenden Kapitel wird der Zusammenhang von eDNA und Biofilm näher beleuchtet.

### Rolle von eDNA in der Biofilmbildung

Extrazelluläre DNA (eDNA) tritt in der Natur in signifikanten Mengen in aquatischen und terrestrischen Ökosystemen auf [260]. Ihre Konzentration variiert in den unterschiedlichen Lebensräumen von 2  $\mu$ g/g in Bodentrockenmasse [178] bis zu 20 mg/g organisches Material in Klärschlamm von Abwasseranlagen [186]. Als Nährstoffquelle für Phosphor, Kohlenstoff und Stickstoff [59, 167], für DNA-Transformation [139, 168] und als Quelle für Gene im Prozess des horizontalen Gentransfers [159] spielt sie eine entscheidende Rolle in inter- und intrazellulären Prozessen von Prokaryoten.

Bereits 1956 wurde das Vorkommen von eDNA in einer „schleimigen“ Schicht auf Bakterien von Catlin und Kollegen beschrieben [35]. Doch erst in den letzten Jahren wurde zunehmend deutlich, dass die eDNA ebenfalls eine wichtige Aufgabe in Zellanheftung und Aufbau der Biofilmstrukturen und im Schutz vor antimikrobiellen Substanzen in Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien übernimmt [4, 53, 89, 131, 166, 199, 235, 274]. Dabei spielt sie sowohl eine Rolle in Monospezies-Biofilmen als auch in gemischten Biofilmen aus diversen Bakterienstämmen, z. B. in bakteriellen Gemeinschaften im Klärschlamm [53]. Die eDNA kann im Biofilm homogen verteilt sein, oder, wie in *Haemophilus influenzae*, als filamentöse Stränge den Biofilm durchziehen [18, 117]. In gemischten Biofilmen ist eine hohe Konzentration von eDNA besonders an sehr eng verknüpften Mikrokolonien einzelner Bakterienarten detektierbar, während andere Spezies keine bis geringe Mengen an eDNA in die Matrix freisetzen [53].

In *P. aeruginosa* konzentriert sich die eDNA besonders an der Außenseite des Stammes von drei-dimensionalen Strukturen und formt damit eine Art Grenze zwischen der Stamm- und der Kappen-assoziierten Subpopulation der pilzartigen drei-dimensionalen Strukturen [4, 282]. Neue Studien belegen zudem das Vorhandensein von DNA auf der Biofilm-Oberfläche. Diese DNA könnte als eine Art Gitter fungieren, auf dem sich Bakterienzellen mittels Typ IV Pili entlang bewegen können. In *P. aeruginosa* konnte bereits gezeigt werden, dass diese Pili DNA binden können [254]. Damit könnten *P. aeruginosa* Zellen über die eDNA an den Stämmen von drei-dimensionalen Strukturen „klettern“, und so die Kappen der pilzförmigen Biofilme bilden [4].

Studien in *S. epidermidis* und *Neisseria meningitidis* belegen eine ebenso stabilisierende Aufgabe der eDNA im Biofilm und verdeutlichen ihre Rolle in der Oberflächen-Anheftung [131, 199]. Interessanterweise entwickelt letzterer Stamm zwei Strategien zum Aufbau des Biofilms: ein eDNA-unabhängiger Biofilmaufbau durch so genannte *Neisseria* „Spreaders“, die eher kurzzeitig Wirtszellen kolonisieren; und eine eDNA-abhängige Biofilmbildung der „Settler“ Zellen. Im letzteren Fall zeichnet sich der Biofilm durch einen stabilen, Scherkraft-resistenten Aufbau und eine Langzeit-Kolonisation des Wirts aus [131].

Als erstes Beispiel eines Gram-positiven Stäbchens beschrieben Vilain und Kollegen die Funktion der eDNA als Adhäsion für den Aufbau von Biofilmen in *Bacillus cereus* [257]. In dieser Studie wurde ebenfalls die Anwesenheit von RNA in der EPS-Matrix bewiesen. Ihre Rolle ist bisher allerdings noch ungeklärt.

Im Gegensatz zu den beschriebenen positiven Einflüssen der eDNA auf Biofilme, spielt dagegen die eDNA in *C. crescentus* eine ganz andere Rolle. Hier inhibiert eDNA aus lysierten Zellen das Anlagern von mobilen Schwärmer-Zellen an den Biofilm [14, 122]. Dabei bindet sie an das Haftorgan der Schwärmer-Zellen und verhindert so die Anheftung. Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass dabei vor allem die im Biofilm neu entstandenen Schwärmerzellen von der Anheftung abgehalten werden. Damit wäre diese Funktion von eDNA ein neuer Mechanismus, um die Biofilmentwicklung zu kontrollieren und ein Ablösen der neu geteilten Schwärmer-Zellen und die damit verbundene weitere Erschließung des Lebensraumes ohne den Verlust der existierenden Biofilmstrukturen zu ermöglichen.

Der extrazellulären DNA lässt sich in Biofilmen also eine sehr vielseitige Funktion zuschreiben. Sie dient den Zellen als Adhäsionshilfe, verbindet die Zellen untereinander, stabilisiert so die Biofilmstrukturen oder begünstigt das Ablösen von motilen Zellen. Des Weiteren wird der eDNA auch eine antimikrobielle Aktivität zugesprochen. Die Bindung und Chelatierung von Kationen, wie Magnesium- und Kalzium-Ionen, aus dem umgebenden Milieu führt zu einem Kationen-Mangel im Medium. Dieser Mangel kann in *P. aeruginosa* durch einer Destabilisierung und Modifizierung der Lipopolysaccharide der äußeren Membran zur Zellyse führen [166]. Sublethale Konzentrationen von eDNA dagegen können durch die Kationenchelatierung eine Antibiotika-Resistenz vermitteln. So kann der Mangel an Kationen im Medium die Expression eines Operon

indirekt induzieren, welches den Zellen eine Resistenz gegenüber kationischen antimicrobiellen Peptiden, wie Polymyxin B, vermittelt [166].

In vielen Fällen ist der Ursprung der eDNA in der EPS-Matrix noch nicht aufgedeckt. Bislang existieren drei Hypothesen zur eDNA-Abgabe, die durch Studien an diversen Bakterien-Spezies untermauert wurden. eDNA kann freigesetzt werden durch: a) die Lyse einer Subpopulation der Biofilm-assoziierten Zellen [4, 199, 248]; b) den Transport mittels Membran-Vesikeln [205, 222]; und c) durch aktive Sekretion, z. B. über ein Typ IV Sekretionssystem in *N. gonorrhoeae* [52]. In den meisten Fällen der bisher erforschten Biofilm-Spezies wird die eDNA allerdings passiv durch die Lyse einer Subpopulation der Zellen freigesetzt. Die Mechanismen und die Regulation der Zellyse sollen im folgenden Abschnitt näher beschrieben werden.

### 2.1.6 Zellyse

Die Freisetzung von DNA und anderen zellulären Komponenten ist von entscheidender Bedeutung für den Aufbau und die Struktur des Biofilms in sehr vielen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien. Dabei wird diese Abgabe meist auf die Lyse einer Subpopulation von Zellen zurückgeführt [4, 34, 199, 208, 248].

#### Autolyse-Systeme

In Gram-negativen Bakterien, wie *Enterococcus faecalis* und *S. epidermidis*, greifen sogenannte Autolysine – bakterielle Murein-Hydrolasen – und extrazelluläre Proteasen in die Biofilmbildung durch die Lyse der Zellen und die daraus resultierende Freisetzung von eDNA ein [84, 199, 248]. Diese Murein-Hydrolasen spalten aufgrund der Aktivität diverser Amidase-, Glukosaminidase- und Endotransglykosidase-Domänen einzelne Komponenten der Peptidoglykan-Schicht und sind so an einer Vielzahl von biologischen Prozessen, wie Zellwachstum und -teilung und dem Recyceln von Peptidoglykan beteiligt [6, 105, 207, 226]. Im Fall einer unkontrollierten oder stark induzierten Aktivität können diese, dann als Autolysine bezeichneten, Proteine die Lyse der Zelle verursachen. Im Fall von *S. epidermidis* ist das Autolysin AtlE durch die Zellyse vermittelte DNA-Freisetzung für die primäre Anheftung der Zellen und die darauffolgende Biofilmbildung in Mikrotiter-Platten entscheidend [93, 199].

Andere Bakterienpezies durchlaufen einem programmierten Zelltod, der dem Apoptose-Mechanismus von höheren Organismen gleicht [83]. So ist in *S. aureus* das Cid/Lrg-Regulationssystem für die Freisetzung von DNA aus lysierten Zellen verantwortlich und spielt damit eine entscheidende Rolle während der Biofilmentwicklung [208]. Dieses Regulationssystem beeinflusst die Aktivität der Murein-Hydrolase und die Autolyse der Zellen [28]. *cidA* des *cidABC*-Operons kodiert für ein Bakteriophagen-ähnliches Holin, während *lrgA* des *lrgAB*-Operons für ein Antiholin kodiert [10]. Holine sind „Pförtner“ des Lyse-Prozesses zu präzise regulierten Zeitpunkten und bilden Löcher in der Zytoplasmamembran der bakteriellen Zelle [265]. Auf post-transkriptioneller Ebene können Holine so den Transport der Murein-Hydrolasen entlang der zytoplasmatischen Membran oder die Abgabe und die Aktivierung des Enzyms regulieren [188]. Als Antagonist hat das Antiholin einen inhibitorischen Effekt auf die Holin-Aktivität. Die Gene *cidB* und *lrgB* kodieren für hydrophobe Proteine mit bisher ungeklärter Funktion.

Eine Deletion von *cidA* in *S. aureus* führt zu einer dramatischen Reduktion der Zelladhäsion und hat einen negativen Einfluss auf die Biofilm-Morphologie, hervorgerufen durch das Fehlen der Autolyse-Aktivität [208]. Auch in *P. aeruginosa* führt eine Mutation in den Cid/Lrg

homologen Proteinen zu einer Akkumulation von toten Zellen innerhalb der Mikrokolonien [10]. Obwohl häufig eine, durch Phagen induzierte, Zellyse für die Freisetzung von eDNA, die Biofilmmreifung und das Ablösen von Zellen verantwortlich gemacht wird [4], zeigten neue Studien in *P. aeruginosa*, dass auch das Cid/Lrg-System eine wichtige Rolle während der Biofilmbildung einnimmt [143].

Aufgrund der funktionalen Ähnlichkeit zu den Proteinen Bax und Bcl-2 aus dem eukaryotischen Apoptose-Regulationssystem [83] kann diesem Autolyse-System eine Rolle im bakteriellen programmierten Zelltod-Mechanismus zugeteilt werden [10]. Dieser Apoptose-Mechanismus kann der Bakterienpopulation eine Toleranz gegenüber antimikrobieller Substanzen und einen Schutz vor einer Bakteriophagen-Induktion vermitteln, indem sich einzelne Zellen für das Überleben der Gesamtpopulation „opfern“ [10, 207].

## Phagen

Bakteriophagen sind in allen Umgebungen und ökologischen Nischen präsent und überragen in ihrer Anzahl Prokaryoten um den Faktor 10 [210]. Neben den lytischen Phagen, die ihren Wirt augenblicklich nach der Infektion lysieren, können temperente Phagen ihre DNA in das Wirts-Genom integrieren und so als Prophagen in der Wirtszelle überdauern [37, 272]. Diese Lysogenie ist eine adaptive, reproduktive Strategie, welche es dem Phagen erlaubt, besonders während ungünstiger physiologischer Bedingungen, in Situationen, in der wenige Wirtszellen zur Verfügung stehen, im Wirt zu überleben. Analysen deckten das Vorhandensein von Prophagen und Prophagen-Elementen in nahezu allen bakteriellen Genomen auf [32]. So besitzt *E. coli* K12 beispielsweise 6 kryptische Prophagen und 3 Prophagen-ähnliche Elemente [106].

Im lysogenen Lebenszyklus sind virale Funktionen für die Replikation und den Aufbau des Phagenpartikels durch einen Phagen-kodierten Repressor reprimiert [195]. Der Prophage wird über die Replikation der Wirtszelle an die nächste Generation „vererbt“ und kann so in einer Population überdauern. Doch nicht nur für den Phagen hat der lysogenen Lebenszyklus Vorteile. Durch die Synthese des Phagengen-Repressors ist auch die Bakterienzelle durch eine weitere Infektion von extrazellulären lytischen Phagen geschützt [1, 94]. Des Weiteren können temperente Phagen auch zur Fitness der Wirtszelle beitragen, indem sie z. B. für Proteine kodieren, die die Virulenz des Wirts oder die Resistenz gegenüber dem Immunsystem steigern können [262]. Beispiele für Phagen-kodierte Virulenzfaktoren sind das Cholera Toxin aus *V. cholerae* und das Shiga Toxin mancher *E. coli* Stämme [261, 262].

Durch verschiedene Agentien, wie Mitomycin C und Antibiotika, physiologischer Stress der Wirtszelle oder UV-Bestrahlung können Phagen aus ihrem lysogenen in den lytischen Lebenszyklus konvertieren [73, 136]. Dabei verursachen diese Substanzen bzw. diverse Stresssituationen einen Schaden an der Wirtszellen-DNA und durch den RecA-vermittelten Reparaturmechanismus wird der lytische Zyklus der Phagen induziert. Doch auch Stress- bzw. RecA-unabhängige, spontane Phagen-Induktionen wurden in diversen Bakterienspezies beobachtet [73, 271]. Dabei scheint besonders QS eine wichtige Rolle zu spielen. In *E. coli* – das selbst keine QS-Botenstoffe synthetisiert, dennoch einen Rezeptor hierfür besitzt – führt die externe Zugabe des QS-Botenstoffes Acyl-Homoserin-Lakton zur Induktion des Phagen Lambda [73]. Auch in *P. aeruginosa* scheint eine QS-regulierte Phageninduktion im Biofilm für die Zellyse verantwortlich zu sein [271].

In den letzten Jahren wurde die Bedeutsamkeit von Prophagen in der Biofilmentwicklung vieler Bakterien-Arten zunehmend deutlich [73, 106, 207, 209, 241, 267, 270, 271]. Das hier am besten untersuchte Beispiel ist der filamentöse Phage Pf4 in *P. aeruginosa* Biofilmen [4, 209], der kontinuierlich aus den Zellen entlassen wird [271, 275]. Dabei bildet dieser Phage keine Plaques und hat keinen Effekt auf das Wachstum der Wirtspopulation. Im Laufe der Biofilmentwicklung

kann der Phage Pf4 jedoch zu einer superinfektiösen lytischen Form konvertieren, lysiert in dieser Variante eine Subpopulation der Biofilm-assoziierten Zellen besonders innerhalb von dreidimensionalen Strukturen, und fördert so die Zerstreung des Biofilms [209, 269, 271]. Interessanterweise führt hier also nicht die Phageninduktion in der Wirtszelle, sondern die Phageninfektion zu einer zeitlich und räumlich organisierten Zellyse im Biofilm [271]. Außerdem scheint die Infektion der *P. aeruginosa* Zellen mit dieser superinfektiösen Form von Pf4 ein Schlüsselprozess in der Bildung von phänotypischen Varianten zu sein [209, 270]. Diese, als "Small Colony Variants (SCV)", bezeichneten veränderten Bakterienzellen können an ihrer Oberfläche mit Phagenpartikeln dekoriert sein, durch die die Wirtszellen untereinander vernetzt werden können [209]. SCVs sind häufig Auslöser für chronische Infektionen und zeichnen sich besonders durch einen verlangsamten Stoffwechsel und eine erhöhte Antibiotika-Toleranz aus [85].

Auch in *E. coli* Biofilmen spielt die Phagen-induzierte Zellyse eine entscheidende Rolle [267]. Transkriptom-Analysen zeigten, dass unter anderem die Genexpression der kryptischen Prophagen CP4-57 und DLP12 in ausgereiften Biofilmen stark induziert wird [54]. Bereits nach 4 Stunden in der Biofilmentwicklung wird der Prophage CP4-57 aktiv und schneidet sein Genom aus dem Wirtsgenom aus. Anders dagegen der Prophage DLP12, der sowohl in planktonischen *E. coli* Zellen, als auch in allen Phasen der Biofilmbildung aktiv werden kann. Die Aktivität beider Prophagen unterliegt dabei indirekt dem globalen Transkriptionsregulator Hha [68]. Durch das Ausschneiden und den daraus resultierenden Verlust der Phagen-DNA von CP4-57 im Genom von *E. coli* wird die Expression von Genen induziert, die unter anderem für Zellyse-vermittelnde Faktoren, wie Phagen-Integrase, und für Komponenten der bakteriellen Flagelle kodieren [267]. Des Weiteren wird die Expression von Genen reprimiert, deren Produkte am Kohlenhydrat-Metabolismus und an der Energieproduktion beteiligt sind. Diese Veränderung im Expressionsmuster führen, neben der Zellyse, zum Ablösen von beweglichen Zellen. Zum anderen wird dadurch die Teilungsgeschwindigkeit und der Nährstoffbedarf der verbleibenden Biofilmpopulation gesenkt.

Auch in Gram-positiven Prokaryoten kann die Aktivität von Phagen zur Biofilmentwicklung beitragen [34, 206, 233]. In *S. aureus* beispielsweise sind Phagenpartikel – hierbei handelt es sich wahrscheinlich um die Phagen  $\Phi$ 11,  $\Phi$ 12 und  $\Phi$ 13 – bereits nach 4 Stunden in der Biofilmentwicklung detektierbar und werden auch im weiteren Verlauf freigesetzt. Resch und Kollegen postulieren, dass durch diese Phagen-Freisetzung zum einem die Membranintegrität der *S. aureus* Zelle gestört und damit die Aufnahme von DNA (Transformation) erleichtert wird [206]. Zum anderen können DNA und andere zytoplasmatische Zellbestandteile durch Zellyse freigesetzt werden, die verbleibenden Zellen als Nährstoffquelle und Matrix-Material dienen. Auch in *S. pneumoniae* führt eine spontane Phageninduktion zur, durch die Lyse der Wirtszelle vermittelten, DNA-Freigabe und hat somit einen positiven Effekt auf die Biofilmentwicklung [34].

Zusammenfassend zeigen diese Beispiele, dass die Aktivierung der Prophagen, die Umschaltung vom lysogenen in den lytischen Zustand, einen großen Einfluss auf die Biofilmentwicklung der Wirtspezies nimmt. Dabei kann die durch die Phagen vermittelte Zellyse die Freisetzung von DNA als Baustoff der EPS-Matrix im Biofilm begünstigen oder lysierte Zellkomponenten dienen den lebenden Biofilm-assoziierten Zellen als Nährstoffquelle. Auch die Phagenpartikel selbst können als strukturelle Komponente ihre Wirtszellen miteinander verbinden. Die Phageninfektion kann auch zu neuen phänotypischen Varianten des Wirts führen, die besonders in physiologisch ungünstigen Bedingungen gegenüber den Wildtyp-Zellen einen Vorteil, wie erhöhte Antibiotika-Resistenz und reduzierter Nährstoffbedarf, ausbilden können.

## 2.2 Der Genus *Shewanella*

Der Genus *Shewanella* umfasst eine sehr diverse Gruppe von fakultativ anaeroben Bakterien, die unterschiedlichste aquatische und sedimentäre Habitate besetzen können (siehe Tab. 1). Ihre respiratorische Vielfalt und ihre Psychrotoleranz ermöglichen den *Shewanella* spp. diese weite Verbreitung und gelten gleichzeitig als das charakteristische Merkmal dieses Genus [90].

**Tab. 1: *Shewanella* Spezies mit sequenzierten Genomen [63].**

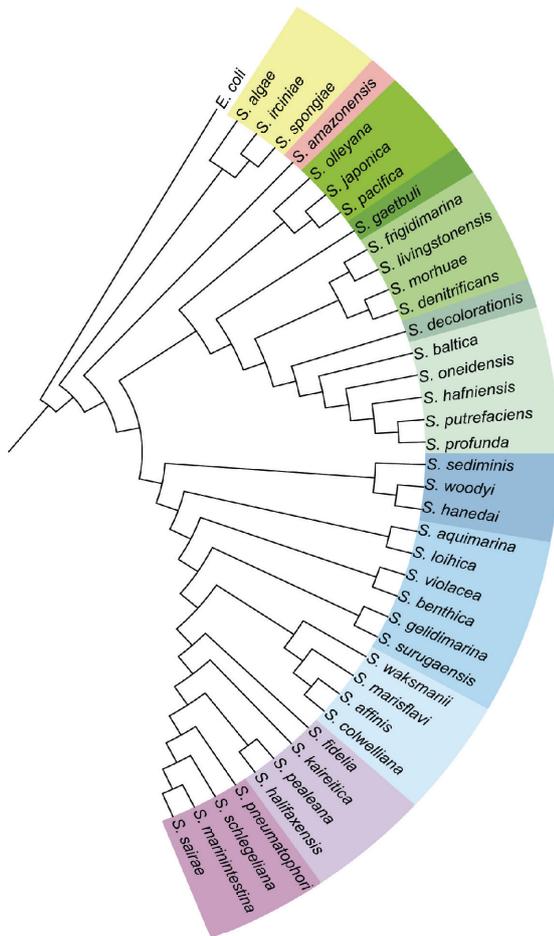
Spezies oder Stamm	Geografischer Ursprung	Habitat, Charakteristika	Quelle
<i>S. amazonensis</i> SB2B	Amapa Fluss, Brasilien	Sediment; suboxisches Redoxbedingungen; Tiefe: 1 m	[256]
<i>S. baltica</i> OS155	Ostsee	Meerwasser; oxische Zone O <sub>2</sub> 2ml/l; Tiefe: 90 m	[26]
<i>S. baltica</i> OS185	Ostsee	Meerwasser; oxisch-anaoxische Grenzschicht; Tiefe: 120 m	[26]
<i>S. baltica</i> OS195	Ostsee	Meerwasser; anoxische Zone; Tiefe: 140 m	[26]
<i>S. benthica</i> KT99	Tonga-Kermadec Graben	Tiefsee; Hochdruckzone; Tiefe: 9000 m	[50]
<i>S. halifaxensis</i> HAW-EB4	Hafen von Halifax , Neu-Schottland, CA	Sediment, Schwerindustriehalde, Tiefe: 215 m	[286]
<i>S. oneidensis</i> MR1	Lake Oneida, USA	Limnisches Sediment, anoxische Zone, Mn(IV)-Reduktion	[257]
<i>S. pealeana</i> ANG-SQ1	Wood Hole Harbor, USA	Tintenfisch, Nidamentaldrüse	[134]
<i>S. piezotolerans</i> WP3	Westpazifik (142°Ost, 8°Nord)	Sediment, Tiefe: 1914 m	[264]
<i>S. putrefaciens</i> CN-32	Albuquerque, USA	Schiefersandstein, Tiefe: 250 m	[64]
<i>S. putrefaciens</i> 200	Alberta, CA	Rohöl-Rohrleitung	[184]
<i>S. sediminis</i> HAW-EB3	Hafen von Halifax , Neu-Schottland, CA	Sediment, 50 nautische Meilen vor der Küste, Tiefe: 215 m	[285]
<i>S. sp.</i> ANA-3	Wood Hole Harbor, USA	Brackwasser, Arsenbehandelter Holzpier	[216]
<i>S. sp.</i> MR-4	Schwarzes Meer	Meerwasser; oxische Zone, 16°C, Tiefe: 5 m	[177]
<i>S. sp.</i> MR-7	Schwarzes Meer	Meerwasser; anoxische Zone; Hoher Nitratgehalt, Tiefe: 60 m	[177]
<i>S. violaceae</i> DSS12	Ryuku Graben, Phillipinische See	Sediment, Tiefe: 5110 m	[179]
<i>S. woodyi</i> MS32	Straße von Gibraltar, Mittelmeer	Detritus, Tiefe: 370 m	[148]

So umfasst die physiologisch und ökologisch heterogene Gruppe der *Shewanellaceae* nicht nur frei lebende Organismen, deren marine oder limnische Habitate sich im Bezug auf Nährstoffangebot, Salzgehalt, Temperatur, Sauerstoff und Druck stark unterscheiden [257]. Manche Arten leben auch in symbiontischer Beziehung zu Eukaryoten [7], in syntrophischer Partnerschaft mit anderen Mikroorganismen [90] oder treten als Pathogene auf [104].

Allgemein bilden *Shewanella* spp. eine Gattung innerhalb der  $\gamma$ -Proteobakterien und formen Gram-negative Stäbchen mit einer 2-3  $\mu\text{m}$  Länge und einem Durchmesser von 0,4-0,7  $\mu\text{m}$  [257]. Im Hinblick auf ihre respiratorische Diversität und durch die einfache Kultivierbarkeit und genetische Manipulation gelangen Shewanellen immer mehr ins Blickfeld der biotechnologischen Forschung.

## 2.2.1 Historie der *Shewanellaceae*

Die taxonomische Position des Genus *Shewanella* wurde in den letzten Jahrzehnten immer wieder neu überdacht. Bereits 1931 wurden Bakterien dieser Gattung in ranziger Butter isoliert [51]. Damals noch als *Achromobacter putrefaciens* klassifiziert, wurde das Bakterium 1941 nach biochemischen Charakterisierungen in *Pseudomonas* umbenannt [138]. Nach einer weiteren Reklassifizierung in den Genus *Alteromonas* 1972 [9], wurde 1985 aufgrund von 16S-rRNA Sequenzstudien die neue Gattung der *Shewanellae* innerhalb der Ordnung *Alteromonadales* begründet [144]. Bis heute sind 48 eigenständige Arten mit 17 vollständig und 6 teilweise sequenzierten Genomen bekannt [90] (Abb. 2).



**Abb. 2: Phylogenetische Analyse des Genus *Shewanella* nach Hau *et al.*, 2007 [90].**

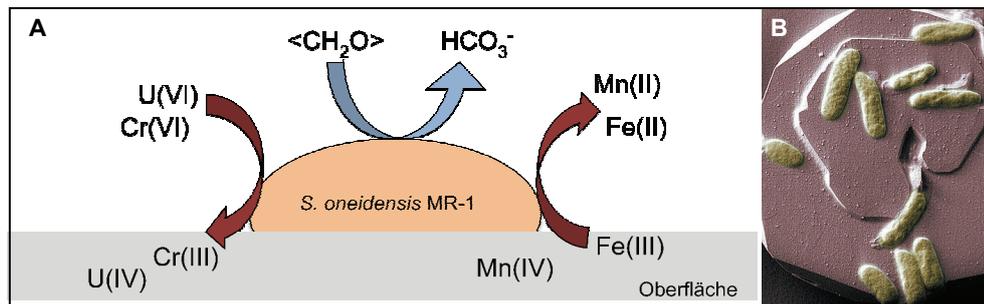
Der phylogenetische Vergleich erlaubt die Gruppierung von verschiedenen *Shewanella* spp. in Bezug auf Habitat und genetischen Ursprung. Die verschiedenen farblichen Cluster beinhalten dabei Spezies, die ähnliche ökologische Nischen bewohnen. So bilden Isolate aus dem Darmtrakt von Fischen (unten, violett) eine monophyletische Gruppe.

Die 16S-rRNA Sequenzen wurden für diese Analyse auf etwa 1200 Bp getrimmt um Spezies mit unvollständig sequenzierten 16S-rRNA Gensequenzen miteinbeziehen zu können. Der bioinformatische Abgleich erfolgte mit ClustalW. Der phylogenetische Baum wurde beruhend auf dem Neighbor-Joining Algorithmus nach 1000 bootstraps mit PAUP berechnet. Die Visualisierung erfolgte online (<http://itol.embl.de/>) mit dem Interactive Tree of Life [126].

## 2.2.2 respiratorische Diversität

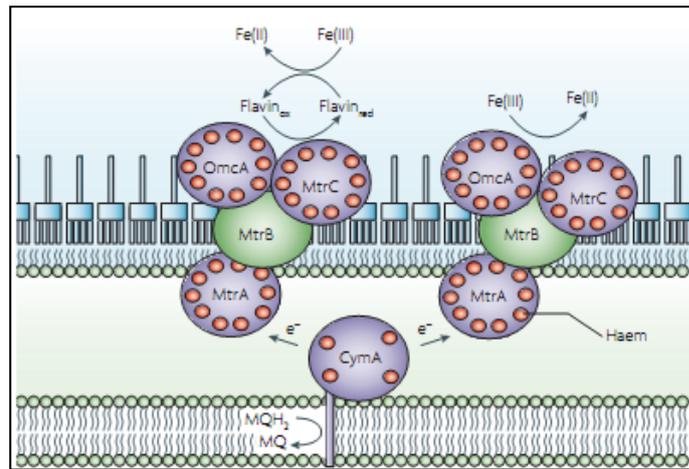
Die neue Forschungs-Ära der Shewanellen begann 1988 mit einer publizierten Charakterisierung von *Shewanella oneidensis* MR-1, welches unter Ausschluss von Sauerstoff dissimilatorisch Mangan- und Eisen-Ionen reduzieren kann [172] (Abb. 3). In weiteren Forschungen wurde schnell deutlich, dass eine ganze Vielfalt an terminalen Elektronenakzeptoren unter anaeroben Bedingungen von *Shewanella* spp. verwendet werden kann [172, 257]. Dazu zählen etwa 20 organische und anorganische Verbindungen, Elemente und Metalle [90]. So ist *S. oneidensis* MR-1 in der Lage, Sulfide aus Thiolsulfat zu gewinnen und kann elementaren Schwefel reduzieren,

welches für fakultative Anaerobier eine eher ungewöhnliche Eigenschaft darstellt [63]. Neben TMAO (Trimethylaminoxid), DMSO (Dimethylsulfoxid) und Fumarat [31] können vor allem viele Metallionen, wie Eisen(III)oxid [31], Chromat [276], Uranat [31], Plutonium(IV)oxid [22], und Technetium(VII)oxid [277] in Kopplung mit einer Laktat-Oxidation reduziert werden. Diese Vielfalt an Elektronenakzeptoren befähigt *Shewanella* spp. der Besiedlung physiologisch unterschiedlicher Habitats. Gleichzeitig liegt hierin ihr großes Potenzial für biologische Sanierungen von Abwässern und der Säuberung von Radionuklid-kontaminierten Umgebungen [140]. So können *Shewanella* spp. in Abwasser oder Böden gelöstes Uran(VI)oxid zu unlöslichem Uran(IV)oxid reduzieren [90], welches ausfällt und so aus der Umwelt entfernt werden kann (Abb. 3).



**Abb. 3: (A) Modell für bakterielle dissimilatorische Reduktion von Metallionen.** Unter anaeroben Bedingungen können *Shewanella* spp. eine Vielfalt von Substraten als terminale Elektronenakzeptoren für die Laktat- und Pyruvat-Oxidation verwenden. Dabei kann die Reduktion auf die Löslichkeit der Substrate eingreifen. Durch die Konversion von löslichen Mineralionen, wie U(VI) und Cr(VI), in eine lösliche Form (U(IV) und Cr(III)) können diese Schadstoffe aus kontaminierten Abwässern isoliert werden. Unlösliche Substrate aus Eisen(III)- oder Mangan(IV)-Ionen werden in eine lösliche Form konvertiert. **(B) Elektronenmikroskopische Aufnahme von *S. putrefaciens* CN-32 Zellen auf dem Eisenoxid-haltigen Mineral Hämatit** (vom Pacific Northwest National Laboratory).

Sequenz-Analysen von *S. oneidensis* MR-1 deuten auf eine Vielzahl von möglichen, für die Reduktion von unlöslichen Substraten benötigten Elektronen-Transportsystemen, darunter 42 putative Cytochrome [155]. Frühere Studien bewiesen, dass die respiratorische Vielfalt in *S. oneidensis* MR-1 von Cytochrom C abhängig ist. Zusammen mit anderen Cytochromen scheint besonders der Komplex aus Shuttleproteinen (Abb. 4), bestehend aus den periplasmatischen (MtrA, DmsE) und in der äußeren Membran-verankerten Cytochromen (MtrC, OmcA), dem Tetrahämcytochrom CymA in der inneren Membran und schließlich dem Protein MtrB in der äußeren Membran für die Metallionen-Reduktion verantwortlich zu sein [12, 13, 169, 173, 174]. Von den verbleibenden Cytochromen kann nur einer kleinen Zahl aufgrund von Vergleichen mit analogen Proteinen eine Funktion zugewiesen werden. Einige sind in der Veratmung von Fumarat [173, 174], Nitrat [43], DMSO und TMAO [81] beteiligt. Darüber hinaus ist von einer umfangreichen Anzahl von Cytochromen bekannt, dass deren Expression durch Thiosulfat und Nitrat stimuliert wird [63].



**Abb. 4: Extrazellulärer Elektronentransfer in *Shewanella* spp nach [63].** Durch eine komplexe respiratorische Kette aus Cytochromen können Elektronen über die bakterielle Membran zum terminalen Elektronenakzeptor transportiert werden (hier Fe(III)-Ionen). Die Cytochrome MtrC und OmcA sind Lipoproteine, die über ein Typ II Proteinsekretionssystem durch die Membranen transportiert werden. Verankert in der äußeren Membran treten sie in direkten Kontakt mit Mineralien oder Elektrodenoberflächen.

### 2.2.3 Regulation

Bakterien der Gattung *Shewanellaceae* sind bekannte Vertreter in komplexen Gemeinschaften in aquatischen und sedimentären Systemen, deren Temperatur, Nährstoff- und Sauerstoffgehalt saisonal schwanken können [103]. Ihre vielseitiges sensorisches, metabolisches und regulatorisches Potenzial ermöglicht es dieser Gattung, in solchen gradientengeprägten Umgebungen zu überleben. Sequenz-Analysen von *S. oneidensis* MR-1 identifizierten 235 Ein-Komponenten-Signaltransduktion-Proteine und 96 Zwei-Komponenten-Systemen (<http://mistdb.com>), die dem Organismus eine optimale Anpassung an die jeweils vorherrschende Bedingung vermitteln. Dabei sind besonders drei Klassen von Signaltransduktion-Proteinen in *S. oneidensis* MR-1 überrepräsentiert. (I) Proteine mit PAS Domänen - eine ubiquitäre sensorische Domäne u. a. zur Detektion von Licht, Sauerstoff und Redox-Potential [245] – und (II) Chemotaxis-Proteine ermöglichen es dem Bakterium, Veränderungen der Umgebung wahrzunehmen und sich an sie anzupassen, aber auch aktiv neue ökologische Nischen mit günstigeren Bedingungen aufzusuchen [63].

Die dritte Klasse (III) bilden die Modulator-Proteine im zyklischen Nukleotid-Signalsystem [63]. c-di-GMP beispielsweise kontrolliert in  $\gamma$ -Proteobakterien verschiedene Funktionen, wie Virulenz, Biosynthese von Zellulose, Motilität und Biofilmbildung [116, 227, 243]. Insgesamt besitzt *S. oneidensis* MR-1 zum Auf- bzw. Abbau von c-di-GMP 51 potenzielle Diguanylat-Zyklasten, 27 Phosphodiesterasen und 20 Hybrid-Proteine [63]. Diese hohe Anzahl an „c-di-GMP-Proteinen“ verdeutlicht die Bedeutsamkeit der post-transkriptionellen Kontrolle und Regulierung von zellulären Prozessen als Antwort auf eine Vielzahl von Umweltsignalen in *Shewanella* spp..

Ebenso wie c-di-GMP spielt zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) eine wichtige Rolle als sekundärer Botenstoff in vielen Prokaryoten. Hier dient es besonders der Aktivierung des Katabolitgen-Aktivatorproteins (CRP), der eine wichtige Rolle in der Regulierung des Kohlenstoffwechsels, aber auch in der Regulation der Antibiotika-Biosynthese, des phototrophen Wachstums und der Pathogenese spielt [21]. Interessanterweise kontrolliert CRP in *S. oneidensis* MR-1 die anaerobe Respiration durch einen bisher ungekannten Aktivierungsmechanismus [214]. In anderen Bakterien übernimmt das Sauerstoffsignalprotein FNR diese Aufgabe [121]. Ein in

*Shewanella* identifiziertes, orthologes FNR-Protein ist nicht für das anaerobes Wachstum der Zellen essenziell [147, 213]. Wahrscheinlich stellt die Verlagerung der anaeroben Regulation von FNR zu CRP die regulatorische Anpassung an dynamische Redoxbedingungen der Umwelt dar und gewährt *S. oneidensis* MR-1 somit die benötigte Flexibilität im Metabolismus.

#### 2.2.4 Kohlenstoff-Metabolismus

Das nicht-fermentative Bakterium *S. oneidensis* MR-1 kodiert eine Vielzahl von Stoffwechselwegen, darunter den Katabolismus von organischen Säuren (C1-3), Fettsäuren, Cofaktoren, Aminosäuren, Peptiden und Nukleotiden [224]. Diese Vielfalt reflektiert die ökologische Rolle von *S. oneidensis* MR-1 als Konsument von organischen Abbauprodukten. Das Bakterium kann eine Auswahl von Aminosäuren und Nukleosiden als Kohlenstoff- und Energiequelle verwerten. Dabei bevorzugt *S. oneidensis* MR-1 anstelle von Zuckern – mit Ausnahme von *N*-Acetyl-Glukosamin (NAG) – 2- bis 3-Kohlenstoff-Verbindungen, wie Laktat, Pyruvat und Acetat [223, 257, 281]. Des Weiteren wird eine Vielzahl von Aminosäuren, Di- und Tripeptiden als Stickstoffquelle verwendet [57, 63].

Pinchuk und Kollegen konnten außerdem zeigen, dass *Shewanella* spp. extrazelluläre DNA als alleinige Phosphat-, Stickstoff-, Kohlenstoff- und Energiequelle unter aeroben und anaeroben Bedingungen nutzen können [191]. In dieser Studie wurde die Verwertung von DNA als Phosphatquelle in *S. oneidensis* MR-1 direkt mit der Aktivität von extrazellulären Nukleasen und Phosphatasen assoziiert.

Aus genomischen Annotationen und unter Zuhilfenahme von Daten aus der Primärliteratur [Reed, J. L., unveröffentlicht], kann ein metabolisches Modell für *S. oneidensis* MR-1 erstellt werden, indem 713 metabolische Reaktionen unter Einbezug von 780 Genen und 623 Metaboliten beteiligt sind [63].

#### 2.2.5 *S. oneidensis* MR-1

Benannt nach seinem Isolationsort, Lake Oneida im Staate New York in den USA und bezogen auf die manganreduzierende Eigenschaft [257] ist dieses Bakterium der wohl häufigste Vertreter in biotechnologischen und mikrobiologischen Studien innerhalb der Gattung *Shewanellaceae*.

Im Gegensatz zu den meisten seiner Verwandten, die marine Lebensräume bevorzugen, besiedelt *S. oneidensis* MR-1 limnische Habitate und ist beweglich durch den Einsatz einer polaren Flagelle. Das etwa 4,97 MBp große Genom und das 1,6 MBp große Megaplasmid von *S. oneidensis* MR-1 kodieren, mit einem durchschnittlichen GC-Gehalt von über 43 %, für 5066 Gene [92]. Der Organismus trägt in seinem Chromosom drei Prophagen, den Lambda-ähnlichen Prophage LambdaSo (50,84 MBp) und zwei Mu-ähnliche Prophagen MuSo1 (34,55 MBp) und MuSo2 (34,53 MBp) [92].

Der Modell-Organismus der dissimilatorischen Eisenionenreduktion beeinflusst durch seine respiratorische Vielfältigkeit Prozesse in geochemischen Kreisläufen und steht, bezüglich der Mobilisierung und Immobilisierung von potenziellen anthropogenen Schadstoffen immer mehr im Interesse der Forschung [90, 140, 141, 176]. Studien zeigten, dass *S. oneidensis* MR-1 unlösliche terminalen Elektronenakzeptoren durch eine Elektronentransportkette an der Zelloberfläche reduzieren kann [72, 225]. Des Weiteren scheint das Bakterium sogenannte „Nanokabel“ (engl.:

Nanowires) für die Reduktion von festen Stoffen auszubilden [58, 79]. Diese extrazellulären stromleitenden Anhängsel bestehen aus dünnen, 3-5 nm dicken Filamenten, oder bilden Bündel von Nanokabeln, die sich zwischen den Zellen erstrecken und Elektronen leiten können. In jedem Fall ist eine direkte Interaktion der Zellen mit, oder eine enge räumliche Nähe zur, redox-aktiven Oberfläche für die Respiration unerlässlich. Vorherige Studien belegten, dass *S. oneidensis* MR-1 redox-aktive, aber auch inerte Oberflächen durch die Anheftung und Ausprägung von Biofilmen kolonisieren kann [153, 246, 250].

### **Biofilmbildung in *S. oneidensis* MR-1**

Unter hydrodynamischen Bedingungen bilden *S. oneidensis* MR-1 Zellen einen sehr kompakten Biofilm mit drei-dimensionalen Strukturen aus [249]. Die genaue Zusammensetzung der produzierten EPS-Matrix ist dabei noch unbekannt. Analysen von Zellaggregaten in planktonischer Kultur deuten auf die Anwesenheit von eDNA, Proteinen und Exopolysacchariden aus *α*-D-Mannose oder *α*-D-Glukose hin [154], doch bleibt unklar, ob die Biofilm-Matrix aus den gleichen Komponenten zusammengesetzt ist.

In diversen Studien wurden mittels Mutanten-Analysen einige Faktoren identifiziert, die für die korrekte Ausbildung von Biofilmen essenziell sind. Der MSHA Pilus und das in der äußeren Membran verankerte Protein AggA spielen bei der initialen Anheftung, aber auch bei der Vermittlung von Zell-Zell-Interaktionen eine entscheidende Rolle [48, 49, 154, 221, 250].

*S. oneidensis* MR-1 besitzt drei Chemotaxis-Systeme, wobei ein System durch ein Insertionselement in *cheA-2* kryptisch ist, und 27 Methyl-akzeptierende Proteine. Ein System (u. a. mit *cheA-3*) wurde bereits auf die sensorische Relevanz gegenüber verschiedener Elektronenakzeptoren untersucht (Mandy Ward, persönliche Mitteilung). Für das zweite System (u.a. mit *cheA-1*), welches in direkter räumlicher Nähe zum Flagellen-Kluster lokalisiert, konnte eine Rolle in der Biofilmbildung nachgewiesen werden [29].

Die Expression des Genklusters *mxdB* ist für die Ausbildung von drei-dimensionalen Strukturen von essentieller Bedeutung [232, 249]. Dabei kodiert *mxdB* für ein Protein, das auf eine bisher nicht näher charakterisierte Weise indirekt am Metabolismus des Botenstoffs c-di-GMP beteiligt ist [202]; *mxdB* kodiert für eine Membran-assoziierte Glykosyltransferase, *mxdB* für ein Protein mit Homologie zu Proteinen von Efflux-Pumpen; *mxdB* für ein hypothetisches Protein. Ein durch MxdA-vermittelten Anstieg von c-di-GMP könnte die Aktivität von MxdB stimulieren, welches durch die Synthese von Polysacchariden zur Stabilisierung der EPS-Matrix führen kann.

Studien in diversen Bakterienspezies zeigen, dass Umweltbedingungen Einfluss auf die Ausbildung von Biofilmen nehmen [77]. Der Gehalt von Sauerstoff im Medium beeinflusst *S. oneidensis* MR-1 Biofilme. Ein plötzlicher Abfall der Sauerstoffkonzentration führt zum Ablösen von 50 % bis 80 % der Biofilm-Biomasse [251].

Die evolutionäre Adaptivität und Robustheit dieser Oberflächen-assoziierten Gemeinschaften, die durch das Zusammenspiel einer Vielfalt von Faktoren entstehen, können in ihrer Wichtigkeit nicht überschätzt werden. Biofilme bilden somit ein ideales, sehr breites Forschungsfeld, sowohl in Bezug auf die Anzahl der Biofilm-bildenden Bakterien, als auch in Anbetracht der Tatsache, dass es die überwiegend vorkommende Persistenzform der Mikroorganismen darstellt.

## Zielsetzung

Genetische Untersuchungen und Analysen von Transkriptomen haben in den letzten Jahren dazu beigetragen, ein Verständnis für molekulare und physiologische Mechanismen der Zellen während der Bildung von Biofilmen zu entwickeln. Bisher blieben aber Signale und zelluläre Anpassungen, die zum Anheften der Zellen und damit zum ersten Schritt in der Biofilmentwicklung führen, weitestgehend unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst die zelluläre Anheftung und die Biofilmbildung von *S. oneidensis* MR-1 unter verschiedenen Bedingungen charakterisiert werden. Anschließend sollten mit Hilfe von innovativen Zellernte-Methoden und Transkriptom-Analysen von initial adhärennten *S. oneidensis* MR-1 Zellen die frühen Vorgänge in der mikrobiellen Anheftung an eine Oberfläche identifiziert werden.

1. Charakterisierung der Biofilmentwicklung von *S. oneidensis* MR-1:

Die Bildung von Biofilmen in diesem Organismus sollte in Abhängigkeit der vorherrschenden Bedingung (statisch; hydrodynamisch) untersucht werden. Dazu wurde zunächst ein statisches Inkubationssystem zur mikroskopischen Analyse der Biofilmentwicklung etabliert.

2. Entwicklung eines hydrodynamischen Zellerntesystems:

Mit Hilfe dieses Erntesystems sollten Zellen nach Anheftung an einer Oberfläche unter hydrodynamischen Bedingungen akkurat isoliert werden, um in späteren Untersuchungen ihr Transkriptionsprofil zu analysieren. Durch Verwendung von unterschiedlichen Oberflächen – inertes bzw. redox-aktives Substrat – sollten spezifische zelluläre Prozesse während der Anheftungsphase aufgedeckt werden.

3. Analysen der Transkriptomprofile Oberflächen-assoziiierter Zellen:

Die Analysen des globalen Expressionsprofils von adhärennten Zellen unter hydrodynamischen bzw. statischen Bedingungen im Vergleich zum Profil planktonischer Zellen sollten Einblicke in zelluläre Veränderungen und Anpassungen während des Übergangs der Zellen von einem planktonischen zu einem sessilen Lebensstil gewähren.

Weiterführende Untersuchungen sollten die Ergebnisse der Transkriptom-Analysen aufgreifen, um die Rolle wichtiger identifizierter Faktoren in der zellulären Anheftung und der Biofilmbildung von *S. oneidensis* MR-1 näher zu charakterisieren. Daraus ergaben sich folgende Projekte:

4. Untersuchungen der Prophagen und zellytischer Prozesse in der Biofilmbildung

Genauere Analyse der Transkriptom-Daten ließ auf die Relevanz der Prophagen bezüglich initialer Anheftung schließen. Demzufolge sollten Deletionen der Prophagenome innerhalb des *S. oneidensis* MR-1 Chromosoms durchgeführt und deren Auswirkungen auf die Biofilmbildung untersucht werden. Zudem sollte der Einfluss von Prophagen auf die Populationsdynamik wachsender *S. oneidensis* MR-1 Zellen analysiert werden, was den Nachweis infektiöser Phagenpartikel beinhaltet.

5. Analyse der Funktionen extrazellulärer DNA in der Biofilmentwicklung

Aufgrund der Wichtigkeit Phagen-induzierter Zellyse für die Biofilmbildung von *S. oneidensis* MR-1 und eine daraus resultierende Freisetzung von zellulären Elementen sollten Effekte und Funktionen extrazellulärer DNA auf initiale Anheftung, sowie Biofilmbildung untersucht werden.

6. Charakterisierung zweier extrazellulärer Endonukleasen

Intensive Untersuchungen hinsichtlich extrazellulärer DNA, die deren signifikante Rolle für die Biofilmbildung untermauerte, führten zu der Analyse zweier extrazellulärer Endonukleasen, sowohl im Bezug auf Biofilmbildung, aber auch auf deren Fähigkeit, DNA als Nahrungsquelle zugänglich zu machen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Charakterisierung der Biofilmbildung von *Shewanella oneidensis* MR-1

Die Mehrzahl bisheriger mikroskopischer Studien der Biofilmbildung in *S. oneidensis* MR-1 beschränkt sich auf Analysen unter hydrodynamischen Bedingungen, durch den Einsatz von sogenannten Flusskammersystemen, in denen Zellen an eine Glasoberfläche adhären. Die Oberflächenbesiedlung und die Biofilmentwicklung kann anschließend mittels konfokaler Laserscanmikroskopie dokumentiert werden [250]. Diese hydrodynamische Lebensbedingung reflektiert aber möglicherweise weniger die natürlichen Konditionen dieses Lebensraums des in einem stehenden Gewässer lebenden Bakteriums. Im Flusskammersystem werden die Zellen konstant mit Nährstoffen versorgt, die Akkumulation von Metaboliten und Signalmolekülen wird unterbunden und die Scherkräfte durch den Mediumfluss verhindern die Ausbildung von weniger stark verknüpften Biofilm-Strukturen. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Inkubationssystem zur Visualisierung von Biofilmkulturen unter statischen Bedingungen etabliert.

#### 3.1.1 Biofilmentwicklung in *S. oneidensis* MR-1 unter hydrodynamischen und statischen Bedingungen

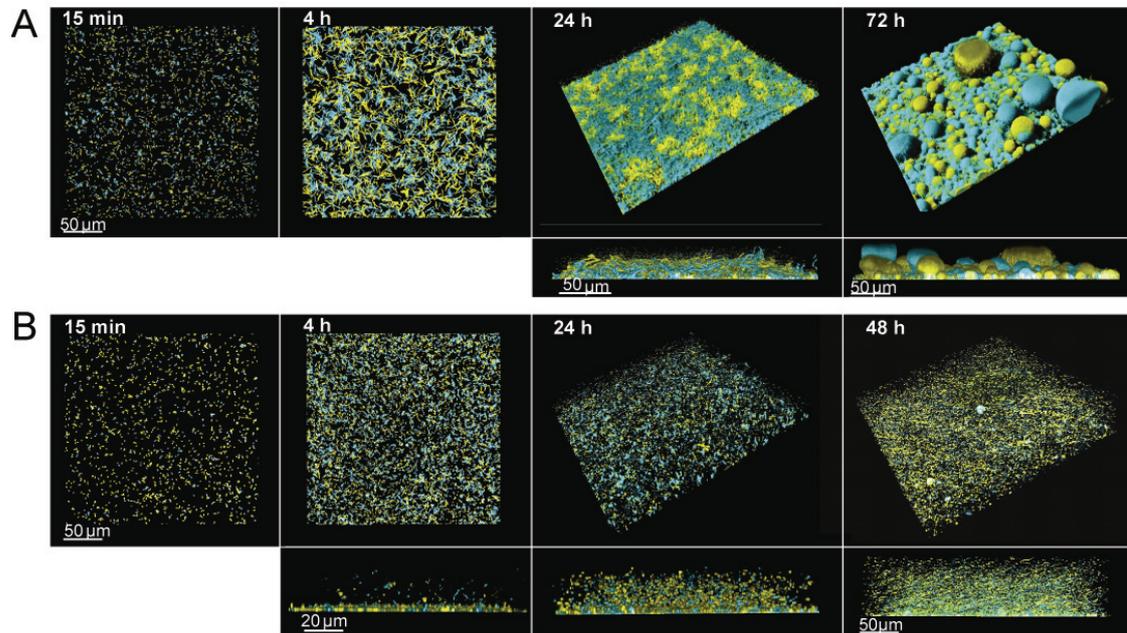
Um die Abhängigkeit der Biofilmentwicklung in *S. oneidensis* MR-1 von den vorherrschenden Bedingungen zu analysieren, wurde ein statisches System etabliert. Dazu wurden fluoreszenzmarkierte Zellen in kleinen Kulturschalen mit hydrophiler Oberfläche inkubiert, in denen die Biofilmbildung mittels eines konfokalen Laserscanmikroskops verfolgt werden kann. Vor mikroskopischer Dokumentation der Biofilmbildung wurde das Medium in den Kulturschalen wiederholt ausgetauscht, um planktonische Zellen zu entfernen.

