

BERICHTE AUS FORSCHUNG UND ENTWICKLUNG NR. 052

Christina G. Weber

***N*-Acylhomoserinlacton-Lactonasen zur Vermeidung von Biofilmen**

Herstellung, Evaluation des Wirkspektrums
und Strategien zur Immobilisierung auf
technischen Oberflächen

Fraunhofer-Institut für
Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB

Berichte aus Forschung und Entwicklung Nr. 052

N-Acylhomoserinlacton-Lactonasen zur
Vermeidung von Biofilmen

Herstellung, Evaluation des Wirkspektrums
und Strategien zur Immobilisierung auf
technischen Oberflächen

Christina G. Weber

FRAUNHOFER VERLAG

Kontaktadresse:

Fraunhofer-Institut für
Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB
Nobelstraße 12
70569 Stuttgart
Telefon 07 11 9 70-40 00
Telefax 07 11 9 70-42 00
E-Mail info@igb.fraunhofer.de
URL www.igb.fraunhofer.de

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.
ISBN: 978-3-8396-0555-4

D 93

Zugl.: Stuttgart, Univ., Diss., 2013

Druck: Mediendienstleistungen des
Fraunhofer-Informationszentrum Raum und Bau IRB, Stuttgart

Für den Druck des Buches wurde chlor- und säurefreies Papier verwendet.

© by **FRAUNHOFER VERLAG**, 2013

Fraunhofer-Informationszentrum Raum und Bau IRB
Postfach 80 04 69, 70504 Stuttgart
Nobelstraße 12, 70569 Stuttgart
Telefon 07 11 9 70-25 00
Telefax 07 11 9 70-25 08
E-Mail verlag@fraunhofer.de
URL <http://verlag.fraunhofer.de>

Alle Rechte vorbehalten

Dieses Werk ist einschließlich aller seiner Teile urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die über die engen Grenzen des Urheberrechtsgesetzes hinausgeht, ist ohne schriftliche Zustimmung des Verlages unzulässig und strafbar. Dies gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen sowie die Speicherung in elektronischen Systemen.

Die Wiedergabe von Warenbezeichnungen und Handelsnamen in diesem Buch berechtigt nicht zu der Annahme, dass solche Bezeichnungen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und deshalb von jedermann benutzt werden dürften. Soweit in diesem Werk direkt oder indirekt auf Gesetze, Vorschriften oder Richtlinien (z.B. DIN, VDI) Bezug genommen oder aus ihnen zitiert worden ist, kann der Verlag keine Gewähr für Richtigkeit, Vollständigkeit oder Aktualität übernehmen.

***N*-Acylhomoserinlacton-Lactonasen zur Vermeidung von Biofilmen –
Herstellung, Evaluation des Wirkspektrums und
Strategien zur Immobilisierung auf technischen Oberflächen**

Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik
der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Ingenieurwissenschaft (Dr.-Ing.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

Christina G. Weber

aus Heilbronn-Neckargartach

Hauptberichter:	Prof. Dr. Thomas Hirth
Mitberichter:	Prof. Dr. Wolfgang Streit
Tag der mündlichen Prüfung:	19.03.2013

Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie der Universität Stuttgart

2013

Ob eine Sache gelingt, erfährst Du nicht, wenn Du darüber nachdenkst, sondern wenn Du es ausprobierst.

Unbekannt

Meiner Familie

In Liebe und Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	11
Tabellenverzeichnis	14
Zusammenfassung	16
Summary.....	19
1 Einleitung.....	22
1.1 Hintergrund – Das ubiquitäre Vorkommen des Biofilms	22
1.2 Problematik – Biofilm als überlegene Lebensweise für Mikroorganismen.....	23
1.3 Motivation – Beeinflussung der Biofilmbildung über das <i>Quorum Sensing</i>	24
1.4 Problemstellung – Biofilme Gram-negativer Wasserkeime	25
1.5 Zielsetzung.....	26
1.6 Vorgehen.....	28
2 Stand der Technik.....	29
2.1 Maßnahmen zur Entfernung von etablierten Biofilmen	29
2.1.1 Mechanische Reinigungsverfahren	29
2.1.2 Chemische Reinigungsverfahren.....	30
2.1.3 Thermische Desinfektion	31
2.1.4 Physikalische Reinigungsverfahren	31
2.1.5 Kombinierte Reinigungs- und Desinfektionsverfahren.....	31
2.2 Vorbeugende Maßnahmen zur Vermeidung und Verminderung von Biofilmen... 32	
2.2.1 Konstruktive Gestaltung der wasserführenden Anlage	32
2.2.2 Optimierung der Umgebungsbedingungen	32
2.2.3 Auswahl des Anlagenmaterials	32
2.3 Antimikrobielle Oberflächen	33
2.3.1 Oberflächen mit freisetzbarem Wirkstoff.....	33
2.3.2 Oberflächen ohne Freisetzung des Wirkstoffes.....	35
2.3.3 Oberflächen zur Adhäsionsreduzierung	37
3 Theoretische Grundlagen dieser Arbeit.....	38
3.1 Molekular- und mikrobiologische Grundlagen.....	38
3.1.1 Der Biofilm und seine Entstehung	38

3.1.2	Zell-Zell-Kommunikation Gram-negativer Bakterien (<i>Quorum Sensing</i>).....	41
3.1.3	<i>Quorum Sensing</i> -Regulation von Virulenzfaktoren.....	44
3.1.4	<i>Quorum Quenching</i> - Störung des <i>QS</i> bei Gram-negativen Bakterien	46
3.1.5	Rolle der <i>N</i> -Acylhomoserinlacton-Lactonasen	50
3.2	Immobilisierung von Enzymen	52
3.2.1	Enzymimmobilisierung durch Adsorption.....	53
3.2.2	Enzymimmobilisierung durch Chemisorption	55
3.2.3	Enzymimmobilisierung durch Einschluss.....	58
4	Material und Methoden	62
4.1	Verwendete Materialien	62
4.1.1	Plasmide und Bakterienstämme	62
4.1.2	Medien und Zusätze sowie Puffer und Lösungen.....	62
4.1.3	Verwendete Chemikalien und Materialien.....	62
4.1.4	Verwendete Geräte und deren zugehörige Software.....	63
4.1.5	Software und Datenbanken	63
4.2	Angewandte Methoden.....	64
4.2.1	Kulturbedingungen der verschiedenen Bakterienstämme.....	64
4.2.2	Expression und Aufreinigung der AHL-Lactonasen.....	64
4.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Bradford-Protein Assay	67
4.2.4	MALDI-TOF-Analyse zur Proteinidentifizierung	68
4.2.5	FT-IR/ATR Analyse der AHL-Lactonasen.....	69
4.2.6	Methoden zur Quantifizierung der spezifischen Enzymaktivität	70
4.2.7	Biofilmassay unter statischen Bedingungen	73
4.2.8	Bestimmung unterschiedlicher Virulenzfaktoren	75
4.2.9	Bioinformatische Methoden.....	73
4.2.10	Immobilisierung der AHL-Lactonasen durch Physisorption	77
4.2.11	Immobilisierung der AHL-Lactonasen durch Chemisorption	78
4.2.12	Immobilisierung der AHL-Lactonasen in einer polymeren Matrix	80

4.2.13	Charakterisierung der adsorptiven Immobilisierungssysteme.....	80
4.2.14	Charakterisierung der chemisorptiven Immobilisierungssysteme.....	82
4.2.15	Charakterisierung der Hydrogele	83
4.2.16	Statistische Methoden	89
5	Ergebnisse	90
5.1	Expression der AHL-Lactonasen im Bioreaktor.....	90
5.2	Aufreinigung der AHL-Lactonasen mittels chromatographischer Methoden	92
5.3	Charakterisierung der aufgereinigten AHL-Lactonasen	96
5.4	Proteinschonende Immobilisierungsmethoden	102
5.4.1	Adsorptive Immobilisierung	102
5.4.2	Chemisorptive Immobilisierung.....	110
5.4.3	Einschluss in eine polymere Matrix	112
5.5	Freigabekinetik in Abhängigkeit der Immobilisierungsmethode.....	125
5.5.1	Desorption von adsorptiv immobilisierten Enzymen	125
5.5.2	Freisetzung von in Hydrogel eingeschlossenem Enzym	128
5.6	Speziesunabhängiges Wirkspektrum der AHL-Lactonasen.....	133
5.7	Wirkung von AHL-Lactonasen auf QS-abhängige Faktoren.....	138
5.8	Wirkung immobilisierter AHL-Lactonasen auf die Biofilmbildung	142
5.8.1	Adsorptive Immobilisierung	142
5.8.2	Chemisorptive Immobilisierung.....	149
5.8.3	Einschluss in eine polymere Matrix	152
5.9	Zusammenfassung der Ergebnisse	157
6	Diskussion der Methoden und Ergebnisse	161
6.1	Herstellung und Aufreinigung der AHL-Lactonasen.....	161
6.1.1	Expression der AHL-Lactonasen im Bioreaktor	161
6.1.2	Aufreinigung der AHL-Lactonasen durch chromatographische Methoden	164
6.2	Immobilisierung der AHL-Lactonasen unter Erhalt der spezifischen Aktivität ..	166
6.2.1	Immobilisierung der AHL-Lactonasen durch proteinschonende Methoden ...	166
6.2.2	Freisetzungsraten eingesetzter Immobilisierungsmethoden.....	170
6.3	Wirkung immobilisierter AHL-Lactonasen auf das QS-abhängige Verhalten	172
6.3.1	Speziesunabhängiges Wirkspektrum der AHL-Lactonasen.....	173
6.3.2	Wirkung der immobilisierten AHL-Lactonasen auf das QS	176

7	Fazit und Ausblick	181
I.	Literaturverzeichnis.....	185
II.	Bakterienstämme	198
III.	Medien und Zusätze sowie Puffer und Lösungen.....	199
IV.	Verwendete Chemikalien und Materialien	205
V.	Verwendete Geräte und zugehörige Software	209
	Veröffentlichungen.....	211
	Lebenslauf	212
	Danksagungen	213

Abkürzungsverzeichnis und Glossar

3-oxo-HSL	3-Oxododecanoyl-DL-homoserinlacton
AC	Affinitätschromatographie
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AHL	N-Acyldomoserinlacton Chemisches Signalmolekül der Zell-Zell-Kommunikation Gram-negativer Bakterien
aiia	AiiA codierendes Gen
AiiA	<i>Autoinducer inhibitor A</i> AHL-Lactonase von <i>Bacillus sp.</i>
aiib	AiiB codierendes Gen
AiiB	<i>Autoinducer inhibitor B</i> AHL-Lactonase von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AI	Autoinducer Chemisches Signalmolekül der bakteriellen Zell-Zell-Kommunikation
AIEX	Anionenaustauschchromatographie
aka	Engl.: also known as; auch bekannt als
Al(OH)₃	Aluminiumhydroxid
Amp^R	Ampicillin-Resistenz
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
Asp	Asparaginsäure
ATCC	American Type Culture Collection
AT-Medium	Medium für <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ATR	Abgeschwächte Totalreflexion
BE	Belgien
Bis-Tris	2,2-Bis(hydroxymethyl)-2,2',2-nitrioltriethanol
blcC	BlcC codierendes Gen Ein Teil des blcABC-Operons, der es Bakterien ermöglicht γ -Butyrolactone als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen.
BlcC (ex AttM)	Autoinducer inhibitor B AHL-Lactonase von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BRD	Bundesrepublik Deutschland
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
C6-HSL	N-Hexanoyl-DL-homoserinlacton
C12-HSL	N-Dodecanoyl-DL-homoserinlacton
CA	Kanada
Ca₅[OH](PO₄)₃]	Calciumhydrogenphosphat
CH	Schweiz

CTEMS	2-(Carboxymethylthio)ethyltrimethylsilan
<i>C. violaceum</i>	<i>Chromobacterium violaceum</i>
Cys	Cystein
DE3	Kodiert T7 Lysogen für eine T7 RNA-Polymerase für eine hohe Transkription von <i>optT</i>
DMPA	2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
<i>E. aerogenes</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen Mikroorganismen bilden eine Matrix aus EPS zum Schutz gegen Umwelteinflüsse. Die EPS stellen die Hauptbestandteile in Biofilmen und Flocken.
ExpPASy	Expert Protein Analysis System Proteindatenbank des Swiss Institute of Bioinformatics
F	Frankreich
FT-IR/ATR	Infrarotspektroskopie mit abgeschwächter Totalreflexion
GB	Großbritannien
Glu	Glutaminsäure
GOP	3-(Glycidoxypropyl)trimethoxysilan
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Engl.: Horseradish Peroxidase; Meerrettichperoxidase
<i>hsd S_B (r_B-m_B)</i>	Verbesserte Transformationseffektivität und verbesserte Darstellung von methylierter DNA
HSL	Homoserinlacton
IT	Italien
k. A.	keine Angaben
KSG	Kalksodaglaskügelchen
LB-Medium	Luria Bertani Medium
LVEB	Linear-viskoelastischer Bereich Bereich, in welchem das Material bis zu einer Maximaldeformation deformiert werden kann, ohne dabei seine Struktur zu verändern.
Lys	Lysin

MALDI-TOF/TOF MS	Engl.: Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization with tandem Time Of Flight and Mass Spectrometry Ein Kombinationsverfahren aus einer Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation von Molekülen und anschließender Flugzeit-Massenspektrometrie.
MBP	Maltosebindendes Protein
MBP-aiia	Gen des rekombinanten Proteins MBP-AiiA
MBP-aiib	Gen des rekombinanten Proteins MBP-AiiB
MBP-attm	Gen des rekombinanten Proteins MBP-AttM
MCT	Engl.: Mercurium-Cadmium-Tellurite; Quecksilber-Cadmium-Tellurit
MilliQ	Aufgereinigtes und deionisiertes Wasser
MW	Engl.: Molecular Weight, Molekulargewicht
n. b.	Nicht bestimmbar
n. d.	Nicht durchgeführt
NL	Niederlande
NZ	Neuseeland
<i>OmpT</i>	<i>OmpT</i> ; Protease, fehlt diese, kann eine höhere Ausbeute an intaktem rekombinantem Protein erzielt werden
ONPG	<i>o</i>-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PEG-DA	Poly(ethylenglykol)-diacrylat
pI	Isoelektrischer Punkt pH-Wert, bei dem ein Protein gleich viele negativ geladene Säuregruppen wie positiv geladene Aminogruppen trägt.
<i>P-lac</i>	Lac-Promotor Bestandteil des <i>lac</i> -Operons, welcher unter anderem das <i>lacZ</i> -Gen beinhaltet. Dieses codiert das Enzym β -Galactosidase.
pMA-EGDMA	Poly-(Methacrylsäure-co-Ethylenglykoldimethacrylat)
<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>
<i>P. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
PS-AA	Polystyrol-Acrylsäure
pVP	2-Vinyl-1-pyrrolidon
QQ	<i>Quorum Quenching</i> Strategie zur Störung des <i>Quorum Sensing</i>
QS	<i>Quorum Sensing</i> Bakterielle Zell-Zell-Kommunikation zur Messung der Populationsdichte mit anschließender koordinierter Genexpression.
REM	Rasterelektronenmikroskop

SAM	S-Adenosylmethionin Precursor des Signalmoleküls <i>N</i> -Acylhomoserinlacton
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamide Gelelektrophorese
SE	Engl. Size exclusion chromatography; Größenausschlusschromatographie
SiO₂	Siliziumdioxid
<i>S. lutea</i>	<i>Sarcina lutea</i>
SOC-Medium	Super Optimal Broth with Catabolite Repression Medium
sp.	Spezies Die Art eines Lebewesens; hier: einer Bakterienart
succAPF	<i>N</i>-Succinyl-Alanin-Alanin-Prolin-Phenylalanin-<i>p</i>-Nitroanilid
Sulfo-NHS	<i>N</i>-hydroxysuccinimid
TEA	Triethylamin
TESPMA	3-(Trimethoxysilyl)propylmethacrylat
TEV	Engl.: tobacco etch virus
TFA	Engl.: Trifluoroacetic acid; Trifluoressigsäure
TBS-T	4,5,6,7-Tetrabromo-2-azabenzimidazole mit Tween
TM	Engl.: Trademark; eingetragenes Warenzeichen
TrinkwV	Trinkwasserverordnung
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UK	Engl.: United Kingdom; Vereinigtes Königreich
USA	Engl.: United States of America; Vereinigte Staaten von Amerika
UV	Ultraviolett
w.E.	willkürliche Einheiten
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
XTT	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
*	Signifikanzniveau von $p < 0,05$

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vorgehensweise dieser Arbeit	28
Abbildung 2: Schematische Darstellung von antimikrobiellen Oberflächenausrüstungen....	33
Abbildung 3: Entstehung eines Biofilms nach Hentzer ¹⁴⁹	40
Abbildung 4: Struktur dreier Autoinducer-2-Moleküle	42
Abbildung 5: Das <i>LuxI-LuxR</i> -QS-System Gram-negativer Bakterien.....	43
Abbildung 6: Allgemeine Struktur von <i>N</i> -Acylhomoserinlactonen	44
Abbildung 7: Siderophore von <i>P. aeruginosa</i>	45
Abbildung 8: Rhamnolipid 1	46
Abbildung 9: QQ-Strategien zur Zerstörung des QS Gram-negativer Bakterien	47
Abbildung 10: AHL-Strukturanaloga, welche den AHL-Rezeptor blockieren können.....	48
Abbildung 11: Mögliche enzymatische Angriffsstellen des AHL.....	49
Abbildung 12: Enzymatische AHL-Spaltung durch eine AHL-Acylase	50
Abbildung 13: Enzymatische AHL-Spaltung durch eine AHL-Lactonase.....	50
Abbildung 14: Möglichkeiten der Immobilisierung von Enzymen	52
Abbildung 15: Immobilisierung durch Adsorption.....	53
Abbildung 16: Adsorptive Immobilisierung eines Enzymss auf einem Trägermaterial	54
Abbildung 17: Immobilisierung durch Chemisorption.....	55
Abbildung 18: Kovalente Immobilisierung eines Enzyms auf einer Trägermatrix	56
Abbildung 19: Silanabscheidung auf hydroxylierten Silanoberflächen aus der Flüssigphase.....	57
Abbildung 20: Zur Oberflächefunktionalisierung verwendete Silane	58
Abbildung 21: Immobilisierung durch Einschluss in eine Matrix.....	59
Abbildung 22: Quell- und Schrumpfverhalten von Hydrogelen.....	60
Abbildung 23: Radikalischer Zerfall von 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon.....	61
Abbildung 24: Radikalische Polymerisation von Poly(ethylenglykol)diacrylat.....	61
Abbildung 25: Fließschema der chromatographischen Trennung der AHL-Lactonasen	66
Abbildung 26: Kovalente Bindung primärer Amine und Carboxylate mit EDC/sulfo-NHS	79
Abbildung 27: Nachweis der Expression der MBP-AHL-Lactonasen im zeitlichen Verlauf	90

Abbildung 28: Quantitativer Western Blot zur Bestimmung der Expression	91
Abbildung 29: Anionenaustauschchromatographie.....	93
Abbildung 30: Affinitätschromatographie.....	94
Abbildung 31: Größenausschlusschromatographie	95
Abbildung 32: Aufreinigung der AHL über die einzelnen Chromatographieschritte	96
Abbildung 33: Aminosäuresequenz von AiiA, AiiB und BlcC.....	97
Abbildung 34: Physiko-chemische Eigenschaften der Primärstruktur von AiiA	98
Abbildung 35: Tertiärstruktur von AiiA.....	99
Abbildung 36: FT-IR/ATR-Spektren von AiiB und BlcC	100
Abbildung 37: Pyraninassay mit unterschiedlichen Substraten.....	101
Abbildung 38: Elektronen-/lichtmikroskopische Aufnahmen der Adsorptionssubstrate	103
Abbildung 39: Zusammenhang zwischen spezifischer BET-Oberfläche des Substrates und der immobilisierten Menge Subtilisin.....	108
Abbildung 40: Zusammenhang zwischen spezifischer Aktivität und immobilisierter Menge Subtilisin	109
Abbildung 41: Zusammenhang zwischen immobilisierte Menge Lysozym und pH-Wert ..	110
Abbildung 42: Polymerisationsgrad von Hydrogelen mit verschiedenen Polymergehalten	113
Abbildung 43: Morphologie von getrockneten und gequollenen Hdyrogelen	114
Abbildung 44: Quellverhalten von Hydrogelen mit unterschiedlichem Molekulargewicht.	115
Abbildung 45: Amplitudendurchlauf: G' und G'' als Funktion der Deformation	118
Abbildung 46: Amplitudendurchlauf: Verlauf des Speichermoduls und Fließgrenzen	119
Abbildung 47: Frequenzdurchlauf: Speichermodul und Viskosität	120
Abbildung 48: Speichermodule im Amplitudendurchlauf von beladenen Hydrogelen.....	121
Abbildung 49: Einfluss der UV-Bestrahlung auf Proteinstruktur und Enzymaktivität	123
Abbildung 50: Stabilitätsprüfung von kovalent gebundenem Hydrogel	124
Abbildung 51: Desorptionskinetik von adsorptiv immobilisiertem Lysozym.....	126
Abbildung 52: Desorbierte Lysozymmenge in definierten Freisetzungsperioden	127
Abbildung 53: Langzeit-Freisetzungskinetik von Proteinen aus einem Hydrogel	129
Abbildung 54: Charakteristika der Freisetzungskinetik von Lysozym aus einem Hydrogel	130

Abbildung 55: Spezifische Aktivität von aus einem Hydrogel freigesetztem Lysozym	131
Abbildung 56: Einfluss von AiiB und BlcC auf einen <i>P. aeruginosa</i> PAO1 Biofilm.....	134
Abbildung 57: Einfluss von AiiB und BlcC auf die metabolische Aktivität Gram-negativer Bakterien	135
Abbildung 58: Einfluss von AiiB und BlcC auf die Biofilmmasse Gram-negativer Bakterien und deren QS-Mutanten	136
Abbildung 59: Einfluss von AiiB und BlcC auf die Biofilmmasse von <i>S. lutea</i>	137
Abbildung 60: Einfluss von AiiB und BlcC auf die Produktion von Siderophore	139
Abbildung 61: Einfluss von AiiB und BlcC auf die Bildung von Rhamnolipiden.....	139
Abbildung 62: Einfluss von AiiB und BlcC auf die Violaceinbildung.....	140
Abbildung 63: Einfluss von AiiB und BlcC auf das Schwarm- und Schwimmverhalten ...	141
Abbildung 64: Biofilmreduzierung von adsorptiv immobilisiertem AiiB und BlcC.....	144
Abbildung 65: Pyocyaninreduzierung durch adsorptiv immobilisiertes AiiB und BlcC.....	145
Abbildung 66: Western Blot: AiiB- und BlcC-Ausrüstung von Flachsubstraten	146
Abbildung 67: X-Gal Assay von mit AiiB und BlcC ausgerüsteten Flachsubstraten.....	147
Abbildung 68: Biofilmreduzierung durch mit AiiA, AiiB und BlcC ausgerüstete Flachsubstrate.....	148
Abbildung 69: Biofilmreduzierung durch kovalent gebundenes AiiB und BlcC	150
Abbildung 70: Wirkung von kovalent gebundenem AiiB und BlcC auf die Virulenzfaktoren	151
Abbildung 71: Biofilmreduktion durch ein 35 %-iges Hydrogel nach 16 h/88 h.....	153
Abbildung 72: Einfluss eines 35 %-iges Hydrogels nach 16 h/88 h auf Virulenzfaktoren .	155
Abbildung 73: Biofilmreduktion eines 50 %-igen Hydrogels nach 16 h.....	156
Abbildung 74: Tertiärstruktur von AiiA und AiiB	165
Abbildung 75: Der C- und N-Terminus sowie das katalytische Zentrum von AiiB.....	179

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Wirkungsweisen der wichtigsten Desinfektionsmittelgruppen nach Wildbrett ³³⁴	31
Tabelle 2: Schlüsselkomponenten des QS Gram-negativer Bakterien und QQ-Strategien ⁹⁷	48
Tabelle 3: Zusammenstellung von AHL-Lactonasen	51
Tabelle 4: Vor- und Nachteile der Adsorption	54
Tabelle 5: Vor- und Nachteile der Chemisorption	56
Tabelle 6: Kombinationen von Oberflächenfunktionalisierung und Proteinseitengruppen	57
Tabelle 7: Vor- und Nachteile der Immobilisierung durch den Einschluss in eine Matrix	59
Tabelle 8: Rekombinante Plasmide	62
Tabelle 9: Angewendete Software und Datenbank	63
Tabelle 10: Bandenpositionen verschiedener Sekundärstrukturlemente nach Ollesch ²³⁷	69
Tabelle 11: Pufferbedingungen der Physisorption	77
Tabelle 12: Parameter der Nachweise von Oberflächenfunktionalisierungen	83
Tabelle 13: Expression entsprechender AHL-Lactonasen in einem Bioreaktor	91
Tabelle 14: Qualität der aufgereinigten AHL-Lactonasen	96
Tabelle 15: Physikochemische Eigenschaften von AiiA, AiiB und BlcC	98
Tabelle 16: FT-IR/ATR-Bandenzuordnung für AiiB und BlcC	99
Tabelle 16: Physikalische Eigenschaften der Adsorptionsmaterialien	104
Tabelle 17: Zeta-Potential der Adsorptionsmaterialien in Citratpuffer mit pH 4,0/pH 6,5	105
Tabelle 18: Chemische Eigenschaften der Adsorptionsmaterialien	106
Tabelle 19: Physikalisch-chemische Eigenschaften von Subtilisin und Lysozym	106
Tabelle 20: Zeta-Potential der Adsorptionsmaterialien zur Adsorption von Subtilisin	107
Tabelle 21: Charakterisierung der Silanschichten	111
Tabelle 22: Quellgrad/Wassergehalt von Hydrogelen (25 % PEG-DA) in Abhängigkeit des PEG-DA-Molekulargewichtes	115
Tabelle 23: Abgeschätzte Maschenweite (Å) nach Flory-Rehner aus Quellversuchen	116
Tabelle 24: Kontaktwinkel ausgewählter Hydrogele	117
Tabelle 25: Werte des linear-viskoelastischen Bereiches (MPa)	118

Tabelle 26: Cysteinanteil verschiedener Enzyme	122
Tabelle 27: Adsorbierte Subtilisinmenge und desorbierbarer Anteil.....	125
Tabelle 28: Parameter der Freisetzungskinetik von Proteinen aus einer polymeren Matrix	132
Tabelle 29: Immobilisiertes AiiB und BlcC auf verschiedenen Adsorptionsträger.....	142
Tabelle 30: Präparation der Immobilisierung von Fusionsproteinen an Flachs substraten	146
Tabelle 31: Präparation der kovalenten Immobilisierung von AiiB und BlcC	149
Tabelle 32: Vergleich der Expression von AiiA, AiiB und BlcC mit Literaturdaten	162
Tabelle 33: Spezifische Aktivität von AiiA und BlcC gegenüber unterschiedlichen Signal- molekülen.....	173
Tabelle 34: <i>Quorum Sensing</i> -Systeme der untersuchten Bakterienspezies	174
Tabelle 35: Regulation verschiedener Virulenzfaktoren durch QS	175
Tabelle 36: Bakterienstämme und deren Eigenschaften	198
Tabelle 37: Antibiotikazugaben zu den jeweiligen Kulturmedien.....	201
Tabelle 38: Verwendete Reaktions- und Nachweiskits	205
Tabelle 39: Chemikalien zur Proteinexpression und deren Kontrolle	206
Tabelle 40: Verwendetes Säulenmaterial zur Aufreinigung	206
Tabelle 41: Verwendete Enzyme und deren Substrate	206
Tabelle 42: Chemikalien zum Nachweis/Quantifizierung des QS und des Biofilms	207
Tabelle 43: Materialien zum Nachweis/Quantifizierung des QS und des Biofilms	207
Tabelle 44: Verwendete Chemikalien zur Herstellung der Immobilisierung	208
Tabelle 45: Verwendete Geräte und deren Bedien- und Auswertesoftware	209

Zusammenfassung

Biofilme am falschen Ort oder mit pathogenen Keimen verursachen volkswirtschaftliche Schäden und sind gesundheitsgefährdend. Häufig angewandte Bekämpfungsstrategien, wie die mechanische oder die chemische Reinigung, sind in ihrer Anwendung und Effektivität eingeschränkt: Biofilme können oftmals nicht vollständig entfernt werden oder bilden Resistenzen gegenüber den eingesetzten Chemikalien, welche zudem oft stark toxisch und hochkorrosiv sind.

Bakterien können in Abhängigkeit von der Populationsdichte ihr Verhalten über extrazelluläre Signalmoleküle steuern (*Quorum Sensing*, QS). So wird eine Vielzahl an bakteriellen Verhaltensweisen wie die Biofilmbildung^{20, 99, 150, 173, 213} und die Expression von Virulenzfaktoren^{96, 192, 337, 340, 342} reguliert, die durch eine Störung der Zell-Zell-Kommunikation beeinflusst werden können. Typische Strategien zur Bekämpfung der Biofilmbildung Gram-negativer Organismen über das QS beinhalten die kompetitive Inhibition des Signalmolekülrezeptors durch ein Struktur analogon²³¹ und den enzymatischen Abbau des Signalmoleküls *N*-Acylhomoserinlacton (AHL)²³⁵.

Grundvoraussetzungen für den praktischen Einsatz eines biofilmreduzierenden Wirkstoffes sind seine Verfügbarkeit und seine Wirkung, idealerweise mit einem breiten Wirkspektrum, sowie ferner seine Darreichungsform, beispielsweise als Oberflächenbeschichtung oder in Form einer Formulierung. Die Wirkung von AHL-Lactonasen auf die Biofilmbildung und die Produktion von Virulenzfaktoren sind in der Literatur beschrieben als Untersuchungen, in denen entsprechende Gensequenzen, vor allem *aiaa*, in die untersuchte Zielspezies kloniert und das Verhalten dieser Mutanten mit ihren jeweiligen Wildtypen verglichen^{265, 323, 96, 98, 243, 309} wurden. Diese Art der Wirkungsbestimmung wurde angewandt, da AHL-Lactonasen derzeit nicht kommerziell verfügbar sind. Die Expression der AHL-Lactonasen erfolgte in bisherigen Studien vor allem mit *Escherichia coli* im Schüttelkolbenmaßstab mit geringen Ausbeuten von bis zu 54 mg/l^{204, 299, 347}, um die Struktur von AiiA²⁹⁹ und AiiB²⁰⁴ aufzuklären und ihre Aktivität zu bestimmen.

Ziel dieser Arbeit war es in das QS Gram-negativer Bakterien einzugreifen, um deren Biofilmwachstum zu hemmen und die Bildung von Virulenzfaktoren zu reduzieren. Darüber hinaus wurde das Potential von AHL-Lactonasen, beispielhaft an AiiA, AiiB und BlcC (ehemals AttM), als antibakterielle Wirkstoffe ermittelt. Um dies zu erreichen, wurden die AHL-Lactonasen AiiA, AiiB und BlcC zunächst in *E. coli* in einem 7 l-Bioreaktor exprimiert und über chromatographische Methoden aufgereinigt. Anschließend wurde ihre Wirkung auf das QS anhand der Biofilmbildung und der Produktion unterschiedlicher Virulenzfaktoren an ausgewählten Gram-negativen Bakterienstämmen untersucht. Für einen praktischen

industriellen Einsatz wurden sie zur Demonstration der Machbarkeit an Partikeloberflächen und mit Maltose ausgerüsteten Flachs substraten physisorbiert, an COOH- und NH₂-funktionalisierten Oberflächen gebunden sowie in ein Hydrogel eingeschlossen. Auch diese Oberflächenbeschichtungen und Formulierungen wurden auf ihre Biofilm-reduzierenden Eigenschaften analysiert.

Zunächst wurden AiiA, AiiB und BlcC in einer Hochzell-dichtefermentation mit bis zu 1,2 g/l exprimiert und auf eine Reinheit von 99 % aufgereinigt. Anschließend wurden die mit MALDI-TOF verifizierten AHL-Lactonasen AiiB und BlcC hinsichtlich ihrer hydrodynamischen Radien ($2,42 \pm 0,12$ nm für AiiB und $2,37 \pm 0,12$ nm für BlcC), ihrer isoelektrischen Punkte (5,45 für AiiB und 5,75 für BlcC) und ihrer Sekundärstruktur (AiiB mit $11,4 \pm 2,2$ % α -Helix und $36,2 \pm 2,9$ % β -Faltblatt, BlcC mit $4,4 \pm 4,2$ % α -Helix und $32,4 \pm 0,7$ % β -Faltblatt) charakterisiert. Bei der Bestimmung der spezifischen Aktivität mit Pyranin als pH-Indikator und mit Hilfe des Reporterstammes *A. tumefaciens* NTL4 (pCF218)(pCF372) im ONPG- und X-Gal-Assay zeigte sich BlcC stets um einen Faktor von 2 bis 3 aktiver als AiiB.

In der mikrobiologischen Bewertung wurde für AiiB und BlcC eine Reduzierung der Biofilmbildung, gemessen durch die metabolische Aktivität und die Biofilmmasse, von *P. aeruginosa*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. fluorescens*, *E. aerogenes* und *C. violaceum* nachgewiesen. Sie besaßen jedoch keinen Einfluss auf Bakterien, die nicht über AHL kommunizieren, wie *S. lutea*, *E. coli*, *P. mirabilis* und die QS-defizienten Mutanten von *E. coli* und *C. violaceum*. Neben der Biofilmbildung in *P. aeruginosa* reduzierten AiiB und BlcC auch dessen Virulenzfaktoren wie Pyocyanin, Pyoverdin, Pyochelin und Rhamnolipide. In *C. violaceum* verminderte sich in Anwesenheit von AiiB und BlcC die Bildung von Violacein signifikant um 18 %. Weiterhin störten AiiB und BlcC das Schwimm- und Schwarmverhalten von *P. aeruginosa* und *P. mirabilis*.

Die Immobilisierung über Physisorption und Chemisorption sowie durch den Einschluss in eine polymere Matrix wurde zunächst mit Hilfe von Modellenzymen erarbeitet und auf ihre Eignung untersucht. Zur Immobilisierung über Physisorption wurden verschiedene polymere und anorganische Partikel ausgewählt und charakterisiert. Der pH-Wert des Immobilisierungspuffers und die spezifische BET-Oberfläche der Partikel besaßen den größten Einfluss auf die Immobilisierung von Enzymen. Das Desorptionsverhalten der physisorbierten Enzyme variierte in Abhängigkeit der zugrundeliegenden physikalischen Wechselwirkungskräfte. Es zeigte sich jedoch, dass 50 bis 90 % des gesamten physisorbierten Enzyms innerhalb der ersten 24 Stunden desorbierten. Lediglich die Immobilisierung über ionische Wechselwirkungen führte zu einer verzögerten Freisetzung.

Siliziumsubstrate, welche über eine Silanisierung aus der Flüssigphase, mit COOH-beziehungsweise NH₂-Gruppen ausgerüstet wurden, dienten zur chemisorptiven Anbindung von AHL-Lactonasen. Es wurden hier Belegungsdichten von 3,3 – 6,3 funktionellen Gruppen/nm² erzielt. Eine Freisetzung des immobilisierten Enzyms ist hier per Definition nicht möglich und wurde folglich nicht untersucht.

Hydrogele, basierend auf Poly(ethylenglykol)diacrylat, mit Polymergehalten zwischen 25 und 50 % wurden als Depotsystem hergestellt. Sie zeigten eine moderate Quellung von 200 % und waren in ihrer Maschenweite von 4,4 bis 7,1 nm über den Polymeranteil eingestellt. Bei einer Deformation < 1 % verhielten sich die Hydrogele wie weiche visko-elastische Feststoffe und wiesen mit zunehmendem Polymeranteil eine höhere, mechanische Stabilität auf. Die UV-Einwirkung während der Netzwerkbildung besaß weder auf die Sekundärstruktur noch auf die spezifische Aktivität von Enzymen einen gravierenden negativen Einfluss. Durch eine geeignete Kombination der Maschenweite und des hydrodynamischen Radius des Proteins wurde ein Ausbluten des Hydrogels in der Anfangsphase vermieden und eine gleichmäßige Freisetzung von aktivem Enzym über eine Dauer von 14 Tagen erreicht.

Letztlich wurden AHL-Lactonasen mit geeigneten Methoden immobilisiert und ihre Biofilm-reduzierende Wirkung auf *P. aeruginosa* PAOI untersucht. AiiB und BlcC, welche auf Kalksodagaskügelchen und Siliziumdioxidpartikeln immobilisiert wurden, reduzierten die Biofilmbildung und die Produktion von Virulenzfaktoren signifikant, wohingegen sich Polystyrolacrylsäurepartikel für diese Anwendung als ungeeignet herausstellten. AHL-Lactonasen, welche über ihr *Tag* an Maltose immobilisiert wurden, reduzierten zwar die Biofilmbildung, jedoch nicht statistisch signifikant. AiiB und BlcC, welche kovalent über ihren N-Terminus gebunden wurden, führten zur einer reduzierten Biofilmbildung und einer verminderten Produktion von Virulenzfaktoren. Auch ein Einschluss von AiiB und BlcC in einem Hydrogel verminderte die Bildung von Virulenzfaktoren und des Biofilms nach 16 h und nach 88 h.

Mit dieser Arbeit wurden die Voraussetzungen geschaffen, die für einen industriellen Einsatz von AHL-Lactonasen im Einsatz gegen Biofilme bisher fehlten: Zunächst wurde anhand verschiedener Bakterienspezies systematisch gezeigt, dass sie als biofilmvermeidende Wirkstoffe in das QS Gram-negativer Bakterien eingreifen und das Biofilmwachstum und die Virulenzfaktorbildung reduzieren. Das hier entwickelten Herstellungsverfahren ermöglicht ein weiteres Upscaling zur großtechnischen Herstellung der AHL-Lactonasen, um deren kommerzielle Verfügbarkeit zu ermöglichen. Letztlich wurden beispielhaft Immobilisierungsansätze gezeigt, die nach ihrer Weiterentwicklung, in technischen wasserführenden Systemen eingesetzt werden können.

Summary

In many economic sectors biofilm formation leads to financial losses, potential pollution problems as well as health and safety hazards. The mechanical and the chemical treatment are the common strategies to eradicate biofilms, though their application is limited. Mechanical treatment is limited by their design, while high concentrations of highly toxic and corrosive chemicals used for cleaning are often not appropriate.

Bacteria are able to control their behavior with respect to population density using extracellular signal molecules (quorum sensing, QS). QS controls different behaviors like biofilm formation and the expression of virulence factors, which can be affected by disrupting the bacterial cell-to-cell communication. Typical strategies for combating biofilm formation in Gram-negative bacteria using QS include competitive receptor inhibition using a structural analog and the enzymatic degradation of *N*-acylhomoserine lactone signal molecule (HSL).

Its availability and effectiveness are major basic requirements for the application of an anti-biofilm agent as well as its wide range of use and its form of presentation, such as surface coatings or formulations. So far the effect of HSL lactonases on biofilm formation and virulence factors has been studied by cloning corresponding genes, particularly *aiaA*, in the examined target species and then comparing their behavior with wild strains. This experimental set-up was used due to the inadequate commercial availability of these enzymes. Early studies of the expression of HSL lactonases in *Escherichia coli* were conducted in shake flasks with only minor yields of up to 54 mg/l in order to study the structure and the activity of AiiA and AiiB.

In this work the reduction of biofilm formation and of virulence factors of Gram-negative bacteria by disrupting their QS. Anti-bacterial properties of HSL lactonases, using as examples AiiA, AiiB and BlcC (former AttM), was investigated. Therefore, AiiA, AiiB and BlcC were expressed in *E. coli* using a 7 L reactor and subsequently purified via a combination of chromatographic procedures. The purified AiiB and BlcC were then tested for their anti-bacterial properties, both against biofilm formation and against the production of virulence factors in selected Gram-negative strains. HSL lactonases were immobilized via physisorption onto particles and surfaces coated with maltose, were covalently linked to COOH- and NH₂-functionalized surfaces and were incorporated into hydrogels to show the feasibility of their industrial application. These surface coatings and formulations were subsequently analyzed for their anti-biofilm properties.

AiiA, AiiB and BlcC were expressed using high cell density fermentation, yielding up to 1.2 g/l, and they were purified to 99 %. The HSL lactonases that were identified by MALDI-TOF analysis were characterized according to their hydrodynamic radius (2.42 ± 0.12 nm for AiiB and 2.37 ± 0.12 nm for BlcC), their isoelectric point (5.45 for AiiB and 5.75 for BlcC) and their secondary structure (AiiB with 11.4 ± 2.2 % α -helix and 36.2 ± 2.9 % β -sheet, BlcC with 4.4 ± 4.2 % α -helix and 32.4 ± 0.7 % β -sheet). The specific activity was analyzed using pyranine as pH indicator as well as *A. tumefaciens* NTL4 (pCF218)(pCF372) as the reporter strain performed in an ONPG- and X-Gal assay. Here BlcC was two to three times more active than AiiB.

In terms of their microbiological evaluation, the enzymes AiiB and BlcC significantly reduced the metabolic activity and the biofilm mass of *P. aeruginosa*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. fluorescens*, *E. aerogenes* and *C. violaceum*. But there was no effect on bacteria that do not communicate via HSL like *S. lutea*, *E. coli*, *P. mirabilis* and QS-deficient mutants of *E. coli* and *C. violaceum*. Besides biofilm formation in *P. Aeruginosa*, AiiB and BlcC reduced the virulence factors like pyocyanin, pyoverdin, pyochelin and rhamnolipids. AiiB and BlcC also reduced violacein production in *C. violaceum* by 18 %. Additionally they disrupted the ability to swim and swarm in *P. aeruginosa* and *P. mirabilis*.

The immobilization via physisorption and chemisorption, and through incorporation into a polymeric matrix was developed and its appropriateness evaluated. Different polymeric and inorganic particles were characterized and used as substrate material for physisorption. The strongest influence on the physisorption process was determined by varying the pH of the immobilization buffer and the specific BET-surface of the particles. The desorption rate was dependent on the physical interaction of enzyme and particle. Between 50 and 90 % of physisorbed protein was desorbed during the first 24 h. Immobilization via ionic interactions led to a retarded desorption rate.

For the chemisorptive immobilization of HSL lactonases, silicon-based substrates were used, which had been previously modified with carboxyl and amine groups by liquid silanization with 3.3 to 6.3 functional groups/nm². Protein releasing was not possible per definition.

Hydrogels that were based on poly(ethylenglycol)diacrylate with a polymer content of between 25 and 50 % were synthesized as a depot system. A moderate swelling of 200 % was observed and the hydrogels could be adjusted in their mesh size from 4.4 to 7.1 nm by varying the polymer content. Using a deformation of less than 1 %, hydrogels acted like soft viscoelastic solids. With increasing polymer content their mechanical stability increased. Neither the secondary structure nor the specific activity of the enzymes exhibited serious changes due to UV radiation during network formation. By using an appropriate combination

of hydrogel mesh size and protein hydrodynamic radius, seeping out could be avoided in the initial phase and a constant release of active enzyme during 14 days could be achieved.

HSL lactonases were immobilized using suitable methods. Subsequently their anti-biofilm effect on *P. aeruginosa* was evaluated. AiiB and BlcC, which were physisorbed onto solid glass microspheres and silica particles, significantly reduced biofilm formation and inhibited the production of virulence factors. Particles of polystyrene and acrylic acid did not appear to be suitable for this application. HSL lactonases that were immobilized via tag onto maltose coated surfaces reduced the biofilm formation, but this was not statistically significant. AiiB and BlcC, which were covalently linked by their N-terminus, significantly reduced both biofilm formation and the production of virulence factors. Through their incorporation into a hydrogel, AiiB and BlcC reduced biofilm formation and inhibited the production of virulence factors after 16 and 88 hours of incubation.

With this research, requirements were set that were so far missing for using HSL lactonases in industrial applications to combat biofilms. Initially HSL lactonases as anti-biofilm agents were shown to act on QS Gram-negative bacteria, to reduce biofilm formation and to inhibit the production of virulence factors. The production process, which was developed in this thesis, enables further scaling up of HSL lactonases to industrial-level production to offer their commercial availability. Finally, different approaches to immobilize HSL lactonases were shown, which could be quickly applied to technical water systems after further development.

1 Einleitung

1.1 Hintergrund – Das ubiquitäre Vorkommen des Biofilms

Mikroorganismen charakterisierte man in der Mikrobiologie lange Zeit ausschließlich als planktonisch suspendierte Zellen. Heute jedoch gehen Wissenschaftler davon aus, dass 99 % der Mikroorganismen in so genannten Mikroökosystemen wie Biofilme, Flocken und Schlämme leben⁷¹. Diese bestehen aus miteinander agierenden Mikroorganismen wie Bakterien und Pilzen, die von einer selbstproduzierten Schutzschicht umgeben sind (siehe auch Kapitel 3.1.1). An Grenzflächen, natürlichen und künstlich geschaffenen, in wässriger oder feuchter Umgebung sind Biofilme allgegenwärtig. Denn überall dort, wo es feucht und warm ist sowie ein Minimalangebot an Nährstoffen vorhanden ist, lassen sich Bakterien bevorzugt nieder, breiten sich aus und bilden größere Kolonien (Biofilme).

Nach dem Vorkommen und der Anwendung werden Biofilme in nützliche und schädliche unterteilt. So können sie beispielsweise unterstützend bei der Biodegradation schädlicher Chemikalien^{18, 89} und der Bioremediation^{236, 286}, in der Abwasseraufbereitung^{289, 317}, im *Bio-mining*^{264, 312} und in biotechnologischen Herstellungsprozessen^{272, 324} eingesetzt werden.

Biofilme am falschen Ort oder mit pathogenen Keimen sind verantwortlich für Materialschäden und daraus resultierende volkswirtschaftliche Schäden. Sie können sogar zu einer Gefahr für die menschliche Gesundheit werden. Ungewollter Biofilmbewuchs an Wärmetauschern setzt deren Wirkungsgrad herab¹⁰⁸ und erhöht bei Rohrleitungen den Druckverlust¹⁰⁹. Durch Biokorrosion entstehen allein in Deutschland jährlich Schäden in Höhe von 2-4 Milliarden Euro¹¹¹. Durch Biofouling erhöhen sich die Betriebskosten in der Wasseraufbereitung über Membranverfahren bis zu 30 %¹¹².

Neben Auswirkungen von Biofilmen in Industrie und Technik ist ihre Bedeutung in der Medizin nicht zu vernachlässigen: 60 % aller Infektionskrankheiten wie Mukoviszidose, Plaquebildung in der Mundhöhle oder chronische Wundinfektionen sind mit Biofilmen assoziiert¹²². Darüber hinaus führt Biofilmbewuchs auf Implantaten und Kathetern zu schwerwiegenden Infektionen. Allein der Austausch biofilmbewachsener Implantate verursacht in den Vereinigten Staaten jährlich Kosten von 900 Millionen Dollar²⁷⁹.

1.2 Problematik – Biofilm als überlegene Lebensweise für Mikroorganismen

Ein Biofilm ist eine Anlagerung von miteinander agierenden Mikroorganismen auf Oberflächen, welche in einer selbstproduzierten Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingebettet sind⁷¹. Diese Lebensweise bietet den Mikroorganismen gegenüber dem planktonischen Wachstum eine Reihe von Vorteilen wie:

- die Versorgung mit Nährstoffen insbesondere in oligotrophen Habitaten durch Adsorption aus dem umgebenden Medium,
- die Bildung ökologischer Nischen für symbiotisch lebende Mikroorganismen,
- die Anpassung an ungünstige Umweltbedingungen wie hydraulische Belastungen, osmotischer Stress und pH-Schwankungen,
- die Gewährleistung des Überlebens unabhängig von der Flüssigkeitsphase,
- der Schutz der Mikroorganismen durch die EPS-Matrix als Barrierschicht beispielsweise gegenüber Bakteriziden,
- die gesteigerte Möglichkeit zum Gentransfer aufgrund der Existenz verschiedener Organismen auf engstem Raum und
- die Änderung des physiologischen Zustandes der Mikroorganismen wie geringere Wachstums- und Vermehrungsrate oder die Expression von Virulenzfaktoren als Verteidigungsstrategie.

Diese Vorteile jedoch führen dazu, dass Mikroorganismen in Biofilmen sowohl in technischen Systemen als auch im oder am lebenden Organismus nur sehr schwer zu bekämpfen sind.

Die EPS-Matrix schützt die Mikroorganismen des Biofilms vor äußeren Angriffen. Sie sind sowohl gegen das Eindringen von Biozid von außen^{81, 110, 132} als auch vor den möglichen toxischen Effekten der besiedelten Oberfläche geschützt. Beispielsweise können Biofilme in Kupferleitungen wachsen, da die entsprechenden Ionen für die Bakterien ungefährlich in der Biofilmmatrix akkumulieren¹⁵⁷.

Neben dem Schutz vor Angreifern hat die EPS-Matrix strukturstabilisierende Aufgaben. Sie fördert die Widerstandsfähigkeit des Biofilms gegenüber hohen Scherkräften in Rohrleitungen oder bei der physikalischen Reinigung^{81, 110, 132, 292}.

In der Biofilmmatrix können Mikroorganismen bei feindlichen Lebensbedingungen wie bei einem eingeschränkten Nahrungsangebot oder bei extremen Temperaturen langfristig überdauern²⁹³, da durch Transportkanäle in der Matrix Nährstoffe ins Innere transportiert werden und der Gasaustausch gewährleistet wird. Dennoch entstehen innerhalb des Biofilms Nährstoff-, pH- und Sauerstoffgradienten, welche die mikrobielle Zusammensetzung beeinflussen^{8, 338}. Aerobe Organismen leben in den äußeren, gut durchlüfteten Biofilmschichten, wohingegen sich anaerobe Mikroorganismen tiefer im Inneren des Biofilms entwickeln können. So kann in Abhängigkeit des Habitats ein extrem komplexes und heterogenes System von Bakterien, Algen und Pilzen entstehen⁶⁷.

Befinden sich Bakterien in einem System hoher Zelldichte, umgeben von einer Schutzschicht, bilden sich im Vergleich zu einzelnen planktonisch vorkommenden Zellen vermehrt Resistenzen gegenüber Bioziden wie Chlor oder Antibiotika^{62, 181, 227, 257, 269}. Diese Unempfindlichkeit gegenüber Bioziden kann im ungünstigsten Fall zur Proliferation potentieller pathogener Bakterien führen, welche in der Lage sind ihre Resistenzen über Plasmide an andere Bakterien zu übergeben¹⁹³.

Im menschlichen Körper schützen die EPS Bakterien vor der Immunabwehr: Es können nur Antigene an der äußeren Matrixschicht erkannt werden. Antikörper und lysierende Enzyme können ebenso wenig direkt am Pathogen angreifen wie Phagozyten. In der Konsequenz werden von Letzteren große Mengen an pro-inflammatorischen Enzymen und Zytokinen freigesetzt, welche zu Entzündungsreaktionen und im schlimmsten Fall zur Zerstörung des umgebenden Gewebes führen können^{106, 300}.

1.3 Motivation – Beeinflussung der Biofilmbildung über das *Quorum Sensing*

Etablierte Biofilme sind meist nur schwer und unvollständig zu bekämpfen. Sie erfordern häufig den Einsatz hoher Konzentrationen von oftmals toxischen Wirkstoffen. Da Biofilme sich in technischen Systemen meist an schwer zugänglichen Stellen ausbilden, ist ihre Entfernung zudem nur schwer möglich und mit einem hohen Aufwand verbunden. Ein vielversprechender Ansatz ist daher die Bildung des Biofilms zu unterdrücken, beispielsweise durch die Beeinflussung der bakteriellen Zell-Zell-Kommunikation.

Bakterien können in Abhängigkeit ihrer Populationsdichte mittels chemischer extrazellulärer Signalmoleküle, so genannter Autoinducer (AI), miteinander kommunizieren und eine Reihe koordinierter Aktionen über kontrollierte Genexpression ausführen. Diese Fähigkeit über Pheromon artige Signalmoleküle die Zelldichte der Population zu messen wird *Quorum Sensing* (QS) genannt^{219, 325}. Das QS steuert eine Reihe von bakteriellen

Verhaltensweisen, wie die Sekretion von Virulenzfaktoren^{96, 192, 337, 340, 342} und die Biofilmbildung^{2, 20, 99, 150, 173, 213}.

Durch Eingriffe in das QS wird die bakterielle Zell-Zell-Kommunikation unterbunden und in der Folge die Sekretion von Virulenzfaktoren beziehungsweise die Biofilmbildung vermieden²⁶⁰. Krankheitserreger verlieren dadurch beispielsweise ihre pathogenen Eigenschaften¹¹. Dieses Ausschalten des QS wird *Quorum Quenching* (QQ) genannt. QQ, das heißt der Einsatz von QS-Inhibitoren, ist eine innovative und elegante Strategie Biofilmwachstum vorbeugend mit nicht toxischen antibakteriellen Wirkstoffen zu verhindern^{85, 266}. Sie bietet den Vorteil niedriger Wirkdosen²⁵⁹.

Im Gegensatz zu herkömmlichen Wirkstoffen, die in der Regel bakterizid oder bakterio-statisch wirken, unterbindet QQ nicht generell das Zellwachstum, sondern verhindert die Umwandlung nicht-pathogener planktonischer Bakterien in pathogene Biofilmorganismen. Aufgrund eines geringeren Selektionsdruckes, bedingt durch geringere Zellzahlen, sind Resistenzbildungen gegen QS-Inhibitoren unwahrscheinlich^{28, 85, 97, 254, 261}. Letztlich eröffnet sich durch die spezieübergreifende Wirkung dieses Ansatzes ein breites Wirkspektrum¹⁹⁵ bei Bakterien, welche über Signalmoleküle *N*-Acyldihomoserinlacton (AHL) kommunizieren.

1.4 Problemstellung – Biofilme Gram-negativer Wasserkeime

Legionellen, Pseudomonaden, Mykobakterien – prominente biofilmbildende Wasserkeime, insbesondere in technischen wasserführenden Anlagen – zählen mehrheitlich zu den Gram-negativen Bakterien. AHL und dessen Derivate steuern im Wesentlichen deren Zell-Zell-Kommunikation und darüber deren Biofilmbildung und die Bildung von Virulenzfaktoren^{26, 56, 95, 104, 119, 135, 213, 247}.

Eine Möglichkeit dieses Signalmolekül enzymatisch zu spalten und auf diese Weise der Biofilmbildung vorzubeugen, kann über AHL-Lactonasen (EC 3.1.1.81) erfolgen^{76, 95, 98, 195, 204, 352}. Die Wirkung der AHL-Lactonasen auf die QS-regulierte Biofilmbildung und die QS-abhängige Bildung von Virulenzfaktoren in unterschiedlichen Bakterienspezies wurde vor allem für *aiaa* untersucht. Hierzu wurde *aiaa*, in die entsprechende Zielspezies kloniert und das Verhalten im Vergleich zu entsprechenden Wildstämmen betrachtet^{96, 98, 265, 323246, 313}.

Die Wirkung von aufgereinigten AHL-Lactonasen wurde bis heute nur für SsoPox und *Pseudomonas aeruginosa*²²⁹ bezüglich des Biofilmwachstums und der Virulenzfaktoren sowie AiiA und *Vibrio cholerae*²¹ bezüglich der Biofilmbildung gezeigt. Es fehlen somit sowohl systematische Untersuchungen zur Wirkung von AHL-Lactonasen auf die Biofilmbildung und die QS-abhängige Produktion von Virulenzfaktoren als auch Untersuchungen zur Wirkung der AHL-Lactonasen auf unterschiedliche Bakterienspezies. Dies liegt unter anderem darin begründet, dass diese Enzyme derzeit nicht kommerziell verfügbar ist.

Für weiterführende, wissenschaftliche Untersuchungen und für einen späteren anti-bakteriellen Einsatz ist zunächst eine großtechnische Herstellung der AHL-Lactonasen mit möglichst geringen Produktionskosten notwendig. Doch auch hierzu fehlen die entsprechenden wissenschaftlichen Erkenntnisse: Bisherige Expressionen von AHL-Lactonasen in *E. coli* und ihre Aufreinigungen wurden mit nur geringen Ausbeuten ausschließlich in Schüttelkolben durchgeführt^{204, 241, 299}. Es müssen daher zunächst die Grundvoraussetzungen einer industriellen Produktion der AHL-Lactonasen, die Herstellung mit hoher Ausbeute in einem einfachen und möglichst günstigen Produktionsprozess, geschaffen werden.

Insbesondere in wasserführenden Systemen, zum Beispiel zur Gewinnung, zur Aufbereitung, zum Transport, zur Lagerung und zur Nutzung von Wasser, verursachen Biofilme große Schäden. Sie beeinträchtigen einerseits die ästhetische und hygienische Qualität des Wassers beziehungsweise des Produktes, andererseits können sie durch Biokorrosion Materialoberflächen zur frühzeitigen Alterung und Zerstörung führen. Hier wäre eine vorbeugende Biofilmvermeidung beziehungsweise –verminderung wünschenswert, beispielsweise indem AHL-Lactonasen unter Erhalt der spezifischen Aktivität immobilisiert werden und in Form von Oberflächenbeschichtungen beziehungsweise in Form von Formulierungen für die Zugabe in Wassersysteme bereitgestellt werden könnten.

1.5 Zielsetzung

Übergeordnetes Ziel dieser Arbeit war es, Oberflächenbeschichtungen und Formulierungen mit biofilmverhindernden Eigenschaften für den Einsatz in technischen wasserführenden Anlagen zu entwickeln und zu bewerten. Dabei sollte die Biofilmbildung durch enzymatische Beeinflussung, gezielt unter Nutzung der Zell-Zell-Kommunikation (QS) beziehungsweise deren Störung (QQ), vorbeugend vermindert oder sogar verhindert werden. Hierzu wurden die AHL-Lactonasen AiiA, AiiB und BlcC (ehemals AttM) angewendet. Diese wurden in der Literatur in der Familie der AHL-Lactonasen als erstes beschrieben und sind im Vergleich zu anderen AHL-Lactonasen am besten charakterisiert.

Konkret sollten AiiA, AiiB und BlcC in einem 7 L-Reaktor in *Escherichia coli* (*E. coli*) exprimiert und mittels chromatographischer Methoden aufgereinigt werden. Anschließend sollten diese Enzyme über drei verschiedene Strategien immobilisiert werden:

- Physisorption an Partikeloberflächen,
- kovalente Bindung an Oberflächen (Chemisorption) und
- Einschluss in eine polymere Matrix (Hydrogel).

Diese unterschiedlichen Immobilisierungsverfahren ergänzen sich bezüglich ihrer Vor- und Nachteile in verschiedenen Anwendungsfällen (siehe hierzu Kapitel 3.2).

Gewinnung der AHL-Lactonasen durch Expression in *E. coli* – Fermentation und Aufreinigung der Enzyme mittels chromatographischer Methoden

Das erste Ziel dieser Arbeit war es, geeignete Expressionsparameter aus Schüttelkolbenversuchen auf die Expression in einem Bioreaktor zu übertragen und die so rekombinant hergestellten Enzyme mit chromatographischen Verfahren aufzureinigen. Hierbei sollten folgende Aufgaben bearbeitet werden:

1. Übertragung optimaler Expressionsparameter aus Schüttelkolbenversuchen (Startzellzahl, Expressionstemperatur und -zeit sowie Konzentration des Induktors) auf die Expression der AHL-Lactonasen als lösliches Protein in einem 7 L-Reaktor.
2. Verfahrensentwicklung zur Aufreinigung der exprimierten AHL-Lactonasen über chromatographische Methoden beziehungsweise die Kombination chromatographischer Methoden.

Immobilisierung der AHL-Lactonasen unter Erhalt der spezifischen Aktivität

Das zweite Ziel, die Entwicklung und Charakterisierung der Immobilisierungsstrategien (Physisorption, Chemisorption, Einschluss im Hydrogel), sollte durch folgende Arbeiten erreicht werden:

3. Untersuchung der Eignung zur proteinschonenden Immobilisierung der Enzyme unter Erhalt ihrer spezifischen Aktivität.
4. Ermittlung und Vergleich der Freisetzungsrates der ausgewählten Immobilisierungsmethoden.

Mikrobiologische Bewertung der Immobilisierungsmethoden

Das dritte Ziel ist die Übertragung der zur Proteinimmobilisierung geeigneten Methoden auf die Immobilisierung der AHL-Lactonasen AiiA, AiiB und BlcC. Hierbei werden ihre antibakteriellen und biofilmvermeidenden Eigenschaften im Biofilmmassay geprüft.

5. Prüfung des speziesunabhängigen Wirkspektrums an ausgewählten Gram-negativen Organismen.
6. Ermittlung des Einflusses von immobilisierten Enzymen auf die Biofilmbildung und die Produktion von Virulenzfaktoren.

1.6 Vorgehen

Abbildung 1 zeigt das generelle Vorgehenskonzept dieser Arbeit. Es unterteilt sich in vier Vorgehensschritte: die Herstellung und Aufreinigung dreier AHL-Lactonasen, die Entwicklung und Charakterisierung von Immobilisierungsmaterialien, die Immobilisierung der AHL-Lactonasen und ihre abschließende mikrobiologische Bewertung.

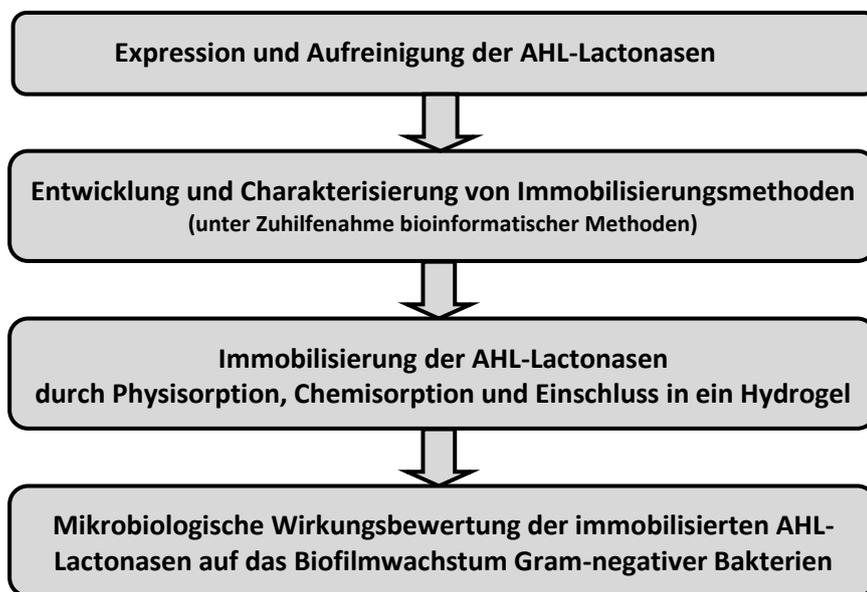


Abbildung 1: Vorgehensweise dieser Arbeit

Für antimikrobielle Strategien muss als Grundvoraussetzung das Bakterizid in ausreichender Quantität bereitgestellt werden. Dies gilt auch für den Einsatz von AHL-Lactonasen zur Biofilmvermeidung unter Ausnutzung des *Quorum Quenchings*. Bisherige Arbeiten zur Expression und Aufreinigung der AHL-Lactonasen erfolgten ausschließlich im Kleinmaßstab des Schüttelkolbens^{176, 241, 298, 299, 346}. Daher wurden in dieser Arbeit zunächst die Expressionsparameter, welche sich in Schüttelkolbenversuchen als optimal erwiesen haben¹⁷⁶, auf die Expression in einem Bioreaktor übertragen. Im Anschluss wurden verschiedene chromatographische Methoden zur Aufreinigung der AHL-Lactonasen angewandt, so dass letztendlich die für die Immobilisierung ausgewählten AHL-Lactonasen in ausreichender Quantität und in einem hohen Reinheitsgrad verfügbar waren.

Unterschiedliche Enzym-Immobilisierungsmethoden wie Physisorption, Chemisorption und Einschluss in eine polymere Matrix wurden auf ihre Eignung zunächst anhand von Modellenzymen (Subtilisin, DNase und Lysozym) getestet. Geeignete Immobilisierungsmethoden wurden nachfolgend unter Zuhilfenahme von bioinformatischen Methoden an die Zielenzyme AiiA, AiiB und BliC angepasst. Diese wurden abschließend auf ihre biofilmvermeidenden Eigenschaften untersucht und bewertet.

2 Stand der Technik

Zur Bekämpfung von Biofilmen unterscheidet man grundlegend zwischen zwei Strategien:

- Maßnahmen zur Entfernung von bereits etablierten Biofilmen und
- vorbeugende Maßnahmen zur Vermeidung der Biofilmbildung.

Die antimikrobielle Ausrüstung von Oberflächen ist eine wichtige vorbeugende Maßnahme zur Vermeidung der Biofilmbildung. Aufgrund ihrer Bedeutung für diese Arbeit wird sie in einem eigenen Kapitel (Kapitel 2.3) gesondert betrachtet.

2.1 Maßnahmen zur Entfernung von etablierten Biofilmen

Ziel von Maßnahmen zur Entfernung von bereits etablierten Biofilmen ist es, die Qualität des fließenden Mediums sicherzustellen und/oder einzelne Anlagenteile in ihrer Funktion zu erhalten. Diese Maßnahmen beruhen in der Regel auf der mechanischen Reinigung. Dies ist zwar die effektivste Reinigungsmethode, sie ist aber, je nach Zugänglichkeit der Anlage, nicht immer anwendbar. Im Fall der chemischen, thermischen und physikalischen Reinigungsverfahren werden die Biofilmorganismen lediglich abgetötet und verbleiben als tote Biomasse weiterhin im System. In dieser Weise können sie als Nährstoffe für weitere Organismen dienen, die wiederum zu einer erneuten Biofilmbildung führen. Als Lösung für dieses Dilemma bieten sich Kombinationsverfahren an wie die Kombination von chemischen Reinigungsverfahren mit der mechanischen Reinigung. Alle hier vorgestellten Reinigungsverfahren haben zum Nachteil, dass sie oftmals den Biofilm nicht vollständig entfernen können und die jeweiligen Mikroorganismen sich an die eingesetzten Chemikalien sowie angewandten Umgebungsbedingungen sehr schnell anpassen können und entsprechende Resistenzen ausbilden.

2.1.1 Mechanische Reinigungsverfahren

Bei der einfachsten mechanischen Reinigung wird das System mit hohem Wasserdruck durchgespült. Die daraus resultierenden hohen Scherkräfte können den Biofilm abtragen¹⁰⁸. Bei der Wasserstrahlreinigung wird das System aktiv mit Wasser in hoher Geschwindigkeit und Wasserdruck gereinigt²⁷⁷. Beide Methoden sind nur bedingt wirksam.

Weit effektiver, aber in ihrer Anwendung eingeschränkt, sind die mechanischen Reinigungsverfahren mit Reinigungskörpern. Im einfachsten Fall wird mit einer Bürste der Biofilm durch hin- und herbewegen abgelöst. In der Industrie werden häufig spezielle querschnittsfüllende Reinigungsgeräte, so genannte Molche (englisch: *pig*), zur Reinigung von Rohrleitungen eingesetzt. Diese Lauf- oder Passkörper werden in aller Regel passiv unter Zuhilfenahme von Luft- oder Wasserdruckstößen durch die Leitungen getrieben²⁷⁷.

Weiterhin werden ferngesteuerte Roboter zur Reinigung bei größeren Querschnitten eingesetzt. Diese bieten den Vorteil, dass gleichzeitig über eine Kamera das Leitungssystem inspiziert werden kann.

2.1.2 Chemische Reinigungsverfahren

Zunächst muss zwischen der Reinigung, dem Entfernen unerwünschter Substanzen einerseits und der Desinfektion, dem Abtöten von (potentiell) pathogenen Mikroorganismen, andererseits unterschieden werden.

Durch eine gründliche Reinigung unter Verwendung von mechanischen Hilfsmitteln wie Bürsten oder Ähnlichem kann bereits ein Großteil der Mikroorganismen und ihrer Stoffwechselprodukte entfernt werden. Die hierzu verwendeten Reinigungsmittel werden ihrem Aufbau entsprechend in alkalische, neutrale und saure Reinigungsverfahren eingeteilt. Alkalische Reinigungsmittel wie Natronlauge, Soda, Wasserglas oder Disilikate sind die am häufigsten benützten Reiniger³²⁸. Ihre Wirkung beruht auf der Aufquellung und der Zersetzung der Schmutzrückstände¹³¹. Zusätzlich werden ihnen zur Steigerung der Reinigungsleistung Nitrilotriessigsäure oder Ethylendiamintetraessigsäure als Komplexbildner, welche die Härtebildner des Wassers komplexieren, oder Tenside zur Herabsetzung der Oberflächenspannung zugegeben³²⁸. Hauptkomponenten neutraler Reinigungsmittel sind Tenside. Darüber hinaus können sie zur Verbesserung der Reinigungsleistung Enzyme, Komplexbildner und Schaumregulatoren enthalten^{131, 328}. Organische oder anorganische Säuren wie Phosphor- oder Salpetersäure werden als saure Reinigungsmittel zur Entfernung kalkhaltiger Rückstände eingesetzt^{131, 328, 334}. Ihnen werden aufgrund ihres niedrigen pH-Wertes häufig Korrosionsinhibitoren zugesetzt.

Desinfektionsmittel unterscheiden sich sowohl in ihrem chemischen Aufbau als auch in ihrer physikalischen Wirkung – sie wirken im Allgemeinen multifaktoriell. Es müssen vorgegebene Einwirkzeiten und Wirkkonzentrationen eingehalten werden, um eine Anpassung beziehungsweise Adaption der Organismen an das Desinfektionsmittel zu verhindern. Eine eingetretene Anpassung kann durch Änderung der Umgebungsbedingungen, zum Beispiel durch Änderung der Temperatur oder der Dosierung, rasch wieder verloren gehen³²⁸. Der Erfolg der Desinfektion wird durch die Faktoren pH-Wert, Temperatur, Konzentration und Einwirkzeit bestimmt³²⁸. Bei optimalen Bedingungen können 99 % der Mikroorganismen abgetötet werden¹³¹. Tabelle 1 zeigt einen Überblick über die wichtigsten Desinfektionsmittelgruppen und deren Wirkungsweise.

Kombinierte Reinigungs- und Desinfektionsverfahren bieten den Vorteil von Reinigung und Desinfektion in nur einem Arbeitsschritt. Als kombinierte Reinigungs- und Desinfektionsmittel werden oftmals alkalische Reiniger mit Aktivchlorzusatz eingesetzt³²⁸.

Tabelle 1: Wirkungsweisen der wichtigsten Desinfektionsmittelgruppen nach Wildbrett³³⁴

Desinfektionsmittel	Wichtigste Vertreter	Wirkung
Aldehyde	Formaldehyd, Glutaraldehyd, Glyoxal	Reaktive Aldehydgruppe reagiert mit Amino- und Amidgruppen von Proteinen und führt zur Schädigung der Zellwand
Alkohole	Ethanol, Propanol, Isopropanol	Denaturierung von Proteinen im Konzentrationsbereich 50-80 %
Amphotenside	Betaine	Interaktion mit der Zellmembran
Guanidine	Alkylguanidin, Polyguanidin	Interaktion mit der Zellmembran
Halogene	Chlor, Chlor-Abspalter, Jodophore	Wirkung als starkes Oxidationsmittel, Bildung von unterchloriger Säure in wässriger Umgebung, Reaktion von Chlor mit Thiolgruppen von Enzymen
Laugen	Natronlauge, Kalilauge	Proteindenaturierung bei pH > 10
Peroxide	Wasserstoffperoxid, Peressigsäure	Wirkung als starkes Oxidationsmittel
Phenole	Kresole, Xylenole	Interaktion mit der Zellmembran, Reaktion mit Proteinen
Quaternäre Ammoniumsalze	Alkyldimethylbenzylammoniumchlorid	Interaktion mit der Zellmembran
Säuren	Ameisensäure, Essigsäure, Milchsäure, Propionsäure	Proteindenaturierung bei pH < 4

2.1.3 Thermische Desinfektion

Bei der thermischen Desinfektion werden Biofilmorganismen durch Erhitzen des Systems beispielsweise auf 100 °C abgetötet. Dies muss mit ausreichend langen Einwirkzeiten (mehrere Minuten) geschehen²⁶⁷.

2.1.4 Physikalische Reinigungsverfahren

Physikalische Reinigungsverfahren spielen in der Anwendung eine eher untergeordnete Rolle, dennoch werden sie hier der Vollständigkeit halber kurz aufgeführt. Hierzu zählen das Anlegen von elektrischen oder magnetischen Feldern¹⁸⁸, die Anwendung von Ultraschall^{188, 277} und die Plasmareinigung²⁹. Das am häufigsten angewandte physikalische Reinigungsverfahren ist die Reinigung über UV-Desinfektion im Bereich von 200 - 300 nm^{83, 106, 202}.

2.1.5 Kombinierte Reinigungs- und Desinfektionsverfahren

Die Reinigungsleistung kann verbessert werden, wenn Reinigungs- mit Desinfektionsverfahren kombiniert werden. Eine Vielzahl an Kombinationsmöglichkeiten ist in der Theorie möglich und wird auch in der Praxis angewandt. Beispielsweise wird die Effektivität der mechanischen Reinigung durch heiße Reinigungsmittel erhöht⁶⁰ oder die Reinigungsleistung der UV-Desinfektion durch die Kombination mit Chlor verbessert¹⁹⁷.

2.2 Vorbeugende Maßnahmen zur Vermeidung und Verminderung von Biofilmen

Ist der Biofilm in einem System ausgebildet, kann er wie in Kapitel 2.1 beschrieben nur sehr schwer wieder entfernt werden. Daher wird versucht, der Biofilmbildung von Beginn an vorzubeugen. Hierzu gibt es drei Ansätze: Die konstruktive Gestaltung der Anlage, die Optimierung der Umgebungsbedingungen und die Auswahl des Anlagenmaterials.

2.2.1 Konstruktive Gestaltung der wasserführenden Anlage

Die bedeutendste vorbeugende Maßnahme zur Vermeidung der Biofilmbildung ist die konstruktive Gestaltung der wasserführenden Anlage. Bei der Konstruktion wird die einfache Zugänglichkeit für die Reinigungsmaßnahmen beziehungsweise die generelle Reinigungsfähigkeit der Anlage miteinbezogen²⁶⁷. Darüber hinaus werden Bereiche mit niedriger Fließgeschwindigkeit wie Toträume, starke Stau- und Totwasserströmungen sowie Spalten vermieden²⁶⁷. Es werden in der Anlage nach Möglichkeit erhöhte Fließgeschwindigkeiten und Scherkräfte angestrebt.

2.2.2 Optimierung der Umgebungsbedingungen

Biofilme wachsen bevorzugt an feuchten und warmen Stellen, sofern dort ein Minimum an Nährstoffen gewährleistet ist. Diese Grundvoraussetzungen des Biofilmwachstums sind die Angriffspunkte der Biofilmvermeidung durch Optimierung der Umgebungsbedingungen. Durch Veränderungen der Prozesstemperatur oder durch periodisches Trockenlegen des Systems kann der Biofilmbildung wirksam begegnet werden. Die Minimierung des anorganischen und organischen Nährstoffeintrages sowie des Eintrages von Sauerstoff ist ebenfalls eine geeignete Methode der Biofilmbildung entgegen zu wirken^{9, 83, 288}. Organische und anorganische Partikel können zum Beispiel vor dem Eintritt in das System abfiltriert werden. Bei geeigneter Filterporenweite lassen sich selbst Mikroorganismen abtrennen.

2.2.3 Auswahl des Anlagenmaterials

Über die Auswahl des Materials kann die Biofilmbildung beeinflusst werden. Maßgeblich hierfür sind die freie Oberflächenenergie, die Topographie und die Korrosionsbeständigkeit des Materials. Mikroorganismen adhären verstärkt auf hydrophilen Oberflächen, das heißt auf Oberflächen mit hoher freier Oberflächenenergie und guten Benetzungseigenschaften⁶⁰. Oberflächen mit geringer freier Oberflächenenergie sind dennoch geeignet die bakterielle Adhäsion zu erschweren. Dies wird durch die Oberflächentopographie noch verstärkt: Je glatter und sauberer eine Oberfläche ist, desto unwahrscheinlicher ist die mikrobielle Kolonisierung^{60, 108, 267}. Je korrosionsbeständiger ein Material ist, desto länger bleibt dessen

Glattheit erhalten. Dies bedeutet, dass ein korrosionsbeständiges Material die Biofilmbildung mittelfristig erschwert.

2.3 Antimikrobielle Oberflächen

Im vorangegangenen Kapitel 2.2.3 wurde beschrieben wie durch die Materialauswahl die Biofilmbildung auf Oberflächen verringert beziehungsweise ganz vermieden werden kann. Gezielte antimikrobielle Oberflächenbeschichtungen respektive -behandlungen können diese Wirkung noch verstärken. Man unterscheidet generell zwischen aktiven wirkstoffbeladenen Oberflächenbeschichtungen, welche je nach Beschichtungsart freigesetzt werden können, und passiven Materialien, bei denen der antimikrobielle Effekt auf Oberflächenstrukturierungen basiert.

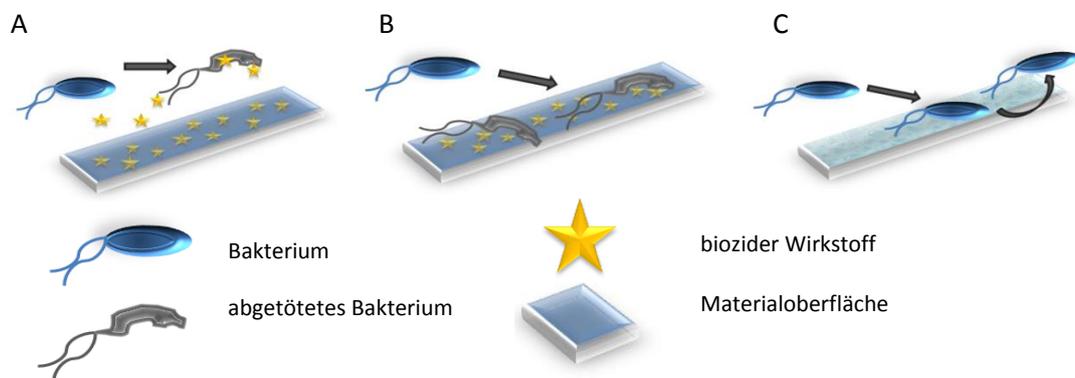


Abbildung 2: Schematische Darstellung von antimikrobiellen Oberflächenausrüstungen

A) Oberflächenbeschichtungen mit freisetzbaren Wirkstoffen; B) Oberflächenbeschichtungen ohne Freisetzung des Wirkstoffes; C) Oberflächenbeschichtung zur Adhäsionsreduzierung

Abbildung 2 zeigt drei Möglichkeiten zur antimikrobiellen Oberflächenausrüstung:

- Oberflächen mit freisetzbarem Wirkstoff,
- Oberflächen ohne Freisetzung eines Wirkstoffes und
- Oberflächen zur Adhäsionsreduzierung.

2.3.1 Oberflächen mit freisetzbarem Wirkstoff

Zur Herstellung von Oberflächen mit freisetzbarem Wirkstoff wird auf einer Materialoberfläche aus Metall, Kunststoff oder anorganischen Trägermaterialien eine poröse Matrix aus organischen oder polymeren Schichten aufgetragen. So entsteht ein Bioziddepot in einer geeigneten Immobilisierungsmatrix. Hieraus oder direkt aus dem Material diffundieren biozide Wirkstoffe in das umgebende Medium, die entweder die Zellwand, den Stoffwechsel oder das Genom von Mikroorganismen angreifen. Diese antimikrobiellen Substanzen können in Nano- oder Mikrokapseln aus Polymeren eingeschlossen in der Matrix eingebettet

sein. Zur Verkapselung können beispielsweise Polyethylenglykol und Polyanhydridimide³⁰⁸, Liposome²³ oder Cyclodextrine¹³⁷ angewandt werden. Bioabbaubare Polymere, basierend auf Polymilchsäure oder Carboxymethylcellulose^{78, 308} beschleunigen, zusätzlich die Freisetzung der verkapselten Wirkstoffe. Zumeist befinden sich diese Depotsysteme noch in der Entwicklung. Marktreife Oberflächen mit freisetzbarem Wirkstoff beschränken sich im Wesentlichen auf Antifouling-Anstriche im marinen Bereich: Aus diesen Farbanstrichen werden verschiedene Wirkstoffklassen zu Biofilmbekämpfung freigesetzt.

Als freisetzbare antimikrobielle Substanzen eignen sich biologische Wirkstoffe (Antibiotika, antimikrobielle Peptide, biogene Antifouling-Substanzen und Enzyme), Übergangsmetallionen (Kupfer, Silber und Bismut) und deren Salze, oxidierende Agenzien (Halogene) und reduzierende Agenzien, Tenside, quartärere Ammoniumsalze und verschiedene organische Verbindungen (Nitroverbindungen, Aldehyde und weitere).

Antibiotika sind natürliche wachstumshemmende Biozide, die von Mikroorganismen zum Selbstschutz gebildet werden. Sie spielen in der Medizin eine sehr große Rolle bei der Infektionsbekämpfung³⁰³. In der Industrie werden sie hingegen kaum zur Biofilmbekämpfung eingesetzt: Zum einen ist die Gefahr der Bildung von multiresistenten Keimen sehr groß und zum anderen sind sie wirkungslos gegenüber Biofilmorganismen, welche durch die sie umgebende EPS-Matrix gut geschützt sind²⁹¹.

Zur enzymatischen Biofilmbekämpfung eignen sich Proteasen wie Trypsin und α -Amylasen^{52, 83, 198}, Lipasen^{83, 198}, Cellulasen^{83, 205}, Hydrolasen¹⁹⁸ sowie Glycosidasen wie Lysozym und Dispersin B^{53, 198, 221}. Sie alle können die Polysaccharide der EPS-Matrix⁸³ zerstören. Erste Produkte zur enzymatischen Biofilmbekämpfung sind bereits auf dem Markt, wie das Koi-Enzym von Fish-Pharma B.V. (Landhorst, NL), welches zur Bekämpfung von *Aeromonas*- und *Pseudomonas*-Biofilmen in Teichen angewandt wird oder die Biorem-Produktlinie der Firma S.A. Realco N.V. (Louvain-la-Neuve; BE) zur Biofilmentfernung in Filtersystemen der Nahrungsmittelindustrie und Trinkwasseraufbereitung.

Eine zunehmend an Bedeutung gewinnende Strategie zur Adhäsionsverhinderung durch freigesetzte Wirkstoffe ist das biogene Antifouling. Darunter versteht man das Verhindern der Anhaftung und Ansammlung von Organismen auf biotischen und abiotischen Oberflächen durch nicht oder nur gering toxische biogene Substanzen^{42, 94}. Diese metabolischen Substanzen, welche oftmals aus Mikroalgen wie Cyanobakterien⁷⁷ oder aus Makroalgen gewonnen werden, gehören zu den Fettsäuren, Terpenen, Terpenoiden, Lipoproteinen, Glycolipiden, Phenolen, Lactonen, Peptiden, Steroiden, Amiden, Alkaloiden, Pyrrolen und Furanonen^{2, 77, 189}. Obwohl in den vergangenen Jahren zur Entwicklung der Marktreife von ungiftigen Antifoulingfarben basierend auf biogenen Wirkstoffen intensive Anstrengungen unternommen wurden, ist deren Einsatz derzeit noch verschwindend gering.

Salze und Ionen von Übergangsmetallen, wie Kupfer, Silber und Zink^{47, 78, 200, 283, 313}, werden als biozide Agenzien verwendet und sind bereits in Gebrauchsgegenstände eingebracht. Eine Sonderrolle fällt hier Silber zu: Es wird in Deodorants, Haushaltsgegenständen und Kleidung eingebracht, um nur einige wenige Beispiele zu nennen. Die antimikrobielle Wirkung dieser Ionen beruht auf dem oligodynamischen Effekt. Das Silber bindet an schwefelhaltigen funktionellen Gruppen von Aminosäuren und Proteinen und führt so zu deren Inaktivierung^{34, 143}.

Die antibakterielle Wirkung von oxidierenden Agenzien wie Peroxiden beruht auf der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (OH-Radikal, H₂O₂, O₂-Radikal), welche Lipide, Proteine⁸⁸ und die DNA schädigen¹⁰³. Halogenhaltige Biozide, Wirkstoffe mit Chloratomen (Natrium- oder Calciumhypochlorit, Chlor, Chlordioxid sowie anorganische und organische Chloramine), werden im Kampf gegen Mikroorganismen und Biofilme in großen Mengen, vor allem bei der Trinkwasserdesinfektion, eingesetzt. Sie inhibieren als starke Oxidationsmittel enzymatische Schlüsselreaktionen innerhalb der Zellen und führen durch Reaktion mit Thiolgruppen zur Proteindenaturierung²⁷³.

Reduzierende Agenzien wie Dithiothreitol (DTT) und β -Mercaptoethanol agieren mit Disulfidbrücken in Proteinen und denaturieren das Protein. Nitroverbindungen und aromatische Verbindungen wie Benzimidazol, führen zu reaktiven und toxischen Nitroso- oder Hydroxylaminspezies. Diese Reduktionsprodukte können in die intrazelluläre Elektronenübertragung eingreifen³³. Aufgrund ihrer unspezifischen Wirkung auf Proteine ist die Anwendung dieser Agenzien in der Praxis jedoch stark eingeschränkt.