Parallel wurden *S. oneidensis* MR-1 Zellen im hydrodynamischen Flusskammersystem inkubiert. Zur visuellen Analyse von möglichen Zellmigrationen wurde eine Kultur aus CFP- und YFP-markierten Zellen im Verhältnis 1:1 in beiden Systemen inkubiert (Abb. 5).

Unmittelbar nach Beginn der Inokulation im Flusskammersystem hefteten sich einzelne Zellen an die Glasoberfläche an und bildeten nach etwa 4 Stunden Mikrokolonien (Abb. 5 A). Nach 24 Stunden war die Oberfläche nahezu komplett mit einer mehrzelligen Schicht besiedelt. Im weiteren Verlauf der Biofilmreifung dominierten drei-dimensionale Strukturen die Architektur des Biofilms, die nach 72 Stunden eine Höhe von mehr als 80  $\mu\text{m}$  erreichten. Auch hier bestand der Hauptanteil der Strukturen entweder aus CFP- oder YFP-markierten Zellen (Abb. 5 A). Diese Strukturen entstehen also nicht, wie im Fall von *P. aeruginosa*, durch Zellmigration [125], sondern sind das Resultat klonalem Wachstums.

Unter statischen Bedingungen begann die Biofilmbildung mit der initialen Anheftung der Zellen und der Ausbildung von Mikrokolonien genau wie im hydrodynamischen System (Abb. 5 B). Nach 9 bis 12 Stunden war die Oberfläche nahezu vollständig besiedelt. Im weiteren Verlauf jedoch nahm die Zelldichte an der Oberfläche ab. So waren nach 24 Stunden weniger Zellen mit der Oberfläche assoziiert. Im Gegensatz zum hydrodynamischen System bildete die Biofilmkultur unter statischen Bedingungen keine dichtgepackten drei-dimensionalen Strukturen aus und auch nach

anhaltender Inkubation waren nur wenige Zellaggregate zu beobachten. Stattdessen schienen einzelne Zellen und kleine Zellverbände in einer netzartigen Struktur eingebunden zu sein. Diese Zellen verblieben auch bei Bewegung des Mediums in ihrer Position, während andere Zellen aktiv durch dieses Netz schwimmen konnten.



**Abb. 5: Biofilmentwicklung in *S. oneidensis* MR-1 unter hydrodynamischen (A) und statischen (B) Bedingungen.** CFP- (blau) und YFP- (gelb) fluoreszenzmarkierte Wildtyp-Zellen wurden simultan in Flusskammern bzw. Petrischalen inkubiert. Die Biofilmbildung wurde unter Einsatz eines konfokalen Laserscanmikroskops nach 15 min, 1, 4, 24 und 48 bzw. 72 h dokumentiert. Dargestellt sind dreidimensionale Rekonstruktionen der Aufnahmen entlang der z-Achse (jeweils obere Bilderreihe), sowie x-z-sagittale Schnitte (untere Bilderreihe).

Nach 24 Stunden Inkubation konnten diese netzartigen Biofilmstrukturen eine Höhe von 50 µm erreichen und zeigten sich resistent gegenüber Scherkräften induziert durch mehrfachen Mediaumaustausch. Im weiteren Verlauf der Biofilmentwicklung bildeten die Zellen und Zellverbände ein immer dichter und robuster werdendes Netzwerk aus.

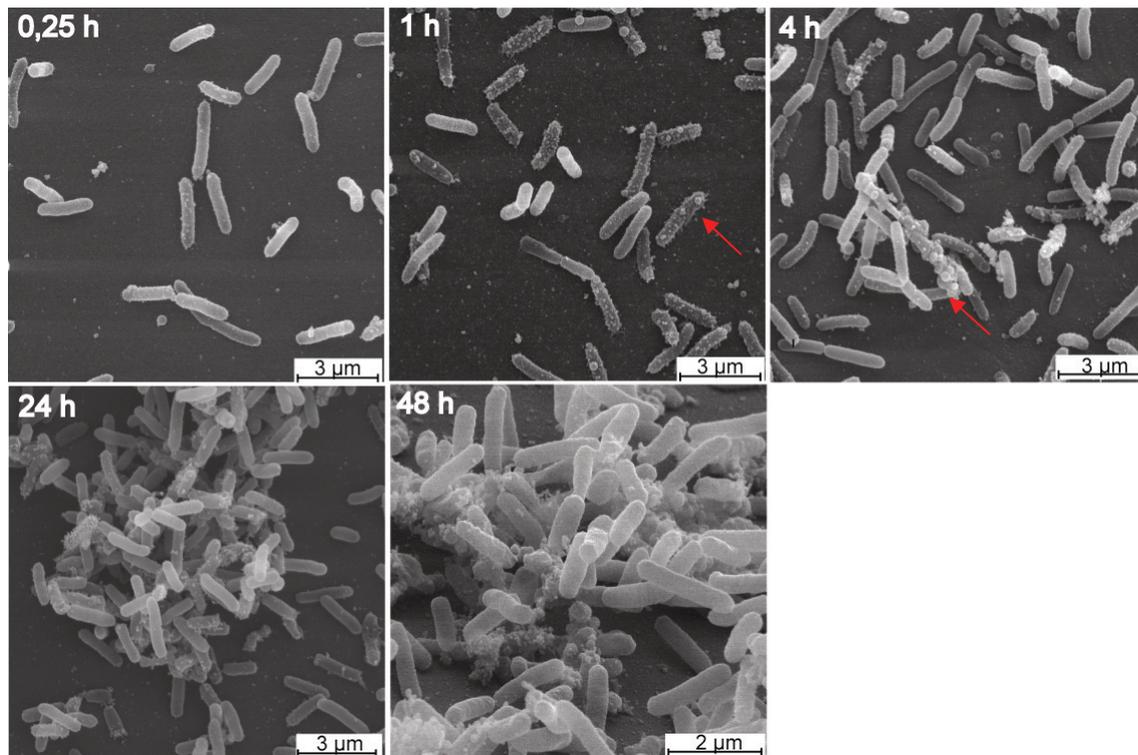
Diese mikroskopische Analyse zeigte, dass die Entwicklung und Morphologie von *S. oneidensis* MR-1 Biofilmen sehr von der vorherrschenden Bedingung abhängig ist. Enge Zell-Zell-Verbände begünstigen das Besiedeln und die Ausbildung von Biofilmen in hydrodynamischen Systemen, während sich die Zellpopulation an statische Bedingungen durch die Bildung von lockeren Zell-Zell-Verbindungen und eines netzartigen Biofilms anpassen.

### 3.1.2 Mikroskopische Analysen von *S. oneidensis* MR-1 Zellen während der Oberflächen-Anheftung und Biofilmbildung

Die Anheftungsphase der Bakterienzellen und ihre Transition zu einem sessilen Lebensstil leiten die Entwicklung von Biofilmen ein. Um zelluläre Anheftungsprozesse, wie morphologische

Veränderungen und potenzielle extrazelluläre Faktoren zur Vermittlung der Oberflächen-Adhäsion in *S. oneidensis* MR-1 zu identifizieren, wurden adhäririerte Zellen elektronenmikroskopisch analysiert.

Dazu wurden *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp-Zellen auf Glasplättchen unter statischen Bedingungen für 0,25, 1 und 4 Stunden – zur Charakterisierung der Anheftungsphase –, sowie für 24 und 48 Stunden – zur visuellen Verfolgung der Biofilmentwicklung – inkubiert. Sowohl die anschließende Präparation und Prozessierung der Oberflächen-assoziierten Zellen, als auch die elektronenmikroskopische Bildaufnahme wurden in Zusammenarbeit mit Jürgen Berger am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen durchgeführt.



**Abb. 6: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Oberflächen-assoziierten *S. oneidensis* MR-1 Zellen in statischer Umgebung.** Wildtyp-Zellen wurden auf Glasplättchen in Kulturschalen unter statischen Bedingungen inkubiert. Die adhäririerte Zellen wurden zu adäquaten Zeitpunkten nach Inokulation auf den Plättchen fixiert und zur mikroskopischen Analyse aufbereitet. Präparation, sowie Rasterelektronenmikroskopie wurden in Zusammenarbeit mit Jürgen Berger durchgeführt.

Abbildung 6 zeigt exemplarische Aufnahmen der zellulären Anheftung und der Biofilmbildung von *S. oneidensis* MR-1 unter statischen Bedingungen. Interessant ist dabei besonders, dass auf den Oberflächen der adhäririerte Zellen bereits nach kürzester Inkubationszeit auf Glas potenzielle Vesikel ausgebildet wurden (siehe Pfeile). Diese Vesikulation war besonders nach einer Inkubation von 1 bis 4 Stunden zu beobachten. Ferner deuteten die Aufnahmen auf das Fehlen von extrazellulären Anhängen, wie Flagellen oder Pili, an einem Großteil der Oberflächen-assoziierten Zellen hin. Zu allen Zeitpunkten der Inkubation konnten in der Kultur Zelltrümmer detektiert werden.

Im weiteren Verlauf der Biofilmentwicklung aggregierten die Zellen zu Mikrokolonien, deren Umfang nach längerer Inkubation (24 und 48 Stunden) stetig wuchs. Anhand dieser mikroskopischen Analysen konnten keine zellumgebenden Substanzen und wenige Zell-Zellverbindende Faktoren detektiert werden, die auf die Anwesenheit von Komponenten der Biofilm-Matrix schließen lassen könnten.

## 3.2 Transkriptom-Analysen von *S. oneidensis* MR-1 während des Übergangs zum sessilen Lebensstil

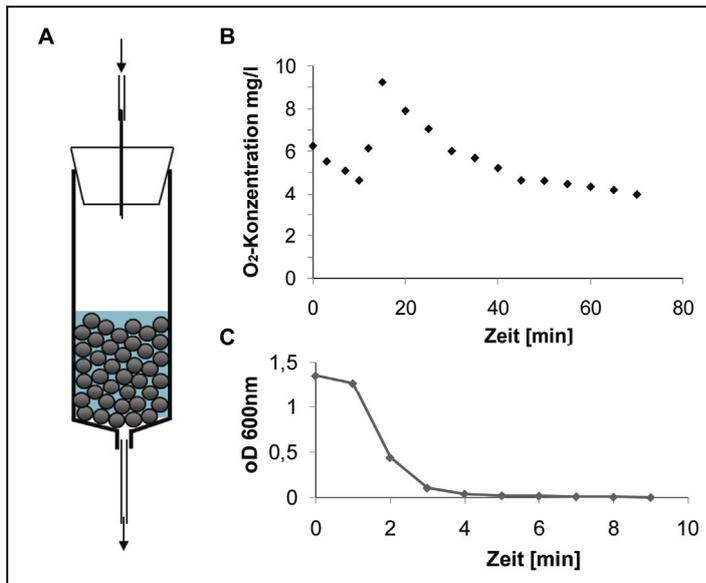
Trotz intensiver Forschungen sind die Kenntnisse bezüglich Mikroben-Oberflächen-Interaktion und Signalen, die zu einer Transition der Zellen vom planktonischen zum sessilen Lebensstil führen, sehr beschränkt. Daher sollten vergleichende Transkriptom-Analysen von *S. oneidensis* MR-1 Zellen Hinweise auf intrazelluläre Prozesse während der initialen Anheftung und der frühen Phase der Biofilmbildung geben. Durch die Inkubation der Zellen unter verschiedenen Bedingungen (statisch und hydrodynamisch) und die Verwendung von inerten und redox-aktiven Oberflächen sollten spezifische Anpassungen und zelluläre Antworten auf die veränderten Umweltbedingungen identifiziert werden.

### 3.2.1 Etablierung eines hydrodynamischen Zellerntesystems

Studien zur Biofilmentwicklung nutzen häufig Flusskammersysteme mit einer Glasoberfläche als Substrat für die Zell-Anheftung. Da eine Ernte der Biofilm-assoziierten Zellen aus diesem System nur schwer möglich ist, wurde ein hydrodynamisches Zellerntesystem etabliert, das folgende Kriterien erfüllen sollte: 1.) schnelle Isolierung von initial angehefteten Zellen zu gewünschten Zeitpunkten, um Degradation der mRNA zu verhindern und 2.) akkurate Trennung der Oberflächen-assoziierten und nicht-angehefteten planktonischen Zellen.

Das hydrodynamische Zellerntesystem besteht aus 50 ml Spritzen, die mit etwa 200 Glaskugeln gefüllt sind (Abb. 7 A). Die Glaskugeln dienen den Zellen als Adhäsionsoberfläche. Um die Ausbildung von (Sauerstoff-)Gradienten zu verhindern und so konstante Sauerstoffmengen zu garantieren, wurde eine geringe Menge an Glaskugeln in der Spritze eingesetzt. Die verwendeten Kugeln besitzen einen Durchmesser von 5 mm. Diese Größe wurde gewählt, um das Entstehen von Zwischenräumen, in denen der Mediumfluss verringert sein konnte und so die Zellen nicht optimal versorgt werden, zu verhindern. Mittels Schläuchen wurden die Spritzen anschließend an eine peristaltische Pumpe und das Mediumreservoir angeschlossen.

Zunächst wurde das Erntesystem mit Medium für 1 Stunde kalibriert. Nach Entfernen des Mediums wurden  $1 \times 10^7$  Zellen einer exponentiell wachsenden *S. oneidensis* MR-1 Kultur inokuliert. Dazu wurden 10 ml der Kultur eingesetzt, um die Glaskugeln vollständig zu bedecken. Nach einer kurzen Anheftungsphase von 10 min wurde der Mediumfluss im Erntesystem gestartet. Die Flussrate betrug dabei 3 ml/min. Eine spektrometrische Analyse von Kristall-Violett-gefärbtem Medium zeigte bei dieser Flussrate eine Medium-Umsatzrate von 4 min (Abb. 7 B). Messungen mit Sauerstoffelektroden belegten, dass das System aerobe Bedingungen ( $>4$  mg  $O_2$ /ml) für einen Zeitraum von 4 Stunden beibehält (Abb. 7 C; Thormann, persönliche Kommunikation).

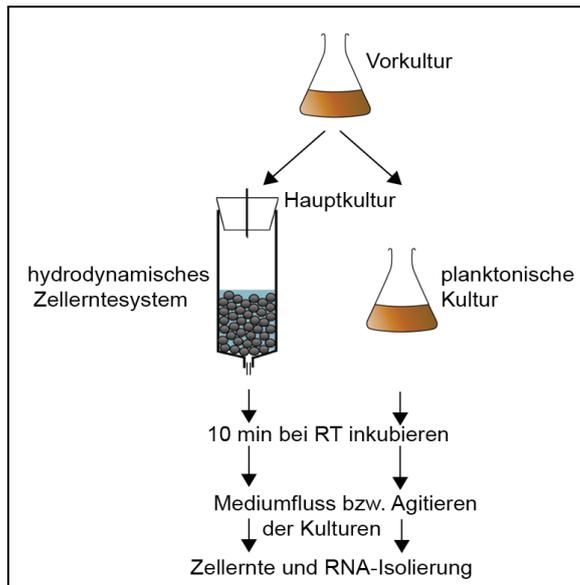


**Abb. 7: Das hydrodynamische Zellerntesystem.** (A) Schematischer Aufbau der Säuleneinheit. Das Erntesystem besteht aus 50 ml Spritzen, in denen Kugeln den Zellen als Adhäsionsoberfläche dienen. Das Medium wird mittels einer peristaltischen Pumpe durch die Spritze geleitet (Pfeile). (B) Quantifizierung der Sauerstoffkonzentration im Zellerntesystem. Zellen mit einer optischen Dichte<sub>600nm</sub> von 0,1 wurden auf Glaskugeln inkubiert und der Mediumfluss nach 10 min Inkubation gestartet. Der Sauerstoffgehalt im Medium wurde am Ausguss mittels einer Sauerstoffelektrode gemessen. (C) Bestimmung der Umsatzrate des Mediums im Erntesystem. Dazu wurde das Medium mit Kristall-Violett gefärbt und das abfließende Medium spektrometrisch analysiert.

Unter diesem konstanten Mediumfluss wurden die Zellen auf den Glaskugeln bei Raumtemperatur inkubiert, bis sie nach 0,25, 1, 2 und 4 Stunden geerntet wurden. Dazu wurde das Medium aus den Spritzen entfernt, die Kugeln in Puffer aufgenommen und die an ihnen adhären Zellen durch Vortexen isoliert. Durch mikroskopische und phänotypische Analysen der isolierten Zellen konnte ausgeschlossen werden, dass die Ernte-Methode einen negativen Effekt auf die Morphologie und Vitalität der Zellen hat. Anschließend wurden die Zellen aus mehr als 20 Erntedurchläufen vereint und die RNA für Transkriptom-Analysen isoliert.

### 3.2.2 Differentielle Genexpression während erster Anheftungsprozesse auf einer Glas-Oberfläche unter hydrodynamischen Bedingungen

Zur Identifizierung von zellulären Prozessen während der Anheftung von *S. oneidensis* MR-1 wurden die Transkriptome der adhären Zellen aus dem hydrodynamischen Erntesystem jeweils mit dem Transkriptom planktonischer Zellen verglichen. Ein solcher direkter Vergleich der Transkriptome ist schwierig, da die Zellen nicht in einem identischen System inkubiert wurden. Um dennoch möglichst gleiche Konditionen zu schaffen, wurden die Bedingungen zur Vorbereitung der Inkubation synchronisiert (siehe Abb. 8). Das bedeutet, dass die Vorkultur identisch war und beide Systeme mit der gleichen Zellzahl beimpft wurden. Zudem wurde – wie oben für die Kultur auf Glaskugeln bereits erwähnt – die planktonische Kultur ebenfalls 10 min stehend vorinkubiert, um eine Synchronisierung der Kulturen zu erreichen. Darauf folgte 1 Stunde schüttelnder Inkubation, bevor die Zellen geerntet und ihre RNA isoliert wurde. Die anschließenden Transkriptom-Analysen wurden von der Fa. Febit Biomed GmbH (Heidelberg) durchgeführt.

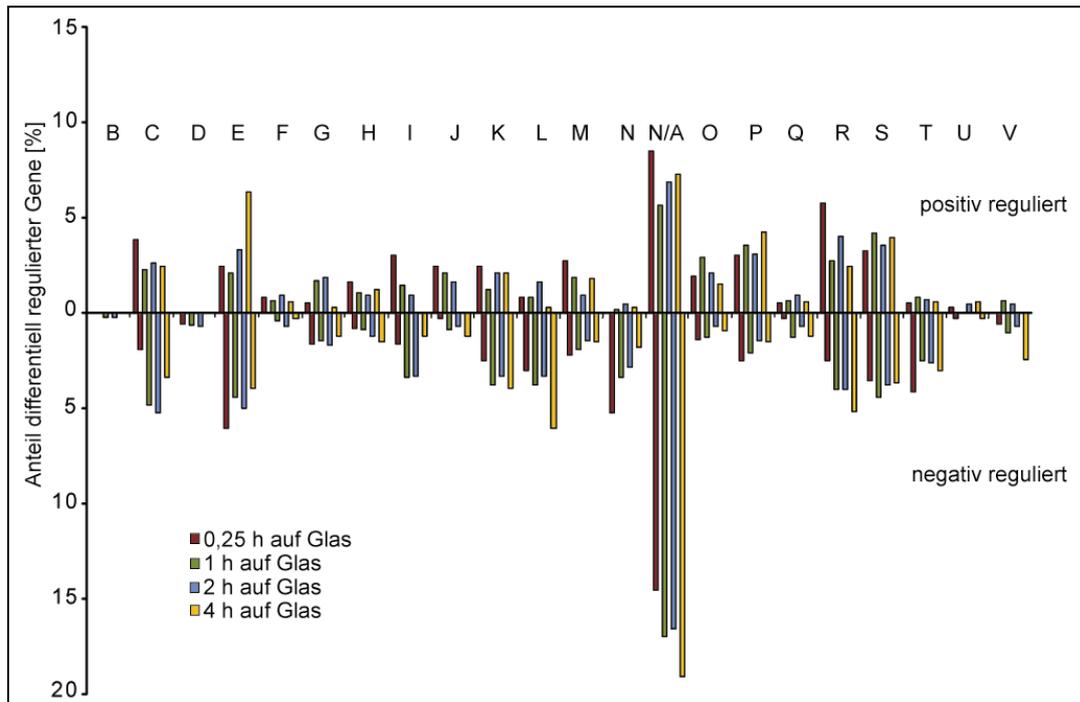


**Abb. 8: Schematische Darstellung der Zellernte für vergleichende Transkriptom-Analysen.** Aus einer Vorkultur wurden *S. oneidensis* MR-1 Zellen ( $OD_{600\text{ nm}}$  0,1) parallel im hydrodynamischen Zellerntesystem und in einem Kolben inokuliert und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Mediumfluss im Erntesystem gestartet bzw. die planktonische Kultur im Kolben auf einen Inkubationsschüttler transferiert. Die Zellen wurden zu diversen Zeitpunkten (Erntesystem: nach 0,25, 1, 2 und 4 h; planktonische Kultur: nach 1 h) geerntet und die RNA isoliert.

Anschließend wurden diese Datensätze der *S. oneidensis* MR-1 planktonischen und Oberflächen-assoziierten Zellen statistisch ausgewertet (Material und Methoden). Dabei galt die Genregulation als signifikant, wenn der  $p$ -Wert  $< 0,05$  war. Die differenzielle Genexpression in den adhärenzassoziierten Zellen wurde durch Abgleich mit dem Expressionsprofil von planktonischen *S. oneidensis* MR-1 Zellen als Referenz ermittelt. Für weitere Untersuchungen wurden die Gene eingeschlossen, die eine  $\log_2$ -fache Veränderung der Genexpression ( $\log_2$  FC) um mehr als 1 aufzeigten (entspricht Regulationsfaktor 2). Eine vollständige Liste der Rohdaten und normalisierten Datensätze der Transkriptom-Analyse ist im „Gene Expression Omnibus“ unter der Zugangsnummer GSE25865 verfügbar.

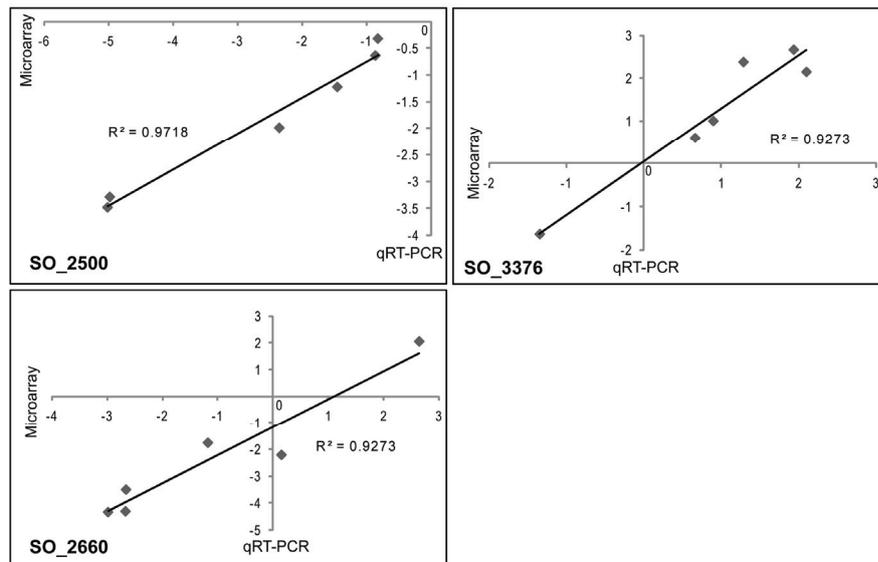
Unter Verwendung der oben genannten Parameter wurden in Oberflächen-assoziierten Zellen, im Vergleich zu planktonischen Zellen, nach 0,25, 1, 2 und 4 Stunden Inkubation 365 (7,3 % des gesamten Genoms), 477 (9,5 %), 422 (8,4 %) bzw. 330 (6,6 %) Gene differenziell exprimiert. Die größte Gruppe bildeten dabei mit jeweils  $\sim 30$  %, Gene, die hypothetische Proteine kodieren (siehe auch Abb. 9, unter anderem Kategorien N/A, R und S). Zu dieser Gruppe, die auch viele hoch-konservierte Proteine unbekannter Funktion beinhaltet, gehörten auch die am stärksten regulierten Gene in allen Vergleichen. So wurde beispielsweise die Expression von SO\_4715 um den Faktor 9,8 positiv reguliert. Die Rolle dieses hoch-konservierten, hypothetischen Proteins, sowie zwei weiterer hypothetischer Proteine, in der Anheftung und Biofilmbildung in *S. oneidensis* MR-1 wird im Kapitel 3.2.5 näher charakterisiert.

Eine kategorische Auftrennung der positiv bzw. negativ regulierten Gene, in den zu verschiedenen Zeitpunkten geernteten Zellen zeigte deutlich, dass während aller Anheftungsphasen die Mehrzahl der Gene einer Kategorie tendenziell gleich reguliert wurde (Abb. 9).



**Abb. 9: Differenziell exprimierte Gene in Oberflächen-assoziierten Zellen unter hydrodynamischen Bedingungen.** *S. oneidensis* MR-1 Zellen wurden nach 0,25, 1, 2 und 4 h Inkubation auf Glaskugeln geerntet und die RNA isoliert. In Transkriptom-Analysen wurde das Expressionsprofil der adhärennten Zellen mit planktonischen Zellen verglichen. Die Gene wurden gemäß ihrer JCVI-Annotation (<http://cmr.jcvi.org>) in funktionale Kategorien (COG) unterteilt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an positiv bzw. negativ regulierten Genen einer einzelnen Kategorie im Vergleich zur Gesamtzahl der differenziell regulierten Gene. B – Chromatin Strukturen und Dynamik; C – Energieproduktion und -konversion; D – Kontrolle Zellzyklus, Zellteilung, Chromosom-Metabolismus; E – Aminosäuretransport und -Metabolismus; F – Nukleotidtransport und Metabolismus; G – Kohlenhydrattransport und Metabolismus; H – Coenzym-Transport und -Metabolismus; I – Lipidtransport und -Metabolismus; J – Translation, Ribosomenbiogenese; K – Transkription; L – Replikation, Rekombination und Reparatur; M – Zellmembran-Biosynthese; N – Zell-Motilität; N/A – nicht in COGs; hypothetische Proteine; O – posttranslationale Modifikation, Proteinumsatz, Chaperone; P – anorganischer Ionen-Transport und Metabolismus; Q – Biosynthese, Transport und Katabolismus von sek. Metaboliten; R – nur Funktionsvorhersage; S – Funktion unbekannt; T – Signaltransduktion; U – intrazellulärer Transport, Sekretion und vesikulärer Transport; V – Verteidigungsmechanismen.

Zur weiteren Validierung der Datensätze wurde die Expression von drei ausgewählten Genen in Oberflächen-assoziierten und planktonischen Zellen mittels quantitativer RealTime-PCR überprüft und mit den Daten der Transkriptom-Analyse verglichen (Abb. 10). Der Determinationskoeffizient  $R^2$  zeigte deutlich, dass die ermittelten Genregulationen aus Mikorarray und q-RealTime-PCR übereinstimmten. Somit können die Transkriptom-Daten als valide angesehen werden.



**Abb. 10: Validierung der Transkriptom-Datensätze durch q-RealTime-PCR.** Im Diagramm ist die  $\log_2$ -fache Veränderung der Genexpression der Oberflächen-assoziierten Zellen unter hydrodynamischen und statischen Bedingungen bezogen auf eine planktonische Kultur dargestellt. Die Abszisse zeigt dabei die Daten aus dem Mikorarray, die Ordinate die ermittelten Werte aus der qRealTime-PCR für die ausgewählten Gene SO\_2500, SO\_3376 (oben von links nach rechts) und SO\_2660 (unten). Die drei Gene kodieren für hypothetische Proteine, wobei letzteres zum Genom des Prophagen MuSo2 gerechnet wird. Der Determinationskoeffizient  $R^2$  zeigt die statistische Varianz der Daten.

Bei einer direkten Gegenüberstellung der einzelnen Datensätze (0,25 h-plankt., 1 h-plankt, 2 h-plankt, 4 h-plankt) wurde deutlich, dass aus der Gesamtheit aller regulierten Gene der vier Expressionsprofile (siehe oben) während der Anheftung nur 54 Gene zu allen Zeitpunkten signifikant differenziell transkribiert wurden (siehe Tab. 2). Diese geringe Zahl liegt zum Teil darin begründet, dass aufgrund der angelegten Parameter ( $p$ -Wert  $<0,05$ ;  $\log_2$ -fache Veränderung  $>1$ ) die Transkriptom-Daten vieler Gene eines einzelnen Datensatzes in den direkten Vergleich aller vier Datensätze nicht mit einbezogen werden. Somit liegt der Fokus dieses Abgleichs auf die wenigen, für alle Phasen der Anheftung wichtigen Gene. Auch zeigt die geringe Zahl differenziell exprimierter Gene während der gesamten Anheftung (0,25-4 Stunden), dass die Oberflächen-Assoziation der Zellen ein transients, zeitlich differenziell regulierter Prozess ist, da zu allen Zeitpunkten Zellen zurück in den planktonischen Lebensstil wechseln können. Zur Auswertung der Expressionsprofile in initial angehefteten Zellen wurden daher zusätzlich die einzelnen Datensätze herangezogen.

**Tab. 2: Differenzielle Genexpression in Oberflächen-assoziierten Zellen im Vergleich zur planktonischen Kultur.** *S. oneidensis* MR-1 Zellen wurden nach 0,25, 1, 2 und 4 h Inkubation auf Glaskugeln unter hydrodynamischen Bedingungen geerntet. Die Zahlen geben die  $\log_2$ -fache Veränderung der Genexpression wieder. Die zugeordneten Produkte und Kategorien sind den Original-Annotationen entnommen (AA– Amino acid; put – putative). Die Liste ist nach Kategorien sortiert.

Gen	0,25 h	1 h	2 h	4 h	Annot.	Produkt	COG Kategorie
SO_0761	-1.65	-2.96	-3.46	-3.17	<i>glnB-1</i>	nitrogen regulatory protein P-II 1	AA transport and metabolism
SO_1676	1.11	1.19	1.21	2.09	<i>metA</i>	homoserine O-succinyltransferase	AA transport and metabolism
SO_1143	-1.52	-1.38	-1.35	-2.08	-	hypothetical protein	AA transport and metabolism
SO_2350	1.19	1.13	1.32	1.62	<i>aspC-1</i>	aromatic amino acid aminotransferase	AA transport and metabolism
SO_1324	-1.34	-1.54	-1.14	-1.07	<i>gltD</i>	glutamate synthase subunit beta	AA transport and metabolism
SO_3135	-1.70	-1.93	-1.22	-2.23	-	C4-dicarboxylate transporter, put	Carbohydrate transport and metabolism

Gen	0,25 h	1 h	2 h	4 h	Annot.	Produkt	COG Kategorie
SO_3714	-1.70	-2.78	-3.12	-2.09	-	sugar-binding protein, putative	Carbohydrate transport and metabolism
SO_3228	-1.13	-2.88	-2.89	-2.16	<i>fliF</i>	flagellar MS-ring protein	Cell motility
SO_3226	-1.07	-2.20	-1.88	-1.76	<i>fliH</i>	flagellar assembly protein H	Cell motility
SO_3224	-1.11	-1.14	-1.21	-1.15	<i>fliJ</i>	flagellar protein FliJ	Cell motility
SO_1673	-1.79	-2.36	-1.63	1.53	-	outer membrane protein W	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SO_3969	1.69	1.75	1.85	1.30	-	OmpA family protein	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SO_0961	1.29	1.10	1.37	1.22	-	hypothetical protein	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SO_2445	-2.06	-2.28	-1.62	-2.73	<i>thiC</i>	thiamine biosynthesis protein ThiC	Coenzyme transport and metabolism
SO_1667	-1.11	-1.66	-1.18	-1.84	<i>pbbB</i>	pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase	Coenzyme transport and metabolism
SO_1478	-1.52	-1.43	-1.24	-1.11	-	methylase, putative toxin secretion ABC transporter, ATP-binding subunit/permease protein, putative	Coenzyme transport and metabolism
SO_A0049	-3.37	-2.52	-2.64	-2.13	-		Defense mechanisms
SO_2253	-1.94	-2.32	-1.82	-2.89	-	acylphosphatase	Energy production and conversion
SO_0344	-1.42	-3.44	-3.34	-2.11	<i>prpC</i>	methylcitrate synthase	Energy production and conversion
SO_1087	2.23	2.22	1.62	1.40	-	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter family protein	Energy production and conversion
SO_1490	-1.32	-1.75	-2.06	-1.48	<i>adhB</i>	alcohol dehydrogenase II	Energy production and conversion
SO_0343	-1.27	-2.36	-2.29	-1.59	<i>acnA</i>	aconitate hydratase	Energy production and conversion
SO_4715	2.70	4.32	3.84	2.31	-	hypothetical protein	Function unknown
SO_0775	1.45	1.76	2.18	1.68	-	hypothetical protein	Function unknown
SO_0184	-2.02	-2.39	-2.04	-2.12	-	microcystin dependent protein	Function unknown
SO_0342	-1.19	-1.87	-1.93	-1.15	-	hypothetical protein	Function unknown
SO_1844	-1.56	-1.48	-2.17	-2.57	-	extracellular nuclease, putative	General function prediction only
SO_2865	1.46	1.03	1.11	1.87	-	L-lysine exporter, putative	General function prediction only
SO_2525	1.89	2.02	2.23	1.43	-	ABC transporter, ATP-binding protein	General function prediction only
SO_2934	-2.52	-2.68	-2.43	-1.62	-	hypothetical protein	General function prediction only
SO_2907	-2.24	-1.29	-1.40	-1.08	-	TonB-dependent receptor domain-containing protein	Inorganic ion transport and metabolism
SO_1971	-1.14	-2.04	-1.39	-1.88	-	acyl-CoA synthetase	Lipid transport and metabolism
SO_2536	1.86	-1.53	-2.19	-1.74	<i>fadE</i>	acyl-CoA dehydrogenase	Lipid transport and metabolism
SO_2657	-1.95	-4.47	-3.90	-5.04	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_2658	-2.20	-4.22	-3.91	-5.25	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_A0176	-2.39	-1.77	-1.46	-2.31	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_4196	2.17	3.80	3.85	3.57	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_2569	3.03	3.00	2.96	2.16	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_0120	1.43	1.99	2.00	1.69	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_2661	-2.22	-3.96	-3.33	-3.96	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_0479	-3.02	-3.78	-3.25	-4.43	-	cytochrome c, putative	not in COGs
SO_4649	-2.22	-2.09	-2.74	-3.42	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_A0047	-1.52	-1.20	-2.01	-1.79	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_0852	-1.71	-2.15	-2.06	-1.99	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_3687	-1.89	-2.61	-2.30	-2.57	-	curli production assembly/transport component CsgE, putative	not in COGs
SO_4260	-2.40	-2.89	-3.02	-3.26	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_2111	1.85	1.52	1.57	1.51	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_3717	-2.01	-2.87	-2.71	-2.30	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_1532	3.38	2.04	1.85	1.39	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_4210	-1.26	-1.09	-1.55	-2.09	-	hypothetical protein	Replication, recombination and repair
SO_A0151	-1.17	-1.43	-1.81	-1.28	-	ISSod13, transposase	Replication, recombination and repair
SO_4648	-1.41	-1.67	-1.16	-1.49	-	sensor histidine kinase	Signal transduction mechanisms
SO_3084	-1.31	-1.23	-1.38	-1.32	-	sensory box protein	Signal transduction mechanisms
SO_0502	1.37	1.24	1.48	1.34	-	ArsR family transcriptional regulator	Transcription

Die einzelnen Transkriptom-Datensätze zeigten, dass sich die Zellen unmittelbar nach der Anheftung auf die Oberfläche an die veränderte Lebensbedingung anpassen. Wie bereits erwähnt, übt die Oberflächeninteraktion der Zelle einen direkten Einfluss auf die Zellmotilität aus. Die Expression der Gene, deren Produkte regulatorische oder strukturelle Aufgaben bei der Flagellen-Assemblierung übernehmen, wurden während allen getesteten Zeitpunkten nach der Oberflächen-Anheftung reprimiert. Als Beispiel dienen *fliF* und *fliJ*, die nach 0,25, 1, 2 und 4 Stunden Inkubation eine  $\log_2$ -fache Expressionsveränderung um -1,1 (-1,1), -2,9 (-1,1), -2,9 (-1,2) und -2,2 (-1,2) aufwiesen. FliF ist eine strukturelle Komponente des Basalkörpers und FliJ ein Teil der Exportmaschinerie der bakteriellen Flagelle. Diese Gene wurden also in sessilen Zellen jeweils um den gemittelten Faktor 2,2 (*fliF*) und 4,8 (*fliJ*) negativ reguliert. Die Daten lassen vermuten, dass während der Anheftung und des Übergangs zu einem permanent sessilen Lebensstils die Flagellen-abhängige Motilität der Zellen nicht mehr benötigt wird. Neben der reduzierten Flagellen-Biosynthese wurde auch die Genexpression des *pil*-Operons, das für die Synthese des Typ IV Pilus in *S. oneidensis* MR-1 verantwortlich ist, unmittelbar nach der ersten Anheftung (0,25 Stunden) um den Regulationsfaktor  $> 2$  reprimiert ( $\log_2$  FC -1,2). Im weiteren Verlauf der Oberflächen-Interaktion wurden diese Gene jedoch nicht mehr signifikant – also ein  $\log_2$  FC  $> +/-1$  – reguliert. Diese Resultate lassen vermuten, dass die Oberflächen-Interaktion während der initialen Anheftung der Zelle einen direkten Einfluss auf die Beweglichkeit der Zellen nimmt.

Auch die Synthese von Fimbrien, die von dem Operon *csgEF* kodiert werden, wurde während aller Stadien der Zell-Oberflächen-Assoziation um  $\log_2$  FC -1,9 bis -2,6 reprimiert. So scheinen auch andere Zellanhänge neben Flagelle und Pili keine Rolle in der permanenten Oberflächen-Anheftung der Zellen zu übernehmen.

Während der Adhäsion und der Transition zu einem sessilen Lebensstil wurden Gene, deren korrespondierenden Proteine Funktionen im anaeroben Metabolismus von *S. oneidensis* MR-1 übernehmen, meist negativ reguliert. Beispiele hierfür sind die Gene *fdnGHI*, die für Formiat-Dehydrogenase-Untereinheiten kodieren, und in Oberflächen-assoziierten Zellen nach 1 Stunde um den Faktor 2,3-3,1 ( $\log_2$  FC -1,2 bis -1,6) negativ reguliert wurden, sowie die Gene des *nap* Operons, das für eine periplasmatische Nitrat-Reduktase kodiert. Die Rolle dieser Proteine in der anaeroben Respiration wurde bereits in *Escherichia coli* und anderen Bakterien beschrieben [45, 238].

Die Expressionsprofile zeigten außerdem eine negative Regulation von Operons, deren Produkte im Coenzym- und Aminosäure-Metabolismus, im Lipid-Transport und -Metabolismus und in der Energieproduktion (Elektronentransport) involviert sind. Ein Beispiel hierfür ist das Operon SO\_1891-1899, das für Komponenten im Lipid-Metabolismus, wie Acetyl-CoA-Carboxylase und Enoyl-CoA-Hydratase, kodiert und dessen Expression besonders nach 1-2 Stunden Anheftung um den Faktor 3,5-6,1 reprimiert wurde.

Auch die Synthese der Transportmaschinerie in *S. oneidensis* MR-1 wurde zumeist negativ reguliert. So wurde besonders die Expression von Genen reprimiert, die für Komponenten von ABC Transportern kodieren, so zum Beispiel der Molybdän-ABC Transporter. Die Gene *modABC*, kodierend für das periplasmatische Molybdän-Bindeprotein, eine Permease und ein ATP-Bindeprotein, wiesen in Zellen nach 0,25, 1 und 2 Stunden Adhäsion eine  $\log_2$ -fache Expressionsveränderung von -1,1 bis -2,0 auf (entspricht einem negativen Regulationsfaktor von 3 bis 4).

Auffällig war auch die negative Regulation von Genen und Operons der Prophagen MuSo2 (SO\_2652-SO\_2704) und LambdaSo (SO\_2939-SO\_3013). Die Expression von Genen des Prophagen MuSo2 wurde besonders nach ein- bis mehrstündiger Zell-Anheftung stark reprimiert. So wurde die Genexpression von SO\_2655 – das für ein DNA-Transpositionsprotein kodiert – in Zellen nach 1, 2 und 4 Stunden Inkubation auf Glaskugeln um den Faktor 20 ( $\log_2$  FC -4,3), 11 ( $\log_2$  FC -3,4) bzw. 37 ( $\log_2$  FC -5,2) negativ reguliert. Die Gene des Prophagen LambdaSo dagegen

wurden besonders stark nach verlängerter Zell-Oberflächen-Interaktion (4 Stunden) negativ reguliert, aber auch eine kürzere Inkubation der Zellen auf Glaskugeln wirkte sich negativ auf die Expression von Genen des Prophagen aus.

Bei der Analyse der Transkriptom-Datensätze war auffällig, dass Gene, deren korrespondierende Proteine wichtige Aufgaben in der Zell-Anheftung während der Biofilmbildung in *S. oneidensis* MR-1 übernehmen, unter den getesteten Bedingungen nicht differenziell reguliert wurden. Beispiele hierfür sind die Gene des *msb*-Operons, die für den zur initialen Anheftung der Zellen wichtigen Mannose-sensitiven Hämagglutinin-Pilus (MSHA) kodieren, oder das Gen *aggA*, dessen Produkt als potenzieller Teil eines ABC-Transporters eine essenzielle Rolle in der Aggregation, Anheftung und Biofilmbildung der Zellen spielt [48, 49]. Andere Gene, deren Produkte anhand von Mutagenese-Studien eine signifikante Rolle in der Biofilmentwicklung zugesprochen wird, wurden während der Anheftungsprozesse negativ reguliert. So wurde die Expression des Operons *mxdABCD*, das für den Aufbau von Biofilmstrukturen in *S. oneidensis* MR-1 essenziell ist [249], um den Faktor 2,7 - 6,5 ( $\log_2$  FC -1,4 bis -2,7) reprimiert.

Diese Analysen zusammenfassend, scheint der erste Oberflächen-Kontakt der Zelle zu einer direkten Anpassung an einen sessilen Lebensstil zu führen. Die Synthese von Zellanhängen, die für die Zell-Beweglichkeit erforderlich sind, wird abgeschaltet. Des Weiteren scheint ein Großteil der metabolischen Aktivität der Zelle anfangs reduziert zu werden, was dafür spricht, dass den adhärerten Zellen ausreichend Nährstoffe und Sauerstoff zur Verfügung stehen.

### **3.2.3 Differenzielle Genexpression während erster Anheftungsprozesse auf einer metabolisch zugänglichen Oberfläche unter hydrodynamischen Bedingungen**

Mit Hilfe dieser Transkriptom-Analysen sollte aufgedeckt werden, ob *S. oneidensis* MR-1 die Art einer Oberfläche erkennen und somit eine spezifische transkriptionelle Antwort auf die Adhäsion auf eine inerte oder redox-aktive Oberfläche ausprägen kann. Dazu wurden die Glaskugeln aus dem hydrodynamischen Zellerntesystem mit Eisenkugeln gleichen Durchmessers ausgetauscht. Durch Waschen und Autoklavieren der Kugeln in destilliertem Wasser bildete sich auf den Kugeln eine Schicht aus Eisen(hydr)oxiden. Unlösliche Eisenoxid-Substrate wie Hämatit können von *S. oneidensis* MR-1 als alternativer terminaler Elektronenakzeptor durch die Ausbildung einer auf Cytochromen basierende Elektronentransportkette reduziert und somit zur anaeroben Respiration genutzt werden [142, 175].

Unter Beibehaltung der Bedingungen im Zellerntesystem konnten die Expressionsprofile der Zellen auf Glas- oder Eisen(hydr)oxid-Oberflächen miteinander verglichen werden. Dadurch lassen sich potenzielle Faktoren identifizieren, die spezifisch in die Erkennung und die initiale Anheftung auf verschiedenen Oberflächen oder Substraten involviert sind.

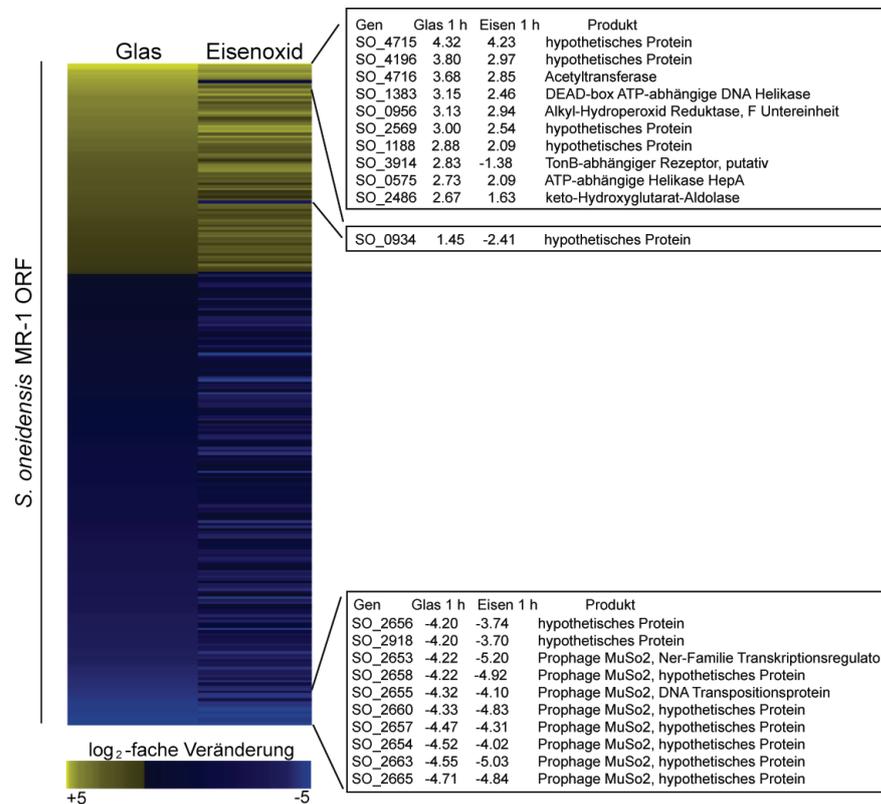
Nach Inkubation der Zellen auf den Eisen(hydr)oxid-haltigen Kugeln wurden die Zellen geerntet und die Proben anschließend mikroskopischen und phänotypischen Analysen unterzogen. Dabei zeigte sich, dass eine verlängerte Inkubation (>einer Stunde) der Zellen auf diesem Substrat zu einer veränderten Morphologie der Zellen führte. Die Zellen waren verkürzt und die Population zeigte in der *Live/Dead* Färbung einen hohen prozentualen Anteil an toten Zellen. Aus diesem Grund wurden die Expressionsprofile adhärterer Zellen auf Eisen(hydr)oxid oder Glas nach einer

Stunde Inkubation jeweils mit dem Expressionsprofil der planktonischen *S. oneidensis* MR-1 Zellen verglichen.

### Ein Großteil zellulärer Prozesse während der Anheftung unter hydrodynamischen Bedingungen ist unabhängig von der Beschaffenheit der Oberfläche

Insgesamt wurden 751 Gene (entspricht 14,8 % des gesamten Genoms) in der Transkriptom-Analyse identifiziert, die in Zellen nach Anheftung auf den Eisen(hydr)oxid-Kugeln im Vergleich zu planktonischen Zellen differenziell reguliert wurden. Etwa 36 % der Gene, die spezifisch während dieser potenziellen Eisenoxid-Respiration reguliert wurden, kodieren für hypothetische Proteine mit unbekannter Funktion.

Ein direkter Vergleich der Expressionsprofile adhärrierter Zellen auf Eisen(hydr)oxid bzw. Glas (1 Stunde) ergab, dass beide Regulons in 245 Genen überlappten. Davon zeigten 242 Gene (99 %) die gleiche Tendenz (Abb. 11). Daraus lässt sich schließen, dass weniger die Art der Oberfläche, als vielmehr die räumliche Nähe zu einer Oberfläche und der Anheftungsprozess selbst für die Veränderungen im Transkriptom der Zelle verantwortlich sind.



**Abb. 11: Vergleichende Analyse der Expressionsprofile von adhärrierten Zellen unter hydrodynamischen Bedingungen.** Mit Hilfe von Transkriptom-Analysen wurde das Expressionsprofil von Zellen nach 1 h Inkubation auf Glas- bzw. Eisen(hydr)oxid-Kugeln jeweils im Vergleich zu planktonischen Zellen aufgenommen. Die Abbildung zeigt eine „clustered heat map“. Dabei sind die regulierten Gene von Glas-assoziierten Zellen nach Expressionsstärke gruppiert. Die am stärksten positiv regulierten Gene sind gelb markiert, die am stärksten negativ regulierten Gene blau. Die differenziell regulierten Gene aus Eisen(hydr)oxid exponierten Zellen wurden – das Farbschema beibehaltend – den Genen der an Glas adhärrierten Zellen zugeordnet. Die nebenstehenden Tabellen zeigen die log<sub>2</sub>-fachen Veränderungen der 20 am stärksten regulierten Gene.

Wie bereits anhand adhärierter Zellen auf Glas gezeigt, wurde nach Adhäsion auf Eisen(hydr)oxid-haltigem Substrat die Expression des Flagellen-Biosynthese-Klusters (*flg*, *flh*, *fli*) reprimiert. Auch ein Großteil der Gene, deren Produkte im Energie-Metabolismus involviert sind, wurde in Anwesenheit von Eisen(hydr)oxid negativ reguliert. Der Vergleich zum Expressionsprofil Glas-assoziiierter Zellen zeigte, dass Gene dieser Kategorie in Zellen auf Eisen(hydr)oxid stärker reprimiert wurden. So wurde beispielsweise die Expression des Genklusters *fdn*, das für die Biosynthese einer Formiat-Dehydrogenase kodiert, um den Faktor 7 (Glas: ~3), reprimiert. Auch die Expression des *mtr/omc* Operons war 4,6-fach negativ reguliert. Dieses Operon kodiert für zwei Cytochrome und ein in der äußeren Membran verankertes Protein, die zusammen eine Rolle in der Eisen(III)- und Mangan(IV)-Respiration von *S. oneidensis* MR-1 spielen [12, 13].

Im Gegensatz zu den Cytochromen wurde eine weitere Komponente der Elektronentransportkette durch die Anheftung auf Eisen(hydr)oxid-haltigem Substrat positiv beeinflusst. Die Expression des *nuo*-Operons, das für Untereinheiten einer NADH-Dehydrogenase kodiert, die wiederum an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt ist, wurde um den gemittelten Faktor ~4,2 induziert.

Wie auch in Zellen nach Anheftung auf Glas wurden die Gene des Prophagen MuSo2 negativ reguliert. Auch das Genom des Prophagen LambdaSo wurde differenziell transkribiert. Interessanterweise wurden einige Operons dieses Prophagen positiv, andere negativ reguliert. So wurde die Expression von Genen, die z. B. für eine Lambda-Terminase oder ein Phagen-Holin kodieren, um den Faktor 6,5 bzw. 8,5 induziert. Zu den reprimierten Genen zählten vor allem solche, die für hypothetische Proteine unbekannter Funktionen kodieren.

Die oben aufgeführten Beispiele weisen auf eine universelle transkriptionelle Antwort der Zelle nach Anheftung auf eine Oberfläche unter hydrodynamischen Bedingungen hin. Durch den Vergleich der Expressionsprofile von *S. oneidensis* MR-1 Zellen nach Inkubation auf Glas bzw. Eisen(hydr)oxid zu planktonisch lebenden Zellen konnten aber auch spezifische Antworten der Zelle auf den Adhäsionsprozess an ein potenziell metabolisch zugängliches Substrat entschlüsselt werden. Auch ein direkter Vergleich des Transkriptom von Eisen(hydr)oxid-adhärerten Zellen zu dem Transkriptom Glas-assoziiierter Zellen verdeutlichte diese Unterschiede. Im Folgenden sollen die Ergebnisse dieses direkten Vergleichs (Eisen zu Glas) näher gegenüber gestellt werden.

### **Metabolisch zugängliche Oberflächen fordern spezifische zelluläre Prozesse während der Anheftungsphase**

In Eisen(hydr)oxid-assoziierten *S. oneidensis* MR-1 Zellen wurden – im Vergleich zu Glas-assoziierten Zellen – viele Gene regulatorischer Proteine differenziell reguliert. So wurde beispielsweise die Expression von *rpoS* ( $\sigma^{38}$ ) um den Faktor 2 reprimiert, während die Expression von SO\_3096 um den Faktor 2,1 induziert wurde. Sequenz-Analysen zeigten, dass letztgenanntes Gen für ein Protein der  $\sigma^{70}$ -Familie kodiert und damit eine wichtige Rolle in der Koordinierung von transkriptionellen Antworten auf verschiedene Stresssituationen übernimmt [11, 108]. Die Expression anderer Sigmafaktoren wie *rpoN* und *rpoE* wurde unter den gegebenen Bedingungen nicht differenziell reguliert.

Auch wurde in Eisen(hydr)oxid-adhärerten Zellen das *msh*-Operon (kodierend für den Mannose sensitiven Hämagglutinin Pilus) um den Faktor 3,6 induziert. Wie bereits erwähnt, wurde dieses Operon in Glas-assoziierten Zellen nicht differenziell transkribiert. Dieser Pilus spielt eine wichtige Rolle in der Anheftung der Zellen an eine Oberfläche [250].

Des Weiteren löste die Anwesenheit von Eisen eine verstärkte negative Regulation von Genen aus, die für Komponenten der Siderophor-Biosynthese (SO\_3030-33), eines TonB-Transportsystems (SO\_3670-72) und eines Hämin-ABC Transporters HmuTUV kodieren. Besonders die Genexpression der beiden genannten Transportsysteme wurde in Zellen nach Inkubation auf Eisen(hydr)oxid im Vergleich zu Glas um den Faktor 26 ( $\log_2$  FC -4,7) bzw. 11 ( $\log_2$  FC -3,5) reprimiert.

Unter Eisen-reduzierenden Bedingungen zeigte ein Großteil der Gene, die für Sekretionsproteine (Gsp), Komponenten der Signaltransduktion und Proteine der Zellwand-Biosynthese und Zellteilung kodieren, eine überwiegend positive Regulation. So wurde die Expression des *fts/mur* Genklusters um mehr als den Faktor 3,9 induziert, während diese Gene in Zellen nach Anheftung auf Glas nicht differenziell reguliert wurden. Auch eine Vielzahl von Genen, deren Produkte in der Aminosäure- und Cofaktor-Biosynthese involviert sind, wurden nach Anheftung der Zellen auf Eisen(hydr)oxid-haltigen Kugeln vermehrt transkribiert.

Mit Hilfe dieser Studie konnte eine universelle zelluläre Antwort auf die Oberflächen-Assoziation von *S. oneidensis* MR-1 unter hydrodynamischen Bedingungen identifiziert werden. Gleichzeitig gelang eine deutliche Determinierung Oberflächen-spezifischer Prozesse während der Anheftung der Zellen und damit eine Abgrenzung zu allgemeiner Oberflächen-Assoziation.

### 3.2.4 Differenzielle Genexpression während erster Anheftungsprozesse auf einer Oberfläche unter statischen Bedingungen

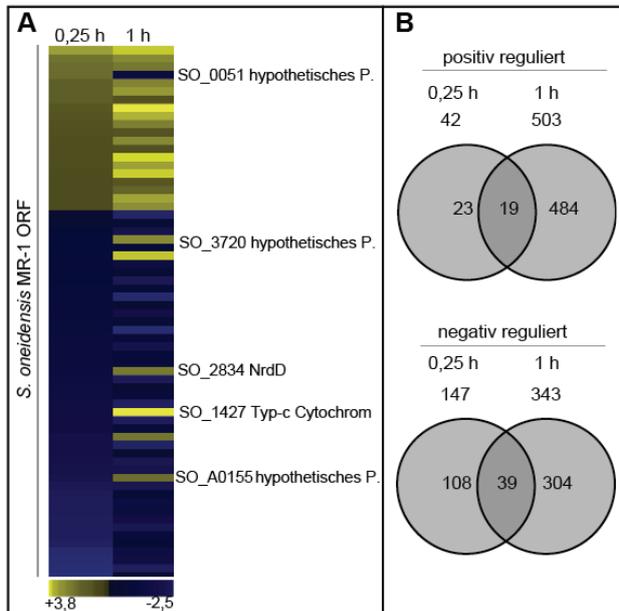
Wie bereits gezeigt, ist die Biofilmentwicklung von *S. oneidensis* MR-1 sehr von den vorherrschenden Bedingungen während der Inkubation abhängig. In hydrodynamischen Systemen müssen sich die Zellen stabiler an die Oberfläche und andere Biofilm-assoziierte Zellen anheften, als unter statischen Bedingungen. Um auch auf genetischer Ebene Unterschiede in der Anheftung zu entschlüsseln, wurde das Expressionsprofil von Zellen nach initialer Anheftung an eine inerte Oberfläche unter statischen Bedingungen analysiert und mit dem Profil von adhären Zellen unter hydrodynamischen Bedingungen verglichen.

Dazu wurden *S. oneidensis* MR-1 Zellen mit gleicher optischer Dichte, wie bereits im hydrodynamischen Zellerntesystem, in Petrischalen bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 0,25 und 1 Stunde wurde das Medium abgenommen, die darin befindlichen planktonischen Zellen des Überstandes isoliert und die Oberflächen-assoziierten Zellen mit frischem Medium gewaschen. Mikroskopische Untersuchungen zeigten, dass durch diesen Waschschrift der Großteil der planktonischen Zellen entfernt, die Oberflächen-assoziierten Zellen aber nicht abgelöst wurden. Anschließend wurden die Zellen unter Zuhilfenahme eines Zellschabers geerntet. Mittels morphologischer und phänotypischer Analysen der isolierten Zellen wurde sichergestellt, dass die Zellvitalität durch die Erntemethode nicht beeinträchtigt wurde. Zur Erstellung der differenziellen Expressionsprofile der Oberflächen-assoziierten Zellen wurden ihre Transkriptom-Daten mit den Daten der planktonischen Zellen aus dem Überstand der Biofilmkultur verglichen.

#### Transiente zelluläre Prozesse dominieren während der Oberflächen-Adhäsion unter statischen Bedingungen

Die Transkriptom-Analyse der statisch inkubierten Zellen im Vergleich zu planktonischen Zellen im Überstand ergab, dass 189 Gene nach 0,25 stündiger und 846 Gene nach einstündiger

Anheftung der Zellen differenziell reguliert wurden. Dies entspricht einer differenziellen Expression von 3,7 % bzw. 17 % des gesamten *S. oneidensis* MR-1 Genoms.



**Abb. 12: Vergleichende Analyse der Expressionsprofile von adhärennten Zellen unter statischen Bedingungen.** Mit Hilfe von Transkriptom-Analysen wurde das Expressionsprofil von Zellen nach 0,25 und 1 h Inkubation in Petrischalen im Vergleich zu planktonischen Zellen aufgenommen. **(A)** Die Abbildung zeigt eine „clustered heat map“. Dabei sind die regulierten Gene von Oberflächen-assoziierten Zellen nach 0,25 h Inkubation nach Expressionsstärke gruppiert (am stärksten positiv gelb; am stärksten negativ blau). Die differenziell regulierten Gene in Zellen nach 1 h Inkubation wurden – das Farbschema beibehaltend – den Genen der, für 0,25 h adhärennten, Zellen zugeordnet. **(B)** Venn-Diagramm zur Darstellung von überlappenden Regulons nach 0,25 bzw. 1 h Inkubation. Insgesamt wurden nach 0,25 h (1 h) Oberflächen-Adhäsion in den Zellen die Expression von 42 (503) Genen positiv und von 147 (343) Genen negativ reguliert.

Ein direkter Vergleich der Expressionsprofile der adhärennten Zellen nach 0,25 und 1 Stunde zeigte, dass die differenziellen Transkriptome nur in 65 Genen überlappten, von denen 19 Gene in beiden Fällen positiv und 39 Gene negativ reguliert werden (Abb. 12, Tabelle 3). Somit zeichnet sich ein Bild von sehr transienten Prozessen während der zellulären Anheftungsphase unter statischen Bedingungen ab.

Während der ersten Phase der Zell-Oberflächen-Interaktion schienen die Zellen ihre metabolischen und physiologischen Aktivitäten nur wenig an die veränderten Lebensbedingungen anzupassen. Zu den Genen, deren Expression während dieser Phase der transienten Anheftung (0,25 Stunden) in den Zellen negativ reguliert wurde, gehören Genkluster der Prophagen MuSo2 und LambdaSo, sowie einzelne Gene, die für Komponenten der Flagellen-Biosynthese (Fli, Flr, Flg) kodieren. Die größte Gruppe der differenziell regulierten Gene bildete mit 49 % nach 0,25 Stunden und 38 % nach 1 Stunde Zell-Oberflächen-Interaktion die Gene, welche für hypothetische Proteine kodieren.

**Tab. 3: Differenzielle Genexpression in Oberflächen-assoziierten Zellen im Vergleich zu planktonischen Bakterien.** *S. oneidensis* MR-1 Zellen wurden nach 0,25 und 1 h Inkubation in Petrischalen unter statischen Bedingungen geerntet. Die Zahlen geben die log<sub>2</sub>-fache Veränderung der Genexpression wieder. Die zugeordneten Produkte und Kategorien sind den Original-Annotationen entnommen (AA – Amino acid; put – putative). Transkriptom-Daten wurden anhand der Kategorien sortiert.

ORF	0,25 h	1 h	Annot.	Produkt	COG Kategorie
SO_1251	-1.27	-1.60	-	ferredoxin, 4Fe-4S	Energy production and conversion
SO_1427	-1.42	3.84	-	decaheme cytochrome c	Energy production and conversion
SO_3720	-1.14	1.79	-	hypothetical protein	Energy production and conversion
SO_2834	-1.31	1.61	<i>nrdD</i>	anaerobic ribonucleoside triphosphate reductase	Nucleotide transport and metabolism
SO_2567	1.02	1.87	<i>menG-1</i>	ribonuclease activity regulator protein RraA	Coenzyme transport and metabolism
SO_2653	-2.63	-1.05	-	Ner family transcriptional regulator	Transcription
SO_1136	-1.16	-1.79	-	DEAD-box ATP dependent DNA helicase	Replication, recombination and repair

ORF	0,25 h	1 h	Annot.	Produkt	COG Kategorie
SO_2654	-2.51	-1.41	-	transposase, putative	Replication, recombination and repair
SO_3462	-1.12	-1.59	<i>recN</i>	recombination and repair protein	Replication, recombination and repair
SO_4209	-2.13	-1.11	-	hypothetical protein	Replication, recombination and repair
SO_4210	-2.04	-1.46	-	hypothetical protein	Replication, recombination and repair
SO_A0119	-1.30	-1.21	-	ISSod13, transposase	Replication, recombination and repair
SO_1673	1.03	2.70	-	outer membrane protein W	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SO_3224	-1.80	-1.73	<i>fliJ</i>	flagellar protein FliJ	Cell motility
SO_3226	-1.56	-1.63	<i>fliH</i>	flagellar assembly protein H	Cell motility
SO_3241	-1.15	-1.08	<i>fliG</i>	peptidoglycan hydrolase	Cell motility
SO_3582	-1.06	-1.10	-	methyl-accepting chemotaxis protein	Cell motility
SO_0051	1.44	-1.32	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_0114	1.27	1.10	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_0127	-1.53	-2.19	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_0216	-1.21	-1.12	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_0439	1.28	1.97	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_0653	1.28	1.74	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_1076	2.06	2.66	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_1187	-1.36	-1.21	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_1479	1.04	2.08	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_1543	1.05	1.09	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_2034	1.02	2.12	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_2529	1.10	1.67	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_2660	-2.05	-1.76	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_2661	-1.97	-1.32	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_2666	-1.23	-1.02	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_2985	-1.55	-1.75	<i>O</i>	prophage LambdaSo, replication protein O	not in COGs
SO_3000	-1.98	-1.32	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_3010	-1.25	-2.51	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_3053	1.15	3.31	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_3132	-1.93	-1.11	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_3258	-1.33	-1.90	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_3502	1.11	2.32	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_3645	-1.53	-1.04	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_3699	-1.23	-1.48	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_3725	-1.30	-1.15	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_3841	-1.14	-1.14	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_4046	1.06	1.78	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_4285	1.02	1.33	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_4649	-2.53	-2.09	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_A0155	-1.68	1.47	-	hypothetical protein	not in COGs
SO_0325	1.04	2.84	-	dsrE-related protein	Inorganic ion transport and metabolism
SO_1560	-1.15	2.61	-	phosphate-binding protein	Inorganic ion transport and metabolism
SO_4516	1.51	1.78	<i>viuA</i>	ferric vibriobactin receptor	Inorganic ion transport and metabolism
SO_2503	-1.26	-1.23	<i>excB</i>	queuosine biosynthesis protein QueC	General function prediction only
SO_2655	-2.46	-1.38	-	prophage MuSo2, DNA transposition protein, putative	General function prediction only
SO_3648	-1.35	-1.04	-	hypothetical protein	Function unknown
SO_3708	1.02	1.17	-	hypothetical protein	Function unknown
SO_1329	-1.42	-2.03	-	adenylate cyclase-related protein	Signal transduction mechanisms
SO_1646	-1.44	-1.22	-	GGDEF family protein	Signal transduction mechanisms
SO_2005	-1.52	1.56	-	dksA-type zinc finger protein	Signal transduction mechanisms
SO_2498	-2.05	-1.22	-	sensory box protein	Signal transduction mechanisms
SO_3641	-1.04	-2.28	<i>apaH</i>	diadenosine tetraphosphatase	Signal transduction mechanisms
SO_4408	-1.15	-1.36	<i>bipA</i>	virulence regulator BipA	Signal transduction mechanisms

ORF	0,25 h	1 h	Annot.	Produkt	COG Kategorie
SO_4648	-1.24	-1.09	-	sensor histidine kinase	Signal transduction mechanisms
SO_A0132	1.09	1.12	-	hypothetical protein	Signal transduction mechanisms
SO_1194	-1.41	-2.15	<i>secF</i>	preprotein translocase subunit SecF	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
SO_4476	-1.23	-2.43	-	spheroplast protein $\gamma$ precursor, putative	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
SO_2388	1.44	1.58	<i>ampC</i>	beta-lactamase	Defense mechanisms

Nach einer längeren Inkubation der Zellen (1 Stunde) ergab sich ein spezifisches Expressionsprofil der Oberflächen-assoziierten Zellen. Insgesamt wurden unter statischen Bedingungen Genexpressionen in adhärirten Zellen im Vergleich zum Transkriptom planktonischer Zellen vorrangig induziert (503 Gene positiv, 343 Gene negativ reguliert). Dazu zählten besonders Gene, die für Proteine der Energieproduktion und der anaeroben Respiration in *S. oneidensis* MR-1 kodieren. Die Synthese von diversen Cytochromen und assoziierten Proteinen (SO\_1427, MtrB, OmcAB), Komponenten der Nitrit-Reduktase (Nrf), der Fumarat-Reduktase (Frd) und der anaeroben DMSO-Reduktase (DmaA/DmsB) wurde um den Faktor 3,5, 3,4, 6,4 bzw. ~30 induziert.

Auch die Synthese von ABC-Transportern wurde in *S. oneidensis* MR-1 Zellen nach einstündiger Anheftung unter statischen Bedingungen meist positiv reguliert. So wurde die Expression von Genen, die beispielsweise für Komponenten eines Kupfer-ABC-Transporters (Nos) oder zweier Phosphat-ABC-Transporter (SO\_1723-25 und SO\_4289-92; Pst) kodieren, um den gemittelten Faktor 4,1, 8,1 respektive 15,2 aktiviert.

Interessant war zudem auch die Regulation der Genexpression von *rpoS*. Dieses Gen, das wie bereits erwähnt, den Stress-induzierten Sigmafaktor RpoS kodiert, wurde in statisch adhärirten Zellen nach 1 Stunde Oberflächen-Anheftung, um den Faktor 2,5 ( $\log_2$  FC 1,3), vermehrt transkribiert. Obwohl die Rolle von RpoS in *S. oneidensis* MR-1 nicht bekannt ist, deutet dies dennoch darauf hin, dass die Inkubation und die Anheftung unter statischen Bedingungen in den Zellen Stress auslösen könnte.

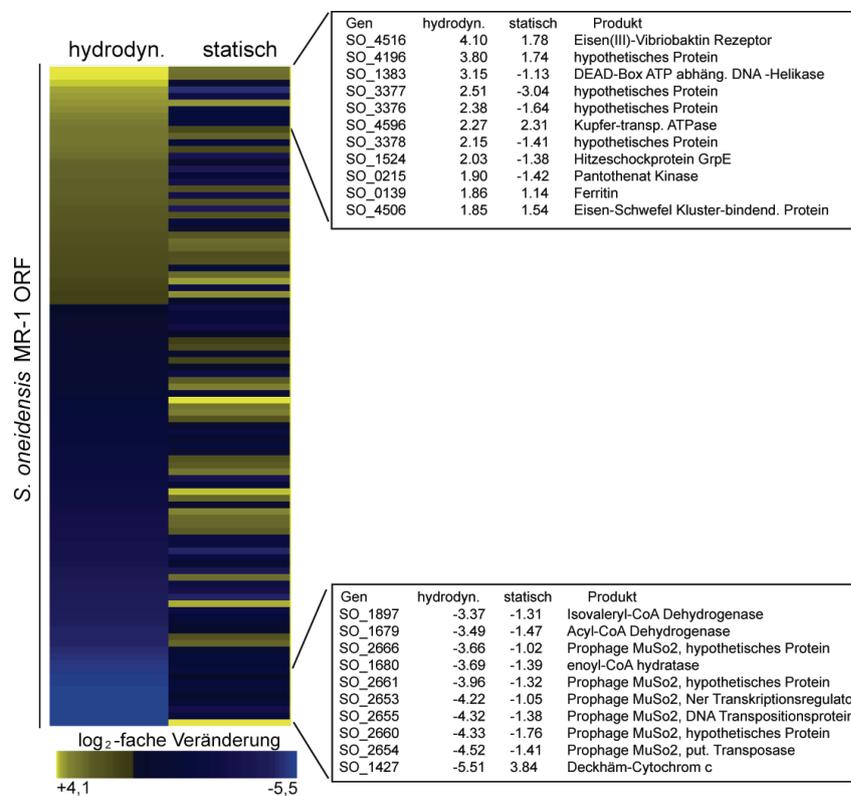
### Die vorherrschenden Inkubationsbedingungen bestimmen zelluläre Veränderungen während der Anheftungsprozesse

Ein direkter Vergleich der Transkriptom-Analysen von Zellen nach einstündiger Inkubation auf einer inerten Oberfläche unter hydrodynamischen und statischen Bedingungen offenbarte deutliche Unterschiede zu dem Expressionsprofil der adhärirten Zellen. Die Regulation der 100, in beiden Vergleichen präsenten Gene, war – abhängig von der vorherrschenden Inkubationsbedingung der Zellen – häufig konträr (Abb. 13). So war beispielsweise die Expression von 11 der 29 Gene, die für hypothetische Proteine kodieren, in adhärirten Zellen im hydrodynamischen und statischen System gegenläufig reguliert. Auch die vollständigen einzelnen Transkriptom-Datensätze der Oberflächen-assoziierten Zellen gegenüber dem jeweiligen planktonischen Pendant verdeutlichten diese inkubationsabhängigen transkriptionellen Unterschiede.

Unter hydrodynamischen Bedingungen wurde in Zellen die Expression von Flagellen- und Pili-relevanten Genen deutlich reprimiert. Unter statischen Bedingungen wurden diese Gene jedoch im Vergleich zur Expression der im Überstand befindlichen planktonischen Zellen kaum oder nur vereinzelt reguliert. Dagegen wurde nur in diesem statischen Umfeld die Expression von Genen induziert, deren Produkte im sensorischen Chemotaxis-System (*cheY-2*  $\log_2$  FC 1,6; SO\_1278 (MCP)

$\log_2$  FC 2,4) und an der Signaltransduktion von *S. oneidensis* MR-1 involviert sind. Auch die Energieproduktion und die anaerobe Respiration (siehe oben) wurden unter den Gegebenheiten des statischen Systems positiv reguliert.

Abgesehen von diesen umweltabhängigen Unterschieden im Transkriptom der Oberflächen-assoziierten Zellen zeigten die Expressionsprofile doch auch viele Gemeinsamkeiten in der Genregulation. Neben vielen Genen, die für hypothetische Proteine kodieren, wurde besonders die Expression von Genen, deren Produkte am Lipid-Metabolismus und -Transport beteiligt sind, in adhärirten Zellen – unabhängig von der vorherrschenden Bedingung – reprimiert. Auch die Genexpression der Prophagen LambdaSo und MuSo2 wurde in beiden Fällen meist negativ reguliert (siehe Abb. 13). Während allerdings in Glas-assoziierten Zellen im hydrodynamischen System die Genexpression beider Prophagen stets reprimiert wurde, wurden einige Gene des jeweiligen Prophagen unter statischen Bedingungen auch positiv reguliert. Auch die Genexpression des Prophagen MuSo1 wurde in Oberflächen-assoziierten Zellen unter statischen Bedingungen induziert.



**Abb. 13: Vergleichende Analyse der Expressionsprofile von adhärirten Zellen unter hydrodynamischen und statischen Bedingungen.** Mit Hilfe von Transkriptom-Analysen wurde das Expressionsprofil von Zellen nach 1 h Inkubation im Vergleich zu planktonischen Zellen aufgenommen. Die Abbildung zeigt eine „clustered heat map“. Dabei sind die regulierten Gene von Glas-assoziierten Zellen im hydrodynamischen System nach Expressionsstärke gruppiert. Die am stärksten positiv regulierten Gene sind in gelb dargestellt, die am stärksten negativ regulierten Gene in blau. Die differenziell regulierten Gene aus adhärirten Zellen im statischen System wurden – das Farbschema beibehaltend – den Genen der unter hydrodynamischen Bedingungen adhärirten Zellen zugeordnet. Die nebenstehenden Tabellen zeigen die  $\log_2$ -fache Veränderungen der 20 am stärksten differenziell regulierten Gene.

Mithilfe dieser drei Transkriptom-Analysen (hydrodyn. auf Glas, hydrodyn. auf Eisen(hydr)oxid, statisch) konnte gezeigt werden, dass sich Oberflächen-assoziierte *S. oneidensis* MR-1 Zellen klar von planktonisch lebenden Zellen abgrenzen. Die Anheftung während der

Biofilmentwicklung kennzeichnet demnach einen deutlich Schritt zu einem metabolisch und physiologisch veränderten Lebensstil. Dabei scheint ein Teil der transkriptionellen Antwort der Zelle universell zu sein, also unabhängig von der Beschaffenheit und Aktivität der Oberfläche und der vorherrschenden Bedingung. Aber auch Substrat- und Umwelt-spezifische zelluläre Antworten konnten mittels der Analyse der Expressionsprofile aufgedeckt werden.

### 3.2.5 Charakterisierung dreier konservierter Proteine unbekannter Funktion, deren Gene in Oberflächen-assoziierten Zellen differenziell reguliert wurden

Die Daten der Transkriptom-Analyse zeigten, dass in Oberflächen-assoziierten Zellen insbesondere Gene, die für hypothetische Proteine mit teils unbekannter Funktion kodieren, differenziell exprimiert wurden. Ihre Aufgaben in der Biofilmbildung können dabei von der Unterstützung der Zell-Anheftung bis zur Stabilisierung von Zell-Zell-Interaktionen reichen. Im Folgenden wurden drei Gene ausgewählt, um ihre Rolle in der initialen Oberflächen-Anheftung und Biofilmbildung unter statischen und hydrodynamischen Bedingungen zu untersuchen. Die Transkriptom-Daten dieser Gene, SO\_2500, SO\_3376 und SO\_4715, wurden mit Hilfe von quantitativer RealTime-PCR validiert (siehe dazu auch Abb. 10).

Die Genexpression von SO\_2500 wurde besonders unter hydrodynamischen Bedingungen in adhärenierten Zellen negativ reguliert (Tab. 4). Das Gen kodiert für ein, in den *Shewanellaceae* hoch konserviertes, hypothetisches Protein, mit der Masse von 18 kDa, welches nach *in silico* Analyse im Zytoplasma der Zelle lokalisiert. Die Expression der beiden Gene SO\_3376 und SO\_4715 wurde in Oberflächen-assoziierten Zellen im hydrodynamischen System stark positiv reguliert (Tab. 4). Beide Gene sind monozistronisch und kodieren für konservierte hypothetische Proteine mit einer molekularen Masse von 20,5 bzw. 24,5 kDa. Während SO\_3376 keine bekannten Domänen aufweist und potenziell im Zytoplasma der Zelle lokalisiert, enthält SO\_4715 eine Domäne unbekannter Funktion (DUF) der Superfamilie 165, die besonders innerhalb der *Shewanellaceae* und *Vibrionaceae* verbreitet ist. Darüber hinaus verfügt SO\_4715 über sechs Transmembran-Domänen, die dafür sprechen, dass dieses Protein in der Zellwand von *S. oneidensis* MR-1 verankert ist.

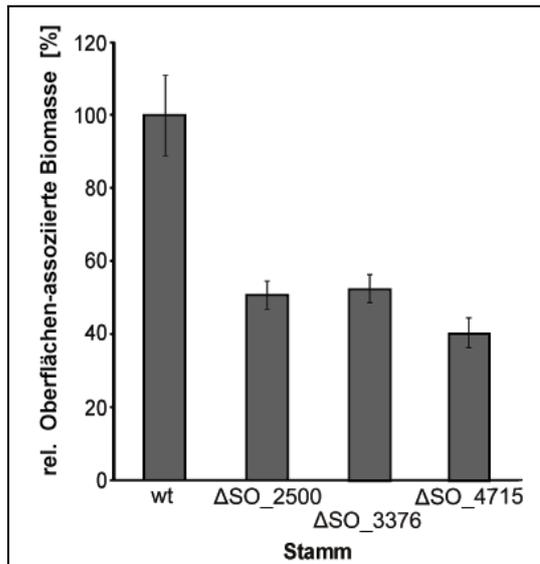
**Tab. 4: Differenzielle Genexpression von SO\_2500, SO\_3376 und SO\_4715 in Oberflächen-assoziierten Zellen.** Die Zellen wurden dazu unter statischen und hydrodynamischen Bedingungen auf Glas, sowie im hydrodynamischen System auf einer Eisen(hydr)oxid-Oberfläche inkubiert. Die korrespondierenden Transkriptome wurden mit dem Profil planktonischer Zellen verglichen. Die Zahlen repräsentieren die log<sub>2</sub>-fache Veränderung der Genexpression.

Gen	hydrodynamisch				statisch		Eisen	Produkt
	0,25 h	1 h	2 h	4 h	0,25 h	1 h	1 h	
SO_2500	-0,64	-3,48	-3,28	-1,98	-1,22	-	-3,38	hypothetisches Protein
SO_3376	2,15	2,38	2,66	-	-	-1,64	1,73	hypothetisches Protein
SO_4715	2,70	4,32	3,84	2,31	-	-	-	hypothetisches Protein

Zur Determinierung der Rolle von SO\_2500, SO\_3376 und SO\_4715 in der Zell-Anheftung und Biofilmbildung, wurden die entsprechenden Gene im Genom von *S. oneidensis* MR-1 deletiert. Die Konstruktion der Mutanten wurde von Lucas Binnenkade im Rahmen seines Vertiefungsmoduls durchgeführt.

### Die Deletion von SO\_2500, SO\_3376 und SO\_4715 führt zu einer verringerten Biofilmbildung unter statischen Bedingungen

Zur Analyse der Biofilmbildung der Deletionsmutanten  $\Delta$ SO\_2500,  $\Delta$ SO\_3376 und  $\Delta$ SO\_4715 unter statischen Bedingungen wurde ein Mikrotiterplatten-Assay durchgeführt. Dabei wurden Zellen des *S. oneidensis* MR-1 Wildtyps, der Mutanten und ihrer korrespondierenden Komplementationsstämme, in denen das vollständige Gen in das Genom von *S. oneidensis* MR-1 reintegriert wurde, in Mikrotiterplatten für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe einer Kristall-Violett Färbung die Oberflächen-assozierte Biomasse in Bezug zur optischen Dichte der Kultur bestimmt.



**Abb. 14: Biofilmentwicklung von  $\Delta$ SO\_2500,  $\Delta$ SO\_3376 und  $\Delta$ SO\_4715 unter statischen Bedingungen.** Zellen des *S. oneidensis* MR-1 Wildtyps und der Mutanten wurden in Mikrotiterplatten für 24 h inkubiert. Der Biofilm wurde mittels einer Kristall-Violett-Färbung der Oberflächen-assozierten Biomasse quantifiziert. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei Replikaten; die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt.

Die Ergebnisse des Mikrotiterplatten-Assay zeigten, dass die Deletionen von SO\_2500, SO\_3376 und SO\_4715 zu einer Reduktion der Oberflächen-assozierten Biomasse führten (Abb. 14). Im Vergleich zum Wildtyp bildeten die Mutanten nur 40-53 % Biofilm-Biomasse aus. Die korrespondierenden Komplementationsstämme akkumulierten hingegen mehr Biofilm-Biomasse als ihre Deletionsmutanten und nähern sich wieder dem Wildtyp-Niveau an (Daten nicht gezeigt). Dies spricht dafür, dass die beobachtete Reduktion der Biofilmbildung in den Mutanten auf die Deletion des jeweiligen Gens zurück geführt werden kann.

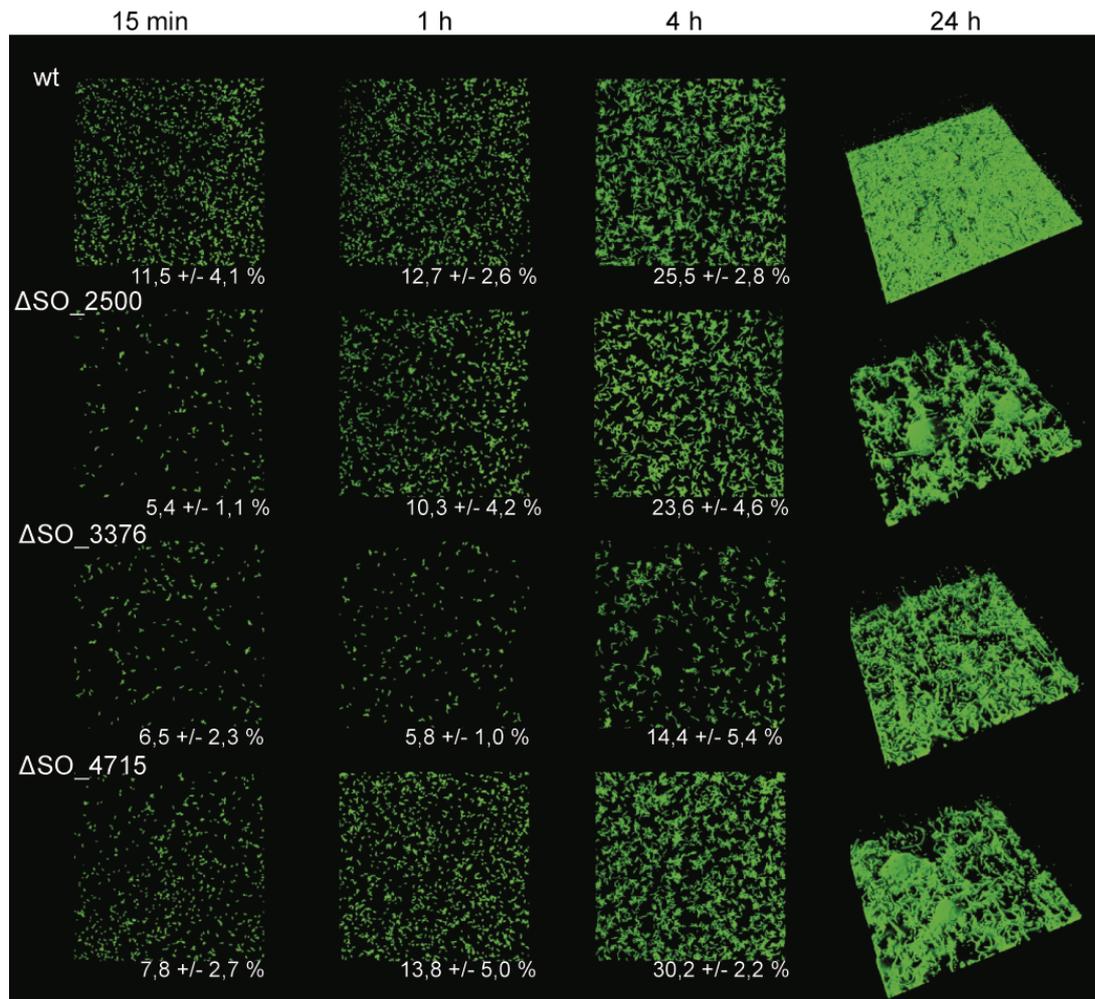
### $\Delta$ SO\_2500, $\Delta$ SO\_3376 und $\Delta$ SO\_4715 zeigen eine reduzierte Oberflächen-Anheftung und gestörte Biofilmbildung unter hydrodynamischen Bedingungen

Zur Charakterisierung der Biofilmentwicklung unter hydrodynamischen Bedingungen wurden die Mutanten  $\Delta$ SO\_2500,  $\Delta$ SO\_3376 und  $\Delta$ SO\_4715, die zuvor mit GFP fluoreszenzmarkiert wurden, in einem Flusskammersystem inkubiert. Die Oberflächenbesiedlung wurde dabei mikroskopisch verfolgt.

Unter hydrodynamischen Bedingungen zeigten besonders Zellen der Mutantenstämme  $\Delta$ SO\_2500 und  $\Delta$ SO\_3376 eine große Beeinträchtigung in der initialen Oberflächen-Anheftung der Zellen im Vergleich zum *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp (Abb. 15). So wurden nach 0,25 bzw. 1 Stunde Inkubation nur 5,4 % und 6,5 % bzw. 10,3 % und 5,8 % der Oberfläche von  $\Delta$ SO\_2500 und

$\Delta$ SO\_3376 kolonisiert. Der Wildtyp besiedelte zu diesem Zeitpunkt bereits 11,5 bzw. 12,7 % der Oberfläche.

Auch nach längerer Inkubation (4 Stunden) waren in  $\Delta$ SO\_3376 nur kleine Mikrokolonien und größere Zellaggregate mit der Oberfläche assoziiert, während  $\Delta$ SO\_2500 Zellen vermehrt an die Oberflächen anheften konnten, und damit das Defizit in der Oberflächen-Besiedlung kompensiert wurde (23,6 % Oberflächenabdeckung in der Mutante, 25,5 % im Wildtyp). Eine Deletion von SO\_4715 hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Zellanheftung und die Oberflächenbesiedlung in den ersten vier Stunden der Inkubation.



**Abb. 15: Rolle der drei hypothetischen Proteine SO\_2500, SO\_3376 und SO\_4715 in der Biofilmentwicklung von *S. oneidensis* MR-1 unter hydrodynamischen Bedingungen.** GFP-markierte Zellen des Wildtyps und der Mutantenstämme  $\Delta$ SO\_2500,  $\Delta$ SO\_3376 und  $\Delta$ SO\_4715 wurden in Flusskammern inkubiert. Oberflächen-Anheftung und Biofilmbildung wurde mikroskopisch mittels eines konfokalen Laserscanmikroskops nach 0,25, 1, 4 und 24 h analysiert. Dargestellt sind drei-dimensionale Schattenprojektionen. Die Schenkellänge der Bilder beträgt 250  $\mu$ m. Die Prozentzahlen repräsentieren die gemittelte Oberflächenabdeckung der Zellen auf Einzelschicht-Ebene aus drei Replikaten.

Nach 24 Stunden hatte der Wildtyp die Oberfläche nahezu komplett mit Zellen bedeckt und vielschichtig besiedelt. Neben diesem „Biofilm-Rasen“ wurden auch erste drei-dimensionale Strukturen detektiert. Dagegen entwickelten die drei Mutantenstämme deutlich weniger Biofilm. Statt einer geschlossenen Zellschicht schienen die Zellen zu aggregieren und bildeten dichte Zellklumpen und zum Teil hohe drei-dimensionale Strukturen aus, zwischen denen zellfreie Bereiche erhalten blieben.

Mit Hilfe dieser Untersuchungen konnte den drei hypothetischen Proteinen SO\_2500, SO\_3376 und SO\_4715 eine wichtige Rolle in der Oberflächenkolonisierung und der Biofilmentwicklung unter statischen und hydrodynamischen Bedingungen zugesprochen werden. Zudem scheinen besonders SO\_2500 und SO\_3376 bereits in der initialen Oberflächen-Anheftung eine wichtige Funktion zu übernehmen. Welche Rolle diese Proteine darin allerdings speziell spielen, bleibt zunächst noch unklar und muss in weiteren Analysen näher untersucht werden.

### 3.3 Rolle der Phagen-induzierten Zellyse für die Anheftung und die Biofilmentwicklung in *S. oneidensis* MR-1

Die Transkriptom-Analysen machten deutlich, dass die Zellen sich augenblicklich nach der ersten Anheftung auf die neue sessile Lebensweise umstellen und metabolisch reorganisieren. In phänotypischen Untersuchungen der initial adhärennten Zellen, die unter anderem mittels *Live/Dead*-Färbung durchgeführt wurden, fiel auf, dass besonders während der ersten Stunde nach Zell-Anheftung im statischen, als auch im hydrodynamischen System, viele tote Zellen an der Oberfläche lokalisierten (Daten nicht gezeigt). Insgesamt waren mehr als 30 % der Zellen tot, während in planktonischen Kulturen gleicher optischen Dichte nur 1-5 % der Zellen gestorben waren. Verfolgte man diese, mit Propidiumjodid rot gefärbten, an der Oberfläche angehefteten toten Zellen mikroskopisch in kleinen Petrischalen, waren sie im weiteren Verlauf der Anheftungsphase nicht mehr detektierbar. Eine mögliche Erklärung wäre, dass sich diese Zellen von der Oberfläche ablösen, was mikroskopisch bisher nicht dokumentiert werden konnte. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass diese Zellen während der frühen Entwicklungsphasen lysierten und daher mikroskopisch nicht mehr erfassbar waren. Ein weiteres Indiz für diese Zellyse-Prozesse während der initialen Anheftung ist die Bedeutsamkeit der extrazellulären DNA für die Zelladhäsion in diesem Stadium, die vorzugsweise aus lysierten Zellen freigesetzt wird (vergleiche Kapitel 2.1.6).

Die Daten der Transkriptom-Analysen offenbarten mögliche Kandidaten für den „programmierten“ Zelltod und die Zellyse in *S. oneidensis* MR-1. Gene der drei Prophagen wurden während der Anheftungsphase in der Biofilmbildung unter statischen und hydrodynamischen Bedingungen differenziell exprimiert. Dies veranlasste zu der Vermutung, dass die Prophagen eventuell eine Rolle in der initialen Anheftung spielen könnten. Eine Vielzahl von Studien an diversen Bakterien belegen die Rolle von Prophagen und Phagen-induzierter Zellyse in Biofilmmreifungsprozessen [73, 106, 207, 209, 241, 267, 270, 271].

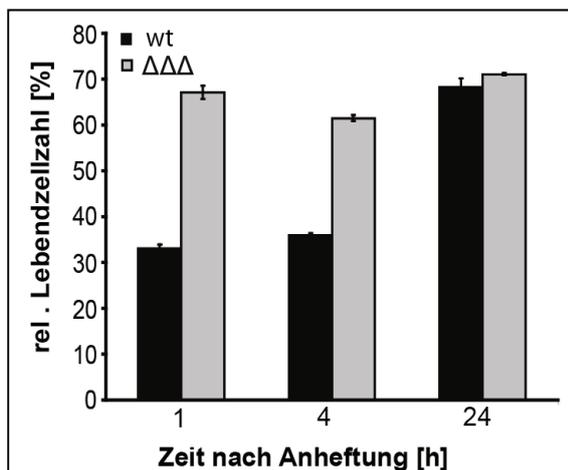
Die drei Prophagen in *S. oneidensis* MR-1 wurden aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu bekannten Prophagen als Mu-ähnliche Prophagen MuSo1 (SO\_0641-SO\_0683; 34,55 kBp) und MuSo2 (SO\_2652-SO\_2704; 34,53 kBp) und als Lambda-ähnlicher Prophage LambdaSo (SO\_2939-SO\_3013; 50,84 kBp) bezeichnet [92]. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass besonders der Phage LambdaSo durch Exposition mit Umweltstressbedingungen, wie die Bestrahlung mit UV-Licht oder ionisierender Strahlung, aktiv wird und die Zellyse von *Shewanella* Populationen induzieren kann [200, 201].

### 3.3.1 Identifizierung von Phagen-induzierten Zellyse-Prozessen in Biofilmen von *S. oneidensis* MR-1

Um zu untersuchen, ob Prophagen eine Rolle bei der Anheftungsphase der Biofilmbildung in *S. oneidensis* MR-1 spielen, wurde zunächst eine Mutante konstruiert, in der sukzessive die kompletten Genome der drei Prophagen inklusive korrespondierender spezifischer attachment (attachment) Stellen durch doppelte homologe Rekombination deletiert wurden. Mit Hilfe von PCR- und Southern-Blot-Techniken wurde bestätigt, dass die Prophagen Genome aus dem Chromosom von *S. oneidensis* MR-1 vollständig entfernt waren und auch keine additiv integrierten oder nicht-integrierten Kopien in der Zelle vorhanden waren (Daten nicht gezeigt). Im Folgenden wird diese  $\Delta\text{LambdaSo}\Delta\text{MuSo}\Delta\text{MuSo1}$  Mutante als  $\Delta\Delta\Delta$  benannt.

Des Weiteren wurden für Folge-Analysen Mutanten konstruiert, in denen entweder ein Prophagen Genom oder zwei Prophagen deletiert wurden. Da große Genregionen inklusive der Integrationsstellen deletiert wurden, konnten die Mutanten nicht mittels ektopischer Expression oder durch Reintegration des Genoms komplementiert werden. Deshalb wurden bei weiteren Analysen auch die korrespondierenden Revertanten, die im zweiten Rekombinationsschritt den ursprünglichen Genotyp ausprägten, untersucht. Diese Stämme glichen phänotypisch dabei immer dem Ursprungstamm. Daraus ergibt sich, dass die beobachteten phänotypischen Ausprägungen auf die Genomdeletion der Prophagen und nicht auf spontane Mutationen zurückzuführen sind.

Zur Analyse der Zell-Vitalität wurden adhärenzte Zellen von *S. oneidensis* MR-1 und der Prophagen-freien Mutante  $\Delta\Delta\Delta$  aus statisch wachsenden Biofilmen nach 1, 4 und 24 Stunden geerntet, indem die Zellen mit einem Zellschaber von der Oberfläche der Petrischalen isoliert wurden. Anschließend wurden Kolonie-bildende Einheiten als Maß der Lebendzellzahl in Relation zur ausgezählten Gesamtzellzahl bestimmt (Abb. 16).



**Abb. 16: Bestimmung der relativen Lebendzellzahl von *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp (schwarz) und der Prophagen-freien Mutante  $\Delta\Delta\Delta$  (grau).** Zellen wurden in Petrischalen inkubiert und nach 1, 4 und 24 h geerntet. Die Balken repräsentieren das Verhältnis an Kolonie-bildenden Einheiten („cfu“) jeder Fraktion bezogen auf die Gesamtzellzahl. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus den Daten von drei Replikaten ermittelt.

Diese Analyse zeigte, dass die Prophagen-freie Mutante eine nahezu doppelt so hohe relative Lebendzellzahl im Vergleich zum Wildtyp aufwies (67 % zu 33 % nach 1 Stunde; 61 % zu 36 % nach 4 Stunden). Während der Anheftungsprozesse und der Biofilmbildung veränderte sich die Zell-Vitalität der Prophagen-freien Mutante nicht. Anders der Wildtyp, der zunächst nur eine sehr geringe Zell-Vitalität zeigte. Nach 24 Stunden konnte für diesen Stamm jedoch eine, mit der Prophagen-freien Mutante vergleichbare, relative Lebendzellzahl von etwa 70 % der gesamten Zellpopulation ermittelt werden.

Diese Ergebnisse sind ein Hinweis darauf, dass die Zellen der Prophagen-freien Mutante vitaler sind als die des Wildtyps, der besonders während der initialen Anheftungsphase eine vergleichsweise geringe metabolisch aktive oder vitale Zell-Population aufweist.

### **Während der initialen Anheftungsphase weist eine Prophagen-freie Mutante eine verringerte Tendenz zur Zellyse auf**

Im Folgenden wurde untersucht, ob in *S. oneidensis* MR-1 während der Anheftung Zellyse einer Subpopulation der adhärenierten Zellen eintritt und ob die Prophagen-freie Mutante weniger anfällig für Zellyse-Prozesse ist. Die Experimente beruhen auf der Tatsache, dass während lytischen Prozesse der zytoplasmatische Inhalt der Zellen in das umgebende Milieu freigesetzt wird. Der Nachweis einer erhöhten Konzentration von extrazellulärer DNA und Proteinen im Medium kann daher als indirektes Maß der Zellyse gelten.

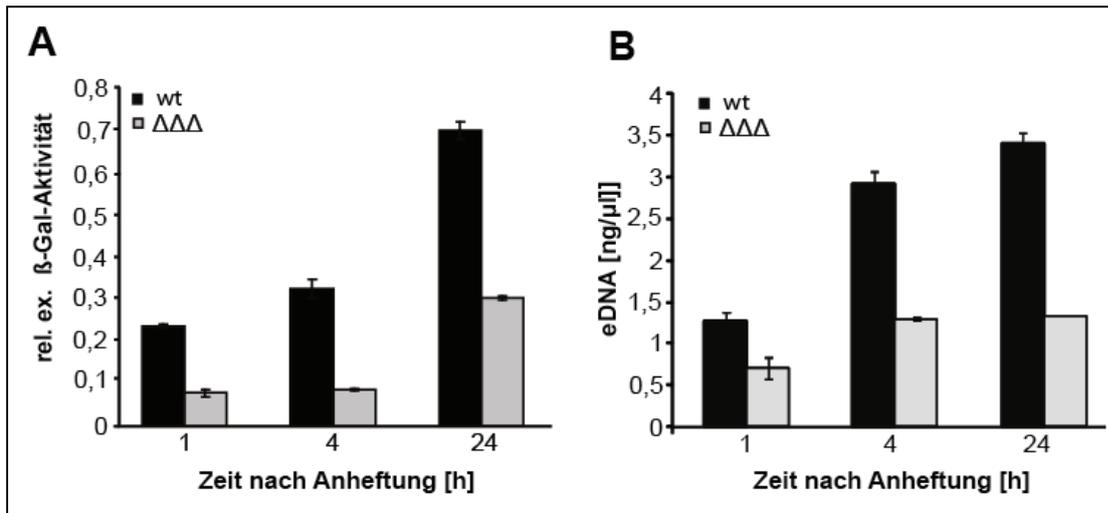
Als Nachweis der Freisetzung von Proteinen während zellytischer Prozesse wurde ein  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäts-Assay verwendet. Dazu wurde zuvor der Vektor pME-P<sub>mot</sub>-lacZ sowohl in *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp als auch in die Prophagen-freie Mutante  $\Delta\Delta\Delta$  elektroporiert. Durch die Aufnahme dieses Plasmids produzierten die Stämme konstitutiv  $\beta$ -Galaktosidase. Da dieses Enzym von *S. oneidensis* MR-1 nicht aktiv ins umgebende Milieu transportiert wird, eignet sich der Nachweis von extrazellulärer  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität als Indikator für eine Zellyse.

Aus statisch wachsenden Biofilmen wurden nun erneut die Überstände nach 1-, 4- und 24-stündiger Zellanheftung isoliert und steril-filtrierte. Als Kontrolle wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität im Überstand einer exponentiell wachsenden planktonischen *S. oneidensis* MR-1 Kultur analysiert. In dieser Probe wurde nur eine geringe, zu vernachlässigende Enzym-Aktivität gemessen.