Weitere Beispiele für zur Freisetzung eingesetzter Biozide sind quartäre Ammoniumsalze¹⁸⁶, Polyhexamethylenbiguanidhydrochlorid³⁰⁷, welches mit negativen Lipiden in Gram-negativen Bakterien interagiert¹⁶⁵, und Triclosan (5-Chloro-2-(2,4-Dichlorphenoxy)-phenol)⁸⁰. Letzteres findet einen breiten Einsatz in Hygieneartikeln wie Zahnpasta und Deodorants sowie in Gebrauchsgegenständen des Alltags³⁹. Es inhibiert in Bakterien das NADH- oder NADPH-abhängige Enoyl-Acyl-Carrierprotein Reduktase²⁷⁴.

2.3.2 Oberflächen ohne Freisetzung des Wirkstoffes

Bei kontaktaktiven, antimikrobiellen Oberflächen ohne Freisetzung eines Wirkstoffes werden die Anhaftung und das mikrobielle Wachstum durch den direkten Kontakt der Mikroorganismen mit der Oberfläche unterbunden. Der Wirkstoff, das antimikrobielle Polymer oder die photokatalytisch aktive Schicht wird kovalent an das Material (Metall, Polymer oder anorganische Trägermaterialien) gebunden.

Antimikrobielle Peptide und Enzyme sind die häufigsten Wirkstoffklassen, welche zur Biofilmvermeidung kovalent an Oberflächen gebunden werden. Antimikrobielle Peptide wie β -Defensine (Magainin, Cecropin A) sind Bestandteil des angeborenen Immunsystems in

Wirbeltieren, Pflanzen, Bakterien, Pilzen und Viren. Sie besitzen ein sehr breites Wirkungsspektrum ohne den Nachteil der Resistenzbildung. Sie zerstören durch Porenbildung die Zellmembran der Zielzelle. In der Regel werden sie mittels Physi- oder Chemisorption (mit und ohne Spacer) sowie mittels Layer-by-layer Assembly immobilisiert^{69, 238}. Enzyme wie Proteasen^{52, 83, 198} oder Lipasen^{83, 198} werden häufig zur Biofilmbekämpfung eingesetzt. Diese werden, wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben, in erster Linie frei in Lösung angewandt; sie können aber auch über kovalente Anbindung beispielsweise mittels Glutardialdehyd an Amino-funktionalisierten Oberflächen immobilisiert werden²²¹. In der Praxis spielt ihr Einsatz derzeit eine stark untergeordnete Rolle; es sind derzeit noch reine Forschungsansätze.

Neben der Ankopplung von antimikrobiell aktiven Substanzen sind Beschichtungen mit antimikrobiellen Polymeren eine weitere Möglichkeit zur Biofilmbekämpfung ohne Freisetzung eines Wirkstoffes. Diese Kontaktbiozide sind über funktionelle Gruppen kovalent an der Oberfläche gebunden. Beispiele hierfür sind an Polymere kovalent gebundene quaternäre Ammoniumgruppen^{133, 349}, Polymere mit kationischen Funktionen beispielsweise Polyethylenimine, welche die bakterielle Zellwand zerstören^{126, 138, 185, 220}, Guanidin-komponenten¹⁶⁶ sowie Polymere mit Betainstrukturen^{123, 127}. Hierbei handelt es sich bisher lediglich um Forschungsansätze, welche noch keine Produktreife erlangt haben.

Eine Sonderrolle nehmen Poly-(β -1-4)-2-amino-2-deoxy-D-glucofuranose, kurz Chitosan, und dessen Derivate ein, welche begrenzt sowohl antimikrobiell als auch fungizid wirken. Diese Wirkung beruht auf mehreren Faktoren, vor allem auf seiner positiven Ladung und den chelatbildenden Eigenschaften. Je nach Molekulargewicht, dem Deacetylierungsgrad und Substituenten am Chitosan variieren die antimikrobiellen Eigenschaften: hochmolekulares Chitosan beispielsweise umhüllt den Mikroorganismus und unterbindet so dessen Nährstoffaufnahme, wohingegen niedermolekulares Chitosan in die Zelle eindringen kann und dort sein antibakterielles Potential entfaltet. Aufgrund seiner biologischen Abbaubarkeit, seiner Biokompatibilität und seiner nicht-toxischen Eigenschaften findet es heutzutage einen weitverbreiteten Einsatz in der Lebensmittelindustrie, beispielsweise als Konservierungsmittel oder in Lebensmittelverpackungsmaterialien, in der Medizintechnik vor allem als Partikel zur Wirkstofffreisetzung in Wundauflagen und Wundverbandsmaterialien sowie in der Textilindustrie¹⁸⁴.

Außerdem können antimikrobiell aktive Oberflächen durch photokatalytische Schichten erzeugt werden. Sie bestehen aus photokatalytisch aktiven Metalloxiden wie Titandioxid in Anatas-Modifikation oder Selendioxid¹⁹⁹. Die antimikrobiellen Eigenschaften solcher Schichten beruhen auf dem katalytischen Effekt in Gegenwart von Wasser und Sauerstoff auf der Bildung von reaktiven OH-Radikalen, welche die bakterielle Zellwand schädigen¹⁸⁷. Dieser Ansatz besitzt, im Vergleich zu den beiden bisher vorgestellten, praktische Relevanz.

So setzt beispielsweise MOL Katalysatortechnik GmbH, Schkopau, auf ein lichtinduziertes katalytisches Verfahren zur Vermeidung von Biofilmen auf Anlagenoberflächen im Bereich der Wasserversorgung sowie der Kühl- und Klimatechnik.

2.3.3 Oberflächen zur Adhäsionsreduzierung

Durch Oberflächenmodifizierungen zur Adhäsionsreduzierung wird ausschließlich das Anhaften von Mikroorganismen und Schmutzstoffen an der Materialoberfläche verhindert, wohingegen der Mikroorganismus selbst nicht angegriffen wird²⁶³. Typische Ansätze hierfür sind die Ausrüstung von Bauteiloberflächen aus Metall, Kunststoff oder Keramik mit hydrophoben oder hydrophilen Beschichtungen oder die Strukturierung über Mikrodomänen wie bei dem so genannten Lotuseffekt²⁶³.

Die Herstellung hydrophiler Oberflächen wird in der Literatur beispielsweise durch Hydrogele mit Polyethylenglykolen^{53, 278}, Polyglykolsäure und Polymilchsäure beschrieben^{170, 278}. Hydrogele besitzen zusätzlich durch die Kompression der Polymerketten die Fähigkeit zur elastischen Abstoßung. Erste Anwendungen finden hydroviskose Beschichtungen in Schiffs- und Bootsanstrichen.

Hydrophobe Oberflächen lassen sich über die Beschichtung mit beispielsweise unterschiedlichen fluorhaltigen Polysiloxanen und -silanen wie Polytetrafluorethylen oder Silikon herstellen. Für den marinen Anwendungsbereich sind beispielsweise Silikon- und Teflon®-Farben weit verbreitet.

So genannte „easy-to-clean“-Oberflächen besitzen per se keine bioziden Eigenschaften. In Kombination mit der mechanischen Reinigung in regelmäßigen Intervallen kann der Biofilm hierdurch effektiv entfernt werden. Hierzu zählen beispielsweise antimikrobielle Beschichtungen mit diamantähnlichen Kohlenstoffschichten, welche mittels Plasmaverfahren erzeugt werden können⁶ und antiadhäsive Oberflächen mit einer negativen Ladung, welche beispielsweise über die Ausrüstung mit Indium- oder Zinnoxid hergestellt werden können¹⁷⁷. Bei negativ geladener Bakterienwand verhindert die elektrostatische Abstoßung die Anhaftung negativ geladener Mikroorganismen auf negativ geladenen Oberflächen.

Intelligente oder Stimulus-responsive Materialien sind in der Lage, ihre physikochemischen Eigenschaften bei Änderungen der Umgebungsbedingungen schnell und reversibel zu ändern²⁴. Für Antibewuchs-Anwendungen im marinen Bereich werden wie bei Schiffs- und Bootsanstrichen in erster Linie Polymere, welche auf pH- oder Temperaturwechsel reagieren, genutzt. In der Literatur wird für diese Anwendung am häufigsten das Polymer Poly(*N*-Isopropylacrylamid) beschrieben, welches in Abhängigkeit der Umgebungstemperatur seine Benetzungseigenschaften ändern kann²⁴.

3 Theoretische Grundlagen dieser Arbeit

3.1 Molekular- und mikrobiologische Grundlagen

Im Folgenden werden der Biofilm und seine Entstehung näher erläutert sowie das *Quorum Sensing* Gram-negativer Bakterien beschrieben. Weiterhin wird die Störung des QS, das *Quorum Quenching*, vorgestellt und es werden die in dieser Arbeit verwendeten *N*-Acyl-homoserinlacton-Lactonasen beschrieben.

3.1.1 Der Biofilm und seine Entstehung

Bei einem Biofilm handelt es sich um eine strukturierte Gemeinschaft von Mikroorganismen, welche in einer selbstproduzierten polymeren Matrix eingebettet sind und an einer inerten oder biologischen Oberfläche anhaften⁷⁰. Sie besitzen im Vergleich zu planktonischen Zellen eine spezielle Genexpression und unterscheiden sich in ihrem Phänotyp¹⁰⁰.

Diese bakterielle Lebensform ist in der Natur sehr weit verbreitet. Nahezu alle Bakterien sind in der Lage Biofilme zu bilden⁹¹, da es sich hierbei um eine Strategie handelt, widrigen Umwelteinflüssen und Umgebungsbedingungen wie extremen Temperaturen, pH-Werten¹³⁹, Austrocknung oder antibakteriellen Substanzen¹⁶⁷ zu begegnen. Mittels Biofilmbildung können selbst oligotrophe Habitate besiedelt werden, da durch die negativ geladene und hydrophobe EPS Ionen und organische Kohlenstoffe aus nährstoffarmen Medien akkumuliert werden¹⁴⁸. Es können sich synergistische Mikrokonsortien verschiedener Spezies ausbilden, die gemeinsam durch Kombination ihrer Stoffwechselwege in der Lage sind, komplexe Substrate, wie Polysaccharide, Proteine oder Glykoproteine, als Nahrungsquelle zu nutzen¹⁴⁸. Die räumliche Nähe im Biofilm begünstigt den genetischen Austausch und den lateralen Gentransfer zur Weitergabe von beispielsweise Antibiotikaresistenzen¹⁴⁸.

Die EPS-Matrix ist eine Schutzschicht für die eingebetteten Mikroorganismen, beispielsweise gegen Phagozyten¹⁴⁸ sowie gegenüber Bioziden. Dies liegt darin begründet, dass der Wirkstoff aufgrund von niedrigen Diffusionsraten oder frühzeitiger Degradation in den Randschichten nicht in das Innere des Biofilms gelangen kann.

Zusätzlich befindet sich ein Teil der Biofilmorganismen in einem Stadium der metabolischen Ruhe und ist dadurch nicht durch Biozide angreifbar. Ein weiterer Teil der Zellen in einem Biofilm weisen eine Art Biofilm-Phänotypus auf, der sich vom planktonischen Typus durch eine veränderte Genexpression unterscheidet. So können beispielsweise antibiotikaabbauende Enzyme in ihrer Expression hochreguliert sein^{70, 148}.

Der Hauptbestandteil des Biofilms ist mit bis zu 98 % Wasser. Dieses wird durch extrazelluläre polymere Substanzen wie Exopolysaccharide, Proteine und Nukleinsäuren⁷² gebunden und bildet um die Biofilmmikroorganismen eine gelartige hydratisierte Matrix, die zur mechanischen Stabilisierung dient¹⁰⁰. Neben den EPS können organische und anorganische Partikel exogenen Ursprungs sowie gelöste Stoffe in die Matrix eingebaut werden¹⁰⁰. Diese EPS bilden die Grundlage der dreidimensionalen Struktur des Biofilms, welche in Form von turm- und pilzartigen Gebilden und filamentösen Auswüchsen (*streamers*)^{139, 148}, als flächendeckende flache Bewüchse¹⁵², als kompakter und dichter Biofilm in Form eines Maiskolben (*corn cob*), in Form von Borsten einer Bürste (*bristle brush*), als Rosette oder in Pallisadenform vorkommen können³³⁹.

Wassergefüllte Kanäle innerhalb der EPS-Matrix gewährleisten den Nährstoff- und Sauerstofftransport bis in die tiefen Regionen des Biofilms und sorgen für den Abtransport von Stoffwechselprodukten^{73, 167}. Dieser komplexe Aufbau begünstigt die metabolische Kooperation verschiedener Bakterienspezies, da hierdurch unterschiedliche Kompartimente mit unterschiedlichen Umgebungsbedingungen gebildet werden¹⁶⁷.

Die Bildung dieser stark unterschiedlichen Biofilmstrukturen wird durch die Umgebungsbedingungen, wie Fließgeschwindigkeit und Scherkräfte, Nährstoffangebot und Substrat, sowie die Biofilmorganismen beeinflusst. Hohe Scherkräfte begünstigen die Ausbildung von visko-elastischen *Streamer*-Biofilmen, wohingegen unter stehenden oder nur langsam fließenden Bedingungen sich pilzförmige Biofilme bilden^{139, 148}. Unter nährstoffreichen Bedingungen sind die Biofilme allgemein dicker und dichter als unter nährstoffarmen Bedingungen¹⁴⁸. Neben den Umgebungsbedingungen können intrinsische Faktoren wie die Zell-Zell-Kommunikation (*Quorum Sensing*) und der horizontale Gentransfer Form und Ausmaß des Biofilms beeinflussen¹⁴⁸.

Bei der Entstehung des Biofilms handelt es sich um einen Entwicklungsprozess in fünf Phasen²⁹⁴: Besiedlung durch Primäradhäsion, irreversible Anhaftung, Bildung von Mikrokolonien, Reifung des Biofilms und Ablösung mit anschließender Neubesiedlung nicht kontaminierter Flächen. Abbildung 3 zeigt schematisch diesen Entwicklungsprozess.

Innerhalb von Sekunden bildet sich auf einer sauberen Oberfläche eines wasserführenden Systems durch Adsorption von Wasserinhaltsstoffen wie Proteinen, Huminsäuren, organischen und anorganischen Säuren ein so genannter *Conditioning Film*¹⁴⁸. Dieser ermöglicht es planktonischen Zellen aufgrund von Van-der-Waals-Kräften und der negativen Oberflächenladung der Bakterienzelle an Oberflächen zu adhären. Begünstigt wird diese Anhaftung durch die Prandtl'sche Grenzschicht direkt an der Materialoberfläche, wo die Strömung gegen Null tendiert. Die Anhaftung der Bakterienzelle wird durch Umwelt-

bedingungen wie Osmose, pH-Wert, Anwesenheit von Eisen und Sauerstoff und der Temperatur beeinflusst¹⁶⁷.

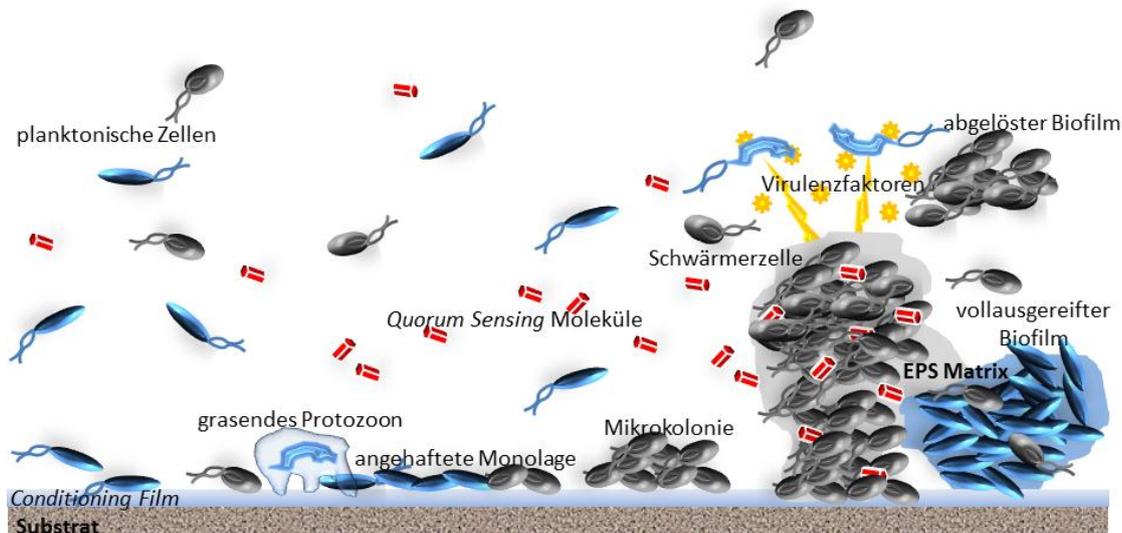


Abbildung 3: Entstehung eines Biofilms nach Hentzer¹⁴⁹

Planktonische Bakterienzellen adhären an der Materialoberfläche in einer Monolage. Daraus erwachsen erste Mikrokolonien, welche durch weitere Vermehrung zum Biofilm reifen. Hier sind die Mikroorganismen in einer Matrix aus extrapolymere Substanzen eingebettet und vor Umwelteinflüssen geschützt. Gleichzeitig wird über das *Quorum Sensing* eine gemeinsame konzertierte Genexpression ausgelöst, welche unter anderem zur Bildung von Virulenzfaktoren führt. In diesem Stadium können durch äußere Einflüsse sowohl komplette Biofilmtile abgelöst werden als auch einzelne Mikroorganismen als so genannte Schwärmerzellen sich vom Biofilm lösen und im weiteren Systemverlauf neuen Biofilm bilden.

Bei dieser Anhaftung handelt es sich um einen reversiblen Prozess, da sich die Bakterienzellen durch aktive Bewegung, durch *Twitching*, mit Hilfe von Flagellen oder Typ IV Pili, wieder von der Oberfläche entfernen können. Durch diese Fortbewegungsarten können sich an Oberflächen adhären Bakterien aufeinander zubewegen und erste Mikrokolonien bilden.

Mit der Anhaftung an Oberflächen und der gesteigerten Zell-Zell-Kommunikation durch vermehrte Zellzahlen verändert sich der Stoffwechsel aufgrund einer veränderten Genexpression¹⁶⁷: Es werden verstärkt extrazelluläre polymere Substanzen und Rhamnolipide produziert²⁴⁸. Diese ermöglichen es dem Biofilm aus der ruhigen Prandtl'schen Grenzschicht in die Strömung zu wachsen.

Die Vermehrung bereits adhären Zellen und das Anhaften zusätzlicher Bakterien, auch aus anderen Spezies aus dem Medium, führen zu einer Akkumulation von Zellen: Es entsteht der Biofilm in seiner maximalen Dichte. Durch die Zell-Zell-Kommunikation kommt es in dieser Phase in den einzelnen Zellen zu einer koordinierten Genexpression. Diese unterscheidet sich sehr stark sowohl von der Genexpression im planktonischen Zustand als auch von der Genexpression während der Phase der ersten Besiedlung und der Bildung der Mikrokolonien¹⁶⁷. So werden nun QS-abhängig verstärkt Virulenzfaktoren wie die Sekretion von Antibiotika und Pathogenitätsfaktoren wie lysierende Enzyme oder Toxine gebildet³²⁶.

In der letzten Phase der Biofilmbildung, der Ablösung und Neubesiedelung nicht kontaminierter Flächen, wird der Biofilm in seinem Dickenwachstum begrenzt – es beginnt seine Flächenausbreitung. Es können sich sowohl einzelne Zellen, als so genannte Schwärmerzellen selbstständig aus dem Biofilm lösen, als auch größere Aggregate aus dem Biofilm durch mechanischen Abrieb gelöst werden¹³⁹. Der mechanische Abrieb kann durch Reinigung, durch erhöhte Scherkräfte aufgrund von durch Biofilm verengten Querschnitten oder durch im Medium schwebende Partikel erfolgen¹⁴⁸. Letztlich können sich ganze Biofilmstrukturen über die Oberfläche bewegen (*Surface Dispersal*)¹³⁹. Durch Ablöse- und Wandermechanismen können weiter entfernte, nicht kontaminierte Oberflächen neu besiedelt werden.

3.1.2 Zell-Zell-Kommunikation Gram-negativer Bakterien (*Quorum Sensing*)

Quorum Sensing (QS) bezeichnet ein System, welches Bakterien erlaubt, mit Hilfe von chemischen Autoinducer-Molekülen miteinander zu kommunizieren. Über diese Signalmoleküle können Bakterien in Abhängigkeit der Populationsdichte ihre Genexpression koordiniert regulieren¹²¹. Die meisten QS-regulierten Verhaltensweisen wie Biolumineszenz, Sekretion von Virulenzfaktoren, Biofilmbildung, Konjugation oder Pigmentbildung sind nur dann effektiv, wenn eine Bakterienpopulation sie synchron wie „ein multizellulärer Organismus“ ausführt²⁹⁶. Hierzu steigt mit der Populationszellzahl die Konzentration an Signalmolekülen, welche durch Diffusion oder aktive Transportmechanismen in das umgebende Medium gelangen. Wird dann eine definierte Grenzwertkonzentration überschritten, docken die Signalmoleküle an ihren spezifischen Transkriptionsregulator an, welcher in der Lage ist entsprechende Zielgene zu aktivieren oder zu reprimieren¹³. Dabei ist ein positiver autoinduktiver Feedback-Kreislauf in Gang gesetzt, der die Signalmolekülsynthese verstärkt⁵⁹.

QS-Systeme werden, basierend auf der Art des Signalmoleküls und ihrer Detektion, in drei Klassen unterteilt¹⁴⁷: Das *LuxI/luxR*-QS Gram-negativer Organismen, das QS basierend auf modifizierten Oligopeptiden Gram-positiver Bakterien und ein Hybridsystem, durch welches Gram-positive Bakterien in der Lage sind mit Gram-negativen zu kommunizieren. Im QS-System Gram-positiver Bakterien werden die Signalmoleküle als Precursoren im Cytoplasma gebildet und während ihrer Sekretion zum Signalpeptid modifiziert⁵⁹. Akkumuliert das Oligopeptid an der Zelloberfläche, kann es durch einen membrangebundenen Histidin-Sensorkinase-Komplex eines Zwei-Komponenten-Signalsystems erkannt werden²¹⁷. Anschließend wird das Antwortregulatorprotein über eine Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungs-Kaskade phosphoryliert. Dieses ist daraufhin in der Lage, an die DNA zu binden und die Transkription der Zielgene zu veranlassen²⁶.

Gram-positive Bakterien sind nicht nur in der Lage miteinander sondern auch artübergreifend mit Gram-negativen Bakterien zu kommunizieren. Dieses gemeinsame QS-System basiert auf dem Autoinducer-2, welcher in beiden Bakterienklassen zu finden ist. Abbildung 4 zeigt die Strukturen dreier Signalmoleküle: Der Spezies-unspezifische Autoinducer-2 von *Vibrio harveyi* und zwei weitere Beispiele für Autoinducer-2-Moleküle, welche in *E. coli* detektiert wurden. Dieses Autoinducer-2-QS-System besitzt analog dem QS-System Gram-negativer Bakterien mit *luxS* eine Autoinducer-2-Synthase. Die Signalkaskade erfolgt analog dem QS-System Gram-positiver Bakterien über die Detektion mit einem Zwei-Komponenten-Sensorkinase-System und anschließender Transkriptionsaktivierung über eine Phosphorylierungskette.

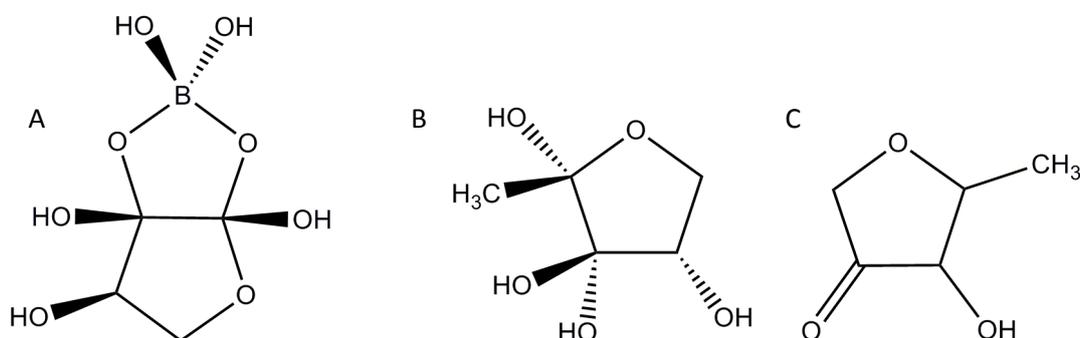


Abbildung 4: Struktur dreier Autoinducer-2-Moleküle

A) Der Spezies-unspezifische *Autoinducer* AI-2; B) Tri-Hydroxymethylfuranon; C) 5-Methyl-4-Hydroxy-3-Furanon

Das QS-System Gram-negativer Bakterien basiert auf den beiden Regulatoren *LuxI* und *LuxR*²¹⁷. *LuxI* oder ein entsprechendes Homologon synthetisiert *N*-Acylhomoserinlactone (AHL) als Signalmoleküle, welche Autoinducer-1 genannt werden. Diese gelangen je nach Länge der Acylkette über Diffusion oder Sekretion in das umgebende Medium. Nach Erreichen der kritischen Grenzkonzentration der Signalmoleküle können sie wieder in die Zelle zurückgelangen, um dort an den *LuxR*-Rezeptor oder einem entsprechenden Homologon zu binden. Der aktivierte *LuxR*-AHL-Komplex aktiviert oder unterbindet die Transkription der Zielgene²¹⁷. Abbildung 5 zeigt den Regulationsmechanismus des QS Gram-negativer Bakterien bei niedriger und hoher Zelldichte.

Viele Gram-negative Bakterien haben nicht nur ein QS-System, sondern besitzen zwei oder mehrere. Durch multiple QS-Systeme, bestehend aus einem eigenen Paar Autoinducer und Rezeptor, können Bakterien sensorische Informationen übermitteln²⁹⁶. Die Hierarchien können in Reihe geschaltet sein, um die Genregulation zeitlich zu steuern wie *LuxI/luxR* und *LasI/lasR* bei *Pseudomonas aeruginosa*. Sie können parallel geschaltet sein, um bestimmte

Gene zu regulieren oder um identische Gene gemeinsam zu regulieren wie *LuxM/luxN*, *LuxS/luxP/luxQ* und *CqsA/CqsS* bei *Vibrio harveyi*³²⁵. Der Vorteil eines parallel geschalteten QS-Systems ist das Abgrenzen der eigenen Zell-Zell-Kommunikation von der Umgebung. Der Vorteil eines in Reihe geschalteten QS-Systems liegt in der zeitlichen Abfolge der Genexpression, beispielsweise während einer frühen oder späten Infektion. Ferner existieren bei Gram-positiven Bakterien zusätzlich kompetitive QS-Systeme mit mehreren Signalmolekülen, welche synergistisch zusammenarbeiten und QS-Systeme mit An-/Ausschaltern³²⁵.

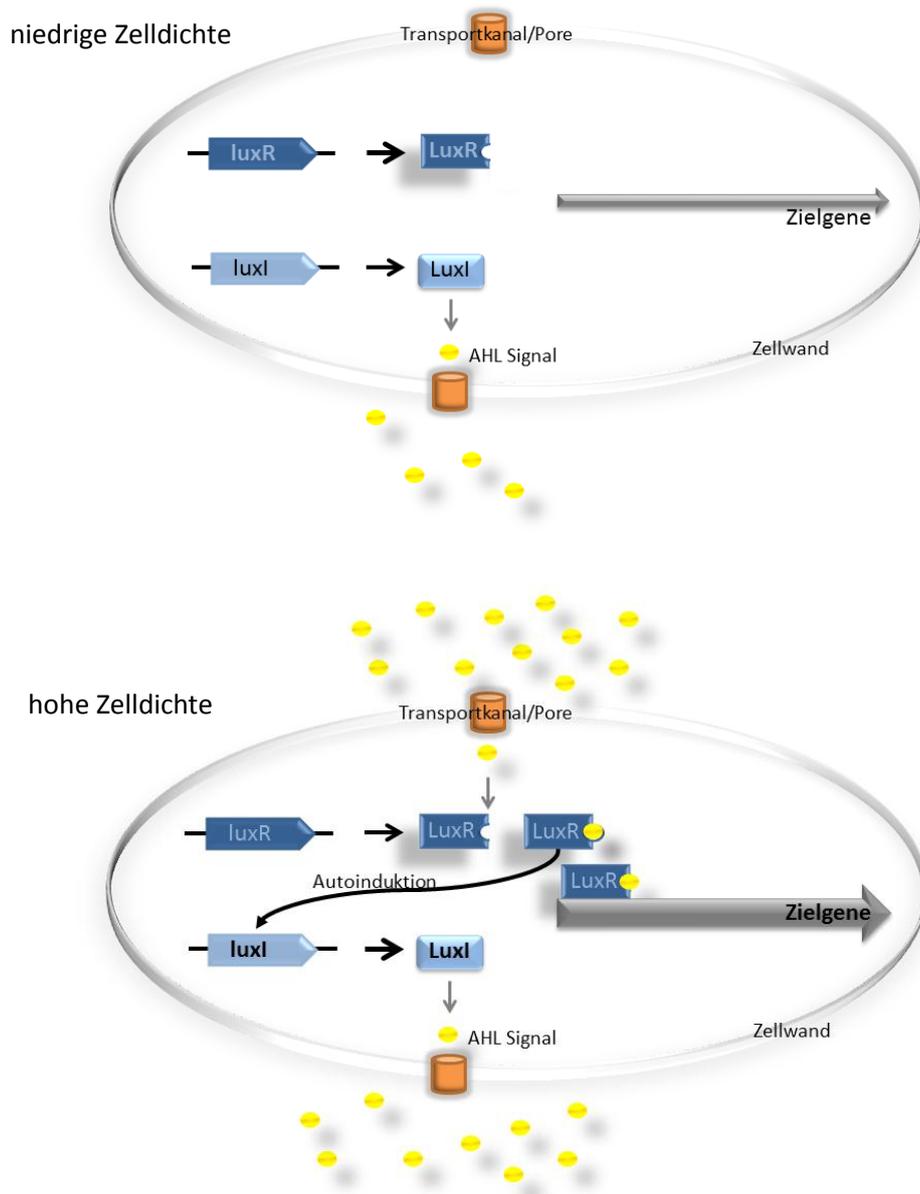


Abbildung 5: Das *LuxI-LuxR*-QS-System Gram-negativer Bakterien

LuxR-Gene kodieren den Transkriptionsregulator, wohingegen *luxI*-Gene die Acylhomoserinlacton-Synthase kodieren. Bei niedrigen Zelldichten wird das Signalmolekül durch Diffusion oder aktiven Transport in das umgebende Medium abgegeben. Bei hoher Zelldichte akkumulieren die exprimierten Signalmoleküle im umgebenden Medium, von wo sie aus in großer Anzahl zurück in die Zelle gelangen. Hier binden sie an den Transkriptionsaktivator *LuxR*. Dieser bindet an die jeweiligen Zielgene und aktiviert deren Transkription. Zusätzlich findet durch den *LuxR*-AHL-Komplex eine Autoinduktion der *LuxI*-Synthase statt.

Diese chemische Kommunikation wird sogar zwischen Prokaryoten und Eukaryoten bei pathogenen und symbiotischen Beziehungen angewandt. Das menschliche Immunsystem kann beispielsweise durch AHL zur Produktion des Zytokins Interleukin-8 aktiviert werden¹⁴⁷. Dieser Entzündungsmediator ist einer der Hauptvermittler bei Entzündungen, da er durch seine chemotaktischen Eigenschaften Leukozyten in das entzündete Gewebe zieht.

AHL werden aus Precursoren, welche aus dem Aminosäuren- und Fettsäurenmetabolismus stammen, exprimiert. Hierbei katalysieren *LuxI*-Proteine und deren Homologe die Synthese der AHL, in dem sie das geladene Acyl-Acyl-Carrierprotein (acyl-ACP) als Acylkettendonator und *S*-Adenosylmethionin (SAM) als Quelle für Homoserinlactone verwenden⁵⁹. *N*-Acylhomoserinlactone bestehen aus einem Homoserinlacton, welches über eine Peptidbindung mit einer Fettsäure variierender Länge verbunden ist. Am ersten und am dritten Kohlenstoffatom kann diese eine Hydroxy- oder Oxogruppe tragen. Sie werden daher in drei Gruppen eingeteilt: *N*-Acylhomoserinlactone, *N*-(3-Oxoacyl)homoserinlactone und *N*-(3-Hydroxyacyl)homoserinlactone. In den meisten Fällen bestehen die Kohlenstoffketten aus einer geraden Anzahl an Kohlenstoffatomen (4-18C). Abbildung 6 zeigt die Grundstruktur der AHL.

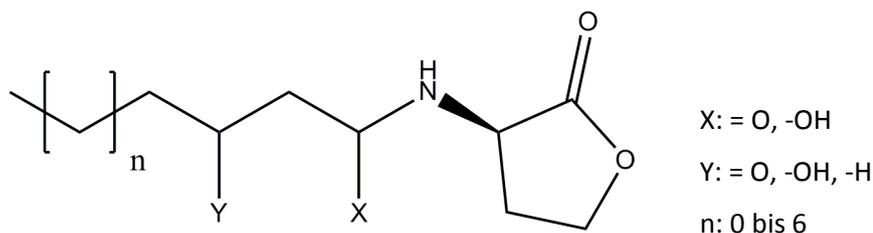


Abbildung 6: Allgemeine Struktur von *N*-Acylhomoserinlactonen

N-Acylhomoserinlactone bestehen aus einem Homoserinlacton und einer Fettsäure, welche über eine Peptidbindung miteinander verbunden sind. Diese kann Oxo- und/oder Hydroxyfunktionen tragen.

Die Schlüsselkomponente des QS Gram-negativer Bakterien ist die spezifische Ausprägung und die spezifische Erkennung der AHL. Einzelne Bakterien müssen in Gemeinschaft anderer Bakterienspezies, welche ähnliche AHL verwenden, in der Lage sein, ihre eigenen Kommunikationswege sicher verwenden zu können.

3.1.3 Quorum Sensing-Regulation von Virulenzfaktoren

Virulenzfaktoren bestimmen die pathogenen Eigenschaften eines Mikroorganismus. Hierzu zählen einerseits Strukturelemente wie Adhäsine, Bestandteile der Bakterienzellwand, und andererseits sekretierte Stoffwechselprodukte wie Exo- und Endotoxine oder Invasionsfaktoren wie DNase oder Proteasen. Sekretierte Virulenzfaktoren können, insbesondere zu

Beginn einer Infektion, zu massiven Gewebeschäden im Wirtsorganismus führen. Die Expression vieler extrazellulärer Virulenzfaktoren ist nicht konstitutiv, sondern Zellzahlabhängig und damit durch das QS gesteuert. Sie werden daher verstärkt in der späten logarithmischen und frühen stationären Wachstumsphase des Bakteriums gebildet^{332, 333}.

Aufgrund seiner umweltrelevanten und klinischen Bedeutung ist *P. aeruginosa* ein Musterbeispiel um das Sozialverhalten von Bakterien zu untersuchen²⁸⁵. Es zählt daher bezüglich des QS, der Biofilmbildung und der Virulenzfaktoren zu den am besten untersuchten Organismen⁸⁴. Daher werden die weiteren Ausführungen zu den Virulenzfaktoren an *P. aeruginosa* gezeigt. *P. aeruginosa*, ein ubiquitär vorkommendes Gram-negatives Bakterium, wächst bevorzugt als Biofilm auf unterschiedlichen Oberflächen wie Wasserleitungen oder Bodenpartikeln¹⁰⁵. Es kann sich, aufgrund seiner Fähigkeit zu unterschiedlichem Sozialverhalten über das QS, an die verschiedensten Umweltbedingungen anpassen. *P. aeruginosa* ist ein opportunistisches Humanpathogen, welches sowohl chronische als auch akute Infektionen, vor allem an immungeschwächten Personen, hervorrufen kann²⁰⁸.

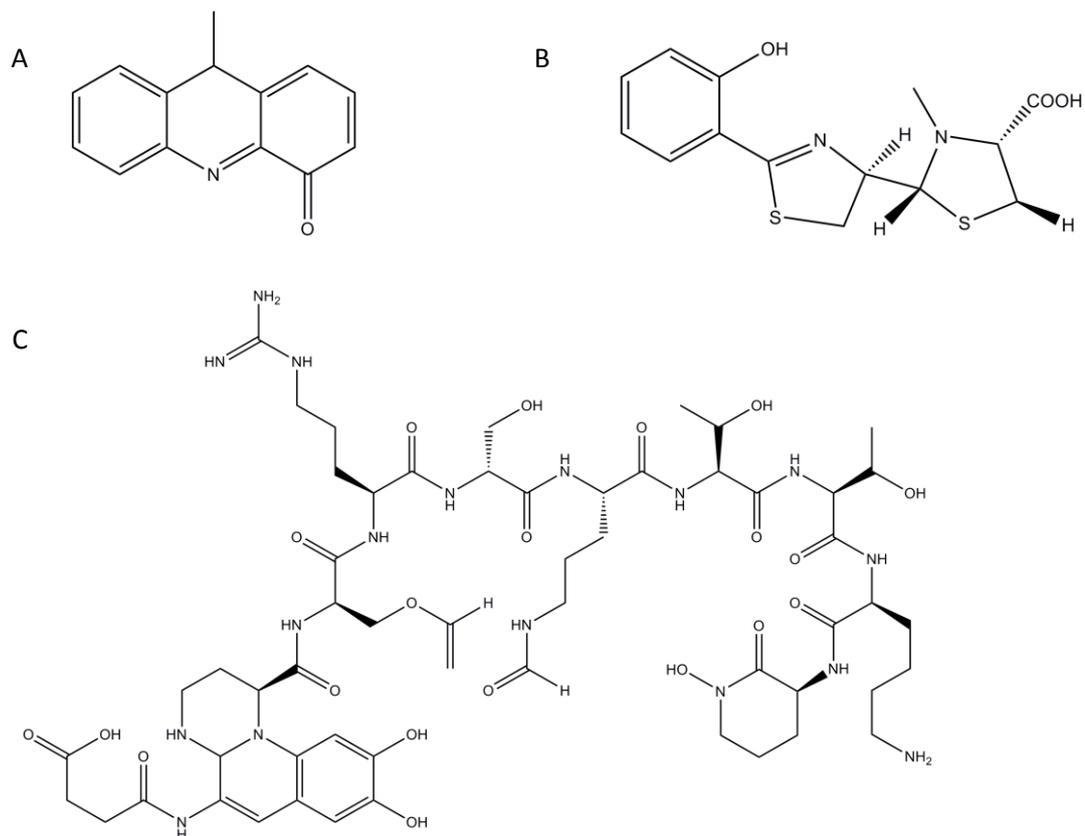


Abbildung 7: Siderophore von *P. aeruginosa*

A) Pyocyanin; B) Pyochelin; C) Pyoverdin

P. aeruginosa besitzt eine Vielzahl an Zell-assoziierten Virulenzfaktoren⁸⁴, wie Lipopolysaccharide und Flagellen, und extrazellulären Virulenzfaktoren, wie Exoproteasen, Siderophore, Exotoxine und verschiedene Sekundärmetabolite^{249, 340} sowie die Fähigkeit Biofilme zu bilden²⁰⁸. All diese Stoffe werden durch das QS sowohl zeitlich als auch in ihrer Produktionsrate reguliert^{86, 92, 119, 282, 295, 318, 330}. Hierbei steuert der Signalmolekül-Rezeptor-Komplex LasR-3-oxo-C12-Homoserinlacton beispielsweise die Virulenzgene *lasA* (Elastase A), *lasB* (Elastase B), *aprA* (alkalische Phosphatase A), *toxA* (Exotoxin A)^{124, 125, 250, 301}. Der Signalmolekül-Rezeptor-Komplex RhlR-C4-Homoserinlacton hingegen reguliert beispielsweise die Expression der Virulenzgene *rhlAB* (Rhamnosyltransferase zur Produktion von Rhamnolipiden), *lasB* (Elastase B), *aprA* (alkalische Phosphatase A), *rpoS* (Sigmafaktor RpoS) sowie Sekundärmetabolite wie Pyocyanin^{43, 191, 192, 234, 251, 341}. Abbildung 7 zeigt drei Siderophore (Eisenchelatoren) von *P. aeruginosa*, Abbildung 8 zeigt das Rhamnolipid I, eine grenzflächenaktive Substanz. Auch das Schwimm- und Schwarmverhalten sind wichtige Virulenzfaktoren. Diese dienen Bakterien zur Oberflächenausbreitung der Zellen und sind eng mit der Rhamnolipidproduktion verknüpft^{44, 90, 183}.

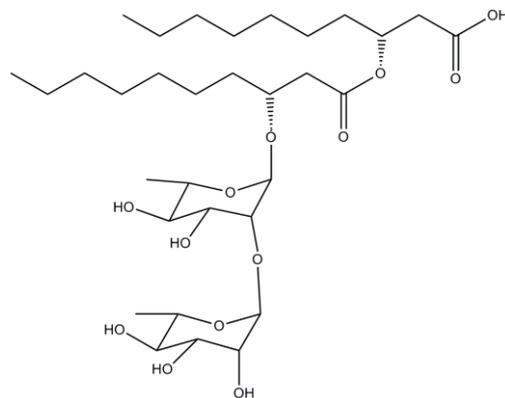


Abbildung 8: Rhamnolipid 1

3.1.4 Quorum Quenching - Störung des Quorum Sensings bei Gram-negativen Bakterien

Wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben können Bakterien ihre Populationsdichte über das *Quorum Sensing* messen und die Expression ihrer Gene zum Beispiel zur Bildung von Virulenzfaktoren koordiniert steuern. Verschiedene Bakterien haben aufgrund des stetigen Wettbewerbs um limitierte Ressourcen Strategien entwickelt, um das QS anderer Bakterien zu stören.

Diese Strategien werden unter *Quorum Quenching* (QQ) beziehungsweise *Quorum Sensing Inhibition* zusammengefasst. Entsprechend den Schlüsselkomponenten des QS-Systems haben sich verschiedene QQ-Strategien entwickelt. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die

verschiedenen QQ-Strategien⁹⁷ und deren Angriffspunkte im QS Gram-negativer Bakterien, Abbildung 9 stellt schematisch die QQ-Strategien dar.

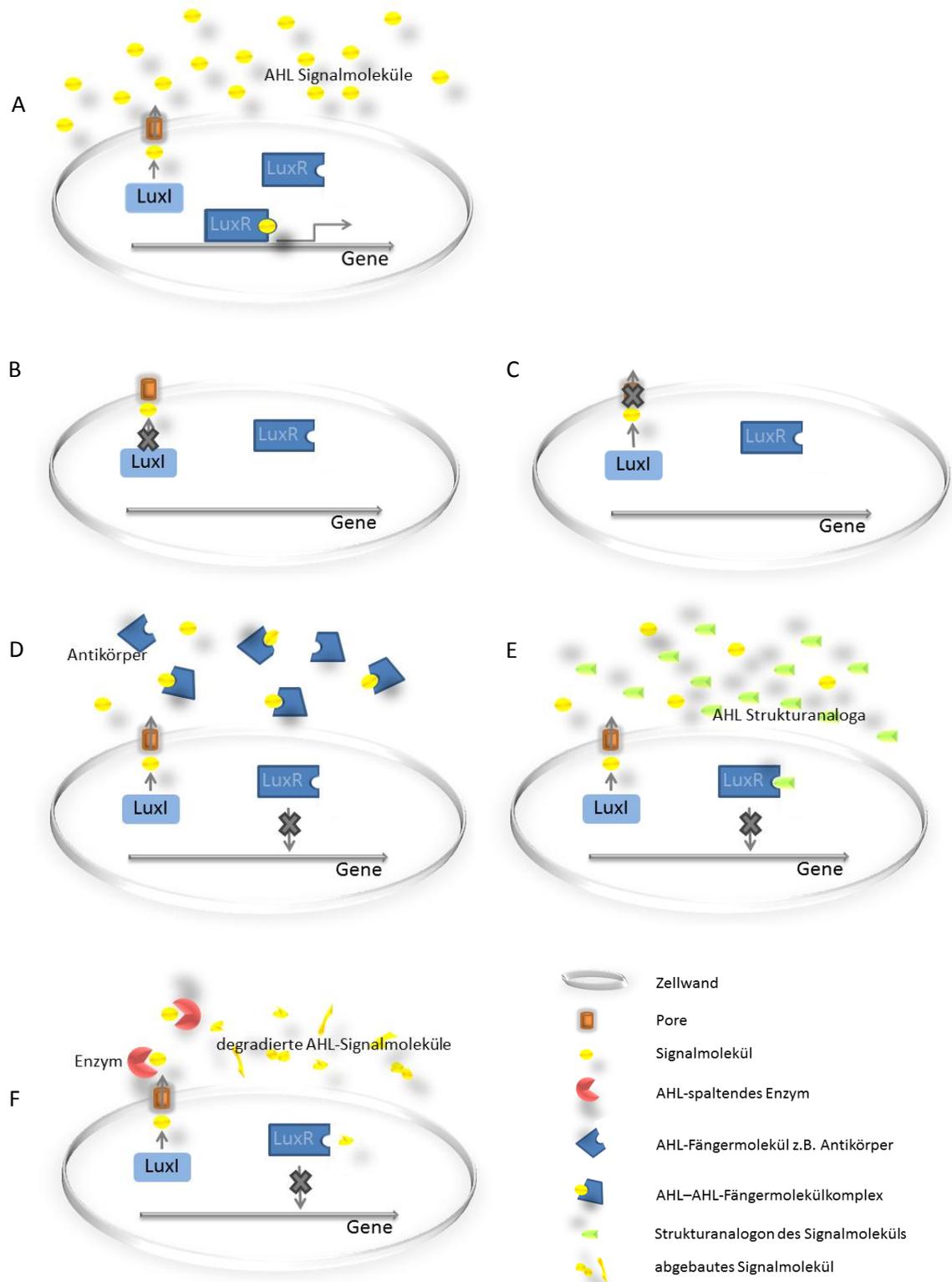


Abbildung 9: QQ-Strategien zur Zerstörung des QS Gram-negativer Bakterien

Generell kann das QS auf zwei verschiedenen Ebenen gestört werden: In der Signalgenerierung (B, C) und im Signalempfang (D, E, F). A) QS Gram-negativer Bakterien; B) Inhibition der AHL-Synthese durch Blockierung des I Proteins; C) Inhibition des Exports langkettiger AHL; D) Bindung des AHL durch beispielsweise Antikörper; E) Kompetitive Inhibition des AHL-Rezeptors durch ein Struktur-analogon; F) Abbau des AHL beispielsweise durch Enzyme.

Tabelle 2: Schlüsselkomponenten des QS Gram-negativer Bakterien und QQ-Strategien⁹⁷

QS-Prozess		Schlüsselkomponente	QQ-Strategie
Niedrige Populationsdichte	Signalgeneration	Proteine und Enzyme, die an der Biosynthese von Acyl-Ketten und S-Adenosylmethionin (SAM) beteiligt sind; <i>LuxI</i> Homologe	Inhibition der Fettsäuresynthese; Inhibition der SAM Biosynthese; Protein I Inhibition
	Signalakkumulation	Proteine, die in der Ausschleusung langkettiger AHL beteiligt sind	AHL abbauende Enzyme; Inhibition der aktiven Ausschleusung
Hohe Populationsdichte	Signalempfang	LuxR Homologe Transkriptionsfaktoren	Protein R Inhibition
	Autoinduktion und Aktivierung des QS-Regulons	R und I Proteine, die an der verstärkten AHL-Produktion beteiligt sind; QS-abhängige Transkriptionsfaktoren	AHL abbauende Enzyme, Inhibition der I und R Proteine

QQ-Strategien können entweder bereits in der Signalgenerierung eingreifen oder erst während des Signalempfangs. Der erste Schritt im QS Gram-negativer Bakterien ist die AHL-Synthese durch *LuxI* oder eines seiner Homologe aus S-Adenosylmethionin (SAM). S-Adenosylhomocystein und Sinefungin sind wirksame SAM-Strukturanaloga, welche das I Protein blockieren und somit die AHL-Synthese verhindern. Diese Art des QQ führt häufig zu unerwünschten Nebeneffekten²³¹. Kleine chemische Moleküle wie Triclosan, welches die Enoyl-ACP Reduktase inhibiert, können die AHL-Biosynthese blockieren⁹⁷. Der nächste Schritt im QS ist der aktive Export langkettiger AHL. Durch eine Inhibition dieses Transportmechanismus kann ebenfalls das QS gestört werden³³¹.

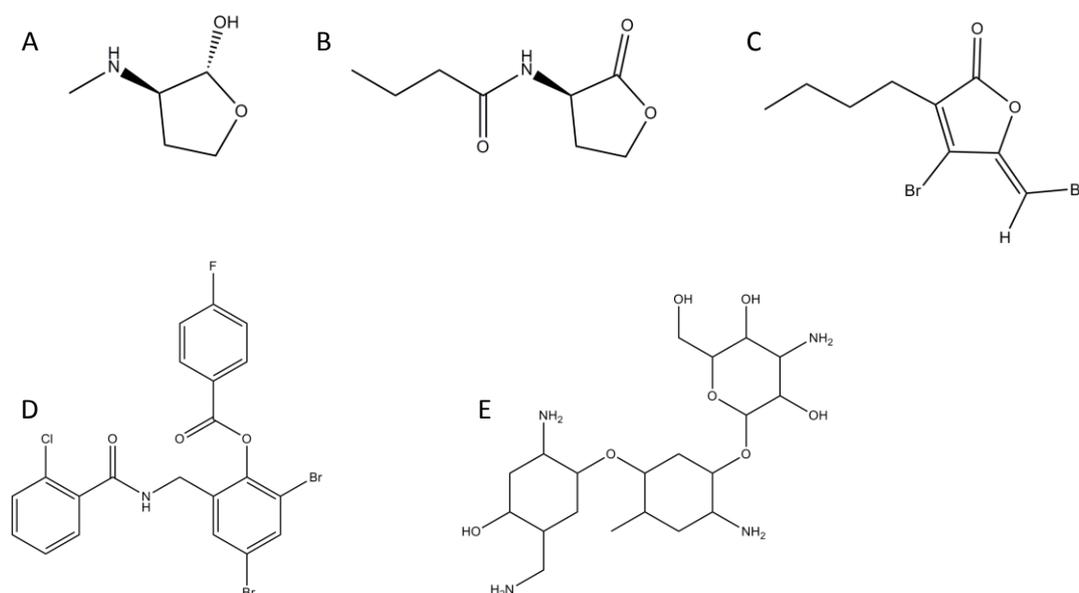


Abbildung 10: AHL-Strukturanaloga, welche den AHL-Rezeptor blockieren können

Es gibt verschiedene Klassen von Strukturanaloga: A) AHL mit modifiziertem Lactonring; B) AHL mit modifizierter Seitenkette; C) Halogenierte Furanone aus der marinen Riesenalge *Delisea pulchra*; D) Inhibitoren ohne strukturelle Verwandtschaft; E) Andere Inhibitoren wie Tobramycin

Auf regulatorischer Ebene ist die Rezeptor-Ligand-Bindung ein weiterer Angriffspunkt des QQ. Hier wird der Rezeptor durch ein AHL-Strukturanalogon blockiert. Der gebildete Komplex kann nicht an die jeweiligen Zielgene binden und die Transkription aktivieren. Hierzu kann das Signalmolekül am Lactonring, an der Acylseitenkette oder an beidem strukturell verändert werden²³¹. Weiterhin können natürliche und synthetische halogenierte Furanone, Inhibitoren ohne strukturelle Verwandtschaft zur AHL sowie bestimmte Antibiotika den *LuxR*-Rezeptor und seine Homologe blockieren. Dies verhindert die Aktivierung der AHL-regulierten Gene²³¹. Abbildung 10 zeigt Beispiele für oben genannte AHL-Strukturanaloga.

Die Spaltung, das heißt die Inaktivierung, des sekretierten AHL kann auf verschiedenen Wegen erfolgen: AHL können durch Antikörperbindungen³³¹ in ihrer Struktur verändert werden, sie können sowohl chemisch als auch enzymatisch inaktiviert werden. Bereits die Änderung des pH-Wertes in den alkalischen Bereich bewirkt die Ringöffnung des Lactonringes durch Hydrolyse der Esterbindung³⁴⁸. Die Meeresalge *Laminaria digitata* produziert beispielsweise Haloperoxidasen, welche die Oxidation von Chloriden und Bromiden mit Wasserstoffperoxid katalysieren und zu Hyperbrom- und Hyperchlorsäure führen. Diese wiederum können mit dem 3-oxo-Homoserinlactonen (3-oxo-HSL) reagieren und es über Reaktion mit der 3-oxo-Funktion inaktivieren³⁸.

Eine der wichtigsten QQ-Strategien ist die enzymatische Inaktivierung des Signalmoleküls. Diese kann in Form einer Änderung der chemischen Struktur des Signalmoleküls durch Oxidoreduktasen wie BpiB09³⁶, Amidohydrolasen³¹⁰ oder Oxidasen erfolgen oder durch eine enzymatische Spaltung²³⁵. Aufgrund der chemischen Struktur des AHL-Signalmoleküls gibt es vier mögliche Angriffsstellen zur enzymatischen Spaltung (siehe Abbildung 11)⁷⁶. *In vivo* sind derzeit lediglich zwei Mechanismen nachgewiesen: Die Spaltung des AHL am Lactonring (1) und die Hydrolyse der Peptidbindung (4).

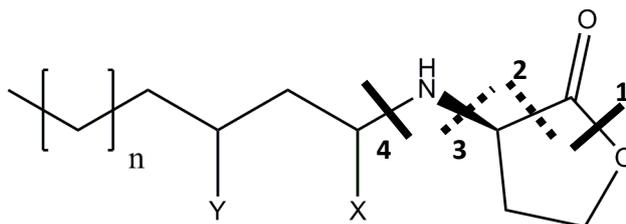


Abbildung 11: Mögliche enzymatische Angriffsstellen des AHL

Dargestellt sind mögliche Angriffsstellen zur enzymatischen Spaltung. Unterbrochene Linien markieren theoretische Spaltungsstellen, wohingegen für die mit durchgezogener Linie markierten Spaltungsstellen entsprechende Enzyme bereits nachgewiesen wurden. 1) Lactonase; 2) Decarboxylase; 3) Deaminase; 4) Acylase

N-Acylhomoserinlacton-Acylasen (EC 3.5.1.-) spalten das Signalmolekül durch Hydrolyse der Peptidbindung in eine Fettsäure und ein Homoserinlacton. Häufig werden diese Produkte weiter metabolisiert und als Kohlenstoff-, Stickstoff- und/oder Energiequelle verwendet.

Abbildung 12 zeigt den Mechanismus der AHL-Acylase⁷⁶. Bisher sind fünf AHL-Acylasen näher beschrieben: AiiD (*Ralstonia eutropha*)²⁰¹, PvdQ¹⁵⁸ und QuiP (*Pseudomonas aeruginosa*)¹⁵⁹, AhlM (*Streptomyces* sp.)²⁴⁵ und AiiC (*Anabaena* sp.)²⁷¹.



Abbildung 12: Enzymatische AHL-Spaltung durch eine AHL-Acylase

AHL-Acylasen spalten die Peptidbindung des Signalmoleküls durch Hydrolyse. Steh für X ein Sauerstoffatom mit einer Doppelbindung entsteht eine Fettsäure und ein Homoserinlacton.

Die zweite Klasse der AHL-spaltenden Enzyme, die AHL-Lactonasen, wird im folgenden Kapitel beschrieben.

3.1.5 Rolle der *N*-Acylhomoserinlacton-Lactonasen

AHL-Lactonasen wurden sowohl in verschiedenen Bakteriengenera als auch in Pflanzen⁸⁷ und eukaryotischen Zellen nachgewiesen⁶⁵. Sie besitzen hydrolytische Aktivität gegen ein weites Spektrum an AHLs, unabhängig von deren Acylkettenlänge und des Oxidationszustandes des C3-Atoms in der Acylkette. Dennoch wirken sie sehr spezifisch gegen AHLs und besitzen keine oder nur sehr geringe Aktivität gegen nicht acetylierte Homoserinlactone und nicht zyklische Ester¹⁰. Abbildung 13 zeigt schematisch die hydrolytische Ringöffnung des *N*-Acylhomoserinlactons, Tabelle 3 eine Zusammenstellung von AHL-Lactonasen.

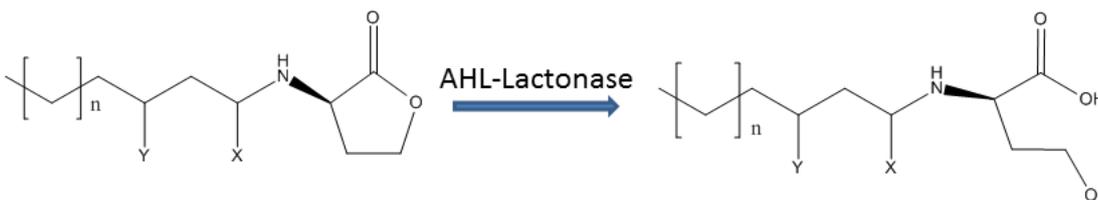


Abbildung 13: Enzymatische AHL-Spaltung durch eine AHL-Lactonase

AHL-Lactonasen hydrolysieren die Esterbindung des Lactonrings des *N*-Acylhomoserinlactons zu einem Acylhomoserin.

In Prokaryoten wurden bisher zwei AHL-Lactonase-Familien beschrieben: Metallohydro-lasen der β -Lactamase-Superfamilie und Phosphotriesterasen. Letztere wurden in verschiedenen Bakterienspezies, beispielsweise in *Geobacillus* sp., *Sulfolobus solfataricus* und *Rhodococcus erythropolis* nachgewiesen^{5, 63, 145, 229, 311}.

Lactonasen der β -Lactamase-Superfamilie wie AiiA und BlcC lassen sich in phylogenetischen Analysen in zwei Cluster einteilen: dem AiiA und dem BlcC Cluster. AHL-Lacton-

asen des AiiA Clusters entstammen alle ausschließlich *Bacillus* Spezies und weisen untereinander eine Peptidsequenzidentität von 90 % auf. AHL-Lactonasen des BlcC Clusters hingegen finden sich beispielsweise in *Agrobacterium tumefaciens*, *Klebsiella pneumoniae* und *Arthrobacter sp.* wieder und weisen 30-58 % Homologie auf. Beide Cluster zeigen zueinander weniger als 25 % Homologie⁷⁶.

Tabelle 3: Zusammenstellung von AHL-Lactonasen

Modifiziert nach Bijtenhoorn³⁷

AHL-Lactonase	Herkunft	Cofaktor/Bindungsmotiv	Superfamilie/Familie	Referenz
AhlD	<i>Arthrobacter sp.</i>	Zn ²⁺	MβL; AttM-Familie	246
AhlK	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Zn ²⁺	MβL; AttM-Familie	246
AidH	<i>Ochrobactrum sp.</i>	Co ²⁺ , Mn ²⁺	MβL; α/β-Hydrolase Familie	214
AiiA	<i>Bacillus sp.</i>	Co ²⁺ , Zn ²⁺	MβL; AiiA-Familie	95, 98, 179, 195, 203, 222, 299, 309
AiiB	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Zn ²⁺	MβL; AttM-Familie	51, 144, 204
AiiM	<i>Microbacterium testaceum</i>	-	MβL; α/β-Hydrolase Familie	322
BlcC (AttM)	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Co ²⁺ , Zn ²⁺	MβL; AttM-Familie	51, 178, 204, 322, 353
BpiB01	Bodenmetagenom; <i>Nitrobacter sp.</i>	Ca ²⁺ , Zn ²⁺	MβL	280
BpiB04	Bodenmetagenom; <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Ca ²⁺ , Zn ²⁺	MβL; Glycosylhydrolase Familie	280
BpiB05	Bodenmetagenom	Ca ²⁺	MβL	37
BpiB09	Bodenmetagenom <i>Xanthomonas campestris</i>	Ca ²⁺ , Zn ²⁺	MβL; Dehydrogenase Familie	280
Dr0930	<i>Deinococcus radiodurans</i>	Fe ²⁺ ; Mn ²⁺ , Zn ²⁺	Amidohydrolase; PTE	344
GKL	<i>Geobacillus kaustophilus</i>	Zn ²⁺	Amidohydrolase; PTE	64
GSP	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Co ²⁺ , Mn ²⁺	Amidohydrolase; PTE	146
PON1-3	Human	Ca ²⁺	Paraoxonasen	101
PPH	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Mn ²⁺ , Zn ²⁺	Amidohydrolase; PTE	5
QlcA	Bodenmetagenom; <i>Bradhyrhizobium sp.</i>	Zn ²⁺	MβL; AttM-Familie	268
QsdA (AhlA)	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Zn ²⁺	Amidohydrolase; PTE	311
SSoPox	<i>Sulfolobus solfarius</i>	Co ²⁺ , Zn ²⁺	Amidohydrolase; PTE	5, 229

MβL: Metallo-β-Lactamase-Superfamilie PTE: Phosphotriesterase-ähnliche Lactonasefamilie

AH-Lactonasen, unabhängig von ihrer Cluster- oder Familienzugehörigkeit, benötigen für ihre Aktivität das Zinkbindungsmotiv HXXHDH~60aa~H^{10, 321}. Tabelle 3 zeigt eine Übersicht ausgewählter Lactonasen bezüglich ihrer Herkunft, ihres Cofaktors und ihrer Familienzuordnung. Die in dieser Arbeit angewandten AHL-Lactonasen AiiA, AiiB und BlcC(AttM)

(EC 3.1.1.-) gehören zu den Metallohydrolasen der β -Lactamasen. Sie werden in Kapitel 5.3 charakterisiert.

3.2 Immobilisierung von Enzymen

In diesem Kapitel werden mögliche Strategien zur Immobilisierung von Enzymen kurz vorgestellt und die angewandten Immobilisierungsmethoden Physisorption, Chemisorption und die Immobilisierung in einer polymeren Matrix genauer beschrieben.

Bei der Immobilisierung sind einerseits die physikalisch-chemischen Eigenschaften des zu immobilisierenden Enzyms und andererseits die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Trägermaterials von Bedeutung. Auf Enzymseite sind dies die Größe, der isoelektrische Punkt (pI), die Flexibilität der Konformation, die Oberflächenladungen, die funktionellen Gruppen, die hydrophoben und hydrophilen Bereiche und die Stabilität bei den gegebenen Reaktionsbedingungen. Für das Trägermaterial sind es hingegen die Hydrophobie und Hydrophilie, der Oberflächenladungen und -funktionalisierungen, die chemische und mechanische Stabilität und die geometrischen Eigenschaften. Da nicht alle Parameter zugleich optimiert werden können, gilt es einen möglichst guten Kompromiss zwischen Stabilität, Aktivität, einfacher Handhabung der Immobilisierung und geringen Kosten zu finden¹⁴⁰.

Zur Immobilisierung stehen fünf verschiedene Methoden zur Verfügung, welche Abbildung 14 schematisch verdeutlicht:

- Adsorption (zum Beispiel über ionische Wechselwirkungen),
- Chemisorption (gegebenenfalls unter zu Hilfenahme eines Spacers),
- *Crosslinking* von (physisorbierten) Enzymen,
- Verkapselung,
- Einbettung in polymere Matrizen oder porösen Beschichtungen sowie
- Kombinationen der oben genannten Methoden.

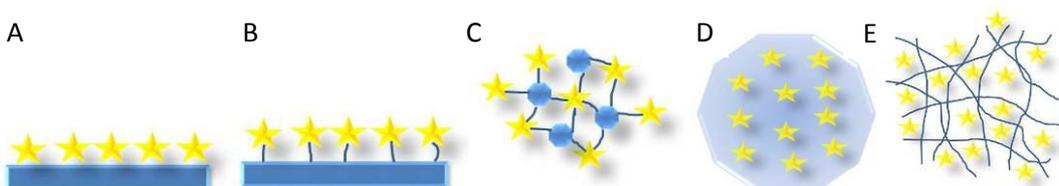


Abbildung 14: Möglichkeiten der Immobilisierung von Enzymen

A) Adsorption; B) Chemisorption (kovalente Bindung); C) Crosslinking von physisorbierten Enzymen; D) Verkapselung; E) Einbettung in polymere Matrizen

Beim Crosslinking von Enzymen werden einzelne Moleküle chemisch zum Beispiel mittels Glutardialdehyd aneinander gebunden, um große dreidimensionale und komplexe Strukturen zu bilden. Diese Methode wird häufig mit anderen oben aufgelisteten Methoden kombiniert.

Die Verkapselung von Enzymen wird durch die Umgrenzung dieser mit einer semi-permeablen Membran erreicht, so dass die verkapselten Enzyme zwar frei in Lösung jedoch ortsgebunden vorliegen. Über die Membranen ist ein Austausch von ausreichend kleinen Molekülen zwischen den beiden Kompartimenten möglich.

3.2.1 Enzymimmobilisierung durch Adsorption

Bei der Adsorption (siehe Abbildung 15) werden das zu immobilisierende Enzym und das Trägermaterial unter geeigneten Bedingungen (Temperatur, Ionenstärke, etc.) innerhalb einer geeigneten Inkubationszeit in Kontakt zueinander gebracht. Nach der Adsorption wird nicht gebundenes Enzym in der Regel durch Waschstschritte von dem Trägermaterial entfernt. Die Physisorption basiert auf physikalischen Wechselwirkungen zwischen Enzym und Trägermaterial. Bei diesen Wechselwirkungen handelt es sich um elektrostatische Wechselwirkungen, Van-der-Waals-Wechselwirkungen und ionische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen oder hydrophobe Wechselwirkungen.

Methodisch kann die Adsorption in folgende Arten unterteilt werden⁴⁸:

- Nicht spezifische Physisorption,
- bio-spezifische Adsorption (zum Beispiel Antikörper-Antigen-Bindung),
- Affinitätsadsorption (zum Beispiel Streptavidin-Avidin-Bindung),
- elektrostatische Bindung und
- hydrophobe Bindung.



Abbildung 15: Immobilisierung durch Adsorption

Immobilisierung eines Enzyms auf einem flachen Trägermaterial und auf Partikeln.

Die wichtigsten Reaktionsparameter sind die Oberflächenchemie und -topographie des Trägermaterials, das Reaktionsmedium und die biochemischen Eigenschaften des Enzyms,

das heißt sein Verhalten bei unterschiedlichen Temperaturen und pH-Werten. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die Vor- und Nachteile dieser Immobilisierungsmethode.

Tabelle 4: Vor- und Nachteile der Adsorption

Vorteile	Nachteile
Einfache, schnelle und kostengünstige Methode	Begrenzte immobilisierte/freisetzbare Enzymmenge
Einfache Freisetzung durch Desorption	Unerwünschte Freisetzung, Ausbluten (<i>Leaking</i>); keine Kontrolle der Freisetzung möglich
Keine chemische Modifizierung des Enzyms nötig	Sterische Hinderung des Enzyms möglich Änderung der Mikrobedingungen möglich (z. B. pH-Änderung durch Anlagerung von Protonen)

Die Physisorption von Proteinen wird durch drei Dinge bestimmt: die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Trägermaterials, die physiko-chemischen Eigenschaften des zu immobilisierenden Proteins und die Immobilisierungsbedingungen (siehe Abbildung 16).

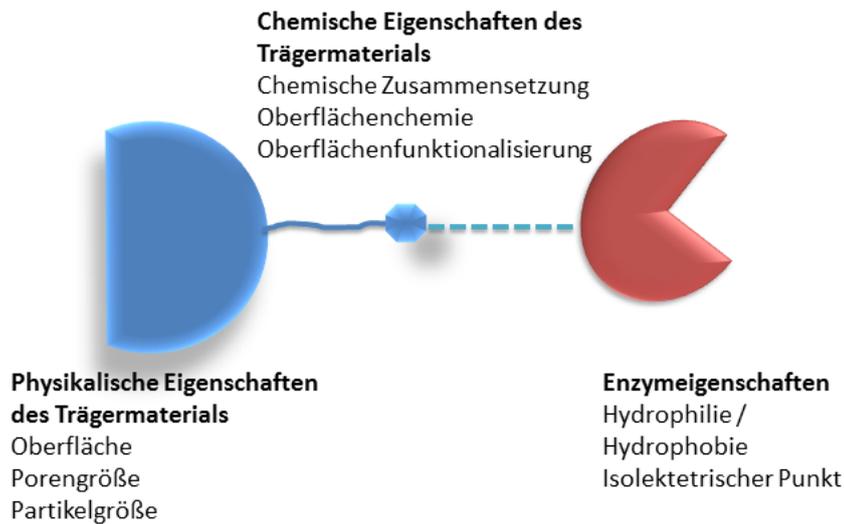


Abbildung 16: Adsorptive Immobilisierung eines Enzyms auf einem Trägermaterial

Bei den physikalischen Eigenschaften sind die Partikelgröße, die verfügbare (spezifische) Oberfläche und die Poren (Größe, Volumen, Größenverteilung, Art) sowie die Dichtebelegung der Bindungsfunktionalitäten maßgeblich, wohingegen die Zusammensetzung des Trägermaterials und seine Oberflächenchemie auf Seite der chemischen Eigenschaften von Bedeutung sind und den Adsorptionstyp aufgrund von attraktiven Wechselwirkungen bestimmen. Deren Bindungsstärke nimmt in folgender Reihenfolge ab: ionische Wechselwirkungen > Wasserstoffbrückenbindung > polare Wechselwirkungen > Van-der-Waals-Bindungen > hydrophoben Wechselwirkungen.

Daneben bestimmt die Immobilisierungsbedingungen, wie pH-Wert, Temperatur, Ionenstärke des Puffers und die Anwesenheit von Additiven, die Art und Ausprägung der Physi-

sorption unter anderem dadurch, dass sie die Konformation des Enzymes zum Zeitpunkt der Immobilisation beeinflussen. Nach der Immobilisierung ist eine Konformationsänderung des Enzyms meist nur sehr schwer zu erreichen, da die Struktur oftmals durch eine Bindung über mehrere Bereiche im Enzym stattfindet, was zu einer Versteifung der Proteinstruktur führen kann. Dadurch kann es zur Störung der nativen Enzymstruktur kommen, wodurch sich im ungünstigsten Fall Stabilität, Selektivität und Aktivität ändern. Es ist daher von großer Bedeutung die Parameter der Immobilisierung sehr sorgfältig auszuwählen, um eine günstige Konformation des immobilisierten Enzyms zu erhalten.

3.2.2 Enzymimmobilisierung durch Chemisorption

Bei der Immobilisierung durch Chemisorption entstehen kovalente Bindungen zwischen Enzym und Trägermaterial, genauer zwischen deren funktionellen Gruppen, (siehe Abbildung 17). Auf Seite des Enzyms sind zugängliche funktionelle Gruppen der Aminosäuren wie Amino-, Carboxyl-, Hydroxyl- und Thiolgruppen beteiligt. Die Immobilisierung erfolgt häufig über eine Isoharnstoffverbindung, eine Diazoverbindung, eine Peptidbindung oder eine Alkylierungsreaktion³⁵. Bei der Immobilisierung werden zunächst reaktive funktionelle Gruppen des Trägermaterials erzeugt. Anschließend wird das Enzym zugegeben, damit sich eine kovalente Bindung ausbildet. Zur Vergrößerung des Abstandes und somit zur Gewährleistung der Enzymkonformation kann zwischen Enzym und Trägermaterial ein *Spacer* als Abstandshalter eingebaut werden. Die wichtigsten Reaktionsparameter bei dieser Immobilisierungsmethode sind die funktionellen Gruppen des Trägermaterials, die funktionellen Gruppen des Enzyms und die Reaktionsbedingungen. Tabelle 5 zeigt Vor- und Nachteile dieser Immobilisierungsmethode.

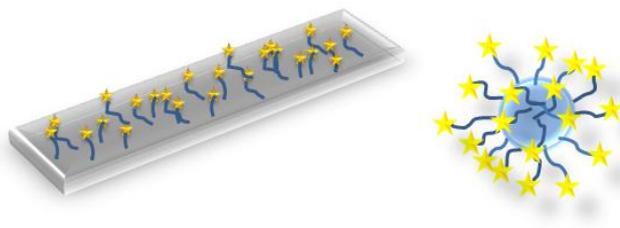


Abbildung 17: Immobilisierung durch Chemisorption

Das Enzym wird über kovalente Bindungen an das flache Trägermaterial oder an Partikel gebunden. Zusätzlich kann ein *Spacer* als Abstandshalter zwischen Enzym und Trägermaterial eingebracht werden.

Durch kovalente Bindung mit Bindungsstärken von 50-1000 kJ/mol kann im Vergleich zur Physisorption eine stabilere Immobilisierung von Proteinen erzielt werden. Diese basiert auf einer chemischen Reaktion zugänglicher funktioneller Gruppen von exponiert liegenden Aminosäuren mit den funktionellen Gruppen des Immobilisierungsträgers. Da in Proteinen

häufig mehrere identische Seitengruppen existieren, ist die Orientierung der Proteine aufgrund mehrerer gleichartiger Bindungen an der Oberfläche meist zufällig und ungerichtet.

Tabelle 5: Vor- und Nachteile der Chemisorption

Vorteile	Nachteile
Keine unerwünschte Freisetzung, kein Ausbluten	Chemische Modifizierung des Enzyms und/oder des Trägermaterials notwendig
Einsatz eines Spacers zum Erhalt der Enzymkonformation	Gegebenenfalls denaturierende Reaktionsbedingungen
Theoretisch dauerhafte Funktionalität möglich	Inaktivierung der Enzyme durch unerwünschte Physisorption von Fremdmolekülen hierauf

Abbildung 18 zeigt die einzelnen Parameter, welche einen Einfluss auf eine erfolgreiche kovalente Anbindung eines Enzyms an einer Oberfläche haben. Generell ist die wichtigste Voraussetzung dieser Immobilisierungsmethode, dass die funktionellen Gruppen des Trägermaterials und des zu immobilisierenden Enzyms, welche miteinander reagieren sollen, chemisch zueinander kompatibel sind. Die spezifischsten Bindungen lassen sich über die Bindung von Cystein- und Lysinseitenkettengruppen erzielen.

Tabelle 6 listet klassische Kombinationen von Oberflächenfunktionalisierungen und aktiven funktionellen Proteinseitengruppen auf.

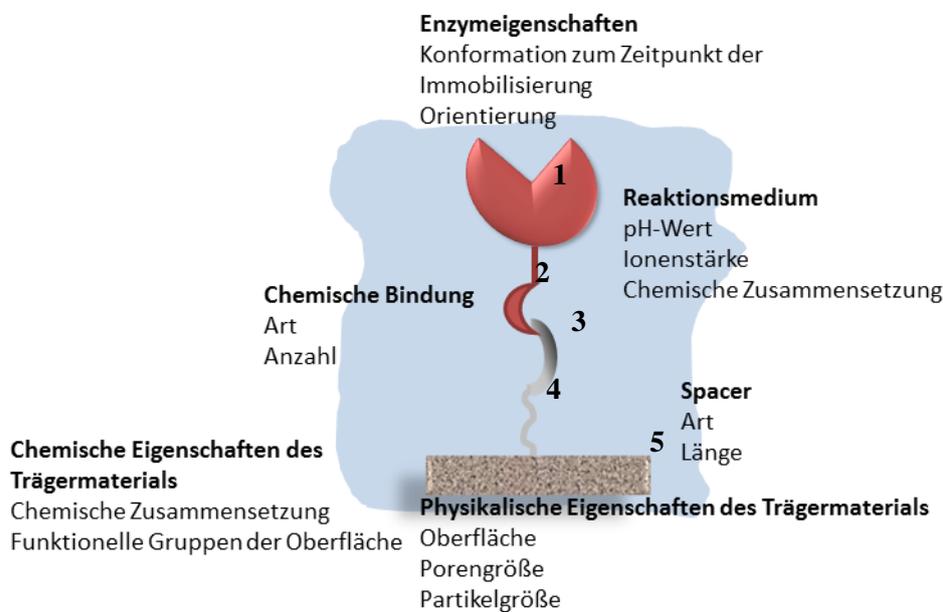


Abbildung 18: Kovalente Immobilisierung eines Enzyms auf einer Trägermatrix

- 1) Enzym; 2) Aktiver Aminosäurerest; 3) Oberflächenfunktionalität des Trägermaterials; 4) Spacer; 5) Immobilisationsträger

Abbildung 19 zeigt die einzelnen Reaktionsschritte, welche bei der hier angewandten Silanisierung aus der Flüssigphase auftreten. Zunächst hydrolysiert die Silangruppe in Anwesenheit von Spuren von Wasser in der Reaktionslösung zum Silantriol, welche sich nachfolgend über Physisorption auf hydrolysierten Oberflächen abscheiden können. Über die Ausbildung von kovalenten Bindungen durch Kondensation sind die abgeschiedenen Silane nun fest an der Oberfläche gebunden. Es entstehen so genannte durch Selbstorganisation erzeugte Monolagen (*self assembled monolayers*), welche sich durch ihre hohe innere Organisation und Stabilität auszeichnen²²³.

Tabelle 6: Kombinationen von Oberflächenfunktionalisierung und Proteinseitengruppen

Oberflächen-aktivierung	Funktionelle Aminosäureseitengruppe des Enzyms	Kopplungs-/Aktivierungsreagenz, Kopplungsreaktion
-NH ₂	-NH ₂ z. B. Lys oder N-Terminus des Enzyms	Glutardialdehyd, Aminierung
	-COOH z. B. C-Terminus des Enzyms, Asp und Glu	Carbodiimid z. B. EDC, Peptidbindung
-COOH	-NH ₂ z. B. Lys oder N-Terminus des Enzyms	Carbodiimid, z. B. EDC, Peptidbindung
	-SH z. B. Cys	Carbodiimid, z. B. EDC, Thiol-Bindung über Schiff'sche Base
Epoxid	-NH ₂ z. B. Lys oder N-Terminus des Enzyms	Epoxid-Amin-Bindung
-SH	-COOH z. B. C-Terminus des Enzyms, Asp und Glu	Carbodiimid, z. B. EDC, Thiol-Bindung über Schiff'sche Base

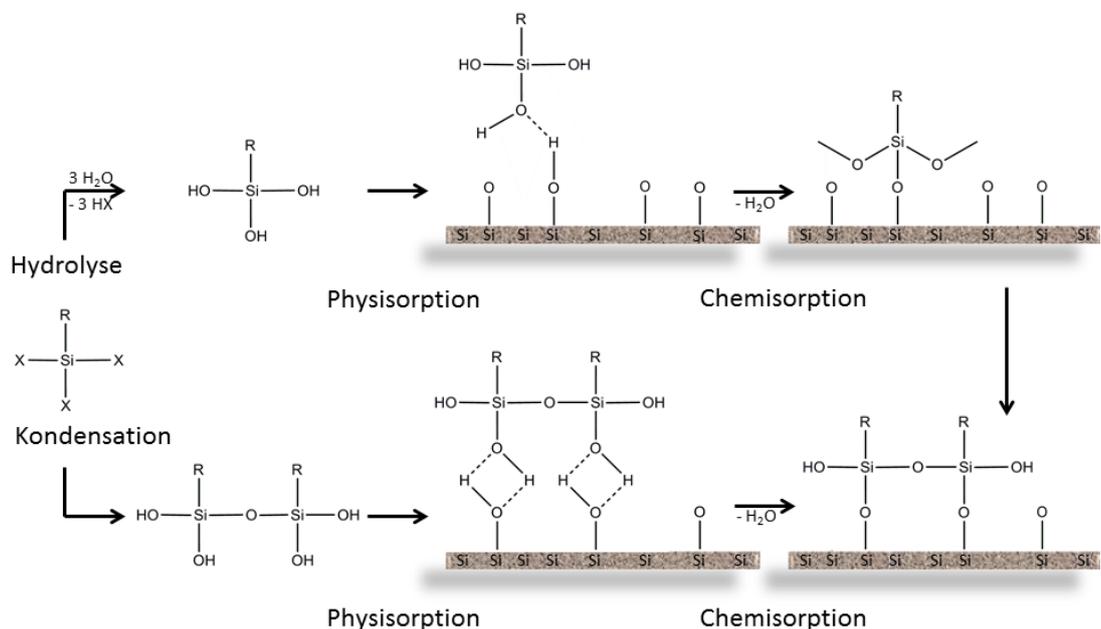


Abbildung 19: Silanabscheidung auf hydroxylierten Silanoberflächen aus der Flüssigphase

X = hydrolysierbare Gruppe, häufig Halogen, Methoxy- oder Ethoxyfunktion; R = Alkylkette als Spacer mit einer funktionalisierten Kopfgruppe, zum Beispiel Allyl-, Phenyl-, Epoxy-, Aminogruppen und viele weitere; Zunächst wird die Silangruppe zu Silanonen hydrolysiert. Nachfolgende scheiden sie sich mittels Physisorption auf der hydrolysierten Oberfläche ab, wo sie kovalente Bindungen ausbilden können. Häufig bilden sich durch Kondensation in der Lösung bereits polymere Aggregate, welche ebenfalls auf der Oberfläche abgeschieden werden können und für Inhomogenitäten in der Silanschicht verantwortlich sind.

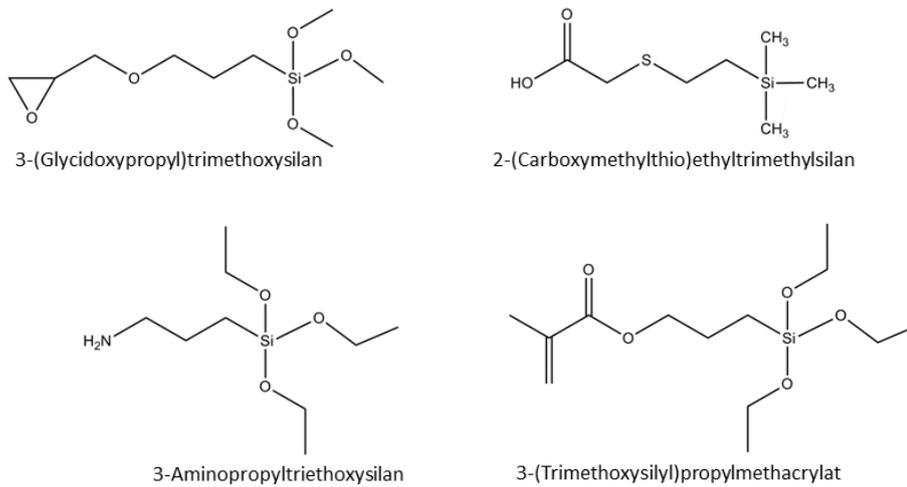


Abbildung 20: Zur Oberflächefunktionalisierung verwendete Silane

Befindet sich in der Reaktionslösung eine erhöhte Konzentration an Wasser können Silanole zu polymeren Aggregaten kondensieren. Diese führen, sobald sie auf der Oberfläche gebunden sind, zu Inhomogenitäten und Defekten in der Silanschicht. Es ist daher wichtig, die einzelnen Reaktionsparameter genau zu kontrollieren. Hierzu zählen die Wahl des Lösungsmittels, der Wassergehalt des Lösungsmittels, das Alter der Lösung, die Reaktionstemperatur und die Reaktionszeit, sowie die Reinheit und die Anzahl der Hydroxidgruppen auf dem Material. Abbildung 20 zeigt die in dieser Arbeit zur Oberflächefunktionalisierung verwendeten Silane.

3.2.3 Enzymimmobilisierung durch Einschluss

Durch Einschluss wird das Enzym durch ein dreidimensionales polymeres Netzwerk oder einem porösen Träger zwar frei in Lösung doch zugleich ortsgebunden gehalten (siehe Abbildung 21). Durch dieses Netzwerk ist das eingeschlossene Enzym in der Lage, den Massentransfer, in der Regel durch Diffusion kleiner Moleküle, zu gewährleisten. Tabelle 7 listet Vor- und Nachteile der Immobilisierung in einem Hydrogel auf.

Es gibt im Allgemeinen vier Methoden zur Herstellung einer polymeren Matrix³⁵:

- Ionotropische Gelierung von Makromolekülen mit multivalenten Kationen,
- temperaturinduzierbare Gelierung,
- Polymerisation durch chemische/photochemische Reaktionen und
- Ausfällung aus nicht mischbaren Lösungsmitteln.

Bei dieser Immobilisierungsmethode kann das Enzym bereits in die Polymerisationslösung zugegeben oder nachträglich in das Netzwerk durch Diffusion eingebracht werden.

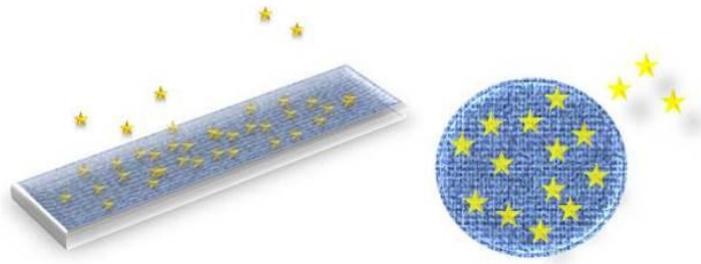


Abbildung 21: Immobilisierung durch Einschluss in eine Matrix

Einschluss des Enzyms in eine polymere oder keramische Matrix. Diese kann als Beschichtung auf einem Flachsubstrat oder in Form eines Partikels vorliegen.