Abbildung 17 A zeigt die ermittelten extrazellulären  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten in den Überständen von statisch wachsenden Biofilmen. Dabei wurde die Aktivität des Enzyms relativ zur Gesamtproteinmenge in der Probe errechnet. Aus der Darstellung wird schnell ersichtlich, dass die Prophagen-freie Mutante  $\Delta\Delta\Delta$  eine stark reduzierte  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp aufwies. Dies zeigte, dass diese Mutante deutlich weniger anfällig für zellytische Prozesse war. Die relative extrazelluläre  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität im Überstand von  $\Delta\Delta\Delta$  war nach 24 Stunden Inkubation um etwa 57 % im Vergleich zum Wildtyp reduziert ( $\Delta\Delta\Delta$  0,3; Wildtyp 0,7). Im Wildtyp deutete ein Anstieg der extrazellulären  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität im Verlauf der Biofilmentwicklung auf eine vermehrte Zellyse hin.

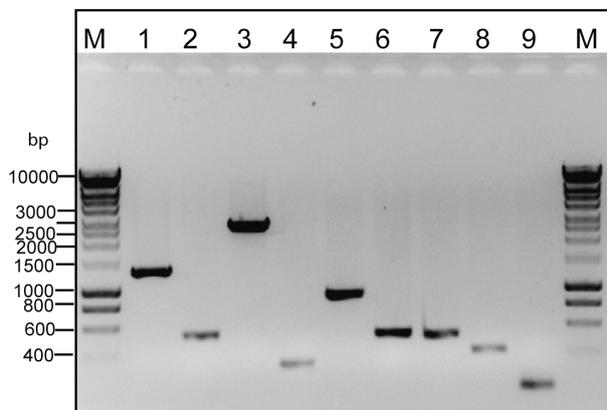
Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in der Quantifizierung von freigesetzter DNA wieder. Dazu wurden erneut die zellfreien Überstände von *S. oneidensis* MR-1 und der Prophagen-freien Mutante  $\Delta\Delta\Delta$  nach 1-, 4- und 24-stündiger Zellanheftung verwendet. Der Gehalt der extrazellulären DNA (eDNA) wurde mittels einer fluorimetrischen Bestimmung mit PicoGreen quantifiziert (Abb. 17 B).

Im Überstand von *S. oneidensis* MR-1 stieg die Konzentration von extrazellulärer DNA im Laufe der Biofilmentwicklung stetig an. Nach 24 Stunden Inkubation wurden im Überstand bis zu 3,4 ng/ $\mu$ l DNA gemessen, während in der Prophagen-freien Mutante  $\Delta\Delta\Delta$  zum gleichen Zeitpunkt nur 1,34 ng/ $\mu$ l DNA freigesetzt wurden. Die Prophagen-freie Mutante zeigte zu keinem getesteten Zeitpunkt eine erhöhte eDNA-Freisetzung und scheint daher weniger anfällig für Zellyse-Prozesse zu sein.



**Abb. 17: Die Rolle der Prophagen in der Zellyse von *S. oneidensis* MR-1.** (A) Bestimmung der relativen extrazellulären  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in zellfreiem Biofilm-Überstand von *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp (schwarz) und der Prophagen-freien Mutante  $\Delta\Delta\Delta$  (grau). In diese Stämme wurde zuvor das Plasmid pME-P<sub>mor</sub>-lacZ zur konstitutiven Expression von lacZ transformiert. Die Zellen wurden in Petrischalen inkubiert und der Überstand nach 1, 4 und 24 h abgenommen und steril-filtrierte. Die aus drei Replikaten gemittelten Werte geben das Verhältnis von extrazellulärer  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität im Überstand zu der Gesamtprotein-Menge in der Probe wieder. (B) Konzentrationsbestimmung der extrazellulären DNA in zellfreien Überständen von *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp (schwarz) und der Prophagen-freien Mutante  $\Delta\Delta\Delta$  (grau). Die Überstände wurden wie in (A) isoliert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte fluorimetrisch mittels PicoGreen Färbung.

Zur Validierung, dass die detektierte eDNA durch zellytische Prozesse freigesetzt wurde und damit aus vollständiger chromosomaler DNA besteht, wurde eine PCR-Reaktion mit verschiedenen Oligonukleotiden durchgeführt, mit deren Hilfe über das ganze Chromosom verteilte Regionen amplifiziert wurden. Alle Reaktionen führten zu einer Amplifizierung des gewählten Fragments (Abb. 18). Daraus lässt sich schließen, dass die eDNA das komplette Chromosom von *S. oneidensis* MR-1 repräsentiert und dass somit keine potenziellen aktiven Sekretionsmechanismen spezifische DNA-Fragmente freigesetzt haben.



**Abb. 18: Analyse der eDNA aus statisch wachsenden Biofilmen mittel PCR.** PCR-Reaktionen wurden auf isolierter eDNA durchgeführt zur Amplifizierung folgender Fragmente: (1) SO\_0577, 1,2 kBp; (2) SO\_0641, 502 Bp; (3) SO\_1066, 2,62 kBp; (4) SO\_1773, 303 Bp; (5) SO\_2685, 905 Bp; (6) SO\_2882, 504 Bp; (7) SO\_2993, 498 Bp; (8) SO\_3000, 379 Bp; (9) SO\_4405, 179 Bp. Die Produkte wurden gelelektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt.

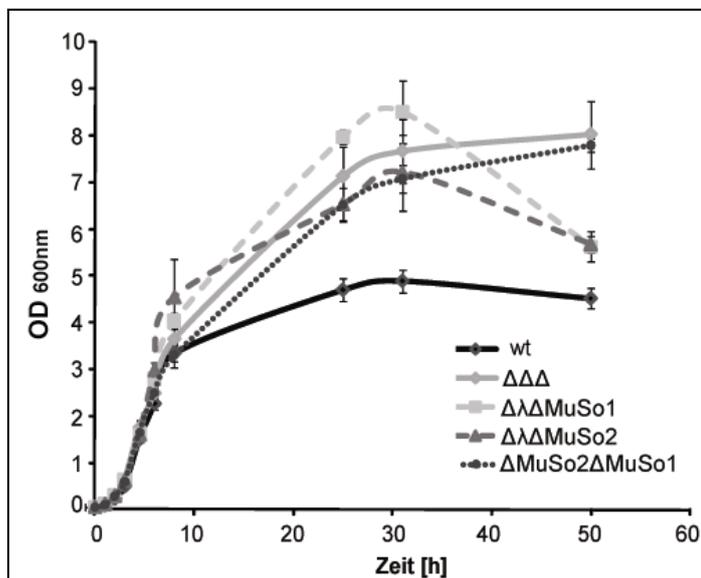
Zusammenfassend zeigten diese Untersuchungen, dass die Deletion der Prophagen zu einer stark verringerten Zellyse und zu einer erhöhten Zell-Vitalität führt. Somit wurden die Prophagen als induzierender Faktor der zellytischen Prozesse einer Subpopulation von *S. oneidensis*

MR-1 während der frühen Anheftungsphase identifiziert. Weitere Analysen sollten zeigen, ob alle drei Prophagen aus dem *S. oneidensis* MR-1 Genom für die Zellyse verantwortlich sind und ob diese Zellyse auch mit der Freisetzung von Phagenpartikeln einhergeht.

### 3.3.2 Einfluss der Prophagen auf die Populationsdynamik in *S. oneidensis* MR-1 Kulturen

Qui und Kollegen stellten die Hypothese auf, dass eine, durch die Exposition mit UV-Licht hervorgerufene Zellyse in der *S. oneidensis* MR-1 Population auf die Aktivität der Phagen, insbesondere des Phagen LambdaSo, zurückzuführen ist [201]. Zur Identifizierung einer potenziellen Rolle einzelner Prophagen in der Zellyse wurden Mutanten analysiert, die nur noch ein Prophagen-genom enthalten ( $\Delta\text{LambdaSo}\Delta\text{MuSo1}$ ,  $\Delta\text{LambdaSo}\Delta\text{MuSo2}$ ,  $\Delta\text{MuSo2}\Delta\text{MuSo1}$ ). Zudem wurde die Prophagen-freie Mutante hinsichtlich ihres Phänotyps untersucht.

Um den Einfluss der Prophagen auf die Zellphysiologie zu untersuchen, wurden diese Stämme zusammen mit *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp hinsichtlich ihres Wachstums in planktonischer Kultur untersucht (Abb. 19). Dabei zeigte sich, dass die Mutantenstämme sehr viel höhere optische Dichten im Vergleich zum Wildtyp erreichten. Beispielsweise wuchs die Prophagen-freie Mutante  $\Delta\Delta\Delta$  (graue durchgezogene Linie) im Verlauf der Inkubation von 31 Stunden bis zur einer optischen Dichte  $_{600\text{ nm}}$  (oD) von 7,4 (entspricht  $7,4 \times 10^9$  Zellen), der Wildtyp (schwarz) hingegen erreichte nur eine optische Dichte von 4,9. Ein ähnlichen Wachstumsphänotyp wies auch die Prophagen-Mutante auf, in der nur noch das Genom des Prophagen LambdaSo ( $\Delta\text{MuSo2}\Delta\text{MuSo1}$ ; gepunktete Linie) erhalten blieb.



**Abb. 19: Wachstumsanalyse der *S. oneidensis* MR-1 Prophagen-Mutanten.** Das Wuchsverhalten von *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp, den Mutanten  $\Delta\text{LambdaSo}\Delta\text{MuSo1}$ ,  $\Delta\text{LambdaSo}\Delta\text{MuSo2}$  und  $\Delta\text{MuSo2}\Delta\text{MuSo1}$ , sowie der Prophagen-freie Mutante  $\Delta\text{LambdaSo}\Delta\text{MuSo2}\Delta\text{MuSo1}$  ( $\Delta\Delta\Delta$ ) wurde in LB-Medium über einen Zeitraum von 50 h in jeweils zwei biologischen Replikaten verfolgt.

Die Prophagen-Mutanten, in denen der Prophage LambdaSo deletiert wurde ( $\Delta\text{LambdaSo}\Delta\text{MuSo1}$  und  $\Delta\text{LambdaSo}\Delta\text{MuSo2}$ ; gestrichelte Linien), erreichten zu diesem Zeitpunkt sogar eine noch höhere Zellzahl als die Prophagen-freie Mutante. Interessanterweise schien in diesen Mutanten jedoch im weiteren Verlauf der Inkubation die Zellzahl in der jeweiligen Kultur abzunehmen (Vergleiche oD 5,6 bzw. 5,7 nach 50 Stunden zu oD 8,5 bzw. 8,0 nach 31 Stunden Inkubation), was dafür spricht, dass sowohl MuSo1, als auch MuSo2 für Zelltod und

lytische Prozesse in der Population nach >10 Stunden Inkubation verantwortlich sind, im weiteren Verlauf der Inkubation aber auch andere Faktoren, wie der Prophage LambdaSo, Zellyse induzieren.

Die Analysen des Wachstumsverhaltens von *S. oneidensis* MR-1 Prophagen-Mutanten ließen erste Schlüsse auf den Einfluss der Prophagen auf die Zellphysiologie zu. Das Erreichen von höheren finalen optischen Dichten der Phagen-Mutanten bestätigt, dass die Prophagen auch in planktonischen Kulturen Zellyse induzieren und für eine Populationsdynamik in *Shewanella* Kulturen verantwortlich sind.

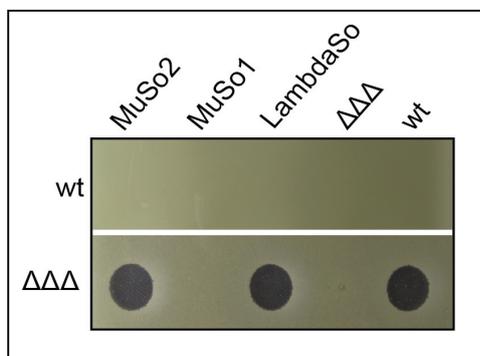
### 3.3.3 Detektion von infektiösen Phagenpartikeln in *S. oneidensis* MR-1 Biofilmen

Aus den vorhergegangenen Analysen geht hervor, dass die Deletion der Prophagen zu einer stark verminderten Zellyse sessiler und planktonischer Kulturen von *S. oneidensis* MR-1 führt. Ob die lytischen Prozesse durch einzelne Prophagenproteine oder durch infektiöse lytische Phagen induziert werden, sollte unter Verwendung von Plaque-Assays, Western-Blot-Analysen und Elektronenmikroskopie analysiert werden.

#### Überstände von *S. oneidensis* MR-1 Biofilmen besitzen ein lytisches Potenzial

Zur Identifizierung von infektiösen Viruspartikeln in *S. oneidensis* MR-1 Biofilmen wurden die Stämme, die einen einzigen Prophagen enthalten, der Wildtyp, sowie die Prophagen-freien Mutante  $\Delta\Delta\Delta$  in Petrischalen inkubiert und der Überstand nach 1, 4 und 24 Stunden geerntet. Auch planktonische Kulturen dieser Stämme wurden für 31 Stunden inkubiert, bevor der Überstände isoliert wurden. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da hier – ausgehend von den Daten der Wachstumsanalyse – bereits die Zellyse der Kultur einsetzte und so genügend potenzielle Phagenpartikel bzw. lytische Proteine akkumulieren konnten.

Die jeweils isolierten zellfreien Überstände der planktonischen und Biofilm-Kulturen wurden auf Softagar-Platten getropft, in denen der Wildtyp bzw. die Prophagen-freie Mutante inkubiert wurden. Im Fall von aktiven infektiösen Viruspartikeln bildeten sich lochähnliche, zellfreie Bereiche im Rasen der Kultur, die durch Phagen-induzierte Zellyse hervorgerufen wurden. Abbildung 20 zeigt exemplarisch das Ergebnis des Plaque-Assays mit Überständen aus 24 Stunden alten Biofilmen.



**Abb. 20: Detektion von Phagen im Überstand von statisch-wachsenden *S. oneidensis* MR-1 Biofilmen.** Zellfreie Überstände von 24 h-alten Biofilmen von *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp, den Prophagen-Mutanten, die nur noch den Prophagen MuSo2 ( $\Delta\text{LambdaSo}\Delta\text{MuSo1}$ ), MuSo1 ( $\Delta\text{LambdaSo}\Delta\text{MuSo2}$ ) oder LambdaSo ( $\Delta\text{MuSo2}\Delta\text{MuSo1}$ ) tragen, sowie die Prophagen-freie Mutante  $\Delta\Delta\Delta$  wurden isoliert. Diese Überstände wurden auf LB-Softagar-Platten getropft, in denen der Wildtyp (obere Abbildung) oder die Phagen-freie Mutante (untere Abbildung) inkubiert wurden.

Die Überstände der Biofilm-Kulturen und der planktonischen Kulturen von Mutanten, die nur den Prophagen MuSo2 oder LambdaSo trugen, produzierten Plaques auf dem Rasen der Prophagen-freien Mutante. Ein ähnliches Resultat zeigten auch die Biofilm-Überstände nach 1 und 4 Stunden Inkubation, allerdings waren hier die Plaques deutlich schwächer ausgeprägt (Daten nicht gezeigt).

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Prophagen MuSo2 und LambdaSo infektiöse Virus-Partikel produzieren, welche die Prophagen-freie Mutante lysieren (Abb. 20). *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp zeigte dagegen keine Ausbildung von Plaques. Dies kann bedeuten, dass eine Induktion des lytischen Zyklus der Phagen LambdaSo und MuSo2 und die daraus resultierende Lyse der Wirtszellen für die Entstehung der Plaques unter den getesteten Bedingungen verantwortlich ist und nicht die Reinfektion der Wildtyp-Zellen durch Phagenpartikel. Die Anwesenheit von Prophagen im Genom scheint die *S. oneidensis* MR-1 Wirtszelle vor einer Reinfektion mit demselben Phagen zu schützen.

Im Gegensatz zu LambdaSo und MuSo2 induzierten Überstände der MuSo1-tragenden Mutante keine Ausbildung von Plaques. Dieser Prophage zeigte zwar einen schädigenden Effekt auf seinen Wirt (siehe Wachstumsanalyse), kann aber keine funktionellen infektiösen Phagenpartikel assemblieren. Dieser Befund steht im Einklang mit einer Genomanalyse von MuSo1, in der das Fehlen bzw. eine durch Insertionen hervorgerufene Unterbrechung von verschiedenen Genen, die für strukturelle Proteine kodieren, beschrieben wurde [32]. Dieser Prophage scheint daher nicht mehr in der Lage zu sein, Phagenpartikel zu synthetisieren, allerdings sind wichtige Proteine für den lytischen Zyklus, wie das Lysozym SO\_0659, weiterhin in seinem Genom kodiert.

Um nun zu untersuchen, ob der Prophage MuSo1 im Rahmen des lytischen Lebenszyklus noch dazu fähig ist, sein Genom aus dem Wirtschromosom heraus zuschneiden, wurde die DNA aus dem Biofilm von *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp isoliert. In einer PCR wurden neben MuSo1-spezifischen, auch MuSo1-flankierende Oligonukleotide eingesetzt, die im Fall von herausgeschnittenem MuSo1-Genom aus dem *S. oneidensis* MR-1 Chromosom ein Produkt amplifizierten. Die PCR-Reaktion zeigte keine Amplifizierung dieses Produktes (Daten nicht gezeigt), was beweist, dass das MuSo1 Prophagen-Genom weiterhin nur im Wirtsgenom verbleibt.

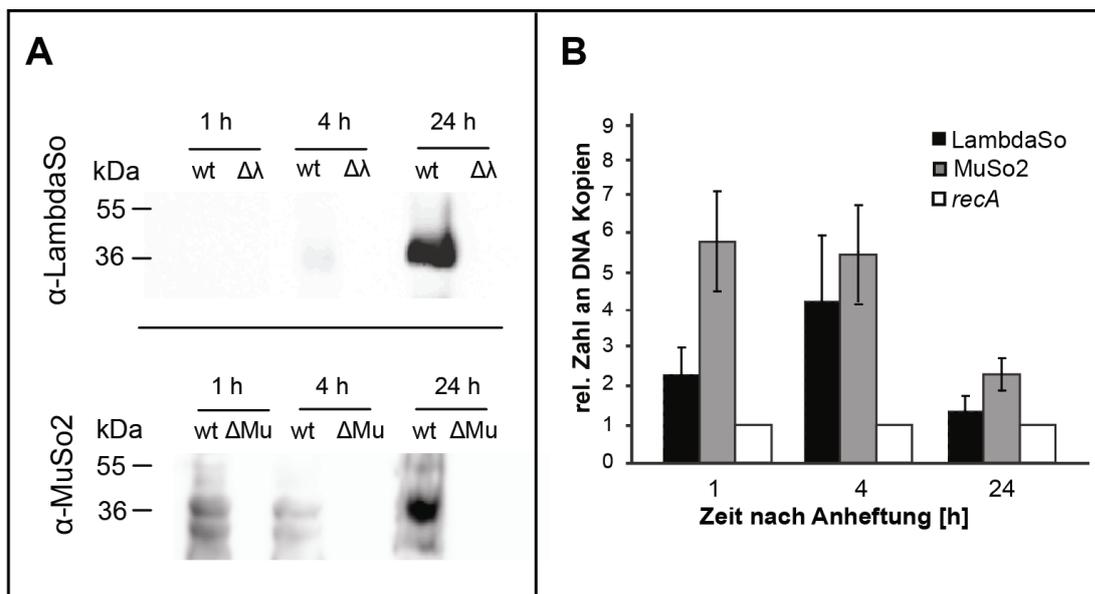
### **Phagenproteine werden bereits in den frühen Entwicklungsphasen des Biofilms produziert**

Unter Einsatz von Western-Blot-Analysen sollte der Beweis erbracht werden, dass Phagenpartikel in Biofilmen von *S. oneidensis* MR-1 vorhanden sind. Außerdem sollte die zeitliche Regulation der Phagen-Induktion während der Biofilmbildung analysiert werden. Zu diesem Zweck wurden im Rahmen dieser Arbeit Antikörper gegen die putative Haupt-Untereinheit des Phagenkopfes (SO\_2685) von MuSo2 und gegen das Kapsid-Protein SO\_2963 des Phagen LambdaSo in Zusammenarbeit mit der Firma Eurogentec synthetisiert.

Zur Detektion der Phagenpartikeln-Proteinen wurden statisch wachsende Biofilmkulturen von *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp und den Prophagen-Mutanten, in denen entweder das Genom des Prophagen LambdaSo ( $\Delta\lambda$ ) oder MuSo2 ( $\Delta\text{Mu}$ ) deletiert wurde, nach 1, 4 und 24 Stunden Inkubation geerntet, indem die Zellen mit einem Zellschaber von der Oberfläche einer Petrischale isoliert wurden. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Zellysate mittels SDS-PAGE wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt (Abb. 21 A).

Das LambdaSo Kapsid-Protein SO\_2963 konnte nach 4 Stunden Inkubation zunächst in geringen Mengen detektiert werden. Im weiteren Verlauf der Biofilmmreifung akkumulierte dieses Protein in beträchtlichen Mengen in der Biofilmmkultur. Im Gegensatz dazu konnte das korrespondierende Protein des Phagen MuSo2 in Zellen bereits nach einer Stunde nach Anheftung nachgewiesen werden. Nach 4 Stunden war die Proteinkonzentration in der Biofilm-Probe gesunken. Signifikante Mengen dieses Proteins wurden nach 24 stündiger Anheftung der Zellen detektiert.

In den jeweiligen Prophagen-Mutanten wurden keine korrespondierenden Proteine detektiert (Abb. 21 A). Dies ist ein weiterer Beweis dafür, dass die Deletion des Prophagen-Genoms erfolgreich war und die Stämme nicht durch Reinfektion neue Prophagen aufgenommen haben.



**Abb. 21: Phagen-Freisetzung während der initialen Oberflächen-Anheftung und der Biofilmbildung.** (A) Detektion der Phagenpartikel von LambdaSo (obere Spalte) und MuSo2 (untere Spalte) in *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp und den korrespondierenden Prophagen-Mutanten ( $\Delta$ LambdaSo =  $\Delta\lambda$ ;  $\Delta$ MuSo2 =  $\Delta$ Mu) mittels Western-Blot-Analyse. Die Biofilm-Zellen wurden in Petrischalen statisch inkubiert und die Biofilm-Biomasse nach 1, 4 und 24 h geerntet. Das Zellysate wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Zur Detektion von Phagenpartikeln im Western-Blot wurden spezifische Antikörper gegen das dominante Kapsid-Protein von LambdaSo bzw. gegen die dominante Kopfuntereinheit von MuSo2 eingesetzt. (B) Bestimmung der relativen Zahl an DNA-Kopien der Phagen LambdaSo (schwarz) und MuSo2 (grau) im Vergleich zur chromosomalen DNA (weiß; durch *recA* repräsentiert) in der eDNA. Extrazelluläre DNA wurde aus dem Überstand von statisch wachsendem Wildtyp-Biofilmen 1, 4 und 24 h nach Inkubation isoliert. Die Kopienzahl wurde mittels quantitativer RealTime-PCR bestimmt. Eine Amplifizierung von *recA* wird dabei zur Determinierung der Kopienzahl chromosomaler DNA verwendet. Die Balken und Fehlerindikatoren repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichung von zwei Replikaten.

Ein weiterer indirekter Nachweis der Phagen in *S. oneidensis* MR-1 wurde mit Hilfe von quantitativer RealTime-PCR erbracht. Dabei wurde die Gesamt-DNA im zellfreien Überstand von statisch wachsenden Biofilmen isoliert und die Konzentration an Phagen-DNA im Verhältnis zu chromosomaler DNA quantifiziert. Im Fall von assemblierten Phagenpartikeln, in denen Phagen-DNA enthalten ist, sollte die Zahl an viralen DNA-Kopien größer sein als die Kopienzahl der extrazellulären chromosomalen DNA. Entsprach die Kopienzahl des amplifizierten

Genomabschnitts des Prophagen der Kopienzahl der chromosomalen DNA, konnte davon ausgegangen werden, dass nur der Prophage im Wirtsgenom in der Probe vorlag.

Abbildung 21 B stellt die Ergebnisse der q-RealTime-PCR dar. Die Amplifizierung von *recA*, einem konstitutiv exprimierten Gen im Genom von *S. oneidensis* MR-1, repräsentierte die Kopienzahl der chromosomalen DNA. Die Kopienzahl der Prophagen LambdaSo und MuSo2 wurde mittels der Amplifizierung von jeweils zwei im Prophagen-Genom verteilten Genabschnitten anhand ihres *cycle threshold* (ct)-Wertes berechnet und im Bezug zur Kopienzahl des Wirtschromosoms gesetzt.

Diese Analyse zeigte deutlich eine Anreicherung von MuSo2 Phagen-DNA im Überstand von 1 und 4 Stunden alten Oberflächen-assoziierten Zellen. In Zahlen ausgedrückt, befand sich im Biofilm-Überstand nach einer Stunde Inkubation 5,8 Kopien von MuSo2-DNA gegenüber einer Kopie der chromosomalen DNA, repräsentiert durch eine *recA*-Kopie. Im Überstand von Zellen, die nur für 15 Minuten an die Oberflächen adhärten, konnte eine fast 7-fache Anreicherung der MuSo2-DNA nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Kopienzahl der LambdaSo-DNA stieg dagegen erst nach 4 Stunden und erreichte eine 4,3-fache Anreicherung im Vergleich zur chromosomalen DNA. Nach 24 Stunden sank die relative Menge der jeweiligen Phagen-DNA ab.

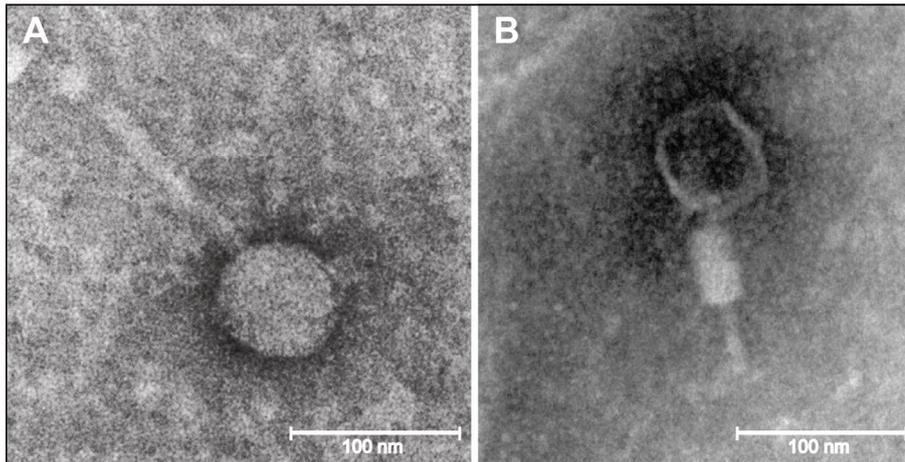
Die Kopienzahl der MuSo1-DNA entsprach in diesen Analysen der Kopienzahl der chromosomalen DNA (Daten nicht gezeigt). Dies zeigte ebenfalls, dass der Prophage MuSo1 – unter den getesteten Bedingungen – nicht in den lytischen Lebenszyklus zu wechseln vermag.

Die Ergebnisse aus der q-RealTime-PCR stimmten mit den Daten der Western-Blot-Analyse überein. Somit scheint der Phage MuSo2 bereits in der initialen Anheftungsphase von *S. oneidensis* MR-1 aktiv zu werden, seine DNA aus dem Wirtschromosom herauszuschneiden und Phagenpartikel zu assemblieren. Der Phage LambdaSo hingegen scheint besonders während der weiteren Biofilm-Reifung zwischen 4 und 24 Stunden aktiv zu werden.

### **Phagen MuSo2 und LambdaSo produzieren infektiöse Phagenpartikel**

Unter Einsatz von Elektronenmikroskopie sollte nun untersucht werden, ob Phagenpartikel in den verwendeten Überständen detektiert werden können. Dazu wurden die Überstände der 24 Stunden-alten Biofilme der LambdaSo- bzw. MuSo2-tragenden Mutanten unter einem Transmissionselektronenmikroskop in Zusammenarbeit mit Dr. Larissa Kolesnikova aus der Abteilung Virologie der Philipps-Universität, Marburg, analysiert. Diese elektronenmikroskopische Analyse erbrachte den direkten Nachweis von infektiösen Viruspartikeln von LambdaSo und MuSo2 in Biofilm-Überständen von *S. oneidensis* MR-1 (Abb. 22).

Zusammenfassend zeigten diese Untersuchungen, dass die Phagen MuSo2 und LambdaSo während der Biofilmentwicklung von *S. oneidensis* MR-1 von dem lysogenen in den lytischen Zustand umschalten und infektiöse Viruspartikel assemblieren. Welche Rolle die Prophagen oder Phagen-induzierte Zellyse dabei in der Biofilmentwicklung und -morphologie spielt, wurde im Folgenden untersucht.



**Abb. 22: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Phagenpartikeln aus *S. oneidensis* MR-1 Biofilm-Überständen.** Mutanten, die nur noch den Prophagen LambdaSo ( $\Delta\text{MuSo2}\Delta\text{MuSo1}$ ) (A) oder MuSo2 ( $\Delta\text{LambdaSo}\Delta\text{MuSo1}$ ) (B) tragen, wurden in Petrischalen für 24 h inkubiert. Anschließend wurden eine Probe des Überstandes entnommen und steril-filtriert. In den Überständen befindliche Phagenpartikel wurden mittels eines Transmissionselektronenmikroskops in Zusammenarbeit mit Dr. Larissa Kolesnikova analysiert.

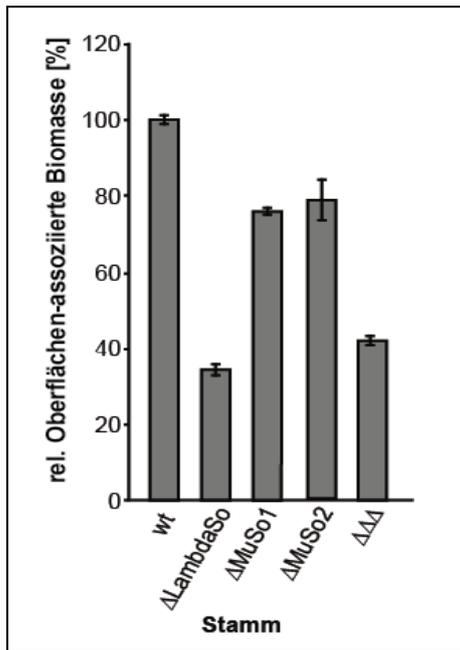
### 3.3.4 Die Rolle der Prophagen in *S. oneidensis* MR-1 Biofilmen

Zur Charakterisierung der Biofilmbildung unter statischen und hydrodynamischen Bedingungen wurden Einzel-Mutanten der Prophagen, sowie die Prophagen-freie Mutante  $\Delta\Delta\Delta$  verwendet. Mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Assays wurde zunächst die Biofilmbildung in statischer Kultur quantifiziert (Abb. 23).

#### $\Delta\text{LambdaSo}$ zeigt eine stark reduzierte Biofilmbildung unter statischen Bedingungen

Die Deletion der Genome der Mu-ähnlichen Prophagen MuSo1 und MuSo2 führte zu einer Verminderung der Oberflächen-assoziierten Biofilm-Biomasse auf etwa 80 % des Wildtyp Niveaus. Die Mutante  $\Delta\text{LambdaSo}$  zeigte sogar einen noch deutlicheren Biofilm-defizienten Phänotyp. Verglichen mit dem *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp akkumulierte diese Mutante nur etwa 38 % der an die Oberfläche angehefteten Biomasse und zeigte damit eine starke Einschränkung in der Zell-Anheftung und Biofilmbildung unter statischen Bedingungen (Abb. 23). In der Prophagen-freien Mutante  $\Delta\Delta\Delta$  dominierte der Biofilm-defiziente Phänotyp von  $\Delta\text{LambdaSo}$ .

Die mikroskopische Beobachtung der Biofilmentwicklung der Prophagen-Mutanten im Flusskammersystem gibt sowohl Aufschluss über die ersten Schritte der Zellanheftung und Kolonisierung der Oberfläche, als auch über die Reifungsprozesse des Biofilms (Abb. 24). Daher wurden die Mutanten  $\Delta\text{MuSo1}$ ,  $\Delta\text{MuSo2}$ ,  $\Delta\text{LambdaSo}$  und die Prophagen-freie Mutante  $\Delta\Delta\Delta$  mit GFP fluoreszenzmarkiert und in die Kanäle des Flusskammersystems inokuliert.



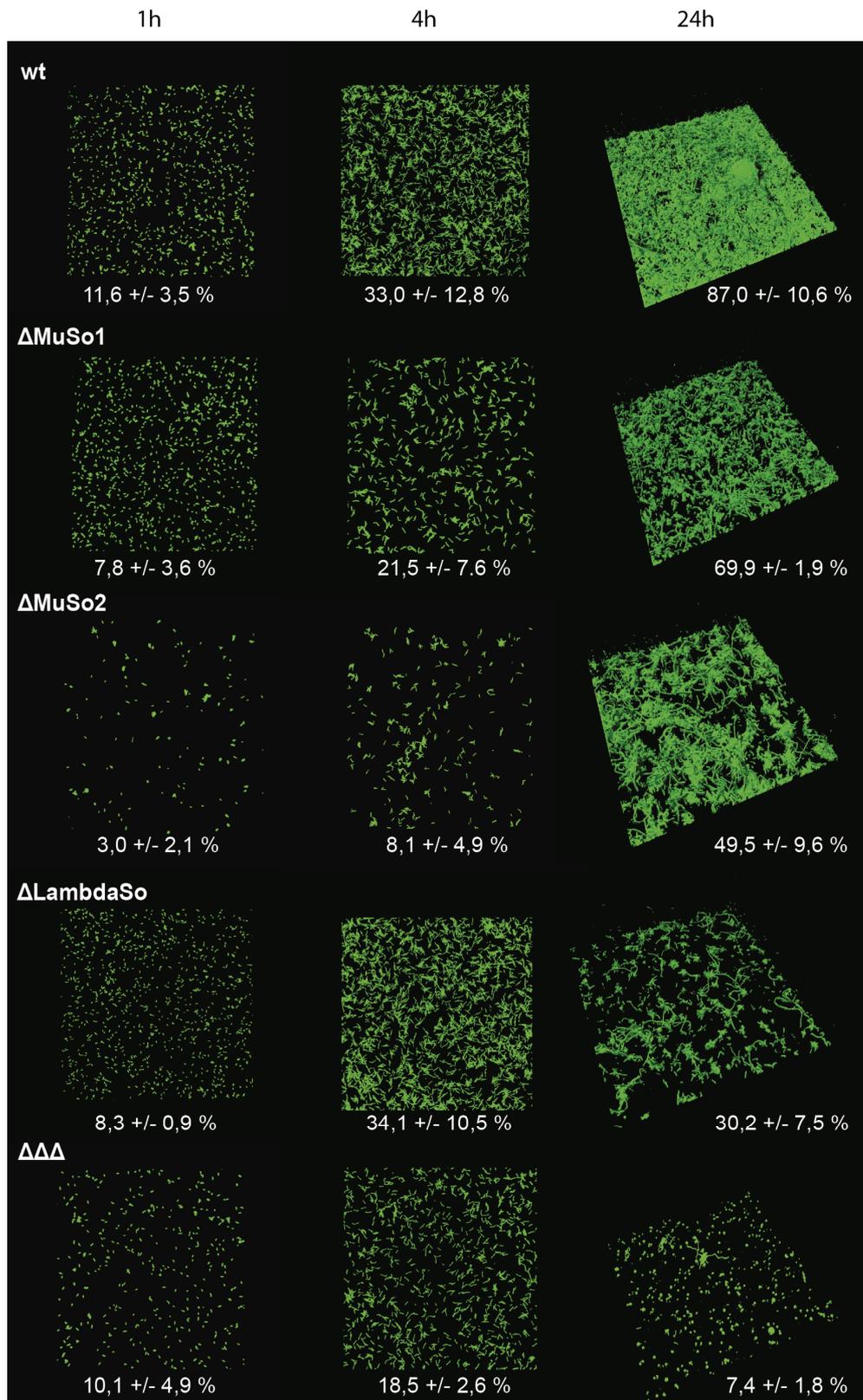
**Abb. 23: Biofilmentwicklung der Prophagen-Mutanten unter statischen Bedingungen.** *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp und die Mutanten  $\Delta$ LambdaSo,  $\Delta$ MuSo1,  $\Delta$ MuSo2 und  $\Delta$ LambdaSo $\Delta$ MuSo2 $\Delta$ MuSo1 ( $\Delta\Delta\Delta$ ) wurden in Mikrotiterplatten für 24 h inkubiert. Der Biofilm wurde mittels einer Kristall-Violett-Färbung der Oberflächen-assoziierten Biomasse quantifiziert. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei Replikaten; die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt.

### Das Fehlen der Prophagen führt zu einer gestörten Biofilmbildung unter hydrodynamischen Bedingungen

Unter hydrodynamischen Bedingungen wiesen die Mutanten  $\Delta$ MuSo1 und  $\Delta$ MuSo2 eine verzögerte Biofilmbildung auf (Abb. 24). Besonders  $\Delta$ MuSo2 zeigte eine stark verminderte Oberflächen-Anheftung mit ca. 3 % statt 11,6 % nach einer Stunde Inkubation im Vergleich zu *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp. Im weiteren Verlauf der Inkubation konnten beide Mutanten die Oberfläche besiedeln und bildeten drei-dimensionale Strukturen ähnlich denen des Wildtyps aus (Daten nicht gezeigt). Im starken Gegensatz dazu führte die Deletion des Prophagen-genoms von LambdaSo nicht zu einer Beeinträchtigung der Zellanheftung während der ersten 4 Stunden Inkubation (Abb. 24). Im Laufe der Entwicklung des Biofilms war die Mutante jedoch unfähig, die Oberfläche vollständig zu kolonisieren. Nach 24 Stunden zeigte  $\Delta$ LambdaSo nur eine Oberflächenabdeckung von 30 % statt 87 % gegenüber der Abdeckung des Wildtyps. Auch nach längerer Inkubation bildete die Mutante höchstens kleine dichtgepackte drei-dimensionale Zellaggregate aus.

Die Prophagen-freie Mutante  $\Delta\Delta\Delta$  wies einen additiven Biofilm-Phänotyp auf. Die initiale Oberflächen-Anheftung der Zellen war stark beeinträchtigt und auch nach 24-stündiger Inkubation konnte die Mutante nur 7,4 % der Oberfläche besiedeln. Diese Mutante ist demnach nicht zur Kolonisierung und Biofilmbildung fähig.

Zusammenfassend zeigten diese Untersuchungen, dass alle drei Prophagen eine Rolle während der Biofilmentwicklung spielen. Dabei scheint besonders der Prophage MuSo2 eine wichtige Rolle in der Oberflächen-Adhäsion der *S. oneidensis* MR-1 Wirtszellen zu spielen, während der Prophage LambdaSo eine vorherrschende Funktion in der Zell-Zell-Interaktion in späteren Prozessen der Biofilmentwicklung übernimmt.



**Abb. 24: Rolle der Prophagen MuSo1, MuSo2 und LambdaSo in der Biofilmentwicklung von *S. oneidensis* MR-1 unter hydrodynamischen Bedingungen.** GFP-markierte Wildtyp und Mutantenstämme  $\Delta$ MuSo1, MuSo2,  $\Delta$ LambdaSo und  $\Delta$ LambdaSo $\Delta$ MuSo2 $\Delta$ MuSo1 ( $\Delta\Delta\Delta$ ) wurden in Flusskammern inkubiert. Oberflächenbesiedlung und Biofilmbildung wurde mikroskopisch mittels eines konfokalen Laserscanmikroskops nach 1, 4 und 24 h analysiert. Dargestellt sind drei-dimensionale Schattenprojektionen. Die Prozentzahlen repräsentieren die gemittelte Oberflächenabdeckung der Zellen aus drei Replikaten. Die Schenkellänge der Bilder beträgt 250  $\mu$ m.

### 3.4 Charakterisierung von extrazellulärer DNA in *S. oneidensis* MR-1 Biofilmen

Zur Stabilität, aber auch zum Schutz vor negativen Umwelteinflüssen und Stressfaktoren bilden Bakterien innerhalb des Biofilms eine Biofilm-Matrix aus, die einen robusten Mikrokosmos darstellt [60, 237]. Diese Biofilm-Matrix stellt dabei den Großteil der Biofilm-Biomasse dar. Ihre Zusammensetzung ist dabei je nach Prokaryotenspezies sehr variabel. Besonders dem Anteil an extrazellulärer DNA (eDNA) in der Matrix wird eine große Bedeutung bezüglich Zellanheftung und Aufbau von Biofilmstrukturen zugesprochen [4, 53, 89, 131, 166, 199, 235, 274]. In *S. oneidensis* MR-1 ist die Zusammensetzung der Biofilm-Matrix noch nicht bekannt. Im Hinblick auf die vorherigen Forschungsergebnisse, dass zelllytische Prozesse und die Freisetzung von DNA während der Anheftungsphase von *S. oneidensis* MR-1 durch Phagen induziert werden, stellte sich die Frage, ob eDNA in diesem Organismus Aufgaben während der Adhäsion und der Biofilmentwicklung übernimmt.

#### 3.4.1 Effekt von DNase I-Behandlung auf die Biofilmbildung von *S. oneidensis* MR-1

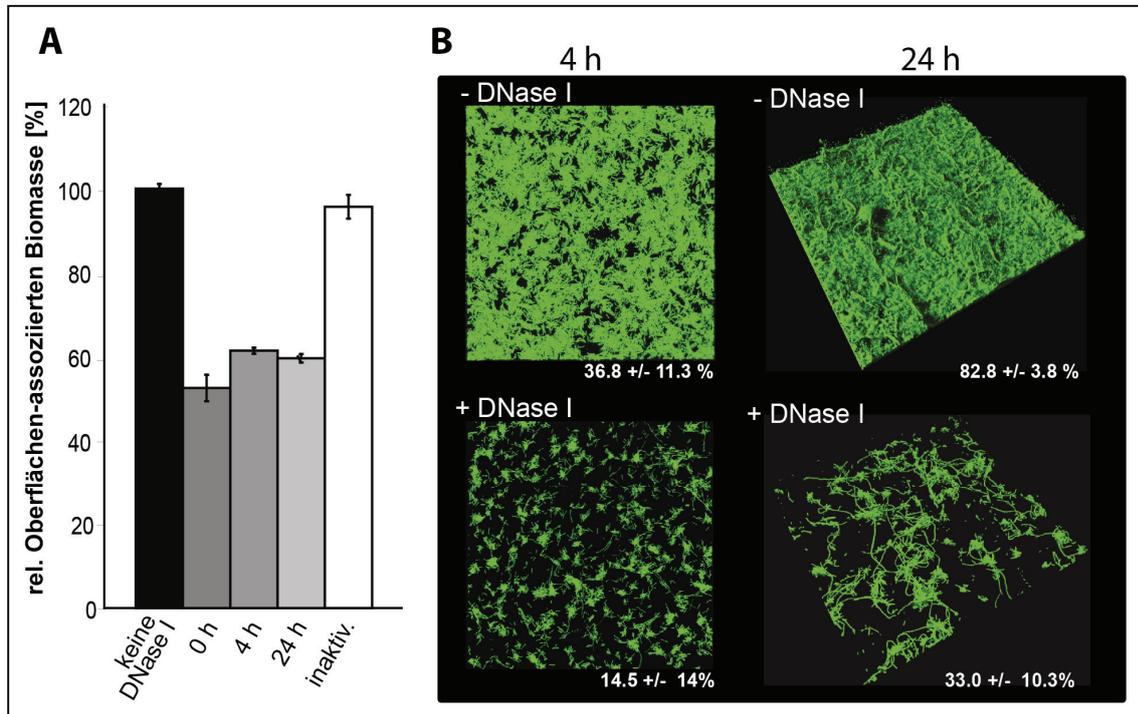
Um zu untersuchen, ob eDNA eine strukturelle Komponente in der Biofilmbildung von Oberflächen-assoziierten *S. oneidensis* MR-1 Zellen darstellt, wurde das Enzym DNase I zu verschiedenen Stadien der Anheftung und Biofilmentwicklung den Kulturen zugesetzt (Abb. 25). Wachstumsanalysen mit DNase I-Zusatz zur planktonischen Kultur bestätigten zuvor, dass eine Behandlung der Zellen mit diesem Enzym keinen Einfluss auf die Wachstumsrate hatte (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 25 A zeigt den Effekt der DNase I-Behandlung auf die Biofilmentwicklung statisch wachsender *S. oneidensis* MR-1 Kulturen in Mikrotiterplatten. Das Enzym wurde dabei vor Inkubation der Zellen (0 Stunden), sowie nach 4 und 24 Stunden Inkubation zugesetzt. Die Zugabe von DNase I zu statisch wachsenden *S. oneidensis* MR-1 Biofilmkulturen resultierte in einer massiven Ab- und Auflösung der Oberflächen-assoziierten Biomasse innerhalb von 15 bis 30 min. Insgesamt wurden 38-48 % der Biomasse im Vergleich zum unbehandelten Biofilm unabhängig von dem Stadium der Biofilmentwicklung abgelöst. Die Vorbehandlung der Oberfläche durch die Zugabe von DNase I vor Zellinkubation in den „Wells“ der Mikrotiterplatte (Zeitpunkt 0 Stunden) führte zu einer stark reduzierten Zellanheftung und eine daraus resultierender Reduktion der Biofilm-Biomasse nach 24 Stunden Inkubation.

Eine Kontrollbehandlung der Biofilmkultur mit hitzeinaktivierter DNase I zeigte keinen Effekt auf die Biofilm-Biomasse und bestätigte damit, dass die Aktivität des Enzyms der alleinige Auslöser für diese drastische Reduktion der Biofilm-assoziierten Biomasse darstellte.

Durch die Inkubation von GFP-fluoreszenzmarkierten *S. oneidensis* MR-1 Biofilmen im hydrodynamischen Flusskammersystem konnte der Effekt von DNase I auch visuell dokumentiert werden. Durch Exposition gegenüber dem Enzym wurden große Mengen der Oberflächen-assoziierten Zellen abgelöst und mit dem Mediumfluss entfernt (Abb. 25 B). Die Einzelschicht aus Zellen nach einer 4-stündigen Inkubation, die bis zu 40 % der Oberfläche abdeckte, wurde durch DNase I großflächig abgelöst. Nur eng verbundene Zellaggregate konnten der DNase I-

Behandlung widerstehen. Nach der Behandlung hatte sich die Oberflächenabdeckung auf 14 % reduziert.



**Abb. 25: Effekt von DNase I auf *S. oneidensis* MR-1 Biofilmen unter statischen und hydrodynamischen Bedingungen. (A)** Wildtyp-Zellen wurden in Mikrotiterplatten für 24 h inkubiert. DNase I wurde vor Zell-Inkubation (0 h), oder nach 4 bzw. 24 h dem Medium zugesetzt. Als Kontrolle wurde ein 24 h-alter Biofilm mit Hitze-inaktivierter DNase I behandelt. Die dargestellten Mittelwerte wurden aus drei Replikaten ermittelt; Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen. **(B)** GFP-markierte Wildtyp-Zellen wurden im Flusskammersystem unter hydrodynamischen Bedingungen inkubiert. Nach 4 und 24 h Inkubation wurde DNase I dem Mediumreservoir zugesetzt und die Biofilmzellen für 2 h mit diesem Medium überspült bevor die Biofilmentwicklung mittels konfokalen Lasermikroskops analysiert wurde. Dargestellt sind drei-dimensionale Schattenprojektionen mit einer Schenkelseite von 250  $\mu\text{m}$ . Die Prozentzahlen repräsentieren die gemittelte Oberflächenabdeckung der Zellen aus drei Replikaten.

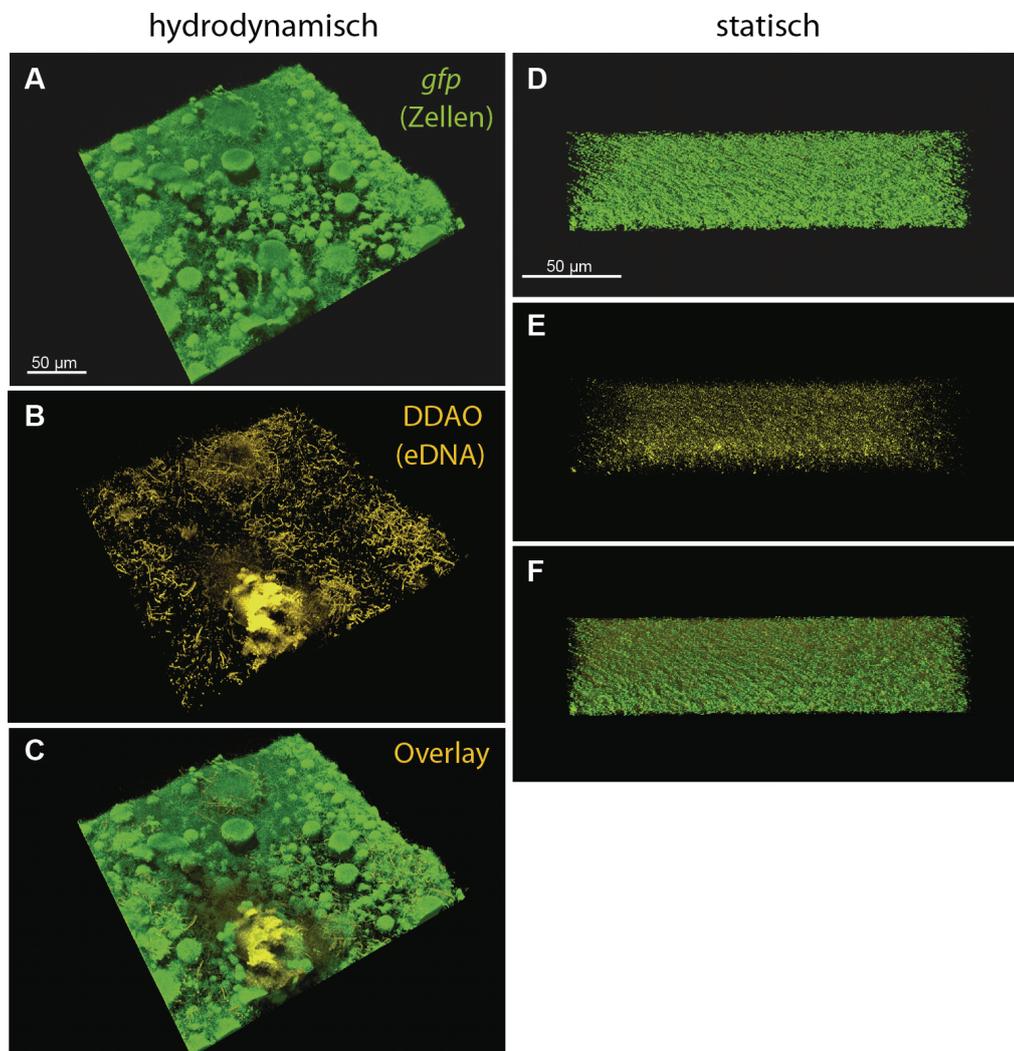
Auch auf einen bereits etablierten Biofilm hatte die Zugabe von DNase I einen drastischen Effekt (Abb. 25 B). Die Oberflächenabdeckung sank von 83 % auf 33 %. Hauptsächlich wurden dabei weniger die dichtgepackten drei-dimensionalen Strukturen, als vielmehr die weniger strukturierten Bereiche aufgelöst. Die direkte Zugabe von DNase I in das Medium vor Inokulation der Zellen im Flusskammersystem führte zu einer stark beeinträchtigten Zell-Oberflächen-Anheftung (Daten nicht gezeigt).

Diese Untersuchungen bestätigten, dass eDNA eine strukturelle Komponente in *S. oneidensis* MR-1 Biofilmen darstellt und bereits für die Zellanheftung und die Oberflächenkonditionierung von essenzieller Bedeutung ist. Resultierend aus diesen Ergebnissen stellte sich die Frage, ob die Zugabe von DNA das Anheften der Zellen und die Biofilmbildung stimulieren kann. Zu diesem Zweck wurde dem Mediumreservoir des Flusskammersystems isolierte chromosomale DNA von *S. oneidensis* MR-1 oder DNA aus Hering-Sperma zugesetzt und die Biofilmentwicklung mikroskopisch verfolgt. Unter den getesteten Bedingungen konnte extern zugegebene DNA weder die initiale Zell-Anheftung stimulieren, noch hatte sie einen Einfluss auf die Biofilmbildung zu späteren Zeitpunkten (Daten nicht gezeigt).

### 3.4.2 Detektion von eDNA in der Biofilm-Matrix von *S. oneidensis* MR-1

Für die Untersuchung der Biofilm-Matrix in lebenden Biofilmen werden meist *in situ* Detektionsverfahren verwendet, bei denen Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden. Extrazelluläre DNA kann durch spezifische interkalierende Farbstoffe, wie der Zellmembran-impermeable Farbstoff DDAO – 7-hydroxy-9H-(1,3-dichloro-9,9-dimethylacridin-2-one) – in Biofilmen sichtbar gemacht werden.

Zur Visualisierung der eDNA in Biofilmen wurden GFP-fluoreszenzmarkierte *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp-Zellen im Flusskammersystem unter hydrodynamischen Bedingungen (Abb. 26 A-C) und in kleine Kulturschalen unter statischen Bedingungen (Abb. 26 D-F) inkubiert und anschließend DDAO dem Medium zugesetzt. Die Detektion der eDNA mit dem Fluoreszenz-Farbstoff war aus Gründen der Sensitivität erst in reifen Biofilmen möglich. Als Kontrolle der Farbstoffspezifität und der korrekten Einstellung der fluorimetrischen Detektion wurde ein Stamm mit DNase I vorbehandelt und anschließend mit DDAO gefärbt. Wie erwartet, wurde keine eDNA nachgewiesen.



**Abb. 26: Detektion von eDNA in *S. oneidensis* MR-1 Biofilmen unter hydrodynamischen (A-C) und statischen Bedingungen (D-F).** Dargestellt sind Schattenprojektionen von Biofilmen (grün) nach 72 h Inkubation im Flusskammersystem (A) und nach 48 h in Kulturschalen (D). Die räumliche Verteilung von eDNA wird durch DDAO-Färbung (gelb; B, E) und Overlays der Bilder (C, F) sichtbar gemacht.

Unter hydrodynamischen Bedingungen war die DDAO-gefärbte eDNA in Schnur-ähnlicher Form organisiert, die den Biofilm durchzieht (Abb. 26 B). Dabei konnten vor allem innerhalb der drei-dimensionalen Strukturen erhöhte Mengen an eDNA detektiert werden. Während der mikroskopischen Untersuchung brach eine dieser drei-dimensionalen Strukturen auf und die gefärbte eDNA wurde freigesetzt (Abb. 26 B, C). Nichtsdestotrotz zeigten sich solche Strukturen relativ resistent gegenüber einer DNase I-Behandlung. Dies kann bedeuten, dass die eDNA innerhalb dieser Strukturen möglicherweise vor dem Enzym geschützt ist, oder dass weitere stabilisierende Faktoren in der Matrix vorhanden sind.

Unter statischen Bedingungen hingegen war die eDNA gleichmäßig im Biofilm verteilt (Abb. 26 E, F). Die räumliche Organisation und die Akkumulation von eDNA in *S. oneidensis* MR-1 Biofilmen ist demnach von der Kultivierungsmethode abhängig. Als strukturelle Komponente spielt sie für die Biofilm-Integrität sowohl unter statischen, als auch unter hydrodynamischen Bedingungen eine wichtige Rolle. Untersuchungen in Biofilmen der Prophagen-freien Mutante  $\Delta\Delta\Delta$  zeigten zudem, dass in dieser Biofilmkultur weder eDNA mittels Färbung detektiert werden konnte, noch dass eine DNase I-Behandlung einen Einfluss auf die Ausbildung des Biofilms nahm (Daten nicht gezeigt). Somit konnte ein weiterer Nachweis erbracht werden, dass eDNA durch Phagen-induzierte zelllytische Prozesse in *S. oneidensis* MR-1 Biofilmen freigesetzt wird.

### 3.5 Identifizierung von zwei extrazellulären Endonukleasen in *S. oneidensis* MR-1

Über den Ursprung und der Rolle der extrazellulären DNA in bakteriellen Biofilmen ist bereits einiges bekannt. Dagegen ist ihre Dynamik – mögliche Degradation und Verknüpfung – wenig erforscht. Dabei könnten vor allem extrazelluläre Nukleasen eine wichtige Rolle spielen.

In Genom-Analysen von *S. oneidensis* MR-1 wurden zwei Gene identifiziert, SO\_1066 und SO\_1844, die für putative extrazelluläre Endonukleasen kodieren [92]. Ihre korrespondierenden Gene werden höchstwahrscheinlich monozistronisch transkribiert. Das Protein SO\_1066 enthält eine N-terminale Signalsequenz, sowie eine putative C-terminale hydrophobe Transmembran-Domäne, die als Membran-Anker fungieren könnte. In Übereinstimmung mit dieser *in silico* Recherche belegen Proteom-Analysen die Assoziation von SO\_1066 mit der äußeren Zellmembran von *S. oneidensis* MR-1 [27, 244]. Das Protein SO\_1844 besitzt eine N-terminale Signalsequenz und wird voraussichtlich über Sec-abhängigen Transport aus der Zelle transportiert. Pinchuk und Kollegen identifizierten SO\_1844 im Überstand von *S. oneidensis* MR-1 Kulturen [191]. Aufgrund der Lokalisation beider Proteine werden im Folgenden SO\_1066 als ExeM (extrazelluläre Endonuklease, Membran-assoziiert) und SO\_1844 als ExeS (extrazelluläre Endonuklease, sekretiert) bezeichnet.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Transkriptom-Analysen zeigten, dass die Expression von SO\_1066 und SO\_1844 in Oberflächen-assoziierten Zellen differenziell reguliert wurde. Besonders während der ersten Anheftungsphase im statischen System wurde die Expression beider Gene induziert (Tab. 5).

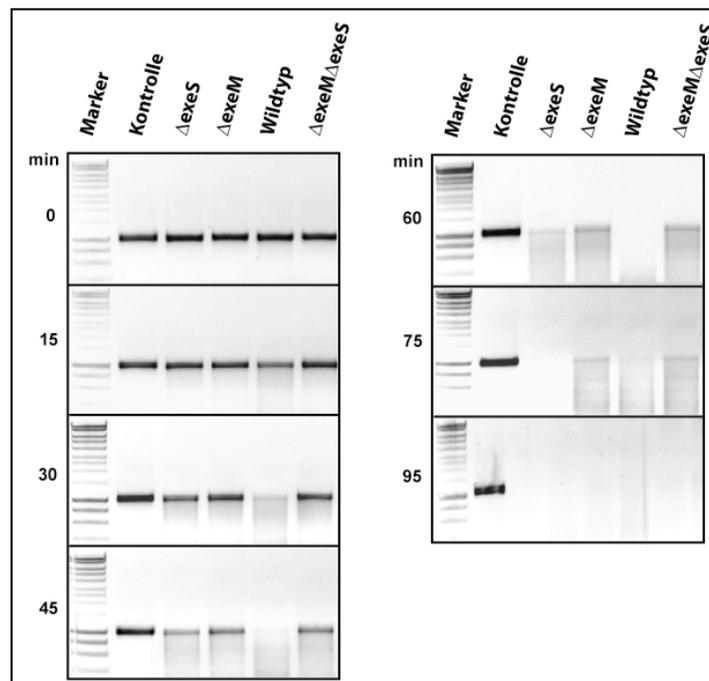
**Tab. 5: Differenzielle Genexpression von SO\_1066 (*exeM*) und SO\_1844 (*exeS*) in Oberflächen-assoziierten Zellen unter statischen Bedingungen und im hydrodynamischen System auf Glas- und Eisen(hydr)oxid-haltigen Kugeln.** Die Zahlen geben die  $\log_2$ -fache Veränderung der Genexpression in adhärenierten zu planktonischen Zellen wieder. Zahlen in Klammern geben Transkriptom-Daten wieder, deren p-Werte oberhalb der gesetzten Grenze von 0,05 liegen.

Gen	hydrodynamisch				statisch		Eisen	Produkt
	0,25 h	1 h	2 h	4 h	0,25 h	1 h	1 h	
SO_1066	(+1)	(+1,4)	(+1,4)	1,7	-	1,8	-	extrazelluläre Nuklease
SO_1844	-1,6	-1,5	-2,2	-2,6	-0,8	(+1,4)	-3,4	extrazelluläre Nuklease

### ExeM und ExeS besitzen extrazelluläre nukleolytische Aktivität

In Zusammenarbeit mit Magnus Heun konnte unter Einsatz von DNA-Degradation-Assays bewiesen werden, dass ExeM und ExeS in der Tat aktive Nukleasen darstellen und extrazelluläre DNA degradieren können. Die eingesetzten Deletionsmutanten  $\Delta exeM$ ,  $\Delta exeS$  und  $\Delta exeM\Delta exeS$  ( $\Delta\Delta$ ), sowie die Komplementationstämmen wurden zuvor von Kristina Paul im Rahmen ihrer Bachelor-Arbeit konstruiert [189].

Zum Nachweis der nukleolytischen Aktivität wurden *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp und die Mutanten  $\Delta exeM$ ,  $\Delta exeS$ , und  $\Delta exeM\Delta exeS$  ( $\Delta\Delta$ ) bis zum Erreichen der exponentiellen Phase in Minimal- bzw. Vollmedium inkubiert. Anschließend wurde die Nuklease-Aktivität in den zellfreien Überständen durch die Zugabe einer definierten Menge eines PCR-Produktes (hier: 1006 Bp) ermittelt (Abb. 27).



**Abb. 27: DNA-Degradation durch zwei extrazelluläre Nukleasen.** Zu den steril-filtrierten Überständen von *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp und den Mutanten  $\Delta exeM$ ,  $\Delta exeS$ , sowie  $\Delta exeM\Delta exeS$  wurde eine definierte Menge eines 1006 Bp-langen PCR-Fragments gegeben. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots der Proben entnommen und auf einem Agarosegel analysiert.

Im Überstand von *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp konnte eine erste Degradation des PCR-Fragments bereits nach 15 Minuten beobachtet werden (Abb. 27). Im Verlauf von 45 Minuten wurde das Fragment vollständig degradiert. Im Gegensatz dazu war die Nuklease-Aktivität im Überstand von  $\Delta exeS$  deutlich reduziert. Ein Abbau der DNA konnte erst nach 30 Minuten detektiert werden. Nach 75 Minuten war das zugegebene PCR-Fragment vollständig degradiert.

Eine Mutante, in der *exeM* deletiert wurde, zeigte einen noch deutlicheren Phänotyp. Auch nach 75 Minuten Inkubation konnte das PCR-Fragment noch im zellfreien Überstand nachgewiesen werden. Auch die Doppelmutante zeigte diese stark reduzierte Nuklease-Aktivität (Abb. 27).

In einem zweiten Ansatz wurde die gleiche definierte Menge an PCR-Produkt direkt zu den exponentiell wachsenden Kulturen zugegeben. Dabei zeigte sich das gleiche Muster an DNA-Degradation in den einzelnen Stämmen wie im Überstand.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass *exeM* und *exeS* für aktive extrazelluläre Nukleasen kodieren. Besonders das potenziell in der Membran verankerte ExeM zeigte dabei eine hohe nukleolytische Aktivität, die auch im zellfreien Überstand der *S. oneidensis* MR-1 Kultur, möglicherweise auf Grund von Zellyse-Prozessen, nachgewiesen werden konnte. Da auch in Abwesenheit von ExeM und ExeS ein signifikantes Maß an DNA-Degradation detektiert wurde, scheint *S. oneidensis* MR-1 über weitere Proteine mit nukleolytischer Aktivität zu verfügen.

Um nun die Rolle der extrazellulären Nukleasen ExeM und ExeS für *S. oneidensis* MR-1 näher zu definieren, wurden von Magnus Heun im Rahmen seiner Master-Arbeit weitere Analysen der Nukleasen angestellt. Um ein komplettes Bild der Aufgaben der Nukleasen zeichnen zu können, wird im Folgenden eine Wachstumsanalyse angebracht. Detaillierte Protokolle und Ergebnisse können in seiner Arbeit entnommen werden [97].

### 3.5.1 Nuklease-abhängige Verwertung von extrazellulärer DNA als Nahrungsquelle in *S. oneidensis* MR-1

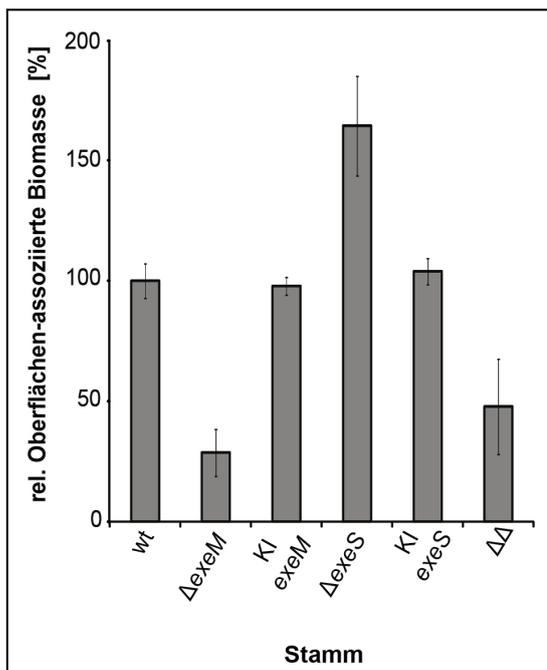
Frühere Studien erbrachten den Beweis, dass *S. oneidensis* MR-1 extrazelluläre DNA als Nährstoffquelle für Phosphor, Kohlenstoff und Stickstoff verwerten kann [191]. Dabei wurde die Hypothese aufgestellt, dass extrazellulären Nukleasen wie ExeS, für die Degradation der DNA verantwortlich sein könnten. Mittels Wachstumsanalysen von Zellen des *S. oneidensis* MR-1 Wildtyps und der Deletionsstämmen  $\Delta exeM$ ,  $\Delta exeS$ , sowie  $\Delta exeM\Delta exeS$  ( $\Delta\Delta$ ) konnte von Magnus Heun gezeigt werden, dass der Organismus in der Tat DNA-Fragmente (>10 kBp) als einzige Phosphatquelle verwerten kann [97]. Im Gegensatz zu *exeS* führte eine Deletion von *exeM* zu einem signifikant reduzierten Wachstum der Zellen. Die Doppelmutante zeigte das gleiche Wachstumsdefizit wie diese Mutante. In Anwesenheit von DNA als einzige Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle konnten weder die Zellen des Wildtyps noch der Mutanten wachsen. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass *S. oneidensis* MR-1 extrazelluläre DNA als einzige Phosphatquelle unter Beteiligung der Nuklease ExeM verdauen kann.

### 3.5.2 Rolle von ExeM und ExeS in *S. oneidensis* MR-1 Biofilmen

Aufgrund der vorausgegangenen Identifizierung von eDNA als essenzielle Komponente in der Zell-Anheftung und Biofilm-Integrität von *S. oneidensis* MR-1, stellte sich die Frage, ob die extrazellulären Endonukleasen ExeM und ExeS ebenfalls eine Rolle in der Biofilmbildung spielen. In Zusammenarbeit mit Kristina Paul wurde dazu die Biofilmentwicklung der Nuklease-Mutanten unter statischen und hydrodynamischen Bedingungen quantifiziert und mikroskopisch verfolgt.

Nach 24 stündiger Inkubation in Mikrotiterplatten zeigte die Mutante  $\Delta exeM$  im Vergleich zum Wildtyp eine stark reduzierte Oberflächen-Anheftung und Biofilmbildung (28 % Biomasse; Abb. 28). Dagegen führte die Deletion von *exeS* zu einer Akkumulation der Oberflächen-assoziierten Biomasse auf 162 % verglichen zur Biomasse des Wildtyps.

Die Doppelmutante  $\Delta exeM\Delta exeS(\Delta\Delta)$  bildete weniger Biofilm (48 %) als der Wildtyp und glich damit dem  $\Delta exeM$  Phänotyp. Eine Komplementation der Mutanten durch Reintegration des Gens („*knock in*“) in das Chromosom von *S. oneidensis* MR-1 führte wieder auf das Wildtyp-Niveau zurück. Daraus lässt sich schließen, dass der observierte Effekt auf die Biofilmbildung der Deletion von *exeM* bzw. *exeS* zugrunde liegt.

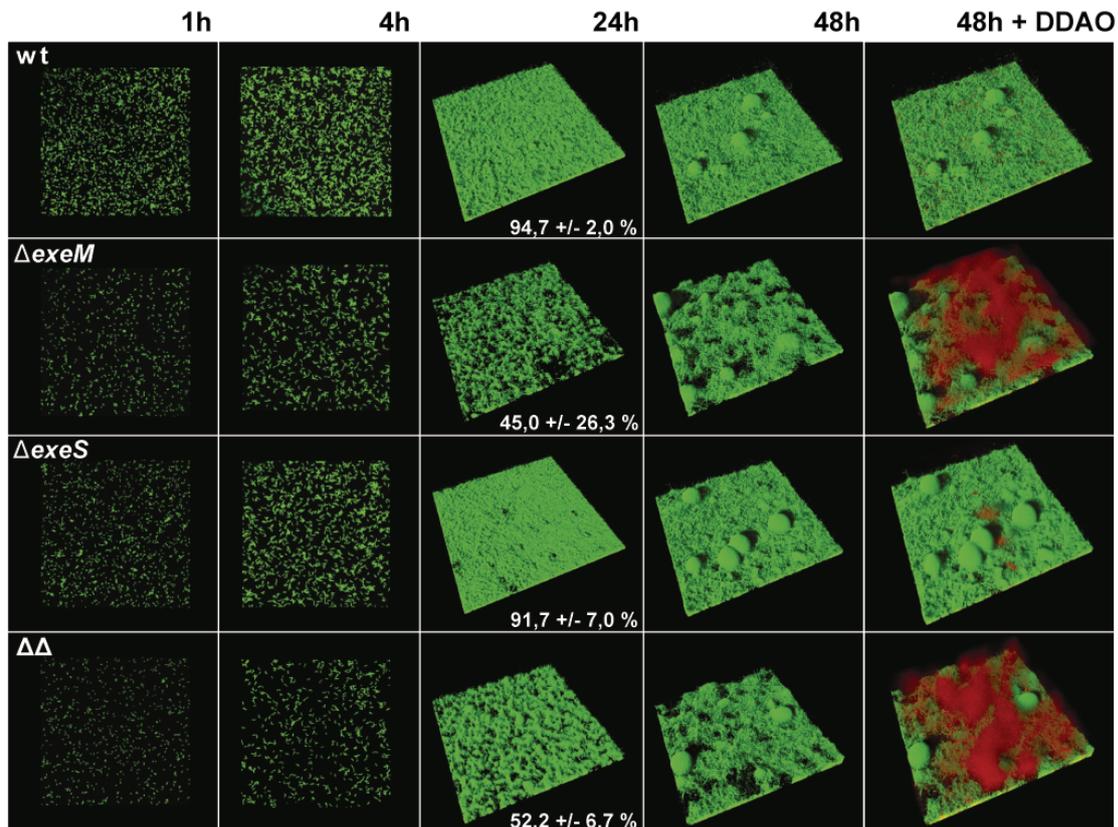


**Abb. 28: Biofilmbildung der Nuklease-Mutanten unter statischen Bedingungen.** *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp und die Mutanten  $\Delta exeM$ ,  $\Delta exeS$  und  $\Delta exeM\Delta exeS$  ( $\Delta\Delta$ ), sowie die korrespondierenden Komplementationsstämme (KI) wurden in Mikrotiterplatten für 24 h inkubiert. Unter Einsatz von Kristall-Violett-Färbung wurde die Biofilmbildung anhand der Oberflächen-assoziierten Biomasse quantifiziert. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei Replikaten; die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt.

Um die Biofilmentwicklung unter hydrodynamischen Bedingungen mittels konfokaler Laserscanmikroskopie zu verfolgen, wurden die Deletionsmutanten und die Komplementationsstämme mit GFP fluoreszenzmarkiert. Anschließend erfolgte die Inkubation im hydrodynamischen Flusskammersystem. Die Biofilmentwicklung wurde zu verschiedenen Zeitpunkten dokumentiert (Abb. 29).

Unter hydrodynamischen Bedingungen führte die Deletion von *exeM* zu einer veränderten Biofilmentwicklung. Während die initiale Zell-Anheftung nicht beeinflusst war, zeigte die Mutante  $\Delta exeM$  einen Defekt in der Oberflächen-Kolonisierung in etablierten Biofilmen nach 24 und 48 Stunden. Zum Vergleich besiedelte *S. oneidensis* MR-1 etwa 95 % der Oberfläche, während  $\Delta exeM$  mit 45 % eine reduzierte Oberflächenabdeckung aufwies. Auch schien diese Mutante kleinere, sehr eng verknüpfte Mikrokolonien und mehr drei-dimensionale Strukturen als der

Wildtyp nach 48 Stunden Inkubation in den Flusskammern auszubilden. Die Doppelmutante  $\Delta exeM\Delta exeS$  ( $\Delta\Delta$ ) zeigte auch unter hydrodynamischen Bedingungen einen mit  $\Delta exeM$  vergleichbaren Biofilm-defizienten Phänotyp. Im Gegensatz dazu waren keine signifikanten phänotypischen Veränderungen in der Biofilmentwicklung von  $\Delta exeS$  gegenüber dem Wildtyp zu beobachten. Nach 24 Stunden Inkubation hatte diese Mutante etwa 92 % der Oberfläche besiedelt. Auch die Biofilmarchitektur war durch die Deletion dieser Nuklease nicht signifikant verändert.



**Abb. 29: Biofilmentwicklung der Nuklease-Mutanten unter hydrodynamischen Bedingungen.** GFP-markierte Zellen des *S. oneidensis* MR-1 Wildtyps und der Mutantenstämme  $\Delta exeM$ ,  $\Delta exeS$  und  $\Delta exeM\Delta exeS$  ( $\Delta\Delta$ ) wurden in Flusskammern inkubiert. Oberflächenbesiedlung und Biofilmbildung wurde mikroskopisch mittels eines konfokalen Laserscannmikroskops nach 1, 4, 24 und 48 h analysiert. Die letzte Spalte zeigt die Verteilung von eDNA (rot) in 48 h alten Biofilmen nach Anfärben mit DDAO. Dargestellt sind dreidimensionale Schattenprojektionen. Die Prozentzahlen repräsentieren die gemittelte Oberflächenabdeckung der Zellen nach 24 h Inkubation aus drei Replikaten. Die Schenkellänge entspricht 250  $\mu\text{m}$ .

Zur Visualisierung und Lokalisierung von eDNA in den Biofilmen der Nuklease-Mutanten, wurde der Biofilm nach 48 Stunden Inkubation mit DDAO gefärbt (Abb. 29). Wie bereits im Kapitel 3.4.2 erwähnt, konnte eDNA in Wildtyp-Biofilmen besonders innerhalb von dreidimensionalen Strukturen detektiert werden. Ein ähnliches Bild zeichnete sich für die Mutante  $\Delta exeS$  ab. Auffällige Unterschiede waren dagegen in der Mutante  $\Delta exeM$  und der Doppelmutante zu beobachten. In diesen Stämmen war die eDNA nicht nur in dreidimensionalen Stämmen in detektierbaren Mengen vorhanden, sondern sie akkumulierte als eine dicke Schicht sowohl innerhalb, als auch oberhalb der Biofilmstrukturen von  $\Delta exeM$  bzw. der Doppelmutante.

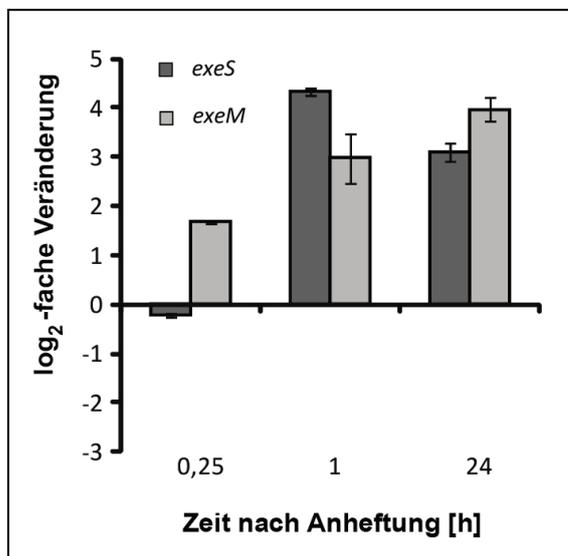
Diese Untersuchungen zeigten, dass beide extrazellulären Endonukleasen ExeM und ExeS in die Biofilmbildung von *S. oneidensis* MR-1 eingreifen. Kann ExeS bisher nur unter statischen Bedingungen eine Rolle in der Biofilmentwicklung zugesprochen werden, so scheint ExeM dagegen unter beiden getesteten Bedingungen eine wichtige Aufgabe zu übernehmen. Die Akkumulation

von eDNA in  $\Delta exeM$  deutet darauf hin, dass diese Nuklease eine potenzielle Rolle in der dynamischen Prozessierung der eDNA in *S. oneidensis* MR-1 Biofilmen übernimmt.

### 3.5.3 Regulierung der Expression von *exeM* und *exeS* in *S. oneidensis* MR-1 Biofilmen

Sowohl ExeM als auch ExeS beeinflussen die Biofilmentwicklung unter statischen Bedingungen. Daraus ergab sich die Frage, ob und wie die korrespondierenden Gene der Nukleasen während der Biofilmbildung differenziell reguliert werden (siehe Tab. 5).

Um die Regulation der Genexpression von *exeM* und *exeS* genauer zu analysieren, wurde RNA aus *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp-Zellen isoliert, die in Petrischalen für 0,25, 1 und 24 Stunden inkubiert wurden. Die frühen Zeitpunkte repräsentieren die initiale Anheftungsphase der Zellen, während nach 24 Stunden der Biofilm etabliert ist. Die Transkriptmengen wurden unter Verwendung einer quantitativen RealTime-PCR ermittelt.



**Abb. 30: Genexpression von *exeM* und *exeS* in *S. oneidensis* MR-1 während der Biofilmbildung unter statischen Bedingungen.** Die Transkriptmengen von *exeM* und *exeS* in Oberflächen-assoziierten Zellen nach 0,25, 1 und 24 h wurden mit Hilfe einer q-RealTime-PCR ermittelt. Dargestellt sind die log<sub>2</sub>-fache Veränderungen der Genexpression in Verhältnis zu Transkriptmengen in planktonischen Zellen. Die Werte und Standardabweichungen wurden aus zwei Replikaten ermittelt.

Die Expression beider Gene wurde bereits in der ersten Anheftungsphase der Zellen positiv reguliert (Abb. 30). Während *exeM* bereits nach 0,25 h vermehrt transkribiert wurde, zeigten die Daten für *exeS* eine positive Regulation der Genexpression nach einer Stunde. In dieser frühen Phase der Biofilmbildung zeigte die Expression *exeM* und *exeS* eine log<sub>2</sub>-fache Veränderung (log FC) um den Faktor 3 bzw. 4,3. *exeM* und *exeS* wurden demnach um den Faktor 7,9 bzw. < 20 hochreguliert. Auch in assemblierten Biofilmen nach 24 Stunden Inkubation wurde die Expression von *exeM* und *exeS* signifikant induziert (log FC 3,8 und 3).

Resümierend konnte den beiden extrazellulären Endonukleasen ExeM und ExeS aus *S. oneidensis* MR-1 eine nukleolytische Aktivität nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Genexpression beider Nukleasen schon zu einem frühen Zeitpunkt in der Biofilmbildung induziert wird und dass sowohl ExeM, als auch ExeS eine wichtige Funktion während dieser Entwicklung in Abhängigkeit der Umweltbedingungen übernehmen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Auswirkungen der Umweltbedingungen auf die Biofilmbildung von *Shewanella oneidensis* MR-1

Bakterien können auf einer Vielfalt von Oberflächen und unter unterschiedlichsten Umweltbedingungen Biofilme aufbauen, deren Zusammensetzung und Architektur von Umwelt-Signalen determiniert werden [77, 278]. Frühere Studien zeigten, dass Biofilme von *Shewanella oneidensis* MR-1 unter hydrodynamischen Bedingungen von dichten drei-dimensionalen Strukturen dominiert werden [153, 246, 250], die als charakteristisches Merkmal für bakterielle Biofilme gelten [42, 46]. Die Entwicklung dieser Strukturen in Biofilmen in diversen Bakterienarten ist dagegen sehr unterschiedlich und von verschiedenen zellulären Prozessen geprägt [119, 232]. So wird der drei-dimensionale Aufbau in *Pseudomonas aeruginosa* durch zelluläre Migrationsprozesse vermittelt, in denen eine mobile Subpopulation mit Hilfe von Typ IV Pili auf eine unbewegliche Subpopulation „klettern“ [125]. Obwohl auch *Shewanella oneidensis* MR-1 über einen solchen Typ IV Pilus verfügt, zeigten die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten mikroskopischen Analysen, dass die Etablierung von drei-dimensionalen Biofilmstrukturen in *S. oneidensis* MR-1 vorrangig auf klonalem Wachstum der Zellen basiert.

Bisherige Studien an *S. oneidensis* MR-1 hoben die Eigenschaften der Biofilmbildung unter hydrodynamischen Bedingungen hervor, was aber – im Bezug auf das limnische stehende Gewässer des Lake Oneida – nicht die Gesamtheit des Habitats umfasst. Daher wurde ein statisches Inkubationssystem entwickelt, das einen erweiterten Einblick in die Entwicklung von *S. oneidensis* MR-1 im natürlichen Umfeld zulässt. In statischer Umgebung aggregieren *S. oneidensis* MR-1 Zellen nicht zu komplexen Strukturen, sondern bilden ein netzartiges System aus nicht direkt miteinander interagierenden Zellen aus, das auch induzierten Scherkräften widerstehen kann. In beiden Ausprägungen des Biofilms ist extrazelluläre DNA (eDNA) ein entscheidend wichtiges Element, das – je nach Beschaffenheit der Umgebung – unterschiedliche Formen der Biofilmstruktur vermitteln kann (siehe dazu auch Kapitel 4.3).

Biofilmreifung und Organisation stehen folglich in engem Zusammenhang mit den vorherrschenden Umweltbedingungen. Das lässt vermuten, dass Umweltfaktoren bereits Einfluss auf den ersten Oberflächenkontakt und das Adhärenzverhalten der Zellen an ein Substrat nehmen und damit die Entwicklung spezifischer Biofilmausprägungen beeinflussen. Somit wurden sowohl redox-aktive als auch inerte Oberflächen, bzw. statische wie hydrodynamische Bedingungen verwendet, um den Effekt dieser Einflüsse auf das Transkriptom während initialer Phasen der Biofilmbildung von *S. oneidensis* MR-1 zu untersuchen.

### 4.2 Spezifische genetische Antwort auf initiale Anheftung in *S. oneidensis* MR-1

Der erste Oberflächenkontakt und der Übergang der Zellen von einem planktonischen zu einem sessilen Lebensstil bilden den ersten Schritt im Aufbau von Biofilmen [234, 250]. Mithilfe diverser genetischer Untersuchungen und Transkriptom-Analysen von Populationen in reifen

Biofilmen wurden erste Schritte in Richtung der Entschlüsselung von zellulären Anpassungen, sowie genetischen Anforderungen und Variationen der Biofilm-assoziierten Zellen gegenüber ihrer planktonischen Pendanten unternommen [62, 96, 156, 218, 219, 231, 233, 263, 273, 275]. Diese Studien belegen, dass eine distinkte Physiologie der Biofilm-assoziierten Zellen durch die differenzielle Expression einiger Biofilm-spezifischer Regulons charakterisiert wird. Als universelle zelluläre Anpassung an das Leben in Biofilmen zeichnen sich diese Zellen besonders durch die Repression ihres Bewegungsapparates, wie Flagellen, die Induktion der Synthese von Matrix-Komponenten und den Wechsel zu einer anaeroben Respiration aus [62, 156, 182].

Im Gegensatz zu den molekularen Mechanismen im gereiften Biofilm sind die zellulären Prozesse in der initialen Anheftungsphase der Zellen bisher weitestgehend unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten – unter Einsatz von Transkriptom-Analysen – essenzielle Komponenten für die Oberflächen-Interaktion von *S. oneidensis* MR-1 identifiziert, sowie zelluläre Antworten auf die veränderte Lebensbedingung entschlüsselt werden. Durch die Etablierung eines Erntesystems war es erstmals möglich, Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der initialen Anheftung unter hydrodynamischen Inkubationsbedingungen – unter Verwendung von unterschiedlichen Substraten – zu isolieren, ihre Expressionsprofile zu analysieren und dem Profil von planktonischen und adhärnten Zellen in statischen Systemen gegenüberzustellen. Mithilfe dieser vergleichenden Analysen der Transkriptome konnte zum einen ein universeller zellulärer Mechanismus als Antwort auf den Oberflächenkontakt der *S. oneidensis* MR-1 Zellen identifiziert werden, zum anderen zeigten die Analysen der Expressionsprofile auch Umwelt-spezifische zelluläre Antworten auf, mit deren Hilfe sich die Zellen an die vorherrschende Bedingung anpassen. Zudem konnte eine spezifische Anpassung des Transkriptoms adhärnter Zellen an die Anwesenheit eines redox-aktiven Eisen(hydr)oxid-Substrats nachgewiesen werden.

#### **4.2.1 Eisen(hydr)oxid-induzierte transkriptionelle Veränderungen in adhärnten *S. oneidensis* MR-1 Zellen**

In anaerober Umgebung repräsentiert die Anheftung an eine Eisen(hydr)oxid-Oberfläche einen essenziellen Schritt in räumlicher wie zeitlicher Organisation des Daseins Eisen-reduzierender Bakterien. So kann *S. oneidensis* MR-1 nur durch direkten Kontakt mit, oder über eine kurze Distanz zu einem Substrat – unter Einsatz von Elektronentransport-Systemen – Eisenionen reduzieren [135]. Was aber geschieht bei erstem Kontakt der Zellen mit einem Eisen(hydr)oxid-Substrat und wie reagieren die Zellen auf Eisenoxid in Anwesenheit von Sauerstoff? Zur Beantwortung dieser Fragen und zur Identifizierung von Faktoren, die eine Rolle in einer potenziellen Oberflächenerkennung der Zellen spielen könnten, wurde das globale Expressionsmuster von adhärnten Zellen auf einem Eisen(hydr)oxid-Substrat ausgewertet. Die in dieser Arbeit verwendete Metallionen-Oberfläche wurde bisher noch nicht zweifelsfrei als ein für *S. oneidensis* MR-1 verwertbares Substrat bestätigt, jedoch konnte bereits eine Eisenionen-Reduktion in diesem Organismus in Anwesenheit von Hämatit ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) und Eisen(III)(hydr)oxid-haltigen Substraten unter Ausschluss von Sauerstoff dokumentiert werden [135, 142, 175].

Sauerstoff-Messungen im hydrodynamischen System bestätigten die Erhaltung aerober Bedingungen über eine Inkubationszeit von mehr als 4 Stunden. Aufgrund des Aufbaus des hydrodynamischen Systems konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sich zwischen einzelnen Kugeln aufgrund von Diffusionsbarrieren anaerobe Mikroumgebungen ausbilden, in denen Oberflächen-assoziierte Zellen ihre Respiration umstellen. Lies und Kollegen zeigten, dass aerob wachsende *S. oneidensis* MR-1 Zellen zwar nur ein geringes Potenzial zur Eisenionen-

Reduktion aufweisen, den Prozess der Umstellung an eine induzierte Sauerstoff-Limitierung aber innerhalb kürzester Anpassungsphase vollziehen können [135].

Die Modulierung des Expressionsprofils durch die verstärkte negative Regulierung der Synthese von Komponenten des Eisen-Reduktionsapparates (Cytochrome, Siderophore etc.) und des anaeroben Energie-Metabolismus deutet jedoch darauf hin, dass die vorherrschenden Inkubationsbedingungen ausreichend molekularen Sauerstoff als nutzbaren terminalen Elektronenakzeptor bereitstellen. Somit scheint *S. oneidensis* MR-1 unter den getesteten Bedingungen keine Kompetenz zur Eisenionen-Reduktion aufzuweisen.

Die durchgeführten Transkriptom-Analysen zeigten außerdem, dass *S. oneidensis* MR-1 Zellen tatsächlich eine spezifische Antwort auf die Adhäsion an ein redox-aktives Substrat im Vergleich zu einer inerten Oberfläche ausprägen. In Glas-assozierten Zellen in einem hydrodynamischen System wird die metabolische Aktivität der Zellen reduziert. Dies spricht dafür, dass die adhären Zellen durch die Chemostat-ähnlichen Bedingungen optimal versorgt werden. Dagegen zeigen Eisen(hydr)oxid-exponierte Zellen eine gesteigerte metabolische Aktivität, die sich besonders in der Aminosäure- und Lipid-Biosynthese ausprägt. Dies könnte implizieren, dass die Anwesenheit einer korrodierten Eisen-Oberfläche eine chemische Stresssituation in den adhären Zellen auslöst, was zu einer gesteigerten metabolischen Aktivität der Zellen führen könnte, um mögliche zelluläre Schäden zu korrigieren. Eine zelluläre Antwort auf durch ein Eisen-Überangebot induzierten oxidativen Stress in Form von Induktion von Detoxifikations-Systemen wurde in *S. oneidensis* MR-1 bereits beschrieben [11].

Darüber hinaus lässt auch die reduzierte Transkription der Gene von Eisentransport-Systemen, wie TonB-ExBD-1 und HmuTUV, vermuten, dass die genetischen Veränderungen eher eine Schutzreaktion der Zellen auf ein Überangebot an Eisenionen als Elektronenakzeptor und Cofaktor darstellt. Eine solche negative Regulierung der Eisentransport-Systeme als Antwort auf Eisenionen-gesättigte Bedingungen in *S. oneidensis* MR-1 wurde auch in anderen Studien beobachtet [283]. Dabei werden die Gene der Transporter-Komponenten direkt durch den Eisenaufnahme-Regulator Fur (SO\_1937) reguliert, der durch Komplexbildung mit Eisen- oder Manganionen die Genexpression reprimiert [215]. Auch wenn *fur* in Oberflächen-assozierten *S. oneidensis* MR-1 Zellen der vorliegenden Studie nicht differenziell reguliert wird, könnten diese Zellen ebenfalls durch einen Fur-gesteuerten regulatorischen Mechanismus die Anwesenheit eines Eisen(hydr)oxid-haltigen Substrats erkennen. Ein weiterer potenzieller Kandidat für die Regulierung der Eisentransport-Systeme stellt der Sigmafaktor  $\sigma^{70}$  dar, dessen Genexpression in Eisenionen-exponierten, adhären Zellen induziert wird. Sequenz-Analysen ordnen dieses Protein in die Familie der Sigmafaktoren mit extrazytoplasmatischer Funktion (ECF) ein [11, 108]. Vertreter dieser Gruppe sind in *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* und vielen anderen Bakterien in der Eisen-Akquisition durch die transkriptionelle Regulierung von Eisen-Aufnahmesystemen und Siderophoren involviert [259].

#### 4.2.2 Anpassung von *S. oneidensis* MR-1 an Sauerstoff-Limitierung während der Anheftungsphase

In statischen Ökosystemen bilden Gradienten der Nährstoff- und Sauerstoff-Konzentrationen die limitierenden Faktoren für das Wachstum einer bakteriellen Population [232]. Dies impliziert eine fein abgestimmte Regulation des Stoffwechsels, um eine optimale Nischenbesetzung zu gewährleisten. Trotz fehlender Messung der Sauerstoffkonzentrationen, kann davon ausgegangen werden, dass im statischen Inkubationssystem nach einer Stunde anaerobe

Bedingungen vorherrschen, welche die Oberflächen-assoziierten Zellen dazu veranlassen, ihre Respiration umzustellen. Die Transkriptom-Analysen bestätigten diese Vermutungen. Während in adhärenierten Zellen im hydrodynamischen System die Synthese von Komponenten des anaeroben Stoffwechsels und Energie-Metabolismus reprimiert wird, reagieren Oberflächen-assoziierte Zellen unter statischen Bedingungen nach einer Stunde Inkubation auf den Kontakt mit der Oberfläche durch Induktion von Faktoren der anaeroben Respiration, wie beispielsweise Nitrit-, Nitrat-, Fumarat- oder DMSO-Reduktasen. Frühere Studien bestätigten die Beteiligung dieser Produkte an der Anpassung an ein anaerobes Wachstum in *S. oneidensis* MR-1 und anderen Bakterien [67, 80, 203, 228]. Auch die Synthese von Cytochromen, wie OmcA und OmcB, scheint in adhärenierten Zellen in Abwesenheit eines Mediumflusses induziert zu werden. Wie bereits erwähnt, spielen Cytochrome eine essenzielle Rolle in der anaeroben Respiration und Metallionen-Reduktion von *S. oneidensis* MR-1 [169, 170, 173].

Eine derartige Induktion des anaeroben Metabolismus wurde bisher hauptsächlich in etablierten Biofilmen diverser Bakterienpopulationen beobachtet [96, 156, 263], jedoch ließen die Autoren einer Studie an einzelschichtigen Biofilmen von *Vibrio cholerae* vermuten, dass in diesem Organismus die permanente Anheftung an eine Oberfläche – nach mehrstündiger Inkubation – zur Aktivierung von Proteinen der anaeroben Respiration führt [164]. Diese Anpassung beschränkt sich nicht allein auf eine metabolische Ebene, sondern drückt sich auch durch morphologische Veränderung der Zellen aus.

So könnten auch die Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen Analysen Oberflächen-assoziiertes *S. oneidensis* MR-1 Zellen im statischen System für eine solche Umstellung der Respiration sprechen. Unmittelbar nach dem ersten Oberflächenkontakt beginnen die adhärenierten Zellen mit der Ausbildung von Vesikeln auf ihrer Oberfläche. Vesikulation bedeutet eine Vergrößerung der Zell-Oberfläche, die als Antwort auf die Limitierung eines alternativ passenden Elektronenakzeptors die Aufnahme von Sauerstoff durch die erweiterte Oberfläche effektiv zu kompensieren versuchen könnten. In früheren Studien konnte eine solche Vesikulation von *S. oneidensis* MR-1 und *Shewanella putrefaciens* CN-32 als Reaktion auf die Anwesenheit eines soliden Eisen(hydr)oxid-Substrats unter vorrangig anaeroben Bedingungen identifiziert werden [78]. Diese identifizierten Vesikel – bestehend aus Komponenten der äußeren Membran, sowie periplasmatischen Proteinen und DNA – besitzen eine hohe Redox-Reaktivität und sind durch Nanokabel untereinander, mit den Zellen und dem Substrat verbunden. Die Anhäufung von Cytochromen und Proteinen der Elektronentransportkette in den Vesikeln erlaubt den Zellen eine höchst effiziente Reduktion von Metallionen und anderen terminalen Elektronenakzeptoren. Interessanterweise bilden *Shewanella* Zellen in Biofilmen auf Eisen(hydr)oxid-haltigem Substrat keine Vesikel aus [78]. Der Grund für diese Unterschiede zwischen einzelnen adhärenierten Zellen und Biofilmpopulationen ist noch unbekannt, lässt aber erahnen, dass in bakteriellen Gemeinschaften möglicherweise eine Entkoppelung – in zeitlicher wie räumlicher Hinsicht – metabolisch aktiver Vertreter vom Substrat stattfindet, was zu einem Rückgang der Vesikulation führen könnte. Des Weiteren zeigten Analysen der Matrix in *Shewanella* sp. HRCR-1 Biofilmen, dass aufgrund einer hohen Zahl an Cytochromen und anderen Redox-Proteinen, die Matrix selbst eine signifikante Rolle im extrazellulären Elektronentransfer einnimmt [33]. Sollte sich in *S. oneidensis* MR-1 eine ebensolche Matrix-Zusammensetzung bestätigen, könnte dies der Grund für den Produktionsstopp der redox-reaktiven Vesikel sein.

Neben diesen reduzierenden Eigenschaften werden die Vesikel auch zum Abtransport von Stoffwechselprodukten und Eisenpräzipitaten genutzt. Dies könnte auch in adhärenierten Zellen in einem statischen Umfeld von Vorteil sein. Während der Mediumfluss in einem hydrodynamischen System die adhärenierten Zellen permanent mit Nährstoffen versorgt und Stoffwechselprodukte abtransportiert werden, findet in statischer Umgebung nur Diffusion statt. Die Vesikulation könnte

somit neben der Steigerung des respiratorischen Potenzials einen aktiven Mechanismus zum Abtransport von akkumulierenden Stoffwechselprodukten darstellen.

Als weitere potenzielle Antwort auf eine Nährstoff-Limitierung und Metabolit-Ansammlung wird in adhärnten *S. oneidensis* MR-1 Zellen unter statischen Bedingungen die Synthese von ABC-Transportern, wie den Phosphat-ABC-Transportern Pst-1 und Pst-2, und dem korrespondierenden Phosphat-Antwortregulator PhoB positiv reguliert. Extrazelluläre Konzentrationen von anorganischem Phosphat beeinflussen die regulatorischen Eigenschaften von PhoB auf dessen spezifisches Regulon durch die Interaktion mit der Sensorkinase PhoR und dem Pst-System [160].

Die Verfügbarkeit von Phosphat wurde bereits in anderen Bakterien mit der Ausbildung von Biofilmen verknüpft. In *Agrobacterium tumefaciens* scheint die Limitierung von externem Phosphat die Ausbildung von Biofilmen zu fördern [44]. Im Gegensatz dazu führt ein Phosphat-Mangel in *Pseudomonas aureofaciens* und *P. fluorescens* zu einer Reprimierung der Biofilmentwicklung, indem unter anderem durch eine Regulationskaskade die intrazelluläre Konzentration von c-di-GMP reduziert wird [160, 162]. Es bleibt zu zeigen, welche Rolle das Pho-Regulationssystem in der zellulären Anheftung und der Biofilmentwicklung in *S. oneidensis* MR-1 spielt.

Interessant ist letztlich noch zu erwähnen, dass in Oberflächen-assoziierten Zellen in statischer Umgebung auch die Expression des chemotaktischen Apparates von *S. oneidensis* MR-1 induziert wird. Somit scheinen adhärnte Zellen besonders in statischer Umgebung ihr sensorisches Potenzial auf die Wahrnehmung der sie umgebenden Umwelt anzuwenden, um durch Verlassen der Oberfläche auf eventuell ungünstige Veränderungen schnell und effizient reagieren zu können. Auch in anderen Bakterien wurde eine solche Rolle des chemotaktischen Apparats für die Anheftung und Biofilmbildung postuliert [123, 164].

Zusammenfassend zeichnet die Vesikulation der Oberflächen-assoziierten *S. oneidensis* MR-1 Zellen zusammen mit den korrespondierenden Transkriptom-Daten das Bild einer schnellen zellulären Anpassung an ein statisches, anaerobes Umfeld durch eine rapide Induktion der anaeroben Respiration unmittelbar nach erstem Kontakt mit einer Oberfläche. Die Regulation der Vesikulation, wie auch die Induktion der Komponenten des anaeroben Metabolismus ist noch unbekannt. Ergebnisse früherer Studien geben jedoch Hinweise auf potenzielle Kandidaten.

Zwei bekannte Vertreter in der Regulierung des anaeroben Stoffwechsels in *S. oneidensis* MR-1 sind zum einen das Arc-Zweikomponenten-Signaltransduktionssystem [66, 80, 111], zum anderen das Katabolitgen-Aktivatorprotein CRP [214]. Die korrespondierenden Gene wiesen in den durchgeführten Analysen bezüglich adhärnter Zellen keine differenzielle Expression auf. Jedoch ist auffällig, dass eine Vielzahl von Genen des Arc Regulons in Oberflächen-assoziierten Zellen im statischen System vermehrt transkribiert wird. Dies bedeutet, dass entweder das Arc-System auch ohne eigene gesteigerte Genexpression Einfluss auf die Expression des Regulons nimmt, oder dass andere, bisher nicht identifizierte Regulatoren – unter sehr spezifischen Bedingungen – die Regulation des anaeroben Stoffwechsels in *S. oneidensis* MR-1 koordinieren. Ein möglicher Kandidat ist SO\_1415, ein Transkriptionsfaktor, dessen Expression unter den getesteten statischen Bedingungen stark induziert wird. Diesem TetR-ähnlichen Regulator wird eine wichtige Rolle im anaeroben Energie-Metabolismus zugeschrieben, jedoch ist bisher weder der Stimulus noch dessen spezifisches Regulon bekannt [283]. Genetische und biochemische Studien könnten Aufschluss über Effekt und Wirkungsweise dieses Transkriptionsfaktors in der Oberflächen-Adhäsion von *S. oneidensis* MR-1 geben.