Die wichtigsten Parameter dieser Immobilisierungsmethode sind die Maschenweite und das Diffusionsfreisetzungverhalten des Hydrogels, der hydrodynamische Radius und die biochemischen Eigenschaften des Enzyms sowie die Reaktionsbedingungen der Polymerisation.

Zur Immobilisierung der Enzyme in einer polymeren Matrix wurde das System des Hydrogels ausgewählt. Dies ist ein dreidimensionales Netzwerk aus wasserunlöslichen Polymerketten, das in der Lage ist unter beträchtlicher Volumenzunahme große Mengen an Wasser aus dem umgebenden Medium in seinem Inneren zu binden (siehe Abbildung 22). Die Flüssigkeit als Dispersionsmittel und das Polymer als dispergierte Substanz bilden ein kohärentes System, das heißt sie hängen stark zusammen und durchdringen sich gegenseitig.

Tabelle 7: Vor- und Nachteile der Immobilisierung durch den Einschluss in eine Matrix

Vorteile	Nachteile
Gesteuerte und langfristige Freisetzung möglich (Depot)	Komplexes System
Lagerfähigkeit	Gegebenenfalls denaturierende Reaktionsbedingungen
Enzym ist frei in Lösung jedoch ortsgebunden	Freisetzung ist über die Diffusionskinetik limitiert
Wiederbeladung des Hydrogels ist gegebenenfalls möglich	

Ein weiteres Kriterium des Hydrogels sind seine mechanischen Eigenschaften, insbesondere die Formbeständigkeit unter seinem Eigengewicht und die Deformierbarkeit durch mechanische Belastung. In rheologischer Hinsicht spricht man von einem Hydrogel, wenn der Speichermodul des Systems betragsmäßig größer ist als der Verlustmodul¹¹⁵.

Aufgrund des Gerüstaufbaus im Netzwerk unterscheidet man zwischen chemisch und physikalisch verknüpften Gelen sowie Gele basierend auf unspezifischen Verschlaufungen. Die Gelbildung chemisch vernetzter Matrizen ist aufgrund der kovalenten Bindungen irreversibel, sie sind elastisch bei vergleichsweise hoher mechanischer Stabilität.

Wichtige physikalische Parameter des Hydrogelsystems zum Einschluss von Enzymen sind die Maschenweite, die Morphologie und die mechanische Stabilität⁴⁹. Die wichtigsten chemischen Parameter sind die Hydrophobie und Hydrophilie, das Wasserbindungsvermögen sowie die aktiven und inaktiven funktionellen Gruppen⁴⁹. Diese Eigenschaften werden in erster Linie durch die chemischen Eigenschaften der Hydrogelprecusoren bestimmt.

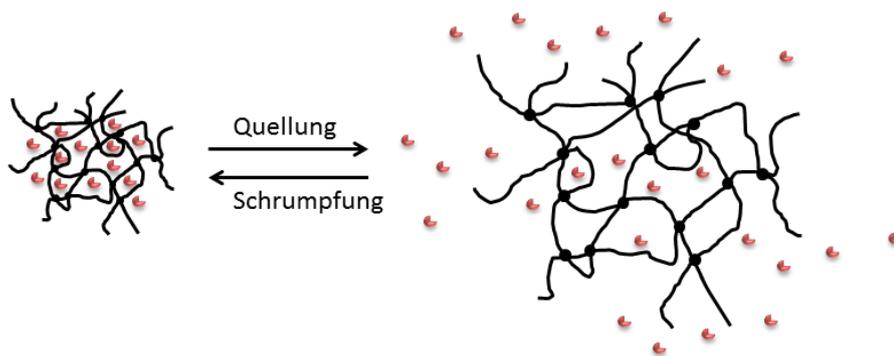


Abbildung 22: Quell- und Schrumpfverhalten von Hydrogelen

Für die Immobilisierung der AHL-Lactonasen wurde ein Hydrogelsystem basierend auf Poly(ethylenglykol)diacrylat (PEG-DA) ausgewählt. Solche Systeme wurden, wie in der Literatur beschrieben, bereits erfolgreich zur Zell- und Proteinimmobilisierung verwendet und als Biomaterial angewandt^{61, 74, 151, 215}.

Hydrogele aus PEG-DA zeichnen sich durch ihre Hydrophilie, Ladungsneutralität, Biokompatibilität, Permeabilität, mechanischen Eigenschaften sowie ihre einfache Herstellung mittels freier radikalischer Polymerisation aus^{15, 31, 162, 172, 253}. Diese Eigenschaften basieren im Wesentlichen auf den Eigenschaften von Poly(ethylenglykol) (PEG). Dieses ist hydrophil, wasserlöslich, biokompatibel^{240, 262}, immunogenisch und nicht-toxisch bei Molekulargewichten größer 400 Da¹⁴¹.

Durch sterische¹¹⁷ und osmotische^{12, 194} Abstoßungseffekte sowie durch die Flexibilität und hohe Beweglichkeit der PEG-Ketten verhalten sich Hydrogele aus PEG-DA passiv gegenüber Proteinmolekülen. Es können sich aufgrund zu geringer Kontaktzeiten keine bindenden Wechselwirkungen zwischen Protein und PEG ausbilden²²⁶.

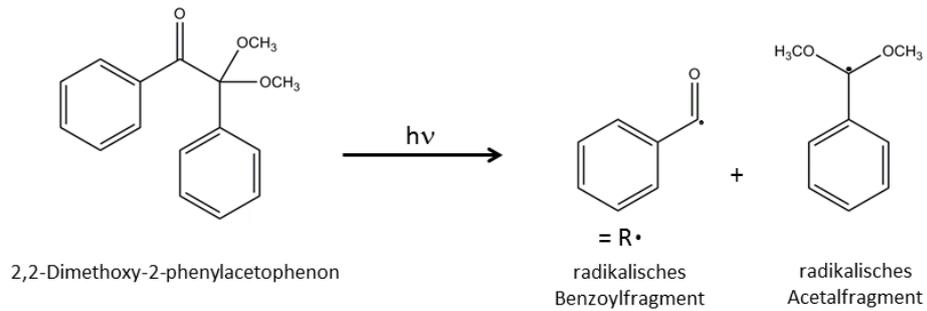


Abbildung 23: Radikalischer Zerfall von 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon

Durch die endständigen Acrylatfunktionen kann PEG-DA in Gegenwart von UV-Licht und Photoinitiatoren zu einem dreidimensionalen Hydrogel vernetzt werden. Die Photopolymerisation erlaubt eine zeitliche und räumliche Kontrolle der Reaktion unter milden Bedingungen²³⁰ mit variabel einstellbaren mechanischen²⁴⁰ und biologischen²⁵⁵ Eigenschaften sowie einstellbarer Maschenweite und Quellverhalten⁷⁵. Zur Polymerisation des Hydrogels wird 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon (DMPA) als Photoinitiator eingesetzt. Abbildung 23 zeigt den Zerfall von DMPA in das aktive radikalische Benzoylfragment und das inaktive radikalische Acetalfragment. Im weiteren Reaktionsverlauf startet das aktive Benzoylfragment durch Angriff der Acrylatbindung die radikalische Polymerisation. Durch Kettenwachstum entsteht ein dreidimensionales polymeres Netzwerk, welches durch Rekombination zweier Radikale abgebrochen wird (Abbildung 24).

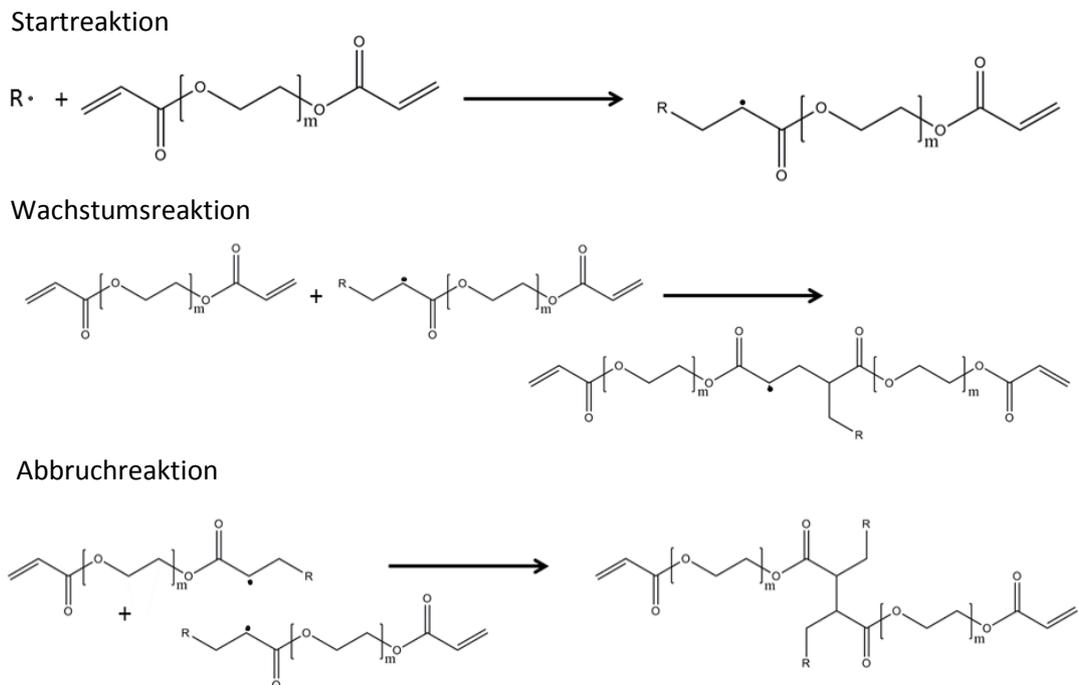


Abbildung 24: Radikalische Polymerisation von Poly(ethylenglykol)diacrylat

4 Material und Methoden

Im Folgenden werden das Vorgehen, die angewandten Methoden und die verwendeten Materialien beschrieben, die benutzt wurden, um die Ziele dieser Arbeit zu erreichen.

4.1 Verwendete Materialien

4.1.1 Plasmide und Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten pMAL-c2x-Vektoren wurden von Walter Fast, Universität Texas, USA freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Sie codieren die AHL-lactonasen mit einem maltosebindenden Protein-*Tag* (MBP-*Tag*), mit einer Schnittstelle für die *tabacco etch virus* (TEV) Protease. Das exprimierte rekombinante Protein akkumuliert im Cytoplasma des Expressionsstamms. Tabelle 8 zeigt die drei in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Tabelle 8: Rekombinante Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pMAL-c2x-aiia	Expressionsvektor für MBP-AiiA, P-lac, Amp ^R	²⁹⁹
pMAL-c2x-aiib	Expressionsvektor für MBP-AiiB, P-lac Amp ^R	²⁰⁴
pMAL-c2x-attm	Expressionsvektor für MBP-AttM, P-lac Amp ^R	Walter Fast, Division of Medical Chemistry, University of Texas, Austin, USA

In Rahmen dieser Arbeit wurde eine Vielzahl verschiedener Bakterienstämme verwendet. Sie wurden zur Expression der AHL-lactonasen, als Biosensoren und als Testorganismen im Biofilmmassay eingesetzt. Tabelle 8 im Anhang I gibt einen Überblick über die verwendeten Bakterienstämme, deren Eigenschaften sowie deren Bezugsquelle. Sie wurden hier nach ihrer Anwendung in dieser Arbeit in drei Gruppen unterteilt: Expressions-, Biosensor- und Bakterienstämme zur Biofilmuntersuchung.

4.1.2 Medien und Zusätze sowie Puffer und Lösungen

Alle Medien und Zusätze sowie die Puffer und Lösungen, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, sind im Anhang II gelistet.

4.1.3 Verwendete Chemikalien und Materialien

Anhang III listet in den Tabellen 39 bis 44 die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Materialien in Gruppenzuteilungen auf:

- Kommerzielle Nachweis- und Reaktionskits (Tabelle 39),

- Chemikalien, welche zur Expression und deren Kontrolle verwendet wurden (Tabelle 40),
- Verwendete Chromatographiesäulen (Tabelle 41),
- Verwendete Enzyme und deren Substrate (Tabelle 42),
- Verwendete Chemikalien zum Nachweis und der Quantifizierung des *Quorum Sensing* sowie des Biofilms (Tabelle 43) und
- Verwendete Chemikalien zur Immobilisierung (Tabelle 44)

4.1.4 Verwendete Geräte und deren zugehörige Software

Anhang IV Tabelle 46 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Geräte, in thematischen Gruppen unterteilt.

4.1.5 Software und Datenbanken

Zur Betrachtung der theoretischen physiko-chemischen Eigenschaften und der Struktureigenschaften der AHL-lactonasen im Hinblick auf die Anwendung geeigneter Immobilisierungsmethoden wurden verschiedene Software und die RCSB Protein Datenbank herangezogen. Tabelle 9 listet die in dieser Arbeit hierzu angewandte Software auf.

Tabelle 9: Angewendete Software und Datenbank

Software/Datenbank	Referenz/Hersteller	URL
Discovery Studio Visualizer 2.0 Freeware	Accelrys, Inc., San Diego, USA	http://accelrys.com
Geneious v5.4	Biomatters Ltd, Auckland, NZ; ¹⁰²	http://www.geneious.com/
ProtParam	ExPASy Proteomics Server des Schweizerischen Instituts für Bioinformatik; ³³⁶	http://web.expasy.org/protparam/
PyMol 1.5	Schrödinger K.K, Mannheim, BRD	http://www.pymol.org/
RCSB Protein Data Bank	³²	http://www.pdb.org/
Swiss PDB Viewer	ExPASy Proteomics Server des Schweizerischen Instituts für Bioinformatik; ¹³⁶	http://www.expasy.org/spdbv/

4.2 Angewandte Methoden

4.2.1 Kulturbedingungen der verschiedenen Bakterienstämme

Die verschiedenen *Agrobacterium tumefaciens* Stämme, siehe hierzu Tabelle 37, wurden alle in AT-Medium unter der Zugabe des jeweilig benötigten Antibiotikums (siehe Tabelle 38) bei 28 °C kultiviert. *Escherichia coli* SoluBL21 mit den jeweiligen MBP-AHL-lactonase kodierenden Plasmiden wurde in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bei 37 °C angezogen. Alle weiteren Gram-negativen Wild- und mutierten Stämme (siehe Tabelle 37) wurden in LB-Medium unter Zugabe des notwendigen Antibiotikums bei 37 °C kultiviert.

4.2.2 Expression und Aufreinigung der AHL-lactonasen

Die rekombinanten Plasmide wurden von W. Fast freundlicherweise zur Verfügung gestellt^{204, 299}. Diese wurden über die Hitzeschock-Methode in den Expressionsstamm *E. coli* SoluBL21 transformiert. Durch einen starken *tac* Promotor im Vektor und den *malE* Translations-initiationsignalen von *E. coli* ist eine Expression der AHL-lactonasen mit maltose-bindendem Protein (MBP) als *Tag* bis zu 200 mg/l Fermentationsbrühe möglich²²⁸. Aufgrund des MBP als *Tag* mit seinen Eigenschaften als molekulares Chaperon²² wird das Fusionsprotein frei löslich im Cytoplasma von *E. coli* exprimiert und zusätzlich *in vivo* vor proteolytischem Abbau geschützt¹⁷¹. Durch die Fusion des MBP am N-Terminus der AHL-lactonase wird die Löslichkeit des rekombinanten Proteins zusätzlich begünstigt und es entstehen im Vergleich zur Fusion am C-Terminus weniger unvollständig gefaltete Translationsprodukte⁴¹. Zur Trennung des Fusionsproteins wurde eine spezifische Protease-Spaltungsstelle für die *tabacco etch virus* Protease eingebaut²⁹⁹.

Als Expressionsstamm wurde *E. coli* SoluBL21TM gewählt. Dieser besitzt in seinem Genotyp, verglichen mit herkömmlichen Expressionssystemen, wesentliche Vorteile¹³⁰:

- T7 Lysogen der T7 RNA Polymerase für einen hohen Transkriptionsgrad, da hierdurch die SOS-Kaskade von *E. coli* gegenüber toxischen Proteinen ausgeschaltet ist,
- defizient in der OmpT Protease, wodurch eine höhere Ausbeute an intaktem rekombinantem Protein möglich ist und
- verbesserte Transformationseffektivität und verbesserte Repräsentation von methylierter DNA, sowie
- uncharakterisierte Mutationen, die es ermöglichen unlösliche Proteine in einer löslichen Form zu exprimieren.

Durch die Transformation der beschriebenen Vektoren in den ausgewählten Expressionsstamm sind AHL-lactonasen günstig, schnell und milligrammweise herstellbar.

Zur **Expression der AHL-lactonasen-Fusionsproteine im Bioreaktor**¹⁷⁶ muss zunächst der Expressionsstamm in der exponentiellen Wachstumsphase in möglichst hoher Zellzahl vorliegen. Dies wurde mittels zweier Vorkulturen erreicht: Eine erste Vorkultur von *E. coli* SoluBL21, transformiert mit dem Vektor pMAL c2x aiaa (respektive aiib oder atm), wurde in 20 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bei 37 °C unter Schütteln (160 rpm) für 16 Stunden angezogen. Von dieser ersten Vorkultur wurden im Verhältnis 1:16 eine zweite Vorkultur in MC2709 Medium mit 100 µg/ml Ampicillin angeimpft und bis zu einer Zellzahl von $OD_{\lambda=600\text{nm}} = 2,0$ unter Schütteln (160 rpm) bei 37 °C angezogen. Die Beimpfung des Bioreaktors, in dem bereits 4 L MC2709 Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bei 37 °C, pH 7,0 und einem Sauerstoffeintrag von 4 vvm bei einer Rührerleistung von 500 rpm vorlagen, erfolgte mit der zweiten Vorkultur in einem Verhältnis 1:50.

Über die Iris Software beziehungsweise direkt über den Labfors3 Bioreaktor selbst wurden die Expressionsbedingungen gesteuert und überwacht. Maßgebliche Parameter waren der pH-Wert, die Temperatur, die Sauerstoffkonzentration, welche an die Rührerleistung gekoppelt war, die Schaumbildung sowie die Glukose- und Stickstofffeedströme. Der pH-Wert wurde mit 6 M Natronlauge und 6 M Phosphorsäure eingestellt. Antifoam A wurde zur Regulation der Schaumbildung bei Bedarf automatisch durch den Bioreaktor zudosiert. Während der gesamten Kultivierung im Bioreaktor wurde die Zellzahl mit Hilfe der optischen Dichte bei $\lambda = 600 \text{ nm}$, die Glukosekonzentration mittels Glukose-Teststreifen und die Ammoniumkonzentration über den Dr. Lange Ammoniumtest überwacht.

Formel 1: Feedflussrate einer Batch-Kultivierung

$$Feed = \left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + m_s \right) * \frac{c_{X_0} * V_0 * e^{\mu * t}}{c_{S_0}}$$

X_0	Biomasse (g)
c_{X_0}	Biotrockenmassekonzentration (g/l)
V_0	Ausgangsvolumen im Bioreaktor (l)
μ	Wachstumsrate (h^{-1})
m_s	Erhaltungsterm (g/g)
c_{S_0}	Substratkonzentration (Feed)
$Y_{X/S}$	Ausbeutekoeffizient (g/g)

In der ersten Kultivierungsphase, der Batch-Phase, wurde bei konstanten Bedingungen bis zum vollständigen Verbrauch der vorgelegten Glukose- und Stickstoffmengen die Zellzahl erhöht. In der anschließenden zweiten Kultivierungsphase, der Fed-Batch-Phase, wurde die Expression des rekombinanten Proteins durchgeführt. Zunächst erfolgte eine Zufütterung mit 50 %-iger Glukoselösung und Stickstoff. Deren Flussrate wurden nach theoretisch

berechneten Verläufen (siehe Formel 1) eingestellt, um bei exponentieller Zufütterung eine höchstmögliche Wachstumsrate zu erreichen.

Zur Expression des rekombinanten Proteins wurde zunächst die Reaktortemperatur auf 30 °C gekühlt, bevor mit 1 mmol/l Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) die Induktion gestartet wurde. Zusätzlich wurden 20 ml Spurenelemente, 200 mg Ampicillin sowie die nötigen Cofaktoren (100 mmol/l Kobaltchlorid für AiiA und BlcC beziehungsweise 500 mmol/l Zinksulfat für AiiB) zugegeben.

Zur Überwachung der Expression wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben für SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Coomassiefärbung und Western Blot Analyse entnommen. Nach 6 Stunden wurde die Expression durch Abtrennung der Zellen mittels 30-minütiger Zentrifugation bei 4000 x g bei 10 °C in der Avanti J-26XP Zentrifuge beendet. Das abgetrennte Zellpellet wurde zu je 8 g-Aliquots bei -80 °C bis zur Aufreinigung gelagert.

Vor dem **Zellaufschluss** wurden die Zellen zunächst gewaschen. Hierzu wurde das Pellet in 4 ml/g eiskaltem PBS resuspendiert und die Zellmasse bei 5039 x g innerhalb von 15 min in der Heraeus Multifuge 1 S-R abzentrifugiert. Das Pellet wurde erneut in 4 ml/g gekühltem Aufschlusspuffer resuspendiert und die Zellen bei 1200 bar im Hochdruckhomogenisator in zwei bis fünf Wiederholungen aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden letztlich in 30-60 min in der Sorvall WX Ultra 80 bei 62200 x g abzentrifugiert. Bei einer eventuellen Trübung des Überstandes wurde dieser sterilfiltriert.

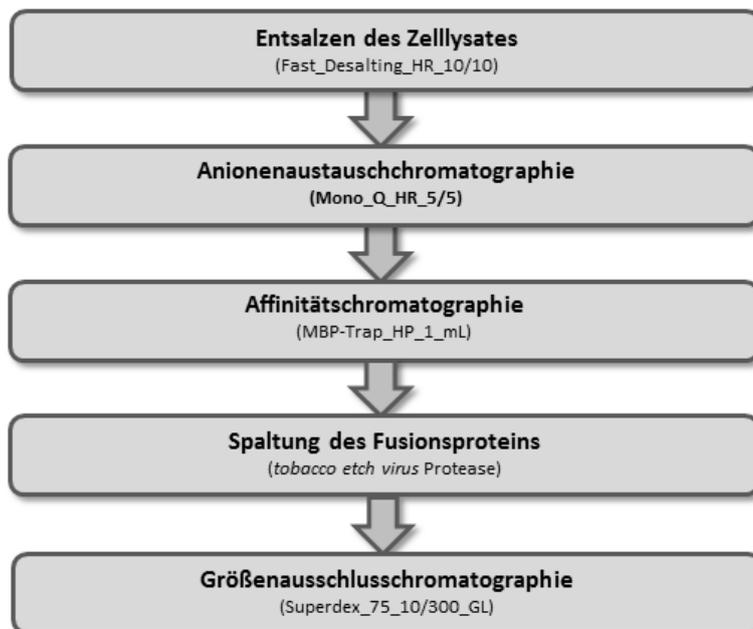


Abbildung 25: Fließschema der chromatographischen Trennung der AHL-lactonasen

Die **chromatographische Trennung** der Fusionsproteine erfolgte mittels verschiedener nacheinander angewandter Methoden (Abbildung 25), die entweder am ÄKTApurifier™ oder am ÄKTAexplorer™ 100 durchgeführt wurden. Zur Ermittlung der Zielfraktion wurden jeweils eine SDS-PAGE-Gelelektrophorese mit anschließender Western Blot Analyse der unterschiedlichen Fraktionen durchgeführt.

Als erstes wurde das Zelllysate für die nachfolgende Anionenaustauschchromatographie entsalzt. Das Zelllysate wurde hierzu zu je 1 ml-Aliquots mit einer Fließrate von 1 ml/min auf die equilibrierte Fast-Desalting-Säule auftragen und die entsprechend entsalzte Proteinfraktion aufgefangen.

Zur weiteren Auftrennung der konzentrierten Probe mittels Anionenaustauschchromatographie wurden 20-50 mg entsalztes Protein mit einer Fließrate von 0,75 ml/min auf die equilibrierte Mono_Q_HR_5/5-Säule aufgetragen. Als Laufpuffer wurden hier 20 mmol/l Triethylamin (TEA) und 20 mmol/l TEA mit 1 mol/l NaCl verwendet.

Bei der nachfolgenden Affinitätschromatographie wurden 4-6 ml der Fusionsproteine enthaltende Fraktion (maximale Zugabe von 7 mg Protein) auf eine equilibrierte MBP_Trap_HP_1_ml-Säule mit einer Fließrate von 0,5 ml/min unter Verwendung von 1 mol/l PBS pH 7,4 als Laufmittel aufgegeben. Im Anschluss wurde mit 5-10 ml einmolarem PBS gewaschen, um ungebundene Proteine von der Säule zu entfernen. Letztlich wurde zur Spaltung der AHL-lactonase vom MBP-Tag 15 µg AcTev Protease mit einer Fließrate von 0,5 ml/min auf die Säule gegeben und für 16 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Die AHL-lactonase enthaltende Zielfraktion wurde abschließend mit PBS pH 7,4 als Laufpuffer auf eine equilibrierte Superdex_75_10/300_GL-Säule mit einer Fließrate von ebenfalls 0,5 ml/min aufgeben und die enthaltenen Proteine der Größe aufgetrennt.

Abschließend wurden die aufgereinigten Probenvolumina eingeengt und somit die AHL-lactonasen aufkonzentriert. Hierzu wurden je 500 µL aufgereinigte Probe mit einem Amicon Ultrazentrifugenröhrchen bei 2000 x g innerhalb von 10 Minuten auf ein Volumen von 100 µL eingeengt. Dies wurde mehrfach wiederholt, um entsprechend aufkonzentriertes AiiB- und BlcC-Proben zur Charakterisierung und Anwendung zu erhalten.

4.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Bradford-Protein Assay

Sowohl die **SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese** (SDS-PAGE) mit einem 4-12 % NuPAGE Novex Bis-Tris MiniGel, MES-laufpuffer und je 15-20 µg Proteinprobe beziehungsweise MBP-Standard als auch der **Western Blot** mit dem iBlot Dry Blotting System wurden nach dem Standardprotokoll der Invitrogen GmbH durchgeführt.

Die Analyse des Western Blots erfolgte mit der Immunodetektion. Hierbei wird das immobilisierte MBP durch einen spezifischen MBP-Antikörper, welcher mit einer Meerrettichperoxidase konjugiert ist, gebunden. Dieser wiederum wurde mit einer Enzym-Substrat-Reaktion nachgewiesen. Zunächst wurde die Zellulosemembran mit der Blocklösung für 30 min bei Raumtemperatur unter Schütteln abgesättigt, um die unspezifische Antikörperbindung zu reduzieren. Anschließend wurde sie mit 0,2 µg/ml des Antikörpers für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Durch je drei 10-minütige Waschschrte mit 50 ml TBS-T-Puffer wurde die Membran gewaschen. Zur Detektion wurden 1 ml Super West Dura Extended Duration Substrate (1:1 Peroxidpuffer und Luminollösung) aufgegeben und mit einem LAS 3000 Imaging System mit einer CCD Kamera die Chemilumineszenz des umgesetzten Luminols visualisiert und dokumentiert. Die Quantifizierung einzelner Banden wurden in definierten Flächen mit Hilfe der Aida Image Analyzer Software deren Pixel-dichtebestimmung in zueinander ins Verhältnis gesetzt.

Zur **Färbung der basischen Proteinendgruppen mit Coomassie** wurden die SDS-PAGE-Gele über Nacht bei Raumtemperatur in 20 ml Coomassie-lösung inkubiert und nach-folgend der Hintergrund mit der Coomassie-Waschlösung wieder entfärbt.

Eine sensitivere Färbung der aufgetrennten Proteine im SDS-PAGE-Gel wurde durch eine **Silber-Färbung** erreicht. Hierzu wurde das Gel zunächst 10 Minuten in der Fixierlösung inkubiert und zweimal in je 50 ml Wasser für 5 Minuten gewaschen. Danach wurde innerhalb einer Minute das Gel mit 50 ml Natriumthiosulfat (1 g/l) sensibilisiert und zweimal mit 50 ml Wasser für 20 Sekunden gewaschen. Anschließend wurde das Gel mit einer Silbernitratlösung (1 g/l) für 10 Minuten inkubiert und überschüssiges Silbernitrat mit 50 ml Wasser und 5 ml Natriumcarbonat (30 g/l) gewegewaschen. Mit 45 ml Silber-färbung-Entwicklerlösung wurde die Silberfärbung bis zur gewünschten Bandenintensität entwickelt. Sobald die Intensität der Banden zufriedenstellend war, wurde mit 2,5 ml einer 2,3-molaren Zitronensäurelösung die Färbung abgestoppt.

Die **Bestimmung der Proteinkonzentrationen** erfolgte nach Protokoll des Bradford-Protein Assays von Bio-Rad oder alternativ photometrisch bei $\lambda = 280$ nm.

4.2.4 MALDI-TOF-Analyse zur Proteinidentifizierung

Die **Identifizierung und die Bestimmung des Reinheitsgrades der aufgereinigten Proteine** erfolgte mittels **MALDI-TOF-Tandem-MS**. Diese Analysen wurden von Herrn Dr. Ekkehard Hiller durchgeführt und werden hier daher nur kurz vorgestellt¹⁵³. Von jeweils 10 µg aufgereinigter Probe wurden die enthaltenen Proteine ausgefällt, resuspendiert und über Trypsin verdaut. Die Aufreinigung der Peptide in einem Volumen von 10 µL erfolgte nach einem Standardprotokoll in ZipTip_{C18}-Spitzen. Hiervon wurde je 1 µL auf einer α -

Cyano-4-Hydroxymethylsäurematrix auf einem „AnchorChip“ aufgetragen. Im Anschluss wurde das Peptidgemisch mittels MALDI-TOF-MS auf das jeweilige Masse/ladungs-Verhältnis über einen Scanbereich des Massenspektrometers von 700 bis 4000 Da untersucht. Die Analyse der Daten zur Identifizierung der Proteine erfolgte mit dem Suchprogramm MASCOT und wurde mit einer Eubakterien-Datenbank beziehungsweise mit der individuellen Aminosäureabfolge der jeweiligen Lactonase abgeglichen.

4.2.5 FT-IR/ATR Analyse der AHL-lactonasen

Die Fourier-Transformation Infrarot-Spektroskopie (FT-IR) eignet sich zur **Analyse der Sekundärstruktur von Proteinen**. Sie beschreibt die konformationelle Anordnung einer Polypeptidkette von Aminosäuren, wobei die räumliche Anordnung von Seitenketten vernachlässigt wird.

Bei der Infrarotspektroskopie der Polypeptidkette von Proteinen treten verschiedene charakteristische Banden auf. Die Amid-I- und die Amid-II-Bande sind hierbei die dominierenden Banden. Die intensivste Absorptionsbande ist die Amid-I-Bande bei $1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$, welche auf die C=O-Streckschwingung und ferner auf die Streckschwingung der C-N-Gruppen zurückzuführen ist. Sie charakterisiert die Rückgratkonformation des Proteins. Die Amid-II-Bande resultiert aus dem Zusammenspiel der N-H-Biegeschwingung, der C-N-Streckschwingung und der C-C-Streckschwingung. Sie befindet sich bei $1510 - 1580 \text{ cm}^{-1}$.

Tabelle 10: Bandenpositionen verschiedener Sekundärstrukturelemente nach Ollesch²³⁷

Strukturelement	Amid-I-Frequenz (cm^{-1})
Aggregierte β -Haarnadelschleifen	~ 1685
Antiparalleles β -Faltblatt	1695 – 1675
β -Haarnadelschleifen	1685 – 1655
α -Helix	1658 – 1650
Ungeordnete Struktur	1650 – 1637
β -Faltblatt, intramolekular	1637 – 1620
Intermolekulares β -Faltblatt	~ 1615

Anhand der Amid-I-Bande wurde zwischen charakteristischen lokalen Strukturelementen zum Beispiel basierend auf intramolekularen Interaktionen wie Wasserstoffbrücken unterschieden: α -Helix, β -Faltblatt und *Random Coil* (Zufallsknäuel). Diese besitzen jeweils charakteristische Absorptionsbanden im Infrarotspektrum (siehe Tabelle 10)

Das am häufigsten vorkommende Strukturmotiv von Proteinen ist die α -Helix. Sie besteht aus einer rechtsgängigen Spirale, die durch eine Wasserstoffbrückenbindung der C=O-

Gruppe jeder Aminosäure mit der N-H-Gruppe der vierten folgenden Aminosäure stabilisiert wird. Im Infrarotspektrum besitzen α -Helices ihre C=O-Absorptionsbanden im Wellenzahlbereich von $1658 - 1650 \text{ cm}^{-1}$.

Das β -Faltblatt besteht aus einzelnen gestreckten Polypeptidketten (β -Stränge), die über Wasserstoffbrücken verbunden sind. Es entsteht eine Struktur ähnlich einer Ziehharmonika. Man unterscheidet weiter zwischen zwei β -Faltblättern: parallelen (N- und C-Terminus liegen auf derselben Seite) und antiparallelen (der N-Terminus liegt auf der Seite des C-Terminus des Partnerstranges). Im Infrarotspektrum befinden sich die Absorptionsbanden der C=O-Gruppen bei $1637 - 1620 \text{ cm}^{-1}$. Antiparallele β -Faltblattstrukturen weisen zusätzlich Absorptionsbanden im Bereich $1695 - 1675 \text{ cm}^{-1}$ auf.

Das *Random Coil* weist keine erkennbare Sekundärstruktur auf, dennoch trägt sie maßgeblich zur Tertiärstruktur des Proteins bei und begünstigt sehr kompakte Proteinstrukturen. Ihre Stabilität erhalten sie durch Ionenbindungen, Wasserstoffbrücken, Dipol-Dipol- sowie Van-der-Waals-Kräfte zwischen Aminosäurenresten. Im Bereich von $1650 - 1637 \text{ cm}^{-1}$ Wellenzahlen weisen sie charakteristische Absorptionsbanden auf.

Bei der Infrarotspektroskopie werden basierend auf Schwingungsanregungen des zu untersuchenden Moleküls Wellenzahlen und Absorptionsintensitäten im Bereich $4000 - 900 \text{ cm}^{-1}$ Wellenzahl gemessen. Hierzu wurde das Equinox 55 Infrarotspektrometer von Bruker mit einer Diamant-ATR Einheit (DuraSamplIRII™) und einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten MCT-Detektor verwendet. Die Auflösung der Absorptionsspektren betrug 4 cm^{-1} . Es wurden jeweils $5 \mu\text{L}$ gelöstes Protein in wässrigem Lösungsmittel auf den ATR-Kristall aufgeben und mit einer Scanzahl von 240 aufgenommen.

Die erhaltenen Rohspektren wurden dann zunächst mathematisch bezüglich eventuell im System enthaltenem Kohlenstoffdioxid und Wasserdampf korrigiert: Aus zwei Einkanal-spektren, einem Probenspektrum und einem Referenzspektrum, wird mittels atmosphärischer Kompensation ein Differenzspektrum gebildet. Im Anschluss wurde ein weiteres Differenzspektrum gebildet: Hier wurde das Probenspektrum um das Spektrum des wässrigen Lösungsmittels korrigiert. Abschließend wurden zur weiteren Untersuchung die zweiten Ableitungen der Spektren gebildet. Die Sekundärstrukturanteile von α -Helix und β -Faltblatt wurden über spezielle Programmteile der Auswertesoftware OPUS ermittelt.

4.2.6 Methoden zur Quantifizierung der spezifischen Enzymaktivität

Sowohl die AHL-spaltende Fähigkeit der AHL-lactonasen als auch die spezifische Aktivitäten wurde durch verschiedene Methoden nachgewiesen. Zum einen wurde mittels Pyranin Assay die Spaltung des AHL-Substrates chemisch nachverfolgt und die spezifische

Aktivität ermittelt. Zum anderen wurde mittels X-Gal- und ONPG-Assay das Eingreifen der AHL-lactonasen auf das *Quorum Sensing* Gram-negativer Organismen durch den Einsatz von *A. tumefaciens* NTL4 als Reporterstamm betrachtet.

Chemisch wurde der Umsatz von AHL analog der Reaktionsgleichung (siehe Abbildung 13, Seite 51) über zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt: Das Produkt Acylhomoserin wurde anhand des erniedrigten pH-Wertes mittels des pH-Indikators Pyranin quantifiziert.

A. tumefaciens NTL4¹²⁰ trägt auf einem Plasmid eine *traI-lacZ* Promotorfusion, so dass die Aktivierung der *traI* Gene mit der Produktion von β -Galactosidase assoziiert ist. Die gebildete β -Galactosidase wurde über den Umsatz zweier verschiedener Substrate quantifiziert: 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) zu 5-Bromo-4-chloro-3-Hydroxyindol, welches weiter zu dem blauen Farbstoff 5,5'-Dibromo-4,4'-dichloro-indigo oxidiert, oder alternativ 2-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG) zu dem gelben Farbstoff *o*-Nitrophenol.

Die Fähigkeit der AHL-lactonasen zur Hydrolyse des Substrates wurde beim **Pyranin-Assay** genutzt. Bei Pyranin (8-Hydroxy-1,3,6-pyrenetrisulfonat) handelt es sich um einen wasserlöslichen fluoreszierenden pH-Indikator, der in sehr starkem Maß von der Ionisation der 8-Hydroxylgruppe ($pK_a = 7,2$) abhängt⁶⁶. Er eignet sich also zur pH-Bestimmung im Bereich pH 6-10.

Hierzu wurden 0,25 μ g AHL-lactonase mit 50 mol/l Pyranin in einmolarem PBS-Puffer mit einem pH 7,4 und 3 mmol/l *N*-Acylhomoserinlacton gemischt. Alternativ wurde das Reaktionsgemisch ohne Lactonase direkt auf in Multiwellplatten-immobilisiertem Enzym zugegeben. Zu den Zeitpunkten $t = 0$ min und $t = 60$ min wurde anschließend die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 410$ nm und einer Emissionswellenlänge von $\lambda = 465$ nm im Biotek-Reader ausgelesen. Die pH-Wert-Änderung wurde anhand eines 50 μ mol/l Pyraninstandards (pH-Werte von 6,2 bis 7,8) ausgewertet.

Sowohl X-Gal-Assay als auch ONPG-Assay erfordern eine Vorinkubation der zu untersuchenden Lactonase, frei löslich oder immobilisiert, mit dem Substrat. Hierzu wurden diese mit einer 10 μ mol/l C6-Homoserin-lösung in PBS-Puffer bei 22 °C für 2,5 h inkubiert, um die Konzentration der Signalmoleküle herabzusetzen. Anschließend wurde mit dieser verringerten Konzentration an C6-Homoserin (C6-HSL) der X-Gal oder der ONPG-Assay durchgeführt.

Der **ONPG-Assay** wurde nach einem modifizierten Protokoll von Schipper²⁸⁰ durchgeführt: 2,5 ml AT-Medium wurden mit 10^7 Zellen *A. tumefaciens* je 5 μ L vorinkubierter AHL-lösung gegeben. Die eingesetzten AHL-Standardkonzentrationen variierten von 10^{-7} bis 10^{-9} molar. Anschließend wurde dieser Ansatz bei 28 °C für 16 h bei 160 rpm inkubiert.

Für die Auswertung wurde zunächst die Zelldichte der Kultur bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600 \text{ nm}$ bestimmt. Anschließend wurde 1 ml der Übernachtskultur mit 20 μL Toluol versetzt und 3 Minuten gevortext. Nach der Phasentrennung wurden 800 μL dieser Lösung mit 200 μL einer frisch angesetzten ONPG-Lösung (13 nM in Z-Puffer) versetzt und bei Raumtemperatur im Dunkeln für 20 Minuten inkubiert. Durch Zugabe von je 400 μL einer einmolaren Na_2CO_3 -Lösung wurde die Reaktion abgestoppt, Trübstoffe bei 17000 \times g abzentrifugiert und die Extinktion bei einer Wellenlänge von $\lambda = 420 \text{ nm}$ vermessen. Zur Auswertung wurde das Verhältnis $E_{\lambda=600 \text{ nm}}/E_{\lambda=420 \text{ nm}}$ gebildet.

Alternativ zum ONPG-Assay wurde der **X-Gal-Assay** durchgeführt. Hierzu wurden pro Kavität einer 96-Multiwell-Mikrotiterplatte je 240 μL einer 16 h-Vorkultur von *A. tumefaciens* in AT-Medium mit einer $\text{OD}_{\lambda=600\text{nm}}=0,45$ sowie 10 μM C6-HSL-Lösung und 40 $\mu\text{g/ml}$ X-Gal zugegeben. Die jeweilige Probe mit einem Volumen von 50 μL , zum Beispiel immobilisierte Lactonasen auf funktionalisierten Agarosebeads, wurde zuletzt zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 28 °C innerhalb von 5 Stunden. Für die Auswertung wurde der Quotient $E_{\lambda=600\text{nm}}/E_{\lambda=680\text{nm}}$ gebildet. Dieser Assay wurde alternativ mit AHL-lactonase ausgerüsteten Multiwellplatten durchgeführt.

Die **Bestimmung der spezifischen Aktivität von Lysozym** erfolgte anhand der Lyse von *Micrococcus luteus* in 0,1 molarem PBS-Puffer pH 7,2. Hierzu wurden zu 50 μL einer Suspension von lyophilisiertem *Micrococcus* (0,05 mg/ml) 50 μL einer Lysozymlösung im Konzentrationsbereich bis 10 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben. Bei 24 °C wurde die Abnahme der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600 \text{ nm}$ innerhalb von 5 Minuten verfolgt. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität erfolgte nach Formel 2.

Formel 2: Spezifische Aktivität von Lysozym

$$A = \frac{\Delta OD_{600 \text{ nm}} * 1000}{m_{\text{Lysozym}}}$$

A	Spezifische Aktivität (U/mg)
$\Delta OD_{600 \text{ nm}}$	Differenz der optischen Dichte zu den Zeitpunkten 0 und 5 Minuten (-)
m_{lysozym}	Masse des Lysozyms (mg)

Die **Bestimmung der spezifischen Aktivität von Subtilisin** modifiziert nach Hintz¹⁵⁴ basiert auf der Spaltung des Substrates *N*-Succinyl-Alanin-Alanin-Prolin-Phenylalanin-*p*-Nitroanilid (succAPF) zu 4-Nitroanilin, welches unter alkalischen Bedingungen gelb wird. Hierzu wurden in einmolarem Tris-Puffer mit 147 mg/l Calciumchlorid 0,138 mg/ml Substrat und 0,444 mg/ml Subtilisin zugegeben und bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Die entstandene Gelbfärbung wurde photometrisch bei der Wellenlänge $\lambda = 405 \text{ nm}$ vermessen. Formel 3 gibt die Bestimmung der spezifischen Aktivität an.

Formel 3: Spezifische Aktivität von Subtilisin

$$A = \frac{\Delta E_{405 \text{ nm}} * V}{\Delta t * \epsilon * d * m_{\text{Subtilisin}}} * 10000$$

A	Spezifische Aktivität (U/mg)
$\Delta E_{405 \text{ nm}}$	Differenz der Extinktion zu den Zeitpunkten 0 und 15 Minuten (-)
$m_{\text{Subtilisin}}$	Masse des Subtilisins (mg)
Δt	Inkubationszeit (min)
V	Volumen in der Küvette, V = 0,0001 L
d	Schichtdicke, d = 1 cm
ϵ	spez. Molarer Extinktionskoeffizient, $\epsilon = 9600 \text{ L} * \text{mol}^{-1} * \text{cm}^{-1}$

4.2.7 Bioinformatische Methoden

In dieser Arbeit wurden bioinformatische Methoden angewandt, um die physiko-chemischen Eigenschaften der drei AHL-lactonasen AiiA, AiiB und BlcC (exAttM) zu bestimmen, ihre Homologie auf der Basis der Primärstruktur sowie ihre Tertiärstruktur zu visualisieren und zu analysieren. Die jeweiligen Sequenzinformationen wurden hierfür aus der allgemein zugänglichen Datenbank NCBI Entrez Protein (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) entnommen. Dies ist eine Protein-Sequenz-Datenbank, welche auf der Zusammenstellung mehrere Datenbanken wie beispielsweise SwissProt (SIB; <http://www.expasy.org>) und PDB (www.rcsb.org/) beruht.

Das Programm ProtParam¹²⁸ der Internet-Homepage des ExPASy Proteomics Servers des Swiss Institute of Bioinformatics (SIB; <http://www.expasy.org>) listet basierend auf der Aminosäuresequenz **physiko-chemische Eigenschaften des Proteins** und seiner Sequenz auf. Hierzu gehören das Molekulargewicht, der theoretische isoelektrische Punkt, die Aminosäurezusammensetzung, die atomare Zusammensetzung, der spezifische molare Extinktionskoeffizient bei $\lambda = 280 \text{ nm}$, die erwartete Halbwertszeit in drei Organismen (Mensch, Hefe und *E. coli*), der Stabilitätsindex und Einschätzungen zur Hydrophobizität (Grand average of hydropathicity, GRAVY). Das Molekulargewicht berechnet sich aus der Addition der isotopen Massen der Aminosäuren des Proteins und der Wassermoleküle. Der theoretische isoelektrische Punkt wird über die pK-Werte der Aminosäuren ermittelt. Aus den Einzelwerten der Extinktionskoeffizienten von Cystein, Tryptophan und Tyrosin setzt sich der molare spezifische Extinktionskoeffizient zusammen.

Die **Analyse der Primärstruktur** hinsichtlich Hydrophobie/Hydrophilie und der Ladung der Aminosäure sowie des pI-Wertes der einzelnen Aminosäuren erfolgte mit der Geneious Free Software¹⁰² (<http://www.geneious.com/>).

Zur **Strukturvisualisierung und zur Analyse der Tertiärstrukturen** der AHL-lactonasen wurden der Swiss-PdbViewer (aka DeepView; <http://www.expasy.org/spdbv>)¹³⁶ und der Discovery Studio Visualizer (<http://accelrys.com>) verwendet.

Das **Multiple Sequenz Alignment der Primärstrukturen** zum Nachweis der Homologie der AHL-lactonasen untereinander wurde mit der Geneious Free Software¹⁰² (<http://www.geneious.com/>) durchgeführt. Dieses arbeitet mit Parametern wie der Blossum 62 Matrix, Gap open Penalty 12, Gap Extension Penalty 2 und Global Alignment Type mit Gaps am freien Ende und 10 Iterationsschritten.

Die **Abschätzung des hydrodynamischen Radius von Proteinen** erfolgte nach einer Gleichung von Wilkins³³⁵ basieren auf der Anzahl der Aminosäuren in der Polypeptidkette (Formel 4).

Formel 4: Abschätzung des hydrodynamischen Radius von Proteinen nach Wilkins³³⁵

$$R_h = (4,75 \pm 1,11) * N^{0,29 \pm 0,02}$$

R_h hydrodynamischer Radius
N Anzahl der Aminosäuren in der Polypeptidkette

4.2.8 Biofilmmassay unter statischen Bedingungen

Der Biofilmmassay unter statischen Bedingungen wurde zur Untersuchung von drei Kompartimenten genutzt:

- Kulturüberstand: Suspendierte Zellen in der Umgebung der immobilisierten AHL-lactonasen,
- Boden der 96-Multiwellplatte: Biofilm in direktem Kontakt zu immobilisierten AHL-lactonasen und
- Calgary Biofilm Device⁵⁵: Biofilm in direkter Umgebung der immobilisierten AHL-lactonase jedoch ohne direkten Kontakt.

Der Biofilmmassay wurde in einem Gesamtvolumen von 300 μ L/Kavität in einer 96-Multiwellplatte durchgeführt. Für die Untersuchung des Hydrogels oder der Adsorptions-trägermaterialien wurden diese mit je 50 μ L/Kavität eingesetzt. Zur Bestimmung des Einflusses von AHL-lactonasen auf die Biofilmbildung wurden AiiB und BlcC mit einer Konzentration von 8 ng/ml eingesetzt. Hierzu wurden die Mikroorganismen in LB-Medium mit einer Endkonzentration von $OD_{\lambda=600\text{ nm}} = 0,03$ (10^8 Zellen/ml) zugegeben und für 16 h in einer 96-Multiwellplatte mit aufgesetztem Calgary Biofilm Device⁵⁵ inkubiert. Nach Ablauf von 16 h wurde der Kulturüberstand abgenommen und die Zelldichte bei einer Wellenlänge

von $\lambda = 600$ nm und ausgewählten Virulenzfaktoren (siehe Kapitel 4.2.9) bestimmt, um den Einfluss der AHL-lactonasen auf suspendierte Zellen und Virulenz-faktoren zu untersuchen.

Abschließend wurde entweder die metabolische Aktivität durch den Umsatz von Fluoresceindiacetat (FDA) beziehungsweise 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid (XTT) oder die Biofilmmasse durch Färbung mit Kristallviolett (vor allem für das Calgary Biofilm Device⁵⁵) bestimmt.

a) Zur Ermittlung der **metabolischen Aktivität mittels enzymatischer Spaltung von FDA** wurden natürlich vorkommende Esterasen herangezogen: Die Konzentration der Esterasen ist direkt proportional zur Zellzahl im Biofilm. Es wurde je Kavität 100 μ L einer 1,2 millimolaren FDA-lösung in 0,9 %-iger Natriumchloridlösung zugegeben und 30 Minuten bei 30 °C inkubiert. Mit $\lambda_{\text{Anregung}} = 485$ nm und $\lambda_{\text{Emission}} = 535$ nm wird gebildetes Fluoreszein mit einem Tecan-Reader vermessen.

b) Die **Ermittlung der metabolischen Aktivität mittels Umsatz von XTT** basiert auf dem Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System in den Mitochondrien von metabolisch aktiven Zellen. Hierfür wurden je 100 μ L XTT-lösung pro Kavität gegeben und bei 37 °C für 20 Minuten inkubiert. In dieser Zeit wurde XTT zu einem orangefarbenem Formazanfarbstoff gespalten. Die Auswertung erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 492$ nm.

c) **Kristallviolett** als basischer Farbstoff bindet an Anionen. Somit werden sowohl Gram-negative Bakterien selbst als auch negativ geladene Teilchen der EPS-Matrix angefärbt. Zur Ermittlung der Biofilmmasse wurden zunächst die Platten beziehungsweise das Calgary Biofilmdevice unter der Laminarflow für 30 Minuten getrocknet und die Platten mit je 100 μ L, das Device mit 300 μ L einer 1 % Kristallviolettlösung in 33 % Eisessig pro Kavität für 20 Minuten angefärbt. Im Anschluss wird überschüssiges Kristallviolett dreimal unter langsam fließendem Wasser abgespült und die Platte oder das Device 30 Minuten unter der Laminarflow erneut getrocknet. Der gebundene Farbstoff wird mit je 300 μ L einer 33 %-igen Essigsäure gelöst und bei $\lambda = 590$ nm photometrisch vermessen.

4.2.9 Bestimmung unterschiedlicher Virulenzfaktoren

Der Wirkung der AHL-lactonasen AiiB und BlcC auf der QS wurde zum einen, wie bereits beschrieben, über die Beeinflussung der Biofilmbildung untersucht, zum anderen wurde der Einfluss auf nachfolgende Virulenzfaktoren ermittelt:

- auf die Sekretion der Sekundärmetabolite Pyocyanin, Pyochelin, Pyoverdin und von *P. aeruginosa* PAO1,
- auf die Tensidproduktion der Rhamnolipide von *P. aeruginosa* PAO1,

- auf das Bewegungsverhalten, das Schwimmen und Schwärmen, von *P. aeruginosa* PA14 und PAO1 sowie *P. mirabilis* 4479 und
- auf die Antibiotikaproduktion des Violacein von *C. violaceum* 12472.

Die Bestimmung der Sekundärmetabolite, der Rhamnolipide und des Gesamtgehaltes der Proteasen erfolgte im zellfreien Überstand des statischen Biofilmassays. Hierzu wurden je 200 μL Überstand bei 17.000 x g für 10 Minuten abzentrifugiert.

Pyocyanin, ein blauer Sekundärmetabolit von *P. aeruginosa*, ist direkt durch das QS kontrolliert und gilt als Schlüsselvirulenzfaktor. Es wurde direkt in 100 μL zellfreiem Überstand bei $\lambda = 690$ nm photometrisch nach Bijtenhoorn³⁷ bestimmt.

Der endogene Wachstumspromotor **Pyochelin** bindet Eisen und ist für das Infektionsverhalten von *P. aeruginosa* notwendig. Zur Bestimmung des Pyochelingehtes im zellfreien Überstand nach Yadav³⁴⁵ wurden zu 20 μL Überstand 20 μL 0,5 N HCl, 20 μL Molybdatreagenz, 20 μL 1 M NaOH und 20 μL MilliQ in dieser Reihenfolge zugegeben. Die Konzentration wurde anschließend photometrisch bei $\lambda = 510$ nm bestimmt.

Pyoverdin, ein fluoreszierender Sekundärmetabolit, wurde direkt in 100 μL zellfreiem Überstand bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 405$ nm und einer Emissionswellenlänge von $\lambda = 465$ nm gemessen.

Rhamnolipide gehören zu der Klasse der Glycolipide von *P. aeruginosa* und haben Tensideigenschaften: sie besitzen eine Glycosylkopfgruppe und einen Fettsäurerest^{190, 234}. Zur Bestimmung der Rhamnolipide wurden der pH-Wert von 100 μL zellfreier Überstand auf pH 2 reduziert, indem 25 μL 1 N H_2SO_4 zugegeben wurde. Hierdurch fallen diese aus und wurden bei einer Wellenlänge von $\lambda = 490$ nm photometrisch quantifiziert³.

Zur Bestimmung des **Schwimm- und Schwarmverhaltens** wurden je 500 μL einer Übernachtskultur der Organismen, *P. aeruginosa* PA14, PAO1 beziehungsweise *P. mirabilis* DMS 4479, bei 17.000 x g für 10 Minuten abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde anschließend in 50 μL LB-Medium resuspendiert und davon je 1 μL auf einer Schwimm- oder Schwärmplatte in die Mitte aufgegeben. Das Schwimm- beziehungsweise Schwarmverhalten wurde nach einer 16- und 48-stündigen Inkubation bei 37 °C fotodokumentarisch festgehalten.

C. violaceum bildet, gesteuert durch das QS, das violette Pigment und Antibiotika **Violacein**. Nach einem Protokoll von Martinelli²¹⁰ wurde Violacein wie folgt nachgewiesen und quantifiziert: 200 μL Biofilmüberstand wurde bei 60 °C komplett eingedampft. Violacein

wurden aus dem Pellet anschließend in 100 μ L DMSO innerhalb von zwei Stunden bei Raumtemperatur extrahiert. In diesem Extrakt wurde Violacein bei einer Wellenlänge von $\lambda = 590$ nm photometrisch quantifiziert.

4.2.10 Immobilisierung der AHL-lactonasen durch Physisorption

Die Immobilisierung der Enzyme Lysozym und Subtilisin als Modellproteine und anschließend die Immobilisierung der AHL-lactonasen als Zielenzyme via nicht spezifischer, elektrostatischer oder hydrophober Bindungen wurde nach einem Protokoll von Salman durchgeführt²⁷⁵. Das Trägermaterial wurde in einem definierten Trägermaterial-Enzym-Verhältnis jeweils in einem Puffer mit einem pH-Wert, der oberhalb beziehungsweise unterhalb des pH-Wertes des isoelektrischen Punktes des zu immobilisierenden Enzyms lag, bei 4 °C unter stetigem Rühren oder Schütteln für 24 h inkubiert. Tabelle 11 listet die zur Immobilisierung eingesetzten Puffer auf. Im Anschluss wurde das Trägermaterial bei 17000 x g für 3 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die immobilisierte Proteinmenge wurde aus der Differenz der Proteinmenge im Überstand nach der Immobilisierung zu der eingesetzten Proteinmenge mittels Bradford-Protein Assay bestimmt.

Tabelle 11: Pufferbedingungen der Physisorption

Reaktionsbedingungen/ zur Reaktion wichtige Parameter	AHL-lactonase	Lysozym	Subtilisin
Isoelektrischer Punkt	4,7-5,8	9,3	9,4
Puffer mit pH < pI	Natriumcitratpuffer pH 4,0	20 mM Tris, 1 mM CaCl ₂ ; pH 7,8	20 mM Tris, 1 mM CaCl ₂ ; pH 7,8
Puffer mit pH > pI	Natriumcitratpuffer pH 6,5	Glycinpuffer pH 12,0	5 mM NaPO ₄ ; 0,3 mM CaCl ₂ ; pH 6,5
Zur Immobilisierung verwendete Enzymmenge (μ g/mg Trägermaterial)		76,9	75,2

Die Immobilisierung der AHL-lactonasen erfolgte spezifisch über das MBP-Tag an Maltose, welche an silanisierendem Glas (siehe Unterkapitel kovalente Immobilisierung, Silanisierung) angekoppelt wurde.

Zur **Immobilisierung der Fusionsproteine an Glasträgermaterialien** wurden diese zunächst über eine Silanisierung funktionalisiert und anschließend mit Maltose ausgerüstet. Die Durchführung der Silanisierung allgemein wird weiter in Kapitel 4.2.11 ausgeführt. Die Ankopplung der Maltose an Glycidoxypropyltrimethoxysilan wurden nach einem Protokoll von Gao¹²⁶ durchgeführt. Hierzu wurde durch eine zweistündige Inkubation mit einer Maltoselösung (2 g in 1 molarer Natronlauge) bei Raumtemperatur die Maltose direkt an die

Epoxydgruppe des Silans angekoppelt (300 µL pro Kavität einer 96-Multiwellplatte). Nicht gebundene Maltose wurde anschließend mit MilliQ in mehreren Waschschriften entfernt.

4.2.11 Immobilisierung der AHL-lactonasen durch Chemisorption

Zur chemisorptiven Anbindung der AHL-lactonasen, zur Bereitstellung geeigneter funktioneller Gruppen zur Ankopplung von Maltose und zur Oberflächenbindung des polymeren Netzwerkes waren zunächst Trägermaterialien mit geeigneten funktionellen Gruppen notwendig. Durch geeignete Silanisierung (siehe Abbildung 20, Seite 59) wurden auf Glasobjektträgern, auf Siliziumwafern und auf Glasböden spezieller Multiwellplatten oberflächengebundene Epoxid-, Amino-, Carboxy- und Methacrylatfunktionen bereitgestellt.

Zur **Silanisierung** wurden die Trägermaterialien zunächst mit 2 %-iger Hellmanex®-Lösung bei 40 °C für 90 Minuten und anschließendem 5-minütigem Ultraschallbad gereinigt, mit MilliQ-Wasser gewaschen und unter einem Stickstoffstrom getrocknet.

Die Trägermaterialien wurden durch eine 30-minütige Inkubation bei 75 °C in basischer Piranha-Lösung hydroxyliert, anschließend mit MilliQ-Wasser gewaschen und getrocknet. Im Anschluss erfolgte die einstündige Silanisierung mit einer 5 %-igen Silanlösung in Ethanol bei Raumtemperatur. Nicht kovalent gebundene Silanole wurden durch ein Ultraschallbad in Ethanol innerhalb von 5 Minuten entfernt.

Nach der Trocknung der Trägermaterialien unter einem Stickstoffstrom, wurden sie abschließend bei 100 °C für eine Stunde erhitzt. Hierdurch verfestigten sich die kovalenten Bindungen der Silane, insbesondere die freien Silanolgruppen, zu anderen Silanmolekülen und zum Trägermaterial³⁰⁴. Zur Ausrüstung einer 96-Multiwellplatte wurden jeweils 300 µL Reaktionslösung pro Reaktionsschritt zugegeben.

Die Oberflächenanbindung der AHL-lactonasen erfolgte anschließend über drei verschiedene Methoden:

- Über eine adsorptive Bindung des MBP-Tags an Maltose, welche an GOP gebunden wurde,
- über eine chemisorptive Bindung des C-Terminus von AiiB und BlcC an aminofunktionalisierte Oberflächen und
- über eine chemisorptive Bindung des N-Terminus von AiiB und BlcC an carboxyfunktionalisierte Oberflächen.

Zur **Ankopplung von Maltose an epoxidfunktionalisierte Trägermaterialien** wurden diese für zwei Stunden mit einer Maltoselösung (20 g/l in 1 molarer Natronlauge) bei

Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde nicht gebundene Maltose mit MilliQ-Wasser abgewaschen und die Trägermaterialien getrocknet.

Die **Ankopplung von MBP-Fusionsprotein** an Maltose-ausgerüsteten Oberflächen erfolgte entweder innerhalb von 16 h bei 4 °C oder alternativ bei Raumtemperatur innerhalb von 2 h unter kontinuierlichem Schütteln. Hierzu wurden die Zelllysate in einer Konzentration von 20 mg/ml in 10 millimolarem PBS pH 7,4 verdünnt aufgegeben.

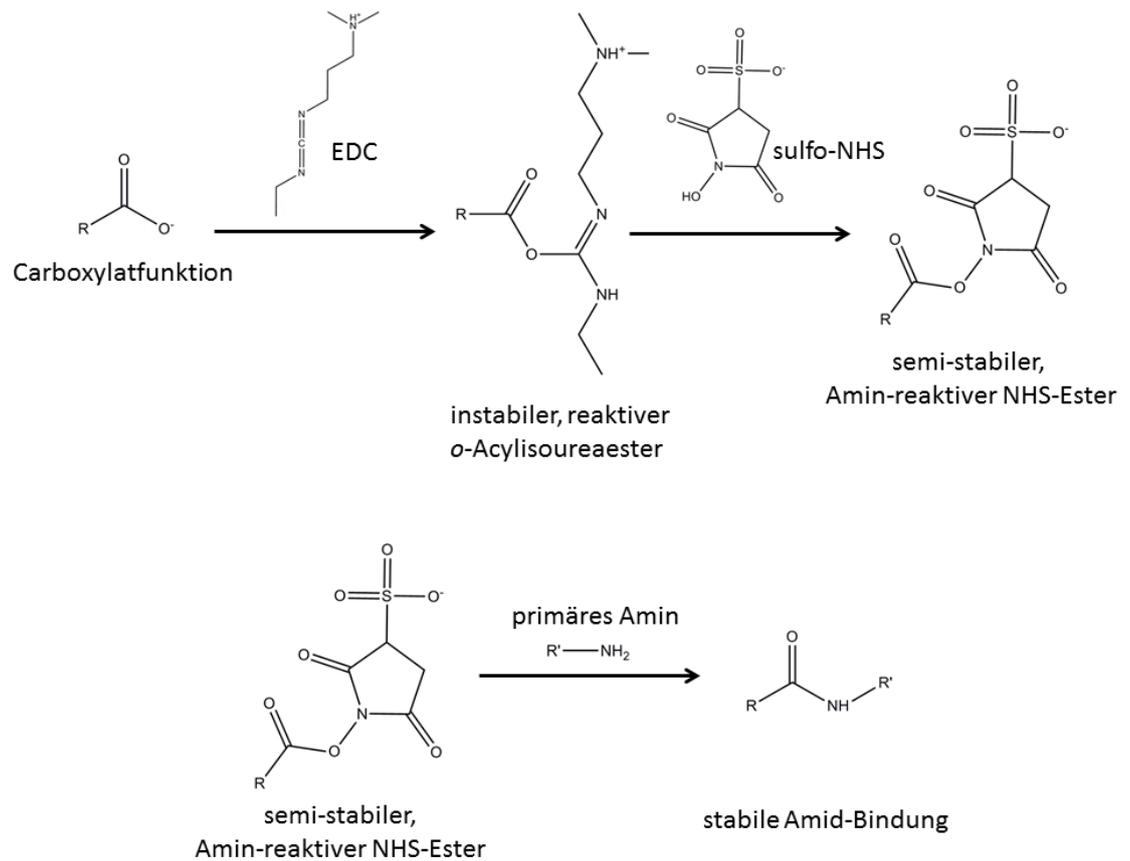


Abbildung 26: Kovalente Bindung primärer Amine und Carboxylate mit EDC/sulfo-NHS

Im ersten Schritt bindet EDC an der Carboxylatfunktion zu einem instabilem, reaktiven *o*-Acylisoureaester, welcher durch sulfo-NHS zu einem semi-stabilen, aminreaktiven NHS-Ester überführt wird. Letzterer bildet mit einem primären Amin eine stabile Amid-Bindung.

Eine **kovalente Bindung von Carboxylatfunktionen mit primären Aminen** wurde mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) und *N*-hydroxysulfosuccinimid (sulfo-NHS) erzielt. Hierbei bildete die Carboxylatfunktion mit EDC zunächst einen instabilen, reaktiven *o*-Acylisoureaester. Mit sulfo-NHS bildete sich hieraus ein semi-stabiler Amin-reaktiver NHS-Ester, welcher mit primären Aminen stabile Amid-Bindungen ausbildete (siehe Abbildung 26).

Zur **kovalenten Bindung von AiiB und BlcC über ihren N-Terminus an carboxylierte Oberflächen** wurden je Kavität einer 96-Multiwellplatte 50 μL EDC/sulfo-NHS-Lösung hineinpipettiert und für 25 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Nicht gebundenes EDC wurde entfernt, indem die Kavitäten mit viel MES60 gewaschen wurden. Dann wurde zu jeder Kavität 100 μL AiiB beziehungsweise BlcC (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in MES60) zugegeben und für 2,5 Stunden unter Schütteln inkubiert. Abschließend wurden nicht gebundenes AiiB beziehungsweise BlcC mit viel MES60 durch Waschen entfernt.

Für die **kovalente Bindung von AiiB und BlcC über ihren C-Terminus an aminofunktionalisierte Oberflächen** wurde zunächst EDC/sulfo-NHS-Protein-Lösung auf einem Schüttler für 25 Minuten inkubiert. Im zweiten Schritt wurden von dieser Lösung je 100 μL pro Kavität einer 96-Multiwellplatte zugegeben und für weitere 2,5 Stunden inkubiert. Abschließend wurde nicht gebundenes AiiB beziehungsweise BlcC mit viel MES60 durch Waschen entfernt.

4.2.12 Immobilisierung der AHL-lactonasen in einer polymeren Matrix

Die Synthese der Poly(ethylenglykol)diacrylat (PEG-DA)-Hydrogele erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Mellot²¹⁵. Es wurden zunächst 2,2 mg/ml DMPA in *p*-Vinylpyrrolidon als Reaktionsbeschleuniger (Stammkonzentration 300 mg/ml) mit der jeweiligen, der Volumenkonzentration entsprechenden Menge an PEG-DA unter Vortexen gemischt und langsam die korrespondierende Menge MilliQ zugegeben. Dieses Gemisch wurde für drei Sekunden bei einer Leistung von 15 mW/cm² mit UV-Licht bestrahlt und polymerisiert.

4.2.13 Charakterisierung der adsorptiven Immobilisierungssysteme

Zur Charakterisierung der unterschiedlichen Adsorptionsträger wurden die Partikelgröße in trockenem Zustand mittels Rasterelektronen- und Lichtmikroskopie sowie die Partikelgröße in hydratisiertem Zustand mittels dynamischer Lichtstreuung analysiert. Ebenso wurden die spezifische Oberfläche mittels Gasadsorption (BET-Messung), das Zeta-Potential in den Puffersystemen, die Hydrophilie beziehungsweise die Hydrophobizität mittels Kontaktwinkelmessung bestimmt. Abschließend wurden die einzelnen Materialien mittels FT-IR/ATR in trockenem und hydratisiertem Zustand charakterisiert.

Die **Bestimmung der Partikelgröße** in trockenem Zustand wurde mittels Lichtmikroskopie bestimmt. Wo dies aufgrund der Abmessungen nicht möglich war, wurde die Partikelgröße von Frau Monika Riedl mittels Rasterelektronenmikroskopie bestimmt.

Zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius der Partikel wurden zunächst 10 mg/ml Pulver in MilliQ für 30 min im Ultraschallbad suspendiert und dadurch die Partikel

vereinzelt. Mit einer Verdünnung von 1:300 bis 1:30, je nach Partikelgröße, wurden mit dem Zetasizer 3000 HSA über die dynamische Lichtstreuung die Partikelabmessungen in hydratisiertem Zustand vermessen. Hierzu wurden folgende Brechungsindizes verwendet:

Aluminiumhydroxid	1,58
Hydroxylapatit	1,65
Poly(methacrylsäure- <i>co</i> -ethylenglykoldimethacrylat)	1,59
Polystyrolacrylsäurepartikel	1,421
Siliziumdioxid	1,44

Die **Bestimmung der spezifischen Oberfläche** wurde von Herrn Björn Moller mit Hilfe der Gasabsorption nach Brunauer, Emmett und Teller (BET) nach DIN 66131⁹³ durchgeführt.

Zur Ermittlung des **Zeta-Potentials** wurden, analog der Bestimmung des hydrodynamischen Radius, die Partikel in einer Konzentration von 10 mg/ml im Puffer (siehe Tabelle 11) für 30 min im Ultraschallbad suspendiert und vereinzelt. In einer Verdünnung von 1:300 bis 1:30, je nach Partikelgröße, wurden die Zeta-Potentiale im Immobilisierungspuffer nach dem Prinzip der Laser-Doppler-Anemometrie ermittelt. Über die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit von suspendierten Teilchen wird auf das Zeta-Potential geschlossen¹⁶⁸.

Mit Hilfe der **Messung des Kontaktwinkels** wurden Aussagen zur Hydrophilie beziehungsweise der Hydrophobizität des jeweiligen Adsorptionsträgermaterials getroffen. Zunächst wurde aus 150 mg Pulver mit einem Druck von 5 to für 30 Sekunden ein Pressling mit dem Durchmesser von 13 mm hergestellt. Hierauf wurde ein Wassertropfen aufgegeben, Nun wurde der Winkel zwischen Oberfläche und einer am Tropfenrand angelegten Tangente bestimmt. Die Tropfenform des Wassers auf der Oberfläche wurde in drei Kategorien unterteilt:

- Der Tropfen spreitet bei einem Kontaktwinkel von $\Theta = 0^\circ$
- Das Material wird teilweise benetzt bei einem Kontaktwinkel von $\Theta < 90^\circ$
- Das Material wird nur schlecht benetzt bei einem Kontaktwinkel von $\Theta > 90^\circ$

Mit Hilfe der **Infrarotspektroskopie mit abgeschwächter Totalreflexion** (siehe Kapitel 4.2.5) wurden die Adsorptionmatrizen in trockenem und in hydratisiertem Zustand charakterisiert. Die Proben wurden hierzu auf den Diamant-ATR-Kristall angepresst und die wellenlängenabhängige Absorption mit einer Scananzahl von 240 bei einer Auflösung von 4 cm^{-1} im Wellenlängenbereich von $400\text{-}12000 \text{ cm}^{-1}$ mit einem MCT-Detektor gemessen.

Zur **Bestimmung der Freisetzungsrates** von adsorptiv immobilisiertem Enzym wurden unter sterilen Bedingungen je 130 mg Partikel mit adsorbiertem Lysozym oder Subtilisin in 1 ml 10 mmolarem PBS-Puffer pH 7,4 unter Schütteln beziehungsweise mit einer Rotations-

bewegung bei Raumtemperatur inkubiert. Nach definierten Zeitintervallen wurden die Proben für 1-3 min bei 17000 x g abzentrifugiert und die Proteinkonzentration im Überstand mittels Bradford-Protein Assay bestimmt. Der Überstand wurde anschließend verworfen und die Proben mit jeweils 1 ml frischem PBS-Puffer bis zum nächsten Messzeitpunkt inkubiert.

4.2.14 Charakterisierung der chemisorptiven Immobilisierungssysteme

Zur Charakterisierung der Silanschichten und zur Analyse der einzelnen Reaktionsschritte in ihrer Herstellung wurden die Änderung der Schichtdicke mittels Ellipsometrie, der Kontaktwinkel mit der *Sessile Drop* Methode und die Änderungen der Oberflächenfunktionalisierungen mittels FT-IR/ATR-Messung nachverfolgt. Die Bestimmung der Oberflächenbelegung wurde mit spezifischen kolorimetrischen Methoden durchgeführt. Diese Methoden werden nachfolgend kurz vorgestellt.

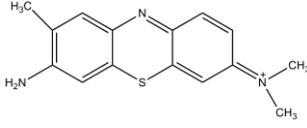
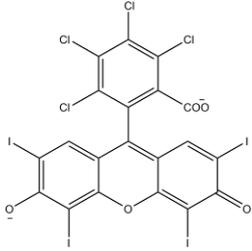
Mittels **Ellipsometrie**, das heißt mittels der Ausnutzung der Polarisationszustandsänderung von Licht bei Reflexion an einer spiegelnden Probe, wurden die Dicken verschiedener Oberflächenschichten auf Silanwafern analysiert. Folgende Brechungsindizes wurden zur Analyse der jeweiligen Silanschichtdicke verwendet¹:

Allyltrimethoxysilan	1,405
Aminopropyltriethoxysilan	1,422
2-(Carboxymethylthio)ethyltrimethylsilan	1,481
Glycidoxypropyltrimethoxysilan	1,429
3-(Trimethoxysilyl)propylmethacrylat	1,431

Mit Hilfe der **Messung des Kontaktwinkels** wurden Aussagen zur Veränderung der Hydrophilie beziehungsweise der Hydrophobizität in Abhängigkeit der jeweiligen Schicht getroffen. Die Durchführung erfolgte analog der Charakterisierung der adsorptiven Immobilisierungssysteme. Es war nicht notwendig einen Pressling herzustellen, stattdessen wurde direkt auf dem silanisierten Material gemessen.

Zur **Bestimmung der Oberflächenbelegung** wurden verschiedene kolorimetrische Verfahren angewandt. Diese basieren auf der kovalenten Bindung eines Farbstoffes an entsprechende Oberflächenfunktionalisierungen bei einem bestimmten pH-Wert. Durch einen pH-Wert-Wechsel vom sauren Bereich in den basischen Bereich beziehungsweise umgekehrt wurde der Farbstoff wieder abgelöst und die gelöste Farbstoffkonzentration photometrisch bestimmt. Die jeweiligen Parameter listet Tabelle 12 auf. Zunächst mussten Epoxydgruppen in Aminogruppen umgewandelt werden. Dies erfolgte nach einem Protokoll von Hartwig¹⁴². Es wurden hierzu die Epoxid-funktionalisierten Proben für 1 h bei 50 °C mit einer 25 %-igen Ammoniaklösung inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit MilliQ-Wasser gewaschen.

Tabelle 12: Parameter der Nachweise von Oberflächenfunktionalisierungen

	Nachweis saurer Oberflächenfunktionalisierungen	Nachweis basischer Oberflächenfunktionalisierungen
Farbstoff	Toluidinblau	Bengalrosa
pH-Wert und Puffer der Bindung	MilliQ pH = 10	0,1 M Natriumhydrogenphosphat pH = 4,7
pH-Wert und Puffer der Ablösung	50 % Essigsäure pH << 10	0,1 M Kaliumcarbonat pH >> 4,7
Wellenlänge der photometrischen Auswertung	633 nm	559 nm
Strukturformel des Farbstoffes		

Zum Nachweis von sauren Oberflächenfunktionalisierungen wurden diese zunächst mit 0,5 mmolarem Toluidinblau in MilliQ-Wasser mit pH 10 bei 30 °C für 5 h inkubiert. Nicht gebundener Farbstoff wurde mit 0,1 molarer Natronlauge entfernt und die Proben wurden getrocknet. Mit 50 % Essigsäure (1 ml pro Probe) wurde der gebundene Farbstoff gelöst und bei einer Wellenlänge von $\lambda = 633$ nm photometrisch vermessen. Die Konzentration wurde anhand einer Toluidin-Standardreihe im Bereich 0 bis 10 $\mu\text{g/ml}$ bestimmt.

Der Nachweis der basischen Oberflächenfunktionalisierung wurde mit Bengalrosa durchgeführt¹⁴². Hierzu wurden die Proben in einer Lösung aus 0,4 mg/ml Bengalrosa in 0,1 molarem Natriumdihydrogenphosphat mit pH 4,7 bei Raumtemperatur unter Schütteln für 10 min inkubiert. Mit MilliQ-Wasser wurde nicht gebundener Farbstoff abgewaschen und die Proben anschließend getrocknet. Mit je 1 ml/Probe 0,1 molarer Kaliumcarbonatlösung wurde innerhalb von 5 min der gebundene Farbstoff abgelöst und bei einer Wellenlänge von $\lambda = 559$ nm photometrisch vermessen. Die Konzentration wurde mit Hilfe des molaren spezifischen Extinktionskoeffizienten von $\varepsilon = 6,5 \times 10^4$ L/(mol*cm) berechnet.

4.2.15 Charakterisierung der Hydrogele

Zur Charakterisierung der Hydrogele wurden die Ausbeute Y , das Quell- und Schrumpfverhalten, das Molekulargewicht zwischen Quervernetzung M_c , die Maschenweite ζ , und die rheologischen Eigenschaften analysiert. Weiter wurde die Immobilisierungsmethode auf ihre proteinschonenden Eigenschaften und auf ihr Freisetzungverhalten hin untersucht.

Durch die **Ausbeute Y** wird die Vollständigkeit der Polymerisation des Hydrogels bestimmt (Formel 5). Hierzu wurde das Gewicht des frisch gequollenen Hydrogels ausgewogen.

Formel 5: Ausbeute Y der Hydrogelsynthese

$$Y = \frac{W_s}{W_{\text{Polymer}}} * 100 = \frac{W_s}{V_{\text{Polymer}} * \rho_{\text{Polymer}}}$$

W_{Polymer}	Gewicht des Polymeranteils in der Polymerisationslösung (g)
W_s	Gewicht des gequollenen Hydrogels (g)
Y	Ausbeute (%)
V_{Polymer}	Volumen des eingesetzten Polymers (cm ³)
ρ_{Polymer}	Dichte des Polymers, für PEG-DA $\rho = 1,12 \text{ g/cm}^3$

Wird ein getrocknetes Hydrogel mit einer wässrigen Lösung in Kontakt gebracht, dringt Wasser aufgrund der hohen Affinität der PEG-Gruppen zu Wasser in das Polymernetzwerk ein. Dabei dehnt sich das Hydrogel gleichmäßig in alle Raumrichtungen aus, es quillt isotrop. Im Quellungsgleichgewicht befindet sich der osmotische Druck, hervorgerufen durch das einquellende Wasser, und die Kontraktion des Hydrogels, die entgegengesetzte elastische Rückstellkraft der gestreckten Polymerketten, im Gleichgewicht. Die Quellung eines Polymernetzwerkes in wässriger Umgebung aus thermodynamischer Sicht wird durch die Flory-Rehner-Theorie¹¹⁶ beschrieben. Dieses basiert auf der Flory-Huggins-Theorie^{114, 161}, welche das thermodynamische Verhalten von Polymerlösungen beschreibt.

Der Gleichgewichtszustand des gequollenen Hydrogels wird durch den **Quellgrad S** und den **Gleichgewichtswasseranteil EWC** beschrieben. Diese werden aus experimentellen Daten, das heißt aus dem Gewicht direkt nach der Polymerisation, dem Gewicht nach Trocknung (24 h bei 70 °C im Vakuumtrockenschrank) und nach anschließendem Quellen in MilliQ (24 h bei Raumtemperatur), nach folgenden Formeln berechnet oder abgeschätzt.

Formel 6: Massenbezogener Quellgrad S_m ^{30, 129, 206}

$$S_m = \frac{W_s}{W_d} * 100$$

S_m	Massenbezogener Quellgrad (%)
W_s	Gewicht des gequollenen Hydrogels (g)
W_d	Gewicht des getrockneten Hydrogels (g)

Der Quellgrad ist ein Maß für die von einem Hydrogel aufgenommene Wassermenge. Man unterscheidet generell zwischen dem massenbezogenen Quellgrad S_m (Formel 6) und dem volumenbezogenen Quellgrad S_v . Mit der Dichte des Polymers wurde der massenbezogene Quellgrad S_m in den volumenbezogenen Quellgrad S_v (Formel7) umgerechnet.

Formel 7: Volumenbezogener Quellgrad Q

$$S_v = \frac{\frac{W_l}{\rho_l} + \frac{W_{Polymer}}{\rho_{Polymer}}}{\frac{W_{Polymer}}{\rho_{Polymer}}} = \frac{\frac{W_s - W_d}{\rho_l} + \frac{W_{Polymer}}{\rho_{Polymer}}}{\frac{W_{Polymer}}{\rho_{Polymer}}}$$

S_v	Volumenbezogener Quellgrad (%)
W_l	Gewicht des Lösungsmittels im Hydrogel
$W_{Polymer}$	Gewicht des eingewogenen Polymers (g)
W_d	Gewicht des getrockneten Hydrogels (g)
W_s	Gewicht des getrockneten Hydrogels (g)
ρ_l	Dichte des Lösungsmittels hier $\rho_{Wasser} = 0,997 \text{ g/cm}^3$
$\rho_{Polymer}$	Dichte des Polymers hier $\rho_{Polymer} = 1,120 \text{ g/cm}^3$

Da zwischen Polymer und Wasser nur ein geringer Dichteunterschied existiert und Hydrogele generell einen hohen Wassergehalt aufweisen, darf die Dichte des trockenen Polymers nach Abe⁴ mit der Dichte des Hydrogels näherungsweise gleichgesetzt werden. Der volumenbezogene Quellgrad wurde daher direkt aus den Massenverhältnissen bestimmt. Im Folgenden wird daher nicht zwischen massen- und volumenbezogener Quellgrad unterschieden (Formel 8). Im Normalfall darf weiterhin der Quellgrad eines gequollenen Hydrogels mit dem reziproken Wert des Volumenanteils des Hydrogels in gequollenen Zustand gleichgesetzt werden, da der Volumenanteil des getrockneten Hydrogels gleich eins zu setzen ist ($\phi_e = 1$)³⁰².

Formel 8: Quellgrad S

$$S = \frac{\phi_0}{\phi_e}$$

S	Quellgrad (%)
ϕ_0	Volumenanteil des Polymers im trockenen Zustand (-)
ϕ_e	Volumenanteil des Polymers im gequollenen Zustand (-)

Die im Quellungsgleichgewicht aufgenommene Wassermenge wird durch den Gleichgewichtswasseranteil beschrieben (Formel 9).

Formel 9: Gleichgewichtswasseranteil EWC^{30, 129, 206}

$$EWC = \frac{W_s - W_d}{W_s} * 100$$

EWC	Gleichgewichtswasseranteil (%)
W_s	Gewicht des gequollenen Hydrogels (g)
W_d	Gewicht des getrockneten Hydrogels (g)

Durch die chemische Verknüpfung besteht das Hydrogel als Polymernetzwerk quasi aus einem Molekül mit einem unendlichen Molekulargewicht. Das **mittlere Molekulargewicht zwischen zwei Knotenpunkten** M_c (Formel 10) und der **Abstand zweier Knotenpunkte im ungequollenen Zustand** \bar{r}_0^{-2} (Formel 11) beschreiben den Aufbau dieses Netzwerkes.

Um das mittlere Molekulargewicht zwischen zwei Knotenpunkten M_C zu berechnen benötigt man einerseits den Flory-Huggins-Parameter χ , die Dichte des Polymers ρ und das molare Volumen des Lösungsmittels V_m als stoffspezifische Parameter und andererseits den Quellgrad aus der experimentellen Bestimmung.

Formel 10: Mittleres Molekulargewicht zwischen zwei Knotenpunkten M_C

$$M_C = \frac{\rho V_m (\phi_e^{1-\frac{2}{d}} - \frac{\phi_e}{2})}{\ln(1 - \phi_e) + \phi_e + \chi \phi_e^2}$$

M_C	Mittleres Molekulargewicht zwischen zwei Knotenpunkten (g/mol)
ρ	Dichte des Polymers (g/cm ³), hier $\rho = 1,120$ g/cm ³
V_m	Molares Volumen des Lösungsmittels, hier für Wasser: $V_m = 18$ cm ³ /g
ϕ_e	Volumenanteil des Polymers im gequollenen Zustand (-)
d	Dimensionen, hier: $d = 3$
χ	Flory-Huggins-Parameter, Wechselwirkungsparameter zwischen Polymer und Lösungsmittel (-), hier für PEG-DA: $\chi = 0,426$ ²¹⁵

Dieser Zusammenhang gilt unter der Annahme, dass der Flory-Huggins-Parameter χ des PEG im Hydrogel mit PEG in Wasser gleichzusetzen ist und der Einfluss der Acrylatgruppen vernachlässigbar ist²¹⁵.

Der Abstand zweier Knotenpunkte im ungequollenen Zustand $\overline{r_0^2}$ wurde mit nachfolgender Formel berechnet.