Als zweiter Kandidat könnte der Sigmafaktor RpoS die Expression von Komponenten der anaeroben Respiration regulieren. Die Expression von *rpoS* wird unter statischen Bedingungen in

Oberflächen-assoziierten Zellen induziert. Als Untereinheit der RNA-Polymerase beeinflusst RpoS die Transkription einer Vielzahl von Genen als Antwort auf diverse Umweltbedingungen, wie oxidativem Stress, Hitzeschock und Nährstoffmangel [95]. Auch in Biofilmen spielt die RpoS-induzierte Stressantwort als Reaktion auf Nährstoff-Limitierung – besonders Phosphat – und auf die Akkumulation von Stoffwechselprodukten eine entscheidende Rolle [95, 137, 232]. So wird in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ein Biofilm nur unter Nährstoffmangel-Bedingungen ausgebildet [70, 71], während in *P. aeruginosa* dieser Sigmafaktor, als Antwort auf Nährstoffmangel, die Reifung des Biofilms reprimiert [275]. Somit ist RpoS ein Master-Regulator, der nicht nur eine spezifische physiologische Reaktion einzelner Zellen auf einen spezifischen Stress auslöst, sondern auch die Physiologie der mikrobiellen Gemeinschaft reguliert. Zukünftige Studien könnten das RpoS Regulon in *S. oneidensis* MR-1 identifizieren und die Rolle dieses Regulators in der initialen Anheftung und Biofilmbildung dieses Organismus analysieren.

#### 4.2.3 Universelle zelluläre Prozesse während der Anheftungsphase in *S. oneidensis* MR-1

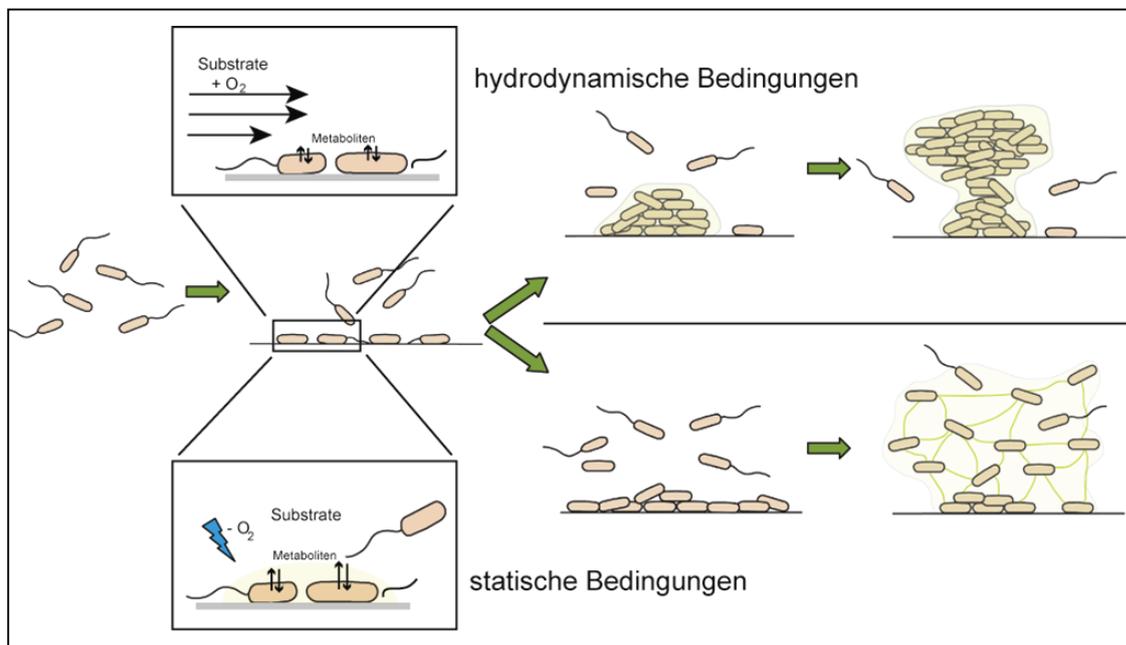
Trotz unterschiedlicher Biofilmausprägungen unter statischen und hydrodynamischen Bedingungen konnte in beiden Inkubationssystemen gleiche genetische Antworten der *S. oneidensis* MR-1 Zellen auf den Oberflächenkontakt identifiziert werden. Das globale Expressionsprofil von Oberflächen-assoziierten Zellen unterscheidet sich von der Genexpression planktonischer Zellen in Abhängigkeit der Inkubationsbedingung um bis zu 17 % des gesamten Genoms. Damit führt der erste Oberflächenkontakt und die initiale Anheftung der *S. oneidensis* MR-1 Zellen – als einleitender Schritt der Biofilmbildung – bereits dazu, dass sich die Physiologie sessiler Zellen gegenüber ihres planktonischen Pendant verändert und damit ein eigenständiges Stadium des Biofilms repräsentiert. Die universellen zellulären Prozesse während der Anheftung der Zellen beinhalten zum einen die differenzielle Expression der Prophagen in *S. oneidensis* MR-1, auf deren Rolle im Kapitel 4.3 näher eingegangen werden soll. Zum anderen wirkt sich der Oberflächenkontakt auf die zelluläre Motorik aus, indem die Interaktion der Zelle mit der Oberfläche zu einer Reduktion der Motilität, und so zu einer Favorisierung eines sessilen Lebensstils führt. Eine solche Modulierung der Expression von Flagellen-assoziierten Genen als direktes Resultat der Oberflächen-Interaktion wurde auch schon in anderen Bakterien, wie *Legionella pneumophila*, beobachtet [99]. Auch ist die Abwesenheit der Flagellen-vermittelten Beweglichkeit von *V. cholerae* Zellen unabdingbar für ein permanentes Anheften an einer Oberfläche [163, 164].

Interessanterweise werden augenscheinlich wichtige Elemente für Anheftung und folgende Biofilmbildung von *S. oneidensis* MR-1, wie z. B. *aggA* und das *mxl*-Operon, während der Oberflächen-Assoziation nicht induziert. Dem TolC-ähnlichen Protein AggA, das eine potenzielle Komponente eines ABC-Transporters darstellt, wird eine Funktion in der Zell-Zell- und Zell-Oberflächen-Interaktion zugeschrieben [48, 49, 247]. Die Produkte des *mxl*-Lokus dagegen übernehmen – u. a. durch die indirekte Modulierung der intrazellulären Konzentration des sekundären Botenstoffs zyklisches di-Guanosinmonophosphat (c-di-GMP) durch MxdA [202] – essenzielle Aufgaben in der Aufrechterhaltung des sessilen Lebensstils und in der Stabilisierung der Biofilm-Matrix in *S. oneidensis* MR-1 [249, 250].

Des Weiteren wird auch die Synthese des Mannose sensitive Hämagglutinin (MSHA) Typ IV Pilus bei einer Anheftung der Zellen – zumindest an eine metabolisch inerte Oberfläche wie Glas – nicht induziert. Dies ist konträr zu genetischen Studien, die zeigten, dass dieser Pilus eine essenzielle Aufgabe in der Oberflächen-Interaktion der *S. oneidensis* MR-1 Zellen übernimmt, indem

er als Verankerung der Zellen an eine abiotische Oberfläche zu fungieren scheint [250]. Im Bezug auf die beobachtete Expression relevanter Gene wäre es jedoch möglich, dass diese konstitutiv exprimiert werden und auch eine posttranslationale Regulation kann an dieser Stelle ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Nichtsdestotrotz scheint die Genexpression solcher Biofilm-assoziiierter Elemente erst in späteren Phasen der Biofilmbildung induziert zu werden, was darauf hindeutet, dass Zellen während der Etablierung von Biofilmen mehrere, differenziell regulierte Entwicklungsprozesse durchlaufen.

Durch die Identifizierung differenziell exprimierter Gene hypothetischer, teils hochkonservierter Proteine, wie SO\_2500 und SO\_4715, tragen die Transkriptom-Analysen dieser Arbeit dazu bei, diesen Proteinen eine Funktion in der Anheftung und Biofilmbildung in *Shewanella* spp. und anderen Organismen zuzuschreiben. Auch bilden sie den Grundstein für weiterführende Studien, die das komplexe Modulierungssystem in Biofilm-bildenden Bakterien komplettieren können und damit einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung spezifischer Interaktions- und Regulations-Netzwerke im bakteriellen Gemeinschaften leisten.



**Abb. 31: Modell der einzelnen Stadien der Biofilmentwicklung von *S. oneidensis* MR-1 unter hydrodynamischen (oben) und statischen Bedingungen (unten).** Die Kästen geben Einblicke in die physikalischen Faktoren während der Anheftungsprozesse in *S. oneidensis* MR-1. **(Oben)** In hydrodynamischen Systemen werden Oberflächen-assoziierten Zellen durch die Strömung (Pfeile) mit ausreichend Nährstoffen und molekularem Sauerstoff versorgt. Stoffwechselprodukte der Zellen werden abtransportiert. Nach der Anheftung bilden sich Mikrokolonien aus, die Komponenten der Biofilm-Matrix, wie eDNA, produzieren. Während der Reifungsphase entstehen Biofilm drei-dimensionale Strukturen aus dichtgepackten Zellaggregaten. **(Unten)** In einem statischen System ist die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung der adhären Zellen auf Diffusion beschränkt. Die Limitierung von Sauerstoff in Nähe der Oberfläche wird augenblicklich von anheftenden Zellen über einen bisher unbekanntem Mechanismus erkannt, so dass sich die Zellen auf eine anaerobe Respiration umstellen. Die potentielle Akkumulation von Metaboliten (gelb) führt zu einer Induktion der Transportmaschinerie in *S. oneidensis* MR-1. Als Reaktion auf verschlechterte Umweltbedingungen, die z. B. durch das Chemotaxis-System erkannt werden könnten, verlassen die Zellen die Oberfläche und suchen günstigere Habitate auf. Nach erfolgreicher Kolonisierung der Oberfläche werden Komponenten der Biofilm-Matrix synthetisiert. Der Biofilm ist charakterisiert durch eine netzartige Struktur, in der sich auch planktonische Zellen bewegen können.

Zusammenfassend lässt sich ein Modell für die zellulären Prozesse während der Anheftung in *S. oneidensis* MR-1 aufstellen. In freier Natur muss sich *S. oneidensis* MR-1 als Bewohner eines limnischen Systems, dem Strömungen und statische Bereiche zu eigen sind, schnell und effizient an verändernde Umweltbedingungen anpassen, was eine Adaption der strukturellen Eigenschaften der multizellulären Gemeinschaft beinhaltet (Abb. 31). Universelle zelluläre Prozesse bilden die Basis für eine energetisch günstige und effektive Kolonisierung der Grenzschicht durch dieses Bakterium. Der schnelle Wechsel der Respiration und die metabolische Reorganisation ermöglichen das Überleben in einem solchen divergenten Habitat. Die morphologischen Konfigurationen der Biofilmstrukturen sind dagegen sehr an die vorherrschende Bedingung angepasst. Unter Einfluss von Scherkräften in fließenden Ökosystemen ist der Organismus gezwungen, sehr stabile Zell-Oberflächen- und Zell-Zell-Verbindungen aufzubauen, während in stehenden Gewässern und in Sedimenten lockere Verbindungen von Vorteil sein können. Das Fehlen von dichten Strukturen und Zell-Zell-Interaktionen erleichtert die Diffusion von Nährstoffen. Trotzdem können durch das Fehlen einer Strömung eine Limitierung von Sauerstoff und die Akkumulation von Stoffwechselprodukten auftreten, die einen Einfluss auf die Entwicklung der bakteriellen Gemeinschaft nehmen können.

#### **4.3 Extrazelluläre DNA als essenzieller Faktor für Oberflächen-Anheftung und Biofilmbildung in *Shewanella oneidensis* MR-1**

Seit der ersten Entdeckung von extrazellulärer DNA (eDNA) in einer Schleimschicht auf Bakterien 1956 [35], wurde zum einen ihre Rolle im Nährstoffkreislauf, zum anderen ihre Funktion in Gemeinschaften von Bakterienpopulation intensiv untersucht [53, 59, 166, 167]. So dient eDNA in terrestrischen und aquatischen Systemen den Bakterien als ein Depot für Nährstoffe, wie Phosphor und Stickstoff [59, 167]. Whitchurch und Kollegen erbrachten den ersten Beweis für eDNA als wichtigen stabilisierenden Faktor in Biofilmen von *P. aeruginosa* [274]. Seitdem wurde aus zahlreichen Studien diverser Bakterien deutlich, dass eDNA ein verbreiteter strukturgebender Faktor in Biofilmen darstellt [4, 53, 89, 131, 166, 199, 235, 274]. Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist eDNA auch in der Matrix von *S. oneidensis* MR-1 Biofilmen – unter statischen und hydrodynamischen Bedingungen – eine wichtige strukturelle und stabilisierende Komponente.

In statischen Systemen ist die eDNA dabei sehr diffus im Biofilm verteilt. Eine ähnliche Organisation wurde bereits in Biofilmen des Bakterienstammes F8 identifiziert, der ebenfalls limnische Ökosysteme besiedelt [18]. In einem hydrodynamischen Umfeld lokalisiert die eDNA vorrangig innerhalb von drei-dimensionalen Strukturen der *S. oneidensis* MR-1 Biofilme und begünstigt so deren Aufrechterhaltung. Allerdings deuten die Analysen der DNase I-behandelten reifen Biofilme darauf hin, dass die Biofilm-Matrix noch aus weiteren Elementen, wie Proteinen und Polysacchariden, besteht. Auch konnte allein eine externe Zugabe von DNA die Biofilmbildung nicht stimulieren, was vermuten lässt, dass ein zusätzlicher Faktor in der Anheftung und Etablierung von *S. oneidensis* MR-1 Biofilmen involviert ist. Erste Analysen in Richtung der Identifizierung einzelner Matrix-Komponenten wurden bereits unternommen. Zwar war das Anfärben von Proteinen und Polysacchariden durch entsprechende Detektionsmethoden noch nicht erfolgreich, so konnte aber dennoch eine Degradation der Biofilm-Matrix und damit ein Ablösen des Biofilms nach Proteinase-Behandlung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Somit

stellen extrazelluläre Proteine eine weitere strukturelle Komponente in der Biofilm-Matrix von *S. oneidensis* MR-1 dar.

Doch nicht nur in der Etablierung und Stabilisierung von Biofilmen spielt die eDNA eine entscheidene Rolle. Sie ist auch bereits in der Anheftung der *S. oneidensis* MR-1 Zellen an eine Oberfläche involviert. Eine solche Rolle der eDNA in der Adhäsion und der frühen Biofilmenwicklung wurde auch in anderen Bakterien beschrieben [89, 113, 131, 258, 274]. Dabei stellten die Autoren die Hypothese auf, dass die bakterielle Zelloberfläche mit DNA dekoriert sein könnte, was durch resultierende Säure-Base-Wechselwirkung die Zell-Zell- und Zell-Oberflächen-Interaktion begünstigen würde [89, 258].

Obwohl sich viele Studien mit den Funktionen von eDNA in Biofilmen beschäftigten, bleibt doch meist die Frage unbeantwortet, auf welchem Weg die DNA freigesetzt wird. Neben aktiven Sekretionsmechanismen, wie in *Neisseria gonorrhoeae* [52], kann die eDNA durch passiven Transport über Membran-Vesikel freigesetzt werden [205, 222]. Obwohl *S. oneidensis* MR-1 Zellen nach Adhäsion unter statischen Bedingungen ebenfalls Vesikel ausbilden, bleibt doch fraglich, ob eine solche Vesikulation auch in Zellen in hydrodynamischen Systemen eintritt und damit für die Abgabe der für die Anheftung benötigten eDNA verantwortlich ist. Ein weiteres Indiz dafür, dass die eDNA nicht (allein) über Vesikel in das umliegende Milieu transportiert wird, ist die Tatsache, dass sie aus vollständiger genomischer DNA zu bestehen scheint. In *Helicobacter pylori* dagegen zeigten DNA-Fingerprinting-Analysen klare Sequenzunterschiede zwischen der eDNA und der intrazellulären DNA auf. Dieses Ergebnis ließ die Autoren schlussfolgern, dass eDNA nicht durch Lyse, sondern möglicherweise durch aktive Vesikel-vermittelte Exkretion freigesetzt wird [82].

Neben diesen beiden Transportmechanismen scheinen in den meisten bakteriellen Biofilmen vorrangig zellytische Prozesse für die Freisetzung der eDNA verantwortlich zu sein [4, 199, 248]. Dabei können beispielsweise Toxin/Antitoxin- bzw. Holin/Antiholin-Systeme eine wichtige Rolle spielen, die in Anhängigkeit spezifischer Stimuli die Zellyse direkt oder über die Aktivität von Murein-Hydrolasen induzieren [199, 208, 248]. Ein potenzielles Holin/Antiholin-System mit Homologie zu dem Cid-Regulationssystem aus *Staphylococcus* spp. [208] konnte im Rahmen dieser Arbeit in *S. oneidensis* MR-1 identifiziert werden, jedoch zeigten die phänotypischen Charakterisierungen und Mutagenese-Studien, dass dieses System keine signifikante Rolle in zellytischen Prozessen oder der Biofilmbildung in diesem Organismus spielt. Dagegen konnte hier erstmalig eine Prophagen-induzierte Zellyse in *S. oneidensis* MR-1 Zellen während der Anheftung und der Biofilmbildung identifiziert werden, die für die Freisetzung der eDNA verantwortlich ist. Nichtsdestotrotz ist es möglich, dass die Aktivität der Phagen den Einfluss des Cid-Systems auf *S. oneidensis* MR- Population maskiert. Genetische und phänotypische Analysen dieses potenziellen Holin/Antiholin-System in einer Prophagen-freien Mutante könnten Aufschluss über die Rolle des Cid-Systems in der Populationsdynamik in *S. oneidensis* MR-1 geben.

#### **4.4 Phagen-induzierte Zellyse in der Oberflächen-Anheftung und Biofilmbildung in *Shewanella oneidensis* MR-1**

Bakteriophagen sind in allen Ökosystemen weit verbreitet und spielen eine entscheidende Rolle in der Biosphäre, indem sie u. a. als potenzieller Hauptfaktor des induzierten Zelltods und der Zellyse von Bakterien einen wesentlichen Anteil zum Nährstoffkreislauf im Ökosystem beitragen [210]. Der lysogene Lebenszyklus erlaubt den Phagen auch unter suboptimalen Bedingungen als

Prophagen im Chromosom der Wirtszelle zu verbleiben und erst durch ein Signal in den lytischen Zyklus zu wechseln, um Zellyse einzuleiten. Neben verschiedenen Agenzien kann besonders die RecA-vermittelte SOS-Antwort der Wirtszelle auf physiologische Stressbedingungen, wie Hitzeschock oder UV-Bestrahlung, die Konversion der Phagen in einen lytischen Zyklus induzieren [73, 136]. Eine solche Induktion der lytischen Aktivität als Antwort auf UV-Stress wurde auch für die drei identifizierten Prophagen in *S. oneidensis* MR-1 beschrieben [92, 201].

Mit Hilfe von Mutagenese-Studien konnte nun erstmalig gezeigt werden, dass alle drei Prophagen ohne extern induzierte Stresssituation Zellyse in *S. oneidensis* MR-1 induzieren können. So ist in der Population einer Prophagen-freien Mutante die zellytische Aktivität drastisch reduziert. Dies zeigt, dass Prophagen einen großen Anteil an lytischen Prozessen in *S. oneidensis* MR-1 haben, jedoch scheinen zudem weitere, bis dato noch unbekannte Faktoren einen Beitrag zur Zellyse zu leisten. Die gestörte Oberflächen-Anheftung und Biofilmbildung der Prophagen-freien Mutante scheint aus der drastisch reduzierten Freisetzung von eDNA und anderen wichtigen Elementen in der Zell-Zell- und Zell-Oberflächen-Interaktion zu resultieren. Somit nehmen die Prophagen in *S. oneidensis* MR-1 direkten Einfluss auf die Physiologie von Oberflächen-assoziierten Zellen im Biofilm, ebenso wie auf die Populationsdynamik in planktonischen Kulturen. Eine Induktion von Prophagen, sowie ihre lytische Aktivität während der Biofilmentwicklung wurden bereits in anderen Bakterien beschrieben [73, 207, 233, 270]. Dabei vermuteten Whiteley und Kollegen, dass die Produktion von Phagen eine Rolle in der Generierung einer genetischen Diversität in Biofilmen spielt [275].

Nach der Induktion durch ein noch unbekanntes Signal assemblieren die Prophagen LambdaSo und MuSo2 infektiöse Viruspartikel, die eine Prophagen-freie Mutante reinfizieren können. Der *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp hingegen ist durch die Anwesenheit der Prophagen in seinem Genom vor einer Infektion mit dem korrespondierenden Phagen geschützt. In anderen Bakterien wurde bereits gezeigt, dass der synthetisierte Phagen-Repressor, dessen Gen im Prophagen-genom liegt, eine erneute Infektion der Wirtszelle mit extrazellulären lytischen Phagen verhindert [1, 94]. Im Gegensatz zu *P. aeruginosa*, in dem die Infektion der Zellen mit der superinfektiösen Variante des Phagen Pf4 zur Zellyse in Biofilmen führt [271], scheint in *S. oneidensis* MR-1 vorrangig die Induktion des lytischen Zyklus der Phagen und nicht die Phageninfektion für die Zellyse einer Subpopulation verantwortlich zu sein.

Die biochemischen und phänotypischen Analysen beschreiben eine zeitliche Regulation der Prophagen. Während besonders MuSo2 bereits nach direktem Oberflächenkontakt der Zellen in den lytischen Zustand konvertiert und Phagenpartikel assembliert, wird LambdaSo erst nach längerer Adhäsion der Wirtszellen aktiv. Dies ist auch im Biofilmphänotyp der einzelnen Prophagen-Mutanten deutlich zu erkennen. Die lytische Aktivität von MuSo2 scheint somit in der Zell-Oberflächen-Interaktion beteiligt zu sein, während LambdaSo eine essenzielle Rolle in der Zell-Zell-Interaktion und der Entwicklung von drei-dimensionalen Strukturen im Biofilm übernimmt. Auch in planktonischer Kultur scheinen zunächst MuSo2 und MuSo1, dann der Prophage LambdaSo eine Zellyse auszulösen.

Im Gegensatz zu LambdaSo und MuSo2 kann der Prophage MuSo1 durch das Fehlen von Genen struktureller Proteine keine Phagenpartikel ausbilden. Trotzdem nimmt der Prophage Einfluss auf die Physiologie und Populationsdynamik der Wirtszelle. Des Weiteren führt eine Deletion des MuSo1-Genoms zu einer verzögerten Biofilmentwicklung in *S. oneidensis* MR-1. Der Einfluss von solchen kryptischen Prophagen auf den Biofilm der Wirtszelle wurde bereits schon in früheren Studien gezeigt [68, 266]. So wird in *E. coli* die Genexpression des kryptischen Prophagen CP4-57 in ausgereiften Biofilmen stark induziert [54]. Dieser Prophage hat im Laufe der Zeit durch den Verlust von Genen aus seinem Genom wichtige Funktionen für die Assemblierung von Phagenpartikeln und damit für den lytischen Lebenszyklus verloren, andere Phagen-spezifische

Gene, z. B. kodierend für Integrasen, aber weiterhin bewahrt [16]. Während der Biofilmentwicklung schneidet CP4-57 seine DNA aus dem Wirtschromosom aus. Dies führt zu einer Induktion der Genexpression von Flagellen-assoziierten Genen und zelllytischer Prozesse und nimmt somit negativen Einfluss auf die sessile Lebensweise und die Biofilmentwicklung in *E. coli* [267]. MuSo1 dagegen schneidet sein Genom nicht aus dem Wirtschromosom aus. Daher scheint sein Einfluss auf die (Biofilm-) Population von *S. oneidensis* MR-1 hauptsächlich auf seinem zelllytisches Potenzial durch die (gesteigerte) Aktivität einzelner Proteine, wie das MuSo1-Lysozym, zu beruhen.

Kontrovers zu den vorliegenden Ergebnissen der biochemischen und phänotypischen Analysen, die eine Aktivität der Prophagen LambdaSo und MuSo2 bereits in der Anheftungsphase Oberflächen-assoziierten *S. oneidensis* MR-1 Zellen beschreiben, zeigten die Transkriptom-Daten dieser Zellen eine vorrangig negative Regulation der Genexpression dieser Prophagen. Diese Diskrepanz zu den Transkriptom-Studien liegt höchstwahrscheinlich in der Handhabung der Mikroarray-Technologie begründet. Mikroarray-Daten spiegeln die Transkriptmengen von Genen in der gesamten Bakterienpopulation wieder. Dies bedeutet, dass in einem Großteil der Oberflächen-assoziierten *S. oneidensis* MR-1 Population die Expression der Prophagen-spezifischen Gene in der Tat reprimiert wird, schließt jedoch nicht aus, dass eine Subpopulation dieser Zellen diese Gene verstärkt exprimiert, was zu der Produktion von viralen Partikeln und zur Lyse dieser Untergruppe führt. Eine abrupte Dezimierung der entsprechenden Zellen und der damit einhergehende Verlust des korrespondierenden Transkriptoms könnte die beobachtete Reduktion der Expression Prophagen-spezifischer Gene erklären. Hinweise auf eine induzierte Transkription der Prophagen-Gene zeigen lediglich die Transkriptom-Daten des Prophagen LambdaSo in Oberflächen-assoziierten Zellen im statischen System. Hier ist die Expression von einigen, vorrangig für späte strukturelle und hypothetische Proteine kodierende Gene induziert.

Zusammenfassend erbringt diese Studie den ersten Beweis, dass die Wirkungsweise von Phagen, bzw. Prophagen, einen essenziellen Beitrag zur Oberflächen-Anheftung und der Einleitung des Biofilm-spezifischen Entwicklungsprogramms leistet, da sie die Regulation programmierter Zellyse und damit auch die Freisetzung von eDNA übernehmen. So komplettieren die Erkenntnisse dieser Analyse frühere Studien, die den Prophagen und der von ihnen induzierten Zellyse eine wichtige Rolle in der Biofilmbildung und -stabilisierung zuschreiben [73, 106, 207, 209, 241, 267, 270, 271]. Aufgrund der fehlenden positiven Regulierung von Proteinen in der bakteriellen SOS-Antwort (wie RecA) während der zellulären Anheftung, sind die Signale und regulatorische Elemente, die zur Aktivierung des lytischen Zustands der Prophagen führen, weiterhin unbekannt. Jedoch scheint vor dem Hintergrund der allgemeinen Induktion der Phagen unter den verschiedenen getesteten Bedingungen eine zentrale zelluläre Stressantwort Auslöser der Phageninduktion zu sein.

#### **4.5 Funktionen zweier extrazellulären Endonukleasen in der Biofilmbildung von *Shewanella oneidensis* MR-1**

Extrazelluläre DNA (eDNA) spielt nicht nur als strukturgebendes Element in der Biofilmbildung, sondern auch als Nährstoffquelle diverser Bakterien verschiedenster Ökosysteme eine entscheidende Rolle [53, 59]. Aufgrund ihrer Abundanz in der Natur kann die Wichtigkeit von

eDNA nicht überschätzt werden. Eine Studie zeigte, dass auch *S. oneidensis* MR-1 DNA als Phosphor-, Stickstoff- und Kohlenstoff-Quelle verwerten kann [191]. Dabei wurden zwei extrazelluläre Endonukleasen identifiziert, die in allen bisher sequenzierten Vertretern der *Shewanellaceae* konserviert sind. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die extrazelluläre nukleolytische Aktivität dieser Nukleasen ExeM und ExeS bestätigt. Dabei zeigte ExeS eine geringere nukleolytische Aktivität. Dieses Protein wurde zuvor nur in Überständen von *S. oneidensis* MR-1 detektiert, was voraussetzt, dass das Protein über die Zytoplasmamembran in das umliegende Milieu transportiert wird [191].

Im Gegensatz zu ExeS zeigte ExeM eine hohe DNA-degradierende Aktivität. In früheren Studien wurde dieses Protein in Assoziation mit der Zellwand von *S. oneidensis* MR-1 detektiert, allerdings ist nach kontroversen Ergebnissen unklar, ob dieses Protein in der äußeren [244] oder in der Zytoplasma-Membran verankert ist [27]. Eine Lokalisation von ExeM in der zytoplasmatischen Membran erscheint anhand seiner postulierten nukleolytischen Aktivität von extrazellulärer DNA eher unwahrscheinlich, allerdings kann ein aktiver Transport von ExeM aus der Zelle nicht ausgeschlossen werden. Der Nachweis der DNA-degradierenden Aktivität des Enzyms im zellfreien Überstand einer *S. oneidensis* MR-1 Kultur lässt vermuten, dass ExeM entweder nicht fest mit der Zellwand assoziiert ist, oder dass aufgrund von zelllytischen Prozessen dieses Protein in das umgebende Milieu freigesetzt wird. Besonders letztere Möglichkeit scheint sehr wahrscheinlich, da eine Phagen-induzierte Zellyse in *S. oneidensis* MR-1 Kulturen bereits identifiziert wurde.

In Abwesenheit dieser zwei Nukleasen ist die DNA-Degradation in Überständen oder Zellen von *S. oneidensis* MR-1 stark reduziert, aber nicht vollständig aufgehoben, sodass die Anwesenheit weiterer Nukleasen im Überstand der Zellen wahrscheinlich ist. Nichtsdestotrotz wiesen die Wachstumsanalysen darauf hin, dass vorrangig ExeM eine Rolle in der Verwertung von DNA als Phosphorquelle in *S. oneidensis* MR-1 einnimmt. Ob und welche Aufgaben ExeS in planktonisch lebenden Populationen übernimmt, bleibt noch zu untersuchen.

Abgesehen von der Rolle, die Zugänglichkeit von eDNA als Nahrungsquelle zu gewährleisten, können extrazelluläre Nukleasen noch weitere Aufgaben erfüllen. So übernehmen sie auch Funktionen in DNA-Aufnahmesystemen während natürlicher Transformationsprozesse [30, 36]. Beispielsweise prozessiert die Oberflächen-exponierte Nuklease EndA aus *Streptococcus pneumoniae* doppelsträngige DNA in einzelsträngige Fragmente, die von den Zellen aufgenommen werden können [198]. In *Vibrio cholerae* dagegen inhibiert die über Quorum Sensing regulierte Nuklease Dns die Transformation durch die Degradierung der DNA bei geringer Zelldichte der Population [17]. Es bleibt zu zeigen, ob auch *S. oneidensis* MR-1 natürlich kompetent ist und wenn ja, welche Rolle die identifizierten Nukleasen ExeM und ExeS darin spielen. Sequenz-Analysen deuten auf die Akquirierung von Genen und Genklustern – wie die Gene eines zweiten Flagellenstators [190]– in diesem Organismus hin und auch ein Integrase-System lässt eine Aufnahme von DNA der *S. oneidensis* MR-1 Zellen vermuten.

Neben der Verwertung der DNA als Nährstoffquelle für planktonische *S. oneidensis* MR-1 Populationen, sind die extrazellulären Endonukleasen ExeM und ExeS von wichtiger Bedeutung für die Biofilmbildung in diesem Organismus. Wie auch in vielen anderen Prokaryoten ist eDNA eine entscheidende Komponente für Anheftung, Aufbau und Stabilisierung des Biofilms in diesem Organismus [4, 53, 89, 131, 166, 199, 235, 274]. Die Induktion der Expression von *exeM* und *exeS* in Zellen während der Anheftungsphase lässt vermuten, dass die Nukleasen schon in diesem Stadium für die Degradierung der eDNA (aus den lysierten Zellen) benötigt werden.

Nukleolytische Aktivität wurde auch in Biofilmen anderer Bakterien detektiert. Aus diversen Studien geht hervor, dass der Abbau der eDNA in bakteriellen Gemeinschaften zwei positive Effekte auf die Population haben kann. So kann er zum einen die Biofilm-assoziierten

Zellen vor der antimikrobiellen Eigenschaft der DNA schützen. Studien in *P. aeruginosa* zeigten, dass hohe Konzentrationen an DNA (~0,5 %) einen letalen Effekt auf Zellen im Biofilm haben können [166]. Die Eigenschaft der DNA, Kationen, wie Magnesium- und Kalzium-Ionen zu chelatieren, führt zu einem Mangel an Kationen im Medium. Dies wiederum kann durch Destabilisierung der Lipopolysaccharide der bakteriellen Membran eine Lyse der Zellen induzieren. Eine solche antimikrobielle Eigenschaft der DNA wurde auch in anderen Gram-positiven und -negativen Bakterien beschrieben [166].

Auch *S. oneidensis* MR-1 Zellen sind empfindlich gegenüber hohen Konzentrationen an eDNA ( $\geq 1\%$ ) und lysieren nach einer längeren Exposition (siehe [97]). Dabei scheinen jedoch weder ExeM, noch ExeS eine schützende Wirkung vor der toxischen Eigenschaft der eDNA zu haben (Daten nicht gezeigt). Dies ist nicht überraschend, da auch degradierte, kleine DNA-Fragmente Kationen chelatieren und so eine Zellyse auslösen können. Nichtsdestotrotz könnte die Degradierung der eDNA in Biofilmen vor einer zu großen Akkumulation der DNA schützen und so einen indirekten Einfluss auf die Vitalität der Biofilmpopulation nehmen.

Ein weiterer wichtiger Effekt offenbart sich in der Nuklease-vermittelte Degradation von eDNA beim Ablösen von Zellen in Biofilmen. Durch den gezielten Abbau der eDNA und anderen Komponenten der Biofilm-Matrix können sich die Zellen aktiv aus dem Biofilm „herausschneiden“, um so neue Oberflächen zu besiedeln [75, 119]. In *S. aureus* beeinflusst die Theronuklease Nuc die Biofilmbildung, indem sie das Ablösen der Zellen aus den Biofilmstrukturen zu begünstigen scheint [149]. Der Degradationsprozess ist somit ein entscheidendes Element für die Verbreitung der Bakterienpopulation und die erfolgreiche Besiedlung des Habitats. Frühere Studien in *S. oneidensis* MR-1 erbrachten den Beweis, dass Zellen während der Biofilmbildung in einem dynamischen Prozess dissoziieren [249, 251]. Des Weiteren führt ein plötzlicher Abfall von molekularem Sauerstoff zu einem massiven Ablösen der Zellen [251], was durch einen potenziellen rigorosen Abbau der stabilisierenden Biofilm-Matrix induziert werden könnte. In diesen Degradationsprozess der Matrix könnten die extrazelluläre Endonukleasen ExeM und ExeS eingreifen und so die Hauptkomponente – die eDNA – abbauen.

Die Mutagenese-Studien zeigten, dass die Biofilmentwicklung durch die zwei Nukleasen unter verschiedenen Bedingungen unterschiedlich beeinflusst wird. So nimmt ExeS keinen Einfluss auf die Biofilmentwicklung in einem hydrodynamischen System, da durch den ständigen Mediumfluss in diesem Umfeld diese potenziell sekretierte Nuklease aus dem Biofilm entfernt wird und folglich kein nukleolytischer Effekt beobachtet werden kann. Unter statischen Bedingungen hingegen führt eine Deletion von *exeS* zu einer vermehrten Akkumulation der Biofilm-Biomasse. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass ExeS in diesem Umfeld – durch die Degradierung der eDNA in der Matrix – das Ablösen von Zellen aus dem Biofilm begünstigt.

Im Gegensatz zu ExeS spielt die potenziell Membran-verankerte Nuklease ExeM auch unter hydrodynamischen Bedingungen eine wichtige Rolle in der Biofilmbildung von *S. oneidensis* MR-1. Die massive Akkumulierung von eDNA und enge Zell-Zell-Verbindungen im Biofilm einer Deletionsmutante lassen darauf schließen, dass ExeM für den Abbau der eDNA in enger räumlicher Nähe der Zellen und ihrer dynamische Umsetzung im Biofilm verantwortlich ist.

Resümierend konnte in dieser Studie erstmalig gezeigt werden, dass die extrazelluläre Endonuklease ExeM durch Verwertung von DNA als Phosphorquelle das Überleben der *S. oneidensis* MR-1 Population unter Phosphat-limitierenden Bedingungen ermöglicht. Des Weiteren haben sowohl ExeM, als auch ExeS, eine wichtige Funktion in der Biofilmbildung dieses Organismus. Zwar konnte noch kein eindeutiger Beweis für die Funktion der Nukleasen für das Ablösen der Zellen aus dem Biofilm erbracht werden, jedoch liegt eine solche Rolle aufgrund von vorherigen Studien und der Lokalisation dieser beiden Enzyme auf der Hand. Da eDNA die

---

universelle Komponente in der Biofilm-Matrix darstellt, ist die Fähigkeit, diese zu degradieren, für ein Ablösen der Zellen und eine erfolgreiche Besiedlung neuer Oberflächen unumgänglich. So gibt diese Studie Hinweise darauf, dass die Fähigkeit zur DNA-Degradation ein universeller Weg von – in der Natur auch oft gemischten – Biofilmpopulationen darstellt, um als bakterielle Gemeinschaft dynamisch zu bleiben. Des Weiteren kann die Verwertung der eDNA als Nahrungsquelle durch die Aktivität von extrazellulären Nukleasen den Biofilm-assoziierten Zellen sehr dienlich sein.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Chemikalien und Material

#### 5.1.1 Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 6, die verwendeten Plasmide in Tabelle 7 aufgeführt. Alle Stämme wurden als Gefrierkulturen mit 10 % (v/v) DMSO bei -80°C konserviert.

**Tab. 6: Stammliste**

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 $\alpha$ pir	<i>recA1 gyrA (lacZYA-argF) (80d lac [lacZ] M15) pir</i> RK6	[158]
WM3064	<i>thrB1004 pro thi rpsL hsdS lacZ</i> $\Delta$ M15 RP4-1360 $\Delta$ ( <i>araBAD</i> ) 567 $\Delta$ <i>dapA</i> 1341::[ <i>erm pir</i> (wt)]	W. Metcalf, University of Illinois, Urbana- Champaign
<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1		
S79	Wildtyp	[257]
MR-1 <i>egfp</i>	Wildtyp, markiert mit eGFP in der Tn7-Region	[76]
MR-1 <i>ecfp</i>	Wildtyp, markiert mit eCFP in der Tn7-Region	Diese Arbeit
MR-1 <i>eyfp</i>	Wildtyp, markiert mit eYFP in der Tn7-Region	Diese Arbeit
$\Delta$ MuSo1	Deletion des Genklusters SO_0641-SO_0685	Diese Arbeit
$\Delta$ MuSo1 <i>egfp</i>	$\Delta$ SO_0641-SO_0685, markiert mit eGFP in der Tn7-Region	Diese Arbeit
$\Delta$ MuSo2	Deletion des Genklusters SO_2651-SO_2704	Diese Arbeit
$\Delta$ MuSo2 <i>egfp</i>	$\Delta$ SO_2651-SO_2704, markiert mit eGFP in der Tn7-Region	Diese Arbeit
$\Delta$ LambdaSo	Deletion des Genklusters SO_2939-SO_3013	Diese Arbeit
$\Delta$ LambdaSo <i>egfp</i>	$\Delta$ SO_2939-SO_3013, markiert mit eGFP in der Tn7-Region	Diese Arbeit
$\Delta$ LambdaSo $\Delta$ MuSo1	$\Delta$ SO_2939-SO_3013 / $\Delta$ SO_0641-SO_0685	Diese Arbeit
$\Delta$ LambdaSo $\Delta$ MuSo2	$\Delta$ SO2939-SO_3013 / $\Delta$ SO2651-SO_2704	Diese Arbeit
$\Delta$ MuSo2 $\Delta$ MuSo1	$\Delta$ SO2651-SO_2704 / $\Delta$ SO_0641-SO_0685	Diese Arbeit
$\Delta$ LambdaSo $\Delta$ MuSo2 $\Delta$ MuSo1	$\Delta$ SO_2939-SO_3013 / $\Delta$ SO2651-SO_2704 / $\Delta$ SO_0641-SO_0685	Diese Arbeit
$\Delta$ LambdaSo $\Delta$ MuSo2 $\Delta$ MuSo1 <i>egfp</i>	$\Delta$ LambdaSo/ $\Delta$ MuSo2/ $\Delta$ MuSo1, markiert mit eGFP in der Tn7-Region	Diese Arbeit
$\Delta$ exeM	Deletion des Gens SO_1066	K. Paul (unveröffentlicht)
$\Delta$ exeM <i>egfp</i>	$\Delta$ exeM, markiert mit eGFP in der Tn7-Region	K. Paul (unveröffentlicht)
KI <i>exeM</i>	Wildtyp („knock-in“ von SO_1066)	K. Paul (unveröffentlicht)
$\Delta$ exeS	Deletion des Gens SO_1844	K. Paul (unveröffentlicht)

Stamm	Genotyp	Quelle
$\Delta exeS$ <i>egfp</i>	$\Delta exeS$ , markiert mit eGFP in der Tn7-Region	K. Paul (unveröffentlicht)
KI <i>exeS</i>	Wildtyp („knock-in“ von SO_1844)	K. Paul (unveröffentlicht)
$\Delta exeM\Delta exeS$	Deletion der Gene SO_1066 und SO_1844	Diese Arbeit
$\Delta exeM\Delta exeS$ <i>egfp</i>	$\Delta exeM\Delta exeS$ , markiert mit eGFP in der Tn7-Region	Diese Arbeit
$\Delta SO_{2500}$	Deletion des Gens SO_2500	L. Binnenkade (unveröffentlicht)
$\Delta SO_{2500}$ <i>egfp</i>	$\Delta SO_{2500}$ , markiert mit eGFP in der Tn7-Region	Diese Arbeit
KI SO_2500	Wildtyp („knock-in“ von SO_2500)	Diese Arbeit
$\Delta SO_{3376}$	Deletion des Gens SO_3376	L. Binnenkade (unveröffentlicht)
$\Delta SO_{3376}$ <i>egfp</i>	$\Delta SO_{3376}$ , markiert mit eGFP in der Tn7-Region	Diese Arbeit
KI SO_3376	Wildtyp („knock-in“ von SO_3376)	Diese Arbeit
$\Delta SO_{4715}$	Deletion des Gens SO_4715	L. Binnenkade (unveröffentlicht)
$\Delta SO_{4715}$ <i>egfp</i>	$\Delta SO_{4715}$ , markiert mit eGFP in der Tn7-Region	Diese Arbeit
KI SO_4715	Wildtyp („knock-in“ von SO_4715)	Diese Arbeit

Tab. 7: In dieser Arbeit verwendeten Plasmide

Plasmid	Genotyp	Quelle
<b>Konstrukte für <i>in-frame</i> Deletionen in <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1</b>		
pNPTS138-R6KT	Austausch des pUC origin von pNPTS138 durch einen $\gamma$ -origin aus pUC18R6KT-mini-Tn7T	[76]
pNPTS138-R6KT- $\Delta$ MuSo1	SO_0641-SO_0685 Deletionsfragment in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- $\Delta$ MuSo2	SO_2651-SO_2704 Deletionsfragment in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- $\Delta$ LambdaSo	SO_2939-SO_3013 Deletionsfragment in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
<b>Überproduktion von <i>S. oneidensis</i> MR-1 Phagen-Proteinen zur Antikörper-Regenerierung</b>		
pASK-IBA3plus	Expressionsvektor, Strep-TagII Epitop	IBA GmbH, Göttingen
pASK-SO_2963	SO_2963 in pASK-IBA3plus	Diese Arbeit
pASK-SO_2685	SO_2685 in pASK-IBA3plus	Diese Arbeit
<b>Lebendfluoreszenzmarkierung von <i>S. oneidensis</i> MR-1</b>		
pUC18-R6KT-miniTn7T-ecfp	<i>ecfp</i> in miniTn7T-Stelle	[132]
pUC18-R6KT-miniTn7T-egfp	<i>egfp</i> in miniTn7T-Stelle	[76]
pUC18-R6KT-miniTn7T-eyfp	<i>eyfp</i> in miniTn7T-Stelle	[132]
pTNS2	ori-R6K; kodiert TnsABC+D-spezifischen Transposition Weg	[38]
<b>Plasmide zur konstitutiven Expression von <i>lacZ</i> in <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1</b>		
pME6031	<i>repAoriV<sub>pVS1ori</sub>V<sub>p15Aori</sub>T</i>	[91]
pME6031-P <sub>mot</sub> - <i>lacZ</i>	<i>mot</i> -ABPromotor fusioniert an <i>lacZ</i>	[76]

### 5.1.2 verwendete Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide („Primer“) wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim) synthetisiert.

**Tab. 8: Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden.** Restriktionsschnittstellen (RS), die mit Hilfe der Oligonukleotide eingeführt wurden, sind durch Unterstrich gekennzeichnet.

Name	Sequenz	RS
<b><i>in-frame</i> Deletionen in <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1</b>		
dMu-1_up_EcoRI_fw	<u>CGAATTC</u> TCGGTGCTAAGGTGATTGC	<i>EcoRI</i>
dMu-1_up_overlap_rev	AGGTTATAGCTTAGTTAGCTCACAATGTTAATACGA	
dMu-1_dwn_overlap_fw	CTAACTAAGCTATAACCTTGCTCCAGCACC	
dMu-1_dwn_PstI_rev	<u>CGACTGCAG</u> CAATGACGGGCTGATATTG	<i>PstI</i>
dMu1-check-fw	GCGAAACCGTTTTGATACAC	
dMu1-check-rev	CGAAGACTCTATCTACAGGCCAA	
dMu-2_up_PstI_fw	<u>ACCTG</u> CAGTGTTCGGAC	<i>PstI</i>
dMu-2_up_overlap_rev	AAGCTTGCCCGATCCCCTTACATCCTACA	
dMu-2_dwn_overlap_fw	ACGGGATCGGGCAAGCTTATTCTTCGCTT	
dMu-2_dwn_BamHI_rev	<u>CGGATCC</u> TGCAATGTGACCGTTGTGG	<i>BamHI</i>
dMu2-check-fw	GCCTGATAACGACAAACAATTT	
dMu2-check-rev	CCCAGTTTGTGAAGTTATGAG	
dlambda_up_EcoRI_fw	<u>CGAATTC</u> AATTGCTTTAGCCGAGGCA	<i>EcoRI</i>
dlambda_up_overlap_rev	AATGAGTGAGGTAAGCTTTCGTTTCGTTTG	
dlambda_dwn_overlap_fw	AAGCTTACCTCACTCATTAGTATCTTGCTCTTCTGA	
dlambda_dwn_PstI_rev	<u>CGACTGCAG</u> GCGGATTTTCACTGTTTCCAG	<i>PstI</i>
dlambda-check-fw	TGAAAGCGCACATTCCA	
dlambda-check-rev	GAAACCCCTGTTCGGTGAAAA	
<b>Überproduktion von <i>S. oneidensis</i> MR-1 Phagen-Proteinen</b>		
SO2963-EcoRI-fw	<u>CGAATTC</u> CCAAACCCAAATTTT	<i>EcoRI</i>
SO2963-PstI-rev	<u>CGACTGCAG</u> GGGCAAAAGTAAAGTTAC	<i>PstI</i>
SO2685-EcoRI-fw	<u>CGAATTC</u> GCTACTGAAGCACAAAGT	<i>EcoRI</i>
SO2685-NcoI-rev	<u>GACCATG</u> GGCAGTAACTAAAGGC	<i>PstI</i>
<b>Quantitative RealTime-PCR von ausgesuchten Genen</b>		
SO0675-qPCR-fw	GCGAGTTTCAAATGCTTTG	
SO0675-qPCR-rev	CCTAACCCAGCCATAGGTATTGG	
dSO2653- qPCR-fw	GATCACCTCTCACGCGCAT	
dSO2653- qPCR-rev	GCGTATTGAAAATGTCACCTATTGA	
SO2658-qPCR-fw	GTAAAGCCATTGAGGTTGACCT	
SO2658-qPCR-rev	CTAAACAAAAGCCGCCGC	
SO2985-qPCR-fw	CCACCCGACTCTCAGAT	
SO2985-qPCR-rev	GGTGAAAGCAGATTTGGAAGAT	
SO2999-qPCR-fw	GGCCATATTGTGGCAGATAAA	
SO2999-qPCR-rev	CTTATCTTTTAAACCAAGAACGGTG	

Name	Sequenz	RS
SO1066-qPCR-fw	GCTTTGCCTATGATGGCAA	
SO1066-qPCR -rev	GCTGTATTGCCACTGTTATATAATTCA	
SO1844-qPCR-fw	GCGCGGATAAATTTGATTATTTTC	
SO1844-qPCR -rev	CTGGCTTAAATCAATGCTGCT	
recA- qPCR-651-fw	TCACATCAACCGCACCAGAACG	
recA-qPCR-781-rev	CGCTCTTGATCCTATCTACGCG	
<b>PCR auf extrazellulären DNA</b>		
SO0577-Seq-fw	CGCAACGGTTACTATATCCACTCG	
SO0577-Seq-rev	CGATAATGGCGTTCATCGGCG	
dSO0641-up-EcoRI-fw	<u>CGAATTC</u> GGATGGTTCGTATGGTGTCG	
dSO0641-up-overlap-rev	AAGAAAGTGCGGTAAGGACGTGAAGTAATTCTCA	
SO1066-XmaI-fw	G <u>ACCCGGG</u> GAAAATGTTAATAAAGTTAACAGCTGTT	
SO1066-NcoI-rev	G <u>ACCATGG</u> AATAACGGCGACGACGTTG	
SO1773-up-EcoRI-fw	<u>CGAATTC</u> TGCAATTCCTTTTATGCACTG	
SO1773-up-NdeI-rev	<u>GTACAT</u> ATGGTTTGTATCTAGGGCAACTGCTTG	
SO2685-EcoRI-fw	<u>CGAATTC</u> GCTACTGAAGCACAAAGT	
SO2685-NcoI-rev	G <u>ACCATGG</u> GCAGTAACATAAAGGC	
<b>PCR auf ΔMuSo1 DNA</b>		
dSO0644-EcoRI-fw	CGAATTCGCGTGAAAAGTTATGGCTAAAA	
dSO0644-KpnI-rev	G <u>AGGTACC</u> GCGAGCGAGAAAATGAGGAT	
<b>Herstellung von Sonden für Southern-Blot-Analysen</b>		
SO0644-check-fw	GGCCTCATCGATAAACAGTG	
SO0644-check-rev	ACCGAACACGAAAAAGCC	
SO2653-check-fw	GATCACCTCTCACGCAT	
SO2653-check-rev	GCGTATTGAAATGTCACCTATTGA	
SO2963-check-fw	CACCATCAAGCAGCAAAA	
SO2963-check-rev	CTTAAGCTGGCCACCTTGC	
<b>Amplifizierung von DNA-Fragmenten für Nuklease-Aktivität</b>		
dtonB-exbBD_check_fw	GCTTCGTTTTTTAATACTTCTGCAA	
dtonB-exbBD_check_frev	GCTCATTAATTGTTGCTCATCG	
dSO4149_check_fw	CCAAGCTTCACCGGTTGA	
dSO4149_check_rev	CGAGTCCGAGCAACAAA	

### 5.1.3 Nährmedien

Die in dieser Arbeit verwendeten Nährmedien sind in Tabelle 9 gelistet.