Formel 11: Abstand zweier Knotenpunkte im ungequollenen Zustand $\overline{r_0^2}$

$$\frac{1}{(\overline{r_0^2})^2} = l * (2 \frac{M_C}{M_r}) * C_n^{\frac{1}{2}}$$

$\overline{r_0^2}$	Abstand zweier Knotenpunkte im ungequollenen Zustand (nm)
l	durchschnittliche Bindungslänge, hier für C-C-Einfachbindung $l = 0,154$ nm ⁷⁵
M_C	Mittleres Molekulargewicht zwischen zwei Knotenpunkten (g/mol)
M_r	Molekulargewicht der Wiederholungseinheit, hier für PEG, $M_r = 44$ g/mol ²¹⁶
C_n	Charakteristisches Verhältnis, Maß für die Ausdehnung der Polymerketten im ungestörten Zustand, hier für PEG $C_n = 4,0$ ²¹⁶

Die Maschenweite des gequollenen Hydrogels ζ (Formel 12) ist auf Seite des Hydrogels das ausschlaggebende Kriterium für die Diffusion eines Proteins aus dem Depotsystem. So muss die Maschenweite mindestens die Größe des Proteins haben, um eine ungehinderte Diffusion zu gewährleisten, darf jedoch im Verhältnis des Proteins nicht zu groß sein, um ein zu rasches Ausbluten des Systems zu verhindern. Die Maschenweite ist nur als stochastischer Mittelwert anzusehen, da sowohl größere als auch kleinere Maschen im Netzwerk auftreten.

Formel 12: Maschenweite ξ

$$\xi = (r_0^2)^{\frac{1}{2}} * \left(\frac{1}{S}\right)^{\frac{1}{3}}$$

ξ	Maschenweite des gequollenen Hydrogels (nm)
r_0^2	Abstand zweier Knotenpunkte im ungequollenen Zustand (nm)
S	Quellgrad (%)

Zur **Untersuchung des Polymerisationsgrades des Hydrogels** in Abhängigkeit des Polymergehaltes der Ausgangslösung wurden frisch polymerisierte Hydrogele mittels FT-IR vermessen (siehe Kapitel 4.2.5). Die ausgeprägten Wasserbanden des im Hydrogel enthaltenen wässrigen Lösungsmittels überlagern alle weiteren Banden des Polymers. Daher wurde das Differenzspektrum des Hydrogelspektrums und des Lösungsmittelspektrums gebildet, um von Wasserbanden überlagerte Banden zu betrachten. Der Grad der Polymerisation wurde anhand der Banden bei 1635 cm^{-1} der terminalen C=C-Bindung des PEG-Diacrylats ermittelt.

Zur **Untersuchung der proteinschonenden Eigenschaften** der Immobilisierungsmethode des Hydrogels wurden je 50 μL Proteinproben (50 mg/ml in 10 mM PBS-Puffer) mit einer Leistung von 15 mW/cm^2 UV-bestrahlt. Hierbei variierte die Bestrahlungsdauer von 0-300 s. Die Sekundärstrukturen und deren Veränderungen wurden mit FT-IR, wie in Kapitel 4.2.5 beschrieben, untersucht.

Die **rheologischen Eigenschaften** von Hydrogelen werden im Wesentlichen durch die Parameter Polymergehalt und die Temperatur sowie Art, Stärke und Dauer der Belastung bestimmt. Das viskoelastische Deformationsverhalten von Hydrogelen während der Scherungsbeanspruchung wurde mittels zweier rheologische Größen charakterisiert:

- Der Speichermodul G' , als Maß für die gespeicherte Deformationsenergie, beschreibt das reversible oder elastische Verhalten und
- der Verlustmodul G'' , als Maß für die dissipierte Deformationsenergie, beschreibt das irreversible und viskose Verhalten.

Da beide Module sich in Abhängigkeit der Amplitude und Frequenz der Deformationsfunktion ändern, werden bei Oszillationsmessungen sowohl Amplituden- als auch Frequenzdurchläufe zur Bestimmung dieser Module durchgeführt. Im Amplitudendurchlauf mit variabler Amplitude bei konstanter Frequenz wird der linear-viskoelastische Bereich des Hydrogels (LVEB) bestimmt. Dieser ist durch konstante Werte der Funktionen der beiden Module in Abhängigkeit der Scherrate definiert. Im Frequenzdurchlauf mit konstanter Amplitude und variabler Frequenz wird das zeitabhängige Scherverhalten untersucht.

Für rheologische Analysen wurden Hydrogele mit einem Durchmesser von 20 mm und einer Dicke von 0,2 mm hergestellt und vollständig gequollen. Diese wurden mit Platte-Platte-Oszillationsmessungen bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ an einem Anton Paar-Rheometer untersucht. Im Ampli-

tudendurchlauf wurden Speicher- und Verlustmodul in Abhängigkeit der Deformation von 0,01 bis 100 % und einer Frequenz von 1,5 Hz und einer aufgetragenen Normalkraft von 50 N gemessen. Die einzelnen Messpunkte wurden in logarithmischen Abständen im Bereich von 0,5 bis 50 s aufgenommen, damit sich bei den jeweiligen Scherraten ein Gleichgewicht einstellen konnte. Aus diesen Messungen wurden die Fließgrenze (Schnittpunkt der Speicher- und Verlustmodulkurven), der Verlustfaktor $\tan \delta$ (Quotient aus Verlust- und Speichermodul) und der LVEB ermittelt. Im Frequenzdurchlauf wurden Speicher- und Verlustmodul in Abhängigkeit der Kreisfrequenz von 0,1 bis 1000 s^{-1} bei konstanter Amplitude mit einer Deformation im LVEB gemessen.

Zur **Bestimmung des Freisetungsverhaltens** wurden unter sterilen Bedingungen zu je 500 μ L Hydrogele mit einer Beladung von 10 mg Protein im gequollenen Zustand je 1 ml 10 millimolarer PBS-Puffer pH 7,4 zugegeben. Nach definierten Zeitintervallen wurde die Proteinkonzentration im Überstand mittel Bradford-Protein Assay bestimmt. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und durch 1 ml frischen Puffer ersetzt.

Nach dem Power Law¹⁸⁰ wurde in logarithmierter Form das freigesetzte Protein gegen die Zeit dargestellt werden (Formel 13):

Formel 13: Beschreibung der Proteinfreisetzung aus Hydrogelen nach dem Power Law

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k * t^n \Leftrightarrow \ln\left(\frac{M_t}{M_\infty}\right) = \ln k + n * \ln t$$

M_t/M_∞	Anteil der freigesetzten Wirkstoffmenge zum Zeitpunkt t (mg)
t	Zeit
k	Geschwindigkeitskonstante
n	Freisetzungsexponent, Power-law-Exponent

Aus der Steigung n der logarithmierten Power Law Gleichung wurde der Freisetzungsmechanismus bestimmt. Man unterscheidet dabei drei Fälle:

- $n = 0,45 - 0,5$ Proteinfreisetzung nach der Fick'schen Diffusion (Case-I-Transport)
- $0,5 < n < 1$ Proteinfreisetzung nach der Fick'schen Diffusion wird durch Quellung und Erosion beeinflusst (Case-II-Transport)
- $n = 1$ Konzentrationsunabhängige Proteinfreisetzung durch Quellung und Erosion des Hydrogels

Abschließend wurde die Möglichkeit **der kovalenten Bindung der PEG-DA-Hydrogele auf Oberflächen** untersucht. Hierzu wurden je 500 μ L einer 35 %-igen Polymerisationslösung von PEG-DA MW575 auf unbeschichtete Glasobjektträger sowie auf Glasobjektträger, welche mittels Silanisierung mit Acrylatfunktionen ausgerüstet wurden (siehe Kapitel

4.2.11), innerhalb von 5 Sekunden polymerisiert. Die Stabilität der kovalenten Bindung wurde in drei Versuchsanordnungen überprüft:

- Unvollständige Trocknung der Hydrogele bei Raumtemperatur innerhalb von 60 Minuten,
- Behandlung für 60 Minuten im Ultraschallbad und
- Quellung in MilliQ innerhalb von 20 h.

4.2.16 Statistische Methoden

Die Experimente wurden im Regelfall mit einer Stichprobenanzahl von $n \geq 3$ durchgeführt und mit Hilfe von Excel wurden die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen berechnet. Mit dem F-Test wurde die statistische Signifikanz des Unterschiedes zweier Varianzen untersucht. Unter zu Hilfenahme des einseitigen Student-Testes wurden die Unterschiede der Mittelwerte mit $p < 0,05$ zur Ermittlung der Signifikanz bestimmt. Die statistische Signifikanz ist in den jeweiligen Abbildungen mit * gekennzeichnet. Alle Graphen und Diagramme wurden mit OriginPro 8 G erstellt.

5 Ergebnisse

5.1 Expression der AHL-lactonasen im Bioreaktor

Die optimierten Fermentationsparameter von Kerger¹⁷⁶ sind erfolgreich auf die Expression von MBP-AiiA, MBP-AiiB beziehungsweise MBP-BlcC (ehemals MBP-AttM) in einem Bioreaktor im ausgewählten Expressionsstamm *E. coli* SoluBL21TM (DE3) übertragbar. Abbildung 27 zeigt den Nachweis des Zielproteins im Fermentationsverlauf, sowohl mittels Coomassie-gefärbter SDS-PAGE als auch im Western Blot und anschließender Immunodetektion mit spezifischem MBP-Antikörper (Western Blot, siehe Kapitel 4.2.3).

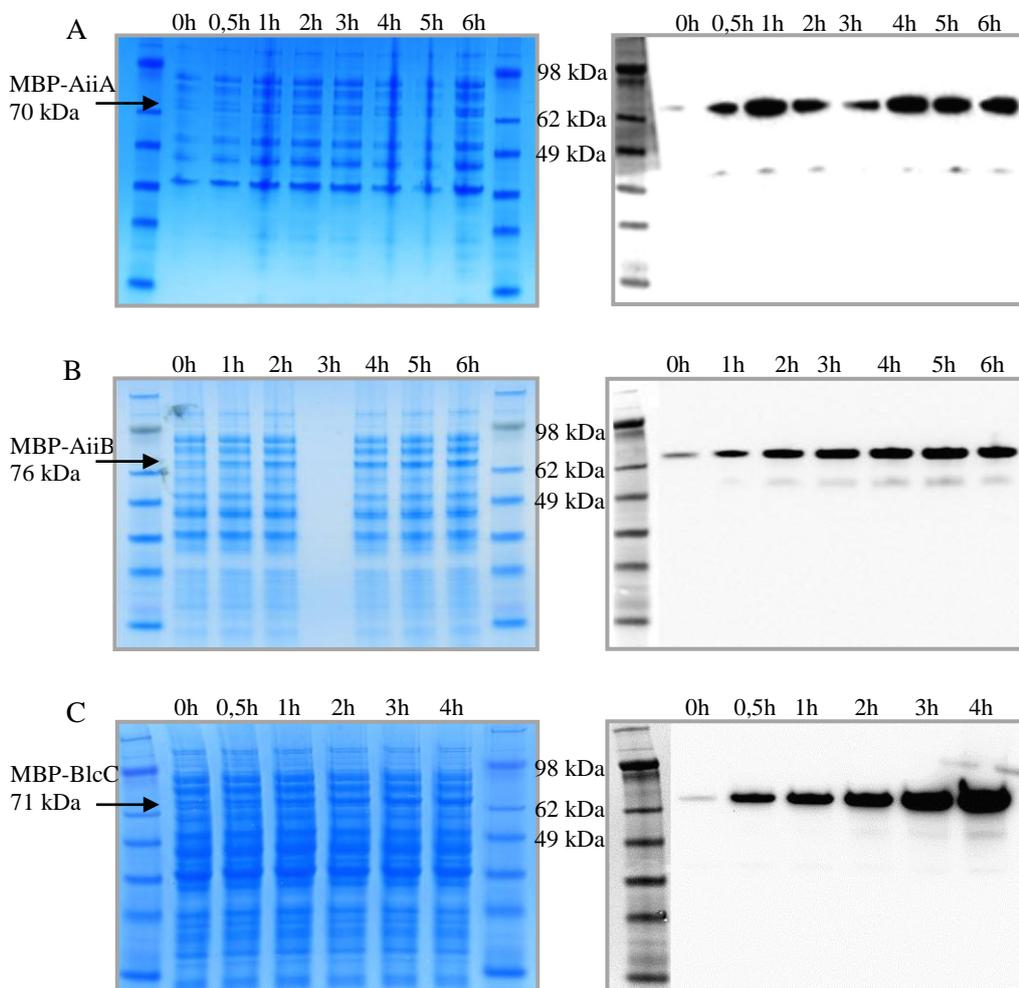


Abbildung 27: Nachweis der Expression der MBP-AHL-Lactonasen im zeitlichen Verlauf

Je 1 μ L Fermentationsbrühe zum Erntezeitpunkt wurde mittels SDS-PAGE mit einem 4 bis 12 %-igen Bis-Tris Gel aufgetrennt:

- A) Expression von MBP-AiiA (72 kDa) über eine Expressionszeit von 6 h;
- B) Expression von MBP-AiiB (70 kDa) über eine Expressionszeit von 6 h;
- C) Expression von MBP-BlcC (71 kDa) über eine Expressionszeit von 4 h

Linke Spalte: Visualisierung durch Coomassiefärbung;

Rechte Spalte: Western Blot mit Immunodetektion mit spezifischem MBP-Antikörper (Western Blot)

Bereits ohne Induktion werden die jeweiligen AHL-lactonasen in sehr geringer Konzentration exprimiert (siehe Abbildung 27 bei $t = 0$ h). Durch die Zugabe von IPTG als Induktor wird eine Überexpression (siehe Abbildung 27: Werte bei $t = 0,5$ h) der AHL-lactonasen erreicht. Die Expression zeigt einen akkumulierten Verlauf über die Expressionsdauer. Zum Zeitpunkt $t = 4$ h zeigt sich eine leichte Abnahme der AHL-Konzentration.

Die Translation der Fusionsproteine startet beim N-terminalen MBP. Bei der Expression von MBP-AiiA und MBP-AiiB tritt teilweise eine unvollständige Translation der Fusionsproteine auf. Im Western Blot der jeweiligen AHL-lactonasen ist bei 50 kDa eine schwache, korrespondierende Bande durch den MBP-Antikörper nachweisbar. Eine Bande der Proteingröße von 40 kDa ist unvollständig synthetisiertem MBP-AiiA-Fusionsprotein zuzuordnen. Diese Synthesebruchstücke sind jedoch im Vergleich zum korrekt synthetisierten Fusionsprotein in einem geringeren Maße vorhanden.

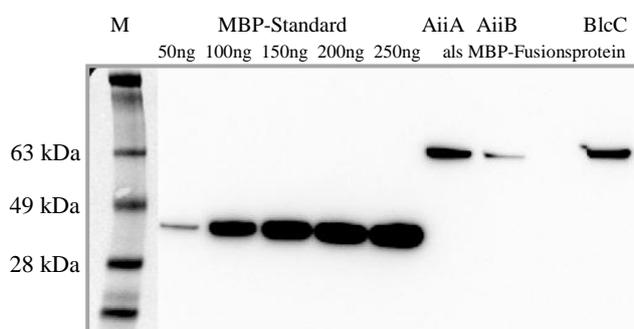


Abbildung 28: Quantitativer Western Blot zur Bestimmung der Expression

Western Blot mit spezifischer MBP-Antikörperfärbung zum Nachweis von in einem 4 bis 12 %igen Bis-Tris-Gel aufgetrennten Proteinen.

Spalte 1 bis 5: Maltosebindendes Protein (42 kDa) als Standard in den Konzentrationen 50/100/150/200/250 ng;
 Spalte 6: MBP-AiiA (70 kDa);
 Spalte 7: MBP-AiiB (76 kDa);
 Spalte 8: MBP-BlcC (71 kDa)

Der Anteil der jeweiligen AHL-lactonase am Gesamtprotein und die Ausbeute ist mit dem Bradford-Protein Assay und einem quantitativen Western Blot mit einem MPB-Standard von 50 ng bis 250 ng MBP bestimmbar (siehe Abbildung 28 und Tabelle 13).

Tabelle 13: Expression entsprechender AHL-lactonasen in einem Bioreaktor

	AiiA	AiiB	BlcC (ex AttM)
Zellzahlkonzentration bei der Induktion, OD_{600nm} (-)	66	56	41
Trockenmasse am Ende der Expression (g/l)	31	30	17
Anteil der AHL-lactonase am Gesamtzellprotein (%)	1,8	1,0	1,4
Ausbeute (mg/l)	1180	660	1000

Bei der Hochzelllichtfermentation werden Zelldichten von bis zu 10^{14} Zellen/l erreicht. Dies entspricht einer Trockenmasse von 30 g/l. Hiermit wird, in Abhängigkeit der Zelldichte, bis zu 1,2 g/l der jeweiligen AHL-lactonase als Fusionsprotein exprimiert. Mit Co^{2+} -Ionen als Cofaktor ist bei MBP-AiiA mit 1,2 g/l und MBP-BlcC mit 1,0 g/l im Vergleich zu MBP-AiiB mit Zn^{2+} -Ionen als Cofaktor mit 0,7 g/l eine 1,5 bis 1,8-fache höhere Ausbeute erreichbar (siehe Tabelle 13). Insgesamt beträgt der Anteil der AHL-lactonasen am Gesamtprotein von *E. coli SoluBL21* (DE) 1,0 bis 1,8 %.

Literaturangaben zu den drei hier verwendeten AHL-lactonasen AiiA, AiiB und BlcC beziehen sich in erster Linie auf AiiA^{57, 95, 98, 176, 203, 222, 239, 241, 244, 298, 309, 321, 350}. AiiA ist also von den drei ausgewählten AHL-lactonasen am umfassendsten erforscht: Daher werden im Folgenden in erster Linie die AHL-lactonasen AiiB und BlcC hinsichtlich ihrer Aufreinigung und ihrer Charakterisierung untersucht.

5.2 Aufreinigung der AHL-lactonasen mittels chromatographischer Methoden

Qualitätskriterien der Aufreinigung der AHL-lactonasen sind zum einen die Proteinausbeute (Quantität) und zum anderen die Reinheit (Qualität). Um diese effektiv zu erreichen, wird eine dreistufige Reinigungsstrategie gewählt:

1. Anionenaustauschchromatographie (AIEX, Mono_Q_HR_5/5-Säule) mit einer vorgeschalteten Entsalzung des Rohzellslysats,
2. Affinitätschromatographie (AC, MBP_Trap_1_ml-Säule) des Fusionsprotein-enthaltenden Eluats der Anionenaustauschchromatographie und anschließendem Abschneiden des MBP-Tags mit einer AcTEV-Protease und
3. Größenausschlusschromatographie (SE; Superdex_75_10/300_GL-Säule) der Eluatfraktion aus der Affinitätschromatographie, welche die AHL-lactonase enthält.

Abschließend erfolgt eine Aufkonzentration des jeweiligen Zielproteins, indem das Probenvolumen in einem Zentrifugenfilterröhrchen eingeengt wird.

Im ersten Schritt, der Anionen-austauschchromatographie, wird die Proteinkonzentration der Probe verringert, um eine Überladung der MBP_Trap_1_ml-Säule zu vermeiden. Hierdurch wird sowohl die unspezifische Bindung von unerwünschten Proteinen an der Säule verringert, als auch der Verlust von nicht gebundener AHL-lactonase reduziert, welche aufgrund von besetzten Bindungsstellen des Säulenmaterials ausgewaschen werden würde.

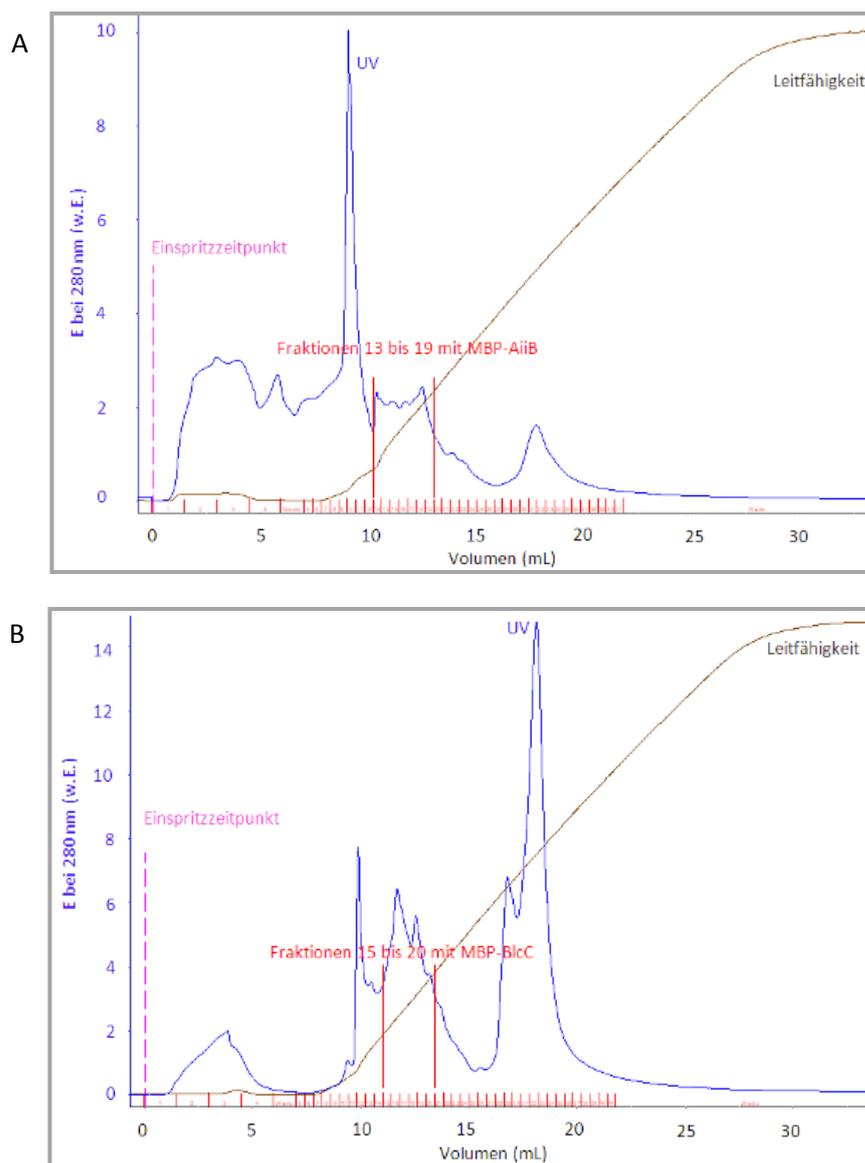


Abbildung 29: Anionenaustauschchromatographie

A) Elution von MBP-AiiA; B) Elution von MBP-BlcC

Abbildung 29 zeigt typische Elutionsprofile der AIEX von MBP-AiiB und MBP-BlcC. Die Fraktionen, welche das jeweilige Zielprotein enthalten, werden mit Western Blot Analyse ermittelt (entsprechende Daten sind hier nicht gezeigt). Dies ist nötig, da die Trennleistung der Säule mit der aufgetragenen Proteinkonzentration variiert³²⁷ und die Fraktionen, welche die Zielproteine enthalten, ebenso variieren. Zur weiteren Aufreinigung werden entsprechende das Zielprotein enthaltende Fraktionen vereinigt.

Im zweiten Schritt, der Affinitätschromatographie, erfolgt die gezielte Abtrennung der Fusionsproteine aus dem Proteingemisch durch die spezifische Bindung des MBP-Tags an die Maltose des Säulenmaterials. Anschließend wird an einer definierten Schnittstelle zwischen MBP-Tag und AHL-lactonase das rekombinante Protein durch Zugabe einer

AcTEV-Protease gezielt geschnitten, so dass im Eluat die AHL-lactonase ohne *Tag* sowie die AcTEV-Protease vorliegen. Abbildung 30 zeigt typische AC-läufe von AiiB und BlcC.

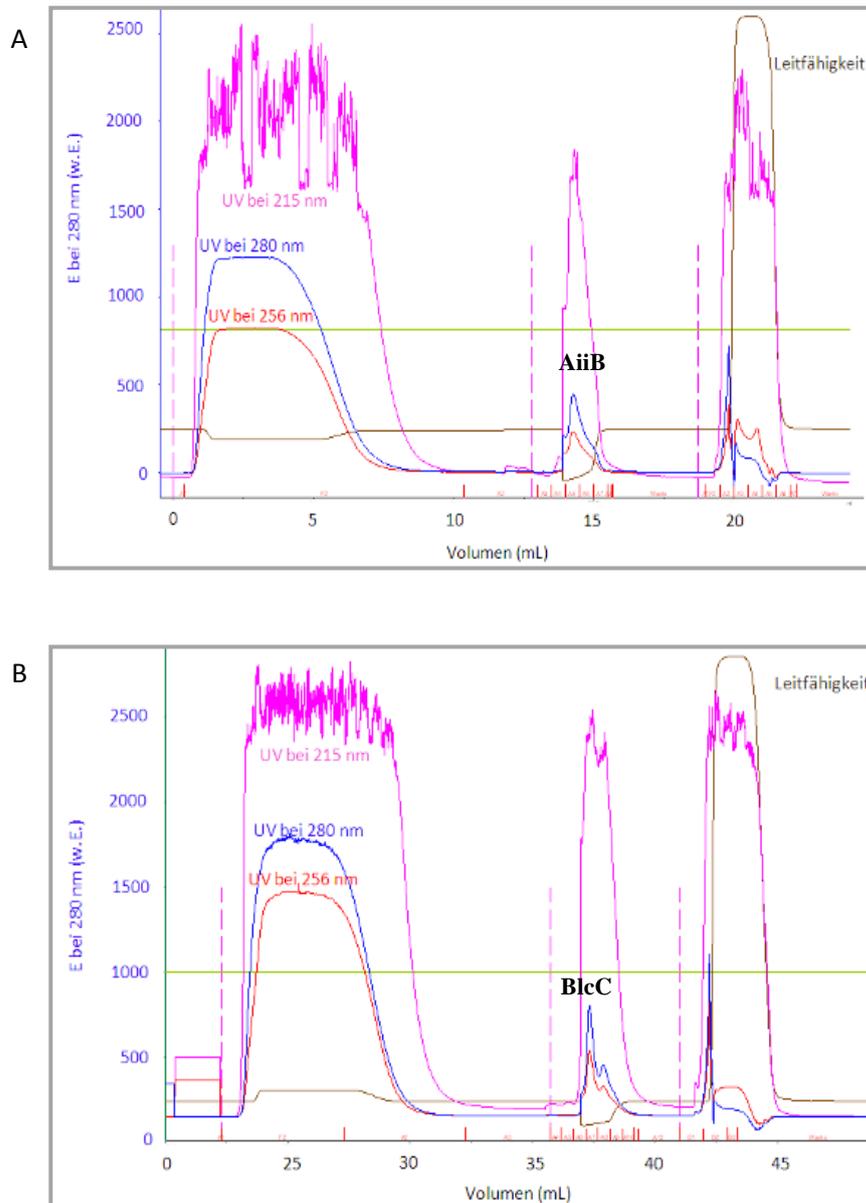


Abbildung 30: Affinitätschromatographie

A: Elution von AiiB; B: Elution von BlcC

Im dritten Trennungsschritt, der Größenausschlusschromatographie, wird anhand der Stokes-Radien der Proteine reine AHL-lactonasen von den restlichen Verunreinigungen abgetrennt. Als Verunreinigungen sind in erster Linie unvollständig synthetisierte AHL-lactonasen als auch AcTEV aus dem vorhergehenden Reinigungsschritt enthalten. Abbildung 31 zeigt typische Elutionsprofile der SE der Eluate aus der AC. Die Eluatfraktionen, welche das Zielprotein enthalten, werden mit Western Blot Analyse (Ergebnisse sind hier nicht gezeigt)

ermittelt. AiiB beziehungsweise BlcC befinden sich stets im ersten Peak, das heißt in den Eluatfraktionen 6 bis 9.

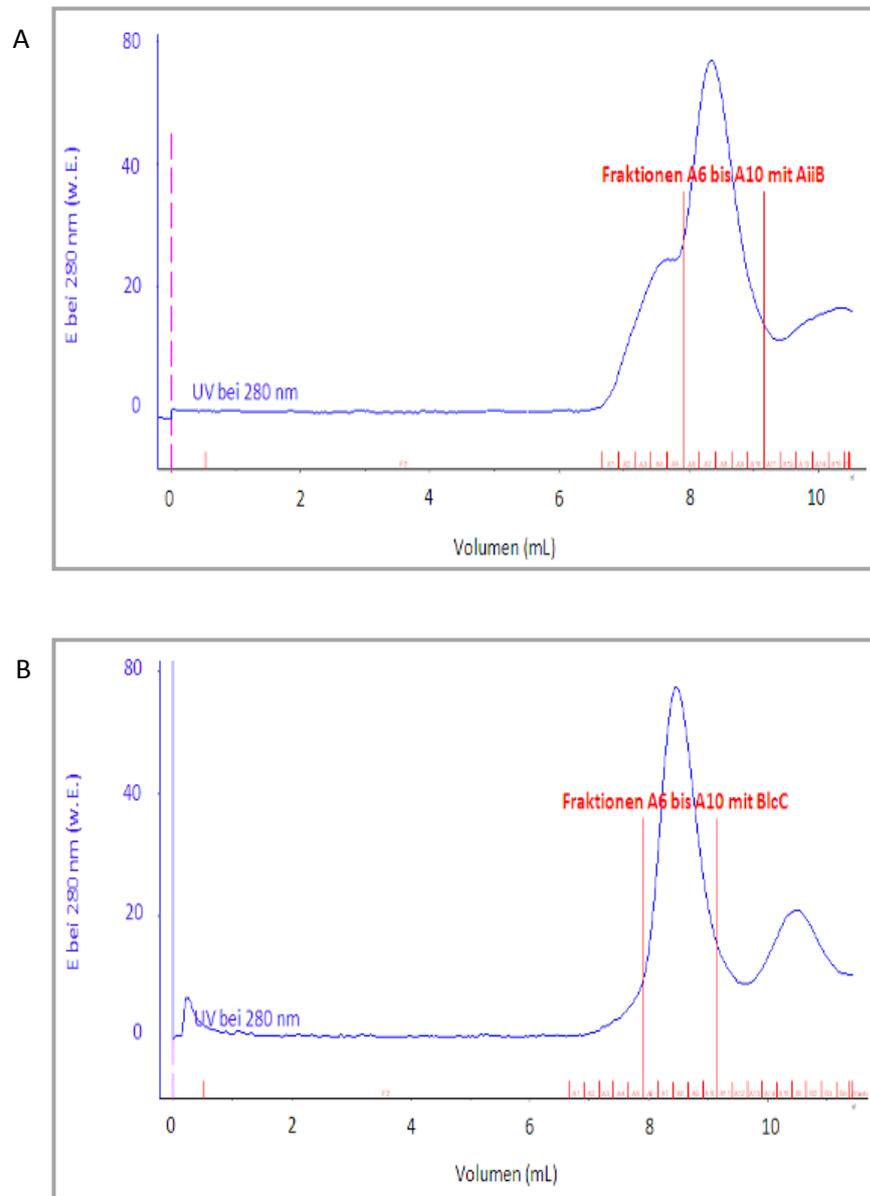


Abbildung 31: Größenausschlusschromatographie

:A Elution von AiiB; B: Elution von BlcC

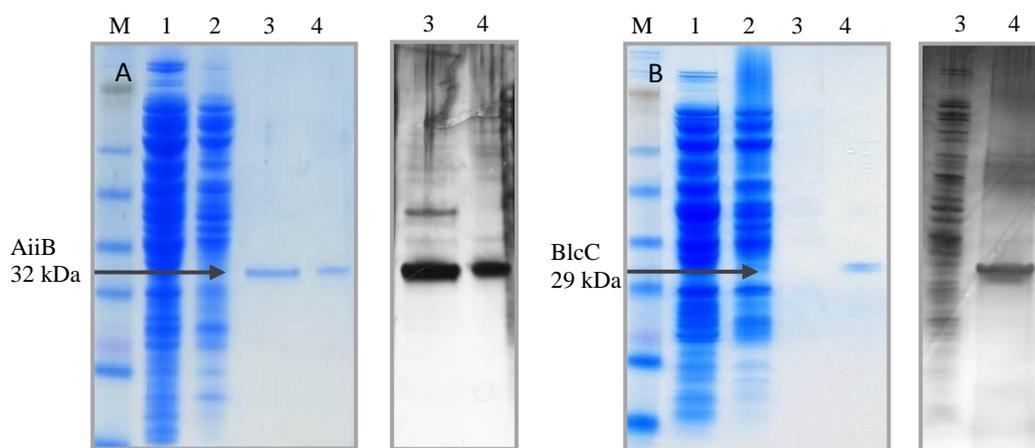


Abbildung 32: Aufreinigung der AHL über die einzelnen Chromatographieschritte

Die Proteine von je 20 μL Probe (1 μL Probe bei 1) wurden in einem 4 bis 12 %-igen Bis-Tris-SDS-PAGE-Gel der Größe nach aufgetrennt:

M) Marker; 1) Rohzellysate; 2) Eluat der Anionenaustauschchromatographie; 3) Eluat der Affinitätschromatographie; 4) Eluat der Größenausschlusschromatographie;

Links: Visualisierung durch Coomassiefärbung; Rechts: Visualisierung durch Silberfärbung A) AiiB, B) BlcC

Abbildung 32 zeigt die Aufreinigung der AHL-lactonasen, beginnend bei dem Rohzellysate über AIEX, AC und SE mit welcher die AHL-lactonasen AiiB und BlcC bis zu einem Reinheitsgrad von 99 % aufreinigbar sind. Dieser Reinheitsgrad wird nach allgemeiner Konvention anhand der Coomassiefärbung der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine bestimmt. In der entsprechenden Silberfärbung sind noch geringe Verunreinigungen zu erkennen. Diese sind aufgrund ihrer niedrigen Konzentration zu vernachlässigen, so dass die aufgereinigten AHL-lactonasen als rein zu betrachten sind.

Tabelle 14: Qualität der aufgereinigten AHL-lactonasen

	AiiA	AiiB	BlcC (ex AttM)
MALDI-TOF Sequenzidentifizierungsanteil (%)	n. d.	75,3	61,7
Reinheitsgrad aus MALDI-TOF (%)	n. d.	> 95	> 95
Reinheitsgrad aus SDS-PAGE mit Silberfärbung (%)	n. d.	99	99

Mittels massenspektrometrischer Untersuchung wird die Sequenz der aufgereinigten Proteinfractionen mit den jeweiligen AHL-lactonase-Sequenzen, welche in der Literatur beschrieben sind, abgeglichen. Die Sequenz von AiiB ist mit einer Identität von 75,3 % und die Sequenz von BlcC mit einer Identität von 61,7 % verifiziert (siehe Tabelle 14).

5.3 Charakterisierung der aufgereinigten AHL-lactonasen

Basierend auf der Aminosäuresequenz der AHL-lactonasen AiiA, AiiB und BlcC werden deren physiko-chemische Eigenschaften betrachtet. Hierzu sind deren Sequenzen (siehe

Abbildung 33) mit dem Programm ProtParam¹²⁸ des ExPASy Proteomics Servers des Swiss Institute of Bioinformatics (SIB; <http://www.expasy.org>) ausgewertet worden. Der hydrodynamische Radius ist basierend auf dem Molekulargewicht nach Wilkins³³⁵ abgeschätzt. Tabelle 15 listet die Ergebnisse dieser Modellierungen und Abschätzungen im Überblick auf.

AiiA					
1	svnstltpgn	llnlpvwcy	leteegpilv	dtgmpeiavn	neglfngtfv egqilpkmt
61	edriitlkr	agyepddlly	iisshlhfdh	aggngafsnt	piiiqraeye aaqyreeylk
121	ecilphllyk	ieegyevvp	gvrlytpgh	spghqslie	teksgpillt idasytkenf
181	edevpfagfd	selalssikr	lkevakekp	iiffghdieq	ekgckafpey i
AiiB					
1	mgnklfvld	geirvdenfi	ianstfvtpq	kptvssrlid	ipvsayliqc tdatvlydtg
61	chpecmgtng	rwpaqsqlna	pyigasecni	perlrlqgl	pddistvvl
121	eyfgksrlia	hedefatavr	yfatgdhssp	yivkdieawl	atprnwdlvgrdererelap
181	gvnlfnftg	hasgmlglav	rlekqpgfll	vsdacytatn	ygpparragv lhdtygdr
241	vshiryaes	rsltvlfghd	reqfasliks	tdgfye	
BlcC					
1	mlqsgtlkck	vhnikmnqgn	gadyeipvpf	flithpaght	vidggnai
61	icdvypvld	kdqgcvdqik	algfdpadvk	yvqshlhld	htgaigrfpn athivqrsey
121	eyaftpdwfa	gggyirkdfd	kpglkwqfln	gaqddydyvy	gdgtlttft pghapghqsf
181	lvrlpnskl	lftidaaytl	dhweekalpg	flastvdtvr	svqklrtyae khdatvvtgh
241	dpdawanfkk	apefya			

Abbildung 33: Aminosäuresequenz von AiiA, AiiB und BlcC

Die Sequenzinformationen stammen aus der allgemein zugänglichen Datenbank NCBI Entrez Protein (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mit folgenden Referenznummern: AiiA ACI96341.1; AiiB A9CKY2 und BlcC AAD43990.

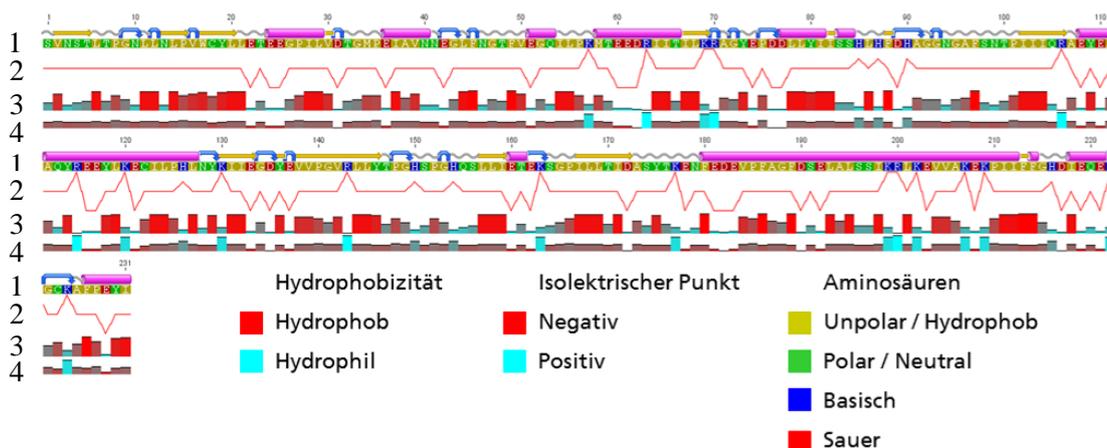
Für eine spätere Immobilisierung, insbesondere für den Einschluss in ein Hydrogel, ist der hydrodynamische Radius als Maß für die Proteingröße von großer Bedeutung. Anhand der Molekulargewichte werden folgende hydrodynamische Radien der AHL-lactonasen abgeschätzt: AiiA (MW = 28,09 kDa) $2,30 \pm 0,12$ nm, AiiB (MW = 30,56 kDa) $2,42 \pm 0,12$ nm und BlcC (MW = 28,46 kDa) $2,37 \pm 12$ nm.

Bei der adsorptiven Immobilisierung mittels ionischer Wechselwirkungen ist der isoelektrische Punkt der jeweiligen AHL-lactonasen zur Auswahl eines geeigneten Puffers wichtig, da Material und AHL-lactonase idealerweise eine gegenpolige Ladung tragen sollten. Die unterschiedlichen Anteile der positiv und negativ geladenen Aminosäuren führen zu folgenden isoelektrischen Punkten: AiiA mit 4,77; AiiB mit 5,45 und BlcC mit 5,75.

Tabelle 15: Physikochemische Eigenschaften von AiiA, AiiB und BlcC

	AiiA	AiiB	BlcC (ehemals AttM)
Herkunft	<i>B. thuringiensis</i>	<i>A. tumefaciens</i> C58	<i>A. tumefaciens</i> C58
Anzahl der Aminosäuren	250	276	256
Molekulargewicht (kDa)	28,09	30,56	28,46
Theor. isoelektrischer Punkt	4,77	5,45	5,75
Anteil negativ geladener Aminosäuren (%)	20,4	19,2	14,8
Anteil positiv geladener Aminosäuren (%)	15,2	12,3	12,1
Anteil unpolare Aminosäuren (%)	50,4	48,9	51,5
Hydrodynamischer Radius (nm) nach Wilkins ³³⁵	2,30 ± 0,12	2,42 ± 0,12	2,37 ± 0,12

Neben der adsorptiven Immobilisierung mittels ionischer Wechselwirkungen können Proteine über hydrophile/hydrophobe Wechselwirkungen auf Adsorptionsmaterialien physisorbiert werden. Der Anteil der unpolaren Aminosäuren beträgt bei AiiA 50,4 %, bei AiiB 48,9 % und BlcC 51,5 %. Bei einer Immobilisierung über diese verhältnismäßig großen unpolaren Bereiche der AHL-lactonasen besteht die Gefahr einer Konformationsänderung der AHL-lactonasen, da diese Bereiche sich in wässriger Umgebung überwiegend im Inneren von AiiA befinden (Ergebnisse hier nicht gezeigt). Dies führt wiederum zu einem Verlust der spezifischen Aktivität. Abbildung 34 zeigt am Beispiel AiiA, dargestellt mit der Geneious Free Software¹⁰², die Verteilung von unpolaren/hydrophoben, polaren/neutralen sowie basischen und sauren Aminosäuren entlang der Peptidsequenz und den daraus resultierenden Verteilungen der isoelektrischen Punkte und der Hydrophobizität.

**Abbildung 34: Physiko-chemische Eigenschaften der Primärstruktur von AiiA**

Dargestellt mit der Geneious Free Software¹⁰². 1 Aminosäuresequenz und Sekundärstruktur der AHL-lactonase, 2 Aminosäureladung, hierbei entspricht die mittlere Basislinie einer neutralen Ladung, 3 Hydrophobizität, 4 isoelektrischer Punkt

Mit dem Programm Swiss-PdbViewer (aka DeepView; <http://www.expasy.org/spdbv>)¹³⁶ werden zugängliche Aminosäuren visualisiert. Abbildung 35 zeigt dies beispielhaft an AiiA. Hier sind Arg2, Gly1 und Glu139 frei zugänglich. Diese Aminosäuren könnten beispielsweise zur Immobilisierung über ionische Wechselwirkungen genutzt werden. Arginin (pKa 12,5) trägt bei einem pH-Wert bis 13,0 eine positive Ladung, wohingegen Glutaminsäure (pKa 4,3) bis pH-Wert 4,0 eine negative Summenladung besitzt. Weitere zugängliche Aminosäuren sind: Ile23, His137, Glu215, Lys232 und Lys245. Hier könnten beispielsweise die Carboxyfunktion von Glu215 oder die Aminofunktionen von Lys232 und Lys245 zu einer kovalenten Verknüpfung genutzt werden.

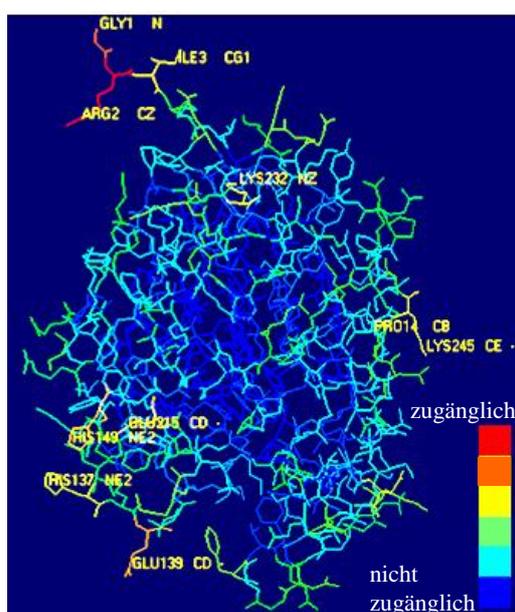


Abbildung 35: Tertiärstruktur von AiiA

Darstellung der Zugänglichkeit der Aminosäuren in der Tertiärstruktur mit dem Swiss-PdbViewer (aka DeepView; <http://www.expasy.org/spdbv>)¹³⁶.

Zur weiteren Strukturanalyse der Sekundärstruktur von AiiB und BlcC werden diese mittels FT-IR/ATR untersucht. Abbildung 36 zeigt die jeweiligen FT-IR/ATR-Spektren und die zweite Ableitung der ausgewählten Spektren von AiiB und BlcC im Bereich 1750 cm^{-1} bis 1200 cm^{-1} , welcher der sensitive Bereich der Amid-I- und Amid-II-Banden ist.

Tabelle 16: FT-IR/ATR-Bandenzuordnung für AiiB und BlcC

	AiiB	BlcC
Amid I	1641 cm^{-1}	$1654/1635\text{ cm}^{-1}$
Amid II	$1554/1541\text{ cm}^{-1}$	1542 cm^{-1}
$\text{NH}_3^+/\text{CH}_2$	1475 cm^{-1}	1522 cm^{-1}
Amid III	1399 cm^{-1}	$1367/1353\text{ cm}^{-1}$

Mit der OPUS-Software wird für AiiB ein α -Helix-Anteil von $11,4 \pm 2,2$ % (Amid-I-Bande bei 1641 cm^{-1}) und einen β -Faltblatt-Anteil von $36,2 \pm 2,9$ % vorhergesagt. Für BlcC wird ein α -Helix-Anteil von $4,4 \pm 4,2$ % (Amid-I-Bande bei $1654/1635 \text{ cm}^{-1}$) und ein β -Faltblatt-Anteil von $32,4 \pm 0,7$ % bestimmt. Der Vorhersagefehler für den α -Helix-Anteil beträgt $5,5$ % und für den β -Faltblatt-Anteil $4,5$ %. Des Weiteren wird für BlcC bei $1420/1406 \text{ cm}^{-1}$ eine ausgeprägte Bande ermittelt, welche den sauren Seitenketten zuzuordnen ist. Tabelle 16 listet die Bandenzuordnungen der Spektren beziehungsweise der zweiten Ableitung dieser von AiiB und BlcC auf.

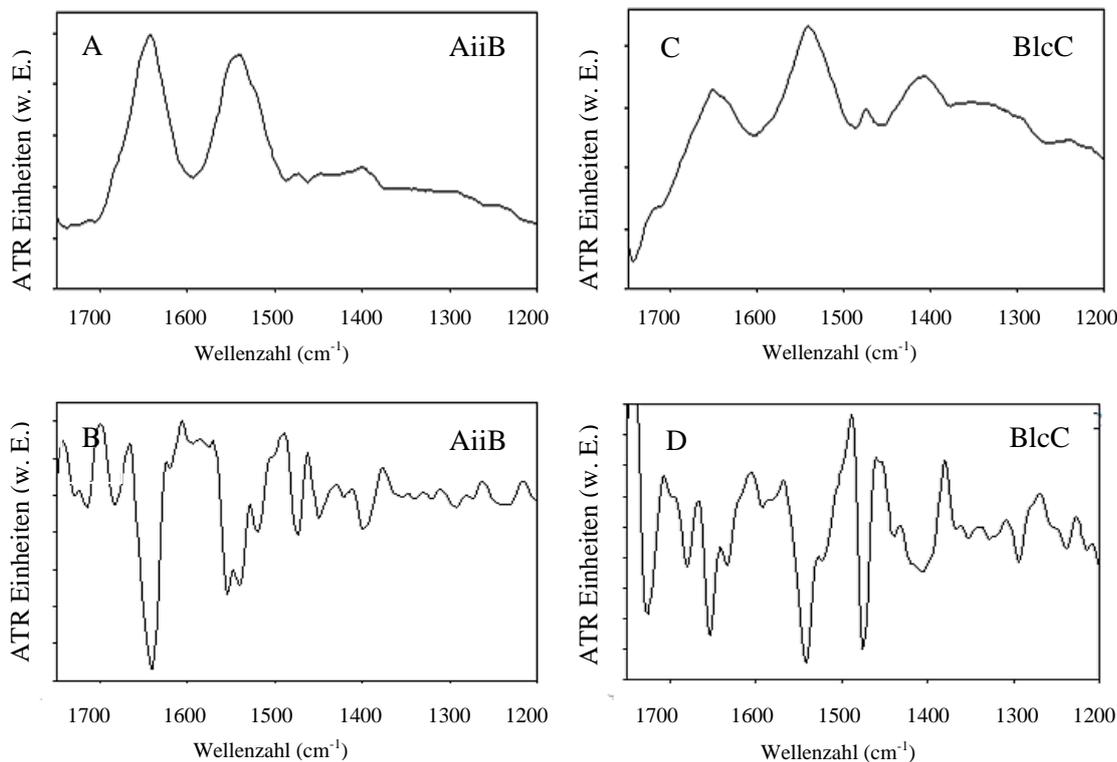


Abbildung 36: FT-IR/ATR-Spektren von AiiB und BlcC

FT-IR/ATR-Spektren von AiiB und BlcC im Bereich 1750 cm^{-1} bis 1200 cm^{-1} sowie deren zweite Ableitungen. A) FT-IR/ATR-Spektrum von AiiB mit der Amid-I-Bande bei 1641 cm^{-1} und der Amid-II-Bande bei $1554-1541 \text{ cm}^{-1}$. B) Zweite Ableitung des FT-IR/ATR-Spektrums von AiiB; C) FT-IR/ATR-Spektrum von BlcC mit der Amid-I-Bande bei $1654/1635 \text{ cm}^{-1}$ und der Amid-II-Bande bei 1542 cm^{-1} ; D) Zweite Ableitung des FT-IR/ATR-Spektrums von BlcC.

Im folgenden Abschnitt werden die spezifischen Aktivitäten der AHL-lactonasen AiiB und BlcC hinsichtlich der drei Substrate *N*-Hexanoyl-DL-homoserinlacton (C6-HSL), *N*-Dodecanoyl-DL-Homoserinlacton (C12-HSL) und *N*-(3-Oxododecanoyl)-l-homoserinlacton (3-oxo-HSL) näher betrachtet. Zum einen wird mit dem Pyraninassay die Substratspezifität von C6-HSL, C12-HSL und 3-oxo-HSL rein chemisch betrachtet, zum anderen wird diese

Substratspezifität der AHL-lactonasen mit Hilfe des Reporterstammes *A. tumefaciens* NTL4(pCF218)(pCF372) im ONPG- und X-Gal-Assay auf ihre QQ-Wirkung getestet.

Abbildung 37 zeigt den Umsatz des jeweiligen Substrates C6-HSL, C12-HSL und 3-oxo-HSL durch je 0,75 ng/ml eingesetzter AHL-lactonase AiiB oder BlcC. Der Umsatz der Substrate zu ihrer jeweiligen korrespondierenden Säure (siehe Abbildung 37) wird anhand einer pH-Wert-Änderung in einer Inkubationszeit von 60 min verfolgt. Diese Änderung wird mit dem pH-Wert-abhängigen Fluoreszenzfarbstoff Pyranin quantifiziert. AiiB setzt sowohl C6-HSL ($0,072 \pm 0,002$ pH-Einheiten) als auch 3-oxo-HSL ($0,066 \pm 0,003$ pH-Einheiten) in gleichem Maße um, wohingegen AiiB gegenüber C12-HSL einen erhöhten Umsatz von $0,105 \pm 0,032$ pH-Einheiten zeigt. BlcC setzt bevorzugt 3-oxo-HSL ($0,399 \pm 0,003$ pH-Einheiten) und C6-HSL ($0,273 \pm 0,035$ pH-Einheiten) um, wohingegen es C12-HSL nur in geringem Maße umsetzt ($0,104 \pm 0,040$ pH-Einheiten).

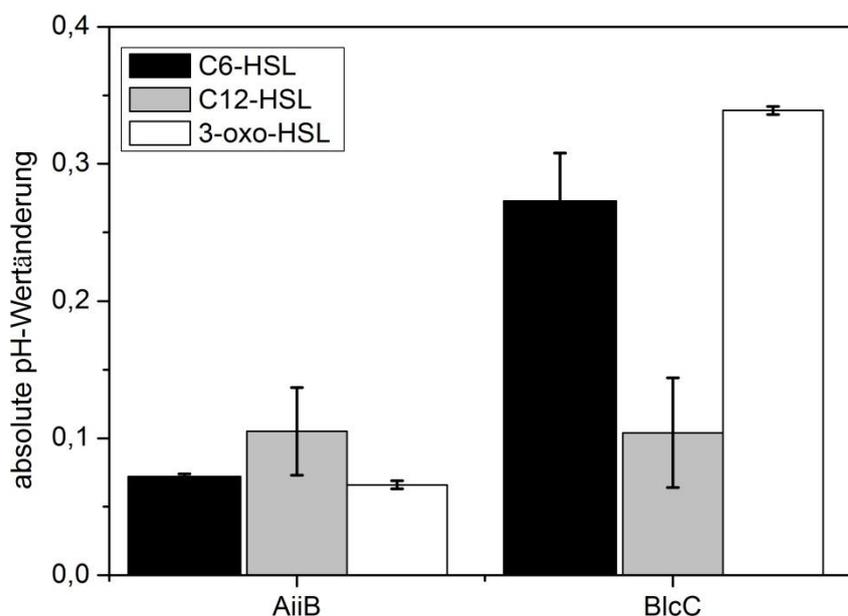


Abbildung 37: Pyraninassay mit unterschiedlichen Substraten

Der Umsatz unterschiedlicher Substrate (C6-HSL, C12-HSL und 3-oxo-HSL) durch je 0,75 ng AiiB oder BlcC wurde mittels der pH-Wert-Änderung mit dem pH-Wert-Indikator Pyranin innerhalb von 60 min verfolgt.

Der ONPG- und der X-Gal-Assay haben gemeinsam, dass der Umsatz des Substrates durch die AHL-lactonasen mit dem Reporterstamm *A. tumefaciens* NTL4(pCF218)(pCF372) getestet wird. Dieser Stamm ist nicht in der Lage, das AHL-Signalmolekül zu produzieren, wohl aber dieses zu detektieren. Durch eine *traI-lacZ* Promotorfusion wird bei Aktivierung der *traI* Gene β -Galactosidase gebildet. Im X-Gal Assay mit C6-HSL als Substrat für die AHL-lactonase wurde 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) zu 5-Bromo-4-chloro-3-Hydroxyindol, welches weiter zu dem blauen Farbstoff 5,5'-Dibromo-

4,4'-dichloro-indigo oxidiert. Im ONPG-Assay mit 3-oxo-HSL als Substrat für die AHL-lactonase wird 2-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG) zu dem gelben Farbstoff *o*-Nitrophenol umgesetzt.

Im ONPG-Assay ist für AiiB ein Umsatz von 3-oxo-HSL von $7,8 \pm 0,7$ nM nachweisbar, für BlcC beträgt dieser Substratumsatz $9,4 \pm 0,2$ nM. Im X-Gal-Assay ist eine direkte absolute Quantifizierung nicht möglich, da zwischen dem Umsatz von X-Gal und der eingesetzten C6-HSL-Konzentration kein direkter linearer Zusammenhang besteht. Die spezifische Aktivität von AiiB kann mit $76,9 \pm 4,9$ % und BlcC mit $81,4 \pm 6,1$ % im Vergleich zur eingesetzten AHL-Konzentration von $10 \mu\text{M}$ lediglich als relativer Wert angegeben werden.

5.4 Proteinschonende Immobilisierungsmethoden

Ob eine Methode zur Immobilisierung von Enzymen geeignet ist, wird von den Strukturveränderungen des Enzyms und den damit einhergehenden Veränderungen der katalytischen Aktivität durch die Immobilisierung bestimmt. Hierbei sind die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Trägermaterialien und die gewählten Reaktionsbedingungen der Immobilisierung ausschlaggebend (siehe Kapitel 3.2). Für die adsorptive und die chemisorptive Immobilisierung sowie für den Einschluss eines Proteins in eine polymere Matrix werden diese, zum Teil anhand von Lysozym, Subtilisin und DNase als Modellenzyme, betrachtet. Zur Immobilisierung der AHL-lactonasen AiiA, AiiB und BlcC werden die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Trägermaterialien sowie die Reaktionsbedingungen optimiert.

5.4.1 Adsorptive Immobilisierung

Sechs unterschiedliche partikuläre Trägermaterialien werden auf Ihre Eignung zur adsorptiven Immobilisierung geprüft:

- Aluminiumhydroxid (Martinal ON 320; $\text{Al}(\text{OH})_3$),
- Calciumhydrogenphosphat (Hydroxylapatit, $\text{Ca}_5[\text{OH}(\text{PO}_4)_3]$),
- Kalksodagläskügelchen (KSG),
- Poly-(Methacrylsäure-*co*-Ethylenglykoldimethacrylat (pMA-EGDMA),
- Polystyrol-Acrylsäure (PS-AA) und
- Siliziumdioxid (Aerosil 200; SiO_2).

Bei diesen Materialien handelt es sich überwiegend um kommerzielle Materialien, deren Bezugsquellen in Tabelle 45 aufgeführt sind.

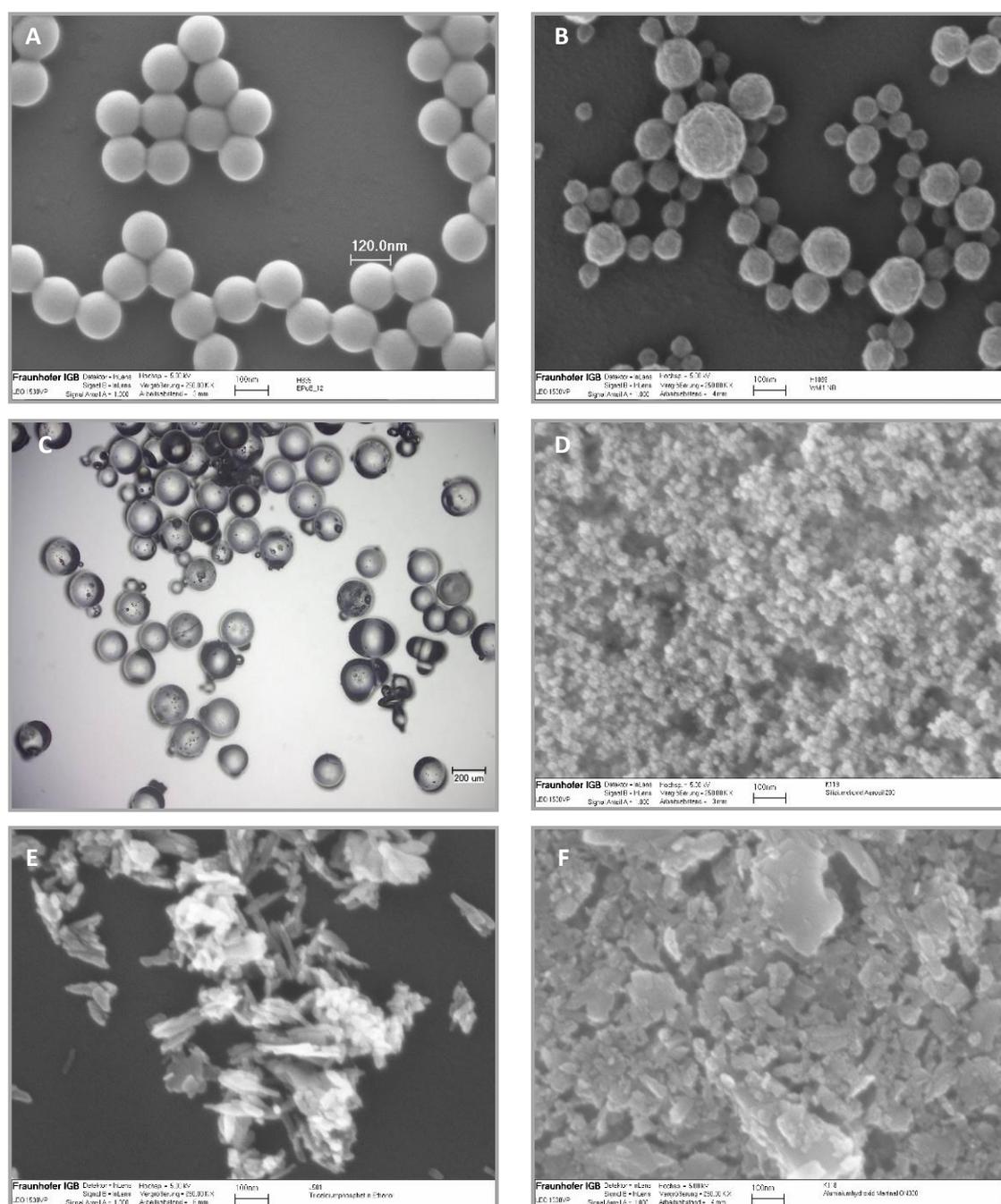


Abbildung 38: Elektronen-/lichtmikroskopische Aufnahmen der Adsorptionssubstrate

A) Polystyrol-Acrylsäure; B) Poly-(Methacrylsäure-co-Ethylenglykoldimethacrylat; C) Kalksodagläskügelchen; D) Siliziumdioxid; E) Calciumhydrogenphosphat; F) Aluminiumhydroxid

Zunächst werden die physikalischen Eigenschaften der Adsorptionsmaterialien betrachtet. Hierzu zählen die Größe ihrer spezifischen Oberfläche und der mittlere Durchmesser eventuell vorhandener Poren, die Partikelabmessungen in trockenem Zustand, welche anhand von mikroskopischen Aufnahmen (siehe Abbildung 38) ermittelt werden, und die Partikelabmessungen in wässriger Umgebung (hydrodynamischer Radius), welche mit der dynamischen Lichtstreuung bestimmt werden. Tabelle 17 zeigt diese physikalischen Eigenschaften der Adsorptionssubstrate im Überblick.

Tabelle 17: Physikalische Eigenschaften der Adsorptionsmaterialien

Material	BET-Oberfläche (m ² /g)	Porendurchmesser (nm)	Hydrodynamischer Radius r _h (nm)	Partikelabmessung r (nm)	r _h /r (-)
Siliziumdioxid	188	-	141 ± 61	20	7,0
Poly-(Methacrylsäure-co-Ethylenglykoldimethacrylat)	50	-	214 ± 9	80	2,5
Calciumhydrogenphosphat	32	-	299 ± 141	100 x 30	2,9
Polystyrol-Acrylsäure	21	-	678 ± 120	120	3,8
Aluminiumhydroxid	15	5,3	389 ± 215	80 x 30	4,5
Kalksodagaskügelchen	< 1	-	n. d.	200 000	n. b.

Prinzipiell gilt: Je größer die spezifische Oberfläche ist, desto mehr Protein kann immobilisiert werden. Daher werden bezüglich der BET-Oberfläche Materialien in drei verschiedenen Größenordnungen ausgewählt: Siliziumdioxid mit einer relativ großen Oberfläche von 188 m²/g, Kalksodagaskügelchen mit einer sehr geringen Oberfläche von 0,1 m²/g und vier weitere Materialien mit Oberflächen von 15 bis 50 m²/g.

Zusätzlich ist Al(OH)₃ ein poröses Material, dessen Porendurchmesser bei 5,3 nm liegt. Bei der BET-Oberflächenbestimmung wird die innere Oberfläche dieser Poren berücksichtigt. Mit theoretischen hydrodynamischen Radien von 2,3 bis 2,4 nm sind die AHL-lactonasen in der Lage, in diese Poren einzudringen und die innere Fläche ebenfalls zur Adsorption zu nutzen.

Bei vier der ausgewählten Materialien handelt es sich um runde Partikel (SiO₂, PS-AA, KSG und pMA-EGDMA), Ca₅[OH|(PO₄)₃] weist eine Nadelform auf und Al(OH)₃ ist quaderförmig (siehe Abbildung 38). Mit der Auswahl sind drei verschiedene Größenbereiche abgedeckt: Große Partikel mit 200 µm, sehr kleine Partikel mit 20 nm und Partikel im Größenbereich um die 100 nm.

Zwischen der spezifischen Oberfläche und den Partikelabmessungen besteht ein direkter Zusammenhang. Die SiO₂-Partikel mit den kleinsten Abmessungen (20 nm) besitzen mit 188 m²/g die größte BET-Oberfläche, wohingegen die KSG-Kügelchen mit einem Durchmesser von 200 µm die kleinste BET-Oberfläche (0,1 m²/g) aufweisen.

Der hydrodynamische Radius des Partikels in Lösung entspricht dem 2,5- bis 4,5-fachen der Abmessungen im trockenen Zustand. Dies ist auf die Solvathülle aus Lösungsmittelmolekülen, welche sich um den Partikel anlagerten, zurückzuführen. Lediglich SiO₂ weist mit 7,0 ein höheres r_h/r-Verhältnis auf. Dieses ist, ebenso wie die starke Streuung der hydrodynamischen Radien von Al(OH)₃ und Ca₅[OH|(PO₄)₃], durch die Agglomeration einzelner Partikel zu begründen.

Wichtige Einflussfaktoren einer Enzym-Material-Bindung unter Beibehaltung der Enzymaktivität sind, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, die Chemie des Materials und des Enzyms sowie das Reaktionsmedium. Über die Materialoberflächenchemie und das Reaktionsmedium werden die Art der Wechselwirkungskräfte zwischen Material und Enzym bestimmt. Das Reaktionsmedium bestimmt über den pH-Wert die Struktur des Enzyms und somit dessen aktive Konformation und die Ladungen an der Grenzschicht des Materials (Zeta-Potential).

In Abhängigkeit der isoelektrischen Punkte (pI) der AHL-lactonasen von 4,77 für AiiA, 5,45 für AiiB und 5,75 für BlcC (siehe Tabelle 15) werden Citratpuffer mit pH 4,0 bzw. pH 6,5 als Immobilisationspuffer angewendet. Bei einem pH-Wert von 4,0 trägt das Enzym aufgrund der abnehmenden Dissoziation der Säuregruppe eine positive Summenladung, wohingegen bei einem pH-Wert von 6,4 das Enzym aufgrund der zunehmenden Dissoziation der Säure negativ geladen ist.

Tabelle 18: Zeta-Potential der Adsorptionsmaterialien in Citratpuffer mit pH 4,0/pH 6,5

Material	ζ -Potential pH 4,0 (mV)	ζ -Potential pH 6,5 (mV)
Siliziumdioxid	$0,6 \pm 0,2$	$-24,8 \pm 2,8$
Calciumhydrogenphosphat	$-14,0 \pm 1,5$	$-45,5 \pm 1,3$
Poly-(Methacrylsäure-co-Ethylenglykoldimethacrylat)	$-25,2 \pm 0,9$	$-76,2 \pm 1,9$
Polystyrol-Acrylsäure	$-42,0 \pm 0,9$	$-63,3 \pm 0,7$
Aluminiumhydroxid	$-37,0 \pm 1,7$	$-65,0 \pm 1,6$
Kalksodagläskügelchen	n. b.	n. b.

Die Immobilisierung über ionische Wechselwirkungen besitzt mit 100-350 kJ/mol die größte Bindungsstärke und tritt daher bevorzugt auf. Voraussetzung für diese Art der Immobilisierung ist, dass das Material gegenüber dem Enzym eine entgegengesetzte Ladung trägt. Bei einem pH-Wert von 6,5 besitzen die AHL-lactonasen ebenso wie die Adsorptionsmaterialien mit Zeta-Potentialen von -76,2 bis -24,8 mV eine negative Summenladung (siehe Tabelle 18). Bei einem pH-Wert von 4,0 dagegen, welcher kleiner als der pI ist, sind die AHL-lactonasen positiv geladen, wohingegen die Adsorptionsmaterialien mit Zeta-Potentialen von -42,0 bis -14,0 mV negativ geladen sind (siehe Tabelle 18). Es wird daher zur Immobilisierung mittels ionischer Wechselwirkungen der Citratpuffer bei einem pH-Wert von 4,0 gewählt, da hier Material und Enzym gegenpolig geladen sind. Aufgrund des positiven Zeta-Potentials von 0,6 mV des SiO₂ kann hier keine Immobilisierung über ionische Wechselwirkungen stattfinden.

Tabelle 19: Chemische Eigenschaften der Adsorptionsmaterialien

Material	H-Brücken-Bindung	Verhältnis zu Wasser	Vorrückkontaktwinkel mit Wasser (°)
Aluminiumhydroxid	möglich	hydrophil	19,2 ± 1,6
Calciumhydrogenphosphat	n. b.	hydrophil	n. b.
Kalksodaglas	n. b.	n. b.	n. b.
Poly-(Methacrylsäure-co-Ethylenglykoldimethacrylat)	möglich	hydrophil/hydrophob	n. b.
Polystyrol-Acrylsäure	möglich	hydrophob/hydrophil	63,5 ± 8,1
Siliziumdioxid	n. b.	hydrophil/hydrophob	30,1 ± 6,0

Neben der adsorptiven Immobilisierung über ionische Wechselwirkungen kann eine Enzym-Material-Bindung mittels Wasserstoffbrücken und un-/polaren Bindungen oder über Van-der-Waals-Kräfte erfolgen. Ob eine Immobilisierung über diese Kräfte von der Materialseite vielversprechend ist, zeigt Tabelle 19.

Hydrophobe und hydrophile Wechselwirkungen zwischen Enzym und Material sind weit verbreitet. Hydrophobe Materialoberflächen begünstigen Wechselwirkungen mit den hydrophoben Strukturbereichen des (meist hydrophilen) Enzyms, welche meist in dessen Innerem liegen. Hierdurch wird oftmals die Konformation des Enzyms verändert⁴⁸, was wiederum zu einem Verlust der spezifischen Aktivität führen kann. Es gilt daher für hydrophile Enzyme hydrophile Materialoberflächen für die Immobilisierung zu wählen, wohingegen für hydrophobe Enzyme hydrophobe Materialoberflächen zu wählen sind, um die spezifische Aktivität und die Stabilität des immobilisierten Enzyms zu gewährleisten.

Tabelle 20: Physikalisch-chemische Eigenschaften von Subtilisin und Lysozym

	Subtilisin	Lysozym
Herkunft	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Gallus gallus</i>
Molekulargewicht (kDa)	26,8	16,2
Theoretischer isoelektrischer Punkt	8,7	9,2
Anzahl der Aminosäuren	272	147
Anteil negativ geladener Aminosäuren (%)	6,2	13,0
Anteil positiv geladener Aminosäuren (%)	3,7	6,2
Anteil unpolare Aminosäuren (%)	43,0	40,1
Hydrodynamischer Radius (nm) nach Wilkins ³³⁵	2,4 ± 0,12	2,0 ± 0,12

Entsprechend werden zur Immobilisierung der hydrophilen AHL-lactonasen entweder hydrophile Substrate wie $\text{Ca}_5[\text{OH}(\text{PO}_4)_3]$ oder $\text{Al}(\text{OH})_3$ oder Materialien mit einem hydrophilen Anteil wie beispielsweise PS-AA, pMA-EGDMA oder SiO_2 verwendet (siehe Tabelle

19). Bei den letzten beiden überwiegt der hydrophile Materialanteil. Dies wird mit Hilfe der Kontaktwinkelbestimmung gezeigt, da für alle Materialien ein Kontaktwinkel $< 90^\circ$ ermittelt wurde (siehe Tabelle 19). So besteht SiO_2 vor allem aus hydrophilen Silanolgruppen²¹¹.

Tabelle 21: Zeta-Potential der Adsorptionsmaterialien zur Adsorption von Subtilisin

Material	ζ -Potential pH 6,5 (mV)	ζ -Potential pH 7,8 (mV)
Siliziumdioxid	$-24,8 \pm 1,0$	$-18,1 \pm 1,3$
Calciumhydrogenphosphat	$-12,4 \pm 0,6$	$-16,0 \pm 1,7$
Aluminiumhydroxid	$-24,8 \pm 1,0$	$-21,1 \pm 4,2$
Kalksodagläskügelchen	n. b.	n. b.

Die bisherigen Ergebnisse beziehen sich auf die Modellproteine Lysozym und Subtilisin, deren physikalisch-chemischen Eigenschaften in Tabelle 20 aufgeführt sind. Es zeigt sich sowohl bei der Immobilisierung von Subtilisin als auch bei der Immobilisierung von Lysozym, dass bei entgegengesetzter Ladung von Enzym und Material deutlich mehr Protein gebunden wird (siehe Abbildung 41 sowie Abbildung 39 A und B im direkten Vergleich). Dies lässt auf eine Immobilisierung durch ionische Wechselwirkungen schließen. Dies trifft selbst für SiO_2 zu, welches bei pH 6,5 und pH 7,8 im Gegensatz zu pH 4,0 ein negatives Zeta-Potential aufweist (siehe Tabelle 21).

Abbildung 39 A und Abbildung 40 A verdeutlichen den Zusammenhang zwischen spezifischer Oberfläche und der Gesamtmenge des immobilisierten Subtilisins. Mit zunehmender spezifischer Oberfläche des Materials steigt die Anzahl der Enzymmoleküle, welche prinzipiell gebunden werden können. Dieser Zusammenhang ist unabhängig vom pH-Wert während der Immobilisierung.

Den Zusammenhang zwischen immobilisierter Subtilisinmenge und deren Aktivität wird von Abbildung 39 B und Abbildung 40 B dargestellt. Die Aktivität des Enzyms wird von seiner aktiven Konformation und der Zugänglichkeit des aktiven Zentrums bestimmt. Unabhängig vom pH-Wert während der Immobilisierung wird die spezifische Aktivität bei dem pH-Wert bestimmt, welcher dem pH-Optimum des Enzyms entspricht.

Aufgrund der sehr großen spezifischen Oberfläche des SiO_2 von $188 \text{ m}^2/\text{g}$ wird hier im Vergleich zu den anderen Materialien mit bis zu 60 ng/mg Substrat viel Enzym gebunden. Dieses besitzt jedoch im Vergleich zu Enzym, welches auf anderen Materialien adsorbiert wurde, mit $78 \pm 3 \text{ U/mg}$ beziehungsweise $87 \pm 1 \text{ U/mg}$ nur eine geringe Aktivität. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums nicht gewährleistet ist oder das Substrat das aktive Zentrum nicht erreichen kann. Im Gegensatz

hierzu binden $\text{Al}(\text{OH})_3$ und KSG aufgrund der niedrigeren spezifischen Oberfläche von $15 \text{ m}^2/\text{g}$ beziehungsweise $0,016 \text{ m}^2/\text{g}$ im Vergleich nur sehr geringe Enzymmengen von bis zu $15 \text{ ng}/\text{mg}$. Dennoch besitzen die an diesen Materialien immobilisierten Enzyme im Vergleich eine hohe Aktivität von bis zu $772 \pm 27 \text{ U}/\text{mg}$. Das aktive Zentrum ist hier für das Substrat frei zugänglich.

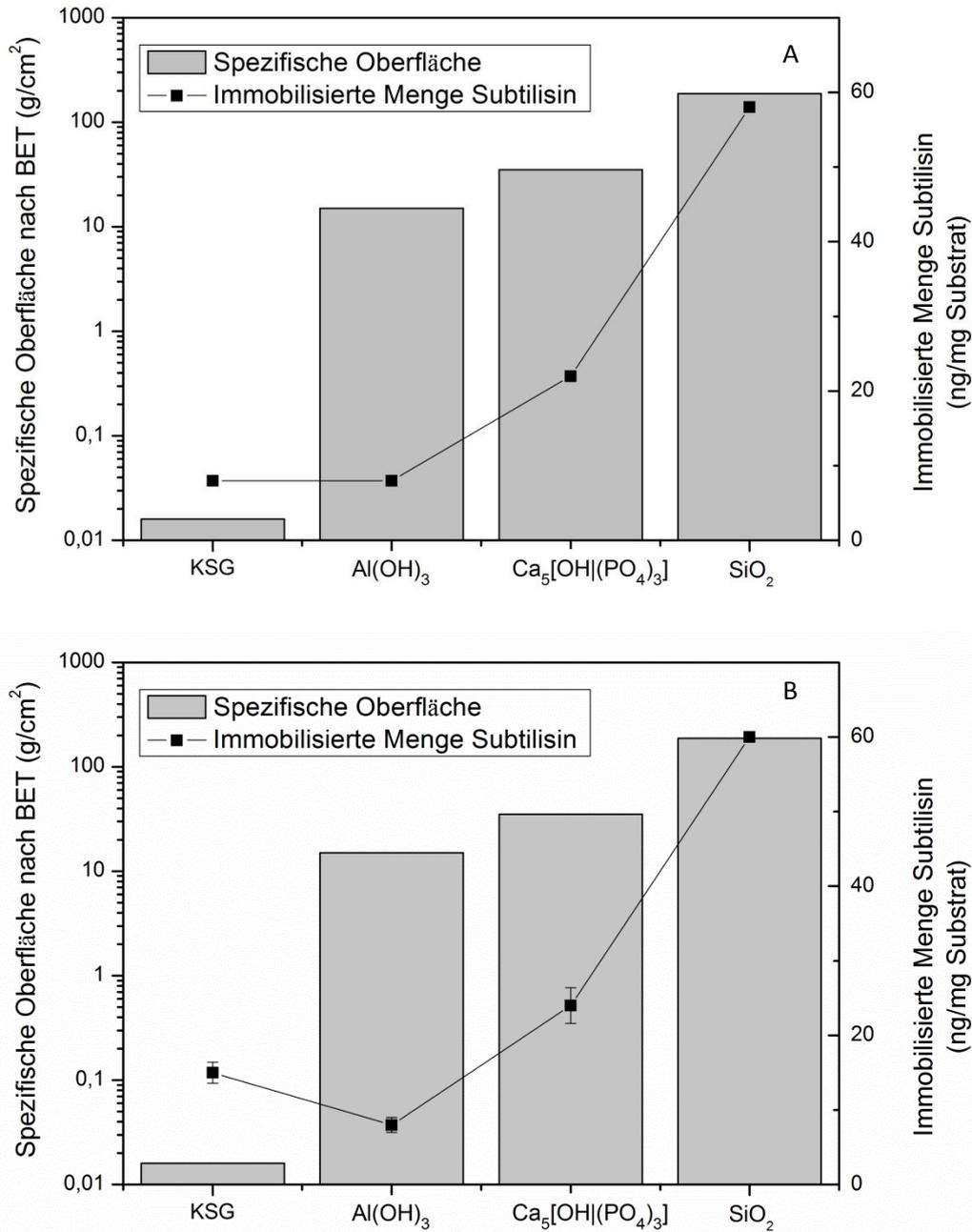


Abbildung 39: Zusammenhang zwischen spezifischer BET-Oberfläche des Substrates und der immobilisierten Menge Subtilisin

A) Immobilisierung bei pH 6,5 < pI B) Immobilisierung bei pH 7,8 > pI.

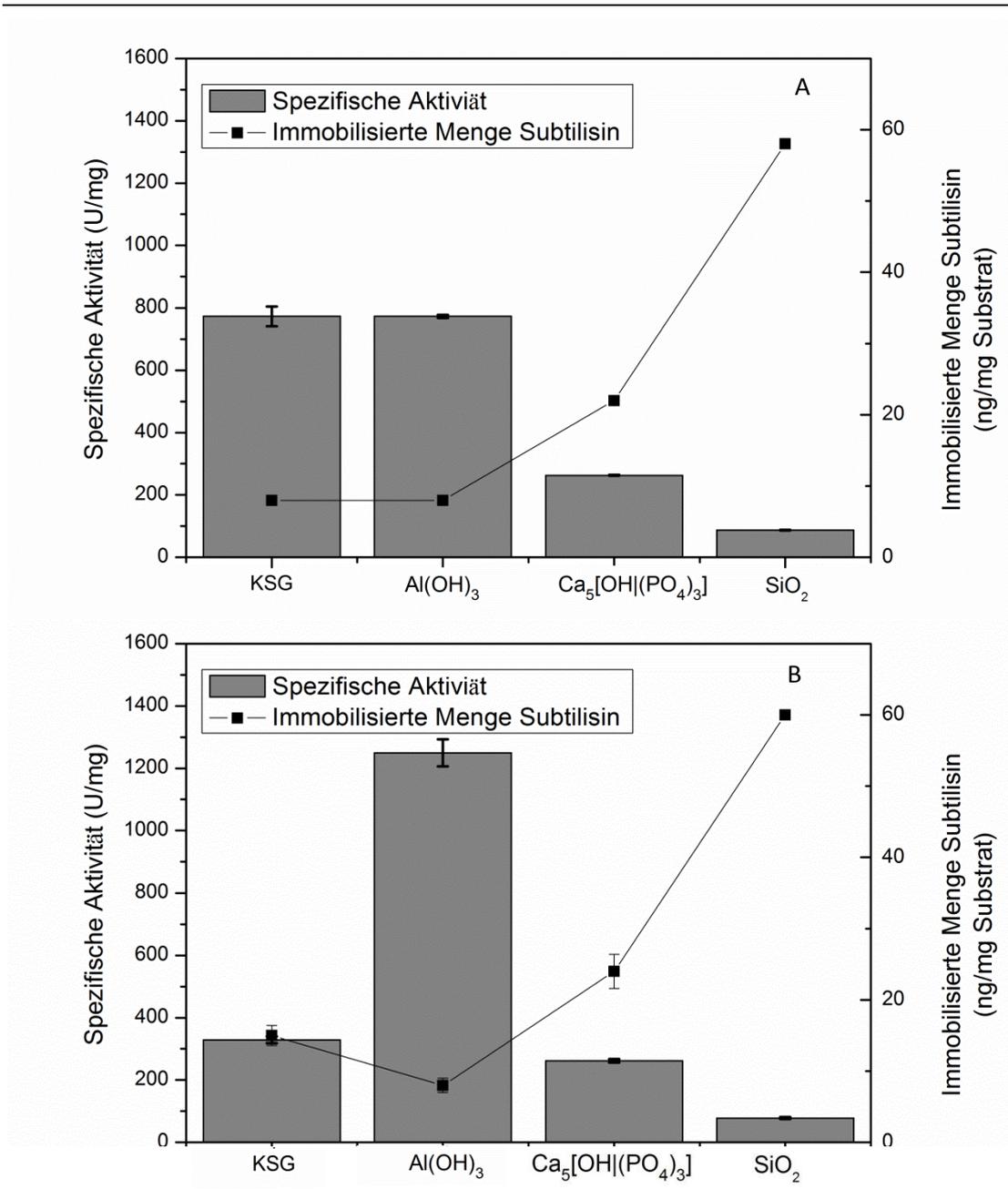


Abbildung 40: Zusammenhang zwischen spezifischer Aktivität und immobilisierter Menge Subtilisin

Die Bestimmung der spezifischen Aktivität erfolgte über den Umsatz des Substrates succAPF zu *p*-Nitrophenol bei pH 7,5.

A) Immobilisierung bei pH 6,7 < pI; B) Immobilisierung bei pH 7,8 > pI.

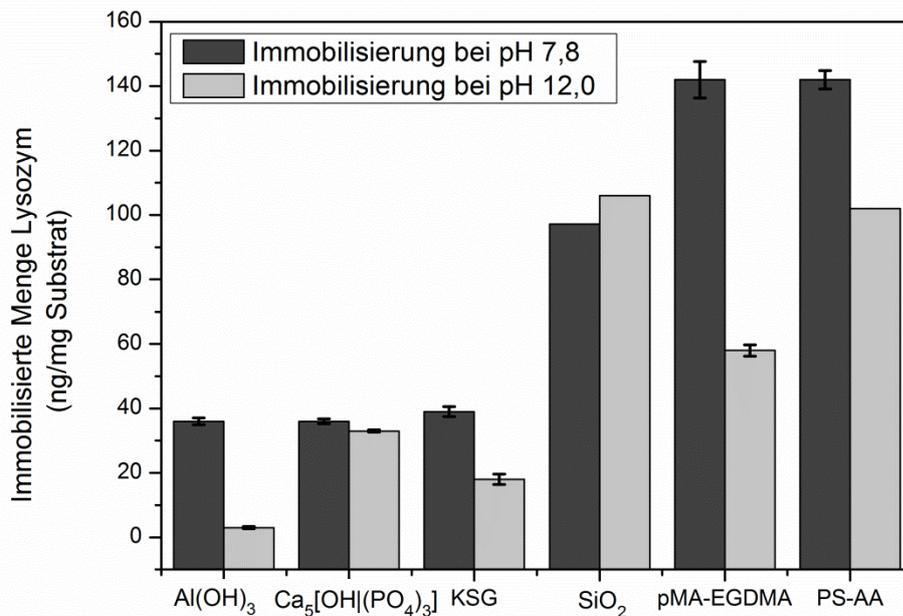


Abbildung 41: Zusammenhang zwischen immobilisierte Menge Lysozym und pH-Wert

Der Zusammenhang zwischen immobilisierter Subtilisinmenge und dessen Aktivität weist für Ca₅[OH|(PO₄)₃] und SiO₂ keine pH-Wert-Abhängigkeit der Immobilisierung auf. Die Aktivität von Subtilisin, welches bei einem pH > pI auf Al(OH)₃ immobilisiert wurde, zeigt eine 50 % höhere Aktivität wie Subtilisin, welches bei pH < pI immobilisiert wurde. Wird Subtilisin bei pH > pI auf KSG immobilisiert, ist die Aktivität im Vergleich zu einer Immobilisierung bei pH < pI um 50 % reduziert.

5.4.2 Chemisorptive Immobilisierung

Zur chemisorptiven Immobilisierung werden Siliziumglas- und Siliziumoberflächen mittels Silanisierung mit folgenden funktionellen Gruppen ausgerüstet:

- Aminofunktionen durch 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES),
- Carboxyfunktionen durch 2-(Carboxymethylthio)ethyltrimethylsilan (CTEMS),
- Epoxidfunktionen durch 3-(Glycidoxypropyl)trimethoxysilan (GOP),

sowie ferner zur Oberflächen-Anbindung des PEG-DA-Hydrogels

- Methacrylatfunktionen durch 3-(Trimethoxysilyl)propylmethacrylat (TESPMA).