**Tab. 9: Medien**

Bezeichnung	Zusammensetzung	Quelle	
Lysogeny <u>B</u> roth (LB) (Luria/Miller)	Trypton Hefeextrakt Natriumchlorid pH-Wert Lactat (anaerobe Kultivierung) Fumarat (anaerobe Kultivierung) oder DMSO (anaerobe Kultivierung)	10 g/l 5 g/l 10 g/l 7,0 20 mM 40 mM 200 mM	[15]
Super <u>O</u> ptimal <u>B</u> roth (SOB)	Trypton Hefeextrakt Magnesiumchlorid Natriumchlorid Kaliumchlorid pH-Wert	20 g/l 5 g/l 0,95 g/l 0,5 g/l 0,186 g/l 7,0	[88]
Super <u>O</u> ptimal <u>B</u> roth with <u>C</u> atabolite Repression (SOC)	SOB Glukose	20 mM	[88]
<u>L</u> actate <u>M</u> edium (LM)	Hefeextrakt Pepton HEPES Natriumchlorid Milchsäure pH-Wert	0,2 g/l 0,1 g/l 10 mM 10 mM 15 mM 7,5	[190]
<u>M</u> yers and <u>M</u> yers <u>M</u> inimal <u>M</u> edium (4M)	Natriumchlorid Natriumphosphat Ammoniumsulfat Magnesiumsulfat Calciumchlorid Mangansulfat Eisen (II) Chlorid Cobaltchlorid Zinksulfat Kupfersulfat Borsäure Natriummolybdat Nickelchlorid Natriumselenat HEPES Laktat <u>oder</u> N-Acetylglucosamin pH-Wert	150 mM 5 mM 10 mM 0,5 mM 50 mM 0,13 mM 0,54 mM 0,5 mM 0,1 mM 0,02 mM 5,66 mM 0,39 mM 0,5 mM 0,15 mM 25 mM 40 mM 40 mM 7,5	[72]

### 5.1.4 Chemikalien

In dieser Arbeit wurden Chemikalien von den Firmen Roth (Karlsruhe), Difco (Heidelberg), Bioline (Luckenwalde), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Steinheim) verwendet. Andere Bezugspartner werden im Text gesondert aufgeführt.

### 5.1.5 Antibiotika und Medienzusätze

Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika und Medienzusätze sind in Tabelle 10 gelistet.

**Tab. 10: Antibiotika und Medienzusätze**

Zusatz	Stammkonzentration	Endkonz. entsprechend des Bakteriums	Lösungsmittel
<b>Antibiotika</b>			
Ampicillin-Natriumsalz	100 mg/ml	100 µg/ml	A. dest
Chloramphenicol	30 mg/ml	30 µg/ml für <i>E.coli</i> 10 µg/ml für <i>S.oneidensis</i>	Ethanol 96% (v/v)
Kanamycinsulfat	50 mg/ml	50 µg/ml	A. dest
Tetrazyclinhydrochlorid	10 mg/ml	2,5 µg/ml	Ethanol 96% (v/v)
Gentamycinsulfat	10 mg/ml	10 µg/ml	A. dest
<b>Induktoren und sonstige Zusätze</b>			
Anhydrotetrazyclin	1 mg/ml	200 ng/ml	Dimethylformamid
2,6-Diaminopimelinsäure (DAP)	60 mM	300 µM	A. dest
Saccharose	80 % (w/v)	10 % (w/v)	A. dest

### 5.1.6 Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonucleasen wurden von den Firmen New England Biolabs (Frankfurt a.M.) und MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Für die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden die DNA-Polymerase Phusion von Biozym Scientific GmbH (Hess. Oldendorf) und die Taq-DNA-Polymerase von Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Darüber hinaus fanden für Dephosphorylierungsreaktionen an Nukleinsäuren die Antarkische Phosphatase® von New England Biolabs (Frankfurt a.M.) und für Ligationen von DNA-Fragmenten die T4-DNA-Ligase von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) Verwendung.

### 5.1.7 Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten „Kits“ sind in Tabelle 11 gelistet.

**Tab. 11: Kits**

Bezeichnung und Firma	Verwendungszweck
DNA Clean & Concentrator (Zymo Research, Freiburg)	DNA-Aufreinigung
Zymo Clean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, Freiburg)	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen
Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research, Freiburg)	Isolierung von Plasmid-DNA
Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer, Erlangen)	Chemilumineszentes Reagenz für HRP-abhängige Immunodetektion
CDP-Star® Reagent (New England Biolabs, Frankfurt am Main)	Chemilumineszentes Reagenz für AP-abhängige Immunodetektion
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)	Reverse Transkription zur Gewinnung von cDNA

### 5.1.8 Puffer

Die Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Puffer ist in Tabelle 12 aufgeführt. Darüber hinaus verwendete Pufferlösungen, sowie etwaige Abweichungen sind im Text gesondert aufgeführt.

**Tab. 12: Puffer**

Bezeichnung	Zusammensetzung	Quelle
<b>Arbeit mit Nukleinsäuren</b>		
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)	Tris Essigsäure EDTA pH-Wert	40 mM 20 mM 1 mM 8,3
5x DNA-Ladepuffer	TAE-Puffer Bromphenolblau Glycerol	2 % (v/v) 0,05 % (w/v) 50 % (v/v)
Transformationspuffer (TB)	Kaliumchlorid Manganchlorid Calciumchlorid Pipes pH-Wert	250 mM 55 mM 15 mM 10 mM 6,7
Salt-EDTA-Tris-Puffer (SET)	Natriumchlorid EDTA Tris pH-Wert	75 mM 25 mM 20 mM 7,5
<b>Arbeit mit Proteinen</b>		
2x Protein-Ladepuffer	SDS Bromphenolblau Glycerol β-Mercaptoethanol Tris pH-Wert	4 % (w/v) 0,02 % (w/v) 20 % (w/v) 10 % (w/v) 0,125 M 6,8
10x Tris-Glycin-SDS-Puffer	Tris Glycin SDS pH-Wert	0,1 M 0,8 M 0,25 % (w/v) 8,3
Trenngelpuffer	Tris SDS pH-Wert	1,5 M 0,4 % (w/v) 8,8
Sammelgelpuffer	Tris SDS pH-Wert	0,5 M 0,4 % (w/v) 6,8
Protein-Lysepuffer	HEPES Natriumchlorid Lysozym pH-Wert	10 mM 150 mM 0,5 mg/ml 7,0

### 5.1.9 Geräte

Eine Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Geräte befindet sich in Tabelle 13.

**Tab. 13: Geräte**

Gerät	Typ	Firma
Q-RT-PCR-Maschine	ABI 7300	Amersham Biosciences (Freiburg)
Mikrotiterplattenlesegerät	Infinite M200	Tecan (Männedorf, Schweiz)
Immunoblot Visualisierer	LAS-4000	FujiFilm (Düsseldorf)
Konfokalmikroskop	Leica TCS SP5	Leica Microsystems (Wetzlar)
NanoDrop	ND-1000	Peqlab, Erlangen
French® pressure cell press	SLM-AMINCO	SLM instruments (Urbana, IL)

## 5.2 Molekularbiologische Methoden

### 5.2.1 Konstruktion rekombinanter Bakterienstämme

Molekularbiologische Methoden, wie die Präparation von genomischer DNA und Klonierungsverfahren, wurden entsprechend Standardprotokollen [192, 217] oder nach Anweisungen der Hersteller durchgeführt. Die verwendeten Enzyme, Puffer, Kits und Chemikalien sind in den Kapiteln 5.1.4-8 gesondert aufgeführt.

#### Transfer replikativer Plasmide

Replikative Plasmide wurden mittels Transformation in chemisch kompetente *E. coli* [110] oder elektrokompetente *S. oneidensis* MR-1 Zellen [171] eingebracht.

#### „in-frame“ Deletionen

Die Generierung von „in-frame“ Deletionsmutanten von *S. oneidensis* MR-1 erfolgte mittels zweifacher homologer Rekombination unter Verbleib kleiner terminaler Gensequenzen (je 20-30 Bp) [133]. Hierzu wurden angrenzende Regionen zu dem zu deletierenden Gen per PCR amplifiziert. Durch die Wahl geeigneter Oligonukleotiden wurden zwei, sich in der Sequenz überlappende, Fragmente konstruiert, die in einer zweiten PCR fusioniert wurden. Anschließend wurde das so entstandene „knock-out“ Fragment nach Restriktion mit dem Suizidvektor pNPTS138-R6KT ligiert. Dieser Vektor trägt neben einer Resistenzkassette gegen Kanamycin das Gen *sacB*, welches für das Enzym Levansynthase codiert, welches Saccharose zu einem für die Zellen toxischen Produkt umwandelt. Der resultierende Deletionsvektor wurde nun zuerst in *E. coli* DH5 $\alpha$ *pir* transferiert, bevor er anschließend in einer zweiten Transformation in den DAP-auxotrophen *E. coli* WM3064 überführt wurde. Mittels Konjugation erfolgte die Einbringung des Vektors in *S. oneidensis* MR-1 und dort die ortsspezifische Integration des Plasmids in das Genom. Zur Selektion der Bakterien mit chromosomal-integriertem Plasmid (erste homologe Rekombination) wurden Einzelkolonien auf Kanamycin-Resistenz und Saccharose-Sensitivität untersucht. Im nächsten Schritt wurden Kan<sup>R</sup>-Sac<sup>S</sup>-Klone ohne Selektionsdruck in LB für etwa 15-20 Replikationszyklen angezogen, um die zweite homologe Rekombination zu ermöglichen. Anschließend erfolgte die Selektion auf „Plasmid“-freie Stämme durch Wachstum auf LB-Agar mit 10 % (w/v) Saccharose. Saccharose-resistente aber Kanamycin-sensitive Stämme wurden im letzten Schritt mittels PCR auf Deletion des gewünschten Genabschnittes untersucht.

#### „in-frame“ Komplementationen

Zur „in-frame“ Komplementation („knock-in“) wurde eine Kopie des zuvor deletierten Gens analog der eben beschriebenen Methode zur Erzeugung von „in-frame“ Deletionen in seinen genetischen Kontext im *S. oneidensis* MR-1 Genom reintegriert..

### 5.2.2 Lebendfluoreszenzmarkierung von *S. oneidensis* MR-1

Für Biofilmuntersuchungen wurden *S. oneidensis* MR-1 Stämme mit konstitutiv exprimierten

*gfp*, *cfp* oder *yfp* unter Verwendung eines modifizierten Tn7-Übertragungssystems generiert [76]. Im Wesentlichen wurde dazu das Gen kodierend für das Fluoreszenzprotein GFP, CFP oder YFP aus pBK-miniTn7-c(g,y)fp3 [130] in den Tn7-Übertragsvektor pUC18-R6KT-miniTn7T [38] ligiert und in den DAP-auxotrophen *E. coli* WM3064 Stamm transformiert. Der Vektor wurde anschließend in *S. oneidensis* MR-1 mittels Konjugation unter zusätzlichem Einsatz des Stammes *E. coli* WM3064, der das Helferplasmid pTNS2 trägt, transferiert. Die Selektion der CFP-, GFP und YFP-markierten *S. oneidensis* MR-1 Zellen erfolgte auf LB-Platten durch die Zugabe von Chloramphenicol, sowie durch mikroskopische Untersuchungen unter Verwendung des Fluoreszenzmikroskops Zeiss Image MI (Oberkochen).

Durch vergleichende Experimente bezüglich des Wachstums und der Biofilmbildung der unmarkierten und fluoreszenzmarkierten Stämme wurden mögliche negative Effekte der Protein-Produktion ausgeschlossen.

### 5.2.3 Isolierung von extrazellulärer DNA aus dem Überstand von Biofilmkulturen

Für die Extraktion von eDNA aus dem Überstand von Biofilmkulturen wurden Übernachtskulturen von *S. oneidensis* MR-1 Stämmen in LM Medium auf eine optische Dichte<sub>600nm</sub> von 0,05 verdünnt und in Petrischalen statisch inkubiert. Nach einer Inkubation für 1, 4, beziehungsweise 24 h wurden 500 µl des Überstandes geerntet und steril-filtriert. Der zellfreie Überstand wurde mit 250 mM Natriumchlorid versetzt und die darin enthaltene DNA durch die Zugabe von 96 % (v/v) Ethanol gefällt. Die DNA wurde in TE-Puffer (10 mM Tris (pH 8,0); 1 mM EDTA) gelöst und die Konzentration durch Spektrophotometrie (unter Verwendung des NanoDrops) bestimmt.

### 5.2.4 Quantifizierung der extrazellulären DNA aus dem Überstand

Die Bestimmung der Konzentration von eDNA im Überstand von Biofilmkulturen erfolgte mittels eines modifizierten Assays zur DNA Quantifizierung („DNA secretion assay“) [87]. Der zellfreie Überstand wurde, wie unter 5.2.3 beschrieben, isoliert und 100 µl der Probe mit 100 µl einer 1:200 Verdünnung des Fluoreszenzfarbstoffs PicoGreen (Molecular Probes; Invitrogen, Darmstadt) versetzt. Der Gehalt von eDNA wurde unverzüglich fluorimetrisch bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm am Tecan Infinite M200 Reader gemessen. Die Konzentration von eDNA in der Probe wurde anschließend mittels Referenzstandards (25, 50, 100, 200, 500 und 1000 ng/ml DNA) in LM Medium berechnet:

### 5.2.5 Nichtradioaktive Markierung von DNA mit Digoxigenin

Die Herstellung von Digoxigenin (DIG)-markierten DNA-Sonden erfolgte unter Verwendung des PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) nach Angaben des Herstellers.

### 5.2.6 Southern-Blot-Analyse

Die Southern-Blot-Analyse erfolgte im Wesentlichen wie unter [230] beschrieben. Dazu wurden 5 µg isolierter chromosomaler DNA von *S. oneidensis* MR-1 mit geeigneten Restriktionsendonukleasen verdaut und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Nach Depurinierung, Denaturierung und Neutralisierung des Gels wurde die DNA mittels Kapillar-Blots auf eine Nylon-Membran (Hybond-N, Amersham Life Science) transferiert. Die Hybridisierung der Membran mit der Sonde sowie die Inkubation mit dem alkalischen Phosphatase-konjugierten Anti-Digoxigenin Antikörper und die anschließende Detektion mit CSPD (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) erfolgte nach Herstellerangaben.

### 5.2.7 Extraktion von Gesamt-RNA

Exponentiell wachsende *Shewanella*-Kulturen wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 4.600 x g und 4°C geerntet, mit eiskaltem AE-Puffer (20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA) gewaschen und anschließend in 600 µl AE-Puffer resuspendiert (150 µl/1x10<sup>9</sup> Zellen). Zur Lagerung und weiteren Aufbereitung erfolgte die Zugabe von 900 µl 60°C heißem Phenol und 10 µl einer 25 % (w/v) SDS-Lösung. Die Probe wurde bei 60°C für 10 min inkubiert und nach Abkühlung auf Eis abzentrifugiert (13.000 x g; 10 min, 4°C). Die wässrige Phase wurde mit 900 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) und 62,5 µl Natriumacetat (2 M; pH-Wert 5,2) versetzt und erneut abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde gegebenenfalls ohne erneute Zugabe von Natriumacetat wiederholt. Anschließend wurde zur Fällung der Gesamt-RNA der wässrigen Phase 2,5 Volumen eiskaltes Ethanol (96 % (v/v)) zugegeben und für mindestens 2 h bei -80°C inkubiert. Nach erneutem Abzentrifugieren (13.000 x g; 10 min, 4°C) und Waschen des Pellets mit eiskaltem Ethanol (70 % (v/v)) wurde die RNA getrocknet und anschließend in 100 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Verbleibende Reste chromosomaler DNA wurden mit dem Turbo DNA-Free Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) nach Herstellerangaben aus den Proben entfernt. Mittels einer PCR wurde anschließend die Reinheit der Gesamt-RNA verifiziert.

### 5.2.8 Erstellung von Expressionsprofilen

Transkriptom-Analysen zur Erstellung von Expressionsprofilen der *S. oneidensis* MR-1 Zellen wurden in Zusammenarbeit mit der Firma Febit (Febit Biomed GmbH, Heidelberg) erstellt. Für jede zu untersuchende Bedingung erfolgte die Analyse von zwei unabhängigen Replikaten. Dazu wurden Oligonukleotidsonden durch lichtaktivierte *in situ*-Synthese hergestellt [8]. Ein Microarray-Biochip bestand hierbei aus acht individuellen Microfluid-Kanälen, mit je >15.000 DNA-Sonden. Dabei wurde das Sondenset anhand des Gesamtgenoms von *S. oneidensis* MR-1 (TIGR 4. Juni 2008) mittels eines modifizierten Smith-Waterman-Algorithmus berechnet [229]. Für fast alle der 4.938 annotierten Gene in *S. oneidensis* MR-1 wurden so drei 50 Bp-lange Oligonukleotidsonden mit hoher Spezifität und Sensitivität hybridisiert.

Die Qualitätskontrolle der RNA wurde mithilfe des Bioanalyzers 2100 (Agilent, Böblingen) und dem RNA 6000 Nanokit (Agilent; Waldbronn), entsprechend Herstellerangaben, durchgeführt. Die 16S- und 23S-rRNA wurden unter Verwendung des MICROBE-Express Kits (Applied Biosystems, Darmstadt) entfernt. Für jeden Array wurden 3 µg der Gesamt-RNA aufbereitet.

Die verbleibende mRNA wurde mit dem Amp<sup>TM</sup>II-Bacteria Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) biotinyliert, getrocknet und fragmentiert. Im Anschluss wurde die mRNA in 15 µl Longmer Hybridisierungspuffer (Febit Biomed GmbH, Heidelberg) resuspendiert und auf den Biochip aufgetropft. Die Hybridisierung erfolgte für 16 h bei 45°C mit Argon Druckluft. Nach der Hybridisierung wurde der Chip gewaschen um nichthybridisierte RNA zu entfernen. In einem letzten Schritt wurden die verbleibenden Signale nach Herstellerangaben verstärkt (Febit Biomed GmbH, Heidelberg).

### Datenanalyse

Die detektierten Signale wurden mittels Geniom Wizard Software (Febit Biomed GmbH, Heidelberg) evaluiert. Nach einer Hintergrund-Korrektur erfolgte eine quantile Normalisierung der Daten. Alle weiteren Analysen wurden unter Einbeziehung dieser ermittelten normalisierten Daten durchgeführt.

Die so berechneten Intensitäten wurden auf Normalverteilung überprüft und einem parametrischen T-Test – zur Feststellung signifikanter Expressionsunterschiede zwischen den zu vergleichenden Bedingungen – unterzogen. Die resultierenden p-Werte wurden im Benjamini-Hochberg-Verfahren angepasst [101, 126]. Für eine signifikante statistische Aussage wurden alle Daten mit einem p-Wert von >0,05 ausgeschlossen.

## 5.2.9 Quantitative RealTime-PCR

Extrahierte Gesamt-RNA wurde als Vorlage zur cDNA-Synthese mit dem RevertAid<sup>TM</sup> H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, St. Leon-Roth) eingesetzt. Die cDNA ihrerseits wurde als Matrize für eine quantitative PCR unter Verwendung des SYBR® Green PCR-Mastermixes (Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet. Die Bestimmung der zur cDNA korrespondierenden Transkriptmengen erfolgte jeweils aus mindestens zwei biologischen und technischen Replikaten.

Die Auswertung der SYBR® Green Signale erfolgte unter Einsatz der RealTime 7300 PCR Software (Amersham, Freiburg). Der entsprechende cT-Wert (*cycle threshold*) wurde dabei automatisch nach einem 2-Schritt-Zyklus mit 40 Wiederholungen bestimmt. Das Signal der zu untersuchenden Transkriptmenge wurde auf die Transkriptmenge von *recA* standardisiert. Die Primereffizienz jedes Primerpaares wurde unter Einsatz definierter Mengen chromosomaler DNA (100 ng, 10 ng, 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng) als Matrize für eine quantitative RealTime-PCR (q-RealTime-PCR) bestimmt.

Isolierte extrazelluläre DNA aus dem Überstand von Biofilmkulturen (siehe Abschnitt 5.2.3) wurde ebenfalls als Matrize für eine q-RealTime-PCR eingesetzt, um das Verhältnis von Phagen-DNA zu chromosomaler DNA im Überstand zu bestimmen. Hierzu wurde 1 ng eDNA eingesetzt, in dem nach Berechnung 180033 Kopien der chromosomalen DNA enthalten sind. Nach Durchführung der q-RealTime-PCR wurde die errechnete Kopienzahl der DNA einzelner Phagen zu der Kopienzahl von *recA*, welche die chromosomale DNA repräsentiert, in Bezug gesetzt.

## 5.3 Mikrobiologische Methoden

### 5.3.1 Kultivierung von Bakterien

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme sind in Tabelle 6 aufgeführt. *S. oneidensis* MR-1 wurde routinemäßig aerob in LB Medium bei 30°C, *E. coli* bei 37°C kultiviert. Zur Kultivierung des Stammes *E. coli* WM3064 wurde dem Medium 300 µM DAP zugesetzt. Für Untersuchungen der Biofilmentwicklung von *S. oneidensis* MR-1 wurden die Zellen in LM Medium mit 500 µM Laktat angezogen. Für emerses Wachstum wurde dem entsprechenden Medium 1,5 % Agar zugesetzt.

Die optische Zelldichte der Bakterienkulturen wurde photometrisch durch Absorptionsmessung an einem Photometer bei 600 nm bestimmt.

### 5.3.2 Zellernte von an Oberflächen angehefteten *S. oneidensis* MR-1 Zellen

Die Kultivierung und Isolierung der Oberflächen-assoziierten *S. oneidensis* MR-1 Zellen fand sowohl unter hydrodynamischen, also auch unter statischen Bedingungen statt.

#### Hydrodynamische Bedingung

Zur Isolierung von Oberflächen-assoziierten *S. oneidensis* MR-1 Zellen unter hydrodynamischen Bedingungen wurde ein Zellerntesystem entwickelt. Dieses System besteht aus aufgehängten 50 ml Spritzen, die mit Glaskugeln (Durchmesser 5 mm, Kalk-Natron-Glas; Roth, Karlsruhe) und LM Medium nur etwa 3 cm hoch (entspricht etwa 200 Kugeln) gefüllt wurden, um die Ausbildung von Sauerstoffgradienten zu verhindern. Die Kugeln dienten später als Oberfläche für die Anheftung der Zellen. Zum vollständigen Bedeckend er Kugeln war etwa 10 ml Medium bzw. Kultur erforderlich.

Nach Kalibrierung der Oberfläche mit Medium wurden Übernachtskulturen von *S. oneidensis* MR-1 in LM Medium auf eine optische Dichte<sub>600nm</sub> von 0,1 verdünnt und auf den Glaskugeln für 10 min inkubiert. Anschließend wurde der Mediumfluss gestartet, indem die Spritzen über Schläuche mit einem Mediumreservoir und einer peristaltischen Pumpe verbunden wurden. Die Medium-Umsatzrate betrug 3 ml/min, was einem kompletten Austausch des Mediums nach 4 min entsprach. Sauerstoff-Messungen in den Räumen zwischen den Kugeln ergaben, dass das System aerobe Bedingungen (> 4 mg O<sub>2</sub>/ml) für mehr als 4 h beibehielt (Thormann, unveröffentlicht). Durch den Mediumfluss wurden nicht angehefteten Zellen aus den Spritzen entfernt. Zu verschiedenen Zeitpunkten (0,25, 1, 2 und 4 h) wurden die angehefteten Zellen geerntet, indem die Kugeln aus der Spritze entfernt, in 1:10 Stopplösung (5 % (v/v) Phenol (pH 7,4); 95 % (v/v) Ethanol) aufgenommen und gevortext wurden. Die Zellpellets der verschiedenen Anheftungsperioden wurden vereint.

Zur vergleichenden Analyse des Transkriptom Oberflächen-assoziiierter Zellen wurde parallel eine planktonische Kultur aus derselben Vorkultur mit einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,1 angeimpft, ebenfalls für 10 min bei RT stehend und anschließend für 1 h schüttelnd inkubiert.

In einem zweiten Ansatz wurden die Glaskugeln durch Eisenkugeln (Blässinger, Vellmar) ausgetauscht. Bevor die Eisen-Kugeln als Kolonisationsoberfläche im Erntesystem Verwendung

fanden, wurden die Kugeln zunächst mehrfach gewaschen und in A. dest. autoklaviert. Dadurch bildete sich eine Schicht aus Eisen(hydr)oxiden. Die Inokulation und Ernte der angehefteten *S. oneidensis* MR-1 Zellen fand analog zu der oben beschriebenen Vorgehensweise statt.

Durch mikroskopische und phänotypische Untersuchungen von geernteten Zellen von Glas- bzw. Eisenkugeln in LM Medium wurde sowohl die effiziente Zellablösung von den Kugeln bestätigt, als auch eine durch die Erntemethode möglicherweise hervorgerufene Beschädigung der Zellen ausgeschlossen.

### **Statische Bedingung**

Zur Ernte von unter statischen Bedingungen angehefteten Zellen wurde *S. oneidensis* MR-1 in 20 ml LM Medium mit einer optischen Dichte<sub>600nm</sub> von 0,1 in Petrischalen bei RT inkubiert. Zu diversen Zeitpunkten (0,25 und 1 h) wurde das Medium abgenommen und die darin befindlichen planktonischen Zellen als Referenz für die Transkriptom-Analysen geerntet. Anschließend wurden die Oberflächen-assoziierten Zellen in Stopplösung unter Verwendung eines Zellschabers (Sarstedt, Nümbrecht) vom Boden der Petrischale geerntet. Mikroskopische Analysen bestätigten auch hier, dass das Abkratzen die Zellen nicht mechanisch beschädigte.

## **5.3.3 Kultivierung von *S. oneidensis* MR-1 Biofilmen**

### **Statischer Mikrotiterplatten-Assay**

Die Kultivierung von *S. oneidensis* MR-1 Biofilmen in Polypropylen-Mikrotiterplatten (Sarstedt, Nümbrecht) erfolgte wie in [250] beschrieben. Übernachtskulturen der *S. oneidensis* MR-1 Stämme wurden in LM Medium 1:35 verdünnt, in die Kammern der Mikrotiterplatte (96-Kammerformat) transferiert und bei 30°C für etwa 24 h inkubiert. Wenn benötigt, wurde 30 µg/ml DNase I (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) oder Proteinase K (Roth Karlsruhe) zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 4 und 24 h) zum Medium in den Kammern zugegeben.

Nach 24 h Inkubation wurde die Zelldichte innerhalb der Kammern bestimmt. Die Färbung der Biofilme erfolgte durch Zugabe von 10 µl Kristallviolett (0,5 % (w/v)) und anschließender Inkubation für 10 min. Durch Waschen mit Wasser wurde der verbleibende Farbstoff entfernt. Das in den Biofilm inkorporierte Kristall-Violett wurde anschließend mit 200 µl Ethanol ausgewaschen und durch eine Extinktionsmessung bei 570 nm quantifiziert. Zum Ausschluss von Wachstumsdefekten wurde die Menge an Kristall-Violett auf die optische Dichte<sub>600nm</sub> der Kultur bei 600 nm normiert. Die so ermittelte relative Menge an Oberflächen-assoziierten-Biomasse wurde zur Biomasse des Wildtyps in Bezug gesetzt. Die Biofilmanalysen in Mikrotiterplatten wurden in mindestens drei unabhängigen Versuchen wiederholt.

### **Statischer Biofilm in Kulturschalen**

Um die Biofilmentwicklung unter statischen Bedingungen auch visuell zu verfolgen, erfolgte die Kultivierung von *S. oneidensis* MR-1 in kleinen unbeschichteten Kulturschalen (Durchmesser 35 mm; ibidi, Martinsried) mit hydrophober Oberfläche. Dazu wurden Übernachtskulturen in LM Medium mit 500 µM Laktat auf eine optische Dichte von 0,05 verdünnt und bei RT in den Petrischalen inkubiert. Vor mikroskopischer Visualisierung der Biofilmbildung am konfokalen Fluoreszenzmikroskop wurde das Medium entfernt und die Biofilm-assoziierten

Zellen mit frischem LM Medium gewaschen. Kontrollen zeigten, dass durch diesen Waschschrift nur die planktonischen Zellen entfernt und die Biofilmstruktur nicht beeinträchtigt wurde.

Zur Behandlung des Biofilms mit DNase I oder Proteinase K, oder zur Färbung mit DDAO (7-hydroxy-9H-(1,3-dichloro-9,9-dimeThylacridin-2-one; Invitrogen, Karlsruhe), wurde das entsprechende Enzym bzw. der Farbstoff zum frischen Medium zugegeben.

### **Hydrodynamisches Flusskammersystem**

Biofilme wurden bei RT in LM Medium in einem Drei-Kammer-Flusssystem kultiviert. Jede Kammer maß 1 x 4 x 40 mm. Als Kolonisierungsoberfläche für die Bakterien wurden Deckgläschen (Roth, Karlsruhe) mit Silikon (Siska-Henkel, Düsseldorf) auf den Kanälen befestigt. Der Aufbau des Flusskammersystems, die Sterilisation und die Beimpfung der Kulturen erfolgte wie unter [250] beschrieben. Alle Biofilmanalysen wurden in Triplikaten in mindestens zwei unabhängigen Versuchen durchgeführt.

Zur Behandlung der Biofilmkulturen mit Dnase I bzw. Proteinase K wurde das entsprechende Enzym in das Einlauf-Mediumreservoir in einer Endkonzentration von 30 µg/ml zugegeben. Zur Färbung der extrazellulären DNA wurde der Farbstoff DDAO in einer Endkonzentration von 4 µM über die Blasenfalle dem Medium zugesetzt. Der Biofilm wurde 1 h mit dem Enzym, beziehungsweise dem Farbstoff inkubiert. Die mikroskopische Visualisierung der Biofilmbildung wurde am konfokalen Fluoreszenzmikroskop an einer Stelle im Kanal nahe dem Mediumseinfluss verfolgt.

### **5.3.4 Mikroskopie und Bildbearbeitung**

Die Biofilmentwicklung unter hydrodynamischen und statischen Bedingungen wurde mit Hilfe eines invertierten konfokalen Laserscanmikroskops Typ Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar) verfolgt. Die so entstandenen Aufnahmen wurden mittels IMARIS Software (Bitplane AG, Zürich, Schweiz) prozessiert und zu drei-dimensionalen Bildern zusammengefügt.

Zur Quantifizierung der Oberflächenabdeckung wurden die zwei-dimensionalen Aufnahmen der konfokalen Ebene der Oberflächen-assoziierten Zellen ausgewählt und mit der Software Adobe® Photoshop® bearbeitet. Die prozentuale Oberflächenabdeckung der Zellen wurde aus dem Verhältnis der Menge an grünen Pixeln, welche die GFP-markierten Zellen repräsentieren, und dem Hintergrund (schwarz; Boden) errechnet. Für jeden Zeitpunkt während der Biofilmentwicklung wurden mindestens vier individuelle Bilder aus je zwei unabhängigen Experimenten analysiert.

### **5.3.5 Elektronenmikroskopie**

#### **Rasterelektronenmikroskopie**

Der Prozess der Anheftung und die beginnende Biofilmbildung von *S. oneidensis* MR-1 wurden unter Einsatz eines Rasterelektronenmikroskops in Kollaboration mit Jürgen Berger vom Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen, analysiert.

Dazu wurden Übernachtskulturen in LM Medium auf eine optische Dichte<sub>600nm</sub> von 0,05 verdünnt und in kleinen unbeschichteten Petrischalen (ibidi, Martinsried) zusammen mit Polylysin-behandelten Glasplättchen bei RT inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde zur Fixierung der Zellen 2,5 % (v/v) Glutaraldehyd zum Medium zugegeben und für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Glasplättchen aus der Petrischale entnommen und in einer Mikrotiterplatte (24 Kammerformat) in PBS-Puffer (130 mM NaCl, 70 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 30 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) mit 2,5 % (v/v) Glutaraldehyd bei 4°C gelagert.

Im Anschluss wurden die Proben mit dem Kontrastmittel Osmiumtetroxid (1 % (w/v)) behandelt und für 1 h auf Eis inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Proben auf den Glasplättchen in Ethanol dehydriert und unter Einsatz von CO<sub>2</sub> getrocknet („kritische Punkt-Trocknung“). Die Proben wurden anschließend mit 7 nm Gold/Palladium (Au/Pd) besprüht und bei 20 kV Beschleunigungsspannung unter einem Hitachi S-800 Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop untersucht.

### Transmissionselektronenmikroskopie

Zur Visualisierung von Phagenpartikeln im Überstand von *S. oneidensis* MR-1 Biofilmen wurde ein Transmissionselektronenmikroskop verwendet. Die Fixierung der Partikel sowie die Mikroskopie erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Larissa Kolesnikova (Abt. Virologie, Philipps-Universität, Marburg).

Dazu wurden zunächst *S. oneidensis* MR-1 Biofilme, wie unter 5.3.3 beschrieben, für 24 h in Petrischalen kultiviert und anschließend die Überstände abgenommen und steril-filtriert. Die zellfreie Überstände wurden auf Kohlenstoff-beschichtete Gitter getropft, für einige Minuten bei RT inkubiert und anschließend mit einem Tropfen Wasser für 1 min gewaschen. Im Anschluss wurden die Gitter mit 2 % (w/v) Uranylacetat behandelt und getrocknet. Die Aufnahmen erfolgten unter Einsatz des Transmissionselektronenmikroskop JEOL TEM 1230 (JEOL, Peabody, USA).

### 5.3.6 Untersuchung der lytischen Aktivität von Phagen in Biofilm-Überständen

*S. oneidensis* MR-1 Zellen wurden, wie unter 5.3.3 beschrieben, in Petrischalen inkubiert und der Überstand steril-filtriert. Der Überstand einer planktonisch wachsenden Kultur wurde nach einer 30-stündigen Inkubation ebenfalls steril-filtriert und im Folgenden als Kontrolle eingesetzt.

Parallel wurden *S. oneidensis* MR-1 Stämme aus einer Übernachtskultur in LB Medium verdünnt und bis zum Erreichen einer optischen Dichte<sub>600nm</sub> von 1 kultiviert. Von den Zellsuspensionen wurden 100 µl mit 40 ml lauwarmen LB Softagar (0,3 % (w/v) Agar) gemischt und in Petrischalen gegossen. Die zellfreien Überstände wurden anschließend auf die ausgehärteten Platten getropft und die Platten bei 30°C über Nacht inkubiert. Die Ausbildung von Phagenplaques wurde photographisch dokumentiert. Die lytische Aktivität der Phagen wurde in mindestens drei unabhängigen Experimenten bestimmt.

### 5.3.7 Bestimmung der relativen Lebendzellzahl in Biofilmen

Zur Analyse der Lebendzellzahl in *S. oneidensis* MR-1 Stämmen wurden die Zellen statisch in Petrischalen kultiviert (siehe 5.3.3) und zu verschiedenen Zeitpunkten mittels eines Zellschabers

geerntet. Zuvor wurde das Medium in den Petrischalen ausgetauscht, um die planktonisch lebenden Zellen zu entfernen. Die Gesamtzellzahl jeder Probe wurde mittels einer Thoma-Zählkammer (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen) ermittelt. Parallel wurden verschiedene Verdünnungen der Proben auf LB Agarplatten ausplattiert und die Zahl der Kolonien als Maß der Lebendzellzahl bestimmt. Die relative Lebendzellzahl wurde aus dem Verhältnis der Kolonienzahl zur Gesamtzellzahl ermittelt. Die Ergebnisse wurden durch drei unabhängige Versuche verifiziert.

## 5.4 Biochemische Methoden

### 5.4.1 Überproduktion und Aufreinigung rekombinanter Proteine

#### Überproduktion

Die Phagene SO\_2685, kodierend für die Hauptuntereinheit des Kapsids von MuSo2, und SO\_2963, das für ein Kapsid-Protein des Phagen LambdaSo kodiert, wurden in den Überexpressionsvektor pASK-IBA3plus (IBA GmbH, Göttingen) kloniert. Die Überproduktion erfolgte in *E. coli* DH5 $\alpha$ pir bei Inkubation in LB Medium bei 37°C. Nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase (optische Dichte etwa 0,5) wurden zur Induktion der Proteinüberproduktion 200 ng/ml Anhydrotetrazyklin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) zugesetzt. Nach 4 h Wachstum unter Induktionsbedingungen erfolgte die Zellernte.

#### Aufreinigung

Zur Aufreinigung der rekombinanten Proteine [114] wurden die Zellen in Lyse-Puffer (siehe Tab. 12) resuspendiert und anschließend in drei Durchläufen mittels einer French-Press mit 1200 Bar aufgeschlossen. Einschlusskörperchen von SO\_2685 und SO\_2963 wurden anschließend mittels Zentrifugation bei 1.000 x g, 4°C, geerntet und eine Probe mit 2-fach SDS-Ladepuffer versetzt und auf das Vorhandensein des jeweiligen Zielproteins mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese [129] überprüft. Die Einschlusskörperchen wurden bis zur Aufreinigung bei -20°C gelagert.

### 5.4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung der Protein-Konzentrationen erfolgte mittels des BCA Protein Assay Reagent (Thermo Scientific, Schwerte) und wurde, den Herstellerangaben folgend, durchgeführt.

### 5.4.3 Produktion von Antikörpern

Zur Generation von Antikörpern gegen Phagenproteine wurde diese, wie zuvor beschrieben, produziert und als Einschlusskörperchen isoliert. Anschließend wurde 800  $\mu$ g des

jeweiligen Proteins mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in einem 16 x 16 cm großem Gel aufgetrennt und die korrespondierende Bande nach Färbung mit 0,1 % Coomassie (in A. dest. gelöst) ausgeschnitten. Die Produktion der polyklonalen Antikörper wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) durchgeführt.

#### 5.4.4 Western-Blot-Analysen

*S. oneidensis* MR-1 Zellen wurden in Petrischalen inkubiert und mit Hilfe eines Zellschabers geerntet. Zellen, korrespondierend zu einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,25, wurden abzentrifugiert, in 10 µl 2-fach SDS-Ladepuffer aufgenommen und anschließend mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Immobilon-P; Millipore, Schwalbach) transferiert. Zur Detektion der Phagenproteine wurden die polyklonalen Antikörper gegen SO\_2685 bzw. SO\_2963 in der Verdünnung 1:5.000 bzw. 1:20.000 verwendet. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit dem polyklonalen Ziege-anti-Kaninchen Immunglobulin HRP-konjugiertem Zweitantikörper (Thermo Fischer Scientific, Schwerte). Das Signal wurde mit Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer, Erlangen) entsprechend Herstellerangaben entwickelt und im CCD System LAS\_4000 (Fujifilm, Düsseldorf) dokumentiert.

#### 5.4.5 Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität im Überstand von Biofilmen

Die Aktivität der extrazellulären  $\beta$ -Galaktosidase in statisch wachsenden Biofilmen wurde, wie unter [236] beschrieben, durchgeführt. Dazu wurde das Plasmid pME6031-P<sub>mot</sub>-lacZ [76], welches ein in *Shewanella* konstitutiv exprimiertes lacZ-Gen trägt, in *S. oneidensis* MR-1 transformiert. Eine Übernachtskultur dieses Stammes wurde in LM Medium auf eine optische Dichte von 0,05 verdünnt und bei RT in Petrischalen inkubiert. Nach 1, 4 bzw. 24 h wurde der Überstand des Biofilms abgenommen und steril-filtriert. Als Kontrolle diente zellfreier Überstand einer planktonischen Kultur, die bei RT für 24 h inkubiert wurde. Die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität im zellfreien Überstand erfolgte in Eppendorf-Gefäßen bei 30°C dem Standardprotokoll [157] folgend. Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität wurde zur Gesamtproteinmenge in der Probe normalisiert.

#### 5.4.6 Bestimmung der Nuklease-Aktivität in *S. oneidensis* MR-1

Die extrazelluläre Nuklease-Aktivität in *S. oneidensis* MR-1 erfolgte im Wesentlichen wie unter [191] beschrieben. Dazu wurden *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp und Nuklease-Mutanten aus einer Übernachtskultur auf eine optische Dichte<sub>600nm</sub> von 0,05 in 20 ml LB-Medium inokuliert und für 4 h schüttelnd bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Stämme auf die gleiche optische Dichte eingestellt und der Überstand der Stämme steril-filtriert. Zu 230 µl der Zellen bzw. des sterilen Überstandes wurde ein spezifisches PCR-Fragment (1006 Bp bzw. 3140 Bp) in der Endkonzentration von 5 µg/ml gegeben und die Mischung bei 30°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 25 µl der Probe entnommen und die DNA auf einem Agarose-Gel visualisiert. Zur Validierung der Ergebnisse wurde dieser Versuch dreimal wiederholt.

## 6 Quellen

1. **Adams, M. H.** 1959. Bacteriophages. New York: Interscience Publisher:592-pp.
2. **Agladze, K., X. Wang, and T. Romeo.** 2005. Spatial periodicity of *Escherichia coli* K-12 biofilm microstructure initiates during a reversible, polar attachment phase of development and requires the polysaccharide adhesin PGA. *J Bacteriol* **187**:8237-46.
3. **Aldridge, P., R. Paul, P. Goymer, P. Rainey, and U. Jenal.** 2003. Role of the GGDEF regulator PleD in polar development of *Canibacter crescentus*. *Mol Microbiol* **47**:1695-708.
4. **Allesen-Holm, M., K. B. Barken, L. Yang, M. Klausen, J. S. Webb, S. Kjelleberg, S. Molin, M. Givskov, and T. Tolker-Nielsen.** 2006. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol* **59**:1114-28.
5. **Andersen, L. P., and L. Rasmussen.** 2009. *Helicobacter pylori*-cocoid forms and biofilm formation. *FEMS Immunol Med Microbiol* **56**:112-5.
6. **Baba, T., and O. Schneewind.** 1998. Targeting of muralytic enzymes to the cell division site of Gram-positive bacteria: repeat domains direct autolysin to the equatorial surface ring of *Staphylococcus aureus*. *EMBO J* **17**:4639-46.
7. **Barbieri, E., B. J. Paster, D. Hughes, L. Zurek, D. P. Moser, A. Teske, and M. L. Sogin.** 2001. Phylogenetic characterization of epibiotic bacteria in the accessory nidamental gland and egg capsules of the squid *Loligo pealei* (Cephalopoda:Loliginidae). *Environ Microbiol* **3**:151-67.
8. **Baum, M., S. Bielau, N. Rittner, K. Schmid, K. Eggelbusch, M. Dahms, A. Schlauersbach, H. Tahedl, M. Beier, R. Guimil, M. Scheffler, C. Hermann, J. M. Funk, A. Wixmerten, H. Rebscher, M. Honig, C. Andreae, D. Buchner, E. Moschel, A. Glathe, E. Jager, M. Thom, A. Greil, F. Bestvater, F. Obermeier, J. Burgmaier, K. Thome, S. Weichert, S. Hein, T. Binnewies, V. Foitzik, M. Muller, C. F. Stahler, and P. F. Stahler.** 2003. Validation of a novel, fully integrated and flexible microarray benchtop facility for gene expression profiling. *Nucleic Acids Res* **31**:e151.
9. **Baumann, L., P. Baumann, M. Mandel, and R. D. Allen.** 1972. Taxonomy of aerobic marine *eubacteria*. *J Bacteriol* **110**:402-29.
10. **Bayles, K. W.** 2007. The biological role of death and lysis in biofilm development. *Nat Rev Microbiol* **5**:721-6.
11. **Beliaev, A. S., D. M. Klingeman, J. A. Klappenbach, L. Wu, M. F. Romine, J. M. Tiedje, K. H. Nealson, J. K. Fredrickson, and J. Zhou.** 2005. Global transcriptome analysis of *Shewanella oneidensis* MR-1 exposed to different terminal electron acceptors. *J Bacteriol* **187**:7138-45.
12. **Beliaev, A. S., and D. A. Saffarini.** 1998. *Shewanella putrefaciens* *mtrB* encodes an outer membrane protein required for Fe(III) and Mn(IV) reduction. *J Bacteriol* **180**:6292-7.
13. **Beliaev, A. S., D. A. Saffarini, J. L. McLaughlin, and D. Hunnicutt.** 2001. MtrC, an outer membrane decahaem c cytochrome required for metal reduction in *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Mol Microbiol* **39**:722-30.
14. **Berne, C., D. T. Kysela, and Y. V. Brun.** 2010. A bacterial extracellular DNA inhibits settling of motile progeny cells within a biofilm. *Mol Microbiol*.
15. **Bertani, G.** 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62**:293-300.
16. **Blattner, F. R., G. Plunkett, III, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao.** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**:1453-1462.
17. **Blokesch, M., and G. K. Schoolnik.** 2008. The extracellular nuclease Dns and its role in natural transformation of *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **190**:7232-40.
18. **Bockelmann, U., A. Janke, R. Kuhn, T. R. Neu, J. Wecke, J. R. Lawrence, and U. Szewzyk.** 2006. Bacterial extracellular DNA forming a defined network-like structure. *FEMS Microbiol Lett* **262**:31-8.

19. **Bodenmiller, D., E. Toh, and Y. V. Brun.** 2004. Development of surface adhesion in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **186**:1438-47.
20. **Boles, B. R., and A. R. Horswill.** 2008. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog* **4**:e1000052.
21. **Botsford, J. L., and J. G. Harman.** 1992. Cyclic-Amp in Prokaryotes. *Microbiol Review* **56**:100-122.
22. **Boukhalfa, H., G. A. Icopini, S. D. Reilly, and M. P. Neu.** 2007. Plutonium(IV) reduction by the metal-reducing bacteria *Geobacter metallireducens* GS15 and *Shewanella oneidensis* MR1. *Appl Environ Microbiol* **73**:5897-5903.
23. **Boyd, A., and A. M. Chakrabarty.** 1994. Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **60**:2355-9.
24. **Branda, S. S., F. Chu, D. B. Kearns, R. Losick, and R. Kolter.** 2006. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Mol Microbiol* **59**:1229-38.
25. **Branda, S. S., A. Vik, L. Friedman, and R. Kolter.** 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology* **13**:20-26.
26. **Brettar, I., E. R. Moore, and M. G. Hofle.** 2001. Phylogeny and abundance of novel denitrifying bacteria isolated from the water column of the Central Baltic Sea. *Microb Ecol* **42**:295-305.
27. **Brown, R. N., M. F. Romine, A. A. Schepmoes, R. D. Smith, and M. S. Lipton.** 2010. Mapping the subcellular proteome of *Shewanella oneidensis* MR-1 using sarkosyl-based fractionation and LC-MS/MS protein identification. *J Proteome Res* **9**:4454-63.
28. **Brunskill, E. W., and K. W. Bayles.** 1996. Identification of LytSR-regulated genes from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **178**:5810-2.
29. **Bubendorfer, S.** 2010. Die Funktion von Flagelle und Chemotaxis in der Biofilmbildung. Master-Arbeit.
30. **Burton, B., and D. Dubnau.** 2010. Membrane-associated DNA transport machines. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**:a000406.
31. **Caccavo, F., R. P. Blakemore, and D. R. Lovley.** 1992. A hydrogen-oxidizing, Fe(III)-reducing microorganism from the Great Bay Estuary, New-Hampshire. *Appl Environ Microbiol* **58**:3211-3216.
32. **Canchaya, C., C. Proux, G. Fournous, A. Bruttin, and H. Brussow.** 2003. Prophage genomics. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**:238-76, table of contents.
33. **Cao, B., L. Shi, R. N. Brown, Y. Xiong, J. K. Fredrickson, M. F. Romine, M. J. Marshall, M. S. Lipton, and H. Beyenal.** 2011. Extracellular polymeric substances from *Shewanella* sp. HRCR-1 biofilms: characterization by infrared spectroscopy and proteomics. *Environ Microbiol*.
34. **Carrolo, M., M. J. Frias, F. R. Pinto, J. Melo-Cristino, and M. Ramirez.** 2010. Prophage spontaneous activation promotes DNA release enhancing biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One* **5**:e15678.
35. **Catlin, B. W.** 1956. Extracellular deoxyribonucleic acid of bacteria and a deoxyribonuclease inhibitor. *Science* **124**:441-2.
36. **Chen, I., P. J. Christie, and D. Dubnau.** 2005. The ins and outs of DNA transfer in bacteria. *Science* **310**:1456-1460.
37. **Chen, Y., I. Golding, S. Sawai, L. Guo, and E. C. Cox.** 2005. Population fitness and the regulation of *Escherichia coli* genes by bacterial viruses. *PLoS Biol* **3**:e229.
38. **Choi, K. H., J. B. Gaynor, K. G. White, C. Lopez, C. M. Bosio, R. R. Karkhoff-Schweizer, and H. P. Schweizer.** 2005. A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nature Methods* **2**:443-8.
39. **Choy, W.-K., L. Zhou, C. K.-C. Syn, L.-H. Zhang, and S. Swarup.** 2004. MorA defines a new class of regulators affecting flagellar development and biofilm formation in diverse *Pseudomonas* species. *J Bacteriol* **186**:7221-7228.
40. **Costerton, J. W.** 1995. Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol* **15**:137-40.
41. **Costerton, J. W., G. G. Geesey, and K. J. Cheng.** 1978. How bacteria stick. *Sci Am* **238**:86-95.
42. **Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, and H. M. Lappin-Scott.** 1995. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49**:711-45.