Dazu werden die Oberflächen zunächst gereinigt und mit einer ammoniakalischen Wasserstoffperoxidlösung hydrophilisiert. Anschließend erfolgt die Silanisierung mit einer 5 %-igen Silanlösung in Ethanol. Über Ellipsometrie (Schichtdickenbestimmung) und Kontaktwinkelbestimmung mittels Sessile-Drop-Methode mit Wasser werden die einzelnen Präparationsschritte bewertet und die entstandenen Silanschichten charakterisiert. Zusätzlich

werden die Belegungsdichten der Materialien mit funktionellen Gruppen via Färbemethoden (vergleiche Kapitel 4.2.14) bestimmt: Bengalrosa zur Bestimmung von positiv geladenen Gruppen und Toluidinblau zur Bestimmung von sauren funktionellen Gruppen. Tabelle 22 listet die Ergebnisse des jeweiligen Präparationsschrittes auf.

Tabelle 22: Charakterisierung der Silanschichten

Präparations-schritt	Schichtdicke (nm)	Vorrück-Kontaktwinkel (°)	Rückzug-Kontaktwinkel (°)	Belegungs-dichte (funktion. Gruppen/nm ²)
SiO ₂ /SiOH	2,3 ± 0,1	spreitet	n. d.	n. b.
APTES	1,3 ± 0,2	73,1 ± 2,3	36,3 ± 2,6	3,3 ± 0,3
CTEMS	2,1 ± 0,7	72,9 ± 1,1	51,9 ± 4,6	6,3 ± 1,5
GOP	1,9 ± 0,5	47,2 ± 1,7	38,4 ± 1,2	3,5 ± 0,2
TESPMA	2,9 ± 0,8	53,8 ± 2,9	43,9 ± 2,9	6,2 ± 0,4

Durch die Reinigung und Hydroxylierung wird eine Dicke der SiO₂/SiOH-Schicht von 2,3 ± 0,1 nm erreicht. Der Kontaktwinkel wird hierdurch dermaßen erniedrigt, dass der Wassertropfen auf der Oberfläche spreitet.

Zwischen der Belegungsdichte und der Schichtdicke besteht eine direkte Korrelation: Je dicker die entstandene Silanschicht ist, desto mehr funktionelle Gruppen befinden sich auf der Oberfläche. Der Zuwachs der Schichtdicken steigt von 1,3 ± 0,2 nm auf 2,9 ± 0,8 nm in folgender Reihenfolge: APTES < GOP < CTEMS < TESPMA. Nahezu analog erhöht sich die Belegungsdichte der Materialien mit funktionellen Gruppen von 3,3 ± 0,3 auf 6,3 ± 1,5 funktionelle Gruppen/nm²: APTES < GOP < TESPMA < CTMES.

Basierend auf dem gereinigten und hydroxylierten Material, auf welchem der aufgebene Wassertropfen spreitet, erhöhen sich durch die Silanisierung stets die gemessenen fortschreitenden und rückschreitenden Kontaktwinkel:

- APTES: $\Theta_a = 73^\circ$ und $\Theta_r = 36^\circ$
- CTEMS: $\Theta_a = 73^\circ$ und $\Theta_r = 52^\circ$
- GOP: $\Theta_a = 47^\circ$ und $\Theta_r = 38^\circ$
- TESPMA: $\Theta_a = 54^\circ$ und $\Theta_r = 44^\circ$

Die Standardabweichung der fortschreitenden Kontaktwinkel von < 5 % zeigt, dass durch die gewählten Silanisierungsmethoden eine gleichmäßige Beschichtung der Materialien erzielt wird.

5.4.3 Einschluss in eine polymere Matrix

Das hier ausgewählte Hydrogelsystem basiert auf Poly(ethylenglykol)diacrylat. Aufgrund seiner vielen positiven Eigenschaften (siehe 3.2.3), wie beispielsweise des hydrophilen Charakters, und seiner biologischen Verträglichkeit^{240, 262} wird PEG oft für Anwendungen im medizinischen Bereich, vorrangig im Tissue Engineering²⁹⁷ und als Wirkstofffreisetzungsdot³¹⁶ eingesetzt. Aufgrund dieser Eigenschaften und Anwendungen eignet es sich daher prinzipiell für den Einsatz als Wirkstoffdepotsystem in technischen wasserführenden Anlagen.

Durch die endständigen Acrylgruppen wird das Poly(ethylenglykol) durch radikalische Polymerisation zu einem dreidimensionalen Netzwerk mit variablen mechanischen und biochemischen Eigenschaften verbunden. Hierzu werden Hydrogele durch eine photo-initiierte Polymerisation von Poly(ethylenglykol)diacrylat mit dem Photoinitiator DMPA durch eine UV-Bestrahlung mit einer Leistung 15 mW/cm^2 hergestellt.

Die wichtigsten Charakterisierungsparameter von Hydrogelen sind zunächst die Ausbeute und der Polymerisationsgrad. Hierüber wird die Vollständigkeit der Polymerisation verfolgt. Zur Bestimmung des Polymerisationsgrades wird die Konzentration der nicht abreagierten Acrylgruppen im polymerisierten Hydrogel mit Hilfe der FT-IR Spektroskopie betrachtet und unter Anwendung der OPUS-Software quantifiziert.

Abbildung 42 zeigt beispielhaft Ausschnitte der FT-IR/ATR-Spektren von Hydrogelen mit unterschiedlichen Polymergehalten von 15 bis 45 % PEG-DA mit einem Molekulargewicht von 575 g/mol . Mit steigendem Polymergehalt sinkt der Anteil der nicht-abreagierten Acrylgruppen (Bande bei 1635 cm^{-1}) nach der Polymerisation: Ausgehend von PEG-DA als Ausgangslösung mit $100 \pm 5 \%$ Acrylgruppen sinkt der Anteil der nicht-abreagierten Acrylgruppen mit zunehmendem Polymergehalt von $52 \pm 8 \%$ (10 % PEG-DA) über $48 \pm 3 \%$ (15 % PEG-DA), $42 \pm 4 \%$ (20 % PEG-DA) auf $34 \pm 6 \%$ (25 % PEG-DA). Dies bedeutet, dass mit zunehmendem Polymergehalt mehr Acrylgruppen miteinander reagieren, was wiederum zu einem ansteigenden Grad der radikalischen Polymerisation führt.

Innerhalb einer konstanten UV-Bestrahlungszeit von 3 s ist die Polymerisationsreaktion diffusionslimitiert: Bei niedrigen Polymergehalten (<15-20 %) läuft sie nicht vollständig ab, da Reaktionspartner nicht zeit- und ortsnahe zur Verfügung stehen. Somit ist der Anteil der verfügbaren Reaktionspartner, das heißt der Polymergehalt in der Polymerisationslösung, der Parameter, welcher die Vollständigkeit der Reaktion bestimmt.

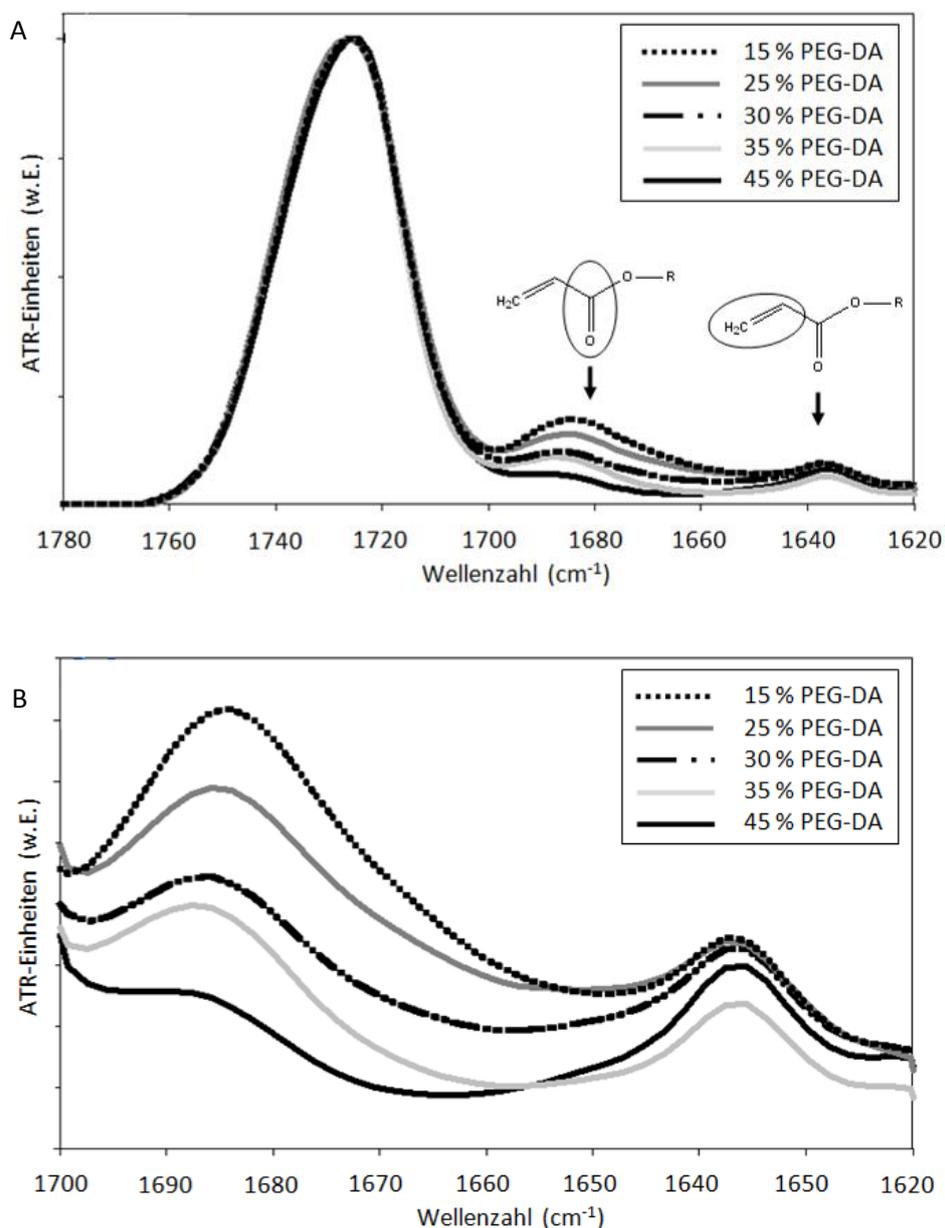


Abbildung 42: Polymerisationsgrad von Hydrogelen mit verschiedenen Polymergehalten

A) Ausschnitt des FT-IR/ATR-Spektrums (1780-1620 cm^{-1}) von Hydrogelen mit verschiedenen Polymergehalten (MW 575) von 15/25/30/35/45 %; Die Spektren sind auf die jeweilige Carbonylbande des Makromers bei 1720 cm^{-1} normiert.

B) Vergrößerter Ausschnitt des in A) gezeigten Spektrums (1700-1620 cm^{-1}); Hier ist die terminale C=C-Doppelbindung bei 1635 cm^{-1} sowie die C=O-Bindung in direkter Nachbarschaft der C=C-Doppelbindung bei 1685 cm^{-1} gezeigt.

Die Ausbeute wird durch das Verhältnis des tatsächlich polymerisierten Hydrogels zum theoretisch erreichbaren Hydrogelgewicht bestimmt. Trotz deutlicher Unterschiede in der Anzahl der abreagierten Acrylgruppen ist die Ausbeute unabhängig vom Polymergehalt dennoch annähernd bei 100 %. Dies gilt ausschließlich für frisches PEG-DA. Mit zunehmender Lagerdauer des Polymers ist eine Abhängigkeit der Ausbeute von dem Polymergehalt in der

Polymerisationslösung zu beobachten: Mit zunehmendem Polymergehalt steigt die Ausbeute. Dies ist auf die partielle Reaktion der Acrylgruppen über die Lagerdauer zu begründen.

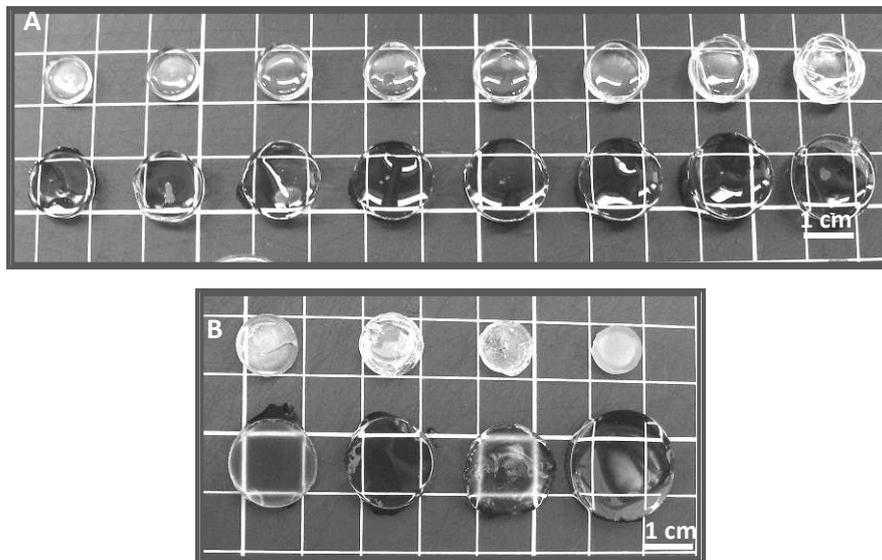


Abbildung 43: Morphologie von getrockneten und gequollenen Hydrogelen

A) Bei 70 °C vollständig getrocknete Hydrogele (obere Reihe) und mit MilliQ gequollene Hydrogele (untere Reihe) mit unterschiedlichen Polymergehalten. Von links nach rechts 15/20/25/30/35/40/45/50 % PEG-DA; B) Bei 70 °C vollständig getrocknete Hydrogele (obere Reihe) und mit MilliQ gequollene Hydrogele (untere Reihe) mit 25 % PEG-DA mit unterschiedlichen Molekulargewichten in der jeweiligen Polymerisationslösung. Von links nach rechts MW 575, MW 700, MW 2000 und MW 6000.

Eine maßgebliche Eigenschaft von Hydrogelen ist ihr Wasserbindungsvermögen und ihre damit einhergehende Volumen- und Gewichtsveränderung bei der Quellung. Bei Hydrogelen aus PEG-DA mit MW 575 und MW 700 sind diese beiden Parameter nur bedingt vom Polymergehalt abhängig. Der Quellgrad liegt bei allen untersuchten Polymergehalten bei 200 %. Dies entspricht einem Wassergehalt von 50 %. Abbildung 43 zeigt beispielhaft Hydrogele jeweils im getrocknetem und im gequollenem Zustand.

Abbildung 44 zeigt die Volumenausdehnung des Quellverhaltens von Hydrogelen mit einem Polymeranteil von jeweils 25 % über einen Zeitraum von 48 h. Es wurden zur Herstellung der Hydrogele PEG-DA mit unterschiedlichen Molekulargewichten verwendet (MW575/MW 700/MW2000/MW6000). Die größte Volumenausdehnung mit 200 % besitzen die Hydrogele bereits nach 5 Stunden Quellzeit. Nachfolgende Volumenänderungen sind aufgrund der Messmethode zu vernachlässigen. Es darf daher davon ausgegangen werden, dass Hydrogele, welche 24 h in MilliQ gequollen wurden, sich in ihrem Quellungsgleichgewicht befinden. Im Weiteren bezieht sich der gequollene Zustand des Hydrogels stets auf eine Quellzeit von 24 h.

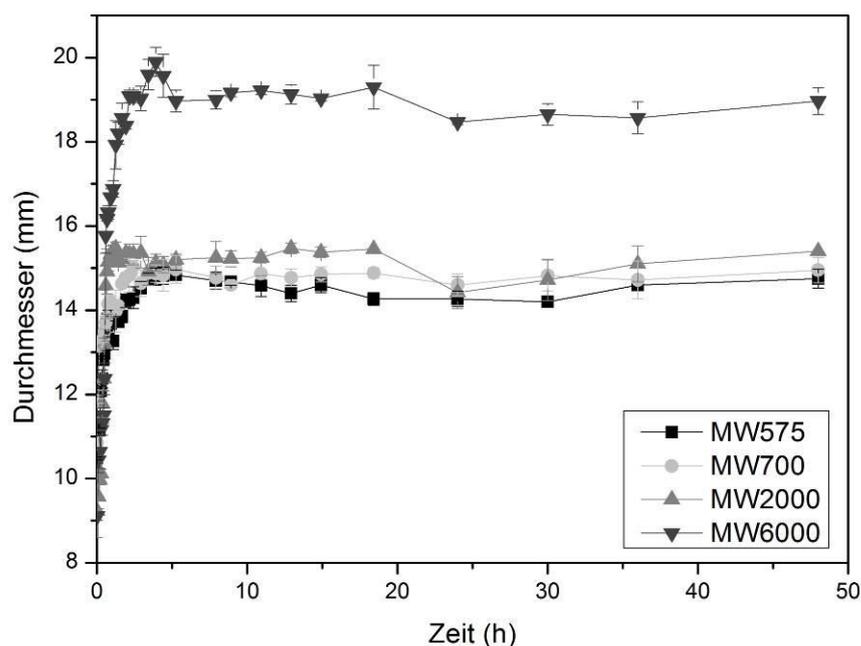


Abbildung 44: Quellverhalten von Hydrogelen mit unterschiedlichem Molekulargewicht

Über einen Zeitraum von 48 h wurde der jeweilige Durchmesser des Hydrogels, welches in MilliQ gequollen wurde, als Maß für die Volumenausdehnung ermittelt. Untersucht wurden vier Hydrogele mit jeweils 25 % Polymergehalt mit unterschiedlichem Molekulargewicht.

Tabelle 23 listet den Quellgrad und den Wassergehalt nach 24 h Quellung von Hydrogelen mit einem Polymergehalt von jeweils 25 % auf, welche aus PEG-DA mit unterschiedlichem Molekulargewicht (MW575/MW700/MW2000/MW6000) hergestellt sind. Mit steigen-dem Molekulargewicht erhöht sich der Wassergehalt im Hydrogel: So beträgt der Wassergehalt für ein Hydrogel mit 25 % PEG-DA mit MW575 und MW700 56/57 % wohingegen ein Hydrogel mit 25 % PEG-DA mit MW6000 bereits 87 % beträgt. Der Quellgrad steigert sich entsprechend von 228 % auf 755 %. Ein höheres Molekulargewicht wird durch eine höhere Anzahl der PEG-Wiederholungseinheiten erreicht, welche wiederum für den Zusammenhang des gesteigerten Wasserbindungsvermögens von Hydrogelen in Abhängigkeit des Molekulargewicht des Makromers verantwortlich sind.

Tabelle 23: Quellgrad/Wassergehalt von Hydrogelen (25 % PEG-DA) in Abhängigkeit des PEG-DA-Molekulargewichtes

Molekulargewicht (g/mol)	Quellgrad (%)	Wassergehalt (%)
575	228 ± 11	56
700	232 ± 12	57
2000	414 ± 21	76
6000	755 ± 38	87

Da das Hydrogel als Depot mit gezielter Freisetzungsrates zur Immobilisation von Proteinen dienen soll, sind hier die Maschenweite und das Diffusionsfreisetzungsverhalten maßgebend. Tabelle 24 zeigt die Maschenweite der unterschiedlichen Hydrogele, welche in ihrem Polymergehalt beziehungsweise in dem Molekulargewicht des verwendeten PEG-DA variieren. Es zeigt sich ein linearer Zusammenhang zwischen Polymergehalt beziehungsweise Molekulargewicht des Makromers einerseits und Vernetzungsgrad beziehungsweise Maschenweite andererseits: Mit steigendem Polymergehalt des Hydrogels von 15 % auf 50 % erhöht sich der Vernetzungsgrad und infolgedessen verringern sich die Maschenweiten. Mit steigendem Molekulargewicht hingegen vergrößert sich die Maschenweite. Dies wird, wie bereits beschrieben, durch eine erhöhte Anzahl an PEG-Wiederholungseinheiten erreicht, welche für die jeweilige Kettenlänge und somit für größere Maschen verantwortlich sind. Generell variieren die Maschenweiten der untersuchten Hydrogele in einem Bereich von 4,4 Å bis 21,0 Å.

Tabelle 24: Abgeschätzte Maschenweite (Å) nach Flory-Rehner aus Quellversuchen

Polymergehalt (%)	MW575	MW700	MW2000	MW6000
15	6,0	7,1	n. d.	n. d.
20	5,3	6,8	n. d.	n. d.
25	5,3	5,9	12,6	21,0
30	5,0	5,7	n. d.	n. d.
35	5,2	5,7	n. d.	n. d.
40	4,6	6,0	n. d.	n. d.
45	4,4	5,5	n. d.	n. d.
50	4,4	5,6	n. d.	n. d.

Zur Bestimmung der hydrophilen Eigenschaften der PEG-DA-Hydrogele werden die Kontaktwinkel, jeweils die Vorrück- und Rückzugkontaktwinkel, ausgewählter Hydrogelsysteme mit MilliQ ermittelt (siehe Tabelle 25). Die Oberflächen der Hydrogele sind hydrophil. Dies ist mit Vorrückkontaktwinkel $< 90^\circ$ gezeigt. Diese hydrophilen Eigenschaften der Hydrogele werden in erster Linie von den PEG-Wiederholungseinheiten bestimmt. Sowohl mit dem Polymergehalt als auch mit dem Molekulargewicht sind erhöhte Kontaktwinkel nachweisbar, das heißt, das Hydrogel wird mit einer erhöhten Konzentration an PEG-Wiederholungseinheiten weniger hydrophil. Der Effekt des Molekulargewichtes ist hierbei stärker als der Effekt des Polymergehaltes.

Tabelle 25: Kontaktwinkel ausgewählter Hydrogele [Vorrück-/Rückzug (°)]

Polymergehalt (%)	MW700	MW6000
25	29 ± 3/22 ± 3	46 ± 5/26 ± 3
35	31 ± 2/22 ± 3	n. d.
50	35 ± 3/24 ± 3	n. d.

Bisher sind die chemischen Eigenschaften des PEG-DA-Hydrogelsystems untersucht worden. Im Folgenden werden die mechanischen Eigenschaften der Hydrogele näher betrachtet. Hierzu werden das dynamische rheologische Verhalten von PEG-DA-Hydrogelen mit unterschiedlichen Polymergehalten (20 % bis 50 %) sowie das rheologische Verhalten von Hydrogelen, hergestellt aus Polymeren unterschiedlichen Molekulargewichts, im gequollenen Zustand anhand des Speichermoduls G' , des Verlustmoduls G'' sowie der Viskosität η bei 25 °C untersucht. Weiterhin werden die rheologischen Eigenschaften von unbeladenen Hydrogelen mit denen von Hydrogelen, welche mit Lysozym beziehungsweise DNase beladen sind, verglichen. Bei Hydrogelen mit einem Polymergehalt unter 20 % war eine rheometrische Untersuchung nicht möglich, da diese Hydrogele kein festes Netzwerk ausbilden und während der Aufgabe des Normaldrucks zerstört werden.

Zur Untersuchung der Materialstabilität werden zunächst die Hydrogele im Amplitudenverlauf einem Stresstest unterzogen, bei dem bei konstanter Frequenz die Deformationsamplitude variiert wird. Bei allen untersuchten Hydrogelen mit einem Polymergehalt über 20 % ist zu Beginn des Amplitudenverlaufs der Speichermodul um einen Faktor von 10 bis 100 größer als der Verlustmodul: Die Hydrogele besitzen hier ein elastisches Verhalten. Abbildung 46 zeigt dies beispielhaft für Hydrogele mit einem Polymergehalt von 25 % beziehungsweise 45 %. Die Materialstabilität wird durch zwei Parameter charakterisiert: die Fließgrenze und den linear-viskoelastischen Bereich. Die Fließgrenze wird durch den Schnittpunkt von G' und G'' bestimmt. Das Ende des linear-viskoelastischen Bereiches, in dem G' und G'' konstante Werte annehmen, zeigen die Nachgebrenze an.

Abbildung 46 A zeigt den Verlauf der Speichermodule als Funktion der Deformation verschiedener Hydrogele mit unterschiedlichem Polymergehalt. Diese Kurven wurden in Amplitudendurchläufen bei konstanter Frequenz ermittelt. Bei geringer Deformation (< 1 %) bleibt der Speichermodul zunächst konstant: die Hydrogelnetzwerkstruktur ist intakt. Im weiteren Verlauf, bei einer Deformation größer 1 %, fallen die Speichermodule um einen Faktor von bis zu 100 ab. Hier kehrt sich der Zusammenhang um: mit erhöhtem Polymergehalt fallen die Speichermodule bei zunehmender Deformation schneller ab. Dies lässt auf eine Veränderung der inneren Netzwerkstruktur schließen.

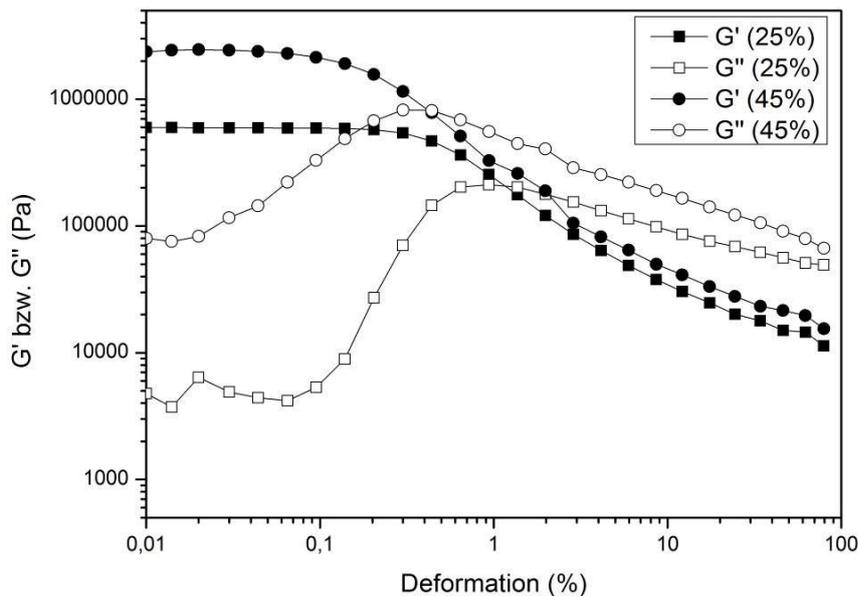


Abbildung 45: Amplitudendurchlauf: G' und G'' als Funktion der Deformation

Die Verlust- und Speichermodul im Amplitudendurchlauf einer dynamischen Oszillationsmessung zweier Hydrogele, mit einem Polymergehalt von 25 % beziehungsweise 45 %, sind hier über die Deformation aufgetragen. Die Fließgrenze wird durch den Schnittpunkt von G' und G'' bestimmt. Das Ende des linear-visko-elastischen Bereiches, in dem G' und G'' konstante Werte annehmen, zeigen die Nachbegrenze an.

Tabelle 26: Werte des linear-viskoelastischen Bereiches (MPa)

Polymergehalt (%)	MW 575	MW 700	MW6000
20	0,21 ± 0,08	0,22 ± 0,03	n. d.
25	0,59 ± 0,04	0,59 ± 0,04	0,53 ± 0,01
30	0,80 ± 0,05	1,01 ± 0,10	n. d.
35	1,06 ± 0,41	1,18 ± 0,42	n. d.
40	1,91 ± 0,17	2,02 ± 0,20	n. d.
45	2,19 ± 0,56	2,39 ± 0,48	n. d.
50	3,28 ± 0,75	2,7 ± 0,62	n. d.

Durch höhere Polymergehalte von bis zu 50 % und dem damit höheren Vernetzungsrad im Hydrogel sind Speichermodul mit um einen Faktor von 10 höheren Werten erreichbar. Gleichzeitig verkürzt sich der linear-viskoelastische Bereich – die Hydrogele werden spröder und verlieren bei zunehmender Deformation schneller die innere Netzwerkstruktur. Ein höheres Molekulargewicht hingegen führt bei gleichem Polymergehalt von 25 % zu einem etwas niedrigeren Speichermodul (siehe Tabelle 26). Die Werte der Speichermodul befinden sich zwischen 0,2 MPa und 3,28 MPa.

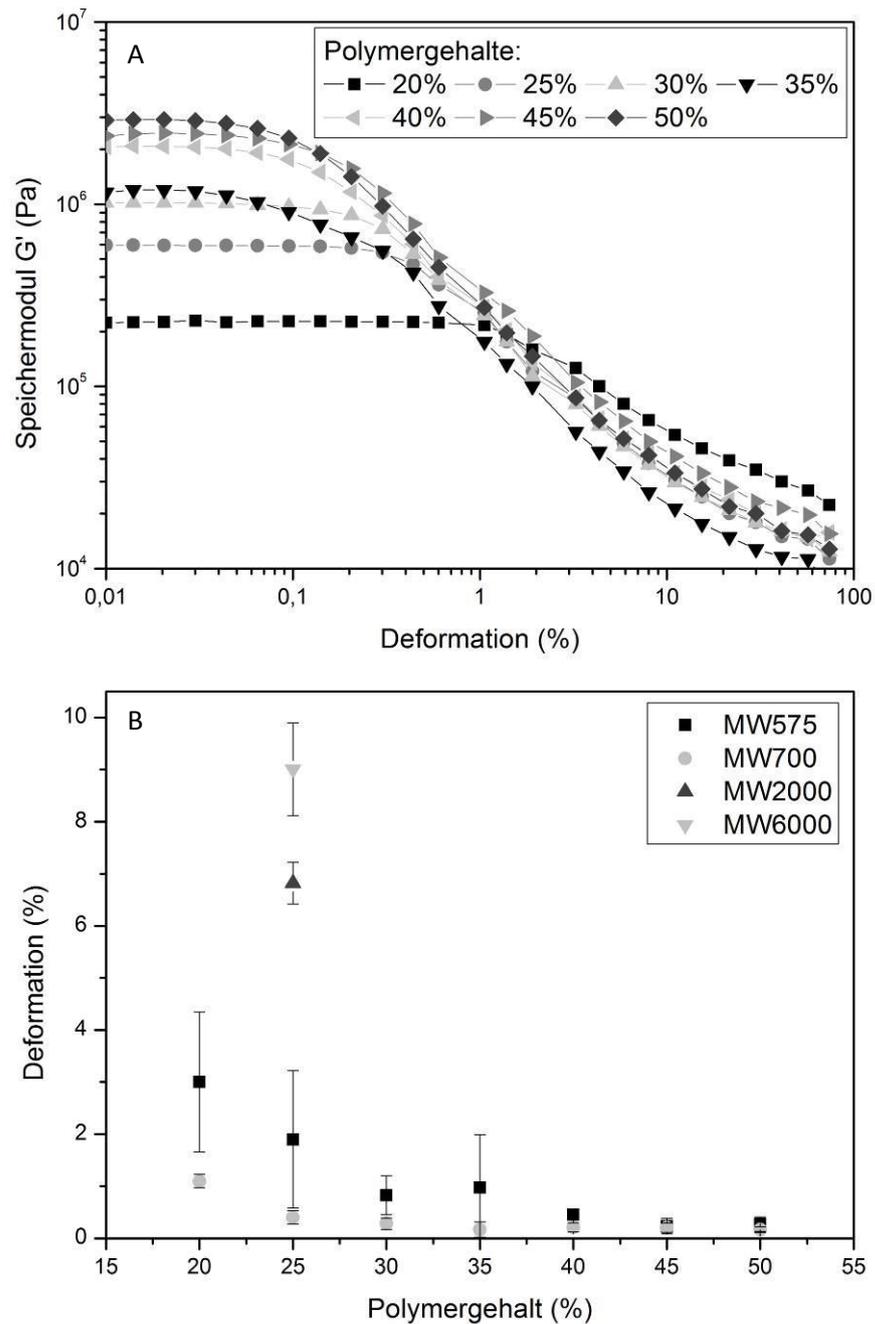


Abbildung 46: Amplitudendurchlauf: Verlauf des Speichermoduls und Fließgrenzen

A) Speichermodule von Hydrogelen mit unterschiedlichem Polymergehalt. Mit zunehmendem Polymergehalt an PEG-DA MW 700 des Hydrogels erhöht sich der Speichermodul bei gleichzeitiger Verkürzung des linear-viskoelastischen Bereiches. B) Fließgrenzen der Hydrogele in Abhängigkeit des Polymergehaltes und des Molekulargewichtes des PEG-DA.

Abbildung 46 B zeigt die Fließgrenzen der Hydrogele in Abhängigkeit des Polymergehaltes und des Molekulargewichtes des PEG-DA. Mit zunehmendem Polymergehalt verringern sich die Werte der Fließgrenzen. Mit zunehmendem Molekulargewicht des eingesetzten Polymers bei gleichem Polymeranteil im Hydrogel hingegen erhöhen sich diese Werte um das Zehnfache von 1,1 MPa für PEG-DA MW 700 auf 9,0 MPa für PEG-DA MW6000. Ab einem Polymeranteil von über 40 % wird der Einfluss des Molekulargewichts vernach-

lässigbar: sowohl für PEG-DA mit MW 575 als auch mit PEG-DA mit MW 700 beträgt der Speichermodul im linear-viskoelastischen Bereich 0,2 MPa.

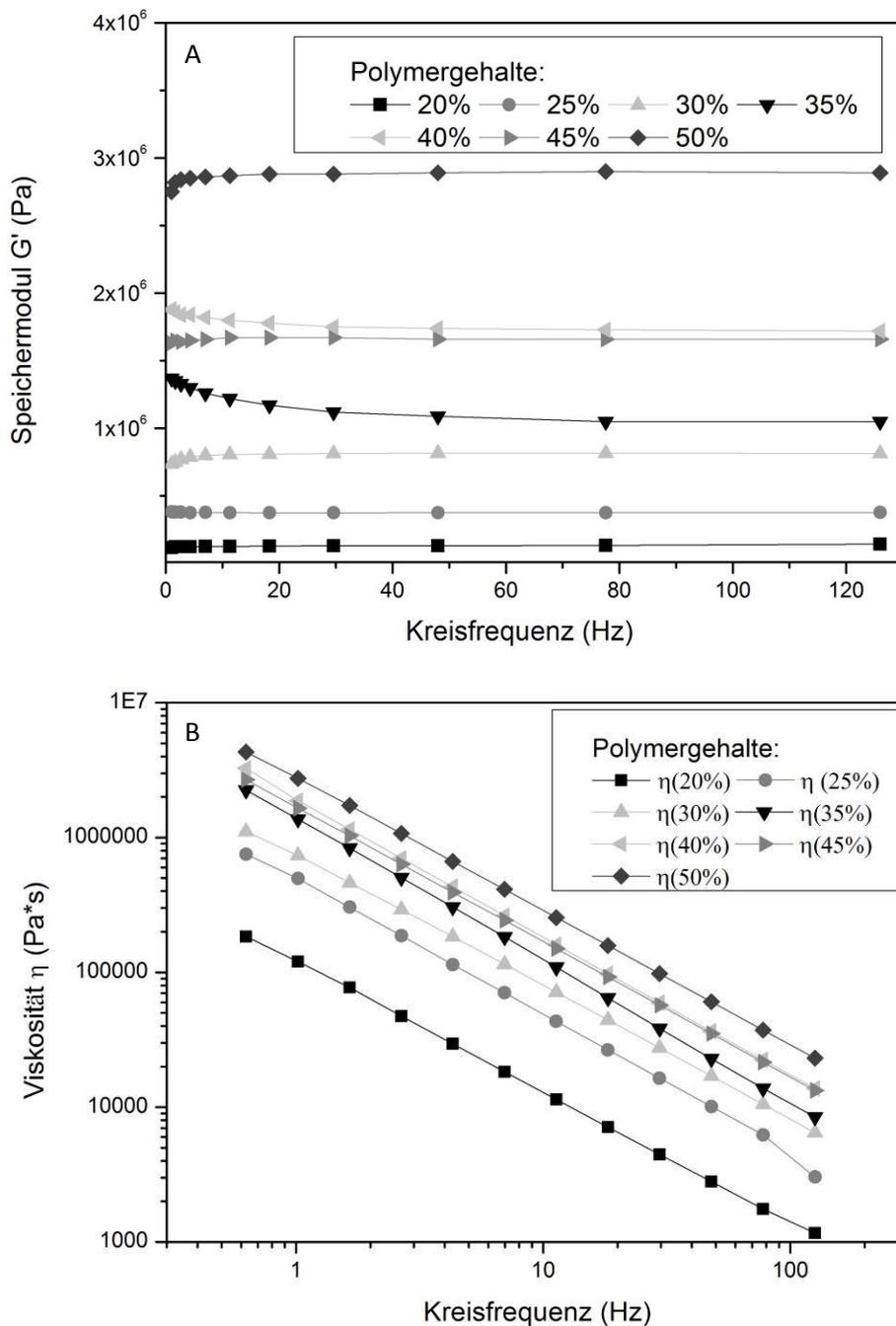


Abbildung 47: Frequenzdurchlauf: Speichermodul und Viskosität

Die Frequenzdurchläufe wurden mit Hydrogelen aus PEG-DA MW700 bei einer Deformation von 0,01 %, welche dem linear-viskoelastischen Bereich entspricht, durchgeführt. A) Speicher-/Elastizitätsmodul als Funktion der Frequenz. B) Viskosität als Funktion der Frequenz.

Im Folgenden werden die Hydrogele einem Frequenzdurchlauf unterzogen, bei dem die Amplitude auf einer Deformation von 0,01 % im linear-viskoelastischen Bereich konstant gehalten und die Frequenz moduliert wird. Betrachtet werden sowohl der Speicher-/Elastizitätsmodul G' , der Verlust-/Viskositätsmodul G'' als auch die Viskosität η . Für alle

untersuchten Hydrogele sind die ermittelten Elastizitätsmodule in einem Wertebereich von $0,07 \pm 0,01$ Pa (20 % PEG-DA MW 700) bis $3,04 \pm 0,00$ Pa (50 % PEG-DA MW 700) um eine Zehnerpotenz größer als die Viskositätsmodule mit $0,02 \pm 0,001$ (20 % PEG-DA MW 700) bis $0,11 \pm 0,02$ (50 % PEG-DA MW 700).

Abbildung 47 A zeigt die Speicher-/Elastizitätsmodule von Hydrogelen mit unterschiedlichem Polymergehalt. Diese sind unabhängig von der Frequenz. Mit zunehmendem Polymergehalt steigen die Elastizitätsmodule von $0,14 \pm 0,01$ MPa (20 % PEG-DA MW 700) auf $2,9 \pm 0,04$ MPa (50 % MW700). Dies bedeutet, dass mit zunehmendem Polymergehalt die Hydrogele aufgrund der höheren Elastizität mechanisch stabiler sind.

Abbildung 47 B stellt die Frequenzabhängigkeit der Viskosität von Hydrogelen mit unterschiedlichem Gehalt am Makromer PEG-DA MW 700 dar. Mit zunehmender Frequenz von 0,01 bis 1 Hz sinken die jeweiligen Viskositätswerte um einen Faktor von 100. Dies deutet darauf hin, dass die Hydrogele strukturviskose Eigenschaften besitzen. Ebenso sind die Viskositätswerte direkt abhängig vom Polymergehalt des Hydrogels: Je mehr Makromeranteile im Hydrogel vorhanden sind, desto höher sind die Viskositätswerte.

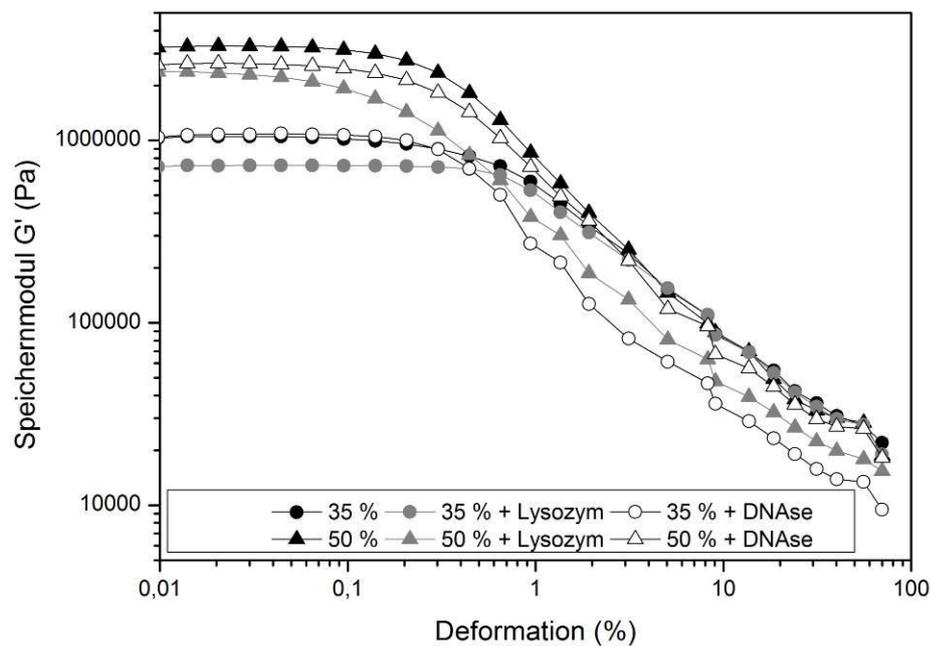


Abbildung 48: Speichermodule im Amplitudendurchlauf von beladenen Hydrogelen

Der Verlauf des Speichermoduls als Funktion der Deformation wurde im Amplitudendurchlauf von Hydrogelen mit unterschiedlichem Polymergehalt (35 % und 50 % PEG-DA), jeweils im unbeladenen sowie im beladenen Zustand (2 mg/ml Lysozym beziehungsweise DNase), ermittelt.

Bisher sind die rheologischen Eigenschaften der Hydrogele im unbeladenen Grundzustand untersucht worden. Im Folgenden werden nun mit jeweils 2 mg/ml Lysozym oder DNase beladene Hydrogele betrachtet (siehe Abbildung 48). Durch die Beladung verringern sich die Speichermodule um 20 % und der linear-viskoelastische Bereich verkürzt sich.

Die Frequenzunabhängigkeit der Speicher-/Elastizitätsmodule im Frequenzdurchlauf werden durch die Beladung nicht gestört. Dennoch erhöhen sich die Elastizitätsmodule beispielsweise bei Hydrogelen mit einem Polymergehalt von 35 % vom unbeladenen Hydrogel mit $0,47 \pm 0,09$ MPa auf $1,65 \pm 0,02$ MPa für eine Beladung mit Lysozym und $1,86 \pm 0,22$ MPa für eine Beladung mit DNase.

Sind bisher das Hydrogel bezüglich seiner chemischen, physikalischen und mechanischen Eigenschaften auf Eignung zur Immobilisierung und Freisetzung von Enzyme betrachtet worden, werden abschließend die Reaktionsbedingungen, insbesondere die UV-Bestrahlung, hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Proteinstruktur untersucht. UV-Strahlung als energiereiche Strahlung kann auf Proteine denaturierend wirken. Sie kann einerseits Kettenbrüche (Depolymerisation) bei Aminosäuren verursachen und andererseits zur Ausbildung zusätzlicher kovalenter Bindungen (Dimerisierung) führen. Häufig bewirkt UV-Strahlung eine Entfaltung des Proteins, bei der reaktive Gruppen wie freie Sulfhydrylgruppen von Cysteinen auf der Proteinoberfläche freigelegt werden. Dies begünstigt wiederum die Aggregation der Moleküle¹⁷⁵.

Für die Denaturierung der Proteine ist vor allem die Strahlendosis von Bedeutung. Hierzu werden Experimente mit Lysozym, DNase und BlcC durchgeführt, welche mit unterschiedlicher Bestrahlungsdauer (0 s bis 300 s) bei einer Leistung von 15 mW/cm^2 behandelt werden. Analysiert wird zum einen die Strukturstabilität von Lysozym und DNase als Modellenzyme unter UV-Einfluss mit FT-IR/ATR-Messungen und Auswertung mit der OPUS-Software und zum anderen die spezifische Aktivität von Lysozym als Modellenzym und BlcC mit den jeweiligen Aktivitätsassays (vergleiche Kapitel 4.2.5 und 4.2.6).

Tabelle 27: Cysteinanteil verschiedener Enzyme

Enzym	Prozentualer Anteil Cystein (%)
DNase	1,2
Lysozym	3,0
AiiA	1,3
AiiB	2,2
BlcC	1,2

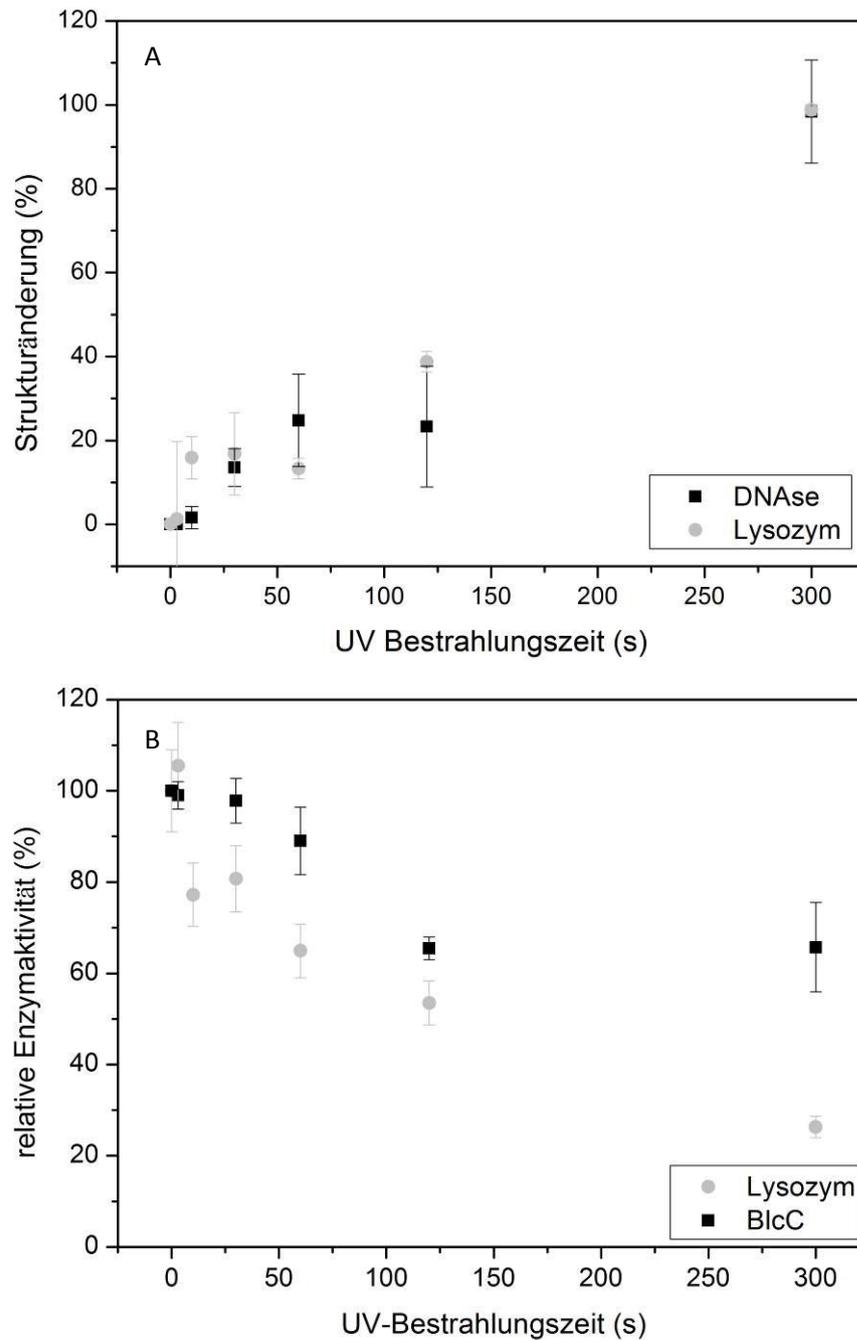


Abbildung 49: Einfluss der UV-Bestrahlung auf Proteinstruktur und Enzymaktivität

A) Prozentuale Strukturänderung von Lysozym und DNase durch UV-Bestrahlung, ermittelt durch FT-IR/ATR mit Auswertung in der OPUS-Software;

B) Änderung der relativen Enzymaktivität durch die UV-Bestrahlungsdauer von Lysozym und BlcC, bestimmt durch Aktivitätsassays (siehe Kapitel 4.2.6).

Mit zunehmender Bestrahlungsdauer erhöht sich die finale Dosis der UV-Strahlung, welche auf die Enzyme aufgegeben wurde, auf 450 mJ/cm^2 . Entsprechend steigt die prozentuale Strukturänderung von DNase und Lysozym nahezu linear mit zunehmender Bestrahlungsdauer (Abbildung 49 A) auf bis zu 100 %. Eine Bestrahlungsdauer von 0 s bis 5 s bewirkt eine Strukturänderung der Enzyme von weniger als 10 %. Weiterhin zeigt sich, dass

Lysozym durch die UV-Bestrahlung stärker geschädigt wird als DNase (5-10 %). Dies liegt möglicherweise an dem höheren Cysteinanteil mit 3,0 % (siehe Tabelle 27).

Abbildung 49 B stellt den UV-bedingten Verlust der spezifischen Aktivität der Enzyme Lysozym und BlcC dar. Daraus ist ersichtlich, dass bis zu einer Bestrahlungsdauer von 5 s ein Aktivitätsverlust kleiner 5 % auftritt. Mit zunehmender Bestrahlungsdauer jedoch sinkt nahezu linear die spezifische Aktivität der Enzyme. Im Vergleich zu Lysozym mit einem Cysteinanteil von 3,0 % weist BlcC mit einem niedrigen Cysteinanteil von 1,2 % bei gleicher Bestrahlungsdauer eine 30 %-ig höhere Aktivität auf.

Tabelle 27 listet den jeweiligen Cysteinanteil der Modelenzyme DNase und Lysozym sowie der AHL-lactonasen AiiA, AiiB und BlcC auf. Alle drei AHL-lactonasen besitzen mit 1,2 bis 2,2 % einen geringen Cysteinanteil als das Modellprotein Lysozym. Entsprechend fallen ihre UV-bedingten Strukturänderungen und ihre Aktivitätsverluste geringer aus im Vergleich zu Lysozym.

Abschließend wird die Möglichkeit der kovalenten Bindung der PEG-DA-Hydrogele auf Oberflächen und deren Stabilität betrachtet. Verglichen werden Hydrogele auf unbeschichteten Objektträgern und Hydrogele, welche mit methacrylatfunktionalisierten Objektträgern polymerisiert wurden. Bei alleiniger Quellung ist kein Unterschied in der Haftung der beiden untersuchten Proben feststellbar. Das Hydrogel löst sich jedoch von dem unbeschichteten Objektträger sowohl nach Trocknung als auch durch eine einstündige Ultraschallbehandlung (Abbildung 50 B, C, D), wohingegen das kovalent an den Objektträger gebundene Hydrogel seine Bindung beibehält (Abbildung 50 A).

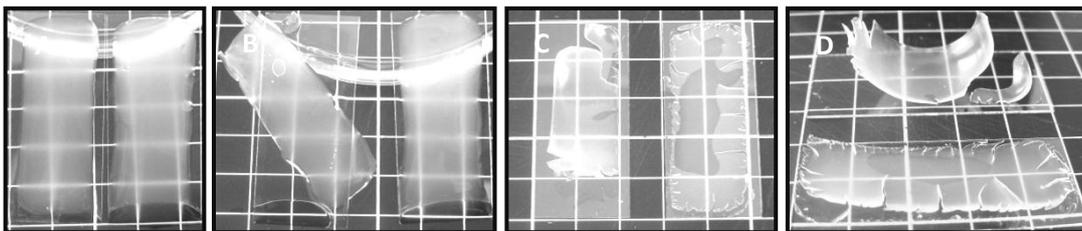


Abbildung 50: Stabilitätsprüfung von kovalent gebundenem Hydrogel

A) Quellung der Hydrogele in MilliQ, links auf einem unbeschichteten Objektträger; rechts kovalent gebunden an methacrylatfunktionalisiertem Objektträger;

B) Hydrogele nach einer 60-minütigen Ultraschallbehandlung; links auf einem unbeschichteten Objektträger; rechts kovalent gebunden an methacrylatfunktionalisiertem Objektträger;

C) Hydrogele nach 20-minütiger Trocknung bei Raumtemperatur; links auf einem unbeschichteten Objektträger; rechts kovalent gebunden an methacrylatfunktionalisiertem Objektträger;

D) Hydrogele nach 20-minütiger Trocknung bei Raumtemperatur; hinten auf einem unbeschichteten Objektträger; vorne kovalent gebunden an methacrylatfunktionalisiertem Objektträger;

5.5 Freigabekinetik in Abhängigkeit der Immobilisierungsmethode

Je nach Immobilisierungsmethode ist die Freigabekinetik von unterschiedlichen Faktoren abhängig, die in Kapitel 6.2.2 diskutiert werden. So ist beispielsweise eine Freisetzung des immobilisierten Proteins bei der chemisorptiven Immobilisierung per Definition nicht möglich, da es sich um eine kovalente Anbindung des Enzyms an das Material handelt.

5.5.1 Desorption von adsorptiv immobilisierten Enzymen

Während die Adsorption bei zwei unterschiedlichen pH-Werten ($\text{pH} < \text{pI}$ und $\text{pH} > \text{pI}$) durchgeführt wird, erfolgt die Desorption unabhängig vom pH-Wert der Immobilisierung stets bei pH 7,4 in 10 mM PBS.

Tabelle 28: Adsorbierte Subtilisinmenge und desorbierbarer Anteil

Material	Immobilisierung bei pH 7,8 < pI		Immobilisierung bei pH 12,0 > pI	
	Adsorbierte Subtilisinmenge (ng/mg)	Desorbierbarer Anteil (%)/(ng/mg)	Adsorbierte Subtilisinmenge (ng/mg)	Desorbierbarer Anteil (%)/(ng/mg)
SiO ₂	97,2	0,5/0,5	106	9,2/9,8
Al(OH) ₃	36	0,9/0,3	3	27,7/0,8
KSG	39	4,4/1,7	18	3,9/0,7
Ca ₅ [OH](PO ₄) ₃	36	9,2/3,3	33	10,1/3,3
PSAA	142	12,3/17,5	102	4,6/4,7
pMA-EGDMA	142	11,2/15,8	58	26,7/15,5

Tabelle 28 listet die nach 24 h an dem jeweiligen Material adsorbierte Subtilisinmenge in Abhängigkeit des pH-Wertes bei der Immobilisierung und den jeweiligen desorbierbaren Anteil bei einem pH-Wert von 7,4 auf. Auffällig ist, dass der desorbierbare Anteil bei Al(OH)₃ mit maximal 27,7 % (0,8 ng/mg) beziehungsweise die maximale absolut desorbierbare Proteinmenge bei PS-AA mit 12,3 % (17,5 ng/mg) nur gering ist. Generell weisen die polymeren Partikel PSAA und pMA-EGDMA, unabhängig des pH-Wertes der Immobilisierung, mit 17,5 ng/mg und 15,8 ng/mg die höchsten absoluten desorbierbaren Proteinmengen auf. Dies deutet darauf hin, dass die Bindung zwischen Material und Enzym hier weniger stark ausgeprägt ist.

Bei der Immobilisierung über ionische Wechselwirkungen bei einem pH-Wert < pI, bei der Material und Enzym gegenpolig geladen sind, sind die Bindungen mit 100 kJ/mol stark ausgebildet. Entsprechend ist hier der desorbierbare Anteil um bis zu 30 % geringer als bei der Immobilisierung bei einem pH-Wert > pI. Einzig KSG bildet eine Ausnahme.

Abbildung 51 zeigt die Desorptionsverläufe der unterschiedlichen Materialien bei den zwei zur Immobilisierung gewählten pH-Werten. $\text{Al}(\text{OH})_3$ weist die geringste Kurvensteigung auf. pMA-EGDMA zeigt, unabhängig des pH-Wertes während der Adsorption, jeweils ähnliche Kurvenverläufe, die mit $15 \mu\text{g}/\text{mg}$ Material und $16 \mu\text{g}/\text{mg}$ Material im gleichen Maximalbereich liegen.

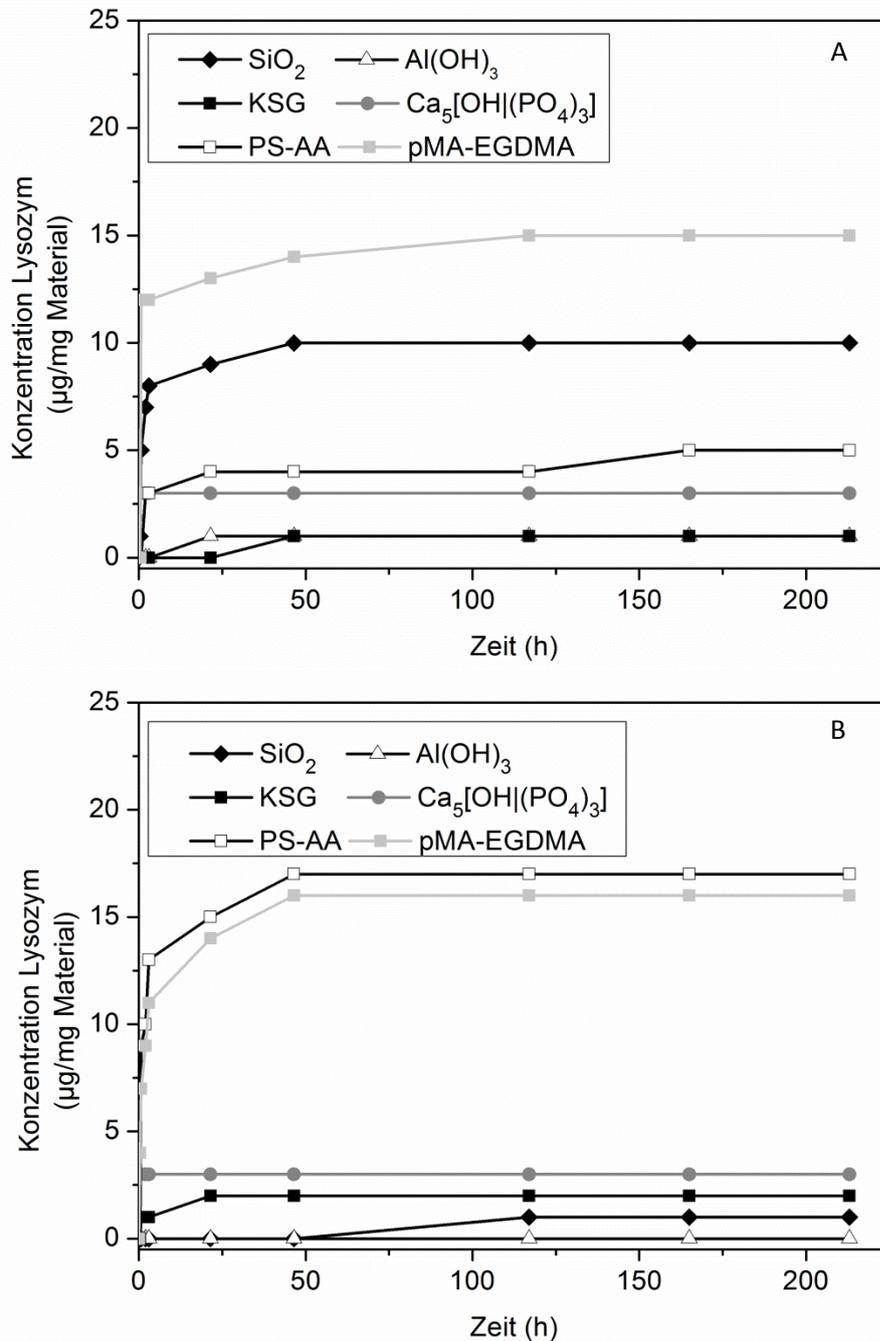


Abbildung 51: Desorptionskinetik von adsorptiv immobilisiertem Lysozym

Die Proteinkonzentration im Überstand wurde mit dem Bradford-Protein Assay ermittelt und über die Messzeitpunkte aufsummiert. Nach jeder Konzentrationsbestimmung wurde der Überstand durch frisches 10 mM PBS pH 7,4 ersetzt.

A) Desorptionskinetik von bei pH 7,8 < pI adsorptiv immobilisiertem Lysozym; B) Desorptionskinetik von bei pH 12 > pI adsorptiv immobilisiertem Lysozym

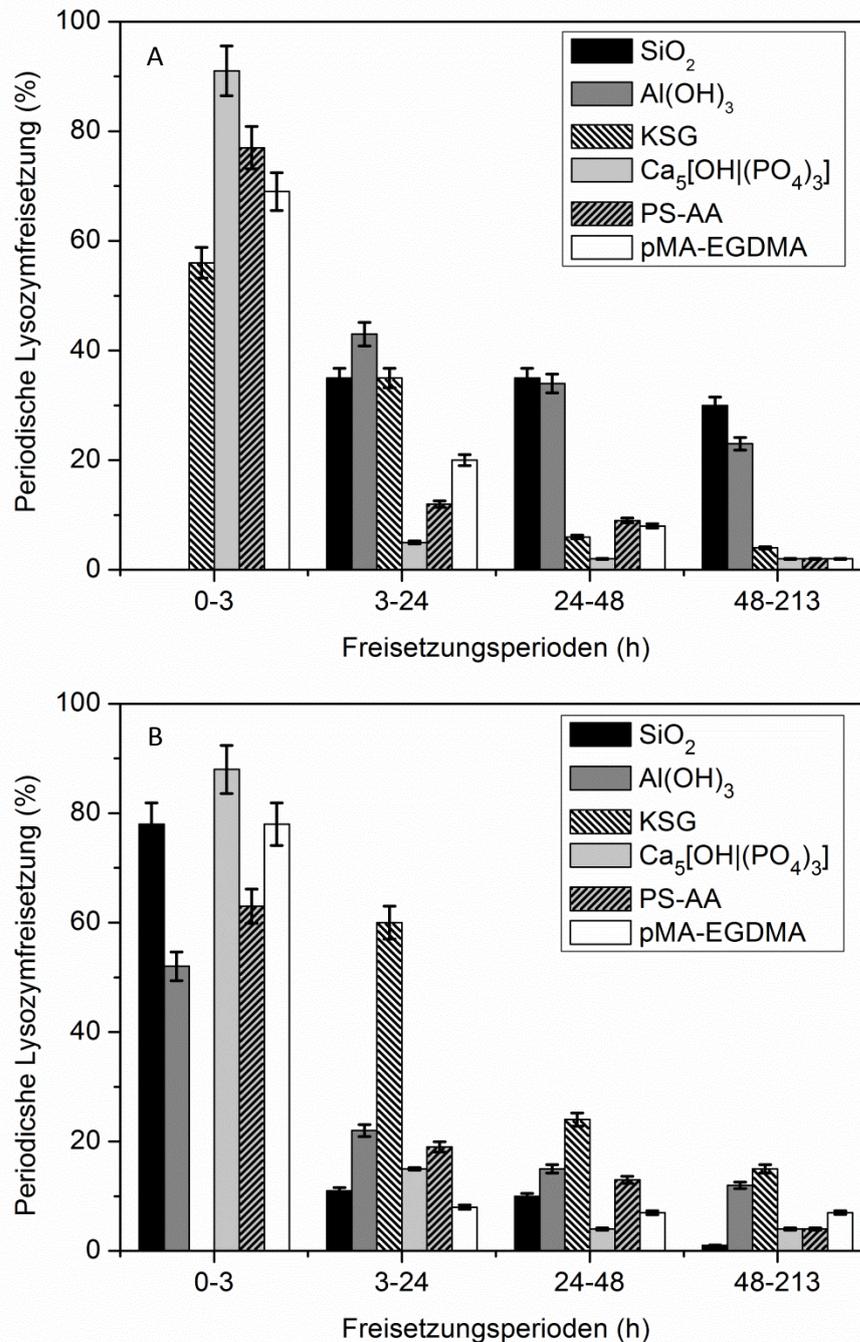


Abbildung 52: Desorbierte Lysozymmenge in definierten Freisetzungperioden

Die Proteinkonzentration im Überstand wurde mit dem Bradford-Protein Assay ermittelt und über die Messzeitpunkte aufsummiert. Nach jeder Konzentrationsbestimmung wurde der Überstand durch frisches 10 mM PBS pH 7,4 ersetzt.

A) Desorptionskinetik von bei pH 7,8 adsorptiv immobilisiertem Lysozym dargestellt in definierten Freisetzungperioden; B) Desorptionskinetik von bei pH 12 adsorptiv immobilisiertem Lysozym dargestellt in definierten Freisetzungperioden.

In den ersten drei Stunden der Desorption findet der sogenannte „initial burst“ statt. Dabei desorbieren die weniger stark gebundenen Enzymmoleküle in das umgebende Medium und zwar 50 bis 90 % aller gebundenen Enzymmoleküle (siehe Abbildung 53). Ihr Anteil an der Gesamtmenge aller gebundenen Lysozymmoleküle liegt weit über 50 %. In der zweiten

Desorptionsphase kommen weitere 20 % hinzu, während in der letzten Phase, die sich bis zu 213 h erstreckt, ein Rest von weniger als 15 % freigesetzt wird.

Das gleichmäßigste Desorptionsverhalten über den untersuchten Zeitraum weisen die an SiO_2 und $\text{Al}(\text{OH})_3$ bei einem pH-Wert von 7,8 immobilisierten Enzymmolekülen auf. Innerhalb der ersten 3 h desorbieren von Subtilisin, welches auf $\text{Ca}_5[\text{OH}(\text{PO}_4)_3]$, PS-AA oder pMA-EGDMA immobilisiert wurde, bereits 60-70 % der gesamten immobilisierten Proteinmenge. Für eine kontinuierliche Freisetzung über einen längeren Zeitraum sind diese Systeme aus diesem Grund nicht geeignet.

5.5.2 Freisetzung von in Hydrogel eingeschlossenem Enzym

Die Freisetzung von Molekülen, welche in einem Hydrogel eingeschlossen sind, wird von verschiedenen Parametern beeinflusst. Dazu zählen auf Seiten des Hydrogels das Quellverhalten, die Maschenweite und das Diffusionsverhalten der Moleküle innerhalb des Hydrogels sowie der hydrodynamische Radius auf Seiten des Moleküls²¹⁵.

In Freisetzungsversuchen mit BSA, welches vor der Polymerisation in die Ausgangslösung zugegeben wird, zeigt sich, dass mit steigendem Polymergehalt in der Polymerisationslösung die Freisetzung verzögert wird (siehe Abbildung 53 A). Dies beruht darauf, dass durch den höheren Polymergehalt ein dichteres Hydrogelnetzwerk gebildet wird.

Weiterhin zeigt sich, dass die Proteingröße bei der Freisetzung eine wichtige Rolle spielt. So wird Lysozym mit einem hydrodynamischen Radius von 2,0 nm im direkten Vergleich zu BSA mit einem hydrodynamischen Radius von 3,0 nm unabhängig des Polymergehaltes in der Polymerisationslösung schneller freigesetzt (siehe Abbildung 53 B): aus einem 10 %-igen Hydrogel wird BSA mit 45,7 $\mu\text{g}/\text{d}$ und Lysozym mit 86,8 $\mu\text{g}/\text{d}$ freigesetzt, aus einem 25 %-igen wird BSA mit 10,9 $\mu\text{g}/\text{d}$ und Lysozym mit 35,0 $\mu\text{g}/\text{d}$ freigesetzt.

Bei geeigneter Kombination des Proteins und des Polymergehaltes ist eine kontinuierliche und gleichmäßige Freisetzung, welche bis zu 200 Tage anhält, erzielbar. Die Maschenweite des Hydrogels muss an den hydrodynamischen Radius des freizusetzenden Proteins angepasst werden, um ein Ausbluten des Depotsystems zu verhindern. Dies ist über den Polymergehalt in der Polymerisationslösung steuerbar.

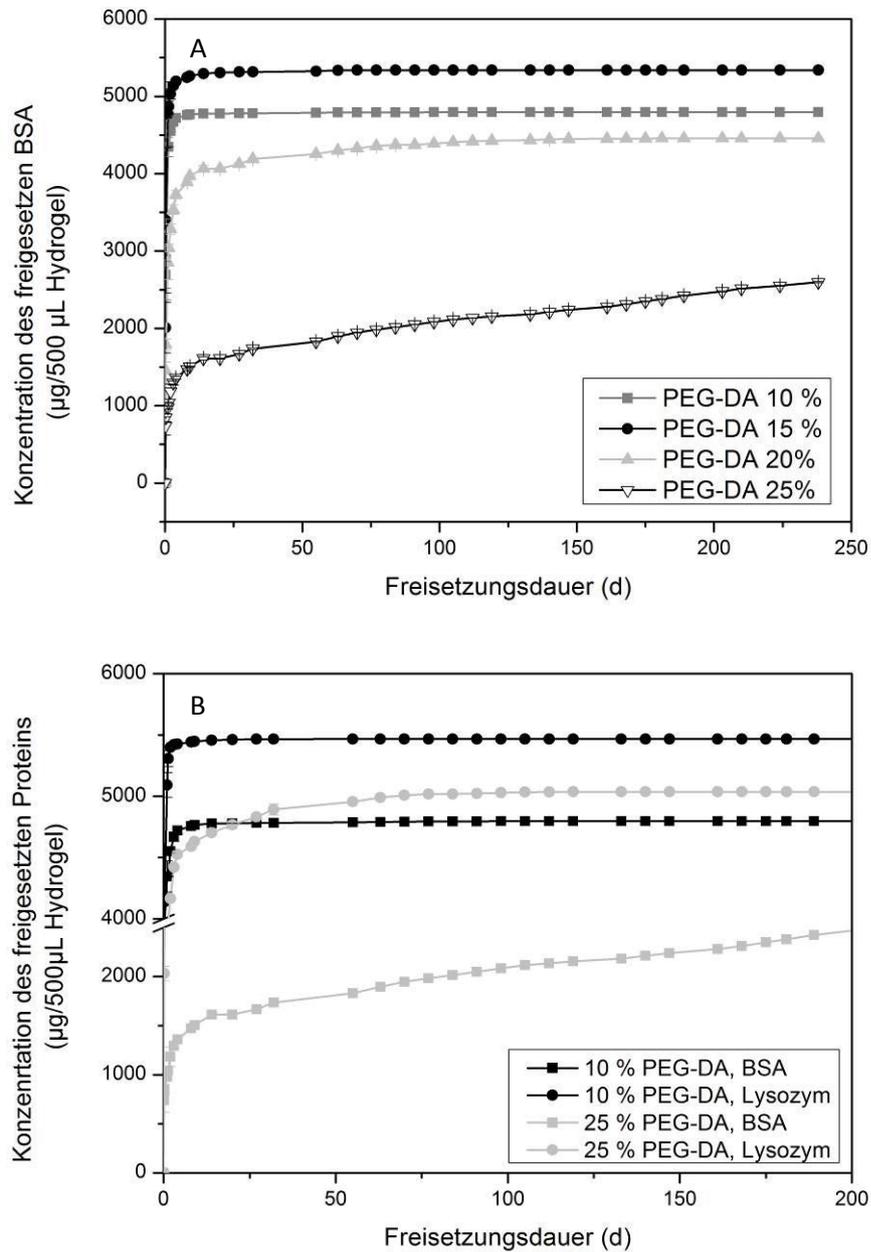


Abbildung 53: Langzeit-Freisetzungskinetik von Proteinen aus einem Hydrogel

Die Freisetzung von in einem PEG-DA-Hydrogel eingeschlossenem BSA (2 mg/ml) beziehungsweise Lysozym (2 mg/ml) erfolgte in 10 mM PBS pH 7,4 bei Raumtemperatur. Freigesetztes Protein im Überstand wurde mittels Bradford-Protein Assay bestimmt. Nach jedem Messzeitpunkt wurde der Überstand verworfen und durch frisches PBS ersetzt.

A) Das Freisetzungsverhalten von BSA in Abhängigkeit des Polymergehaltes des Hydrogels in der Polymerisationslösung ist dargestellt als die aufsummierte freigesetzte Proteinmenge; B) Vergleich von Freisetzungskinetiken bezüglich Proteingröße und Polymergehalt des Hydrogels in der Polymerisationslösung.

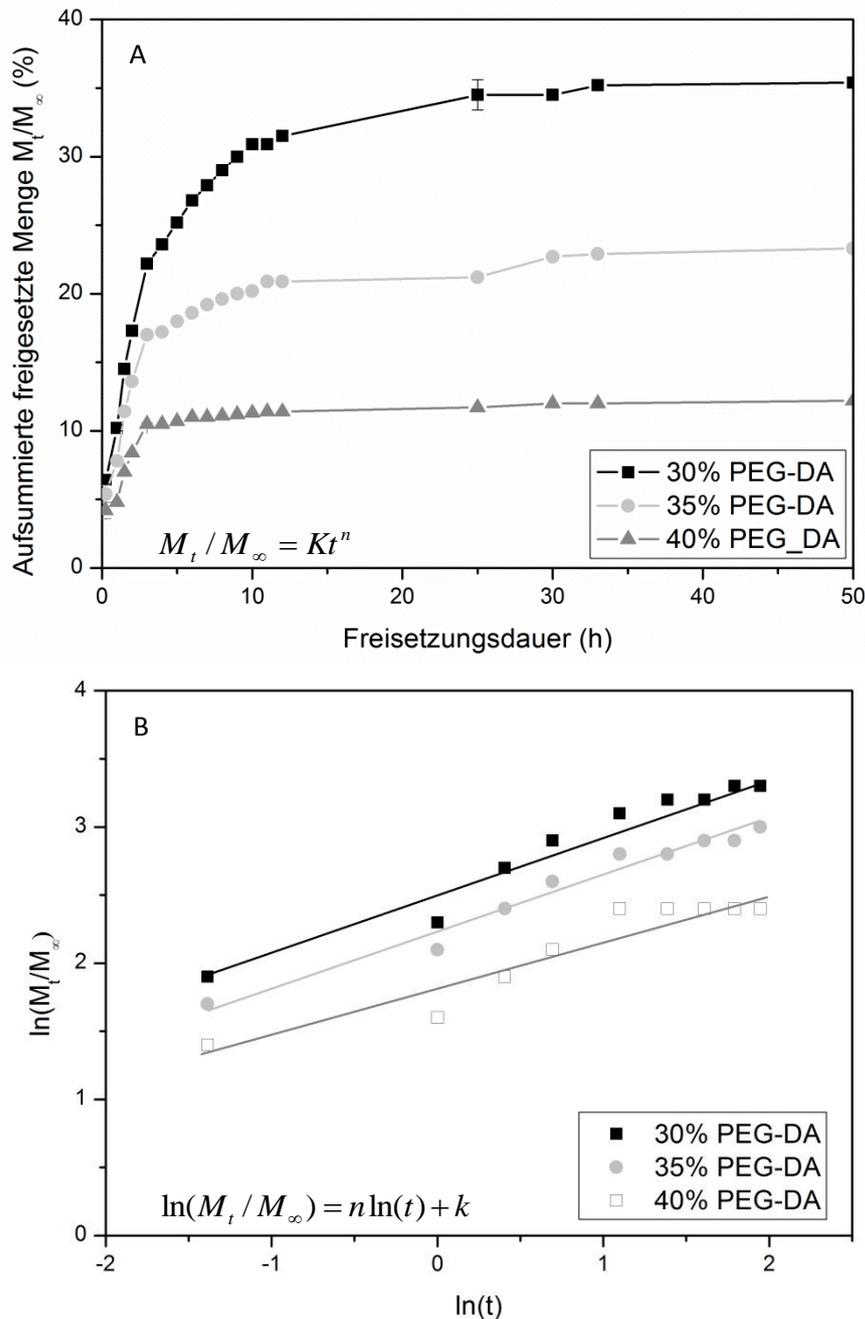


Abbildung 54: Charakteristika der Freisetzungskinetik von Lysozym aus einem Hydrogel

Die Freisetzung von Lysozym (2 mg/ml) aus einem PEG-DA Hydrogel erfolgte in 10 mM PBS pH 7,4 bei Raumtemperatur unter sterilen Bedingungen. Freigesetztes Protein im Überstand wurde mittels Bradford-Protein Assay bestimmt. Nach jedem Messpunkt wurde der Überstand verworfen und durch frisches PBS ersetzt.

A) Freisetzungskarakteristiken von Lysozym aus einem Hydrogel in Abhängigkeit des Polymergehaltes des Hydrogels in der Polymerisationslösung; B) Logarithmierte Darstellung der Freisetzung von Lysozym in Abhängigkeit des Polymergehaltes des Hydrogels in der Polymerisationslösung.

Formel 14: Beschreibung der Proteinfreisetzung aus Hydrogelen nach dem Power Law

$M_t / M_\infty = Kt^n$	M_t	Kumulative Menge des freigesetzten Proteins zum Zeitpunkt t
	M_∞	Kumulative Menge des freigesetzten Proteins im Gleichgewicht
	K	Freisetzungskonstante
	n	Freisetzungsexponent

Bei geeigneter Kombination des Proteins bezüglich des hydrodynamischen Radius und des Hydrogelpolymergehaltes sowie der daraus resultierenden Maschenweite, kann die „initial burst“ Phase stark reduziert werden. Abbildung 54 A zeigt hierzu beispielhaft die Kombination von Lysozym und Hydrogelen mit Polymergehalten von 30 %, 35 % und 40 %. Für diese sind die Freisetzungskurven durch die Power-law-Gleichung (Formel 14) anpassbar.

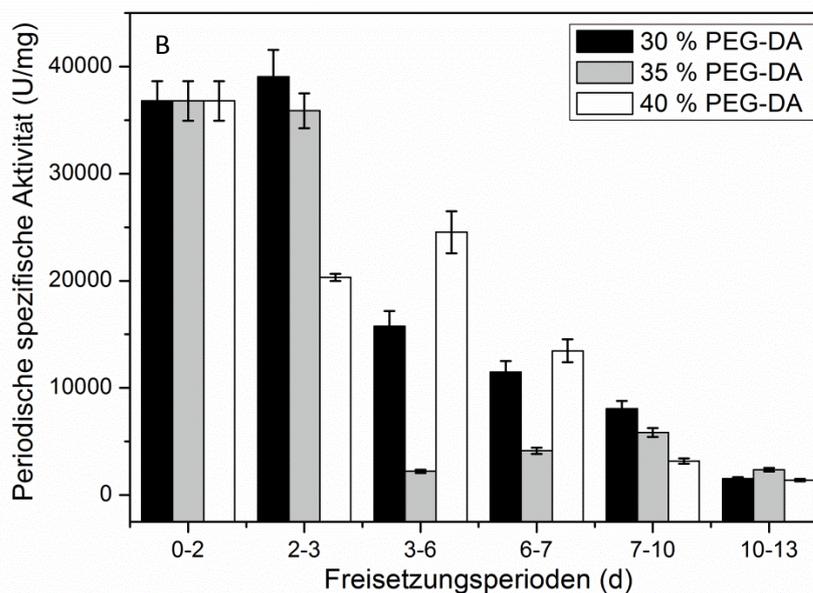
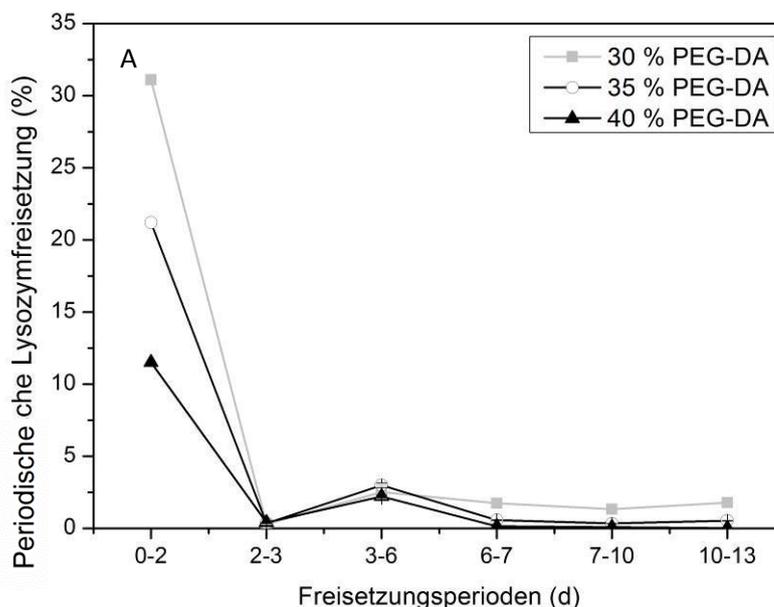


Abbildung 55: Spezifische Aktivität von aus einem Hydrogel freigesetztem Lysozym

Die Freisetzung von Lysozym (2 mg/ml) aus einem PEG-DA Hydrogel erfolgte in 10 mM PBS pH 7,4 bei Raumtemperatur unter sterilen Bedingungen. Freigesetztes Protein im Überstand wurde mittels Bradford-Protein Assay bestimmt und dessen spezifische Aktivität über die Lyse von *M. lysodeikticus* ermittelt. Nach jedem Messpunkt wurde der Überstand verworfen und durch frisches PBS ersetzt.

A) Freisetzungcharakteristik von Lysozym aus Hydrogelen mit unterschiedlichen Polymergehalten, dargestellt in definierten Freisetzungsperioden; B) Spezifische Aktivität des freigesetzten Lysozyms.

Abbildung 54 B zeigt die logarithmierte Darstellung von $\ln(M_t/M_\infty)$ über $\ln(t)$. Hieraus wurden die Freisetzungskonstante k und der Freisetzungsexponent n sowie das dazugehörige Bestimmtheitsmaß ermittelt. Tabelle 29 führt diese Werte sowie zusätzlich Werte für DNase (Freisetzungskurven hier nicht gezeigt) auf. Mit zunehmendem Polymergehalt in der Polymerisationslösung sinkt der Wert der Freisetzungskonstanten, das heißt die Freisetzungsdauer verlängert sich. Die Freisetzung der Kombination von DNase aus einem Hydrogel mit einem Polymergehalt von 20 % erfolgt mit einem Freisetzungsexponenten von $n = 0,45$ der molekularen Diffusion nach Fick. Alle hier vorgestellten Systeme sind mit einem Freisetzungskoeffizienten $n < 0,45$ in ihrer Freisetzung unabhängig von der Quellung des Hydrogels.

Tabelle 29: Parameter der Freisetzungskinetik von Proteinen aus einer polymeren Matrix

PEG-DA Anteil (%)	Protein	k	n	R ²
20	DNase	2,3	0,45	0,931
25	DNase	2,0	0,40	0,948
30	DNase	1,6	0,43	0,960
30	Lysozym	2,6	0,37	0,908
35	Lysozym	2,3	0,29	0,819
40	Lysozym	1,8	0,34	0,815

Neben der Freisetzungskinetik des Enzyms aus einem Hydrogel, ist dessen spezifische Aktivität zu verschiedenen Freisetzungszeitpunkten interessant. Hierzu wird mit Lysozym, welches aus Hydrogelen mit 30 %, 35 % und 40 % Polymergehalt in der Polymerisationslösung zu unterschiedlichen Zeitpunkten freigesetzt wird, die Lyse von *M. lysodeikticus* photometrisch untersucht. Abbildung 55 A zeigt zunächst die freigesetzte Enzymmenge in verschiedenen Freisetzungsperioden von je zwei bis drei Tagen. Abbildung 55 B stellt dazu die jeweilige spezifische Aktivität des freigesetzten Lysozyms in denselben Freisetzungsperioden dar.

In den ersten zwei bis drei Tagen wird in der „initial burst“-Phase – abhängig von dem Polymergehalt in der Polymerisationslösung – zwischen 12 % und 32 % des gesamten immobilisierten Lysozyms freigesetzt. In den darauffolgenden Freisetzungsphasen werden aus allen untersuchten Systemen weniger als 5 % des Gesamtgehaltes an Lysozym kontinuierlich und gleichmäßig freigesetzt. Mit steigendem Polymergehalt in der Ausgangslösung erhöht sich die Dichte der Hydrogele und die Maschenweiten werden enger (siehe Kapitel 5.4.3), entsprechend wird pro Freisetzungsperiode weniger Lysozym freigesetzt. Die Freisetzungsdauer hingegen verlängert sich durch die kontinuierliche und gleichmäßige Freisetzung von geringen Enzymmengen.

Lysozym, welches aus Hydrogelen mit 30 % und 35 % Polymergehalt freigesetzt wird, zeigt in den ersten drei Tagen keinen Aktivitätsverlust. Über die gesamte Freisetzungsdauer von 14 Tagen tritt ein Verlust der spezifischen Aktivität von Lysozym um 50 % auf, welches aus einem 30 %-igen Hydrogel freigesetzt wird, jeweils nach drei und sechs Tagen. Nach 14 Tagen beträgt die spezifische Aktivität lediglich ein Achtel der spezifischen Aktivität, welche zu Beginn der Freisetzung gemessen wird. Im Gegensatz hierzu ist das Lysozym, welches aus einem 40 %-igen Hydrogel freigesetzt wird, nach einer Woche noch 50 % der ursprünglichen Aktivität besitzt, nach 14 Tagen sinkt diese auf lediglich 12,5 %. Lysozym, welches aus einem Hydrogel mit einem Polymergehalt von 35 % freigesetzt wird, weist bereits nach drei Tagen nur noch 25 % seiner ursprünglichen Aktivität auf. Diese behält das freigesetzte Enzym bis zum Ende der Untersuchung bei. Das hier vorgestellte Depotsystem eines Hydrogels ist somit für Freisetzung von aktivem Enzym innerhalb von mindestens 14 Tagen geeignet.