43. **Cruz-Garcia, C., A. E. Murray, J. A. Klappenbach, V. Stewart, and J. M. Tiedje.** 2007. Respiratory nitrate ammonification by *Shewanella oneidensis* MR-1. *J Bacteriol* **189**:656-662.
44. **Danhorn, T., M. Hentzer, M. Givskov, M. R. Parsek, and C. Fuqua.** 2004. Phosphorus limitation enhances biofilm formation of the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* through the PhoR-PhoB regulatory system. *J Bacteriol* **186**:4492-501.
45. **Darwin, A., P. Tormay, L. Page, L. Griffiths, and J. Cole.** 1993. Identification of the formate dehydrogenases and genetic determinants of formate-dependent nitrite reduction by *Escherichia coli* K12. *J Gen Microbiol* **139**:1829-40.
46. **Davey, M. E., and A. O'Toole G.** 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**:847-67.
47. **Davies, D. G., and C. N. Marques.** 2009. A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J Bacteriol* **191**:1393-403.
48. **De Vriendt, K., S. Theunissen, W. Carpentier, L. De Smet, B. Devreese, and J. Van Beeumen.** 2005. Proteomics of *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilm reveals differentially expressed proteins, including AggA and RibB. *Proteomics* **5**:1308-16.
49. **De Windt, W., H. Gao, W. Kromer, P. Van Damme, J. Dick, J. Mast, N. Boon, J. Zhou, and W. Verstraete.** 2006. AggA is required for aggregation and increased biofilm formation of a hyper-aggregating mutant of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Microbiol* **152**:721-9.
50. **Delong, E. F., D. G. Franks, and A. A. Yayanos.** 1997. Evolutionary relationships of cultivated psychrophilic and barophilic deep-sea bacteria. *Appl Environ Microbiol* **63**:2105-8.
51. **Derby, H., and B. Hammer.** 1931. Bacteriology of butter. IV. Bacteriological studies of surface taint butter. IOWA Agricultural Experiment Station Research Bulletin **145**:387-416.
52. **Dillard, J. P., and H. S. Seifert.** 2001. A variable genetic island specific for *Neisseria gonorrhoeae* is involved in providing DNA for natural transformation and is found more often in disseminated infection isolates. *Mol Microbiol* **41**:263-77.
53. **Dominiak, D. M., J. L. Nielsen, and P. H. Nielsen.** 2010. Extracellular DNA is abundant and important for microcolony strength in mixed microbial biofilms. *Environ Microbiol*.
54. **Domka, J., J. Lee, T. Bansal, and T. K. Wood.** 2007. Temporal gene-expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Environ Microbiol* **9**:332-46.
55. **Dow, J. M., L. Crossman, K. Findlay, Y. Q. He, J. X. Feng, and J. L. Tang.** 2003. Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**:10995-1000.
56. **Drenkard, E.** 2003. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes & Infection* **5**:1213-9.
57. **Driscoll, M. E., M. F. Romine, F. S. Juhn, M. H. Serres, L. A. McCue, A. S. Beliaev, J. K. Fredrickson, and T. S. Gardner.** 2007. Identification of diverse carbon utilization pathways in *Shewanella oneidensis* MR-1 via expression profiling. *Genome Inform* **18**:287-98.
58. **El-Naggar, M. Y., G. Wanger, K. M. Leung, T. D. Yuzvinsky, G. Southam, J. Yang, W. M. Lau, K. H. Neilson, and Y. A. Gorby.** 2010. Electrical transport along bacterial nanowires from *Shewanella oneidensis* MR-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:18127-31.
59. **Finkel, S. E., and R. Kolter.** 2001. DNA as a nutrient: novel role for bacterial competence gene homologs. *J Bacteriol* **183**:6288-93.
60. **Flemming, H. C., T. R. Neu, and D. J. Wozniak.** 2007. The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J Bacteriol* **189**:7945-7.
61. **Flemming, H. C., and J. Wingender.** 2010. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* **8**:623-33.
62. **Folsom, J. P., L. Richards, B. Pitts, F. Roe, G. D. Ehrlich, A. Parker, A. Mazurie, and P. S. Stewart.** 2010. Physiology of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms as revealed by transcriptome analysis. *BMC Microbiol* **10**:294.
63. **Fredrickson, J. K., M. F. Romine, A. S. Beliaev, J. M. Auchtung, M. E. Driscoll, T. S. Gardner, K. H. Neilson, A. L. Osterman, G. Pinchuk, J. L. Reed, D. A. Rodionov, J. L. Rodrigues, D. A. Saffarini, M. H. Serres, A. M. Spormann, I. B.**

- Zhulin, and J. M. Tiedje. 2008. Towards environmental systems biology of *Shewanella*. *Nat Rev Microbiol* **6**:592-603.
64. Fredrickson, J. K., J. M. Zachara, D. W. Kennedy, H. L. Dong, T. C. Onstott, N. W. Hinman, and S. M. Li. 1998. Biogenic iron mineralization accompanying the dissimilatory reduction of hydrous ferric oxide by a groundwater bacterium. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **62**:3239-3257.
65. Friedman, L., and R. Kolter. 2004. Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *J Bacteriol* **186**:4457-65.
66. Gao, H., X. Wang, Z. K. Yang, T. Palzkill, and J. Zhou. 2008. Probing regulon of ArcA in *Shewanella oneidensis* MR-1 by integrated genomic analyses. *BMC Genomics* **9**:42.
67. Gao, H., Z. K. Yang, S. Barua, S. B. Reed, M. F. Romine, K. H. Nealson, J. K. Fredrickson, J. M. Tiedje, and J. Zhou. 2009. Reduction of nitrate in *Shewanella oneidensis* depends on atypical NAP and NRF systems with NapB as a preferred electron transport protein from CymA to NapA. *Isme J* **3**:966-76.
68. Garcia-Contreras, R., X. S. Zhang, Y. Kim, and T. K. Wood. 2008. Protein translation and cell death: the role of rare tRNAs in biofilm formation and in activating dormant phage killer genes. *PLoS One* **3**:e2394.
69. Gerstel, U., C. Park, and U. Romling. 2003. Complex regulation of *csfD* promoter activity by global regulatory proteins. *Mol Microbiol* **49**:639-54.
70. Gerstel, U., and U. Romling. 2003. The *csfD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella typhimurium*. *Res Microbiol* **154**:659-667.
71. Gerstel, U., and U. Romling. 2001. Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate *agfD* promoter and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella typhimurium*. *Environ Microbiol* **3**:638-648.
72. Gescher, J. S., C. D. Cordova, and A. M. Spormann. 2008. Dissimilatory iron reduction in *Escherichia coli*: identification of CymA of *Shewanella oneidensis* and NapC of *E. coli* as ferric reductases. *Mol Microbiol* **68**:706-719.
73. Ghosh, D., K. Roy, K. E. Williamson, S. Srinivasiah, K. E. Wommack, and M. Radosevich. 2009. Acyl-homoserine lactones can induce virus production in lysogenic bacteria: an alternative paradigm for prophage induction. *Appl Environ Microbiol* **75**:7142-52.
74. Gilbert, P., D. J. Evans, E. Evans, I. G. Duguid, and M. R. Brown. 1991. Surface characteristics and adhesion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Appl Bacteriol* **71**:72-7.
75. Gjermansen, M., P. Ragas, C. Sternberg, S. Molin, and T. Tolker-Nielsen. 2005. Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Environ Microbiol* **7**:894-906.
76. Godeke, J., K. Paul, J. Lassak, and K. M. Thormann. 2010. Phage-induced lysis enhances biofilm formation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Isme J*.
77. Goller, C. C., and T. Romeo. 2008. Environmental influences on biofilm development. *Curr Top Microbiol Immunol* **322**:37-66.
78. Gorby, Y., J. McLean, A. Korenevsky, K. Rosso, M. Y. El-Naggar, and T. J. Beveridge. 2008. Redox-reactive membrane vesicles produced by *Shewanella*. *Geobiol* **6**:232-41.
79. Gorby, Y. A., S. Yanina, J. S. McLean, K. M. Rosso, D. Moyles, A. Dohnalkova, T. J. Beveridge, I. S. Chang, B. H. Kim, K. S. Kim, D. E. Culley, S. B. Reed, M. F. Romine, D. A. Saffarini, E. A. Hill, L. Shi, D. A. Elias, D. W. Kennedy, G. Pinchuk, K. Watanabe, S. Ishii, B. Logan, K. H. Nealson, and J. K. Fredrickson. 2006. Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:11358-63.
80. Galnick, J. A., C. T. Brown, and D. K. Newman. 2005. Anaerobic regulation by an atypical Arc system in *Shewanella oneidensis*. *Mol Microbiol* **56**:1347-1357.
81. Galnick, J. A., H. Vali, D. P. Lies, and D. K. Newman. 2006. Extracellular respiration of dimethyl sulfoxide by *Shewanella oneidensis* strain MR-1. *PNAS* **103**:4669-4674.

82. **Grande, R., M. Di Giulio, L. J. Bessa, E. Di Campli, M. Baffoni, S. Guarnieri, and L. Cellini.** 2011. Extracellular DNA in *Helicobacter pylori* biofilm: a backstairs rumour. *J Appl Microbiol* **110**:490-8.
83. **Green, D. R., and J. C. Reed.** 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**:1309-12.
84. **Guiton, P. S., C. S. Hung, K. A. Kline, R. Roth, A. L. Kau, E. Hayes, J. Heuser, K. W. Dodson, M. G. Caparon, and S. J. Hultgren.** 2009. Contribution of autolysin and Sortase a during *Enterococcus faecalis* DNA-dependent biofilm development. *Infect Immun* **77**:3626-38.
85. **Haeussler, S.** 2004. Biofilm formation by the small colony variant phenotype of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* **6**:546-51.
86. **Hall-Stoodley, L., and P. Stoodley.** 2005. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol* **13**:7-10.
87. **Hamilton, H. L., K. J. Schwartz, and J. P. Dillard.** 2001. Insertion-duplication mutagenesis of *Neisseria*: use in characterization of DNA transfer genes in the gonococcal genetic island. *J Bacteriol* **183**:4718-26.
88. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**:557-580.
89. **Harmsen, M., M. Lappann, S. Knochel, and S. Molin.** 2010. Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **76**:2271-9.
90. **Hau, H. H., and J. A. Gralnick.** 2007. Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*. *Annu Rev Microbiol* **61**:237-58.
91. **Heeb, S., Y. Itoh, T. Nishijyo, U. Schnider, C. Keel, J. Wade, U. Walsh, F. O'Gara, and D. Haas.** 2000. Small, stable shuttle vectors based on the minimal pVS1 replicon for use in Gram-negative, plant-associated bacteria. *Mol Plant-Microbe Interactions* **13**:232-237.
92. **Heidelberg, J. F., I. T. Paulsen, K. E. Nelson, E. J. Gaidos, W. C. Nelson, T. D. Read, J. A. Eisen, R. Seshadri, N. Ward, B. Methe, R. A. Clayton, T. Meyer, A. Tsapin, J. Scott, M. Beanan, L. Brinkac, S. Daugherty, R. T. DeBoy, R. J. Dodson, A. S. Durkin, D. H. Haft, J. F. Kolonay, R. Madupu, J. D. Peterson, L. A. Umayam, O. White, A. M. Wolf, J. Vamathevan, J. Weidman, M. Impraim, K. Lee, K. Berry, C. Lee, J. Mueller, H. Khouri, J. Gill, T. R. Utterback, L. A. McDonald, T. V. Feldblyum, H. O. Smith, J. C. Venter, K. H. Nealson, and C. M. Fraser.** 2002. Genome sequence of the dissimilatory metal ion-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. *Nat Biotechnol* **20**:1118-23.
93. **Heilmann, C., M. Hussain, G. Peters, and F. Gotz.** 1997. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol Microbiol* **24**:1013-24.
94. **Hendrix, R. W.** 1983. *Lambda II*. Cold Spring Harb Lab Press:694 pp.
95. **Hengge-Aronis, R.** 2002. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**:373-95, table of contents.
96. **Hentzer, M., L. Eberl, and M. Givskov.** 2005. Transcriptome analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: anaerobic respiration and iron limitation. *Biofilms* **2**:37-61.
97. **Heun, M.** 2010. Charakterisierung von zwei putativen extrazellulären Endonukleasen in *Shewanella oneidensis* MR-1 (Ivorläufiger Titel). Master-Arbeit.
98. **Hickman, J. W., D. F. Tifrea, and C. S. Harwood.** 2005. A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *PNAS* **102**:14422-14427.
99. **Hindre, T., H. Bruggemann, C. Buchrieser, and Y. Hechard.** 2008. Transcriptional profiling of *Legionella pneumophila* biofilm cells and the influence of iron on biofilm formation. *Microbiol* **154**:30-41.
100. **Hinsa, S. M., M. Espinosa-Urgel, J. L. Ramos, and G. A. O'Toole.** 2003. Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Mol Microbiol* **49**:905-18.

101. **Hochberg, Y.** 1988. A sharper Bonferroni procedure for multiple tests of significance. *Biometrika* **75**:800-802.
102. **Hoffman, L. R., D. A. D'Argenio, M. J. MacCoss, Z. Zhang, R. A. Jones, and S. I. Miller.** 2005. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* **436**:1171-1175.
103. **Hofle, M. G., and I. Brettar.** 1996. Genotyping of heterotrophic bacteria from the central baltic sea by use of low-molecular-weight RNA profiles. *Appl Environ Microbiol* **62**:1383-90.
104. **Holt, H. M., B. Gahrn-Hansen, and B. Bruun.** 2005. *Shewanella algae* and *Shewanella putrefaciens*: clinical and microbiological characteristics. *Clin Microbiol Infect* **11**:347-52.
105. **Holtje, J. V., and E. I. Tuomanen.** 1991. The murein hydrolases of *Escherichia coli*: properties, functions and impact on the course of infections in vivo. *J Gen Microbiol* **137**:441-54.
106. **Hong, S. H., X. Wang, and T. K. Wood.** 2010. Controlling biofilm formation, prophage excision and cell death by rewiring global regulator H-NS of *Escherichia coli*. *Microbial Biotech* **3**:344-356.
107. **Houot, L., and P. I. Watnick.** 2008. A novel role for enzyme I of the *Vibrio cholerae* phosphoenolpyruvate phosphotransferase system in regulation of growth in a biofilm. *J Bacteriol* **190**:311-20.
108. **Hughes, K. T., and K. Mathee.** 1998. The anti-sigma factors. *Annu Rev Microbiol* **52**:231-86.
109. **Hung, D. T., J. Zhu, D. Sturtevant, and J. J. Mekalanos.** 2006. Bile acids stimulate biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* **59**:193-201.
110. **Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama.** 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**:23-8.
111. **Iuchi, S., Z. Matsuda, T. Fujiwara, and E. C. Lin.** 1990. The *arcB* gene of *Escherichia coli* encodes a sensor-regulator protein for anaerobic repression of the *arc* modulon. *Mol Microbiol* **4**:715-27.
112. **Izano, E. A., M. A. Amarante, W. B. Kher, and J. B. Kaplan.** 2008. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl Environ Microbiol* **74**:470-6.
113. **Izano, E. A., I. Sadovskaya, H. Wang, E. Vinogradov, C. Rangunath, N. Ramasubbu, S. Jabbouri, M. B. Perry, and J. B. Kaplan.** 2008. Poly-N-acetylglucosamine mediates biofilm formation and detergent resistance in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Microb Pathog* **44**:52-60.
114. **Jagadeesan, S., P. Mann, C. W. Schink, and P. I. Higgs.** 2009. A novel "four-component" two-component signal transduction mechanism regulates developmental progression in *Myxococcus xanthus*. *J Biol Chem* **284**:21435-45.
115. **Janakiraman, R. S., and Y. V. Brun.** 1999. Cell cycle control of a holdfast attachment gene in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **181**:1118-25.
116. **Jenal, U., and J. Malone.** 2006. Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu Rev Genet* **40**:385-407.
117. **Jurcisek, J. A., and L. O. Bakaletz.** 2007. Biofilms formed by nontypeable *Haemophilus influenzae* in vivo contain both double-stranded DNA and type IV pilin protein. *J Bacteriol* **189**:3868-75.
118. **Kaplan, J. B., C. Rangunath, N. Ramasubbu, and D. H. Fine.** 2003. Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous beta-hexosaminidase activity. *J Bacteriol* **185**:4693-8.
119. **Karatan, E., and P. Watnick.** 2009. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**:310-47.
120. **Kierek, K., and P. I. Watnick.** 2003. Environmental determinants of *Vibrio cholerae* biofilm development. *Appl Environ Microbiol* **69**:5079-88.
121. **Kiley, P. J., and H. Beinert.** 1998. Oxygen sensing by the global regulator, FNR: the role of the iron-sulfur cluster. *Fems Microbiol Reviews* **22**:341-352.
122. **Kirkpatrick, C. L., and P. H. Viollier.** 2010. Cell dispersal in biofilms: an extracellular DNA masks nature's strongest glue. *Mol Microbiol*.

123. **Kirov, S. M., M. Castrisios, and J. G. Shaw.** 1939. *Aeromonas* flagella (polar and lateral) are enterocyte adhesins that contribute to biofilm formation on surfaces. *Infection & Immunity* **72**:1939-45.
124. **Klausen, M., M. Gjermansen, J. U. Kreft, and T. Tolker-Nielsen.** 2006. Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilms. *FEMS Microbiol Lett* **261**:1-11.
125. **Klausen, M., A. Heydorn, P. Ragas, L. Lambertsen, A. Aaes-Jorgensen, S. Molin, and T. Tolker-Nielsen.** 2003. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol* **48**:1511-24.
126. **Klipper-Aurbach, Y., M. Wasserman, N. Braunspegel-Weintrob, D. Borstein, S. Peleg, S. Assa, M. Karp, Y. Benjamini, Y. Hochberg, and Z. Laron.** 1995. Mathematical formulae for the prediction of the residual beta cell function during the first two years of disease in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. *Med Hypotheses* **45**:486-90.
127. **Kuchma, S. L., K. M. Brothers, J. H. Merritt, N. T. Liberati, F. M. Ausubel, and G. A. O'Toole.** 2007. BifA, a cyclic-Di-GMP phosphodiesterase, inversely regulates biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriol* **189**:8165-78.
128. **Kumar, C. G., and S. K. Anand.** 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int J of Food Microbiol* **42**:9-27.
129. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5.
130. **Lambertsen, L., C. Sternberg, and S. Molin.** 2004. Mini-Tn7 transposons for site-specific tagging of bacteria with fluorescent proteins. *Enviro Microbiol* **6**:726-32.
131. **Lappann, M., H. Claus, T. van Alen, M. Harmsen, J. Elias, S. Molin, and U. Vogel.** 2010. A dual role of extracellular DNA during biofilm formation of *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **75**:1355-71.
132. **Lassak, J.** 2010. Evolution von Zwei-Komponenten-Systemen in *Shewanella oneidensis* MR-1 Dissertation.
133. **Lassak, J., A. L. Henche, L. Binnenkade, and K. M. Thormann.** 2010. ArcS, the cognate sensor kinase in an atypical Arc system of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl Environ Microbiol* **76**:3263-74.
134. **Leonardo, M. R., D. P. Moser, E. Barbieri, C. A. Brantner, B. J. MacGregor, B. J. Paster, E. Stackebrandt, and K. H. Nealson.** 1999. *Shewanella pealeana* sp. nov., a member of the microbial community associated with the accessory nidamental gland of the squid *Loligo pealei*. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 4**:1341-51.
135. **Lies, D. P., M. E. Hernandez, A. Kappler, R. E. Mielke, J. A. Gralnick, and D. K. Newman.** 2005. *Shewanella oneidensis* MR-1 uses overlapping pathways for iron reduction at a distance and by direct contact under conditions relevant for biofilms. *Appl Environ Microbiol* **71**:4414-26.
136. **Little, J. W.** 2005. Lysogeny, prophage induction, and lysogenic conversion. In M.K. Waldor, D.I. Friedman, and S. Adhya (ed.), *Phage*. ASM press, Washington, DC:37-54.
137. **Liu, X., C. Ng, and T. Ferenci.** 2000. Global adaptations resulting from high population densities in *Escherichia coli* cultures. *J Bacteriol* **182**:4158-64.
138. **Long, H. F., and B. W. Hammer.** 1941. Classification of organisms important in dairy products. III. *Pseudomonas putrefaciens*. IOWA Agricultural Experiment Station Research Bulletin **285**:176-95.
139. **Lorenz, M. G., D. Gerjets, and W. Wackernagel.** 1991. Release of transforming plasmid and chromosomal DNA from two cultured soil bacteria. *Arch Microbiol* **156**:319-26.
140. **Lovley, D. R.** 2003. Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation. *Nat Rev Microbiol* **1**:35-44.
141. **Lovley, D. R., D. E. Holmes, and K. P. Nevin.** 2004. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Adv Microb Physiol* **49**:219-86.
142. **Lower, B. H., L. Shi, R. Yongsunthon, T. C. Droubay, D. E. McCready, and S. K. Lower.** 2007. Specific bonds between an iron oxide surface and outer membrane cytochromes MtrC and OmcA from *Shewanella oneidensis* MR-1. *J Bacteriol* **189**:4944-52.

143. **Ma, L., M. Conover, H. Lu, M. R. Parsek, K. Bayles, and D. J. Wozniak.** 2009. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathog* **5**:e1000354.
144. **MacDonell, M. T., and R. R. Colwell.** 1985. Phylogeny of the *Vibrionaceae*, and Recommendation for 2 New Genera, *Listonella* and *Shewanella*. *Syst Appl Microbiol* **6**:171-182.
145. **Mah, T. F., and G. A. O'Toole.** 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*. **9**:34-9.
146. **Mai-Prochnow, A., F. Evans, D. Dalisay-Saludes, S. Stelzer, S. Egan, S. James, J. S. Webb, and S. Kjelleberg.** 2004. Biofilm development and cell death in the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Appl Environ Microbiol* **70**:3232-8.
147. **Maier, T. M., and C. R. Myers.** 2001. Isolation and characterization of a *Shewanella putrefaciens* MR-1 electron transport regulator *etrA* mutant: reassessment of the role of EtrA. *J Bacteriol* **183**:4918-26.
148. **Makemson, J. C., N. R. Fulayfil, W. Landry, L. M. Van Ert, C. F. Wimpee, E. A. Widder, and J. F. Case.** 1997. *Shewanella woodyi* sp. nov., an exclusively respiratory luminous bacterium isolated from the Alboran Sea. *Int J Syst Bacteriol* **47**:1034-9.
149. **Mann, E. E., K. C. Rice, B. R. Boles, J. L. Endres, D. Ranjit, L. Chandramohan, L. H. Tsang, M. S. Smeltzer, A. R. Horswill, and K. W. Bayles.** 2009. Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS One* **4**:e5822.
150. **Marsh, P. D., and D. J. Bradshaw.** 1995. Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol* **15**:169-75.
151. **McClaine, J. W., and R. M. Ford.** 2002. Reversal of flagellar rotation is important in initial attachment of *Escherichia coli* to glass in a dynamic system with high- and low-ionic-strength buffers. *Appl Environ Microbiol* **68**:1280-9.
152. **McFall-Ngai, M.** 2008. Host-microbe symbiosis: the squid-*Vibrio* association-a naturally occurring, experimental model of animal/bacterial partnerships. *Adv Exp Med Biol* **635**:102-12.
153. **McLean, J. S., P. D. Majors, C. L. Reardon, C. L. Bilskis, S. B. Reed, M. F. Romine, and J. K. Fredrickson.** 2008. Investigations of structure and metabolism within *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms. *J Microbiol Methods* **74**:47-56.
154. **McLean, J. S., G. E. Pinchuk, O. V. Geydebrekht, C. L. Bilskis, B. A. Zakrajsek, E. A. Hill, D. A. Saffarini, M. F. Romine, Y. A. Gorby, J. K. Fredrickson, and A. S. Beliaev.** 2008. Oxygen-dependent autoaggregation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Environ Microbiol* **10**:1861-76.
155. **Meyer, T. E., A. I. Tsapin, I. Vandenberghe, L. de Smet, D. Frishman, K. H. Nealson, M. A. Cusanovich, and J. J. van Beeumen.** 2004. Identification of 42 possible cytochrome C genes in the *Shewanella oneidensis* genome and characterization of six soluble cytochromes. *J Integrat Biol* **8**:57-77.
156. **Mikkelsen, H., N. J. Bond, M. E. Skindersoe, M. Givskov, K. S. Lilley, and M. Welch.** 2009. Biofilms and type III secretion are not mutually exclusive in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol* **155**:687-98.
157. **Miller, J.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY.
158. **Miller, V. L., and M. J. J.** 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires toxR. *J Bacteriol* **170**:2575 - 2583.
159. **Molin, S., and T. Tolker-Nielsen.** 2003. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr Opin Biol* **14**:255-61.
160. **Monds, R. D., P. D. Newell, R. H. Gross, and G. A. O'Toole.** 2007. Phosphate-dependent modulation of c-di-GMP levels regulates *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 biofilm formation by controlling secretion of the adhesin LapA. *Mol Microbiol* **63**:656-79.
161. **Monds, R. D., and G. A. O'Toole.** 2009. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends Microbiol* **17**:73-87.

162. **Monds, R. D., M. W. Silby, and H. K. Mahanty.** 2001. Expression of the Pho regulon negatively regulates biofilm formation by *Pseudomonas aureofaciens* PA147-2. *Mol Microbiol* **42**:415-26.
163. **Moorthy, S., and P. I. Watnick.** 2004. Genetic evidence that the *Vibrio cholerae* monolayer is a distinct stage in biofilm development. *Mol Microbiol* **52**:573-87.
164. **Moorthy, S., and P. I. Watnick.** 2005. Identification of novel stage-specific genetic requirements through whole genome transcription profiling of *Vibrio cholerae* biofilm development. *Mol Microbiol* **57**:1623-35.
165. **Morris, C. E., J. Monier, and M. Jacques.** 1997. Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **63**:1570-6.
166. **Mulcahy, H., L. Charron-Mazenod, and S. Lewenza.** 2008. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathog* **4**:e1000213.
167. **Mulcahy, H., L. Charron-Mazenod, and S. Lewenza.** 2010. *Pseudomonas aeruginosa* produces an extracellular deoxyribonuclease that is required for utilization of DNA as a nutrient source. *Environ Microbiol* **12**:1621-9.
168. **Muto, Y., and S. Goto.** 1986. Transformation by extracellular DNA produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Immunol* **30**:621-8.
169. **Myers, C. R., and J. M. Myers.** 1997. Cloning and sequence of *cymA*, a gene encoding a tetraheme cytochrome c required for reduction of iron(III), fumarate, and nitrate by *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J Bacteriol* **179**:1143-52.
170. **Myers, C. R., and J. M. Myers.** 1994. Ferric iron reduction-linked growth yields of *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J App Bacteriol* **76**:253-8.
171. **Myers, C. R., and J. M. Myers.** 1997. Replication of plasmids with the p15A origin in *Shewanella putrefaciens* MR-1. *L Appl Microbiol* **24**:221-5.
172. **Myers, C. R., and K. H. Nealson.** 1988. Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor. *Science* **240**:1319-21.
173. **Myers, J. M., and C. R. Myers.** 2001. Role for outer membrane cytochromes OmcA and OmcB of *Shewanella putrefaciens* MR-1 in reduction of manganese dioxide. *Appl Environ Microbiol* **67**:260-269.
174. **Myers, J. M., and C. R. Myers.** 2000. Role of the tetraheme cytochrome CymA in anaerobic electron transport in cells of *Shewanella putrefaciens* MR-1 with normal levels of menaquinone. *J Bacteriol* **182**:67-75.
175. **Neal, A. L., T. L. Bank, M. F. Hochella, Jr., K. M. Rosso, and M. B. Djamgoz.** 2005. Cell adhesion of *Shewanella oniedensis* MR-1 to iron oxide minerals: Effect of different single crystal faces. *Geochemical Transactions* **6**:77-84.
176. **Nealson, K. H., A. Belz, and B. McKee.** 2002. Breathing metals as a way of life: geobiology in action. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**:215-22.
177. **Nealson, K. H., C. R. Myers, and B. B. Wimpsee.** 1991. Isolation and identification of manganese-reducing bacteria and estimates of microbial Mn(IV)-reducing potential in the Black-Sea. *Deep-Sea Research Part a-Oceanographic Research Papers* **38**:S907-S920.
178. **Niemeyer, J., and F. Gessler.** 2002. Determination of free DNA in soils. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **165**:121-124.
179. **Nogi, Y., C. Kato, and K. Horikoshi.** 1998. Taxonomic studies of deep-sea barophilic *Shewanella* strains and description of *Shewanella violacea* sp. nov. *Arch Microbiol* **170**:331-8.
180. **O'Toole, G.** 2008. How *Pseudomonas aeruginosa* regulates surface behaviors. *Microbe* **3**:65-71.
181. **O'Toole, G., H. B. Kaplan, and R. Kolter.** 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* **54**:49-79.
182. **O'Toole, G. A., and R. Kolter.** 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* **30**:295-304.
183. **O'Toole, G. A., and R. Kolter.** 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* **28**:449-61.

184. **Obuekwe, C. O., and D. W. Westlake.** 1982. Effects of medium composition on cell pigmentation, cytochrome content, and ferric iron reduction in a *Pseudomonas sp.* isolated from crude oil. *Can J Microbiol* **28**:989-92.
185. **Palmer, J., S. Flint, and J. Brooks.** 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J Ind Microbiol Biotechnol* **34**:577-88.
186. **Palmgren, J., and P. Kirkinen.** 1996. Venous circulation in the maternal lower limb: a Doppler study with the Valsalva maneuver. *Ultrasound Obstet Gynecol* **8**:93-7.
187. **Parise, G., M. Mishra, Y. Itoh, T. Romeo, and R. Deora.** 2007. Role of a putative polysaccharide locus in *Bordetella* biofilm development. *J Bacteriol* **189**:750-60.
188. **Park, T., D. K. Struck, J. F. Deaton, and R. Young.** 2006. Topological dynamics of holins in programmed bacterial lysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:19713-8.
189. **Paul, K.** 2009. Die Rolle der putativen extrazellulären Endonukleasen SO\_1066 und SO\_1844 in der Biofilmbildung von *Shewanella oneidensis* MR-1. Bachelor-Arbeit.
190. **Paulick, A., A. Koerdt, J. Lassak, S. Huntley, I. Wilms, F. Narberhaus, and K. M. Thormann.** 2009. Two different stator systems drive a single polar flagellum in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Mol Microbiol* **71**:836-50.
191. **Pinchuk, G. E., C. Ammons, D. E. Culley, S. M. Li, J. S. McLean, M. F. Romine, K. H. Nealson, J. K. Fredrickson, and A. S. Beliaev.** 2008. Utilization of DNA as a sole source of phosphorus, carbon, and energy by *Shewanella* spp.: ecological and physiological implications for dissimilatory metal reduction. *Appl Environ Microbiol* **74**:1198-208.
192. **Pospiech, A., and B. Neumann.** 1995. A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. *Trends Genet* **11**:217-8.
193. **Pratt, L. A., and R. Kolter.** 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* **30**:285-93.
194. **Prigent-Combaret, C., G. Prensier, T. T. Le Thi, O. Vidal, P. Lejeune, and C. Dorel.** 2000. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environ Microbiol* **2**:450-64.
195. **Ptashne, M., and N. Hopkins.** 1968. The operators controlled by the lambda phage repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **60**:1282-7.
196. **Purevdorj-Gage, B., W. J. Costerton, and P. Stoodley.** 2005. Phenotypic differentiation and seeding dispersal in non-mucoid and mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbiol* **151**:1569-76.
197. **Purevdorj, B., J. W. Costerton, and P. Stoodley.** 2002. Influence of hydrodynamics and cell signaling on the structure and behavior of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* **68**:4457-64.
198. **Puyet, A., B. Greenberg, and S. A. Lacks.** 1990. Genetic and structural characterization of *endA*. A membrane-bound nuclease required for transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *J Mol Biol* **213**:727-38.
199. **Qin, Z., Y. Ou, L. Yang, Y. Zhu, T. Tolker-Nielsen, S. Molin, and D. Qu.** 2007. Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiol* **153**:2083-92.
200. **Qiu, X., M. J. Daly, A. Vasilenko, M. V. Omelchenko, E. K. Gaidamakova, L. Wu, J. Zhou, G. W. Sundin, and J. M. Tiedje.** 2006. Transcriptome analysis applied to survival of *Shewanella oneidensis* MR-1 exposed to ionizing radiation. *J Bacteriol* **188**:1199-1204.
201. **Qiu, X., G. W. Sundin, L. Wu, J. Zhou, and J. M. Tiedje.** 2005. Comparative analysis of differentially expressed genes in *Shewanella oneidensis* MR-1 following exposure to UVC, UVB, and UVA radiation. *Journal of Bacteriology* **187**:3556-64.
202. **Rakshe, S., M. Leff, and A. M. Spormann.** 2011. Indirect Modulation of the Intracellular c-Di-GMP Level in *Shewanella oneidensis* MR-1 by MxdA. *Appl Environ Microbiol* **77**:2196-8.
203. **Reid, G. A., C. S. Miles, R. K. Moysey, K. L. Pankhurst, and S. K. Chapman.** 2000. Catalysis in fumarate reductase. *Biochim Biophys Acta* **1459**:310-5.
204. **Reisner, A., J. A. Haagenen, M. A. Schembri, E. L. Zechner, and S. Molin.** 2003. Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Mol Microbiol* **48**:933-46.

205. **Renelli, M., V. Matias, R. Y. Lo, and T. J. Beveridge.** 2004. DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiol* **150**:2161-9.
206. **Resch, A., B. Fehrenbacher, K. Eisele, M. Schaller, and F. Gotz.** 2005. Phage release from biofilm and planktonic *Staphylococcus aureus* cells. *FEMS Microbiol Lett* **252**:89-96.
207. **Rice, K. C., and K. W. Bayles.** 2008. Molecular control of bacterial death and lysis. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**:85-109.
208. **Rice, K. C., E. E. Mann, J. L. Endres, E. C. Weiss, J. E. Cassat, M. S. Smeltzer, and K. W. Bayles.** 2007. The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:8113-8.
209. **Rice, S. A., C. H. Tan, P. J. Mikkelsen, V. Kung, J. Woo, M. Tay, A. Hauser, D. McDougald, J. S. Webb, and S. Kjelleberg.** 2009. The biofilm life cycle and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* are dependent on a filamentous prophage. *Isme J* **3**:271-82.
210. **Rohwer, F., and R. Edwards.** 2002. The Phage Proteomic Tree: a genome-based taxonomy for phage. *J Bacteriol* **184**:4529-35.
211. **Ruby, E. G., and M. J. McFall-Ngai.** 1992. A squid that glows in the night: development of an animal-bacterial mutualism. *J Bacteriol* **174**:4865-70.
212. **Ryder, C., M. Byrd, and D. J. Wozniak.** 2007. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr Opin Microbiol* **10**:644-8.
213. **Saffarini, D. A., and K. H. Nealson.** 1993. Sequence and genetic characterization of *etrA*, an *fnr* analog that regulates anaerobic respiration in *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J Bacteriol* **175**:7938-44.
214. **Saffarini, D. A., R. Schultz, and A. Beliaev.** 2003. Involvement of cyclic AMP (cAMP) and cAMP receptor protein in anaerobic respiration of *Shewanella oneidensis*. *J Bacteriol* **185**:3668-71.
215. **Saito, T., M. R. Wormald, and R. J. Williams.** 1991. Some structural features of the iron-uptake regulation protein. *Eur J Biochem* **197**:29-38.
216. **Saltikov, C. W., A. Cifuentes, K. Venkateswaran, and D. K. Newman.** 2003. The ars detoxification system is advantageous but not required for As(V) respiration by the genetically tractable *Shewanella species* strain ANA-3. *Appl Environ Microbiol* **69**:2800-9.
217. **Sambrook, J., and D. W. Russell.** 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
218. **Sauer, K.** 2003. The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biology* **4**.
219. **Sauer, K., and A. K. Camper.** 2001. Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *J Bacteriol* **183**:6579-89.
220. **Sauer, K., M. C. Cullen, A. H. Rickard, L. A. Zeef, D. G. Davies, and P. Gilbert.** 2004. Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *J Bacteriol* **186**:7312-26.
221. **Saville, R. M., N. Dieckmann, and A. M. Spormann.** 2010. Spatiotemporal activity of the *mshA* gene system in *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms. *FEMS Microbiol Lett* **308**:76-83.
222. **Schooling, S. R., A. Hubley, and T. J. Beveridge.** 2009. Interactions of DNA with biofilm-derived membrane vesicles. *J Bacteriol* **191**:4097-102.
223. **Scott, J. H., and K. H. Nealson.** 1994. A biochemical study of the intermediary carbon metabolism of *Shewanella putrefaciens*. *J Bacteriol* **176**:3408-11.
224. **Serres, M. H., and M. Riley.** 2006. Genomic analysis of carbon source metabolism of *Shewanella oneidensis* MR-1: Predictions versus experiments. *Journal of Bacteriology* **188**:4601-4609.
225. **Shi, L., T. C. Squier, J. M. Zachara, and J. K. Fredrickson.** 2007. Respiration of metal (hydr)oxides by *Shewanella* and *Geobacter*: a key role for multihaem c-type cytochromes. *Mol Microbiol* **65**:12-20.
226. **Shockman, G. D., and J. F. Barrett.** 1983. Structure, function, and assembly of cell walls of gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* **37**:501-27.
227. **Simm, R., M. Morr, A. Kader, M. Nimtz, and U. Romling.** 2004. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol* **53**:1123-34.

228. **Simon, J.** 2002. Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification. *FEMS Microbiol Rev* **26**:285-309.
229. **Smith, T. F., and M. S. Waterman.** 1981. Identification of common molecular subsequences. *J Mol Biol* **147**:195-7.
230. **Southern, E. M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**:503-17.
231. **Southey-Pillig, C. J., D. G. Davies, and K. Sauer.** 2005. Characterization of temporal protein production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol* **187**:8114-8126.
232. **Spormann, A. M.** 2008. Physiology of microbes in biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* **322**:17-36.
233. **Stanley, N. R., R. A. Britton, A. D. Grossman, and B. A. Lazazzera.** 2003. Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarrays. *Journal of Bacteriology* **185**:1951-7.
234. **Stanley, N. R., and B. A. Lazazzera.** 2004. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol Microbiol* **52**:917-24.
235. **Steinberger, R. E., and P. A. Holden.** 2005. Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. *Appl Environ Microbiol* **71**:5404-10.
236. **Steinmoen, H., E. Knutsen, and L. S. Havarstein.** 2002. Induction of natural competence in *Streptococcus pneumoniae* triggers lysis and DNA release from a subfraction of the cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:7681-6.
237. **Stewart, P. S., and J. W. Costerton.** 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **358**:135-8.
238. **Stewart, V., Y. Lu, and A. J. Darwin.** 2002. Periplasmic nitrate reductase (NapABC enzyme) supports anaerobic respiration by *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **184**:1314-23.
239. **Sutherland, I. W.** 2001. The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology* **9**:222-7.
240. **Sutherland, I. W.** 2001. Exopolysaccharides in biofilms, flocs and related structures. *Water Science & Technology* **43**:77-86.
241. **Sutherland, I. W., K. A. Hughes, L. C. Skillman, and K. Tait.** 2004. The interaction of phage and biofilms. *FEMS Microbiol Lett* **232**:1-6.
243. **Tamayo, R., J. T. Pratt, and A. Camilli.** 2007. Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* **61**:131-48.
244. **Tang, X., W. Yi, G. R. Munske, D. P. Adhikari, N. L. Zakharova, and J. E. Bruce.** 2007. Profiling the membrane proteome of *Shewanella oneidensis* MR-1 with new affinity labeling probes. *J Proteome Res* **6**:724-34.
245. **Taylor, B. L., and I. B. Zhulin.** 1999. PAS domains: Internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**:479-+.
246. **Teal, T. K., D. P. Lies, B. J. Wold, and D. K. Newman.** 2006. Spatiometabolic stratification of *Shewanella oneidensis* biofilms. *Appl Environ Microbiol* **72**:7324-30.
247. **Theunissen, S., B. Vergauwen, L. De Smet, J. Van Beeumen, P. Van Gelder, and S. N. Savvides.** 2009. The agglutination protein AggA from *Shewanella oneidensis* MR-1 is a TolC-like protein and forms active channels in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **386**:380-5.
248. **Thomas, V. C., L. R. Thurlow, D. Boyle, and L. E. Hancock.** 2008. Regulation of autolysis-dependent extracellular DNA release by *Enterococcus faecalis* extracellular proteases influences biofilm development. *J Bacteriol* **190**:5690-8.
249. **Thormann, K. M., S. Duttler, R. M. Saville, M. Hyodo, S. Shukla, Y. Hayakawa, and A. M. Spormann.** 2006. Control of formation and cellular detachment from *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms by cyclic di-GMP. *J Bacteriol* **188**:2681-91.
250. **Thormann, K. M., R. M. Saville, S. Shukla, D. A. Pelletier, and A. M. Spormann.** 2004. Initial Phases of biofilm formation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *J Bacteriol* **186**:8096-104.
251. **Thormann, K. M., R. M. Saville, S. Shukla, and A. M. Spormann.** 2005. Induction of rapid detachment in *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms. *J Bacteriol* **187**:1014-21.
252. **Tischler, A. D., and A. Camilli.** 2004. Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol Microbiol* **53**:857-69.

253. **Van Dellen, K. L., L. Houot, and P. I. Watnick.** 2008. Genetic analysis of *Vibrio cholerae* monolayer formation reveals a key role for DeltaPsi in the transition to permanent attachment. *J Bacteriol* **190**:8185-96.
254. **van Schaik, E. J., C. L. Giltner, G. F. Audette, D. W. Keizer, D. L. Bautista, C. M. Slupsky, B. D. Sykes, and R. T. Irvin.** 2005. DNA binding: a novel function of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili. *J Bacteriol* **187**:1455-64.
255. **Vasseur, P., I. Vallet-Gely, C. Soscia, S. Genin, and A. Filloux.** 2005. The *pel* genes of the *Pseudomonas aeruginosa* PAK strain are involved at early and late stages of biofilm formation. *Microbiol* **151**:985-97.
256. **Venkateswaran, K., M. E. Dollhopf, R. Aller, E. Stackebrandt, and K. H. Nealson.** 1998. *Shewanella amazonensis* sp. nov., a novel metal-reducing facultative anaerobe from Amazonian shelf muds. *Int J Syst Bacteriol* **48 Pt 3**:965-72.
257. **Venkateswaran, K., D. P. Moser, M. E. Dollhopf, D. P. Lies, D. A. Saffarini, B. J. MacGregor, D. B. Ringelberg, D. C. White, M. Nishijima, H. Sano, J. Burghardt, E. Stackebrandt, and K. H. Nealson.** 1999. Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 2**:705-24.
258. **Vilain, S., J. M. Pretorius, J. Theron, and V. S. Brozel.** 2009. DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms. *Appl Environ Microbiol* **75**:2861-8.
259. **Visca, P., L. Leoni, M. J. Wilson, and I. L. Lamont.** 2002. Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. *Mol Microbiol* **45**:1177-90.
260. **Vlassov, V. V., P. P. Laktionov, and E. Y. Rykova.** 2007. Extracellular nucleic acids. *Bioessays* **29**:654-67.
261. **Wagner, P. L., J. Livny, M. N. Neely, D. W. Acheson, D. I. Friedman, and M. K. Waldor.** 2002. Bacteriophage control of Shiga toxin 1 production and release by *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **44**:957-70.
262. **Wagner, P. L., and M. K. Waldor.** 2002. Bacteriophage control of bacterial virulence. *Infect Immun* **70**:3985-93.
263. **Waite, R. D., A. Papakonstantinou, E. Littler, and M. A. Curtis.** 2005. Transcriptome analysis of *Pseudomonas aeruginosa* growth: comparison of gene expression in planktonic cultures and developing and mature biofilms. *J Bacteriol* **187**:6571-6.
264. **Wang, F., P. Wang, M. Chen, and X. Xiao.** 2004. Isolation of extremophiles with the detection and retrieval of *Shewanella* strains in deep-sea sediments from the west Pacific. *Extremophiles* **8**:165-8.
265. **Wang, I. N., D. L. Smith, and R. Young.** 2000. Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. *Annu Rev Microbiol* **54**:799-825.
266. **Wang, X., Y. Kim, Q. Ma, S. H. Hong, K. Pokusaeva, J. M. Sturino, and T. K. Wood.** 2010. Cryptic prophages help bacteria cope with adverse environments. *Nat Commun* **1**:147.
267. **Wang, X., Y. Kim, and T. K. Wood.** 2009. Control and benefits of CP4-57 prophage excision in *Escherichia coli* biofilms. *ISME J* **3**:1164-79.
268. **Wang, X., J. F. Preston, 3rd, and T. Romeo.** 2004. The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *J Bacteriol* **186**:2724-34.
269. **Watnick, P., and R. Kolter.** 2000. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* **182**:2675-9.
270. **Webb, J. S., M. Lau, and S. Kjelleberg.** 2004. Bacteriophage and phenotypic variation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* **186**:8066-73.
271. **Webb, J. S., L. S. Thompson, S. James, T. Charlton, T. Tolker-Nielsen, B. Koch, M. Givskov, and S. Kjelleberg.** 2003. Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* **185**:4585-92.
272. **Weinbauer, M. G.** 2004. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol Rev* **28**:127-81.
273. **Wen, Z. T., and R. A. Burne.** 2002. Functional genomics approach to identifying genes required for biofilm development by *Streptococcus* mutans.[erratum appears in *Appl Environ Microbiol*. 2003 Jan;69(1):722.]. *Appl Environ Microbiol* **68**:1196-203.

274. **Whitchurch, C. B., T. Tolker-Nielsen, P. C. Ragas, and J. S. Mattick.** 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* **295**:1487.
275. **Whiteley, M., M. G. Banger, R. E. Bumgarner, M. R. Parsek, G. M. Teitzel, S. Lory, and E. P. Greenberg.** 2001. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* **413**:860-4.
276. **Wielinga, B., M. M. Mizuba, C. M. Hansel, and S. Fendorf.** 2001. Iron promoted reduction of chromate by dissimilatory iron-reducing bacteria. *Environmental Science & Technology* **35**:522-527.
277. **Wildung, R. E., Y. A. Gorby, K. M. Krupka, N. J. Hess, S. W. Li, A. E. Plymale, J. P. McKinley, and J. K. Fredrickson.** 2000. Effect of electron donor and solution chemistry on products of dissimilatory reduction of technetium by *Shewanella putrefaciens*. *Appl Environ Microbiol* **66**:2451-2460.
278. **Wimpenny, J., W. Manz, and U. Szewzyk.** 2000. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiology Reviews* **24**:661-71.
279. **Wolfe, A. J., D. S. Millikan, J. M. Campbell, and K. L. Visick.** 2004. *Vibrio fischeri* sigma54 controls motility, biofilm formation, luminescence, and colonization. *Appl Environ Microbiol* **70**:2520-4.
280. **Wozniak, D. J., T. J. Wyckoff, M. Starkey, R. Keyser, P. Azadi, G. A. O'Toole, and M. R. Parsek.** 2003. Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:7907-12.
281. **Yang, C., D. A. Rodionov, X. Q. Li, O. N. Laikova, M. S. Gelfand, O. P. Zagnitko, M. F. Romine, A. Y. Obraztsova, K. H. Nealson, and A. L. Osterman.** 2006. Comparative genomics and experimental characterization of N-acetylglucosamine utilization pathway of *Shewanella oneidensis*. *J Biol Chem* **281**:29872-29885.
282. **Yang, L., K. B. Barken, M. E. Skindersoe, A. B. Christensen, M. Givskov, and T. Tolker-Nielsen.** 2007. Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol* **153**:1318-28.
283. **Yang, Y., D. P. Harris, F. Luo, W. Xiong, M. Joachimiak, L. Wu, P. Dehal, J. Jacobsen, Z. Yang, A. V. Palumbo, A. P. Arkin, and J. Zhou.** 2009. Snapshot of iron response in *Shewanella oneidensis* by gene network reconstruction. *BMC Genomics* **10**:131.
284. **Yildiz, F. H., and G. K. Schoolnik.** 1999. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:4028-33.
285. **Zhao, J. S., D. Manno, C. Beaulieu, L. Paquet, and J. Hawari.** 2005. *Shewanella sediminis* sp. nov., a novel Na<sup>+</sup>-requiring and hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-trinitro-degrading bacterium from marine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**:1511-1520.
286. **Zhao, J. S., D. Manno, C. Leggiadro, D. O'Neil, and J. Hawari.** 2006. *Shewanella halifaxensis* sp. nov., a novel obligately respiratory and denitrifying psychrophile. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**:205-12.
287. **Zhu, J., and J. J. Mekalanos.** 2003. Quorum sensing-dependent biofilms enhance colonization in *Vibrio cholerae*. *Dev Cell* **5**:647-56.
288. **Zobell, C. E., and D. Q. Anderson.** 1936. Observations on the multiplication of bacteria in different volumes and stored seawater and the influence of oxygen tension and solid surfaces. *Biol. Bull. Woods Hole* **71**:324-42.

## *Danksagung*

*An dieser Stelle möchte ich zuerst Dr. Kai M. Thormann für die Bereitstellung des Themas, die hervorragende Betreuung und die ständige Diskussionsbereitschaft danken.*

*Prof. Dr. Erhard Bremer danke ich dafür, dass er ohne zu Zögern die Erstgutachterschaft meiner Arbeit übernommen hat.*

*Großer Dank gilt auch meinen lieben Arbeitskollegen, ohne die das Arbeiten im Labor in den letzten dreieinhalb Jahren nur halb so schön verlaufen wäre. An Jürgen, der für jede Frage und jedes Problem immer ein offenes Ohr hatte. An Anja, die mich im Guten wie im Schlechten in ihrem Rücken ertragen hat und an alle anderen – innerhalb und außerhalb der AG Thormann – für die vielen Diskussionen, Kaffeeklatschgespräche, Unternehmungen, und natürlich die wunderbare Atmosphäre.*

*An dieser Stelle sei auch noch Magnus und Kristina gedankt, die nicht an Wuchstests und Mutantenkonstruktionen verzweifelt sind und die mit den Ergebnissen ihrer Master- bzw. Bachelorarbeit am Fortschreiten so manch eines Themenbereichs maßgeblich beteiligt waren.*

*Des Weiteren gehört mein Dank auch der ganzen Abteilung Ökophysiologie, insbesondere Prof. Dr. Lotte Sørgaard-Andersen für die fruchtbaren Diskussionen. Auch den guten Geistern der beiden Flure, Steffi, Petra und vor allem Elisabeth, sei gedankt.*

*Nicht zuletzt gilt ein besonderer Dank Sebastian, der mich im Laboralltag und im Leben immer unterstützt, mich während des Schreibens dieser Arbeit ertragen und mich immer wieder aufgebaut hat. Seine literarischen Künste haben so manche einen krummen Satz in ein wunderbares Werk verwandelt.*

*Ganz besonders möchte ich hier an dieser Stelle noch meinen Eltern danken, die mich in jeder Lebenslage unterstützen und vieles erst möglich gemacht haben.*

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Julia Gödeke
Geburtsdatum	10. Januar 1983
Geburtsort	Hattingen
Familienstand	ledig

### Schulische Ausbildung

08/1989 bis 07/1993	Gemeinschafts-Grundschule Erik-Nölting, Hattingen
08/1993 bis 06/2002	Gymnasium Holthausen in Hattingen, Abschluss: <b>Allgemeine Hochschulreife</b>

### Akademische Ausbildung

10/2002 bis 07/2007	Biologie-Studium am Lehrstuhl für Biologie und Biotechnologie, Ruhr-Universität Bochum
06/2005	Abschluss: <b>Bachelor of Science</b>
07/2007	Abschluss: <b>Master of Science</b> in Molekularer Botanik und Mikrobiologie
10/2007 bis 04/2011	<b>Promotion</b> am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg, Abteilung Ökophysiologie