5.6 Speziesunabhängiges Wirkspektrum der AHL-lactonasen

QS-Systeme Gram-negativer Bakterien, basierend auf dem *LuxI/luxR*-QS mit AHL als Signalmolekül, unterscheiden sich von den QS-Systemen Gram-positiver Bakterien, welche auf modifizierten Oligopeptiden basieren. AHL-lactonasen besitzen hydrolytische Aktivität gegen ein weites Spektrum an AHL. Wissenschaftler wie Dong⁹⁷ und Chen⁵⁷ gehen daher davon aus, dass AHL-lactonasen speziesunabhängig in das QS von Gram-negativen Bakterien eingreifen. In Experimenten mit extern zugegebenem löslichem Enzym wurde dies jedoch nur für *P. aeruginosa* und *Vibrio harveyi* gezeigt. Daher wird nachfolgend in Experimenten das Wirkspektrum auf verschiedene Bakterienspezies näher untersucht. Hinsichtlich einer späteren Anwendung der AHL-lactonasen in wasserführenden Anlagen, beispielsweise in Anlagen der Trinkwassergewinnung, werden zunächst coliforme Bakterien aus der Anlage 3 zu §7 der Trinkwasserverordnung (TrinkwV) 2011 betrachtet, welche als Indikator für fäkale Verunreinigungen dienen. Dies sind im einzelnen *P. mirabilis*, *E. coli* und *E. aerogenes* aus der Gattung der *Enterobacteriaceae* sowie *P. aeruginosa*. Weiter werden mit *C. violaceum*, *P. fluorescens* und *P. pseudoalcaligenes* Bakterien betrachtet, die sowohl im Boden als auch im Wasser vorkommen.

Das speziesunabhängige Wirkspektrum der AHL-lactonasen AiiB und BlcC wird jeweils an einem 16 h alten Biofilm mit einer Startzellzahl von 10^8 Zellen/ml betrachtet. Zu Beginn des Experimentes werden je 8 µg/ml AiiB oder BlcC, teilweise mit den Cofaktoren Co^{2+} und Zn^{2+} , zu planktonischen Zellen zugegeben. Sowohl die Versuchsdauer mit 16 h als auch der Einsatz von 8 µg/ml AHL-lactonasen haben sich in Vorversuchen als geeignet erwiesen. Der Biofilm wird abschließend zum einen über seine metabolische Aktivität durch den Umsatz

von XTT und zum anderen über seine Massen durch die Färbung mit Kristallviolett quantifiziert. Folgende Fragestellungen werden näher betrachtet:

- Die Wirkung von AiiB und BlcC auf Gram-negative Bakterien, deren QS-Systeme auf AHL basieren, am Beispiel von *P. aeruginosa* PAO1, *P. mirabilis* DSM 4479, *E. aerogenes* DSM 30053, *A. tumefaciens* KYC6, *P. fluorescens* DSM 50090, *P. pseudoalcaligenes* DSM 50189 und *C. violaceum* ATCC 12472,
- Die Wirkung von AiiB und BlcC auf QS Mutanten im Vergleich zu deren Wildstämmen am Beispiel von *C. violaceum* ATCC 12472 und *C. violaceum* CV026, und *E. coli* MG1655 und *E. coli* MG1655 Δ luxS sowie
- Die Wirkung auf Gram-positive Bakterien, deren QS-Systeme nicht auf AHL basieren, am Beispiel von *S. lutea* DSM 20030.

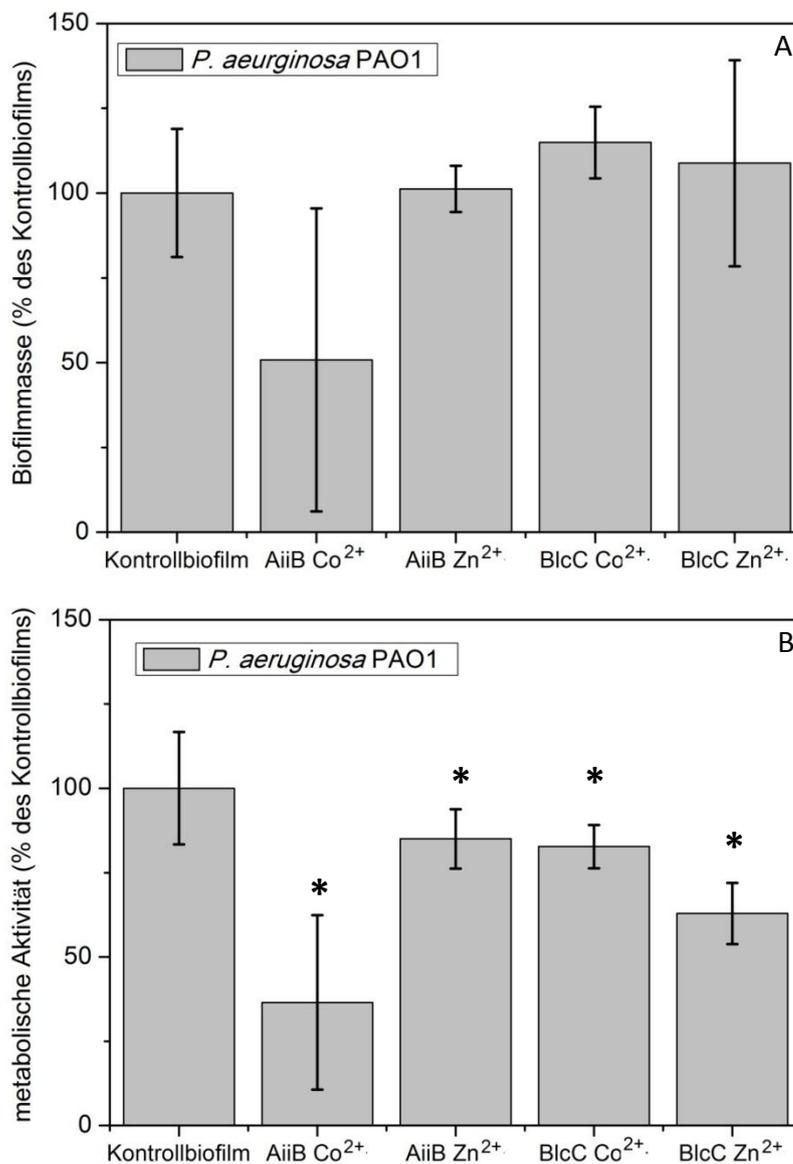


Abbildung 56: Einfluss von AiiB und BlcC auf einen *P. aeruginosa* PAO1 Biofilm

Einfluss der AHL-lactonasen AiiB und BlcC (8 µg/ml), mit je zwei unterschiedlichen Cofaktoren, Co^{2+} und Zn^{2+} , auf einen 16 h-alten Biofilm von *P. aeruginosa* PAO1 mit einer Startzellzahl von 10^8 Zellen/ml. A) Biofilmmasse quantifiziert durch Kristallviolett-färbung, B) Metabolische Aktivität quantifiziert durch den Umsatz von XTT.

Zunächst wird der Einfluss von AiiB und BlcC auf das vielfach eingesetzte Biofilmbakterium *P. aeruginosa* PAO1 betrachtet. Es wird hierfür keine Reduzierung der Biofilmmasse bei einem Einsatz von 8 µg/ml AHL-lactonase innerhalb von 16 h nachgewiesen (siehe Abbildung 56 A). Die metabolische Aktivität von Biofilmen, welche mit AiiB und BlcC inkubiert werden, reduziert sich im Vergleich zum nativen Kontrollbiofilm signifikant ($p < 0,025$): AiiB Co^{2+} auf $36,5 \pm 25,9$ %, AiiB Zn^{2+} auf $85,0 \pm 8,8$ %, BlcC Co^{2+} auf $82,7 \pm 6,4$ % und BlcC Zn^{2+} auf $62,9 \pm 9,1$ % (siehe Abbildung 56 B).

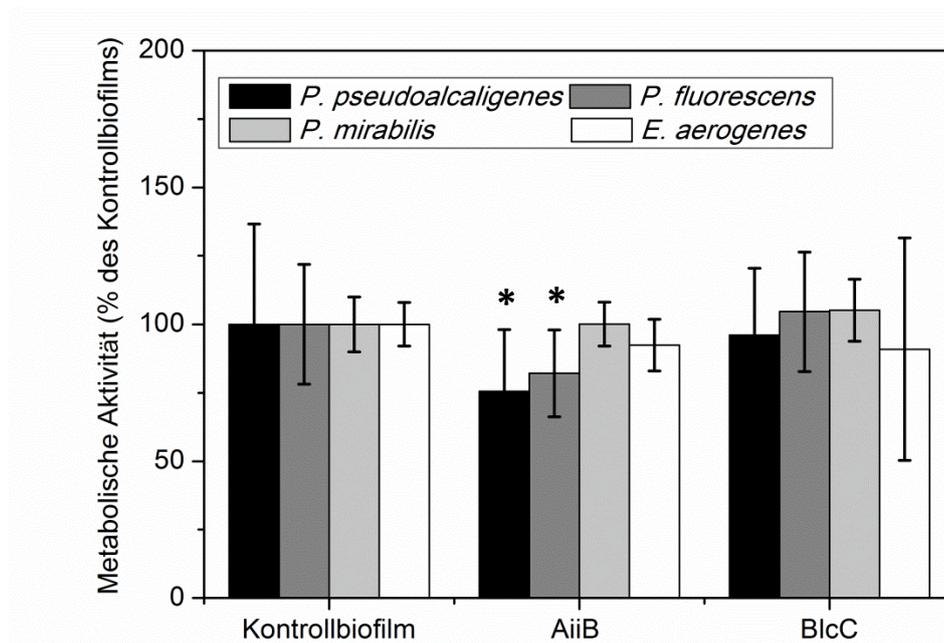


Abbildung 57: Einfluss von AiiB und BlcC auf die metabolische Aktivität Gram-negativer Bakterien

Einfluss der AHL-lactonasen AiiB Zn^{2+} und BlcC Co^{2+} (8 µg/ml) auf die metabolischen Aktivitäten von 16 h alten Biofilmen von *P. pseudoalcaligenes*, *P. fluorescens*, *P. mirabilis* und *E. aerogenes*. Die Wirkung wurde mittels Umsatz von XTT quantifiziert.

Abbildung 57 zeigt den Einfluss von AiiB Zn^{2+} und BlcC Co^{2+} auf die metabolische Aktivität Gram-negativer Biofilmbakterien am Beispiel von *P. pseudoalcaligenes* DSM 10086, *P. fluorescens* DSM 50090, *P. mirabilis* DSM 4479 und *E. aerogenes* DSM 30053. Es zeigt sich unter Verwendung von 8 µg/ml AiiB nur für *P. pseudoalcaligenes* ($82,1 \pm 15,9$ %) und *P. fluorescens* ($75,5 \pm 22,6$ %) eine signifikante Reduzierung ($p < 0,05$). BlcC bewirkt auf diese Stämme keine Biofilmreduzierung. Die Biofilmbildung von *P. mirabilis* DSM 4479 und *E. aerogenes* DSM 30053 ist weder durch 8 µg/ml AiiB noch durch 8 µg/ml BlcC beeinflussbar.

Im Weiteren wird die direkte Wirkung der AHL-lactonasen auf das *Quorum-Sensing* Gram-negativer Bakterien am Beispiel *C. violaceum* und *E. coli* gezeigt, wobei die Kommuni-

kation von *E. coli* nicht auf AHL als Signalmoleküle beruht. Hierzu wird der Einfluss der AHL-lactonasen auf den Wildstamm *C. violaceum* ATCC 12472 beziehungsweise auf *E. coli* MG1655 sowie deren QS-Mutanten *C. violaceum* CV026 beziehungsweise *E. coli* MG1655 Δ luxS betrachtet.

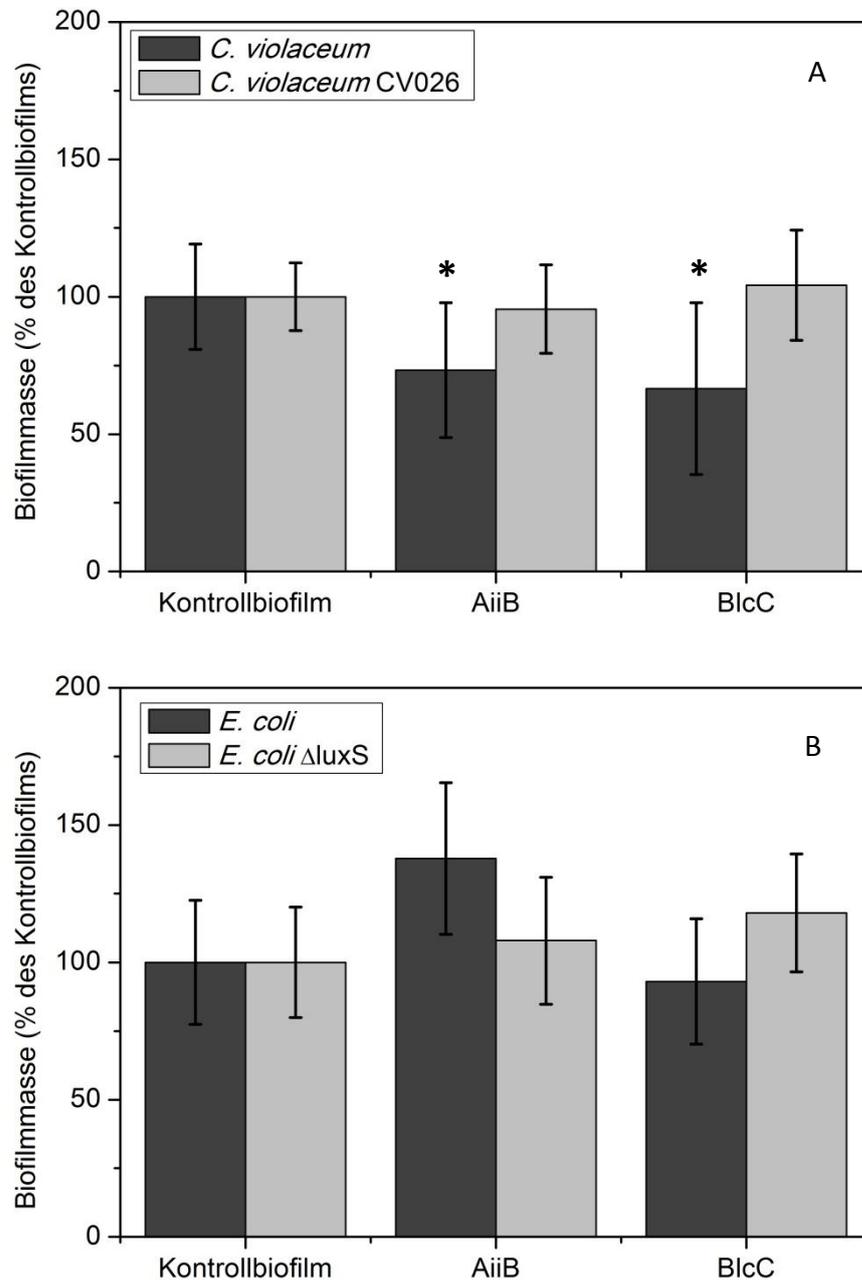


Abbildung 58: Einfluss von AiiB und BlcC auf die Biofilmmasse Gram-negativer Bakterien und deren QS-Mutanten

Einfluss der AHL-lactonasen AiiB Zn^{2+} und BlcC Co^{2+} (8 μ g/ml) auf die Biofilmmasse von 16 h alten Biofilmen von Wildstämmen und deren QS-Mutanten. Die Wirkung wurde mittels Kristallviolett färbung quantifiziert. A) Direkter Vergleich von *C. violaceum* ATCC 12472 und *C. violaceum* CV026. B) Direkter Vergleich von *E. coli* MG1655 und *E. coli* MG1655 Δ luxS.

Sowohl AiiB als auch BlcC reduzieren die Biofilmmasse eines 16 h alten *C. violaceum* Biofilms signifikant ($p < 0,05$) - AiiB auf $73,3 \pm 24,5$ % und BlcC auf $66,6 \pm 31,1$ % der

nativen Biofilmkontrolle (siehe Abbildung 58). Im Vergleich hierzu ist bei dem Biofilm der QS-Mutanten *C. violaceum* CV026, welche nicht in der Lage sind das Signalmolekül zu bilden, durch AHL-lactonase keine Reduzierung der Biofilmbildung zu beobachten.

E. coli nutzt sowohl zu seiner spezieinternen als auch zu der spezieübergreifenden Kommunikation ausschließlich Autoinducer-2-Moleküle. Es ist nicht in der Lage, mittels AHL zu kommunizieren. Entsprechend ist die Biofilmbildung des Wildstammes *E. coli* MG1655 und dessen QS-Mutanten *E. coli* MG1655 Δ luxS durch die AHL-lactonasen AiiB und BlcC nicht beeinflussbar (siehe Abbildung 58 B).

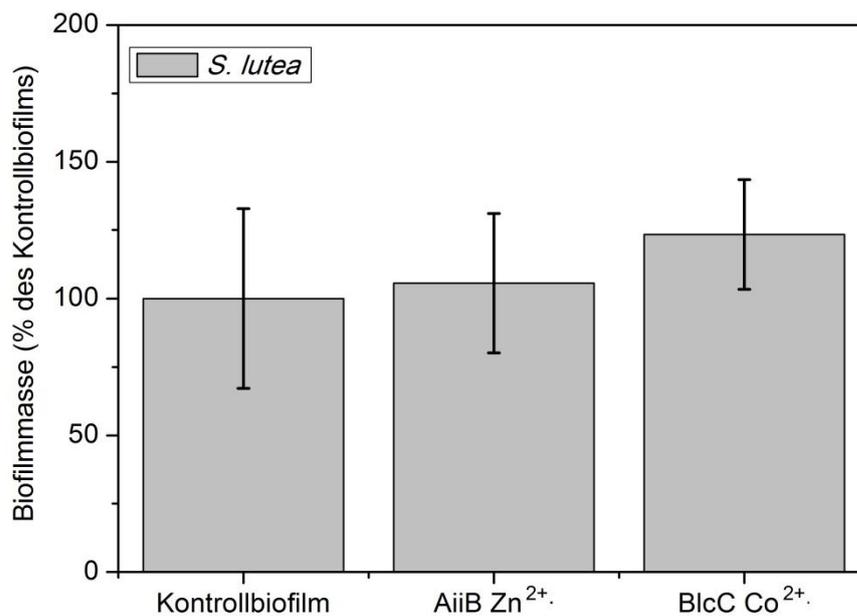


Abbildung 59: Einfluss von AiiB und BlcC auf die Biofilmmasse von *S. lutea*

Einfluss der AHL-lactonasen AiiB Zn²⁺ und BlcC Co²⁺ (8 µg/ml) auf die Biofilmmasse eines 16 h alten Biofilms des Gram-positiven Bakteriums *S. lutea* DSM 20030.

Abschließend wird die Wirkung von AiiB und BlcC auf das Biofilmwachstum des Gram-negativen Bakteriums *A. tumefaciens* KYC6 getestet. Die AHL-lactonasen werden auf jenen Organismus angewandt, aus welchem sie ursprünglich kloniert worden sind. *A. tumefaciens* nutzt AiiB und BlcC, um sich im Konkurrenzettbewerb mit anderen Gram-negativen Bakterien Vorteile zu verschaffen, in dem es das QS der artfremden Organismen stört. Entsprechend wäre eine mögliche Wirkung dieser Enzyme auf seine eigene Zell-Zell-Kommunikation widersinnig. Es zeigt sich, dass AiiB und BlcC keine biofilmreduzierende, sondern eine biofilmbegünstigende Wirkung auf *A. tumefaciens* besitzt. Die Biofilmmasse steigert sich bei Anwesenheit der beiden AHL-lactonasen im Vergleich zum nativen Kontrollbiofilm um das Dreifache: AiiB auf $291 \pm 26,5$ % und BlcC auf $271,2 \pm 14,7$ %.

Als Kontrolle wird letztlich der Einfluss der AHL-lactonasen AiiB und BlcC auf das Biofilmwachstum von Gram-positiven Bakterien, welche über modifizierte Oligopeptide als

Signalmoleküle miteinander kommunizieren, am Beispiel von *S. lutea* DSM 20030 betrachtet. Es ist hier keine Reduzierung der Biofilmbildung nachweisbar (siehe Abbildung 59).

5.7 Wirkung von AHL-lactonasen auf QS-abhängige Faktoren

Wie in Kapitel 3.1.2 bereits beschrieben, werden über das QS in Bakterien eine Vielzahl verschiedener Verhaltensweisen reguliert. Hierzu zählt neben der Biofilmbildung auch die Bildung von Virulenzfaktoren. Diese Strukturelemente und Stoffwechselprodukte bestimmen die pathogenen Eigenschaften eines Mikroorganismus. Durch AHL-lactonasen werden entsprechende Bakterien zwar nicht abgetötet, pathogene Bakterien werden jedoch potentiell ihrer krankmachenden Eigenschaften enthoben oder darin eingeschränkt. So dass für den Menschen die Ansteckungsgefahr mit Krankheiten, verursacht durch Bakterien, die in technischen wasserführenden Systemen wie beispielsweise Trinkwasseraufbereitungsanlagen zurückbleiben, herabgesetzt wird. In dieser Arbeit werden bei dem Biofilmbakterium *P. aeruginosa* PAO1 beispielhaft folgende Virulenzfaktoren betrachtet:

- Drei unterschiedliche Sekundärmetabolite: Pyoverdin²³², Pyocyanin³⁶, Pyochelin¹⁸² sowie
- Rhamnolipide¹⁸² als Beispiel für Tenside.

Der Einfluss von AHL-lactonasen auf die Bewegung in Form des Schwärmens³⁶ wird mit *P. aeruginosa* PA14 und PAO1 sowie mit *P. mirabilis* DSM 4479 analysiert. Darüber hinaus wird die Antibiotikaproduktion am Beispiel von Violacein im Gram-negativen Stamm *C. violaceum* ATCC 12472²¹⁰ betrachtet.

Die Wirkung von je 8 µg/ml AiiB oder BlcC mit den Cofaktoren Co²⁺ und Zn²⁺ auf die Bildung der oben beschriebenen Virulenzfaktoren (mit Ausnahme des Schwarmverhaltens) wird an einem 16 h alten Biofilm mit einer Startzellzahl von 10⁸ Zellen/ml betrachtet. Die AHL-lactonase wird stets zu Beginn des Experiments zu den planktonisch vorgelegten Zellen zugegeben. Die Virulenzfaktoren wird nach Ende des Experiments im zellfreien Überstand nach den in Kapitel 4.2.9 beschriebenen Methoden bestimmt. Das Schwarmverhalten von PA14 wird ebenfalls nach 16 h Inkubation ausgewertet (siehe Kapitel 4.2.9).

AiiB und BlcC reduzieren unabhängig von ihrem Cofaktor die Bildung von Pyocyanin im Vergleich zur nativen Biofilmkontrolle signifikant ($p < 0,05$): AiiB Co²⁺ auf $64,1 \pm 3,1$ %, AiiB Zn²⁺ auf $86,9 \pm 11,9$ %, BlcC Co²⁺ auf $77,0 \pm 12,7$ % und BlcC Zn²⁺ auf $70,1 \pm 2,3$ %. Im Gegensatz hierzu wird die Produktion von Pyoverdin von AiiB Co²⁺ auf $25,4 \pm 30,7$ % und BlcC Co²⁺ auf $62,2 \pm 41,3$ % signifikant minimiert. Die Expression von Pyochelin wird von AiiB unabhängig vom Cofaktor sowie von BlcC mit Co²⁺ als Cofaktor signifikant

herabgesetzt: AiiB Co²⁺ auf 82,3 ± 12,1 %, AiiB Zn²⁺ auf 91,5 ± 2,5 % und BlcC Co²⁺ auf 89,5 ± 7,4 %. Abbildung 60 stellt diese Ergebnisse zusammenfassend dar.

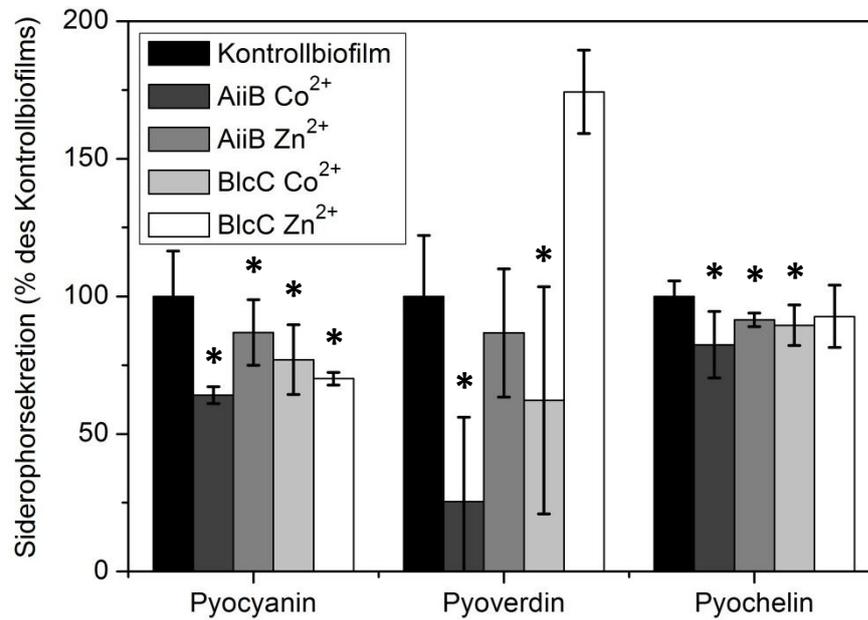


Abbildung 60: Einfluss von AiiB und BlcC auf die Produktion von Siderophore

Einfluss der AHL-lactonasen AiiB Co²⁺, AiiB Zn²⁺, BlcC Co²⁺ und BlcC Zn²⁺ (8 µg/ml) auf die Bildung der Sekundärmetabolite Pyocyanin, Pyoverdine und Pyochelin eines 16 h alten Biofilms von *P. aeruginosa* PAO1.

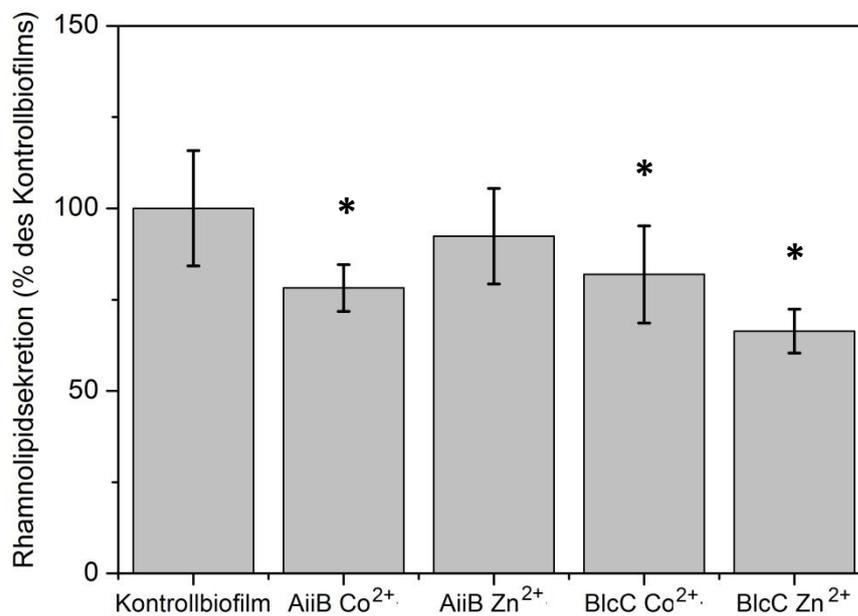


Abbildung 61: Einfluss von AiiB und BlcC auf die Bildung von Rhamnolipiden

Einfluss der AHL-lactonasen AiiB Co²⁺, AiiB Zn²⁺, BlcC Co²⁺ und BlcC Zn²⁺ (8 µg/ml) auf die Produktion von Rhamnolipiden eines 16 h alten Biofilms von *P. aeruginosa* PAO1.

Abbildung 61 stellt die Rhamnolipidproduktion in Anwesenheit von AiiB Co²⁺, AiiB Zn²⁺, BlcC Co²⁺ und BlcC Zn²⁺ im Vergleich zur nativen Biofilmkontrolle dar. Durch 8 µg/ml AiiB Co²⁺ wird die Bildung von Rhamnolipiden auf $78,2 \pm 6,4$ %, durch BlcC Co²⁺ auf $81,9 \pm 13,3$ % und durch BlcC Zn²⁺ auf $66,4 \pm 6,0$ % signifikant minimiert. Für AiiB Zn²⁺ ist eine signifikante Reduzierung nachweisbar.

Abbildung 63 zeigt fotografische Aufnahmen des unbeeinflussten Schwimm- und Schwarmverhaltens von *P. aeruginosa* und *P. mirabilis* sowie das Verhalten unter Zugabe von je 2,5 µg/ml AiiB oder BlcC. Das Schwarmverhalten von *P. aeruginosa* PA14 wird, ebenso wie die Produktion der Rhamnolipide, durch das *rhl*-QS-System gesteuert. Entsprechend beeinflussen AiiB und BlcC das Schwarmverhalten und reduzieren den Schwarmdurchmesser um 25-30 %. Es zeigte sich für *P. aeruginosa* PAO1 ein verändertes Schwimmverhalten durch AiiB und BlcC. Es bilden sich eher kleine Einzelkolonien und der Schwimmdurchmesser war kleiner und nicht symmetrisch ausgebildet.

Das Schwarm- und das Schwimmverhalten von *P. mirabilis* DSM 4479 werden durch die Zugabe von AiiB und BlcC stark verändert. Auf den Schwarmplatten bildet sich im Gegensatz zur Kontrolle kein homogener Rasen aus, sondern es entstehen viele vereinzelt Kolonien. Dies ist auch für das Schwimmverhalten zu beobachten. Bei Zugabe von AiiB und BlcC bildet sich zwar analog zur Kontrolle ein homogener Rasen, dieser besitzt jedoch einen geringeren Durchmesser.

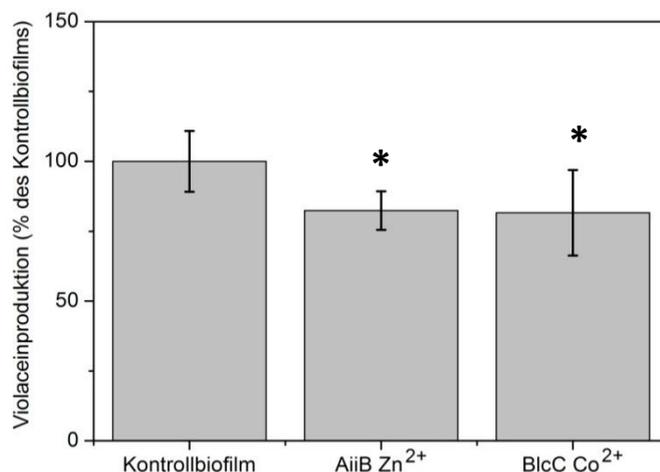


Abbildung 62: Einfluss von AiiB und BlcC auf die Violaceinbildung

Dargestellt ist der Einfluss der AHL-lactonasen AiiB Zn²⁺ und BlcC Co²⁺ (8 µg/ml) auf die Produktion von Violacein eines 16 Stunden alten Biofilms von *C. violaceum* ATCC 12472.

Abbildung 62 zeigt die verminderte Violaceinproduktionsfähigkeit von *C. violaceum* ATCC 12472 aufgrund der Zugabe von 8 µg/ml AiiB und BlcC im Vergleich zur nativen Biofilmkontrolle. AiiB reduziert die Violaceinbildung auf $82,4 \pm 6,9$ %, BlcC auf $81,6 \pm 15,3$ %.

5.8 Wirkung immobilisierter AHL-lactonasen auf die Biofilmbildung

Weiter werden die AHL-lactonasen AiiB und BlcC, ferner MBP-AiiA, MBP-AiiB und MBP-BlcC, mittels der untersuchten Methoden der Physisorption, der Chemisorption und des Einschlusses in ein Hydrogel immobilisiert und deren Einfluss auf die Bildung von Biofilm und Virulenzfaktoren am Beispiel von *P. aeruginosa* PAO1 betrachtet. Zur Immobilisierung werden die bisherigen Erkenntnisse aus der Charakterisierung und der Betrachtung der proteinschonenden Immobilisierungsmethoden angewandt (siehe Kapitel 5.4).

5.8.1 Adsorptive Immobilisierung

Zur adsorptiven Immobilisierung der AHL-lactonasen werden zwei unterschiedliche Strategien verfolgt: Zum einen werden aufgereinigtes AiiB und BlcC auf partikulären Adsorptionsträgermaterialien immobilisiert, zum anderen werden die Fusionsproteine MBP-AiiA, MBP-AiiB und MBP-BlcC aus dem rohen Zellysate über affinitätsspezifische Bindungen an Maltose, welche über GOP an Glasmaterial gekoppelt wurde, immobilisiert.

In Kapitel 5.4.1 werden sechs unterschiedliche partikuläre Materialien, KSG, Al(OH)₃, Ca₅[OH|(PO₄)₃], SiO₂, pMA-EGDMA und PS-AA, hinsichtlich ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften und ihrer Eignung als Adsorptionsträgermaterial mit Hilfe von Modellenzymen charakterisiert. Die Adsorption der aufgereinigten AHL-lactonasen erfolgt aufgrund dieser Ergebnisse bei einem pH-Wert von 4,0 < pI. Hierzu werden je 20 mg/ml der Adsorptionsträgermaterialien in 400 µL Citratpuffer pH 4,0 mit 100 µg/ml AiiB beziehungsweise BlcC für 24 Stunden bei einer Temperatur von 4 °C inkubiert.

Tabelle 30: Immobilisiertes AiiB und BlcC auf verschiedenen Adsorptionsträger

Material	Immobilisierte Menge AiiB (µg/mg Material)	Immobilisierte Menge BlcC (µg/mg Material)
KSG	1,57 ± 0,02	1,50 ± 0,02
Al(OH) ₃	1,57 ± 0,01	1,51 ± 0,00
Ca ₅ [OH (PO ₄) ₃]	1,57 ± 0,00	1,48 ± 0,02
SiO ₂	1,57 ± 0,00	1,17 ± 0,05
pMA-EGDMA	1,57 ± 0,03	1,51 ± 0,00
PS-AA	0,78 ± 0,02	1,05 ± 0,03

Der jeweilige immobilisierte Anteil der AHL-lactonasen wird mit dem Bradford-Protein Assay aus der Differenz der aufgegebenen und der nicht gebundenen Proteinmenge bestimmt. Tabelle 30 listet diese Ergebnisse der Adsorption im Überblick auf. AiiB adsorbierte, mit

Ausnahme von PS-AA mit $0,78 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{mg}$, auf den Adsorptionsträgermaterialien mit $1,57 \mu\text{g}/\text{mg}$ Material. Dies entspricht der gesamten in Lösung angebotenen Menge AiiB. BlcC hingegen adsorbiert bevorzugt in folgender Reihe: KSG ($1,50 \mu\text{g}/\text{mg}$) \approx $\text{Al}(\text{OH})_3$ ($1,51 \mu\text{g}/\text{mg}$) = pMA-EGDMA ($1,51 \mu\text{g}/\text{mg}$) > $\text{Ca}_5[\text{OH}(\text{PO}_4)_3]$ ($1,48 \mu\text{g}/\text{mg}$) > SiO_2 ($1,17 \mu\text{g}/\text{mg}$) > PS-AA ($1,05 \mu\text{g}/\text{mg}$). Von diesen Systemen werden jeweils 2,5 mg in eine Kavität einer 96-Multiwellplatte gegeben, um deren Einfluss auf die Biofilmmasse über die Färbung mit Kristallviolett und die metabolische Aktivität des Biofilms über den Umsatz von XTT sowie die Bildung des Virulenzfaktors Pyocyanin von *P. aeruginosa* PAO1 nach einem Zeitraum von 16 Stunden zu untersuchen.

Abbildung 64 A zeigt die jeweilige metabolische Aktivität der untersuchten Materialien in Relation zu einem nativen, unbehandelten Biofilm von *P. aeruginosa* PAO1, welcher als $100 \pm 11 \%$ gesetzt wurde. Das unbehandelte Material der KSG reduziert die metabolische Aktivität auf $54 \pm 9 \%$ signifikant ($p < 0,05$), wohingegen die anderen Adsorptionsträgermaterialien einen Zuwachs der Biofilmbildung bis zu $224 \pm 12 \%$ für beispielsweise PS-AA bewirken. Dies bedeutet, dass SiO_2 , $\text{Al}(\text{OH})_3$, $\text{Ca}_5[\text{OH}(\text{PO}_4)_3]$, PS-AA und pMA-EGDMA ohne Wirkstoffe biofilm-begünstigende Eigenschaften besitzen. Für AiiB und BlcC, welches auf $\text{Ca}_5[\text{OH}(\text{PO}_4)_3]$, pMA-EGDMA oder auf PS-AA adsorptiv immobilisiert ist, sind keine Biofilm-reduzierenden Eigenschaften nachweisbar – im Gegenteil, die metabolische Aktivität erhöht sich im Vergleich zum Kontrollbiofilm. AiiB, welches auf KSG- beziehungsweise SiO_2 -Partikel immobilisiert ist, reduziert signifikant ($p < 0,05$) die metabolische Aktivität des *P. aeruginosa* PAO1 Biofilms auf $70 \pm 29 \%$ beziehungsweise $75 \pm 26 \%$. BlcC, immobilisiert auf KSG, reduziert ebenfalls die metabolische Aktivität auf $82 \pm 12 \%$. Für AiiB auf $\text{Al}(\text{OH})_3$ ist die metabolische Aktivität mit $91 \pm 13 \%$ ebenfalls reduziert. BlcC, adsorptiv gebunden an $\text{Al}(\text{OH})_3$, $\text{Ca}_5[\text{OH}(\text{PO}_4)_3]$, SiO_2 , pMA-EGDMA und PS-AA, begünstigen die Biofilmbildung.

Da es sich bei den Adsorptionsträgermaterialien um partikuläre Systeme handelt, ist die Bestimmung der metabolischen Aktivität stark fehlerbehaftet. Durch die Abnahme des Biofilmüberstandes werden unbeabsichtigt Partikel, auf denen der Biofilm gewachsen ist, entfernt. Zuverlässiger wird die Biofilmmasse, welche mit Kristallviolett gefärbt ist, am Calgary Biofilm Device⁵⁵ quantifiziert (siehe Abbildung 64 B). Es zeigt sich, dass die unbehandelten Adsorptionsträgermaterialien KSG, $\text{Al}(\text{OH})_3$, $\text{Ca}_5[\text{OH}(\text{PO}_4)_3]$ und pMA-EGDMA die Biofilmmasse im Vergleich zur Biofilmkontrolle signifikant reduzieren. AiiB, welches auf $\text{Ca}_5[\text{OH}(\text{PO}_4)_3]$, pMA-EGDMA und PS-AA adsorptiv gebunden ist, besitzt keine biofilmreduzierenden Eigenschaften, wohingegen sich durch AiiB an KSG auf $37 \pm 19 \%$, durch AiiB an $\text{Al}(\text{OH})_3$ auf $41 \pm 47 \%$ und durch AiiB an SiO_2 auf $82 \pm 10 \%$ die Biofilmmasse signifikant ($p < 0,05$) verringert. Adsorptiv gebundenes BlcC bewirkt, bis auf

die Immobilisierung an PS-AA, eine signifikante Reduzierung der Biofilmmasse auf bis zu 31 ± 20 % für $\text{Al}(\text{OH})_3$.

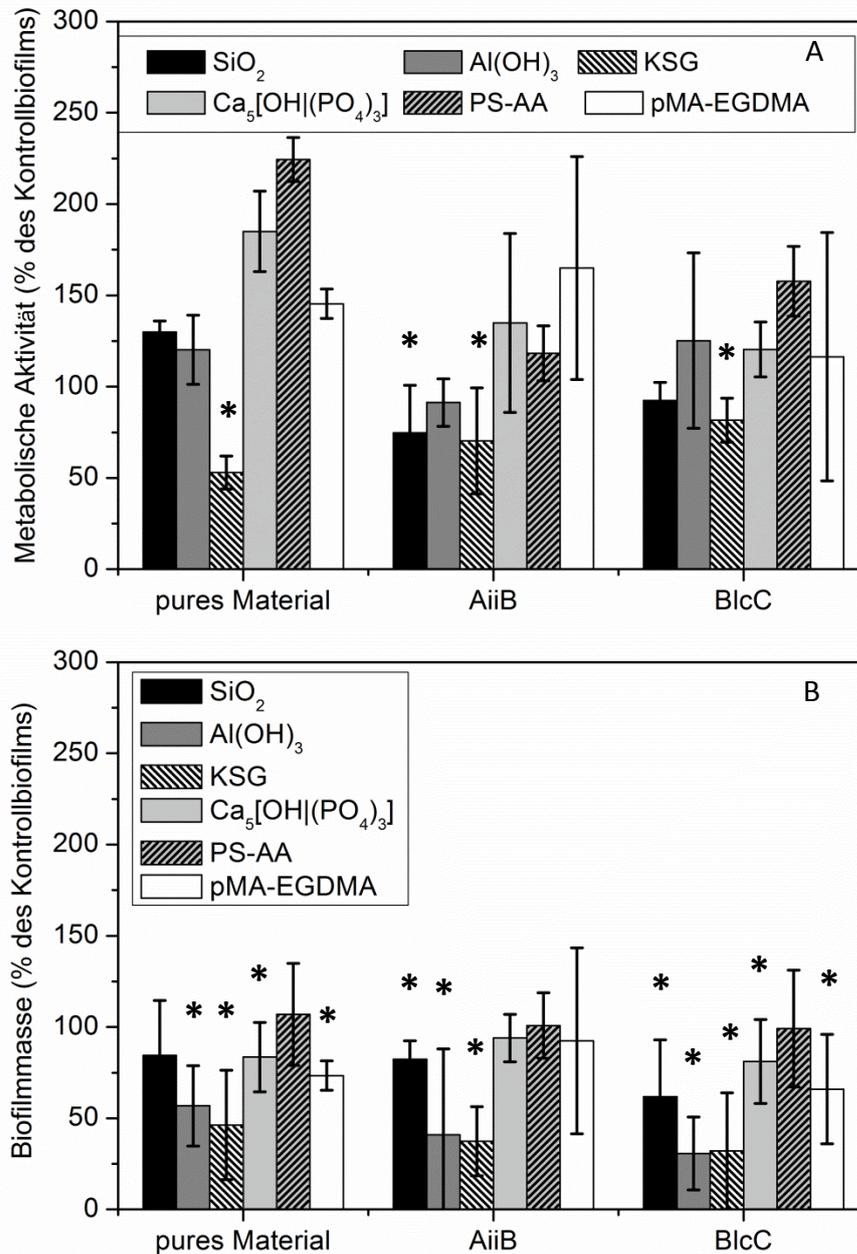


Abbildung 64: Biofilmreduzierung von adsorptiv immobilisiertem AiiB und BlcC

Wirkung von an ausgewählten partikulären Systemen, SiO_2 , $\text{Al}(\text{OH})_3$, KSG, $\text{Ca}_5[\text{OH}](\text{PO}_4)_3$, PS-AA und pMA-EGDMA auf die Biofilmbildung von *P. aeruginosa*: Reines Material und Material, auf welchem AiiB beziehungsweise BlcC mit 1,0 bis 1,6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Material adsorptiv immobilisiert wurde.

A) Metabolische Aktivität über den Umsatz von XTT bestimmt; B) Biofilmmasse durch die Färbung mit Kristallviolett quantifiziert.

Neben der Wirkung von AiiB und BlcC, immobilisiert auf unterschiedlichen partikulären Systemen, auf die Biofilmbildung, wird die Wirkung dieser Systeme auf die Bildung des Virulenzfaktors Pyocyanin von *P. aeruginosa* PAO1 innerhalb von 48 Stunden untersucht (Abbildung 65). Unbehandeltes $\text{Ca}_5[\text{OH}(\text{PO}_4)_3]$, SiO_2 und pMA-EGDMA reduzieren die Pyocyaninproduktion signifikant ($p < 0,05$) um 30 %. Die Pyocyaninproduktion wird durch AiiB und BlcC, welches an Adsorptionsträgermaterialien immobilisiert ist, gehemmt. Die Materialauswahl der Partikel besitzt hier im Vergleich zu den AHL-lactonasen AiiB und BlcC den größeren Einfluss auf die Pyocyaninproduktion.

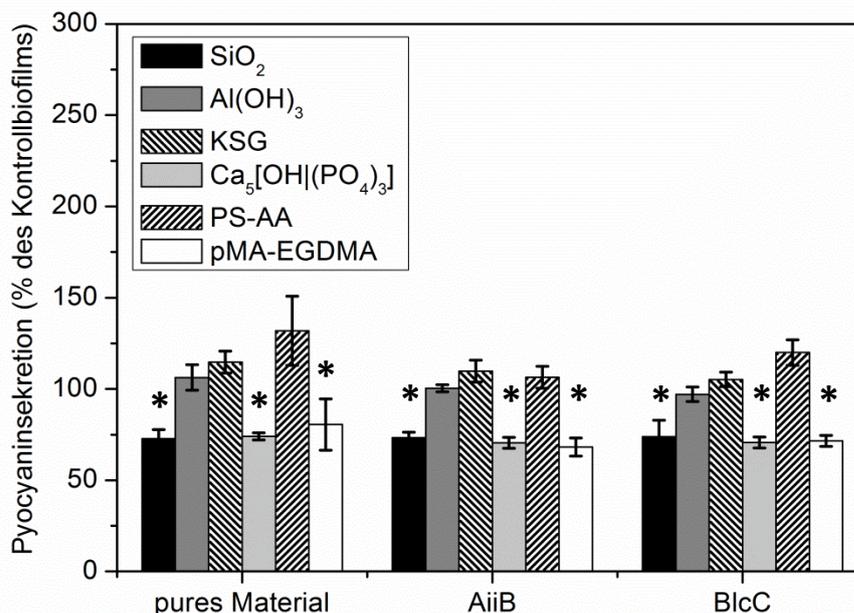


Abbildung 65: Pyocyaninreduzierung durch adsorptiv immobilisiertes AiiB und BlcC

Wirkung von AiiB und BlcC, welche auf unterschiedlichen anorganischen und polymeren Partikeln immobilisiert wurden, auf die Produktion des Virulenzfaktors Pyocyanin in *P. aeruginosa* PAO1.

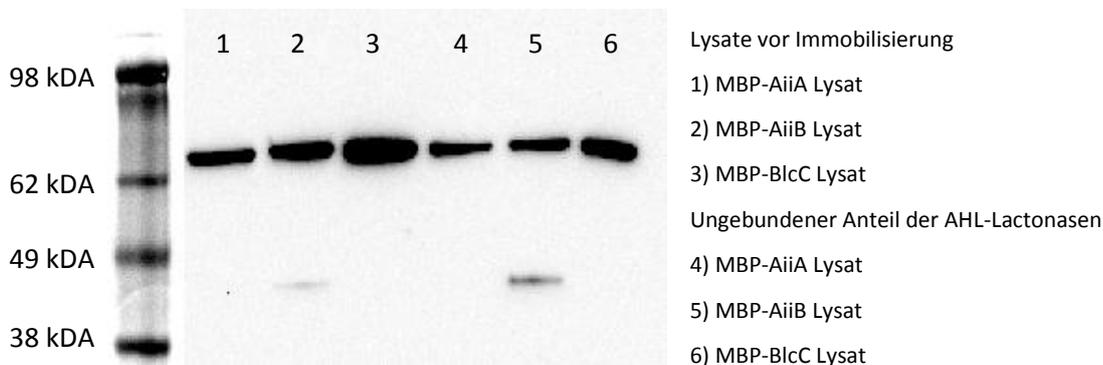
Die Immobilisierung der MBP-Fusionsproteine an Flachs substraten mit gekoppelter Maltose besitzt den Vorteil, dass Lactonasen direkt aus dem rohen Zellysate immobilisiert werden können – eine aufwendige Aufreinigung ist in diesem Fall nicht erforderlich. Die Flachs substrate bestehen aus mit Maltose ausgerüsteten Objektträgern, welche zunächst mit GOP silanisiert sind. Die einzelnen Präparationsschritte der Hydroxylierung, der Silanisierung mit GOP, der Ankopplung von Maltose und der abschließenden affinitätsspezifischen Bindung des MPB-Tags des Fusionsproteins an Maltose werden über die Schichtdicke und die Vorrück-Kontaktwinkel mit MilliQ sowie über die immobilisierte Menge an AHL-lactonasen verfolgt (siehe Tabelle 31). Letztere wird mit dem Bradford-Assay aus der Differenz der bereit gestellten und der nicht immobilisierten Proteinmenge ermittelt.

Tabelle 31: Präparation der Immobilisierung von Fusionsproteinen an Flachs substraten

Präparationsschritt	Schichtdicke (nm)	Vorrück-Kontaktwinkel (°)	Immobilisierte Menge Enzym ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
SiO ₂ /SiOH	2,3 ± 0,1	spreitet	n.d.
GOP	1,9 ± 0,5	47,2 ± 1,7	n.d.
Maltose	1,2 ± 0,0	spreitet	n.d.
AiiA	2,2 ± 1,5	84,9 ± 5,2	720 ± 7
AiiB	2,1 ± 0,6	91,4 ± 8,1	1152 ± 11
BlcC	1,9 ± 0,5	84,4 ± 6,3	648 ± 7

Durch die einzelnen Präparationsschritte erhöht sich die Schichtdicke um jeweils 2 nm. Der Vorrück-Kontaktwinkel von $47,2 \pm 1,2^\circ$ reduziert sich durch die Maltose-Ankopplung, so dass er spreitet. Durch Bindung der AHL-lactonasen erhöht er sich auf $84,9 \pm 5,2^\circ$ für AiiA, $91,4 \pm 8,1^\circ$ für AiiB und $84,4 \pm 6,3^\circ$ für BlcC.

Die Kopplung der Fusionsproteine wird zusätzlich mittels Western Blot Analyse der Lysate vor der Immobilisierung im Vergleich zu nicht gebundenen AHL-lactonasen nach der Immobilisierung überprüft. Abbildung 66 zeigt, bei gleicher Aufgabemenge, dass nach der Immobilisierung die Konzentration AHL-lactonasen im Überstand erniedrigt ist. Es werden 30 % AiiA, 42 % AiiB und 41 % BlcC der jeweils aufgegeben Proteinmenge gebunden. Hierdurch ist eine Oberflächenbelegung mit $720 \pm 7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ für AiiA, für AiiB mit $1152 \pm 11 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und $648 \pm 7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ für BlcC erzielbar.

**Abbildung 66: Western Blot: AiiB- und BlcC-Ausrüstung von Flachs substraten**

1) MBP-AiiA im Lysat vor der Immobilisierung; 2) MBP-AiiB im Lysat vor der Immobilisierung; 3) MBP-BlcC im Lysat vor der Immobilisierung; 4) Ungebundenes MBP-AiiA nach der Immobilisierung; 5) Ungebundenes MBP-AiiB nach der Immobilisierung; 6) Ungebundenes MBP-BlcC nach der Immobilisierung.

Die Aktivitäten der adsorptiv gebundenen AHL-lactonasen AiiB und BlcC werden beispielhaft mit *A. tumefaciens* NTL4 (pCF218)(pCF372) und dem Substrat 3-oxo-HSL durch den Umsatz von X-Gal nachgewiesen. Durch AiiB und BlcC reduziert sich die AHL-Konzentration im Vergleich zu Standardkonzentrationen signifikant ($p < 0,05$) (siehe Abbildung

67). Weiterhin zeigt sich die biofilmvermeidende Wirkung der AHL-lactonasen: Im Vergleich zu den Standardkonzentrationen an 3-oxo-HSL entstand bei Anwesenheit von AiiB und BlcC kein Biofilm, vielmehr bleiben die Bakterien einzeln verteilt, was zu einer homogenen Blaufärbung des Überstandes führt.

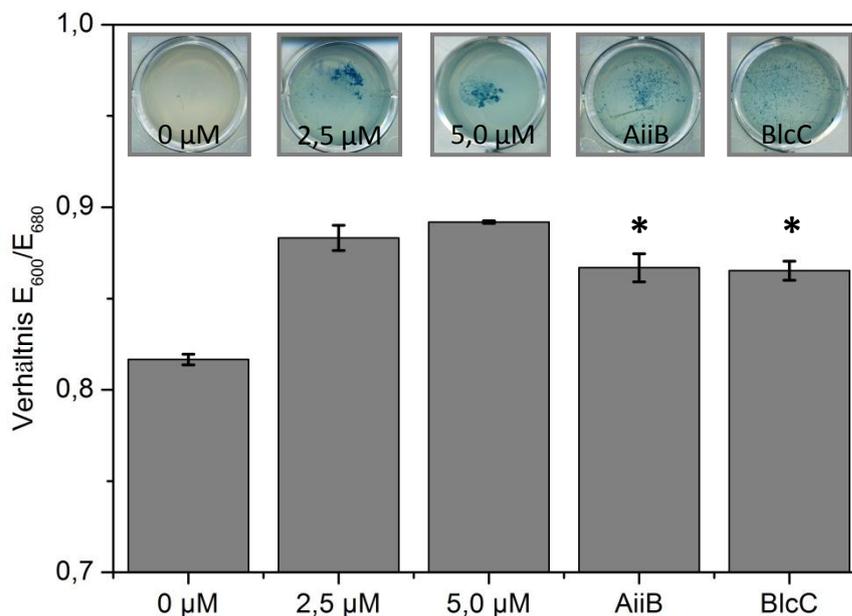


Abbildung 67: X-Gal Assay von mit AiiB und BlcC ausgerüsteten Flachs substraten

Bestimmung der Aktivität von AiiB und BlcC, welche an Flachs substraten immobilisiert wurden, mit Hilfe des Reporterstammes *A. tumefaciens* NTL4 (pCF218)(pCF372)

Weiter wird die Wirkung von AiiA, AiiB und BlcC, welche auf Flachs substraten adsorbiert ist, auf die Biofilmbildung von *P. aeruginosa* PAO1 untersucht. Die Biofilmmasse wird durch die Kristallviolett färbung des Biofilmes am Calgary Biofilm Devices⁵⁵ quantifiziert, die metabolische Aktivität wird über den Umsatz von FDA innerhalb von 30 Minuten bei 30 °C bestimmt. Abbildung 68 A zeigt die Quantifizierung des Biofilmes durch dessen Masse und metabolische Aktivität. Durch AiiA und AiiB vermindert sich die metabolische Aktivität des Biofilmes auf $22,0 \pm 13,5 \%$ beziehungsweise $24,1 \pm 17,2 \%$ stark.

Abbildung 68 B zeigt die Pyocyaninproduktion relativ zur Produktion des Kontrollbiofilmes. Durch AiiB auf $78,3 \pm 23,0 \%$ und BlcC auf $90,5 \pm 11,0 \%$ ist eine Hemmung der Produktion ermittelbar.

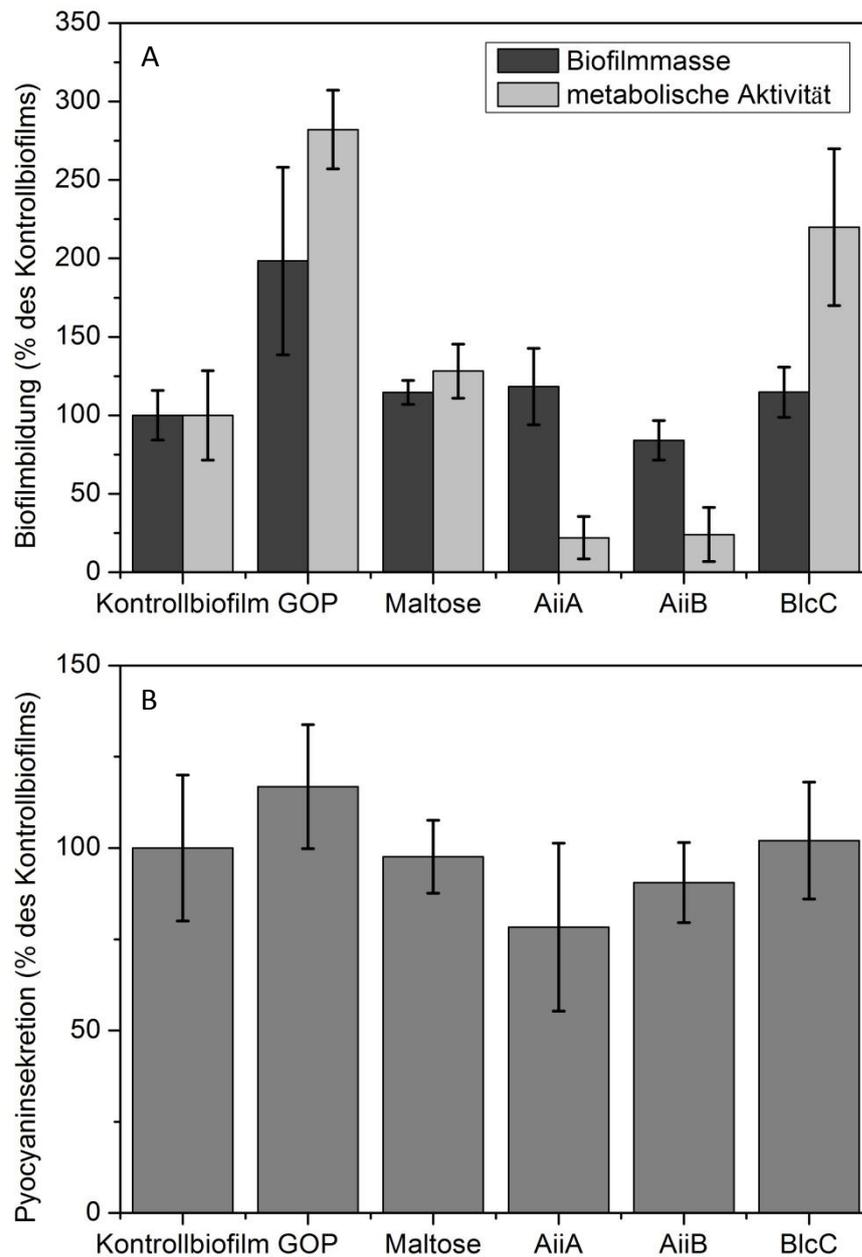


Abbildung 68: Biofilmreduzierung durch mit AiiA, AiiB und BlcC ausgerüstete Flachssubstrate

Untersucht wurden die Wirkung der GOP-Silanschicht, der Maltose sowie AiiA, AiiB und BlcC beispielhaft auf die Biofilmbildung und die Pyocyaninproduktion von *P. aeruginosa* PAO1.

A) Biofilmmasse quantifiziert durch die Kristallviolett-färbung des Calgary Biofilm Devices⁵⁵ und metabolische Aktivität durch den Umsatz von FDA; B) Pyocyaninproduktion.

5.8.2 Chemisorptive Immobilisierung

Die chemisorptive Immobilisierung der AHL-lactonasen erfolgt mit den Kopplungsreagenzien EDC und sulfo-NHS. AiiB und BlcC sind über ihren N-Terminus an carboxy-funktionalisierten Oberflächen und über ihren C-Terminus an aminofunktionalisierten Oberflächen kovalent immobilisiert (siehe Kapitel 4.2.11). Die Kontrolle der kovalenten Anbindung erfolgt über die Schichtdickenbestimmung mit Ellipsometrie und über die Vorrück-Kontaktwinkel mit MilliQ.

Tabelle 32: Präparation der kovalenten Immobilisierung von AiiB und BlcC

Präparationsschritt	Schichtdicke (nm)	Vorrück-Kontaktwinkel (°)
SiO ₂ /SiOH	2,3 ± 0,1	spreitet
3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES)	1,2 ± 0,2	73,1 ± 2,3
2-(Carboxymethylthio)ethyltrimethylsilan (CTEMS)	2,1 ± 0,7	72,9 ± 1,1
AiiB gekoppelt an APTES mit EDC und sulfo-NHS	2,5 ± 1,7	61,7 ± 1,8
BlcC gekoppelt an APTES mit EDC und sulfo-NHS	1,6 ± 1,1	44,2 ± 5,5
AiiB gekoppelt an CTEMS mit EDC und sulfo-NHS	n. b.	26,0 ± 3,4
BlcC gekoppelt an CTEMS mit EDC und sulfo-NHS	n. b.	53,0 ± 7,1

Die Kopplung des C-Terminus der AHL-lactonasen an aminofunktionalisierte Oberflächen geht mit einem Schichtdickenzuwachs für AiiB von $2,5 \pm 1,7$ nm und für BlcC von $1,6 \pm 1,1$ nm einher. Für die Kopplung des N-Terminus der Enzyme an carboxy-funktionalisierte Oberflächen ist kein Schichtdickenzuwachs mit Ellipsometrie nachweisbar (siehe Tabelle 32). Der Vorrückkontaktwinkel mit MilliQ verringert sich bei allen untersuchten Immobilisierungen: Für AiiB, gekoppelt über den C-Terminus, reduziert er sich von $73,1 \pm 2,3^\circ$ für APTES auf $61,7 \pm 1,8^\circ$ und für BlcC auf $44,2 \pm 5,5^\circ$. Für die Kopplung über den N-Terminus reduziert sich der Kontaktwinkel bei AiiB von $72,9 \pm 1,1^\circ$ für CTEMS auf $26,0 \pm 3,4$ und für BlcC auf $53,0 \pm 7,1^\circ$ (siehe Tabelle 32). Eine Bestimmung der immobilisierten Proteinmenge mit dem Bradford-Protein Assay ist nicht möglich, da EDC ebenfalls mit dem Bradford-Reagenz reagiert und die Ergebnisse falsch positiv ausfallen würden.

Abbildung 69 A zeigt den Einfluss von kovalent immobilisiertem AiiB und BlcC auf die Biofilmmasse von *P. aeruginosa* PAO1, quantifiziert am Calgary Biofilm Device⁵⁵ durch Kristallviolett-färbung. AiiB und BlcC, welche über ihren N-Terminus an carboxy-funktionalisierte Oberflächen gebunden sind, reduzieren die Biofilmbildung im Vergleich zum Kontrollbiofilm signifikant: AiiB auf $73,2 \pm 18,2$ % und BlcC auf $80,0 \pm 15,4$ %. Durch die kovalente Immobilisierung über den C-Terminus wird keine Reduzierung der Biofilmmasse erreicht.

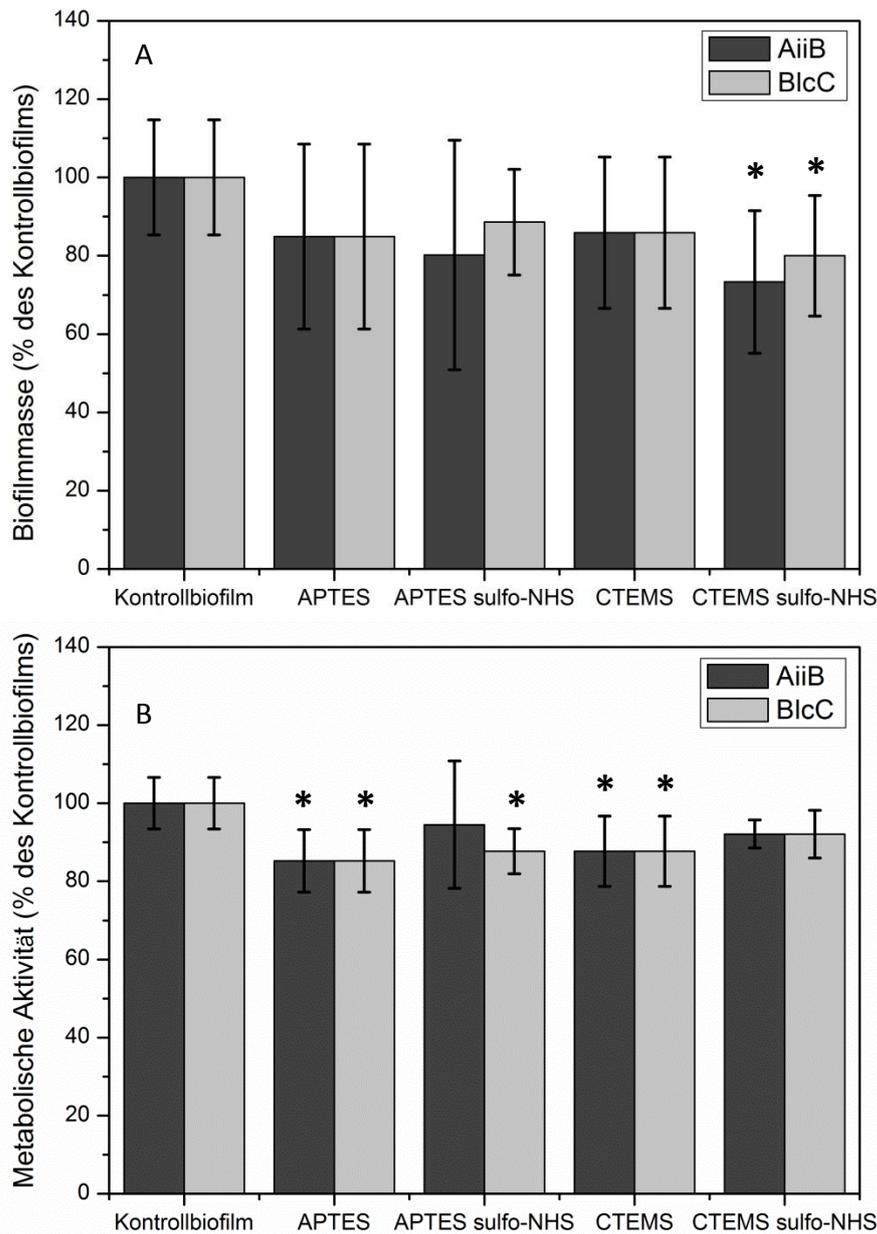


Abbildung 69: Biofilmreduzierung durch kovalent gebundenes AiiB und BlcC

Untersucht wurde die Wirkung der APTES- und CTEMS-Silanschicht sowie des mit EDC und sulfo-NHS kovalent gebundenen AiiB und BlcC auf die Biofilmbildung von *P. aeruginosa* PAO1. Die Signifikanz zu einem Niveau von $p < 0,05$ wurde im Bezug zum Kontrollbiofilm bestimmt.

A) Biofilmmasse quantifiziert durch die Kristallviolett-färbung des Calgary Biofilm Devices⁵⁵, B) Metabolische Aktivität ermittelt durch den Umsatz von XTT;

Im Weiteren wird die Biofilmmasse, welche direkt über der Beschichtung gewachsen ist, anhand der metabolischen Aktivität durch den Umsatz von XTT quantifiziert (siehe Abbildung 69 B). Carboxy- und Aminofunktionen verringern die Biofilmbildung im Vergleich zum Kontrollbiofilm signifikant ($p < 0,05$) auf $85,2 \pm 8,0$ % beziehungsweise $87,7 \pm 9,0$ %. Durch eine kovalente Bindung von AiiB und BlcC an diese funktionellen Gruppen ist keine weitere Biofilmreduzierung erzielbar.

Neben dem Einfluss kovalent immobilisierter AHL-lactonasen auf die Biofilmbildung wird die Wirkung auf ausgewählte Virulenzfaktoren, Produktion an Pyocyanin und Pyoverdin sowie die Produktion von Rhamnolipiden, untersucht. Abbildung 70 A gibt die Ergebnisse für AiiB wieder, Abbildung 70 B zeigt die Ergebnisse für BlcC.

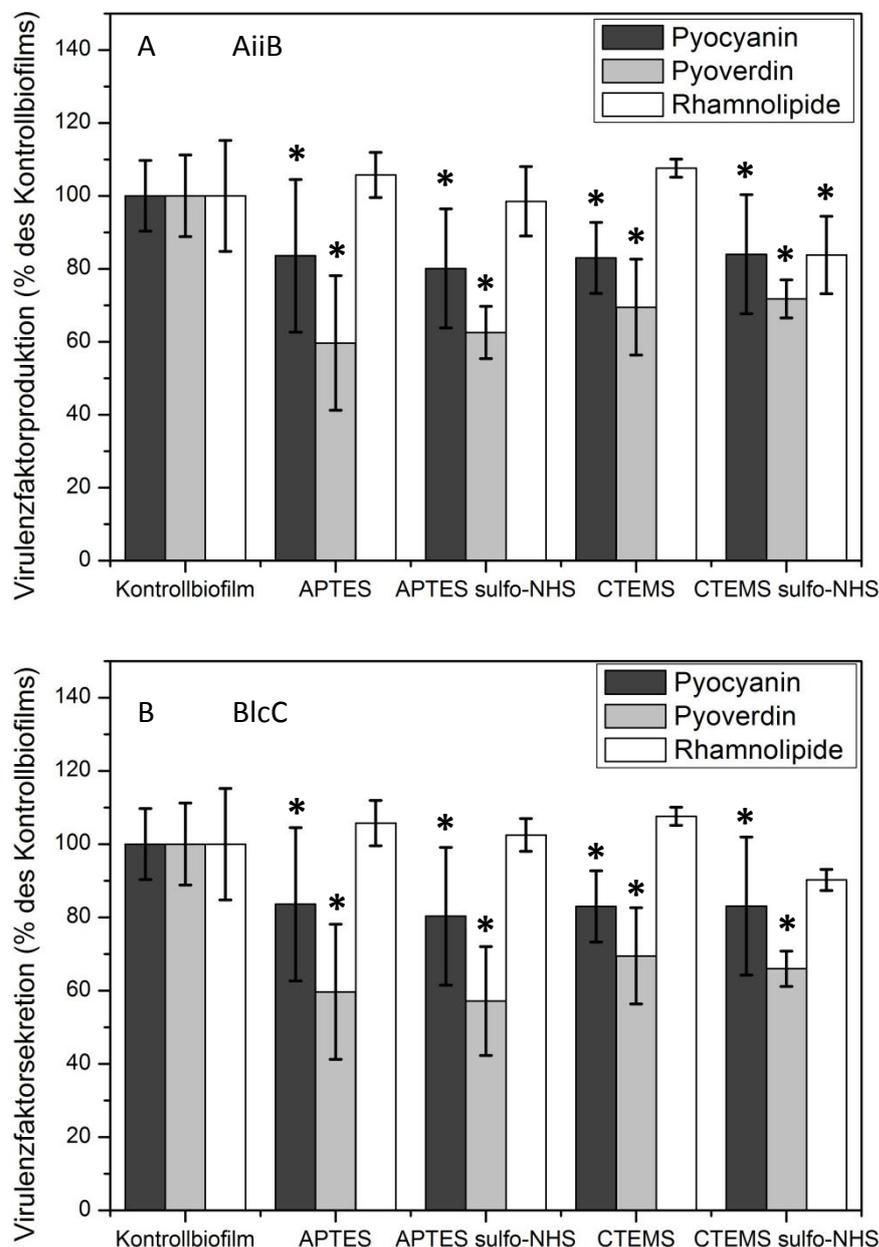


Abbildung 70: Wirkung von kovalent gebundenem AiiB und BlcC auf die Virulenzfaktoren

Wirkung der APTES- und CTEMS-Silanschicht, sowie des mit EDC und sulfo-NHS kovalent gebundenen AiiB und BlcC auf die Virulenzfaktorenproduktion von *P. aeruginosa* PAO1 beispielhaft an Pyocyanin, Pyoverdin und Rhamnolipide. Die hier gezeigte Signifikanz zu einem Niveau von $p < 0,05$ bezieht sich auf den Kontrollbiofilm.

Die Produktion von Pyocyanin wird bereits im Vergleich zum Kontrollbiofilm durch die carboxy- und aminofunktionalisierten Oberflächen signifikant auf $83,0 \pm 9,7\%$ beziehungsweise auf $83,6 \pm 20,9\%$ reduziert. Darüber hinaus verringert sie sich durch AiiB und BlcC,

welche über den C-Terminus an amino-funktionalisierten Oberflächen kovalent gebunden sind, weiter auf $80,1 \pm 16,3$ % beziehungsweise $80,3 \pm 18,8$ %. Eine Signifikanz dieser Ergebnisse ist nur zum Kontrollbiofilm, jedoch nicht zur APTES-Schicht selbst nachweisbar. AiiB und BlcC, welche kovalent an CTEMS gebunden sind, zeigen im Vergleich zur CTEMS-Schicht keine weitere biofilmreduzierende Wirkung.

Die Bildung von Pyoverdin wird im Vergleich zum Kontrollbiofilm in Gegenwart der amino- und carboxyfunktionalisierten Oberflächen signifikant auf $59,7 \pm 18,4$ % beziehungsweise $69,5 \pm 13,2$ % des Kontrollbiofilms gesenkt. Eine weitere Senkung wird darüber hinaus sowohl durch BlcC ($57,2 \pm 4,9$ %), welches über den C-Terminus an amino-funktionalisierte Oberflächen kovalent gebunden ist, als auch durch BlcC ($66,0 \pm 5,2$ %), welches über den N-Terminus an carboxyfunktionalisierte Oberflächen kovalent immobilisiert ist, erreicht. Diese Senkung ist im Vergleich zum Kontrollbiofilm signifikant ($p < 0,05$).

Amino- beziehungsweise carboxyfunktionalisierte Oberflächen besitzen keine reduzierende Wirkung auf die Rhamnolipidproduktion. AiiB und BlcC, welche kovalent über ihren N-Terminus immobilisiert sind, reduzieren die Bildung der Rhamnolipide auf $83,8 \pm 2,9$ % beziehungsweise $90,2 \pm 10,6$ %, AiiB, welches kovalent über sein C-Terminus gebunden ist, vermindert sie auf $98,5 \pm 4,5$ %.

5.8.3 Einschluss in eine polymere Matrix

Die entwickelten Hydrogelsysteme eignen sich, wie in Kapitel 4.2.12 gezeigt, als Wirkstoffdepotsysteme. Im Folgenden wird untersucht, ob und in wie weit diese Systeme als Depotsysteme zu Immobilisierung von AHL-lactonasen und zur Biofilmvermeidung am Beispielorganismus *P. aeruginosa* PAO1 angewandt werden können. Hierzu werden Hydrogele mit 35 % und 50 % PEG-DA mit je 220 µg/ml AiiB beziehungsweise BlcC beladen. Je 50 µL Hydrogel/Kavität werden in einer 96-Multiwellplatte auspolymerisiert und zunächst für zwei Stunden mit MilliQ gequollen. Dies dient zum Auswaschen eventuell nicht abreagierter toxischer Polymerisationsbestandteile. Anschließend werden die QQ-Eigenschaften dieser Systeme mit *P. aeruginosa* PAO1 zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht: Zum einen nach 16 h, um diese Ergebnisse später mit den Ergebnissen der anderen Immobilisierungsmethoden vergleichen zu können, da diese ebenfalls nach 16 h entstanden sind und zum anderen nach 88 h, da es sich bei diesem System um ein Langzeitdepot handelt und daher eine längere Versuchsdauer betrachtet werden sollte.

Im Vergleich zum Kontrollbiofilm reduziert sich die metabolische Aktivität des Biofilms, welcher sich auf einem unbeladenen Hydrogel bildete, innerhalb von 16 h signifikant auf 65 ± 16 % (siehe Abbildung 71 A). Die metabolische Aktivität eines Biofilms auf mit AiiB beziehungsweise BlcC beladenen Hydrogelen ist im Vergleich zum Kontrollbiofilm signifi-

kant reduziert. Verglichen mit dem unbeladenen Hydrogel ist keine signifikante Minderung der metabolischen Aktivität nachweisbar. Die Biofilmmasse wird durch die Anwesenheit von unbeladenem Hydrogel nicht beeinflusst. Hydrogele, welche mit AiiB beziehungsweise

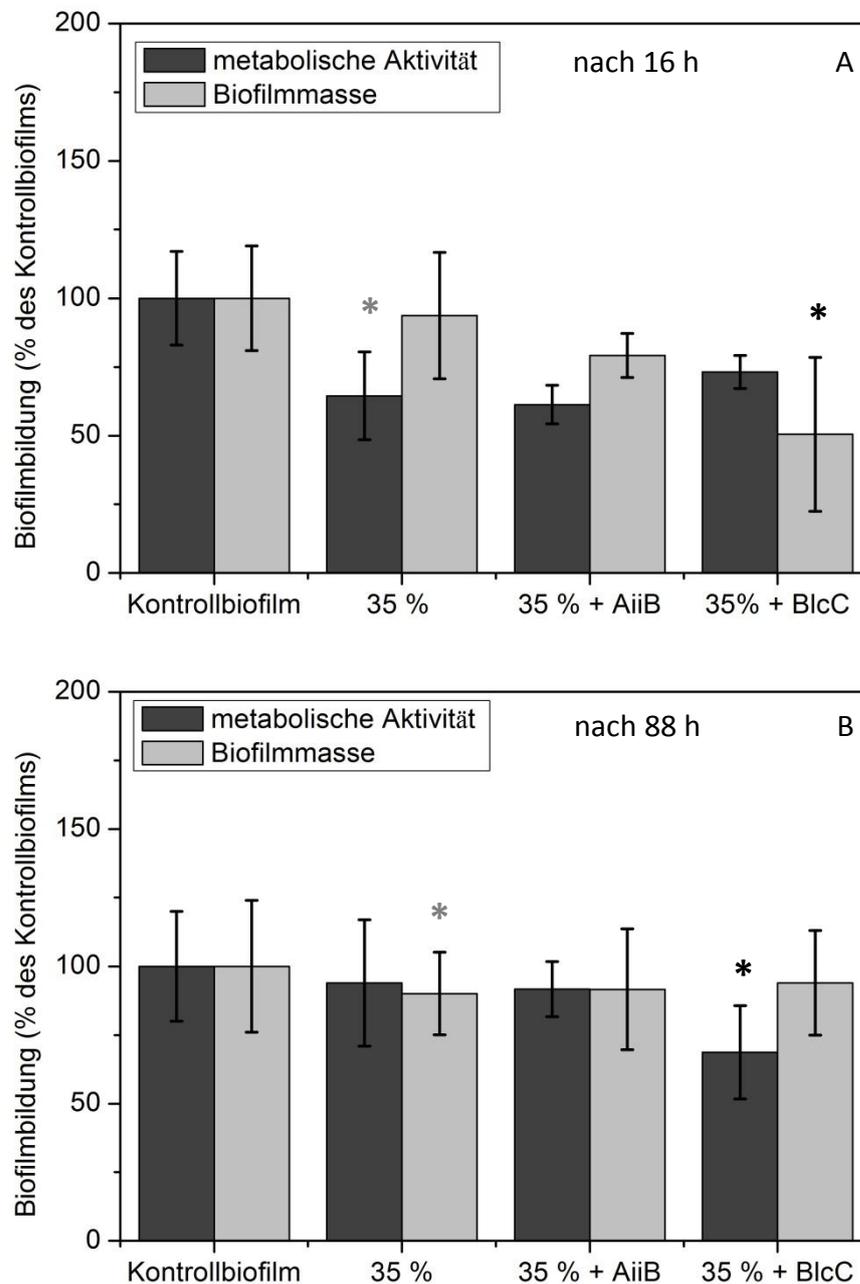


Abbildung 71: Biofilmreduktion durch ein 35 %-iges Hydrogel nach 16 h/88 h Biofilmbildung von *P. aeruginosa* PAO1 in Gegenwart eines 35 %-igen Hydrogels, unbeladen und beladen mit 220 µg/ml AiiB beziehungsweise BlcC. Die metabolische Aktivität wurde über den Umsatz von XTT ermittelt und die Biofilmmasse wurde durch die Färbung des Calgary Biofilm Devices⁵⁵ mit Kristallviolett quantifiziert.

A) nach 16 h; B) nach 88 h

Zur Unterscheidung der Wirkung von nicht abregierten Hydrogelbestandteilen von der Wirkung der AHL-lactonasen wurden zwei unterschiedliche Statistiken betrachtet:

* Signifikant zu $p < 0,05$ im Vergleich zur nativen Kontrolle; * Signifikant zu $p < 0,05$ im Vergleich zum unbeladenen Hydrogel

BlcC beladen sind, beeinträchtigen die Bildung der Biofilmmasse. Die Biofilmmasse vermindert sich bei Anwesenheit von BlcC in einem 35 %-igen Hydrogel, einem Hydrogel mit einem Polymergehalt von 35 % bei der Netzwerksynthese, signifikant auf 51 ± 28 %.

Abbildung 71 B zeigt die oben beschriebenen Systeme nach einer Untersuchungsdauer von 88 h. Das unbeladene Hydrogel beeinflusst die metabolische Aktivität der gebildeten Biofilme im Vergleich zum Kontrollbiofilm nicht nachteilig. Hydrogele, welche mit BlcC beladen wurden, führen zu einer signifikant verminderten metabolischen Aktivität von 69 ± 33 %. Hinsichtlich der Biofilmmasse ist nach 88 h kein nachteiliger Einfluss von unbeladenen und beladenen Hydrogelen zu beobachten.

Neben dem Einfluss auf die Biofilmbildung werden bei den Hydrogelsystemen die Beeinflussung der Produktion der Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* PAO1 am Beispiel Pyocyanin, Pyoverdin und Rhamnolipide zu zwei Zeitpunkten, nämlich nach 16 h (Abbildung 72 A) und nach 88 h (Abbildung 72 B), untersucht. Zunächst wird der Zeitpunkt $t = 16$ h betrachtet: In Anwesenheit von unbeladenem Hydrogel verringert sich die Produktion aller untersuchten Virulenzfaktoren im Vergleich zum Kontrollbiofilm signifikant: Die Produktion von Pyocyanin vermindert sich auf 84 ± 6 %, von Pyoverdin auf 89 ± 14 % und die Bildung der Rhamnolipide wird auf 87 ± 5 % verringert. Teilweise wird durch die Zugabe eine weitere signifikante Reduzierung ($p < 0,05$) im Vergleich zum unbeladenen Hydrogel erzielt. Durch die Beladung mit AiiB wird die Produktion an Pyoverdin auf 58 ± 19 % und die Rhamnolipide auf 80 ± 6 % reduziert. Eine Beladung mit BlcC vermindert die Konzentration an gebildetem Pyoverdin signifikant auf 53 ± 34 %.

Nach Ablauf von 88 h Inkubationszeit wird die Pyocyaninproduktion in Anwesenheit eines unbeladenen 35 %-igen Hydrogels signifikant auf 77 ± 18 % gesenkt. Durch eine Beladung mit AiiB beziehungsweise BlcC reduziert sich die Produktion von Pyocyanin und Pyoverdin auf bis zu 67 ± 10 %. Diese Ergebnisse sind im Vergleich zum unbeladenen Hydrogel bei einem Niveau von $p < 0,05$ nicht statistisch signifikant.

Die Freisetzung der AHL-lactonasen aus einem Hydrogel wird von ihrem hydrodynamischen Radius in Zusammenspiel mit der Maschenweite des Hydrogels bestimmt. Letztere ist über den Makromergehalt in der Polymerisationslösung einstellbar (siehe Kapitel 5.4.3). Daher wurden zur Immobilisierung in einer polymeren Matrix ein Hydrogel mit einem Polymergehalt von 35 % und eines mit einem Polymergehalt von 50 % ausgewählt. Die mikrobiologische Bewertung von ersterem ist oben beschrieben. Im Folgenden werden nun die Ergebnisse der mikrobiologischen Bewertung nach 16 h eines Hydrogels mit einem 50 %-igen Polymergehalt, welches mit AiiB beziehungsweise BlcC beladen wurde, gezeigt: Abbildung 73 A stellt den Einfluss auf die metabolische Aktivität und die Biofilmmasse von

P. aeruginosa PAO1 dar, Abbildung 73 B zeigt die Wirkung auf die Produktion der Virulenzfaktoren Pyocyanin, Pyoverdin und Rhamnolipide.

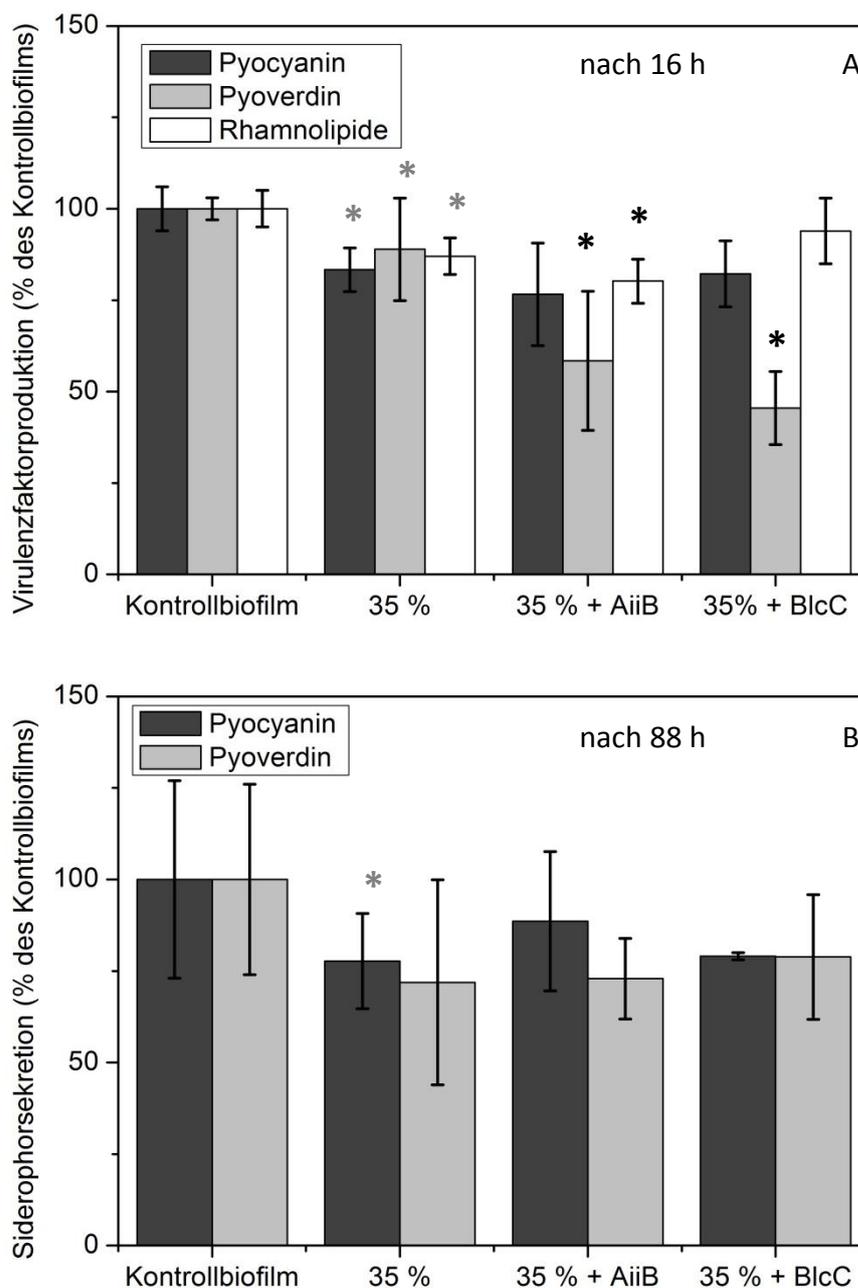


Abbildung 72: Einfluss eines 35 %-igen Hydrogels nach 16 h/88 h auf Virulenzfaktoren

Produktion von Virulenzfaktoren am Beispiel von Pyocyanin, Pyoverdin und Rhamnolipide von *P. aeruginosa* PAO1 in Gegenwart eines 50 %-igen Hydrogels, unbeladen und beladen mit 200 µg/ml AiiB beziehungsweise BlcC.

Zur Unterscheidung der Wirkung von nicht abreagierten Hydrogelbestandteilen von der Wirkung der AHL-lactonasen wurden zwei unterschiedliche Statistiken betrachtet:

* Signifikant zu $p < 0,05$ im Vergleich zum nativen Kontrolle; * Signifikant zu $p < 0,05$ im Vergleich zum unbeladenen Hydrogel

Das unbeladene Hydrogel reduziert die metabolische Aktivität auf 68 ± 14 % und die Biofilmmasse auf 87 ± 9 % signifikant ($p < 0,05$). Mit AiiB beziehungsweise BlcC beladene

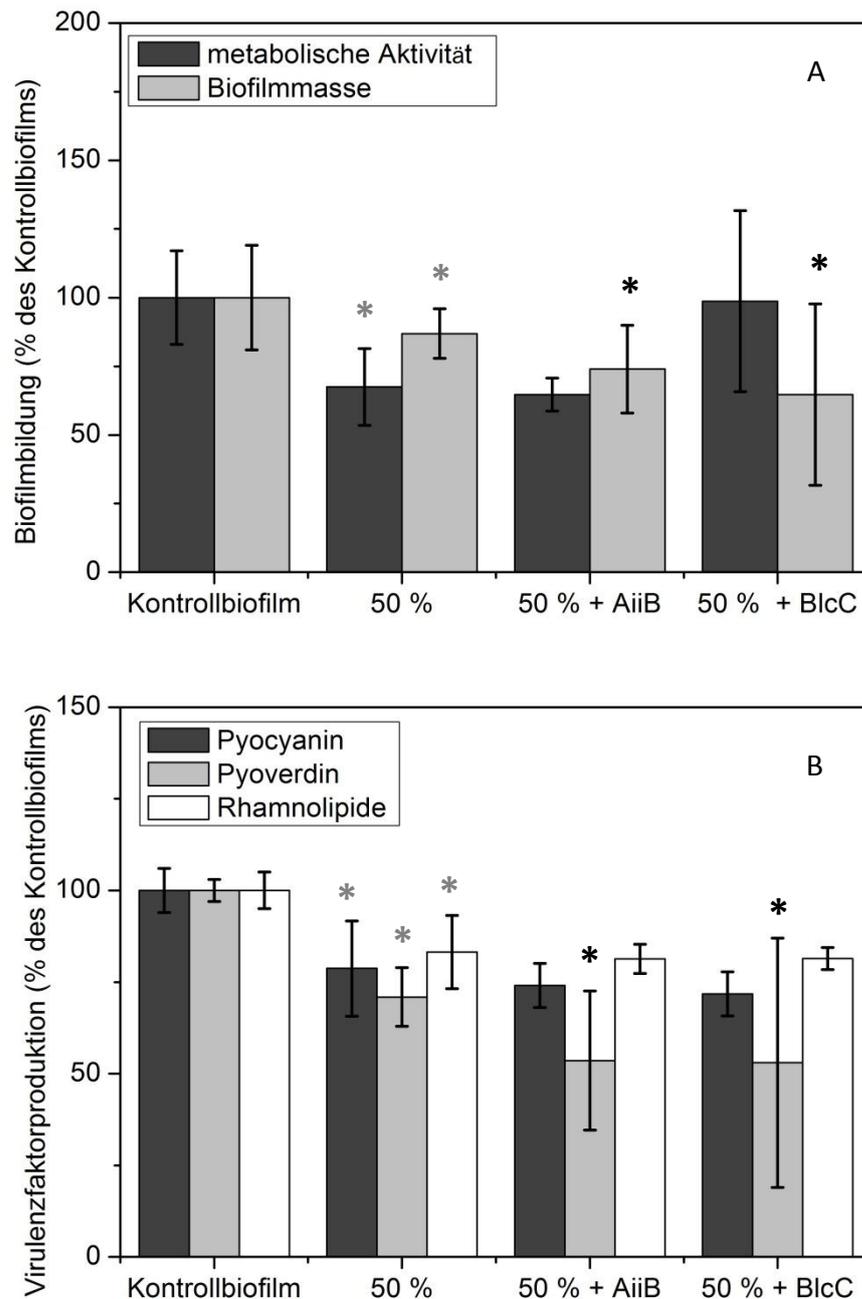


Abbildung 73: Biofilmreduktion eines 50 %-igen Hydrogels nach 16 h A) Biofilmbildung von *P. aeruginosa* PAO1 in Gegenwart eines 50 %-igen Hydrogels, unbeladen und beladen mit 220 µg/ml AiiB und BlcC. Die metabolische Aktivität wurde über den Umsatz von XTT ermittelt und die Biofilmmasse wurde durch die Färbung des Calgary Biofilm Devices⁵⁵ mit Kristallviolett quantifiziert.

B) Produktion von Virulenzfaktoren am Beispiel von Pyocyanin, Pyoverdin und Rhamnolipide von *P. aeruginosa* PAO1 in Gegenwart eines 50 %-igen Hydrogels, unbeladen und beladen mit 200 µg/ml AiiB beziehungsweise BlcC.

* Signifikant zu $p < 0,05$ im Vergleich zum nativen Kontrolle; * Signifikant zu $p < 0,05$ im Vergleich zum unbeladenen Hydrogel

Hydrogele vermindern im Vergleich zum Kontrollbiofilm sowohl die metabolische Aktivität als auch die Biofilmmasse. Im Vergleich zum unbeladenen Hydrogel reduziert sich nur die Biofilmmasse signifikant auf 74 ± 16 % durch AiiB und auf 65 ± 33 % durch BlcC im Vergleich zum unbeladenen Hydrogel.

Unbeladene Hydrogele mit einem Polymergehalt von 50 % beeinflussen die Biofilmbildung und die Produktion von Virulenzfaktoren in *P. aeruginosa* PAO1: Im Vergleich zum Kontrollbiofilm ist die Produktion von Pyocyanin auf 79 ± 13 % reduziert, die von Pyoverdinin auf 71 ± 8 % verringert und die gebildeten Rhamnolipide betragen 83 ± 10 % der Rhamnolipidkonzentration des Kontrollbiofilms. Mit AiiB und BlcC beladene Hydrogele vermindern ebenfalls die Produktion der drei untersuchten Virulenzfaktoren. Im Vergleich zum unbeladenen Hydrogel sind nur die verminderte Pyoverdininproduktion durch AiiB mit 54 ± 19 % und durch BlcC mit 53 ± 34 % mit einem Niveau von $p < 0,05$ statistisch signifikant.

5.9 Zusammenfassung der Ergebnisse

Diese Arbeit setzt sich aus drei Teilbereichen zusammen: Herstellung, Aufreinigung und Charakterisierung der AHL-lactonasen AiiA, AiiB und BlcC, die Erarbeitung und Evaluierung geeigneter Immobilisierungsmethoden für diese sowie deren mikrobiologische Bewertung.

Im ersten Ergebnisteil wurde gezeigt, dass durch eine Hochzelldichtefermentation in einem Bioreaktor mit einer maximal erreichten Dichte von 10^{14} Zellen/l folgende Ausbeuten an frei löslich exprimierten AHL-lactonasen erzielt wurden: AiiA 1,2 g/l; AiiB 0,7 g/l und BlcC 1,0 g/l. In einer dreistufigen Aufreinigung aus Anionen-, Affinitäts- und anschließender Größenausschlusschromatographie wurden Reinheitsgrade von 99 % erreicht. Mittels MALDI-TOF-Analyse wurde die Sequenz der aufgereinigten AHL-lactonasen AiiB mit einer Identität von 75,3 % und BlcC mit 61,7 % verifiziert.

Die drei AHL-lactonasen wurden bezüglich ihrer Eigenschaften über bioinformatische Methoden charakterisiert. Die isoelektrischen Punkte, 4,77 für AiiA, 5,45 für AiiB und 5,75 für BlcC, und die hydrodynamischen Radien, $2,30 \pm 0,12$ nm für AiiA, $2,42 \pm 0,12$ nm für AiiB und $2,37 \pm 0,12$ nm für BlcC, waren hinsichtlich der späteren Immobilisierungsmethoden von besonderer Bedeutung. Mittels FT-IR/ATR wurden die Sekundärstrukturen von AiiB mit einem α -Helix-Anteil von $11,4 \pm 2,2$ % und einem β -Faltblatt-Anteil von $36,2 \pm 2,9$ % sowie BlcC mit einem α -Helix-Anteil von $4,4 \pm 4,2$ % und einem β -Faltblatt-Anteil von $32,4 \pm 0,7$ % bestimmt. Abschließend wurde die spezifische Aktivität von AiiB und BlcC zum einen über den rein chemischen Umsatz des Substrates mittels einer pH-Wert-Änderung über den pH-Indikator Pyranin und zum anderen mit Hilfe des Reporterstammes *A. tumefaciens* NTL4 (pCF218)(pCF372) im ONPG- und X-Gal-Assay untersucht. BlcC erwies sich verglichen mit AiiB als weniger aktiv.

Im zweiten Ergebnisteil, der Erarbeitung geeigneter Immobilisierungsmethoden für die AHL-lactonasen, wurden die Immobilisierung über Physisorption und Chemisorption sowie

der Einschluss in eine polymere Matrix auf ihre Eignung untersucht. Zur Immobilisierung mittels Physisorption wurden die Adsorptionsträgermaterialien Aluminiumhydroxid, Calciumhydrogenphosphat, Kalksodagläskügelchen, Poly-(Methacrylsäure-co-Ethylen-glykoldimethacrylat), Polystyrol-Acrylsäure und Siliziumdioxid ausgewählt. Diese Materialien wurden hinsichtlich ihrer BET-Oberfläche, ihres hydrodynamischen Radius, ihrer Partikelabmessungen und ihres Zeta-Potentials bei unterschiedlichen pH-Werten charakterisiert. Bei einer Enzymbindung über ionische Wechselwirkungen, bei welcher der pH-Wert während der Immobilisierung unterhalb des pI-Wertes des jeweiligen Enzyms lag, wurde die höchste spezifische Beladung mit den Modellenzymen Subtilisin und Lysozym erzielt. Die spezifische BET-Oberfläche besaß einen großen Einfluss auf die Immobilisierung: Mit zunehmender BET-Oberfläche gelang es eine größere Enzymmenge zu immobilisieren. Es zeigte sich, dass die spezifische Aktivität umgekehrt proportional zur spezifischen Oberfläche ist. In Abhängigkeit der Wechselwirkungen, welche der Physisorption zugrunde lagen, desorbierten immobilisierte Enzyme unterschiedlich. Generell desorbierten 50 bis 90 % des gesamten physisorbierten Enzyms innerhalb der ersten 24 Stunden. Eine Immobilisierung über ionische Wechselwirkungen stellte sich als starke Bindung mit daraus resultierender verzögerter und verringerter Freisetzung heraus.

Zur Chemisorption wurden zunächst Siliziumsubstrate mit 3-Aminopropyltriethoxysilan, 2-(Carboxymethylthio)ethyltrimethylsilan, 3-(Glycidoxypropyl)trimethoxysilan und 3-(Trimethoxysilyl)propylmethacrylat mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen ausgerüstet. Die Charakterisierung der Schichten erfolgte über ihre Schichtdicke, welche 1,3 - 2,9 nm betragen, ihre Kontaktwinkel mit Wasser, welche alle $< 90^\circ$ waren, und ihrer Belegungsdichte mit funktionellen Gruppen, welche 3,3 – 6,3 funktionelle Gruppen/nm² ergab. Eine Freisetzung des immobilisierten Enzyms war hier nicht vorgesehen.

Zum Einschluss in eine polymere Matrix wurde ein Hydrogelsystem basierend auf Poly-(ethylenglykol)diacrylat MW575 und MW700 mit Polymergehalten zwischen 25 und 50 % synthetisiert, welches nach 3 Sekunden UV-Bestrahlung durch eine radikalische Polymerisation gebildet wurde. Die Hydrogele quollen mit 200 % moderat und besaßen einen Gleichgewichtswasseranteil von 50 %. Durch Variation des Polymeranteils wurden Maschenweiten zwischen 4,4 und 7,1 nm erzielt. In rheologischen Untersuchungen zeigten diese Hydrogele bei einer Deformation kleiner als 1 % ein Verhalten vergleichbar mit weichen viskoelastischen Feststoffen. Mit zunehmendem Polymeranteil wiesen sie eine höhere mechanische Stabilität auf. Weiterhin wurde die UV-Einwirkung auf die Struktur und die spezifische Aktivität von Enzymen während der Polymerisation untersucht. Es wurden innerhalb einer UV-Bestrahlungsdauer von bis zu 5 Sekunden keine gravierenden Veränderungen in der Sekundärstruktur und daraus folgend in ihrer spezifischen Aktivität nachgewiesen. Abschließend wurde das Hydrogel auf Oberflächen, welche mit Methacrylat-

funktionen ausgerüstet wurden, kovalent gebunden. Das Freisetungsverhalten des Hydrogels wurde als ein Zusammenspiel zwischen Maschenweite und hydrodynamischem Radius des eingeschlossenen Proteins identifiziert. Bei einer geeigneten Kombination dieser beiden Parameter war ein Ausbluten des Hydrogels in der „initial burst“-Phase vermeidbar und eine gleichmäßige Freisetzung des Enzyms über eine Dauer von mindestens 14 Tagen bei gleichbleibender Aktivität konnte erreicht werden.

Im folgenden dritten Ergebnisteil, der mikrobiologischen Bewertung der immobilisierten AHL-lactonasen, wurde zunächst deren Wirkung in gelöster Form auf verschiedene Bakterienspezies untersucht. So wurde eine Reduktion der Biofilmmasse und der metabolischen Aktivität durch Zugabe von 8 ng/ml AiiB und BlcC auf Gram-negative Bakterien wie *P. aeruginosa*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. fluorescens*, *E. aerogenes* und *C. violaceum* gezeigt. AiiB und BlcC beeinflussten die Biofilmbildung von Gram-positiven Bakterien (*S. lutea*), einem Gram-negativen Stamm, welcher nicht über AHL kommuniziert (*E. coli*), dem Gram-negativen Bakterium *P. mirabilis* und den QS-Mutanten von *E. coli* und *C. violaceum* nicht.

Weiterhin wurde die Wirkung von AiiB und BlcC auf die Bildung unterschiedlicher Virulenzfaktoren untersucht. AiiB und BlcC verminderten die Bildung von Pyocyanin, Pyoverdine, Pyochelin und den Rhamnolipiden von *P. aeruginosa* PAO1. Ebenso reduzierte sich die Bildung an Violacein in *C. violaceum*. AiiB und BlcC störten das Schwimm- und Schwarmverhalten von *P. aeruginosa* PAO1, PA14 und *P. mirabilis* nachhaltig.

In diesem Ergebnisteil wurden die bisher gewonnenen Erkenntnisse eingesetzt, um die AHL-lactonasen zu immobilisieren. AiiB und BlcC wurden einerseits auf partikulären Systemen adsorbiert und andererseits auf Flächsubstraten über ihr Tag gebunden. AiiB adsorbierte unabhängig des Trägermaterials mit $1,57 \pm 0,02$ µg/mg Material auf den unterschiedlichen Partikeln. Einzig PS-AA bildete hier eine Ausnahme, da hier mit $0,078 \pm 0,002$ µg/mg Material weniger Enzym immobilisiert wurde. BlcC adsorbierte bevorzugt in folgender Reihe: KSG \approx Al(OH)₃ = pMA-EGDMA > Ca₅[OH](PO₄)₃ > SiO₂ > PS-AA. In der mikrobiologischen Bewertung, der Analyse der Biofilmmasse, der metabolischen Aktivität und der Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* PAO1, stellten sich KSG und SiO₂ als geeignete Materialien und PS-AA als ungeeignetes Material heraus. AHL-lactonasen-Fusionsproteine wurden weiterhin direkt aus dem Zellysate auf mit Maltose ausgerüsteten Oberflächen gebunden. Dies wurde mit einer Western Blot Analyse bestätigt. AiiA und AiiB reduzieren die Biofilmbildung von *P. aeruginosa* PAO1 auf 25 %.

Zur kovalenten Immobilisierung wurden AiiB und BlcC zum einen über deren C-Terminus und zum anderen über deren N-Terminus mit EDC/sulfo-NHS an entsprechend funktionalisierte Oberflächen gebunden. AiiB und BlcC, die beide über ihren N-Terminus kovalent an Oberflächen gebunden wurden, reduzierten die Biofilmmasse von *P. aeruginosa* PAO1

im Vergleich zum Kontrollbiofilm signifikant auf $73,2 \pm 18,2$ % beziehungsweise auf $80,0 \pm 15,4$ %. Die Bildung von Pyoverdin verminderte sich signifikant sowohl durch BlcC, gebunden am C-Terminus, auf $57,2 \pm 7,2$ % als auch durch BlcC, immobilisiert am N-Terminus, auf $66,0 \pm 5,8$ %. Darüber hinaus war ein signifikant störender Einfluss auf die Biofilmbildung und die Produktion der Virulenzfaktoren durch carboxy- und aminofunktionalisierten Oberflächen zu beobachten.

AiiB und BlcC, welche in 35 %-igen und in 50 %-igen PEG-DA-Hydrogelen immobilisiert wurden, reduzierten nach 16 h signifikant die Bildung der Virulenzfaktoren Pyocyanin, Pyoverdin und die Rhamnolipide. Nach 88 h waren diese Virulenzfaktoren bei Anwesenheit von AiiB und BlcC in ihrer Konzentration im Vergleich zum Kontrollbiofilm vermindert. *P. aeruginosa* PAO1 wurde in der Ausbildung eines Biofilms innerhalb von 16 h durch AiiB, immobilisiert in einem 35 %-igen Hydrogel, gehemmt. Die Biofilmmasse reduzierte sich signifikant auf 51 ± 28 % des Kontrollbiofilms. Nach einer Inkubationszeit von 88 h verminderten mit BlcC beladene Hydrogele die metabolische Aktivität signifikant auf 69 ± 33 %.

6 Diskussion der Methoden und Ergebnisse

6.1 Herstellung und Aufreinigung der AHL-lactonasen

Sowohl die Übertragung geeigneter Expressionsparameter aus Schüttelkolbenversuchen auf die Expression in einem 7 l-Bioreaktor als auch die anschließende chromatographische Trennung der rekombinant hergestellten Enzyme war erfolgreich. Dies wird in den folgenden Kapiteln 6.1.1 und 6.1.2 näher ausgeführt. Hierbei werden die hier erzielten Ergebnisse mit in der Literatur publizierten Ergebnissen in Relation gesetzt.

6.1.1 Expression der AHL-lactonasen im Bioreaktor

In der Literatur wurden die Wirkungen von AHL-lactonasen auf das QS und deren direkte Auswirkungen in unterschiedlichen Bakterienspezies hauptsächlich für *aiaa*, welches in die Zielspezies kloniert wurde, beschrieben. Dabei wurde das Verhalten der gentechnisch veränderten Spezies im Vergleich zu deren Wildstämmen betrachtet, zum Beispiel bei *P. aeruginosa* PAO1^{265, 323}, *Erwinia carotovora*^{96, 98} und *Burkholderia* sp.^{243, 309}. Diese Arbeiten wurden im Wesentlichen zwischen 2000 und 2007 durchgeführt.

Seit 2005 gelang es Forschergruppen um W. Fast in den USA und um X. Guan in China entsprechende AHL-lactonasen als Fusionsproteine in *E. coli* zu exprimieren und aufzureinigen^{204, 299, 347}. Diese Arbeiten wurden im Schüttelkolbenmaßstab durchgeführt und dienten in erster Linie zur Strukturaufklärung von AiiA²⁹⁹ und AiiB²⁰⁴. Durch die Übertragung optimaler Expressionsparameter aus Schüttelkolbenversuchen auf die Expression der AHL-lactonasen wurde in dieser Arbeit AiiA, AiiB und BlcC als lösliches Protein im Bioreaktor hergestellt. Ein weiteres Upscaling zur großtechnischen Herstellung der AHL-lactonasen ist aufgrund der hier erzielten Ausbeuten und gewählten Expressionsbedingungen möglich. So eignet sich beispielsweise *E. coli* als Expressionsstamm aufgrund seines schnellen Wachstums besonders für industrielle Herstellungsverfahren, da in kurzer Zeit große Batches erzielt werden können. Darüber hinaus handelt es sich bei dem Fed-Batch-Verfahren um ein Verfahren, dass sich ebenfalls gut zum Upscaling eignet und über das kontrollierte Wachstum bei homogenen Reaktionsbedingungen zu gut reproduzierbaren Batches führt, um die gleichbleibende Qualität des Produktes zu gewährleisten.

Tabelle 33 vergleicht die Parameter und die hieraus erzielten Ausbeuten dieser Arbeit mit Daten aus der Literatur. Die Hauptunterschiede zur Literatur bestehen zum einen in der Verwendung des Hochleistungsexpressionsstammes *E. coli* SoluBL21 und zum anderen in der Hochzelllichtfermentation in einem Reaktor. *E. coli* SoluBL21 ermöglicht im Vergleich zu *E. coli* BL21 (DE3) aufgrund unterschiedlicher Mutationen (siehe Kapitel 4.2.1) eine gesteigerte Expression an löslichem Protein. Hierdurch steigerte sich die Ausbeute deutlich

von 15 bis 54 mg/l auf 660 bis 1180 mg/l. Die Zugabe von Kobaltchlorid als Cofaktor erhöhte die Ausbeute um das 1,5- bis 2-fache im Vergleich zur Zugabe von Zinksulfat als Cofaktor. Diese Beobachtung wird durch die Literatur bestätigt²⁹⁸.

Tabelle 33: Vergleich der Expression von AiiA, AiiB und BlcC mit Literaturdaten

Expressionsparameter	Thomas et. al. ²⁹⁹	Liu et. al. ²⁰⁴	Augustine et. al. ²¹	Wang et al. ³²¹	Yang et. al. ³⁴⁷	Kerger ¹⁷⁶	Eigene Daten		
AHL-lactonase	MBP-AiiA	MBP-AiiB	AiiA	GST-AiiA	GST-AiiA	GST-AiiA	MBP-AiiA	MBP-AiiB	MBP-BlcC
<i>E. coli</i> Stamm	DH5 α	DH5 α	BL21 (DE3) pLys S	k. A.	BL21 (DE3)	<i>Solu</i> BL21	<i>Solu</i> BL21	<i>Solu</i> BL21	<i>Solu</i> BL21
Temperatur (°C)	25	25	28	28	20	37	30	30	30
Zeit (h)	16	16	2-6		20	6	6	6	4
IPTG (mmol/l)	0,3	0,3	0,5	0,5	0,8	1,0	0,1	0,1	0,1
Cofaktor (mmol/l)	Co ²⁺ (100)	Zn ²⁺ (500)	k. A.	k. A.	k. A.	Co ²⁺ (100)	Co ²⁺ (100)	Zn ²⁺ (500)	Co ²⁺ (100)
Anfangszelldichte OD_{600 nm}	0,5 – 0,7	0,5 – 0,7	k. A.	0,4 – 0,5	0,6 – 0,7	27	66	56	41
Ausbeute (mg/l)	15	k. A.	k. A.	k. A.	54	55	1180	660	1000

Durch die Übertragung der Expressionsparameter aus den Schüttelkolbenversuchen auf den Bioreaktor wurden Ausbeuten von 660 bis 1180 mg/l erreicht. Es erfolgte jedoch keine gezielte Optimierung der Expressionsparameter wie die Sauerstoffzufuhr, die Zellzahl während der Expression, das Expressionsmedium oder die Kohlenstoffquellezufütterung für die Expression im Bioreaktor. Es ist daher zu erwarten, dass der AHL-lactonase-Anteil am Gesamtzellprotein von 1,0 bis 1,8 % über die Optimierung der Expressionsparameter auf die Expression im Reaktor gesteigert werden kann. In der Überprüfung des Expressionsverlaufes mittels Western Blot Analyse (siehe Abbildung 27 Seite 91) zeigte sich, dass nach 4 h Expression eine geringfügige Konzentrationsabnahme der AHL-lactonasen auftritt. Dies kann auf einen proteolytischen Abbau während der Fermentation zurückgeführt werden. Daher ist eine Verkürzung der Expressionszeit auf 4 Stunden ebenfalls vielversprechend, um die Ausbeute der weiter zu steigern.

Bei der Hochzelldichtefermentation kann das Plasmid, welches das Zielprotein kodiert, verloren gehen oder die Wachstumsrate vermindert werden. Daher wurde eine plasmid-kodierte Antibiotikaresistenz eingeführt und das Kulturmedium mit Ampicillin angereichert. Das Antibiotikum wird im Fermentationsverlauf jedoch abgebaut²⁵. Es sollte daher eine zusätzliche Ampicillingabe im Fermentationsverlauf erfolgen. In den Fermentationsansätzen dieser Arbeit wurde daher nach 3 Stunden erneut Ampicillin zugegeben. Durch die Abtrennung der Zellmasse aus der Fermentationsbrühe sowie durch die aufeinanderfolgenden Auf-

reinigungsschritte mittels chromatographischer Verfahren wird gewährleistet, dass in der nachfolgenden mikrobiologischen Bewertung der aufgearbeiteten AHL Lactonasen keine falsch positiven Ergebnisse durch eventuell vorhandenes Ampicillin auftreten.

Neben der Expression von AHL-lactonasen als lösliches Protein wird ein Teil in unlöslicher Form, in so genannte „inclusion bodies“, exprimiert¹⁷⁶. Jedoch könnte letzteres beispielsweise durch eine niedrige Expressionstemperatur deutlich minimiert werden. Zur Steigerung der Ausbeute kann das unlösliche Protein zusätzlich aufgereinigt und bereitgestellt werden. Die Herausforderung hierbei besteht in der korrekten Rückfaltung der in der Regel denaturierten Proteine²⁷.

Für ein industrielles Upscaling der Fermentation ist jedoch die Ausbeute der AHL-lactonase von entscheidender Bedeutung. Die hier erzielten Ausbeuten von 1,0 bis 1,8 % des Gesamtzellproteins sind hierfür noch zu gering, es sind vielmehr Ausbeuten von 10-30 % des Gesamtzellproteins wünschenswert. Um dies zu erreichen kann zum einen der Expressionsstamm und zum anderen der Expressionsprozess optimiert werden.

Optimierungen am Expressionsstamm beinhalten in erster Linie die Optimierung des *codon usage*, bei dem von verschiedenen Spezies bestimmte Codons des degenerierten Codes unterschiedlich häufig verwendet werden. Die AHL-lactonasen entstammen *A. tumefaciens* beziehungsweise *B. thuringiensis* und werden in *E. coli* exprimiert, so dass bei ungünstigem *codon usage* die Translation gebremst wird. Eine Optimierung des *codon usage* auf *E. coli* hingegen beschleunigt die Translation und erhöht die Gesamtausbeute des Zielproteins. *E. coli* besitzt weiterhin eine Vielzahl an Proteasen, die sich im Cytoplasma, im Periplasma sowie an der inneren und äußeren Membran befinden. Es könnten daher einzelne Proteasen im Cytoplasma von *E. coli* ausgeschaltet werden, um einen proteolytischen Abbau der AHL-lactonasen zu verhindern. Für ein industrielles Upscaling wäre jedoch eine extrazelluläre Produktion der AHL-lactonasen am günstigsten, da sich hierdurch die Aufreinigung stark vereinfachen würde.

Bei der Optimierung des Expressionsprozesses liegen im Vergleich zur Optimierung des Expressionsstammes die größeren Freiheitsgrade. Für eine Hochzelldichtefermentation mit einer Zelltrockenmasse von mehr als 100 g/l bietet sich die Fed-Batch-Prozessführung mit einer konstanten Wachstumsrate an. Problematisch hierbei ist die schnell auftretende Acetatbildung. Dies kann durch verschiedene Maßnahmen verhindert werden. Eine Maßnahme ist der Austausch der Kohlenstoffquelle Glukose, welche die Acetatbildung begünstigt, durch Glycerol¹⁹⁶ oder eine direkte Feedbackkontrolle der Glukosekonzentration, um den Crabtree-Effekt zu umgehen und dadurch die Acetatbildung zu vermeiden. Zusätzlich kann einer eintretenden Sauerstofflimitierung, die ebenfalls zur Acetatbildung führt, durch die Zugabe von reinem Sauerstoff anstelle von technischer Luft begegnet

werden. Auch die Absenkung der Fermentationstemperatur verringert die Acetatbildungsrate. Es gilt daher für ein industrielles Upscaling die Parameter, welche in dieser Arbeit aus Schüttelkolbenversuchen auf den Bioreaktor übertragen wurden, erneut im Bioreaktor hinsichtlich der Ausbeute zu optimieren.

6.1.2 Aufreinigung der AHL-lactonasen durch chromatographische Methoden

Der eigentliche spezifische Trennungsschritt der AHL-lactonasen über ihr MBP-Tag, die Affinitätschromatographie (AC) mit der Abtrennung des Tags durch die AcTEV-Protease, wurde um zwei weitere Aufreinigungsschritte ergänzt: eine vorgeschaltete Anionenaustauschchromatographie (AIEX) und eine nachgeschaltete Größenausschlusschromatographie (SE). In der vorgeschalteten AIEX wurden anionische Proteine aus dem Rohzelllysat abgetrennt. Dadurch wurden in der nachfolgenden AC zum einen unspezifische Bindungen von unerwünschten Proteinen reduziert und zum anderen die aktive Holoform des Enzyms mit Co^{2+} beziehungsweise Zn^{2+} als Cofaktor von der Apofom ohne Cofaktor abgetrennt. In der nachgeschalteten SE wurden eventuelle Restverunreinigungen, vor allem abgetrenntes MBP sowie die AcTEV Protease, abgetrennt.

Die Reihenfolge der ausgewählten Reinigungsschritte ergab sich aus den jeweiligen Bindungskapazitäten von AIEX und SE. Die AIEXS-Säule kann mit einem 8-fach höheren Volumen als die SE-Säule beladen werden. Die SE-Säule hingegen kann eine hohe Konzentration an Proteinen in nur 250 μL Probenvolumen trennen, selbst wenn diese wie im Falle der AHL-lactonasen mit 28-31 kDa und der AcTEV Protease mit 25 bis 27 kDa ähnliche Molekulargewichte besitzen. Durch diese dreistufige Aufreinigung war letztlich ein Reinheitsgrad von 99 % erreichbar. Vergleichsweise ist in der Literatur ein Reinheitsgrad von 95 %²⁹⁹ beschrieben. Dieser wurde durch eine zweistufige Aufreinigung, bestehend aus AC und anschließender AIEX, erzielt.

Anhand der Tertiärstruktur (Abbildung 74) von AiiA und AiiB ist zu erkennen, dass hier die *Random Coil* sowie die β -Faltblatt Strukturen dominieren und α -Helices zu einem geringeren Anteil in der Struktur vorhanden sind. Dies bestätigte die FT-IR/ATR Analyse der Proteine, mit welcher die Sekundärstrukturen von AiiB und BlcC untersucht wurden. Hierbei wurde anhand der Amid-I- und Amid-II-Bande für AHL-lactonasen ein niedrigerer α -Helix-Anteil von $11,4 \pm 2,2$ % für AiiB und $4,4 \pm 4,2$ % für BlcC sowie ein höherer Anteil an β -Faltblättern mit $36,2 \pm 2,9$ % für AiiB und $32,4 \pm 0,7$ % für BlcC ermittelt. Wang et. al.³²¹ ermittelten mit der linearen Dichroismus-Analyse für AiiA einen α -Helixanteil von 6,5 % und einen β -Faltblattanteil von 48,2 %.

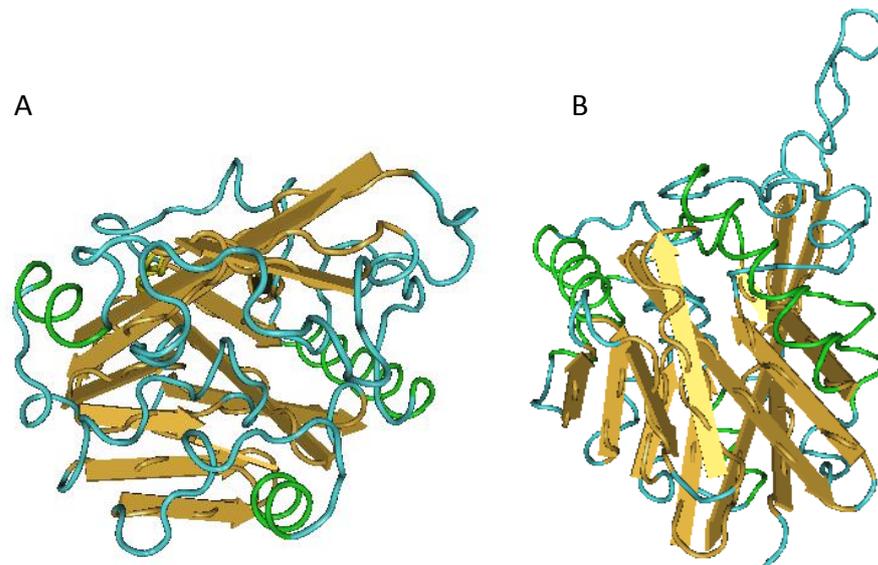


Abbildung 74: Tertiärstruktur von AiiA und AiiB

Basierend auf der Sequenzinformation von AiiB aus der Datenbank NCBI Entrez Protein (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mit der Referenznummer A9CKY2 wurde die Tertiärstruktur mit dem Programm Swiss-PdbViewer (aka DeepView; <http://www.expasy.org/spdbv>)¹³⁶ visualisiert. A) AiiA; B) AiiB; grün: α -Helix; braun: β -Faltblatt; hellblau: Random Coil

Die spezifische Aktivität von AiiB mit Zn^{2+} als Cofaktor und BlcC mit Co^{2+} als Cofaktor wurde mit dem Pyraninassay an drei verschiedenen Substraten, C6-HSL, C12-HSL und 3-oxo-HSL untersucht. BlcC zeigte für die Substrate C6-HSL und 3-oxo-HSL im Vergleich zu AiiB einen 4- bis 5-fach größeren Umsatz. Im ONPG- und im X-Gal-Assay zeigte BlcC im Vergleich zu AiiB ebenfalls stets die höhere Aktivität. Dies ist auf die unterschiedlichen Cofaktoren zurückzuführen. Thomas et. al.²⁹⁸ ermittelten für Co^{2+} als Cofaktor eine höhere spezifische Aktivität als für den Cofaktor Zn^{2+} . Für das Substrat C12-HSL wurden für AiiB und BlcC keine unterschiedlichen Aktivitäten beobachtet. Dies liegt an der geringeren Löslichkeit von C12-HSL in wässriger Lösung. Möglicherweise ist ein Teil des eingesetzten Substrates in der Assaylösung ausgefallen.

Der pH-Optimum-Bereich der AHL-lactonase-Aktivität liegt zwischen pH 6,0 und pH 9,0, das Optimum bei pH 8,0³²¹. Bei einem pH-Wert $<$ pH 4,0 ist die AHL-lactonase inaktiv. In diesem Bereich bleibt die Ringöffnung des AHL stabil: Bei pH-Werten $<$ 4,0 kann der geöffnete Lactonring sich spontan wieder schließen^{45, 260}. Eine Anwendung muss daher im optimalen pH-Bereich durchgeführt werden, auch um der spontanen Ringöffnung des Lactonringes entgegenzuwirken. Die mikrobiologische Bewertung der frei löslichen und immobilisierten AHL-lactonasen AiiB und BlcC wurde in einem Bereich von pH 7 bis pH 8 durchgeführt.

6.2 Immobilisierung der AHL-lactonasen unter Erhalt der spezifischen Aktivität

Zur Immobilisierung der AHL-lactonasen wurden drei verschiedene Strategien ausgewählt: Physisorption an Partikeln und Bindung der AHL-lactonasen an Maltose über ihr MBP-Tag, Chemisorption an amino- und carboxyfunctionalisierten Flächsubstraten sowie der Einschluss in ein PEG-DA-Hydrogel. Diese Systeme wurden entwickelt und charakterisiert, insbesondere wurde ihre Eignung zur proteinschonenden Immobilisierung der Enzyme unter Erhalt der spezifischen Aktivität sowie deren Freisetzungskinetik geprüft. Die Ergebnisse aus Kapitel 5.4 werden im Folgenden methodisch getrennt diskutiert, bevor sie in Kapitel 6.3.2 miteinander verglichen und hinsichtlich ihrer späteren Anwendung diskutiert werden.

6.2.1 Immobilisierung der AHL-lactonasen durch proteinschonende Methoden

Immobilisierung durch Physisorption

Die zwei maßgeblichen Mechanismen der Proteinadsorption über Physisorption sind die Bindung über ionische Wechselwirkungen und die Bindung an hydrophoben Materialien über relativ schwache Wechselwirkungen wie Van-der-Waals-Kräfte. Voraussetzung einer Immobilisierung über ionische Wechselwirkungen ist, dass Protein und Material gegenpolig geladen sind. Dies kann über den pH-Wert im Medium eingestellt werden. Bei einem pH-Wert unterhalb des isoelektrischen Punktes (pI) ist das Protein deprotoniert und positiv geladen. Das Molekül wird durch diese Ladung hydrophiler und adsorbiert bevorzugt auf hydrophilen, negativ geladenen Substraten. Im Gegensatz hierzu ist bei einem pH-Wert $>$ pI die Säuregruppe stärker dissoziiert und das Molekül insgesamt negativ geladen; es adsorbiert bevorzugt auf hydrophoben, positiv geladenen Materialien.

Es wurde gezeigt, dass bei einem $\text{pH} < \text{pI}$ mehr Lysozym auf pMA-EGDMA, PS-AA, $\text{Al}(\text{OH})_3$ und KSG adsorbiert als bei der Bedingung $\text{pH} > \text{pI}$. Dies lässt auf eine Bindung der Enzyme über ionische Wechselwirkungen schließen. Bei $\text{Ca}_5[\text{OH}(\text{PO}_4)_3]$ und SiO_2 wurde nur ein sehr geringer, zu vernachlässigender Einfluss des pH-Wertes auf die immobilisierte Proteinmenge beobachtet. Bei diesen Bedingungen wurde für diese beiden die am wenigsten negativen Zeta-Potentiale ermittelt. Die Immobilisierung von Protein an SiO_2 beruht daher vermutlich auf hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Proteinbereichen und den Siloxangruppen.

Die immobilisierte Proteinmenge ist in erster Linie von der zur Immobilisierung zur Verfügung stehenden spezifischen BET-Oberfläche abhängig: Je größer die BET-Oberfläche, desto mehr Proteinmoleküle können adsorbieren. Dennoch besteht bei einer hohen

Enzymbeladung der Partikel nur eine geringe Aktivität der immobilisierten Enzyme. Diese Aktivitätsdifferenz zur theoretisch möglichen Aktivität bei hoher Beladung mit aktivem Enzym ist auf verschiedene Ursachen zurückzuführen: eine Limitierung der Diffusionsgeschwindigkeit der Enzymsubstratmoleküle, die Verteilung der Enzymmoleküle auf dem Material, eine Denaturierung des Enzyms und eine mögliche sterische Hinderung des aktiven Zentrums des Enzyms durch eine Konformationsänderung. Hierbei wird der Aktivitätsverlust vor allem durch eine Konformationsänderung verursacht, die sich weiter auch als vollständige Denaturierung des Proteins auswirken kann. Insbesondere die Adhäsion von Proteinen auf anorganischen Oberflächen führt zu einer signifikanten Reduzierung des α -Helix-Anteils und zu einer Erhöhung des β -Faltblatt-Anteils¹⁶⁴.

Immobilisierung durch Chemisorption

Zur kovalenten Anbindung von Proteinen auf Glasträgern wurden zunächst funktionelle Gruppen auf diesen Oberflächen erzeugt: Epoxidfunktionen zur Anbindung von Maltose, Amino- und Carboxyfunktionen zur kovalenten Bindung von AiiB und BlcC sowie Methacrylatfunktionen zur Oberflächenbindung von PEG-DA-Hydrogelen.

Hierzu wurden die Flachsubstrate zunächst gereinigt und an ihnen oberflächennahe OH-Gruppen erzeugt, an welchen die jeweiligen Silane adsorbierten. Es wurden in erster Linie reaktive Alkoxysilane (APTES, GOP und TESPMA) verwendet. Diese kondensieren nicht nur an der Oberfläche und bildeten dort Siloxanbindungen, sondern sie kondensieren zum Teil bereits in der Lösung miteinander zu Oligomeren bevor sie an der Oberfläche kondensieren. Hierdurch entstehen Inhomogenitäten in der Beschichtung, die sich beispielsweise bei den betrachteten Schichten in großen Standardabweichungen der Kontaktwinkelbestimmung äußerten.

Für GOP-Schichten wurde eine Schichtdicke von $1,9 \pm 0,5$ nm ermittelt. Dieser Wert liegt über der theoretischen Schichtdicke von $0,85 \pm 0,15$ nm für eine Monolage^{207, 306}. Der Vorrückkontaktwinkel mit $47,2 \pm 1,7^\circ$ liegt unterhalb der Literaturwerte für geordnete Schichten mit $51-52^\circ$ ^{207, 306}. Es liegt daher nahe, dass es sich bei der erzeugten GOP-Schicht um eine Monolage mit Inhomogenitäten handelt.

Für Monolagen aus APTES wurden Schichtdicken von 0,4 bis 0,5 nm und ein Vorrückkontaktwinkel von $40-42^\circ$ ^{207, 305} in der Literatur beschrieben. Durch hydrophobe Verunreinigungen wurde hier ein Kontaktwinkel von 70° nachgewiesen werden²⁸⁷. Die erzeugten APTES-Schichten mit einer Schichtdicke von $1,3 \pm 0,2$ nm und einem Vorrückkontaktwinkel von $73,1 \pm 2,3$ bestehen aus dickeren und vermutlich ungeordneten Schichten mit hydrophoben Verunreinigungen.

Da es sich bei der Schichtdicke für CTEMs mit $2,1 \pm 0,7$ nm und dem Vorrückkontaktwinkel mit $72,9 \pm 1,1^\circ$ um ähnlich hohe Werte handelt, sind es hier ebenfalls dickere und vermutlich ungeordnete Schichten mit hydrophoben Verunreinigungen. Dies gilt auch für TESMPA mit einer Schichtdicke von $2,9 \pm 0,8$ nm. Der erhöhte Kontaktwinkel von $53,8 \pm 2,9^\circ$, im Vergleich zum Literaturwert von 46° ²⁴², unterstützt diese Annahme.

Durch die in dieser Arbeit angewandte Silanisierungsmethode entstehen generell dicke und ungeordnete Schichten. Hierbei handelt es sich jedoch um ein generelles Problem bei der Silanisierung aus der Flüssigphase. Die ermittelten Belegungsdichten unterstützen diese Annahme: Durch Oligomerbildung kann auf der Oberfläche an einer Silanolgruppe mehr als ein Alkoxyasilan binden, welches wiederum mehrere funktionelle Gruppen an der Oberfläche präsentieren kann. Diese Oligomerbildung ist auf die lange Reaktionszeit von einer Stunde zurückzuführen. Je länger die Reaktionszeit, desto wahrscheinlicher ist die Oligomerbildung der Silane in Lösung, die sich im Weiteren auf der Oberfläche abscheiden.

Einschluss in ein Hydrogel

Während der Photopolymerisation von PEG-DA greift das reaktive Methylradikal die terminale C=C Bindung der Methacrylatfunktion an, wodurch im weiteren Reaktionsverlauf das Netzwerk des Hydrogels ausgebildet wird. Bei einer UV-Bestrahlungsdauer von nur 3 Sekunden ist die fortschreitende radikalische Reaktion diffusionslimitiert; nur direkt benachbarte Reaktionspartner reagieren miteinander. Entsprechend bleiben bei erhöhter Konzentration, das heißt erhöhtem Polymergehalt in der Polymerisationslösung, weniger nicht reagierte Makromermoleküle zurück. Je stärker die Makromermoleküle untereinander vernetzt sind, desto ausgeprägter sind die mechanischen Eigenschaften des Hydrogels, es ist weniger brüchig, und desto weniger quillt das Hydrogel^{14, 16}.

Zwei Faktoren beeinflussen das Wasseraufnahmevermögen und den Quellgrad: der Polymergehalt und das Molekulargewicht. Die Wasseraufnahme im Hydrogel erfolgt über die PEG-Ketten, an die Wassermoleküle binden und zu einer Volumenzunahme führen. Ein erhöhtes Molekulargewicht wird durch eine höhere Anzahl an PEG-Wiederholungseinheiten erreicht, daher quellen Hydrogele aus PEG-DA mit einem hohen Molekulargewicht stärker. Ein erhöhter Polymeranteil führt zunächst zu einer stärkeren Vernetzung des Hydrogels, die Polymerketten sind dadurch unflexibler und lagern, bedingt durch die Anordnung im Raum, weniger Wassermoleküle an. Der Wassergehalt im Hydrogel ist von entscheidender Bedeutung für die Proteinfreisetzung. Das Wasser ist das Transportmedium, in das die Proteine aus dem Hydrogel diffundieren.

Mit der Maschenweite werden die physikalischen Eigenschaften von Hydrogelen charakterisiert. Sie beschreibt den Raum zwischen zwei Querverbindungen, die dem Protein zur Diffusion zur Verfügung stehen. Mit zunehmender Vernetzung eines Hydrogels schrumpft dieser Raum. Es ist nur eine begrenzte Anzahl an Proteine einlagerbar und ihre Diffusion ist behindert. Umgekehrt kann eine zu große Maschenweite das Protein nicht zurückhalten. Das Protein wird sehr zügig in hoher Konzentration in einem kurzen Zeitraum, dem so genannten „initial burst“, freigesetzt. Darüber hinaus limitiert die Maschenweite die Größe des Proteins, welches im Hydrogel eingeschlossen wird.

Mit zunehmender Anzahl der Querverbindungen des Hydrogels, hier erzielt über die Variation der Polymerkonzentration, steigt der Wert des Speichermoduls an; die Hydrogele zeigen eine höhere mechanische Stabilität¹³⁴. Hydrogele mit einer geringeren mechanischen Stabilität lassen sich durch eine Reduzierung der Querverbindungen erreichen, beispielsweise durch einen geringeren Polymergehalt oder durch ein höheres Molekulargewicht. Für alle untersuchten Hydrogele sind die Elastizitätsmodule um eine Zehnerpotenz größer als die zugehörigen Viskositätsmodule. Dies deutet darauf hin, dass die photovernetzten Hydrogele sich wie sehr weiche viskoelastische Feststoffe verhalten³⁵¹. Sie speichern die aufgebene mechanische Energie, wie durch die Strömung in einem Fließsystem, und setzen sie nur langsam um. Im Frequenzdurchlauf zeigt sich der Speichermodul der untersuchten Hydrogele nahezu unabhängig von der aufgegebenen oszillatorischen Frequenz. Dieses Verhalten ist typisch für kovalent verknüpfte Netzwerke¹⁷⁴.

Durch eine Beladung der Hydrogele mit Proteinen verändern sich deren mechanische Eigenschaften. Die Werte der Speichermodule verringern sich, der linear-viskos-elastische Bereich verkürzt sich und die Elastizitätsmodule erhöhen sich. Sind Proteine während der Polymerisation des PEG-DA-Netzwerkes zugegen, reagieren reaktive Acrylatgruppen nicht nur miteinander, sondern auch mit den Proteinen, vor allem mit den enthaltenen Lysin-, Cystein- und Methioninresten. Hierdurch verringern sich die Querverbindungen und durch die entstehenden Fehlstellen verliert das Hydrogel an mechanischer Stabilität.

Die proteinschädigende Wirkung von UV-licht beruht im Wesentlichen auf der Photoionisation der aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin. Hierdurch entstehen freie aromatische Radikale. Cystein ist aufgrund seiner Thiolgruppe ebenso sensibel gegen UV-Bestrahlung. In Anwesenheit von Acrylgruppen können die Sulfhydrylgruppen in der Seitenkette von Cystein bei UV-Bestrahlung miteinander reagieren³⁵⁵. Diese Effekte können die Proteine denaturieren und in ihrer Funktion beeinträchtigen. In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass eine UV-Bestrahlungsdauer von 3 Sekunden mit 15 mW/cm^2 auf die untersuchten Enzyme kaum denaturierende Wirkung besitzt. Die spezifische Aktivität der

Enzyme ist hierdurch kaum beeinträchtigt, die hier gewählten Polymerisationsbedingungen dürfen folglich als proteinschonend betrachtet werden.

6.2.2 Freisetzungsraten eingesetzter Immobilisierungsmethoden

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Ermittlung und des Vergleichs der Freisetzungsrates der Immobilisierungsmethoden diskutiert. Bei der chemisorptiven Immobilisierung ist per Definition aufgrund der kovalenten Bindung eine Freisetzung nicht möglich, daher liegt der Fokus auf der Desorption der physisorptiv immobilisierten Proteine und der Freisetzung von Proteinen, welche in einer polymeren Matrix eingeschlossen sind.

In dem hier ausgewählten Versuchsaufbau zur Untersuchung der Desorption von Lysozym, welches auf unterschiedlichen partikulären Materialien physisorbierte, wurde *in vitro* der „worst case“-Fall nachgestellt: Zwischen adsorbierten und desorbierten Enzymen bildet sich ein dynamisches Gleichgewicht aus²²⁵. Indem nach jedem Messzeitpunkt der proteinenthaltende Überstand abgenommen und durch proteinfreies PBS ersetzt wurde, desorbierte stets die maximal mögliche Proteinkonzentration je Zeiteinheit, um das dynamische Gleichgewicht zwischen immobilisiertem und frei löslichem Enzym zu erhalten. Die Desorption der Enzymmoleküle wird hierbei von der Diffusion getrieben, die proportional dem Konzentrationsgradienten zwischen Probe und Umgebungsmedium ist²⁰⁹.

Der desorbierbare Anteil des immobilisierten Lysozyms war mit weniger als 12 % für eine Adsorption mit $\text{pH} < \text{pI}$ und mit weniger als 30 % für eine Adsorption mit $\text{pH} > \text{pI}$ gering. Der größte Anteil des immobilisierten Lysozym wird durch relativ starke Wechselwirkungen wie beispielsweise ionische Wechselwirkungen am Material gebunden. Die Desorptionscharakteristika der immobilisierten Enzyme sind abhängig von der Stabilität der Bindung und daher in der Anwendung nur bedingt kontrollierbar. Sie werden vor allem von den Umgebungsbedingungen des Lösungsmittels, wie der Ionenstärke oder dem pH-Wert, beeinflusst^{46, 107}. In der praktischen Anwendung ist es oftmals nicht möglich, optimale Umgebungsbedingungen einzustellen. Die Freisetzungsrates könnte in dem Fall beispielsweise durch eine erhöhte Beladung der Partikel verändert werden.

Die Desorption bestand bei allen untersuchten Materialien zunächst aus einer „initial burst“-Phase, einer Phase mit verstärkter Desorption, der eine Phase mit konstanter Freisetzungsrates folgte. Nach etwa 50 Stunden Inkubation (vier bis sieben Medienwechsel) war nahezu das gesamte immobilisierte Enzym freigesetzt. Die Anfangsphase mit der hohen Freisetzungsrates ist für die Fälle, in denen eine hohe Anfangsdosis gewünscht ist, ideal. Gerade für den Einsatz in Fließsystemen eignet sich dieses Verhalten jedoch nicht, da der Wirkstoff in viel zu kurzer Zeit desorbiert und das System seine Wirkung verlieren würde.

Der Vergleich der Desorption von Lysozym, welches auf den ausgewählten Materialien bei unterschiedlichen pH-Werten während der Adsorption, $pI < pH$ und $pI > pH$, adsorbiert wurde, zeigte, dass, mit Ausnahme von PS-AA und KSG, ein $pH < pI$ die größere Lysozym-Freisetzungsmenge aufwies. Bei diesem pH-Wert nimmt die Dissoziation der Säuregruppe von Lysozym ab und die Aminogruppe trägt eine positive Summenladung.

Unabhängig vom pH-Wert während der Desorption zeigte Lysozym, welches auf pMA-EGDMA immobilisiert wurde, ähnliche Kurvenverläufe mit vergleichbar freigesetzten Gesamtmengen. Lysozym desorbierte hier hauptsächlich in der „initial burst“-Phase. Dieses Verhalten deutet auf schwache Wechselwirkungen wie beispielsweise Wasserstoffbrückenbindungen oder Van-der-Waals-Bindungen zwischen Lysozym und dem Ethylenglykol des pMA-EGDMA, hin. Daher eignet sich pMA-EGDMA als Trägermaterial zur adsorptiven Immobilisierung von Lysozym.

$Al(OH)_3$ ist als Adsorptions- und Desorptionsmaterial eher ungeeignet. Zum einen wurde nur ein geringer Anteil Lysozym gebunden und dieser wurde im Weiteren nur in sehr geringem, nahezu vernachlässigbarem Maß freigesetzt. Ebenso sind $Ca_5[OH](PO_4)_3$ und KSG aufgrund der nur geringen desorbierbaren Proteinmenge eher ungeeignet.

Die Freisetzungsraten von adsorptiv immobilisiertem Enzym und Enzym, welches in einer polymeren Matrix eingeschlossen ist, wiesen zum Teil ähnliche Verläufe auf: eine „initial burst“-Phase zu Beginn der Freisetzung, welche im weiteren Verlauf in eine gleichmäßige Freisetzung überging. Im Gegensatz zur adsorptiven Immobilisierung, bei der diese nur bedingt kontrollierbar ist, ist die Freisetzung jedoch bei dem Hydrogel durch eine geeignete Kombination zwischen Maschenweite und hydrodynamischem Radius des Enzyms steuerbar. Diese Art der Freisetzung ist häufig diffusionskontrolliert und über die Herstellungsparameter des Hydrogels wie Polymergehalt und Maschenweite steuerbar²¹⁵.

Der Bereich, welcher durch Polymerketten und deren Quervernetzungen eingegrenzt ist, das so genannte Netzwerk des nicht porösen Hydrogels, ist der Bereich, welcher zur Beladung mit Protein zur Verfügung steht. Damit das Protein ungehindert aus dem Hydrogel diffundieren kann, muss die Maschenweite des Netzwerkes größer als der hydrodynamische Radius des zu immobilisierenden Proteins sein. Bei geeigneter Kombination von Maschenweite des Hydrogels und hydrodynamischem Radius des Proteins war eine Freisetzung von bis zu 200 Tagen erzielbar. Aus der Literatur sind Freisetzen von bis zu 100 Tagen für PEG-DA-Hydrogele bekannt²¹⁵.

In dieser Arbeit wurde das Protein bereits in die Polymerisationslösung des Hydrogels zugegeben; es lag bereits während der Ausbildung der Polymerketten und der Quervernetzungen vor. Dadurch verringert sich die Bildung der Quervernetzungen und führt zu einem heterogenen Netzwerk²⁸⁴. Protein, welches kovalent an das Hydrogel über die

Michael-Addition zwischen Lysinresten und den Acrylatgruppen des Polymers²¹⁵ gebunden wird, führt ebenfalls zu Unregelmäßigkeiten in der Hydrogelstruktur. Diese Inhomogenität des Hydrogels begünstigt die „initial burst“-Freisetzung des Proteins¹⁶⁰.

Es wurde eindeutig ein Zusammenhang zwischen geringerer Maschenweite, aufgrund von erhöhtem Makromeranteil in der Polymerisationslösung und verminderter Freisetzung des Proteins ermittelt. Hierbei eignen sich stärker vernetzte Hydrogele zur kontrollierten Freisetzung von Proteinen eher als geringer vernetzte, da sie bei verkürzter „initial burst“-Phase die eingeschlossenen Proteine über einen längeren Zeitraum mit gleichbleibender Freisetzungsrage abgeben.

Der Verlauf der Freisetzungskurven, die „initial burst“-Phase mit nachfolgender kontinuierlicher Freisetzung, ist typisch für Proteine, welche sich im hydrophilen PEG-Bereich oder im hydrophoben Bereich von Hydrogelen mit einem geringen Vernetzungsgrad befinden⁵⁴. Das Protein kann aus diesen Bereichen diffundieren, ein Abbau der Hydrogelmatrix ist hierfür nicht notwendig.

Der dem Freisetzungsverhalten zugrunde liegende Mechanismus wurde mit der Power-law-Gleichung bestimmt. Hierzu mussten folgende Annahmen getroffen werden: homogene Verteilung des Proteins im Hydrogel und vorhandener Konzentrationsgradient des Proteins⁷. Mit einem Freisetzungsexponenten $n < 0,45$ sind alle vorgestellten Systeme in ihrer Freisetzung unabhängig von der Quellung des Hydrogels.

Die hier vorgestellten Hydrogelsysteme eignen sich daher als Wirkstoffdepot für AHL-lactonasen. Über die Maschenweite, welche auf die hydrodynamischen Radien der AHL-lactonasen eingestellt werden kann, ist das Freisetzungsverhalten kontrolliert steuerbar.

6.3 Wirkung immobilisierter AHL-lactonasen auf das QS-abhängige Verhalten

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war es, Oberflächenbeschichtungen und Formulierungen mit biofilmverhindernden Eigenschaften für unterschiedliche praktische Anwendungen zu entwickeln und zu bewerten. In bisherigen Arbeiten von Dong^{96, 98}, Park²⁴⁴, Ulrich³⁰⁹, Reimann²⁶⁵ und Wang³²³ wurde die Wirkung von AHL Lactonasen jedoch nur an ausgewählten Zielorganismen gezeigt, in denen entsprechende Gene kloniert wurden (siehe Kapitel 6.1.1). Daher war es für eine spätere Anwendung zunächst notwendig, die Wirkung frei löslicher AHL-lactonasen zu prüfen. Daher wurde das speziesunabhängige Wirkungsspektrum, die Wirkung auf die Biofilmbildung und die Produktion von Virulenzfaktoren, von AiiB und BlcC untersucht. Hierzu wurden verschiedene Gram-negative Bakterien, die ihr natürliches Vorkommen im Wasser haben ausgewählt. Nachfolgend wurde die Wirkung von immobilisiertem AiiB und BlcC auf die Biofilmbildung von *P. aeruginosa* PAO1 und

die Produktion von Virulenzfaktoren beispielhaft für Pyocyanin, Pyoverdin und Rhamnolipide bewertet.

6.3.1 Speziesunabhängiges Wirkspektrum der AHL-lactonasen

In Kapitel 5.6 wurde untersucht, ob AHL-lactonasen die Biofilmbildung von ausgewählten Gram-negativen Bakterien, die in der Anlage 3 zu §7 der Trinkwasserverordnung (TrinkwV) 2011 gelistet sind und ihr natürliches Vorkommen im Wasser haben, vermindern. Hierzu wurden unterschiedliche Bakterienspezies, Gram-negative, Gram-positive und QS-Deletionsmutanten, eingesetzt. Die Auswahl richtete sich entsprechend ihrem Vorkommen: Wasser- und Bodenkeime sowie Enterobakterien, die bei einem Vorkommen im Wasser auf eine fäkale Verunreinigung hindeuten.

Es zeigte sich, dass AiiB und BlcC die Biofilmbildung der Gram-negativen Bakterien der *Pseudomonaden* sp., *P. aeruginosa*, *P. pseudoalcaligenes* und *P. fluorescens* sowie *C. violaceum* verminderten. Für die Gram-negativen Enterobakterien *P. mirabilis*, *E. aerogenes* und *E. coli* konnte ebenso kein Einfluss der AHL-lactonasen auf die Biofilmbildung ermittelt werden wie auch für die QS-deletierten Mutanten *C. violaceum* CV026 und *E. coli* Δ luxS sowie dem Gram-positiven Stamm *S. lutea*. Dies liegt an den Unterschieden der untersuchten Organismen und ihrer QS-Systeme, welche auf unterschiedlichen Signalmolekülen basieren. So nutzen Pseudomonaden QS-Systeme basierend auf unterschiedlichen AHL und *LasI/lasR*-Homologen und/oder *RhlI/RhlR*-Homologen. Daher wirken AHL-lactonasen in Stämmen dieser Familie, wohingegen sie bei *E. coli*, welcher mittels AI-2 und AI-3 kommuniziert, keine Wirkung haben.

Tabelle 34: Spezifische Aktivität von AiiA und BlcC gegenüber unterschiedlichen Signalmolekülen

Signalmolekül	AiiA (%) ³²¹	AiiB (%) ⁵⁰	AiiB Zn ²⁺ (%) ²⁰⁴	SsPox (%) ²²⁹
3-oxo-C8-HSL	100	100	100	100
C4-HSL	110,9	527	26*	0,3*°
C6-HSL	124,5	27	107	nicht getestet
3-oxo-C12-HSL	97,2	36	nicht getestet	83
AI-2	nicht getestet	nicht getestet	nicht getestet	nicht getestet

* im Gegensatz zu den reinen S-Enantiomeren von 3-oxo-C8-HSL und C6-HSL wurde für C4-HSL ein Racematgemisch verwendet; es wird angenommen dass R-Enantiomere hierbei nicht umgesetzt werden
° C4-HSL war nur bedingt löslich; die Bestimmung der Spezifität wurde lediglich abgeschätzt.

AHL-lactonasen öffnen stets den Lactonring unterschiedlicher Acylhomoserinlactonderivate. Hierbei variiert die spezifische Aktivität der AHL-lactonase mit der Kettenlänge der Fettsäure und der Substitution am ersten und am dritten Kohlenstoffatom³²¹ (siehe Tabelle 34). AiiA setzt beispielsweise bevorzugt unsubstituierte AHL um, wobei es für C6-

HSL die höchste spezifische Aktivität besitzt. Tabelle 34 listet nach Wang et. al.³²¹, Cao et. al.⁵⁰, Liu et. al.²⁰⁴ und Ng. et. al.²²⁹ die spezifischen Aktivitäten der AHL-lactonasen AiiA, AiiB und SsPox gegenüber ausgewählten Signalmolekülen auf. Zu beachten ist hierbei, dass der Wert von AiiB und SsPox für C4-HSL sehr gering ist. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei den anderen untersuchten AHL reine S-Enantiomere verwendet wurden, wohingegen bei C4-HSL ein Racematgemisch eingesetzt wurde. Es wird vermutet, dass R-Enantiomere nicht umgesetzt werden, wodurch die Spezifität erheblich herabgesetzt wird.

Betrachtet man nun weiter die QS-Systeme und die genutzten Signalmoleküle der untersuchten Bakterienspezies (siehe Tabelle 35), werden die Ergebnisse der Untersuchung zum speziesunabhängigen Wirkspektrum der AHL-lactonasen verständlich. *P. aeruginosa* besitzt beispielsweise zwei parallele Systeme, *RhlI/RhlR* und *LasI/lasR* mit C4-HSL und 3-oxo-C12-HSL als Signalmoleküle³¹⁴. Die QS-Systeme von *P. pseudoalcaligenes* und *P. fluorescens* wurden in der Literatur bisher noch nicht untersucht, jedoch basiert das QS von *Pseudomonaden* sp. auf unterschiedlichen AHL³¹⁴. Diese Signalmoleküle werden durch AHL-lactonasen abgebaut, was wiederum die Biofilmbildung negativ beeinflusst.

Tabelle 35: Quorum Sensing-Systeme der untersuchten Bakterienspezies

Bakterienspezies	QS-System	Signalmolekül	Referenz
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Tral/TraR</i>	3-oxo-C8-HSL	163, 256, 354
<i>C. violaceum</i>	<i>CviI/CviR</i>	C6-HSL	58, 212
<i>C. violaceum</i> CV026 (Δ CviI)	-	-	212
<i>E. aerogenes</i>	<i>LuxI/luxR</i> -Homologe	Diketopiperazin, reagiert schwach auf AHL	19, 290, 320
<i>E. coli</i>	<i>LuxS/SdiA</i>	AI-2, AI-3	319, 343
<i>E. coli</i> Δ luxS	-	-	hausintern
<i>P. mirabilis</i>	<i>LuxS/?</i>	AI-2, möglicherweise C4-HSL (noch nicht abgeklärt)	281
<i>P. aeruginosa</i>	<i>LasI/lasR</i>	3-oxo-C12-HSL	82, 84, 191,
	<i>RhlI/RhlR</i>	C4-HSL	250, 251
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	nicht bekannt	nicht bekannt	-
<i>P. fluorescens</i>	nicht bekannt	nicht bekannt	-
<i>Pseudomonaden</i> sp.	<i>LasI/lasR</i> -Homologe und/oder <i>RhlI/RhlR</i> -Homologe	unterschiedliche AHL	315
<i>S. lutea</i> alias <i>Micrococcus</i> sp.	nicht bekannt; möglicherweise <i>agr</i> Locus	Zyklische Dipeptide (Rpf)	224,342

Die Zell-Zell-Kommunikation Gram-negativer Bakterien basiert generell auf verschiedenen AHL als Signalmoleküle. *E. aerogenes*, *E. coli* und *P. mirabilis* sind hier jedoch Ausnahmen: *E. aerogenes* kommuniziert mit Hilfe von Diketopiperazin^{19, 290, 320}, *E. coli* über

AI^{319, 343} und *P. mirabilis* über AI-2²⁸¹. Das Gram-positive Bakterium *S. lutea* nutzt hingegen zyklische Dipeptide zur intraspezies-spezifischen Kommunikation²²⁴. All diese Signalmoleküle werden von AHL-lactonasen nicht abgebaut, infolge dessen reduziert sich die Biofilmbildung dieser Stämme durch AHL-lactonasen nicht.

Neben der Biofilmbildung wurden weitere Virulenzfaktoren wie die Bildung von Siderophoren, Rhamnolipiden und Violacein sowie das Schwimm- und Schwarmverhalten betrachtet. Es zeigte sich, dass der Einfluss durch die AHL-lactonasen auf die Biofilmbildung bei *P. aeruginosa* PAO1 im Vergleich zu dem Einfluss auf weitere untersuchte Virulenzfaktoren geringer ist, wohingegen bei *C. violaceum* die Biofilmbildung und die Bildung von Violacein in gleichem Maße durch AiiB und BlcC beeinflussbar war. *P. mirabilis* wurde in seinem Schwimm- und Schwarmverhalten im Gegensatz zu seiner Biofilmentstehung gestört. Dies äußerte sich in den eingesetzten Konzentrationen an AiiB und BlcC: So war beispielsweise zur Beeinflussung der Biofilmbildung von *P. aeruginosa* eine Konzentration von 8 µg/ml AHL-lactonasen nötig, wohingegen das Schwimm- und Schwarmverhalten bereits von 2,5 µg/ml behindert wurde. Tabelle 36 zeigt die QS-Regulation, das Signalmolekül und das QS-System der untersuchten Virulenzfaktoren.

Tabelle 36: Regulation verschiedener Virulenzfaktoren durch QS

Virulenzfaktor	Bakterienspezies	QS-System	Signalmolekül	Referenz
Biofilmbildung	<i>C. violaceum</i>	<i>CviI/CviR</i>	C6-HSL	320,321
Biofilmbildung	<i>P. mirabilis</i>	<i>LuxS/?</i>	AI-2, möglicherweise C4-HSL (noch nicht abgeklärt)	281
Biofilmbildung	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 <i>P. aeruginosa</i> PA14	<i>LasI/lasR</i>	3-oxo-C12-HSL	171,182,184
Pyochelin	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>RhlI/RhlR</i> (PQS)	C4-HSL	40, 68
Pyocyanin	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>RhlI/RhlR</i>	C4-HSL	17, 68
Pyoverdin	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>RhlI/RhlR</i> (PQS)	C4-HSL	40, 68
Rhamnolipide	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>RhlI/RhlR</i>	C4-HSL	17, 252,183
Schwärmen (Typ IV Pili)	<i>P. aeruginosa</i> PA14	<i>RhlI/RhlR</i>	C4-HSL	183
Schwärmen	<i>P. mirabilis</i>	<i>LuxS/?</i>	AI-2	79, 281
Schwimmen (Flagellae)	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>LasI/lasR</i>	3-oxo-C12-HSL	183, 233
Schwimmen	<i>P. mirabilis</i>	<i>LuxS/?</i>	AI-2	281
Violacein	<i>C. violaceum</i>	<i>CviI/CviR</i>	C6-HSL	320,321

Hieraus wird ersichtlich, dass die Biofilmbildung in *P. aeruginosa* PAO1 und PA14 durch *LasI/lasR* und 3-oxo-C12-HSL als Signalmolekül gesteuert wird, wohingegen die anderen untersuchten Virulenzfaktoren wie Pyochelin, Pyocyanin, Pyoverdin und Rhamnolipide sowie das Schwimm- und Schwarmverhalten durch *RhlI/RhlR* und C4-HSL gelenkt werden. AHL-lactonasen besitzen diesen Signalmolekülen gegenüber unterschiedliche spezifische Aktivitäten (siehe Tabelle 34 Seite 174): AiiA setzt beispielsweise bevorzugt C4-HSL und C6-HSL um. Dies bedeutet, dass bei gleicher Konzentration der AHL-lactonase die Wirkung auf C4-HSL gesteuerte Virulenzfaktoren wie Siderophore und Rhamnolipide sowie das Schwimm- und Schwarmverhalten stärker ausgebildet ist als die Wirkung auf Virulenzfaktoren, welche durch 3-oxo-C12-HSL gelenkt werden, wie beispielsweise die Biofilmbildung.

C. violaceum verfügt lediglich über ein QS-System, das die Biofilmbildung und die Produktion von Violacein in gleichem Maße regelt. Daher wurden diese durch die Zugabe von AHL-lactonasen in gleichem Ausmaß gestört. *P. mirabilis* hingegen kommuniziert nach Literaturangaben mit AI-2 als Signalmolekül²⁸¹. Dies erklärt, dass AHL-lactonasen auf dessen Biofilmbildung keinen Einfluss besaßen. Schneider et. al. vermutet, dass dieser Stamm möglicherweise über das Signalmolekül C4-HSL kommuniziert²⁸¹. Die Beeinflussung seines Schwimm- und Schwarmverhaltens durch AiiB und BlcC ist ein weiteres Indiz hierfür.

6.3.2 Wirkung der immobilisierten AHL-lactonasen auf das QS

Ng. et. al.²²⁹ verfolgten den Ansatz der adsorptiven Immobilisierung. Sie immobilisierten SsoPox, eine Phosphotriesterase-ähnliche Lactonase über ionische Wechselwirkungen an einer positiv geladenen Membran aus Aluminiumfasern zum Einsatz in der Trinkwasseraufbereitung als Filtermaterial. Die Membranen, beladen mit 71 µg/cm² SsPox, reduzierten signifikant die Produktion von Virulenzfaktoren wie Pyocyanin und Elastase in *P. aeruginosa* PAO1. Hierbei handelt es sich derzeit um die einzige veröffentlichte Untersuchung zur Immobilisierung von AHL-lactonasen. Im Vergleich hierzu sind die in dieser Arbeit beschriebenen Immobilisierungen von AHL-lactonasen zur Biofilmvermeidung und zur Reduzierung von Virulenzfaktoren völlig neu.

In den vorangehenden Kapiteln wurden die Immobilisierungsmethoden auf ihre Proteinschonung unter Verwendung der Modellenzyme wie Lysozym, Subtilisin und BSA sowie die AHL-lactonasen AiiB und BlcC bezüglich ihrer Wirkung auf das *Quorum Sensing* untersucht und diskutiert. Im Folgenden wurden AHL Lactonasen mit geeigneten Methoden immobilisiert und deren Wirkung auf die Biofilmbildung sowie die Produktion von Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* PAO1 untersucht.

Die Versuchsdurchführung wurde, mit Ausnahme der über ein *Tag* an Maltose gebundenen AHL-lactonasen, stets mit den gleichen Parametern durchgeführt. Zur Nachstellung des Worst-Case-Falles wurden optimale Wachstumsbedingungen für das Zellwachstum hinsichtlich Bakterienlast, Temperatur und Nährstoffangebot ausgewählt. Diese Bedingungen sind in realen Systemen in der Anwendung nur in den seltensten Fällen gegeben. Es darf davon ausgegangen werden, dass Immobilisierungen, welche unter diesen Bedingungen biofilmverhindernde Eigenschaften zeigen, dies auch im Anwendungsfall gewährleisten.

Es wurde eine Bakterienzahl von 10^8 Zellen/ml ($6,9 \times 10^7$ Zellen/cm²) beziehungsweise 10^{10} Zellen/ml ($6,9 \times 10^7$ Zellen/cm²) im Fall der über Maltose gebundenen AHL-lactonasen eingesetzt. Hierbei handelt es sich um eine hohe punktuelle Bakterienlast. In der Anwendung, in technischen wasserführenden Systemen, in denen noch keine Biofilmbildung stattfand, sind wesentlich niedrigere Bakterienzahlen zu erwarten. Typische Werte für bereits stark kontaminierte Rohrleitungen betragen im Trinkwasser $1,9 - 5,6 \times 10^5$ Zellen/ml und $4,1 - 2,0 \times 10^8$ Zellen/cm² an den Rohrrinnenflächen¹¹³.

Die Inkubationstemperatur von 37 °C ist für reale Systeme, wie zum Beispiel der Trinkwasseraufbereitung, unüblich. Hier herrschen wesentlich niedrigere Temperaturen vor, die das Bakterienwachstum zusätzlich hemmen. Dennoch ist ein Einsatz von AHL-lactonasen möglich, da sie über einen Temperaturbereich von 6 °C bis 40 °C aktiv sind³²¹.

In der Versuchsdurchführung wurde das Standard LB-Medium verwendet. Dies ist ein Komplexmedium mit Peptiden, Vitaminen, Spurenelementen und Mineralien, das bei der Anzucht von Bakterien das optimale Wachstum gewährleistet. Solche Bedingungen sind ebenfalls in realen wasserführenden Systemen zur Gewinnung, zur Aufbereitung, zum Transport, zur Lagerung und zur Nutzung von Wasser eher unüblich – meist herrscht dort Nährstoffarmut.

Durch den gewählten Versuchsaufbau einer 96-Multiwellplatte mit einem Calgary Biofilm Device⁵⁵ konnten unterschiedliche Kompartimente untersucht werden: Erstens wurde der direkte Einfluss der biofilmvermeidenden Oberflächenbeschichtung auf die metabolische Aktivität des Biofilms am Boden der 96-Multiwellplatte untersucht. Zum zweiten wurde die Wirkung der immobilisierten AHL-lactonasen auf die Biofilmmasse im Umfeld der Beschichtung beziehungsweise der Formulierung betrachtet. Drittens wurde die Wirkung der AHL-lactonasen auf die Produktion der sekretierten Virulenzfaktoren aller in der Kavität vorhandenen Bakterien analysiert. Hieraus konnten Schlüsse über die direkte und die mittlere Fernwirkung der immobilisierten AHL-lactonasen gezogen werden. Diese werden in den folgenden Abschnitten näher ausgeführt.

AiiA und AiiB, welche über ihr *Tag* am N-Terminus an mit Maltose ausgerüsteten Oberflächen immobilisiert wurden, reduzierten die metabolische Aktivität des Biofilms, welcher direkt auf der ausgerüsteten Oberfläche wuchs. Diese Ergebnisse waren nicht signifikant. Dies ist zum einen auf eine erhöhte Bakterienlast von 10^{10} Zellen/ml ($6,9 \times 10^7$ Zellen/cm²) und zum anderen auf eine verlängerte Inkubationszeit von 16 h auf 48 h zurückführbar. Darüber hinaus wurde der Biofilm vor der Bestimmung der metabolischen Aktivität zunächst in drei Schritten gewaschen. Dadurch lösen sich nicht festsitzende Biofilmagglomerate, wodurch ein großer experimenteller Fehler entsteht, da die abgelösten Biofilmagglomerate nicht quantifiziert werden. Alle weiteren Experimente wurden mit einer niedrigeren Zellzahl bei verkürzter Inkubationszeit von 16 h durchgeführt. Dennoch wurde gezeigt, dass immobilisierte AHL-lactonasen einen Biofilm, welcher sich direkt auf der Oberfläche ansiedelt, in der Ausbildung reduzieren. Eine Fernwirkung durch Bestimmung der Biofilmmasse am Calgary Biofilm⁵⁵ wurde nicht nachgewiesen. Dies liegt darin begründet, dass die kovalent immobilisierten Wirkstoffe nicht freigesetzt werden. Des Weiteren sind nicht freisetzende Oberflächenbeschichtungen durch einen Bewuchs mit Biofilm unwirksam.

Bei der Untersuchung der biofilmvermeidenden Wirkung von AHL-lactonasen, welche auf Partikeln adsorptiv immobilisiert wurden, ist der experimentelle Fehler bei der Bestimmung der metabolischen Aktivität beträchtlich. Die Partikel setzten sich zum größten Teil auf dem Boden der Multiwellplatte ab. Die Relation der in Anwesenheit der Partikel mit immobilisiertem AiiB und BlcC ausgebildeten Biofilme zum Kontrollbiofilm eignet sich aufgrund der sehr großen Unterschiede der Bewuchsoberfläche nicht, vielmehr sollte das pure Adsorptionsmaterial und das Material, an welchem AiiB und BlcC immobilisiert wurden, miteinander verglichen werden. Durch die Abgabe der physisorbierten AHL-lactonasen besitzt dieses System sowohl eine Wirkung auf den Biofilm, welcher direkt auf den Partikeln gewachsen ist, als auch auf Biofilm im Umfeld, am Calgary Biofilm Device⁵⁵ sowie auf die Produktion der Virulenzfaktoren. Als ungeeignetes Trägermaterial stellte sich PS-AA heraus. Dieses begünstigte stark das Biofilmwachstum.

Durch kovalente Bindung über die Kopplungsvermittler EDC und sulfo-NHS wurden AiiB und BlcC an amino- und carboxyfunktionalisierten Oberflächen immobilisiert. Hier bestätigten sich die Ergebnisse der Immobilisierung der AHL-lactonasen über ihr *Tag* an mit Maltose ausgerüsteten Oberflächen: Oberflächenbeschichtungen mit fest gebundenen Wirkstoffen vermindern die Biofilmbildung auf diesen Oberflächen, besitzen jedoch keine Fernwirkung. Es zeigte sich, dass die Kopplung der AHL-lactonasen über ihren N-Terminus an carboxyfunktionalisierte Oberflächen der Immobilisierung über ihren C-Terminus an aminofunktionalisierten Oberflächen vorzuziehen ist. Dies liegt in der Struktur der AHL-lactonasen begründet. Abbildung 75 zeigt, dass der N-Terminus, verglichen mit dem C-

Terminus, weiter vom katalytischen Zentrum entfernt ist. Eine kovalente Bindung von AiiB am C-Terminus beeinflusst die Faltung stärker als die Bindung am N-Terminus. In der Folge kann sich das katalytische Zentrum nicht korrekt ausbilden. Die AHL-lactonase wird denaturiert und verliert ihre spezifische Aktivität.

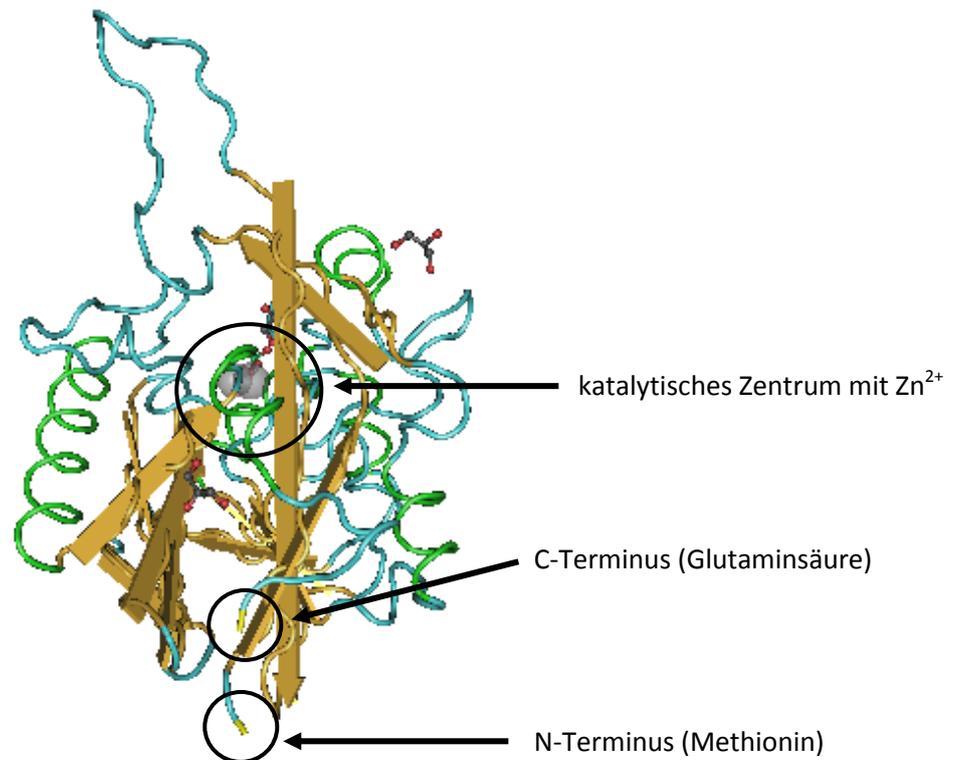


Abbildung 75: Der C- und N-Terminus sowie das katalytische Zentrum von AiiB

Basierend auf der Sequenzinformation von AiiB aus der Datenbank NCBI Entrez Protein (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mit der Referenznummer A9CKY2 wurde die Tertiärstruktur mit dem Programm Swiss-PdbViewer (aka DeepView; <http://www.expasy.org/spdbv>)¹³⁶ visualisiert.

Das PEG-DA-Hydrogel als Wirkstoffdepot eignet sich wegen seiner langfristigen Freisetzung und seiner guten mechanischen Eigenschaften für einen dauerhaften Einsatz in der Anwendung, auch in Fließsystemen. Durch die Beladung mit AiiB und BlcC wurde sowohl nach 16 h als auch nach 88 h die Biofilmbildung signifikant reduziert. Beide reduzierten im Vergleich zum Kontrollbiofilm die metabolische Aktivität des Biofilms, welcher direkt auf dem Hydrogel gewachsen ist. Durch die Freisetzung des Wirkstoffes reduzierte dieser auch die Biofilmbildung im direkten Umfeld, am Calgary Biofilm Device⁵⁵, sowie die untersuchten Virulenzfaktoren. Ein weiterer Vorteil liegt in der Wiederbeladbarkeit des Systems: Ist der Wirkstoff komplett freigesetzt, kann das Hydrogel erneut mit Wirkstoff beladen werden. Hierzu wird das Hydrogel zunächst getrocknet und anschließend in einer Lösung des Wirkstoffes gequollen. Durch den Wasserinflux in das Netzwerk gelangt der Wirkstoff durch die Diffusion ebenfalls in das Hydrogelinnere.

In den Untersuchungen zeigte sich, dass selbst das unbeladene Hydrogel zum Teil antibakterielle Eigenschaften aufwies. Dies ist auf Acrylgruppen, welche mit Proteinen und Biomolekülen Bindungen ausbilden können und daher toxisch wirken, zurückzuführen. Zusätzlich begünstigen sterische¹¹⁷ und osmotische^{248,249} Abstoßungseffekte sowie die extrem flexiblen und beweglichen PEG-Ketten²²⁶ die Biofilmvermeidung auf der Oberfläche, da es Bakterien erschwert wird, auf der Hydrogeloberfläche zu adhären.

Mögliche Einsatzgebiete für die hier entwickelten Immobilisierungen mit AHL-lactonasen zur Biofilmvermeidung liegen in technischen wasserführenden Systemen, die der Gewinnung, der Aufbereitung, dem Transport, der Lagerung und der Nutzung von Wasser dienen. Dies können beispielsweise Rohrleitungen und Schlauchsysteme sein. In diesem Fall, unter Strömungsbedingungen, bietet sich eine Oberflächenbeschichtung mit kovalent gebundenen AHL-lactonasen an. Durch die kovalente Anbindung verbleiben die AHL-lactonasen vor Ort im System und werden nicht ausgespült und die Biofilmbildung wird beispielsweise durch die verminderte Fähigkeit der Rhamnolipidproduktion erschwert. Bakterien, die in ihrer Anhaftung beeinträchtigt sind, werden bei entsprechender Anströmung zusätzlich von der Oberfläche entfernt.

In Systemen mit keiner oder nur einer sehr geringen Strömung wie Tanksysteme, Vorratsbehälter und Totzonen kann das Hydrogelsystem, welches mit AHL-lactonasen beladen ist, zum Einsatz kommen. Da Hydrogelsystem wird entsprechend an einer Stelle mit möglichst niedriger Fließgeschwindigkeit eingebracht. Von hier werden kontinuierlich die eingeschlossenen AHL-lactonasen in das System ausgegeben und verteilen sich dort, um der Biofilmbildung vorzubeugen. Ein weiterer Vorteil des Hydrogelsystems besteht in der hohen Standzeit von mehreren Wochen und Monaten sowie in seiner Wiederbeladbarkeit.

Partikuläre Immobilisierungssysteme von AHL-lactonasen eignen sich in erster Linie, wenn sie im technischen wasserführenden System, unabhängig von der Strömungssituation, vor Ort verbleiben und dort die AHL-lactonasen ins System abgeben. Hierzu ist allerdings eine Art Netz oder eine ähnliche Vorrichtung notwendig, um ein Ausspülen der Partikel aus dem System zu verhindern. Weiterhin kann es je nach Systemart ungünstig sein, wenn Partikel im System verbleiben. Dies ist insbesondere in der Produktion und der Trinkwasseraufbereitung störend. Diese Immobilisierungsmethode lässt sich jedoch sehr einfach auch auf flächige Materialien wie beispielsweise geladene Membranen übertragen. Ist eine Rohrleitung mit einem entsprechend geladenen Kunststoff ausgekleidet, kann beispielsweise hier die AHL-lactonase immobilisiert und so die Rohroberfläche gegen ungewollten Biofilmbewuchs geschützt werden. Denkbar sind auch Ausrüstungen von Osmosemembranen und Filtersysteme, die wasserdurchströmt sind

7 Fazit und Ausblick

AHL-lactonasen greifen in das QS Gram-negativer Bakterien ein und unterbinden die Zell-Zell-Kommunikation. In der Folge wird die Sekretion von Virulenzfaktoren beziehungsweise die Biofilmbildung vermieden und Krankheitserreger reduzieren ihre pathogenen Eigenschaften. Sie bieten zusätzlich den Vorteil einer speziesunabhängigen Wirkung auf Gram-negative Bakterien, welche über AHL miteinander kommunizieren. Eine Resistenzbildung gegen AHL-lactonasen ist unwahrscheinlich^{54,57-61}. Sie sind daher eine neue vielversprechende Wirkstoffklasse im Einsatz gegen bakterielle Biofilme.

In dieser Arbeit wurden mit der Expression im 7 l-Bioreaktor und der Aufreinigung bis zu einem Reinheitsgrad von 99 % die Voraussetzung geschaffen, AHL-lactonasen in einem einfachen und relativ kostengünstigen Prozess herzustellen. Weiterhin wurde ihre Wirkung auf unterschiedliche Gram-negative Spezies hinsichtlich der Biofilmbildung und der Produktion verschiedener Virulenzfaktoren nachgewiesen. Durch die in dieser Arbeit gezeigten wirksamen Immobilisierungsansätze wurden für die praktische Anwendung, zum Beispiel in technischen wasserführenden Systemen, erste methodische Konzepte vorgestellt.

Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse zeigen, dass der Einsatz von AHL-lactonasen, in gelöster oder immobilisierter Form, eine vielversprechende, vorbeugende Maßnahme zur Biofilmbekämpfung ist. Bereits entstandene Biofilme werden in ihrem Wachstum durch AHL-lactonasen nicht beeinträchtigt – einzig die Neubesiedelung nicht kontaminierter Oberflächen kann hiermit vermieden werden. Eine Abtötung der Bakterien durch AHL-lactonasen erfolgt nicht, sie verbleiben weiterhin lebend im System. Sie werden jedoch in der Ausbildung ihrer Virulenzfaktoren stark eingeschränkt. Es ist denkbar, diesen Ansatz mit regelmäßigen Desinfektionen oder Biozidzugaben erfolgreich zu kombinieren: Sind Bakterien durch AHL-lactonasen nicht in der Lage Biofilme zu bilden, sind sie nicht durch die EPS vor Umweltangriffen geschützt und durch Zugabe von Bioziden leichter abzutöten.

In dieser Arbeit wurde ausführlich untersucht, ob AHL-lactonasen, in gelöster Form und über unterschiedlichen Methoden immobilisiert, geeignet sind die Biofilmbildung zu verringern. Hierzu wurden die Experimente aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit dieser Enzyme und dem umfangreichen Versuchsplan stets mit der niedrigsten zu ermittelnden Wirkkonzentration durchgeführt. Somit konnte die prinzipielle Eignung dieser Enzymklasse als biofilmvermeidende Wirkstoffe gezeigt werden. Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeiten sollte zunächst die Wirkung höherer Wirkstoffkonzentration, sowohl in gelöster Form als auch in der Beladung der Hydrogele und der Adsorptionsträgermaterialien, auf die Biofilmbildung und die Produktion von Virulenzfaktoren analysiert werden. Auch beschränkten sich die hier gezeigten Untersuchungen aufgrund des komplexen Zusammen-

spiels verschiedener Bakterienspezies im Biofilm auf die Betrachtung von Einzelspezies-Biofilmen. Daher sollte weiterführend auch die Wirkung der AHL-lactonasen auf gemischte Biofilme und Biofilmkonsortien verschiedener Spezies untersucht werden.

In den Freisetzungsversuchen wurde durch häufiges Wechseln des Überstandes der „worst case“-Fall eines Fließsystems nachgestellt. Vor der praktischen Anwendung in Fließsystemen muss jedoch, da hier die Wirkung der AHL-lactonasen in statischen Biofilmassays gezeigt wurde, zunächst weiterführend die Wirkung unter Fließbedingungen, beispielsweise zunächst in Fließzellen, untersucht werden. Problematisch hierbei wird jedoch ein mit den entsprechenden Immobilisierungen dichtes und vor allem steriles System bereitzustellen. Üblicherweise erfolgt die Sterilisation der Fließzellen nach dem Zusammenbau, das heißt nach dem Einbringen der Beschichtung. Durch die nachfolgende Sterilisation allerdings werden die AHL-lactonasen inaktiviert. Problematisch sind ebenfalls die geringen Dimensionen der Fließzellen, die durch sich teilweise lösende Beschichtungen schnell verstopfen. Auch die entsprechende Quantifizierung des Biofilms stellt eine Herausforderung dar. Entsprechende Färbungen der Biofilmmasse beziehungsweise die Bestimmung der metabolischen Aktivität durch einen Substratumsatz kann zwar in Fließzellen durchgeführt werden, sind jedoch in der Fließzelle nicht photometrisch auswertbar. Die jeweiligen Farblösungen beziehungsweise die Lösungen mit dem umgesetzten Substrat müssen vor eine Quantifizierung der Fließzelle entnommen werden. Hierbei können durch Flüssigkeitsrückstände in der Fließzelle erhebliche Quantifizierungsfehler entstehen. Darüber hinaus ist der Einsatz der AHL-lactonasen, welche auf Partikeln immobilisiert wurden, für einen Einsatz in Fließsystemen eher ungeeignet, da sie aus dem System ausgespült werden. Sie eignen sich vielmehr für Anwendungen mit stehendem Wasser oder sie werden gezielt in ein Fließsystem eingebracht, um während des Systemdurchlaufs die AHL-lactonasen kontinuierlich abzugeben.

Ferner gilt es die Langzeitstabilität und Lagerfähigkeit der gelösten und immobilisierten AHL-lactonasen beispielsweise durch Lyophilisieren zu untersuchen: Hierzu könnte der Einsatz von Lyo- oder Kryoprotektoren hilfreich sein.

Für einen klinischen Einsatz ist die Bewertung der Toxizität der AHL-lactonasen, sowohl in gelöster als auch in immobilisierter Form notwendige Voraussetzung. Erste Arbeiten zum medizinischen Einsatz von AHL wurden von der Arbeitsgruppe um B. Yao, VR China, durchgeführt. Ihnen gelang es, durch eine intraperitoneale Gabe von AiiA bei Karpfen⁵⁷ und durch eine orale Zufütterung von AiiA bei Zebrafischen⁵⁰ die Sterblichkeitsrate bei einer *Aeromonas hydrophila* Infektion zu senken.

So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,
man muss sie für fertig erklären,
wenn man nach Zeit und Umständen
das Möglichste getan hat.

(Johann Wolfgang von Goethe 1786-1788, *Italienische Reise*)

I. Literaturverzeichnis

1. *Chemical Book*. Online im Internet: www.chemicalbook.com [letzter Zugriff: 20.02.2012]. (2009)
2. Abarzua, S. und Jakubowski, S. *Marine Ecology Progress Series*. **123**: 301-312. (1995)
3. Abdel-Mawgoud, A.M., Aboulwafa, M.M. und Hassouna, N.A. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **157**(2): 329-345. (2009)
4. Abe, T., Egawa, H., Ito, H. und Nitta, A. *Journal of Applied Polymer Science*. **40**(7-8): 1223-1235. (1990)
5. Afriat, L., Roodveldt, C., Manco, G. und Tawfik, D.S. *Biochemistry*. **45**(46): 13677-13686. (2006)
6. Alanazi, A., Nojiri, C., Kido, T., Noguchi, T., Ohgoe, Y., Matsuda, T., Hirakuri, K., Funakubo, A., Sakai, K. und Fukui, Y. *Artificial Organs*. **24**(8): 624-627. (2000)
7. Alkhraisat, M.H., Rueda, C., Cabrejos-Azama, J., Lucas-Aparicio, J., Mariño, F.T., Torres García-Denche, J., Jerez, L.B., Gbureck, U. und Cabarcos, E.L. *Acta Biomaterialia*. **6**(4): 1522-1528. (2010)
8. Allison, D.G. *Biofouling*. **19**(2): 139-150. (2003)
9. Allison, K.R., Brynildsen, M.P. und Collins, J.J. *Current Opinion in Microbiology*. **14**(5): 593-598. (2011)
10. Amara, N., Krom, B.P., Kaufmann, G.F. und Meijler, M.M. *Chemical Reviews*. **111**(1): 195-208. (2011)
11. Amara, N., Mashiach, R., Amar, D., Krief, P., Spieser, S.A., Bottomley, M.J., Aharoni, A. und Meijler, M.M. *Journal of the American Chemical Society*. **131**(30): 10610-10619. (2009)
12. Andrade, J.D., Hlady, V. und Jeon, S.-I. *Poly(ethylene oxide) and Protein Resistance* In: Glass, E., Ed.: *Hydrophilic Polymers*. American Chemical Society: Washington, DC. 51-59. (1996)
13. Annous, B.A., Fratamico, P.M. und Smith, J.L. *Journal of Food Science*. **74**(1): 24-37. (2009)
14. Anseth, K.S., Goodner, M.D., Reil, M.A., Kanurpatti, A.R., Newman, S.M. und Bowman, C.N. *Journal of Dental Research*. **75**: 1607-1625. (1996)
15. Anseth, K.S., Kline, L.M., Walker, T.A., Anderson, K.J. und Bowman, C.N. *Macromolecules*. **28**(7): 2491-2499. (1995)
16. Anseth, K.S., Wang, C.M. und Bowman, C.N. *Polymer*. **35**: 3243-3250. (1994)
17. Antunes, L.C.M., Ferreira, R.B.R., Buckner, M.M.C. und Finlay, B.B. *Microbiology*. **156**(8): 2271-2282. (2010)
18. Artham, T. und Doble, M. *Macromolecular Bioscience*. **8**(1): 14-24. (2008)
19. Atkinson, S., Cámara, M. und Williams, P. *N-acylhomoserine lactones, quorum sensing and biofilm development in Gram-negative bacteria*. In: Kjelleberg, S. und Givskov, M., Eds.: *The Biofilm Mode of Life: Mechanisms and Adaptions*. Horizon Bioscience: Wymondham. 95-122. (2007)
20. Atkinson, S., Throup, J.P., Stewart, G.S.A.B. und Williams, P. *Molecular Microbiology*. **33**(6): 1267-1277. (1999)
21. Augustine, N., Kumar, P. und Thomas, S. *Archives of Microbiology*. **192**(12): 1019-1022. (2010)
22. Bach, H., Mazor, Y., Shaky, S., Shoham-lev, A., Berdichevsky, Y., Gutnick, D.L. und Benhar, I. *Journal of Molecular Biology*. **312**(1): 79-93. (2001)
23. Bakker-Woudenberg, I.A. und Lokerse, A.F. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases Supplement*. **74**: 34-41. (1990)
24. Banerjee, I., Pangule, R.C. und Kane, R.S. *Advanced Materials*. **23**(6): 690-718. (2011)
25. Baneyx, F. *Current Opinion in Biotechnology*. **10**(5): 411-421. (1999)
26. Bassler, B.L. *Current Opinion in Microbiology*. **2**(6): 582-587. (1999)

27. Basu, A., Li, X. und Leong, S.S. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **92**(2): 241-251. (2011)
28. Bauer, W.D. und Robinson, J.B. *Current Opinion in Biotechnology*. **13**(3): 234-237. (2002)
29. Bazaka, K., Jacob, M.V., Crawford, R.J. und Ivanova, E.P. *Acta Biomaterialia*. **7**(5): 2015-2028. (2011)
30. Behravesch, E., Sikavitsas, V.I. und Mikos, A.G. *Biomaterials*. **24**(24): 4365-4374. (2003)
31. Bencherif, S.A., Srinivasan, A., Sheehan, J.A., Walker, L.M., Gayathri, C., Gil, R., Hollinger, J.O., Matyjaszewski, K. und Washburn, N.R. *Acta Biomaterialia*. **5**(6): 1872-1883. (2009)
32. Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. und Bourne, P.E. *Nucleic Acids Research*. **28**(1): 235-242. (2000)
33. Biaglow, J.E., Varnes, M.E., Roizen-Towle, L., Clark, E.P., Epp, E.R., Astor, M.B. und Hall, E.J. *Biochemical Pharmacology*. **35**(1): 77-90. (1986)
34. Bicanova, M. und Thinschmidt, G. *Pharmazie*. **40**(10): 736-737. (1985)
35. Bickerstaff, G.F. *Immobilization of Enzymes and Cells*. In: Bickerstaff, G.F., Ed.: *Methods in Biotechnology*. Humana Press Inc.: Totowa, New Jersey. 13-20. (1997)
36. Bijtenhoorn, P., Mayerhofer, H., Muller-Dieckmann, J., Utpatel, C., Schipper, C., Hornung, C., Szesny, M., Grond, S., Thurmer, A., Brzuszkiewicz, E., Daniel, R., Dierking, K., Schulenburg, H. und Streit, W.R. *PLoS One*. **6**(10): e26278. (2011)
37. Bijtenhoorn, P., Schipper, C., Hornung, C., Quitschau, M., Grond, S., Weiland, N. und Streit, W.R. *Journal of Biotechnology*. **155**(1): 86-94. (2011)
38. Borchardt, S.A., Allain, E.J., Michels, J.J., Stearns, G.W., Kelly, R.F. und McCoy, W.F. *Applied Environmental Microbiology*. **67**(7): 3174-3179. (2001)
39. Brausch, J.M. und Rand, G.M. *Chemosphere*. **82**(11): 1518-1532. (2011)
40. Bredenbruch, F., Geffers, R., Nimtz, M., Buer, J. und Häussler, S. *Environmental Microbiology*. **8**(8): 1318-1329. (2006)
41. Bregegere, F., Schwartz, J. und Bedouelle, H. *Protein Engineering*. **7**(2): 271-280. (1994)
42. Briand, J.-F. *Biofouling*. **25**(4): 297-311. (2009)
43. Brint, J.M. und Ohman, D.E. *Journal of Bacteriology*. **177**(24): 7155-7163. (1995)
44. Caiazza, N.C., Shanks, R.M. und O'Toole, G.A. *Journal of Bacteriology*. **187**(21): 7351-7361. (2005)
45. Cámara, M., Williams, P. und Hardman, A. *The Lancet Infectious Diseases*. **2**(11): 667-676. (2002)
46. Can, H.K. und Güner, A. *Journal of Applied Polymer Science*. **99**(5): 2288-2299. (2006)
47. Cantoni, O., Fumo, M. und Cattabeni, F. *Biological Trace Element Research*. **21**: 277-281. (1989)
48. Cao, L. *Adsorption-based Immobilization*. In: *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design*. WILEY-VCH GmbH & Co. KGaA: Weinheim. 53-168. (2005)
49. Cao, L. *Enzyme Entrapment*. In: *Carrier-bound immobilized enzymes*. 317-397. (2005)
50. Cao, Y., He, S., Zhou, Z., Zhang, M., Mao, W., Zhang, H. und Yao, B. *Applied Environmental Microbiology*. **78**(6): 1899-1908. (2012)
51. Carlier, A., Uroz, S., Smadja, B., Fray, R., Latour, X., Dessaux, Y. und Faure, D. *Applied Environmental Microbiology*. **69**(8): 4989-4993. (2003)
52. Caro, A., Humblot, V., Méthivier, C., Minier, M., Barbes, L., Li, J., Salmain, M. und Pradier, C.-M. *Journal of Colloid and Interface Science*. **349**(1): 13-18. (2010)
53. Caro, A., Humblot, V., Méthivier, C., Minier, M., Salmain, M.I. und Pradier, C.-M. *The Journal of Physical Chemistry B*. **113**(7): 2101-2109. (2009)
54. Censi, R., Vermonden, T., Deschout, H., Braeckmans, K., di Martino, P., De Smedt, S.C., van Nostrum, C.F. und Hennink, W.E. *Biomacromolecules*. **11**(8): 2143-2151. (2010)

55. Ceri, H., Olson, M.E., Stremick, C., Read, R.R., Morck, D. und Buret, A. *Journal of Clinical Microbiology*. **37**(6): 1771-1776. (1999)
56. Cha, C., Gao, P., Chen, Y.-C., Shaw, P.D. und Farrand, S.K. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **11**(11): 1119-1129. (1998)
57. Chen, R., Zhou, Z., Cao, Y., Bai, Y. und Yao, B. *Microbial Cell Factories*. **9**(1): 39. (2010)
58. Chernin, L.S., Winson, M.K., Thompson, J.M., Haran, S., Bycroft, B.W., Chet, I., Williams, P. und Stewart, G.S. *Journal of Bacteriology*. **180**(17): 4435-4441. (1998)
59. Chhabra, S.R., Philipp, B., Eberl, L., Givskov, M., Williams, P. und Cámara, M. *Topics in Current Chemistry*. **240**: 279-315. (2005)
60. Chmielewski, R.A.N. und Frank, J.F. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **2**(1): 22-32. (2003)
61. Choi, D., Lee, W., Park, J. und Koh, W. *Bio-Medical Materials and Engineering*. **18**: 345-356. (2008)
62. Choi, O., Yu, C.-P., Esteban Fernández, G. und Hu, Z. *Water Research*. **44**(20): 6095-6103. (2010)
63. Chow, J.Y., Wu, L. und Yew, W.S. *Journal of Biochemistry*. **48**(20): 4344-4353. (2009)
64. Chow, J.Y., Xue, B., Lee, K.H., Tung, A., Wu, L., Robinson, R.C. und Yew, W.S. *Journal of Biological Chemistry*. **52**: 40911-40920. (2010)
65. Chun, C.K., Ozer, E.A., Welsh, M.J., Zabner, J. und Greenberg, E.P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **101**(10): 3587-3590. (2004)
66. Clement, N.R. und Gould, J.M. *Biochemistry*. **20**(6): 1534-1538. (1981)
67. Cloete, T.E., Smith, F. und Steyn, P.L. *International Biodeterioration*. **25**(1-3): 115-122. (1989)
68. Cornelis, P. und Aendekerk, S. *Microbiology*. **150**(4): 752-756. (2004)
69. Costa, F., Carvalho, I.F., Montelaro, R.C., Gomes, P. und Martins, M.C.L. *Acta Biomaterialia*. **7**(4): 1431-1440. (2011)
70. Costerton, J.W. *International journal of antimicrobial agents*. **11**(3-4): 217-21; discussion 237-9. (1999)
71. Costerton, J.W., Cheng, K.J., Paul, M.D., Parfrey, P.S. und Purchase, L.H. *Nature and Disease*. **41**: 435-464. (1987)
72. Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R. und Lappin-Scott, H.M. *Annual Review of Microbiology*. **49**(1): 711-745. (1995)
73. Costerton, J.W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D. und James, G. *Journal of Bacteriology*. **176**(8): 2137-2142. (1994)
74. Cruise, G., M., Hegre, O.D., Scharp, D.S. und Hubbell, J.A. *Biotechnology and Bioengineering*. **57**(6): 655-665. (1998)
75. Cruise, G.M., Scharp, D.S. und Hubbell, J.A. *Biomaterials*. **19**(14): 1287-1294. (1998)
76. Czajkowski, R. und Jafra, S. *Acta Biochimica Polonica*. **56**(1): 1-16. (2009)
77. Dahms, H.-U., Ying, X. und Pfeiffer, C. *Biofouling*. **22**(5): 317-327. (2006)
78. Dallas, P., Sharma, V.K. und Zboril, R. *Advances in Colloid and Interface Science*. **166**(1-2): 119-135. (2011)
79. Daniels, R., Vanderleyden, J. und Michiels, C.W. *FEMS Microbiology Reviews*. **28**: 261-289. (2004)
80. Dann, A. und Hontela, A. *Journal of Applied Toxicology*. **31**(4): 285-311. (2011)
81. Davey, M.E. und O'Toole, G.A. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **64**(4): 847-867. (2000)
82. Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W. und Greenberg, E.P. *Science*. **280**(5361): 295-298. (1998)
83. De Carvalho, C.C. *Recent Patents on Biotechnology*. **1**(1): 49-57. (2007)
84. De Kievit, T.R. und Iglewski, B.H. *Infection and Immunity*. **68**(9): 4839-4849. (2000)
85. Defoirdt, T., Boon, N., Bossier, P. und Verstraete, W. *Aquaculture*. **240**(1-4): 69-88. (2004)
86. Dekimpe, V. und Deziel, E. *Microbiology*. **155**(3): 712-723. (2009)

87. Delalande, L., Faure, D., Raffoux, A., Uroz, S., D'Angelo-Picard, C., Elasri, M., Carlier, A., Berruyer, R., Petit, A., Williams, P. und Dessaux, Y. *FEMS Microbiology Ecology*. **52**(1): 13-20. (2005)
88. Dembitsky, V.M. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **43**(2): 223-251. (2008)
89. Deshusses, M.A. *Current Opinion in Biotechnology*. **8**(3): 335-339. (1997)
90. Deziel, E., Lepine, F., Milot, S. und Villemur, R. *Microbiology*. **149**(8): 2005-2013. (2003)
91. Dickschat, J.S. *Natural Product Reports*. **27**(3): 343-369. (2010)
92. Diggle, S.P., Stacey, R.E., Dodd, C., Camara, M., Williams, P. und Winzer, K. *Environmental Microbiology*. **8**(6): 1095-1104. (2006)
93. DIN 66131. *Bestimmung der spezifischen Oberfläche von Feststoffen durch Gasadsorption nach Brunauer, Emmett und Teller (BET)*. Normenausschuss Siebböden und Kornmessung (NASK) und Normenausschuss Materialprüfung (NMP) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V. (1992)
94. Dobretsov, S., Dahms, H.-U. und Qian, P.-Y. *Biofouling*. **22**(1): 43-54. (2006)
95. Dong, Y.-H., Gusti, A.R., Zhang, Q., Xu, J.-l. und Zhang, L.-H. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**(4): 1754-1759. (2002)
96. Dong, Y.-H., Wang, L.-H., Xu, J.-l. und Zhang, H.-B., Zhang, L.-H. *Nature*. **411**(14): 813-817. (2001)
97. Dong, Y.-H., Wang, L.-H. und Zhang, L.-H. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. **362**: 1201-1211. (2007)
98. Dong, Y.-H., Xu, J.-l., Li, X.-Z. und Zhang, L.-H. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **97**(7): 3526-3531. (2000)
99. Donlan, R.M. *Emerging Infectious Diseases*. **8**(9): 881-890. (2002)
100. Donlan, R.M. und Costerton, J.W. *Clinical Microbiology Reviews*. **15**(2): 167-193. (2002)
101. Draganov, D.I., Teiber, J.F., Speelman, A., Osawa, Y., Sunahara, R. und La Du, B.N. *Journal of Lipid Research*. **46**: 1243-1247. (2005)
102. Drummond, A.J., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A., Duran, C., Field, M., Heled, J., Kears, M., Markowitz, S., Moir, R., Stones-Havas, S., Sturrock, S., Thierer, T. und Wilson, A. *Geneious v5.4*. (2011)
103. Dwyer, D.J., Kohanski, M.A. und Collins, J.J. *Current Opinion in Microbiology*. **12**(5): 482-489. (2009)
104. Eberl, L. *Systematic and Applied Microbiology*. **22**: 493-506. (1999)
105. Entiazi, F., Schwartz, T., Marten, S.M., Krolla-Sidenstein, P. und Obst, U. *Water Research*. **38**(5): 1197-1206. (2004)
106. Estrela, A.B., Heck, M.G. und Abraham, W.R. *Current Medical Chemistry*. **16**(12): 1512-1530. (2009)
107. Filisko, F.E., Malladi, D. und Barenberg, S. *Biomaterials*. **7**(5): 348-353. (1986)
108. Flemming, H.-C. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**: 629-640. (2002)
109. Flemming, H.-C. und Wingender, J. *Chemie in unserer Zeit*. **36**(1): 30-42. (2002)
110. Flemming, H.C. *Water Science and Technology*. **27**: 1-10. (1993)
111. Flemming, H.C. *Werkstoffe und Korrosion*. **45**: 29-39. (1994)
112. Flemming, H.C., Schaule, G. und McDonogh, R. *Biofouling on membrane - a short review*. In: Melo, L., Fletcher, M.M. und Bott, T.R., Eds.: *Biofilms: Science and Technology*. Kluwer Academic Publisher: Dordrecht, Boston, London. 487-497. (1992)
113. Flemming, H.C. und Wingender, J. *Erfassung des Wachstums und des Kontaminationspotentials von Biofilmen in der Verteilung von Trinkwasser*. In: Bundesministerium für Bildung und Forschung, B., Ed. Hygiene-Institut der Universität Bonn
114. Flory, P.J. *Journal of Chemical Physics*. **10**: 51-61. (1942)
115. Flory, P.J. *Faraday Discussions of the Chemical Society*. **57**: 7-18. (1974)
116. Flory, P.J. und Rehner, J. *Journal of Chemical Physics*. **11**: 521-526. (1943)

117. Foa, C., Soler, M., Benoliel, A.-M. und Bongrand, P. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. **7**(3): 141-148. (1996)
118. Fuqua, C., Burbea, M. und Winans, S.C. *Journal of Bacteriology*. **177**(5): 1367-1373. (1995)
119. Fuqua, C., Parsek, M.R. und Greenberg, E.P. *Annual Review of Genetics*. **35**: 439-468. (2001)
120. Fuqua, C. und Winans, S.C. *Bacteriology*. **178**(2): 435-440. (1996)
121. Fuqua, W.C., Winans, S.C. und Greenberg, E.P. *Journal of Bacteriology*. **176**(2): 269-275. (1994)
122. Fux, C.A., Costerton, J.W., Stewart, P.S. und Stoodley, P. *Trends in Microbiology*. **13**(1): 34-40. (2005)
123. Gabriel, G.J., Som, A., Madkour, A.E., Eren, T. und Tew, G.N. *Material Science and Engineering: Reports*. **57**(1-6): 28-64. (2007)
124. Gambello, M.J. und Iglewski, B.H. *Journal of Bacteriology*. **173**(9): 3000-3009. (1991)
125. Gambello, M.J., Kaye, S. und Iglewski, B.H. *Infection and Immunity*. **61**(4): 1180-1184. (1993)
126. Gao, B., Zhang, X. und Zhu, Y. *Journal of Biomaterial Science, Polymer Edition*. **18**(5): 531-544. (2007)
127. Garg, G., Chauhan, G.S., Gupta, R. und Ahn, J.H. *Journal of Colloid and Interface Science*. **344**(1): 90-96. (2010)
128. Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D. und Bairoch, A. *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*. In: Walker, J.M., Ed.: *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press. 571-607. (2005)
129. Geever, L.M., Cooney, C.C., Lyons, J.G., Kennedy, J.E., Nugent, M.J.D., Devery, S. und Higginbotham, C.L. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **69**: 1147-1159. (2008)
130. Genlantis - a division of Gene Therapy Systems Inc. *SoluBL21™ Competent E. coli Kits*. (2011)
131. Gernig, H. *Kapitel 12 Reinigung und Desinfektion*. In: Ortner, M. und Wagner, S., Eds.: *Qualitätsbuch für Fleisch und Fleischerzeugnisse aus bäuerlicher Produktion*. Landwirtschaftskammer Österreich: Wien. (2006)
132. Gilbert, P., Das, J. und Foley, I. *Advances in Dental Research*. **11**(1): 160-167. (1997)
133. Gottenbos, B., van der Mei, H.C., Klatter, F., Nieuwenhuis, P. und Busscher, H.J. *Biomaterials*. **23**(6): 1417-1423. (2002)
134. Gottlieb, M., Macosko, C.W., Benjamin, G.S., Meyers, K.O. und Merrill, E.W. *Macromolecules*. **14**: 1039-1046. (1981)
135. Gray, K.M. und Garey, J.R. *Microbiology* **147**: 2379-2387. (2001)
136. Guex, N. und Peitsch, M.C. *Electrophoresis*. **18**(15): 2714-2723. (1997)
137. Gundogdu, E., Koksall, C. und Karasulu, E. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. **38**(6): 689-696. (2011)
138. Halder, J., Weight, A.K. und Klibanov, A.M. *Nature Protocols*. **2**(10): 2412-2417. (2007)
139. Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. und Stoodley, P. *Nature Reviews Microbiology*. **2**(2): 95-108. (2004)
140. Hanefeld, U., Gardossi, L. und Magner, E. *Chemical Society Reviews*. **38**: 453-468. (2009)
141. Harris, J.M. *Introduction to Biotechnical and Biomedical Applications of Poly(Ethylene Glycol)*. In: Katritzky, A.R. und Sabongi, G.J., Eds.: *Topics in Applied Chemistry*. Plenum Press: New York, London. 1-14. (1992)
142. Hartwig, A. und Albinaky, K. *Qualitätssicherung der Oberflächenvorbehandlung von Kunststoffen in der Fertigung durch selektive Farbreaktionen*. In: *Materialforschung, Fraunhofer-Institut für Fertigungstechnik und Angewandte Materialforschung*: Bremen. (1999)
143. Hattemer, A.J. *Zahnärztliche Rundschau*. **63**(15): 431-436. (1954)
144. Haudecoeur, E. und Faure, D. *Communicative and Integrative Biology*. **3**(2): 84-88. (2010)

-
145. Hawwa, R., Aikens, J., Turner, R.J., Santarsiero, B.D. und Mesecar, A.D. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **488**(2): 109-20. (2009)
 146. Hawwa, R., Aikens, J., Turner, R.J., Santarsiero, B.D. und Mesecar, A.D. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **488**(2): 109-120. (2009)
 147. Henke, J.M. und Bassler, B.L. *Trends in Cell Biology*. **14**(11): 648-656. (2004)
 148. Henrici, A.T. und Zobell, C.E. *Early Views of the Nature of Biofilms*. In: Cunningham, J., Lennox, E. und Ross, R.J., Eds.: *Biofilms: The hypertextbook, Version 3*. Montana State University EDU: Bozeman (2009)
 149. Hentzer, M., Eberl, L., Nielsen, J. und Givskov, M. *BioDrugs*. **17**(4): 241-250. (2003)
 150. Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J.B., Riedel, K., Rasmussen, T.B., Bagge, N., Kumar, N., Schembri, M.A., Song, Z., Kristoffersen, P., Manefield, M., Costerton, J.W., Molin, S., Eberl, L., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Hoiby, N. und Givskov, M. *EMBO Journal*. **22**: 3803-3815. (2003)
 151. Hern, D.L. und Hubbell, J.A. *Journal of Biomedical Materials Research*. **39**(2): 266-276. (1998)
 152. Heydorn, A., Ersboll, B., Kato, J., Hentzer, M., Parsek, M.R., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M. und Molin, S. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**(4): 2008-2017. (2002)
 153. Hiller, E., Heine, S., Brunner, H. und Rupp, S. *Eukaryotic Cell*. **6**(11): 2056-2065. (2007)
 154. Hintz, M. *Untersuchungen zur Subtilisin-Produktion mit Bacillus licheniformis und Konstruktion eines alternativen Selektionssystems Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät - Forschungszentrum Jülich GmbH*. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Düsseldorf. 40. (2003)
 155. Hoang, T.T., Kutchma, A.J., Becher, A. und Schweizer, H.P. *Plasmid*. **43**(1): 59-72. (2000)
 156. Holloway, B.W., Krishnapillai, V. und Morgan, A.F. *Microbiological Reviews*. **43**(1): 73-102. (1979)
 157. Hope, C.K. und Bott, T.R. *Water Research*. **38**(7): 1853-1861. (2004)
 158. Huang, J.J., Han, J.-I., Zhang, L.-H. und Leadbetter, J.R. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**(10): 5941-5949. (2003)
 159. Huang, J.J., Petersen, A., Whiteley, M. und Leadbetter, J.R. *Applied Environmental Microbiology*. **72**(2): 1190-1197. (2006)
 160. Huang, X. und Brazel, C.S. *Journal of Controlled Release*. **73**(2-3): 121-136. (2001)
 161. Huggins, M.L. *Journal of Chemical Physics*. **9**(5): 440. (1941)
 162. Huglin, M.R. *British Polymer Journal*. **21**(2): 184-184. (1989)
 163. Hwang, I., Li, P.-I., Zhang, L., Piper, K.R., Cook, D.M., Tate, M.E. und Farrand, S.K. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **91**: 4639-4643. (1994)
 164. Iafisco, M., Sabatino, P., Lesci, I.G., Prat, M., Rimondini, L. und Roveri, N. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **81**(1): 274-284. (2010)
 165. Ikeda, T., Ledwith, A., Bamford, C.H. und Hann, R.A. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. **769**(1): 57-66. (1984)
 166. Ikeda, T., Yamaguchi, H. und Tazuke, S. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **26**(2): 139-144. (1984)
 167. Ilyina, t.S., Romanova, Y.M. und Gintsburg, A.L. *Russian Journal of Genetics*. **40**(11): 1189-1198. (2004)
 168. Industries, M. *Manual Number MAN 0152*. (1996)
 169. Jones, B.V., Mahenthiralingam, E., Sabbuba, N.A. und Stickler, D.J. *Journal of Medical Microbiology*. **54**(9): 807-813. (2005)
 170. Kaplan, J.B. *Expert Opinion in Therapeutic Patents*. **15**(8): 955-965. (2005)
 171. Kapust, R.B. und Waugh, D.S. *Protein Science*. **8**(8): 1668-1674. (1999)

-
172. Kashyap, N., Kumar, N. und Kumar, M.N.V.R. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. **22**(2): 107-149. (2005)
173. Kaufmann, G.F., Sartorio, R., Lee, S.-H., Mee, J.M., Altobelli, L.J., Kujawa, D.P., Jeffries, E., Clapham, B., Meijler, M.M. und Janda, K.D. *Journal of the American Chemical Society*. **128**(9): 2802-2803. (2006)
174. Kavanagh, G.M. und Ross-Murphy, S.B. *Progress in Polymer Science*. **23**(3): 533-562. (1998)
175. Kehoe, J.J., Remondetto, G.E., Subirade, M., Morris, E.R. und Brodkorb, A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **56**(12): 4720-4725. (2008)
176. Kerger, C. *Expressionsoptimierung und Aufarbeitung der rekombinanten N-Acyl-Homoserinlacton Lactonase AiiA Angewandte Naturwissenschaften*. University of Applied Science: Esslingen (2011)
177. Kerr, A., Hodgkiess, T., Cowling, M.J., Beveridge, C.M., Smith, M.J. und Parr, A.C.S. *Applied Microbiology*. **85**(6): 1067-1072. (1998)
178. Khan, S.R. und Farrand, S.K. *Journal of Bacteriology*. **191**(4): 1320-1329. (2009)
179. Kim, M.H., Choi, W.-C., Kang, H.O., Lee, J.S., Kang, B.S., Kim, K.-J., Derewenda, Z.S., Oh, T.-K., Lee, C.H. und Lee, J.-K. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **102**(49): 17606-17611. (2005)
180. Kim, S.S., Lee, Y.M. und Cho, C.S. *Polymer*. **36**(23): 4497-4501. (1995)
181. King, C.H., Shotts, E.B., Jr., Wooley, R.E. und Porter, K.G. *Applied Environmental Microbiology*. **54**(12): 3023-3033. (1988)
182. Kiran, S., Sharma, P., Harjai, K. und Capalash, N. *Iranian Journal of Microbiology*. **3**(1): 1-12. (2011)
183. Köhler, T., Curty, L.K., Barja, F., van Delden, C. und Pechere, J.C. *Bacteriology*. **182**(21): 5990-5996. (2000)
184. Kong, M., Chen, X.G., Xing, K. und Park, H.J. *International Journal of Food Microbiology*. **144**(1): 51-63. (2010)
185. Koplín, S.A., Lin, S. und Domanski, T. *Biotechnology Progress*. **24**(5): 1160-1165. (2008)
186. Kral, T.E., Kuczera, J. und Przystalski, S. *Zeitschrift für Naturforschung C*. **56**(5-6): 395-401. (2001)
187. Kühn, K.P., Chaberny, I.F., Massholder, K., Stickler, M., Benz, V.W., Sonntag, H.-G. und Erdinger, L. *Chemosphere*. **53**(1): 71-77. (2003)
188. Kumar, C.G. und Anand, S.K. *International Journal of Food Microbiology*. **42**(1-2): 9-27. (1998)
189. Kumar, N. und Iskander, G. *Preparation of furanone derivatives as antibacterial agents*. In: Biosignal Limited, A., Ed. (2008)
190. Lang, S. und Wullbrandt, D. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **51**(1): 22-32. (1999)
191. Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P. und Lazdunski, A. *Molecular Microbiology*. **21**(6): 1137-1146. (1996)
192. Latifi, A., K., W.M., Foglino, M., W., B.B., B., S.G.S.A., Lazdunski, A. und Williams, P. *Molecular Microbiology*. **17**(2): 333-343. (1995)
193. LeChevallier, M.W., Cawthon, C.D. und Lee, R.G. *Applied Environmental Microbiology*. **54**(10): 2492-2499. (1988)
194. Lee, J.H., Lee, H.B. und Andrade, J.D. *Progress in Polymer Science*. **20**(6): 1043-1079. (1995)
195. Lee, S.J., Park, S.-Y., Lee, J.-J., Yum, D.-Y., Koo, B.-T. und Lee, J.-K. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**(8): 3919-3924. (2002)
196. Lee, S.Y. *Trends in Biotechnology*. **14**(3): 98-105. (1996)
197. Lehtola, M.J., Miettinen, I.T., Lampola, T., Hirvonen, A., Vartiainen, T. und Martikainen, P.J. *Water Research*. **39**(10): 1962-1971. (2005)
198. Leroy, C., Delbarre, C., Ghillebaert, F., Compere, C. und Combes, D. *Biofouling*. **24**(1): 11-22. (2008)

199. Li, B. und Logan, B.E. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **41**(2-3): 153-161. (2005)
200. Lin, W., Xu, Y., Huang, C.-C., Ma, Y., Shannon, K., Chen, D.-R. und Huang, Y.-W. *Journal of Nanoparticle Research*. **11**(1): 25-39. (2009)
201. Lin, Y.-H., Xu, J.-I., Hu, J., Wang, L.-H., Ong, S.L., Leadbetter, J.R. und Zhang, L.-H. *Molecular Microbiology*. **47**(3): 849-860. (2003)
202. Lin, Y.S., Stout, J.E., Yu, V.L. und Vidic, R.D. *Seminars in Respiratory Infections*. **13**(2): 147-159. (1998)
203. Liu, D., Momb, J., Thomas, P.W., Moulin, A., Petsko, G.A., Fast, W. und Ringe, D. *Journal of Biochemistry*. **47**(29): 7706-7714. (2008)
204. Liu, D., Thomas, P.W., Momb, J., Hoang, Q.Q., Petsko, G.A., Ringe, D. und Fast, W. *Biochemistry*. **46**(42): 11789-11799. (2007)
205. Loisel, M. und Anderson, K.W. *Biofouling*. **19**(2): 77-85. (2003)
206. Lu, S. und Anseth, K.S. *Macromolecules*. **33**(7): 2509-2515. (2000)
207. Luzinov, I., Julthongpipit, D., Liebman-Vinson, A., Cregger, T., Foster, M.D. und Tsukruk, V.V. *Langmuir*. **16**: 504-516. (2000)
208. Lyczak, J.B., Cannon, C.L. und Pier, G.B. *Microbes and Infections*. **2**(9): 1051-1060. (2000)
209. Martin, A.N. *Diffusion and Dissolution*. In: *Physical pharmacy: Physical Chemical Principles in the Pharmaceutical Sciences*. 4th ed. Lea & Febiger: Philadelphia. (1993)
210. Martinelli, D., Grossmann, G., Sequin, U., Brandl, H. und Bachofen, R. *BMC Microbiology*. **4**(1): 25. (2004)
211. Mathias, J. und Wannemacher, G. *Journal of Colloid and Interface Science*. **125**(1): 61-68. (1988)
212. McClean, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J.H., Swift, S., Bycroft, B.W., Stewart, G.S.A.B. und Williams, P. *Microbiology*. **143**(12): 3703-3711. (1997)
213. McLean, R.J.C., Whiteley, M., Stickler, D.J. und Fuqua, W.C. *FEMS Microbiology Letters*. **154**(2): 259-263. (1997)
214. Mei, G.Y., Yan, X.X., Turak, A., Luo, Z.Q. und Zhang, L.Q. *Applied Environmental Microbiology*. **76**(15): 4933-4942. (2010)
215. Mellott, M.B., Searcy, K. und Pishko, M.V. *Biomaterials*. **22**(9): 929-941. (2001)
216. Merrill, E., W., Dennison, K., A. und Sung, C. *Biomaterials*. **14**(15): 1117-1126. (1993)
217. Miller, B.M. und Bassler, B.L. *Annual Review Microbiology*. **55**: 165-199. (2001)
218. Miller, J. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 355. (1972)
219. Miller, M.B. und Bassler, B.L. *Annual Review of Microbiology*. **55**: 165-199. (2001)
220. Milović, N.M., Wang, J., Lewis, K. und Klibanov, A.M. *Biotechnology and Bioengineering*. **90**(6): 715-722. (2005)
221. Minier, M., Salmain, M., Yacoubi, N., Barbes, L., Méhivier, C., Zanna, S. und Pradier, C.-M. *Langmuir*. **21**(13): 5957-5965. (2005)
222. Momb, J., Wang, C., Liu, D., Thomas, P.W., Petsko, G.A., Guo, H., Ringe, D. und Fast, W. *Biochemistry*. **47**(29): 7715-7725. (2008)
223. Mrksich, M., Chen, C.S., Xia, Y., Dike, L.E., Ingber, D.E. und Whitesides, G.M. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **93**(20): 10775-10778. (1996)
224. Mukamolova, G.V., Kaprelyants, A.S., Young, D.I., Young, M. und Kell, D.B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **95**(15): 8916-8921. (1998)

225. Nadarajah, A., Lu, C.F. und Chittur, K.K. *Modeling the Dynamics of Protein Adsorption to Surfaces*. In: Brash, J.L. und Horbett, T.A., Eds.: *Proteins at Interfaces II: Fundamentals and Applications*. CAS Symposium Series. (1995)
226. Nagaoka, S. und Nakao, A. *Biomaterials*. **11**(2): 119-121. (1990)
227. Naves, P., Del Prado, G., Ponte, C. und Soriano, F. *Journal of Chemotherapy*. **22**(5): 312-317. (2010)
228. New England BioLabs(R) Inc. *pMAL™ Protein Fusion and Purification System*. (2011)
229. Ng, F.S., Wright, D.M. und Seah, S.Y. *Applied Environmental Microbiology*. **77**(4): 1181-1186. (2011)
230. Nguyen, K.T. und West, J.L. *Biomaterials*. **23**(22): 4307-4314. (2002)
231. Ni, N., Li, M., Wang, J. und Wang, B. *Medicinal Research Reviews*. **29**(1): 65-124. (2009)
232. Nithya, C., Aravindraja, C. und Pandian, S.K. *Research in Microbiology*. **161**(4): 293-304. (2010)
233. Nouwens, A.S., Beatson, S.A., Whitchurch, C.B., Walsh, B.J., Schweizer, H.P., Mattick, J.S. und Cordwell, S.J. *Microbiology*. **149**(5): 1311-1322. (2003)
234. Ochsner, U.A., Fiechter, A. und Reiser, J. *Journal of Biological Chemistry*. **269**(31): 19787-19795. (1994)
235. Oger, P.M. und Uroz, S. *Screening for N-AHSL-Based-Signaling Interfering Enzymes*. In: Streit, W.R. und Daniel, R., Eds.: *Metagenomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Springer Science + Business Media. 203-217. (2010)
236. Okabe, S. und Kamagata, Y. *Wastewater Treatment*. In: Liu, W.-T. und Jansson, J.K., Eds.: *Environmental Molecular Biology*. Ciaser Academic Press: Norfolk. 191-210. (209)
237. Ollesch, J. *Praktisch angewandte FTIR-Spektroskopie zur Proteinanalyse*. VDM Verlag Dr. Müller Aktiengesellschaft & Co. KG: Saarbrücken. 22. (2008)
238. Onaizi, S.A. und Leong, S.S. *Biotechnology Advances*. **29**(1): 67-74. (2011)
239. Ozer, E.A. und Zabner, J. *Infectious Diseases and Vaccines*. **9**(Supplement 1): 213-214. (2004)
240. Padmavathi, N.C. und Chatterji, P.R. *Macromolecules*. **29**(6): 1976-1979. (1996)
241. Pan, J., Huang, T., Yao, F., Huang, Z., Powell, C.A., Qiu, S. und Guan, X. *Expression and characterization of aiiA gene from Bacillus subtilis BS-1 Microbiological Research*. Seiten: 711-716. (2008)
242. Park, B. und Song, S. *Biochip Journal*. **1**(2): 140-143. (2007)
243. Park, J.Y., Lee, Y.H., Yang, K.Y. und Kim, Y.C. *Letters in Applied Microbiology*. **51**(6): 619-624. (2010)
244. Park, S.-J., Park, S.-Y., Ryu, C.-M., Park, S.-H. und Lee, J.-I. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. **18**(9): 1518-1521. (2008)
245. Park, S.-Y., Kang, H.-O., Jang, H.-S., Lee, J.-K., Koo, B.-T. und Yum, D.-Y. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**(5): 2632-2641. (2005)
246. Park, S.-Y., Lee, S.J., Oh, T.-K., Oh, J.-W., Koo, B.-T., Yum, D.-Y. und Lee, J.-K. *Microbiology*. **149**(6): 1541-1550. (2003)
247. Parsek, M. und Greenberg, P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **97**(16): 8789-8793. (2000)
248. Parsek, M.R. und Greenberg, E.P. *Trends in Microbiology*. **13**(1): 27-33. (2005)
249. Passador, L., Cook, J.M., Gambello, M.J., Rust, L. und Iglewski, B.H. *Science*. **260**(5111): 1127-1130. (1993)
250. Pearson, J.P., Gray, K.M., Passador, L., Tucker, K.D., Eberhard, A., Iglewski, B.H. und Greenberg, E.P. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. **91**(1): 197-201. (1994)
251. Pearson, J.P., Passador, L., Iglewski, B.H. und Greenberg, E.P. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. **92**(5): 1490-1494. (1995)

-
252. Pearson, J.P., Pesci, E.C. und Iglewski, B.H. *Bacteriology*. **179**(18): 5756-5767. (1997)
253. Peppas, N.A., Hilt, J.Z., Khademhosseini, A. und Langer, R. *Advanced Materials*. **18**(11): 1345-1360. (2006)
254. Persson, T., Givskov, M. und Nielsen, J. *Current Medical Chemistry*. **12**: 3103-3115. (2005)
255. Peyton, S.R., Raub, C.B., Keschrums, V.P. und Putnam, A.J. *Biomaterials*. **27**(28): 4881-4893. (2006)
256. Piper, K.R., von Bodman, S.B. und Farrand, S.K. *Nature*. **362**(6419): 448-450. (1993)
257. Pratten, J. und Ready, D. *Methods in Molecular Biology*. **642**: 203-215. (2010)
258. Rahme, L.G., Stevens, E.J., Wolfort, S.F., Shao, J., Tompkins, R.G. und Ausubel, F.M. *Science*. **268**(5219): 1899-902. (1995)
259. Rasch, M., Buch, C., Austin, B., Slierendrecht, W.J., Ekmann, K.S., Larsen, J.L., Johansen, C., Riedel, K., Eberl, L., Givskov, M. und Gram, L. *Systematic and Applied Microbiology*. **27**(3): 350-359. (2004)
260. Rasmussen, T.B., Bjarnsholt, T., Skindersoe, M.E., Hentzer, M., Kristoffersen, P., Kote, M., Nielsen, J., Eberl, L. und Givskov, M. *Bacteriology*. **187**(5): 1799-1814. (2005)
261. Rasmussen, T.B. und Givskov, M. *Microbiology*. **152**: 895-904. (2006)
262. Ratner, B.D. *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine* Vol. xii. Elsevier Academic Press.: Amsterdam, Boston. (2004)
263. Rauch, P. *Schimmelpilze in Wohngebäuden - Ursachen, Vermeidung und Sanierung*. (2007)
264. Rawlings, D.E. und Johnson, D.B. *Microbiology*. **153**(2): 315-324. (2007)
265. Reimann, C., Ginet, N., Michel, L., Keel, C., Michaux, P., Krishnapillai, V., Zala, M., Heurlier, K., Triandafillu, K., Harms, H., Defago, G. und Haas, D. *Microbiology*. **148**(4): 923-32. (2002)
266. Ren, D., Zuo, R., Gonzalez Barrios, A.F., Bedzyk, L.A., Eldridge, G.R., Pasmore, M.E. und Wood, T.K. *Applied Environmental Microbiology*. **71**(7): 4022-4034. (2005)
267. Reuter, H. *Chemie Ingenieur Technik*. **55**(4): 293-301. (1983)
268. Riaz, K., Elmerich, C., Moreira, D., Raffoux, A., Dessaux, Y. und Faure, D. *Environmental Microbiology*. **10**(3): 560-570. (2008)
269. Ridgway, H.F. und Olson, B.H. *Applied Environmental Microbiology*. **44**(4): 972-987. (1982)
270. Riesenberg, D., Menzel, K., Schulz, V., Schumann, K., Veith, G., Zuber, G. und Knorre, W.A. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **34**(1): 77-82. (1990)
271. Romero, M., Diggle, S.P., Heeb, S., Camara, M. und Otero, A. *FEMS Microbiology Letters*. **280**(1): 73-80. (2008)
272. Rosche, B., Li, X.Z., Hauer, B., Schmid, A. und Buehler, K. *Trends in Biotechnology*. **27**(11): 636-643. (2009)
273. Rutala, W.A. und Weber, D.J. *Clinical Microbiology Reviews*. **10**(4): 597-610. (1997)
274. Saleh, S., Haddadin, R.N.S., Baillie, S. und Collier, P.J. *Letters in Applied Microbiology*. **52**(2): 87-95. (2011)
275. Salman, S., Soundararajan, S., Safina, G., Satoh, I. und Danielsson, B. *Talanta*. **77**(2): 490-493. (2008)
276. Sambrook, J. *Molecular cloning: A laboratory manual* Vol. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York. A.3. (2001)
277. Sangen, M. und Skuhr, P. *Chemie Ingenieur Technik*. **58**(6): 457-464. (1986)
278. Sawhney, S.A., Pathak, C.P., van Rensburg, J.J., Dunn, R.C. und Hubbell, J.A. *Journal of Biomedical Materials Research*. **28**(7): 831-838. (1994)
279. Schachter, B. *Nature Biotechnology*. **21**(4): 361-365. (2003)
280. Schipper, C., Hornung, C., Bijtenhoorn, P., Quitschau, M., Grond, S. und Streit, W.R. *Applied and Environmental Microbiology*. **75**(1): 224-233. (2009)
281. Schneider, R., Lockett, C.V., Johnson, D. und Belas, R. *Microbiology*. **148**(3): 773-82. (2002)

-
282. Schuster, M., Lostroh, C.P., Ogi, T. und Greenberg, E.P. *Journal of Bacteriology*. **185**(7): 2066-2079. (2003)
283. Sekhon, B.S. und Kamboj, S.R. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. **6**(5): 612-618. (2010)
284. Serra, L., Domenech, J. und Peppas, N.A. *Biomaterials*. **27**(31): 5440-5451. (2006)
285. Shrout, J.D., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M. und Parsek, M.R. *MRS Bulletin*. **36**(5): 367-373. (2011)
286. Singh, R., Paul, D. und Jain, R.K. *Trends in Microbiology*. **14**(9): 389-397. (2006)
287. Siqueira Petri, D.F., Wenz, G., Schunk, P. und Schimmel, T. *Langmuir*. **15**: 4520. (1999)
288. Slade, A.H., Ellis, R.J., vanden Heuvel, M. und Stuthridge, T.R. *Water Science and Technology*. **50**(3): 111-122. (2004)
289. Stams, A.J.M. und Oude Elferink, S.J.W.H. *Current Opinion in Biotechnology*. **8**(3): 328-334. (1997)
290. Steindler, L., Devescovi, G., Subramoni, S. und Venturi, V. *Microbiological Methods*. **73**(3): 273-275. (2008)
291. Stewart, P.S. und William Costerton, J. *The Lancet*. **358**(9276): 135-138. (2001)
292. Stoodley, P., Dodds, I., Boyle, J.D. und Lappin-Scott, H.M. *Journal of Applied Microbiology*. **85**(S1): 19-28. (1998)
293. Stoodley, P., Hall-Stoodley, L., Boyle, J.D., Jorgensen, F. und Lappin-Scott, H.M. *Community Structure and Cooperation in Biofilms, Society for General Microbiology Symposium 59*, Cambridge. Cambridge University Press. (2000)
294. Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G. und Costerton, J.W. *Annual Review of Microbiology*. **56**: 187-209. (2002)
295. Swift, R.J., Carter, S.F., Widdowson, D.A., Mason, J.R. und Leak, D.J. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **55**(6): 721-726. (2001)
296. Taga, M.E. und Bassler, B.L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **100**(Suppl 2): 14549-14554. (2003)
297. Tessmar, J.K. und Göpferich, A.M. *Macromolecular Bioscience*. **7**: 23-39. (2007)
298. Thomas, P.W. und Fast, W. *Heterologous overexpression, purification, and in vitro characterization of AHL lactonases*. In: Rumbaugh, K.P., Ed.: *Quorum Sensing - Methods and Protocols*. Springer Science + Business Media: New York, Dordrecht, Heidelberg, London. 275-290. (2011)
299. Thomas, P.W., Stone, E.M., Costello, A.L., Tierney, D.L. und Fast, W. *Biochemistry*. **44**(20): 7559-7569. (2005)
300. Thurlow, L.R., Hanke, M.L., Fritz, T., Angle, A., Aldrich, A., Williams, S.H., Engebretsen, I.L., Bayles, K.W., Horswill, A.R. und Kielian, T. *Journal of Immunology*. **186**(11): 6585-6596. (2011)
301. Toder, D.S., Gambello, M.J. und Iglewski, B.H. *Molecular Microbiology*. **5**(8): 2003-2010. (1991)
302. Toomey, R., Freidank, D. und Rühle, J. *Macromolecules*. **37**(3): 882-887. (2004)
303. Tré-Hardy, M., Vanderbist, F., Traore, H. und Devleeschouwer, M.J. *International journal of antimicrobial agents*. **31**(4): 329-336. (2008)
304. Tripp, C.P. und Hair, M.L. *Langmuir*. **11**(1): 149-155. (1995)
305. Tsukruk, V.V. und Blinznyuk, V.N. *Langmuir*. **14**(2): 446-455. (1998)
306. Tsukruk, V.V., Luzinov, I. und D., J. *Langmuir*. **15**: 3029-3032. (1999)
307. Ueda, S. und Kuwabara, Y. *Biocontrol Science*. **12**(4): 149-153. (2007)
308. Uhrich, K.E., Cannizzaro, S.M., Langer, R.S. und Shakesheff, K.M. *Chemical Reviews*. **99**(11): 3181-3198. (1999)
309. Ulrich, R.L. *Applied Environmental Microbiology*. **70**(10): 6173-6180. (2004)

-
310. Uroz, S., Chhabra, S.R., Camara, M., Williams, P., Oger, P. und Dessaux, Y. *Microbiology*. **151**(Pt 10): 3313-22. (2005)
311. Uroz, S., Oger, P.M., Chapelle, E., Adeline, M.T., Faure, D. und Dessaux, Y. *Applied Environmental Microbiology*. **74**(5): 1357-1366. (2008)
312. Valenzuela, L., Chi, A., Beard, S., Orell, A., Guiliani, N., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. und Jerez, C.A. *Biotechnology Advances*. **24**(2): 197-211. (2005)
313. Valodkar, M., Rathore, P.S., Jadeja, R.N., Thounaojam, M., Devkar, R.V. und Thakore, S. *Journal of Hazardous Materials*. **201-202**: 244-249. (2012)
314. Venturi, V. *FEMS Microbiology Reviews*. **30**(2): 274-291. (2006)
315. Venturi, V. *FEMS Microbiology Reviews*. **30**(2): 274-91. (2006)
316. Veronese, F.M. und Mero, A. *BioDrugs*. **22**(5): 315-329. (2008)
317. Wagner, M., Loy, A., Nogueira, R., Purkhold, U., Lee, N. und Daims, H. *Antonie van Leeuwenhoek*. **81**(1): 665-680. (2002)
318. Wagner, V.E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A.I. und Iglewski, B.H. *Journal of Bacteriology*. **185**(7): 2080-2095. (2003)
319. Walters, M. und Sperandio, V. *International Journal of Medical Microbiology*. **296**(2-3): 125-131. (2006)
320. Wang, H., Cai, T., Weng, M., Zhou, J., Cao, H., Zhong, Z. und Zhu, J. *Medical Microbiology*. **55**(12): 1751-1753. (2006)
321. Wang, L.-H., Weng, L.-X., Dong, Y.-H. und Zhang, L.-H. *Biological Chemistry*. **279**(14): 13645-13651. (2004)
322. Wang, W.Z., Morohoshi, T., Ikenoya, M., Someya, N. und Ikeda, T. *Applied Environmental Microbiology*. **76**(8): 2524-2530. (2010)
323. Wang, Y., Dai, Y., Zhang, Y., Hu, Y., Yang, B. und Chen, S. *Science China Life Sciences*. **50**(3): 385-391. (2007)
324. Wang, Z.-W. und Chen, S. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **83**(1): 1-18. (2009)
325. Waters, C.M. und Bassler, B.L. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. **21**(1): 319-346. (2005)
326. Watson, W.T., Minogue, T.D., Val, D.L., von Bodman, S.B. und Churchill, M.E.A. *Molecular Cell*. **9**(3): 685-694. (2002)
327. Weiß, J. *Ionenchromatographie*. WILEY-VCH: Weinheim. (2001)
328. Wellhäuser, R., Krüger, S. und Zschaler, R. *Reinigung und Desinfektion - Kommentar zu DIN 10516*. Beuth-Kommentare, DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Ed. Beuth Verlag GmbH: Berlin, Wien, Zürich. (2001)
329. Wells, J.S., Trejo, W.H., Principe, P.A., Bush, K., Georgopadakou, N., Bonner, D.P. und Sykes, R.B. *Antibiotics (Tokyo)*. **35**(2): 184-188. (1982)
330. Whitehead, N.A., Barnard, A.M.L., Slater, H., Simpson, N.J.L. und Salmond, G.P.C. *FEMS Microbiology Reviews*. **25**(4): 365-404. (2001)
331. Whitehead, N.A., Welch, M. und Salmond, G.P.C. *Nature Biotechnology*. **19**(8): 735-736. (2001)
332. Whooley, M.A. und McLoughlin, A.J. *Journal General Microbiology*. **129**(4): 989-996. (1983)
333. Whooley, M.A., O'Callaghan, J.A. und McLoughlin, A.J. *Journal General Microbiology*. **129**(4): 981-988. (1983)
334. Wildbrett, G. *Reinigung und Desinfektion in der Lebensmittelindustrie*. In. Behr's Verlag GmbH & Co.: Hamburg. (1996)

-
335. Wilkins, D.K., Grimshaw, S.B., Receveur, V., Dobson, C.M., Jones, J.A. und Smith, L.J. *Biochemistry*. **38**(50): 16424-16431. (1999)
336. Wilkins, M.R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J.C., Williams, K.L., Appel, R.D. und Hochstrasser, D.F. *Methods in Molecular Biology*. **112**: 531-552. (1999)
337. Williams, P., Camara, M., Hardman, A., Swift, S., Milton, D., Hope, V.J., Winzer, K., Middleton, B., Pritchard, D.I. und Bycroft, B.W. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. **355**(1397): 667-680. (2000)
338. Wimpenny, J., Manz, W. und Szewzyk, U. *FEMS Microbiology Reviews*. **24**(5): 661-671. (2000)
339. Wimpenny, J.W.T. und Colasanti, R. *FEMS Microbiology Ecology*. **22**(1): 1-16. (2006)
340. Winson, M.K., Camara, M., Latifi, A., Foglino, M., Chhabra, S.R., Daykin, M., Bally, M., Chapon, V., Salmond, G.P.C., Bycroft, B.W., Lazdunski, A., Stewart, G.S.A.B. und Williams, P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **92**: 9427-9431. (1995)
341. Winson, M.K., Swift, S., Fish, L., Throup, J.P., Jorgensen, F., Chhabra, S.R., Bycroft, B.W., Williams, P. und Stewart, G.S. *FEMS Microbiology Letters*. **163**(2): 185-192. (1998)
342. Winzer, K. und Williams, P. *International Journal of Medical Microbiology*. **291**(2): 131-143. (2001)
343. Wood, T.K. und Williams, P. *Signaling in Escherichia coli biofilms*. In: Kjelleberg, S. und Givskov, M., Eds.: *The Biofilm Mode of Life: Mechanisms and Adaptions*. Horizon Bioscience: Wymondham. 123-140. (2007)
344. Xiang, D.F., Kolb, P., Fedorov, A.A., Meier, M.M., Fedorov, L.V., Nguyen, T.T., Sterner, R., Almo, S.C., Shoichet, B.K. und Raushel, F.M. *Biochemistry*. **48**(10): 2237-2247. (2009)
345. Yadav, V., Harjai, K., Kaur, R., Joshi, K. und Sharma, S. *Folia Microbiologica (Praha)*. **49**(4): 465-470. (2004)
346. Yang, F., Wang, L.-H., Wang, J., Dong, Y.-H., Hu, J.Y. und Zhang, L.-H. *FEBS Letters*. **579**(17): 3713-3717. (2005)
347. Yang, M., Zhang, F., Lin, B.H., Su, X.H., Guo, L.Q., Huang, Z.P. und Guan, X. *Fen Zi Xi Bao Sheng Wu Xue Bao*. **41**(6): 465-472. (2008)
348. Yates, E.A., Philipp, B., Buckley, C., Atkinson, S., Chhabra, S.R., Sockett, R.E., Goldner, M., Dessaux, Y., Cámara, M., Smith, H. und Williams, P. *Infection and Immunity*. **70**(10): 5635 - 5646. (2002)
349. Ye, S., Majumdar, P., Chisholm, B., Stafslie, S. und Chen, Z. *Langmuir*. **26**(21): 16455-16462. (2010)
350. Yin, X.-T., Xu, L., Fan, S.-S., Xu, L.-N., Li, D.-C. und Liu, Z.-Y. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **26**(8): 1361-1367. (2010)
351. Zainuddin, Cooper-White, J.J. und Hill, D.J.T. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. **13**(9): 1007-1020. (2002)
352. Zhang, H.-B., Wang, L.-H. und Zhang, L.-H. *Detection and Analysis of Quorum-Quenching Enzymes Against Acyl Homoserine Lactone Quorum-Sensing Signals*. Current Protocols in Microbiology. John Wiley & Sons, Inc. Chapter1: Unit 1C.3.(2005)
353. Zhang, H.B., Wang, L.H. und Zhang, L.H. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. **99**(7): 4638-4643. (2002)
354. Zhang, L., Murphy, P.J., Kerr, A. und Tate, M.E. *Nature*. **362**(6419): 446-448. (1993)
355. Zheng, S., Xiao, Liu, Y., Palumbo, F.S., Luo, Y. und Prestwich, G.D. *Biomaterials*. **25**(7-8): 1339-1348. (2004)

II. Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Bakterienstämme zur Expression, als Reporterstämme oder zur Biofilmbildung verwendet (siehe Tabelle 37).

Tabelle 37: Bakterienstämme und deren Eigenschaften

Stamm	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
Expressionsstamm		
<i>E. coli</i> SoluBL21 TM (DE3)	F <i>ompT hsdS_B (r_B-m_B) gal dcm</i> (DE3)	AMS Biotechnology (Europe) Ltd; Frankfurt/Main, BRD
Biosensorstämme und deren Kontrollstämme		
<i>A. tumefaciens</i> A136 (pCF218)(pCF374)	Reporterstamm zur Detektion von AHL über die Bildung von β -Galaktosidase; Spec ^R ; Tet ^R	R. McLean, Department of Biology, Texas State University, San Marcos, USA; ¹²⁰
<i>A. tumefaciens</i> KYC6	Wildstamm, Pflanzenpathogen; <i>traM::Tris-gusA</i> mit pCF218; Überexpression von AHL	R. McLean, Department of Biology, Texas State University, San Marcos, USA; ¹¹⁸
<i>A. tumefaciens</i> NTL4 (pCF218)(pCF372)	Reporterstamm zur Detektion von AHL über die Bildung von β -Galaktosidase, Spec ^R ; Tet ^R	C. W. Michiels, Katholieke Universiteit Leuven, BE; ¹²⁰
<i>A. tumefaciens</i> NTL4 (pCF218)(pCF372)	Reporterstamm zur Detektion von AHL über die Bildung von β -Galaktosidase; Spec ^R ; Tet ^R	W. R. Streit, Biozentrum Klein Flottbeck, Universität Hamburg, BRD; ¹²⁰
<i>A. tumefaciens</i> NTL1 (pZLR4)	Reporterstamm zur Detektion von AHL über die Bildung von β -Galaktosidase; Gen ^R	P. Oger, Laboratoire des Sciences de la Terre, Ecole normale supérieure de Lyon, F; ⁵⁶
<i>C. violaceum</i> ATCC 12472	Wildstamm, tropisches Humanpathogen aus dem Boden	R. McLean, Department of Biology, Texas State University, San Marcos, USA ³²⁹
<i>C. violaceum</i> CV026	Reporterstamm zur Detektion von AHL über die Bildung von Violacein; Kan ^R	R. McLean, Department of Biology, Texas State University, San Marcos, USA; ²¹³
<i>E. coli</i> MG1655 Δ luxS	Mutante in <i>luxS</i> (Autoinducer-Bildung)	Fraunhofer- Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik IGB, intern, Stuttgart, BRD
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Wildstamm, nicht mukoid	B. Iglewski, University of Rochester School of Medicine and Dentistry, New York, USA; ¹⁵⁶
<i>P. aeruginosa</i> PA14	Wildstamm	R. Kolter, Harvard Medical School, Boston, USA; ²⁵⁸
<i>P. aeruginosa</i> Pa14 Δ lasI	Mutante in <i>lasI</i>	R. Kolter, Harvard Medical School, Boston, USA; ¹⁵⁵
Biofilmassaystämme		
<i>E. coli</i> K12 (MG1655), ATCC 700926	Wildstamm, humanpathogenes Darmbakterium, Biofilmbildner	LGC Standards GmbH, Wesel, BRD
<i>Enterobacter aerogenes</i> DSM 30053	Wildstamm, humanpathogenes Darmbakterium	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellen GmbH, Braunschweig, BRD
<i>Proteus mirabilis</i> DSM 4479	Wildstamm, fakultativ pathogenes und besonders bewegliches Darmbakterium	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellen GmbH, Braunschweig, BRD
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Wildstamm, humanpathogener Boden- und Wasserkeim, nicht mukoid, Biofilmbildner	B. Iglewski, University of Rochester School of Medicine and Dentistry, New York, USA, ¹⁵⁶
<i>P. aeruginosa</i> PA14	Wildstamm	R. Kolter, Harvard Medical School, Boston, USA; ²⁵⁸
<i>P. pseudoalcaligenes</i> DSM 50189	Wildstamm, nicht-pathogener Wasserkeim	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellen GmbH, Braunschweig, BRD
<i>P. pseudofluorescens</i> DSM 50090	Wildstamm	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellen GmbH, Braunschweig, BRD
<i>Sarcina lutea</i> DSM 20030	Gram-positiver Wildstamm	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellen GmbH, Braunschweig, BRD

III. Medien und Zusätze sowie Puffer und Lösungen

Alle Medien und deren Einzelbestandteile wurden im Regelfall autoklaviert. So dies nicht möglich war, wurden die jeweiligen Medien(-bestandteile) sterilfiltriert (siehe Anmerkungen). Antibiotika wurden erst nach dem Abkühlen des Mediums zugegeben.

AT-Medium pH 7,0

CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,010 g/l
FeSO ₄	0,003 g/l
Glukose (nachträglich sterilfiltriert zugeben)	5,000 g/l
KH ₂ PO ₄ anhydr.	11,900 g/l
MnSO ₄	0,011 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,980 g/l

Feedströme der Fermentation

Kohlenstofffeed:	Glukose	800,00 g/l
Stickstofffeed:	(NH ₄) ₂ SO ₄	168,80 g/l
	NH ₄ Cl	106,00 g/l

LB-Medium pH 7,5²⁷⁶

Bacto-Trypton	10, 000 g/l
Hefeextrakt	5,000 g/l
NaCl	10, 000 g/l

Mass Cultivation Media MC2709 nach Riesenberg²⁷⁰

Glukose (nachträglich sterilfiltriert zugeben)	25,000 g/l
K ₂ HPO ₄	14,600 g/l
NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	4,000 g/l
Na ₂ SO ₄	2,000 g/l
NH ₄ Cl	1,000 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,360 g/l
(NH ₄) ₂ HC ₆ H ₅ O ₇	2,000 g/l
MgSO ₄ x 7H ₂ O (Stock 246,345 g/l) getrennt autoklavieren und nachträglich zugeben	0,739 g/l
Thiamin-HCl (Stock 10,000 g/l) getrennt autoklavieren und nachträglich zugeben	0,020 g/l
50 x Spurenelemente (siehe unten)	20,00 ml/l

Minimalmedium M9²⁷⁶

CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,015 g/l
Glukose (nachträglich sterilfiltriert zugeben)	1,980 g/l
KH ₂ PO ₄ anhydr.	2,990 g/l
MgSO ₄ x 7H ₂ O (nachträglich sterilfiltriert zugeben)	0,492 g/l
NaCl	0,497 g/l
Na ₂ HPO ₄ anhydr.	48,576 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,470 g/l

Schwärmagar für *P. aeruginosa* PA14 (ergänzt M9 Medium)³⁶

M9 Medium (siehe oben) ohne NH₄Cl

Natriumglutamat	5,580 g/l
Agar	5,000 g/l

Schwimmagar für *P. aeruginosa* PAO1 (ergänzt M9 Medium)

M9 Medium (siehe oben)

Agar	3,000 g/l
------	-----------

Schwärmagar für *P. mirabilis* DSM4479¹⁶⁹

LB-Medium (siehe oben)

Agar	7,000 g/l
------	-----------

Schwimmagar ³⁶für *P. mirabilis* DSM4479¹⁶⁹

LB-Medium (siehe oben)

Agar	3,000 g/l
------	-----------

Stammkultur-Agar

LB-Medium (siehe oben) mit

Agar	15,000 g/l
------	------------

50 x Spurenelemente

CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,075 g/l
C ₆ H ₅ FeO ₇ x H ₂ O	5,040 g/l
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,027 g/l
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,105 g/l
H ₃ BO ₃	0,150 g/l
MnSO ₄ x H ₂ O	0,180 g/l
Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	3,015 g/l
NaMoO ₄ x 5H ₂ O	0,105 g/l
Zn(CH ₃ COO) ₂ x 2H ₂ O	1,689 g/l

Je nach Bakterienstamm erfordert die Kultivierung auch den Zusatz von Antibiotika. Tabelle 38 zeigt welcher Stamm, mit welchem/n Antibiotika und in welcher Konzentration kultiviert werden musste.

Tabelle 38: Antibiotikazugaben zu den jeweiligen Kulturmedien

	Ampicillin	Gentamycin	Kanamycin	Spectinomycin	Tetracyclin
<i>A. tumefaciens</i> NTL1 pzLR4		30 µg/ml			
<i>A. tumefaciens</i> NTL4				50 µg/ml	4,5 g/ml
<i>C. violaceum</i> CV026			20 µg/ml		
<i>E. coli</i> mit pMAL c2x aiaa/aib/attm	100 µg/ml				

Zur Expression der AHL-lactonasen wurden spezifische Cofaktoren benötigt (nach einer persönlichen Kommunikation mit W. Fast):

AiiA	0,130 g/l CoCl ₂
AiiB	0,081 g/l ZnSO ₄
BlcC	0,130 g/l CoCl ₂

Die in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen sind nachfolgend aufgelistet. So weit nicht anders angegeben, wurden sie unsteril verwendet. Die Zusammensetzung aller Puffer und Lösungen ist jeweils auf einen Liter ausgelegt. Das Volumen von einem Liter wurde durch die Zugabe von MilliQ-Wasser erreicht.

Affinitätschromatographie-Puffer pH 7,4

EDTA	0,292 g/l
NaCl	11,688 g/l
Tris-HCl	3,152 g/l

Aufschlusspuffer pH 7,4

NaCl	5,844 g/l
Tris-HCl	2,423 g/l

Blocklösung

NaCl	8,766 g/l
KCl	1,492 g/l
Milchpulver	50,000 g/l
Tween20 [®]	5,000 g/l

Coomassie-Entfärbe-lösung

Essigsäure	37,5 ml/l
Methanol	200 ml/l

Coomassie-Färbe-lösung

Methanol	200 ml/l
RotiBlue Coomassielösung	200 ml/l

Dinatriumcitratpuffer pH 4,0

Natriumcitrat	14,220 g/l
HCl	1,637 g/l

Dinatriumcitratpuffer pH 6,5

Dinatriumcitrat	14,142 g/l
NaOH	1,808 g/l

EDC/sulfo-NHS-lösung in MES60 pH 6,0

EDC	5,000 g/l
Sulfo-NHS	5,000 g/l

EDC/sulfo-NHS-Protein-lösung in MES60 pH 6,0

EDC	4,000 g/l
Sulfo-NHS	11,000 g/l
AHL-lactonase	200 mg/l

Glycinpuffer pH 12,0

Glycin	7,507 g/l
NaCl ₂	2,688 g/l
NaOH	2,160 g/l

HEPES-Puffer pH 7,5

Na ₂ SO ₄	28,400 g/l
HEPES	0,477 g/l

Ionenaustauschchromatographie-Puffer

NaCl	58,440 g/l
TEA	2,024 g/l

MES60 pH 6,0

2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure	10,861 g/l
----------------------------------	------------

Molybdatreagenz

Natriummolybdat	100,000 g/l
Natriumnitrit	100,000 g/l

Natriumcitratpuffer pH 4,0

Natriumcitrat	14,220 g/l
NaOH	1,796 g/l

Natriumcitratpuffer pH 6,5

Natriumcitrat	14,142 g/l
NaOH	1,808 g/l

Piranha-lösung

Ammoniak (25 %)	750,00 ml
Wasserstoffperoxid (30 %)	250,00 ml

PBS pH 7,4 (autoklaviert)

NaCl	8,006 g/l
Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O	8,197 g/l
KCl	0,201 g/l
KH ₂ PO ₄ anhydr.	0,204 g/l

Probenpuffer für SDS-PAGE pH 6.8

β-Mercaptoethanol	100,0 ml/l
Bromphenolblau	0,100 g/l
Glycerol	200,0 ml/l
SDS	40,000 g/l
Tris-HCl	15,143 g/l

REM-Puffer pH 7,3 (autoklaviert)

NaCl	4,792 g/l
NaHPO ₄ x 7H ₂ O	0,055 g/l
KH ₂ PO ₄	1,497 g/l

Silanisierungslösung

Ethanol	902,5 ml/l
Silan	50,0 ml/l

Silberfärbung – Fixierlösung

Ethanol	400,00 ml/l
Formaldehyd	0,50 ml/l

Silberfärbung – Entwicklerlösung

Formaldehyd	0,56 ml/l
Na ₂ CO ₃	30,000 g/l
Na ₂ S ₂ O ₃	0,400 mg/l

TBS-T Puffer

NaCl	8,766 g/l
KCl	1,492 g/l
Tween20 [®]	5,000 g/l

Totalproteasereagenz pH 7,5

Azocasein	3,300 g/l
CaCl ₂	0,018 g/l
Tris-HCl	12,000 g/l

Tris-Puffer pH 7,8

CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,191 g/l
Tris-HCl	121,14 g/l

XTT-lösung

Menadion (in Aceton gelöst)	0,752 mg/l
XTT	1,000 g/l

Z-Puffer pH 7,0²¹⁸

Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O	60,720 g/l
NaH ₂ PO ₄ x 7H ₂ O	9,803 g/l
Glukose	7,200 g/l
KCl	0,746 g/l
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,156 g/l

IV. Verwendete Chemikalien und Materialien

In den folgenden Tabellen 32 bis 37 werden die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Materialien in Gruppenzuteilungen aufgelistet:

- Kommerzielle Nachweis- und Reaktionskits (Tabelle 39),
- Chemikalien, welche zur Proteinexpression und deren Kontrolle verwendet wurden (Tabelle 40),
- Verwendete Chromatographiesäulen (Tabelle 41),
- Verwendete Enzyme und deren Substrate (Tabelle 42),
- Verwendete Chemikalien zum Nachweis und der Quantifizierung des *Quorum Sensing* und des Biofilms (Tabelle 43)
- Verwendete Materialien zum Nachweis und der Quantifizierung des *Quorum Sensing* und des Biofilms (Tabelle 44) und
- Verwendete Chemikalien zur Herstellung der Immobilisierung (Tabelle 45)

Tabelle 39: Verwendete Reaktions- und Nachweiskits

Nachweis-/Reaktionskits	Spezifikation	Bezugsquelle
Ammoniumnachweis		
Ammonium Küvetten-Test	Messbereich 47-130 mg/l NH ₄ -N	HACH LANGE GmbH, Düsseldorf, BRD
Dr. Lange Photometer Lasa100		HACH LANGE GmbH, Düsseldorf, BRD
SDS-PAGE und Western Blot		
XCell <i>Sure Lock</i> [®] Mini-Cell CE mark		Invitrogen GmbH, Karlsruhe, BRD
NuPAGE [®] Bis-Tris Gel	4-12 % Mini Gel	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, BRD
NuPAGE [®] MES SDS Running Buffer	20 x Konzentrat	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, BRD
SeeBlue [®] Pre-Stained Standard	Auftrennbereich von 4 kDa bis 250 kDa	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, BRD
iBlot [®] Gel Transfer Device		Invitrogen GmbH, Karlsruhe, BRD
iBlot [®] Transfer Stack (Nitrocellulose)		Invitrogen GmbH, Karlsruhe, BRD
SuperSignal West Dura Chemiluminescent Substrat	Zum Nachweis der HRP-Aktivität	Fischer Scientific GmbH, Schwerte, BRD

Tabelle 40: Chemikalien zur Proteinexpression und deren Kontrolle

Chemikalie	CAS-Nummer	Bezugsquelle
Antifoam A	-	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
Bradford-Reagenz	-	Bio-Rad Laboratories Inc., München, BRD
BSA-Standard, Fraktion V	-	Fischer Scientific GmbH, Schwerte, BRD
Coomassie Roti-Blue®	-	Carl ROTH GmbH & Co KG., Karlsruhe, BRD
Glukoseteststreifen Medi-Test Glukose 3	-	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, BRD
MBP-Antikörper, Maus, monoklonal, HRP-konjugiert	-	Antikörper-online GmbH, Aachen, BRD
Maltosebindendes Protein als Standard	-	Antikörper-online GmbH, Aachen, BRD
SOC-Medium	-	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt, BRD

Tabelle 41: Verwendetes Säulenmaterial zur Aufreinigung

Säule	Anwendung	Bezugsquelle
MBP-Trap_HP_1_ml	Affinitätschromatographie	GE Healthcare GmbH, Freiburg, BRD
Fast_Desalting_HR_10/10	Entsalzen	GE Healthcare GmbH, Freiburg, BRD
Superdex_75_10/300_GL	Größenausschlusschromatographie	GE Healthcare GmbH, Freiburg, BRD
Mono_Q_HR_5/5	Anionenaustauschchromatographie	GE Healthcare GmbH, Freiburg, BRD
Amicon Ultra-0,5 ml 10000MWCO	Zentrifugenröhrchen zur Aufkonzentration	Millipore GmbH, Schwalbach/Ts.

Tabelle 42: Verwendete Enzyme und deren Substrate

Chemikalie	Herkunft	CAS- Nummer	Bezugsquelle
AcTEV Protease	<i>tobacco etch virus</i>	-	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt, BRD
AiiA (E.C. 3.1.1.81)	<i>B. subtilis</i>	-	Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB, Stuttgart, BRD
AiiB (E.C. 3.1.1.81)	<i>B. subtilis</i>	-	Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB, Stuttgart, BRD
BleC (E.C. 3.1.1.81)	<i>A. tumefaciens</i>	-	Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB, Stuttgart, BRD
DNase I (E.C.3.1.21.1)	<i>Bos taurus</i>	9003-98-9	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
LL-37	Human	397562-32-8	BACHEM AG, Bubendorf, CH
Lysozym (E.C.3.2.1.17)	Hühnereiweiß	12650-88-3	Merck Chemicals Ltd., Nottingham, UK
Azocasein		102110-74-7	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
<i>Micrococcus lysodeictikus ATCC 4698, gefriergetrocknet</i>		-	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
Subtilisin (E.C.3.4.21.62)	<i>B. subtilis</i>	0914-01-1	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
N-Succinyl-Ala-Ala-Pro- Phe-p-Nitroanilid		70967-97-4	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD

Tabelle 43: Chemikalien zum Nachweis/Quantifizierung des QS und des Biofilms

Chemikalie	CAS-Nummer	Bezugsquelle
<i>N</i>-Acylhomoserinlactone		
<i>N</i> -Hexanoyl-DL-Homoserinlacton	106983-28-2	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
<i>N</i> -Dodecanoyl-DL-Homoserinlacton	18627-38-8	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
<i>N</i> -(3-Oxododecanoyl)-l-Homoserinlacton	18627-38-8	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
Nachweisreagenzien zur Quantifizierung des Biofilms beziehungsweise des <i>Quorum Sensings</i>		
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid	72040-90-6	Carl ROTH GmbH & Co KG., Karlsruhe, BRD
Fluoresceindiacetat	596-09-8	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
Kristallviolett	548-62-9	Carl ROTH GmbH & Co KG., Karlsruhe, BRD
L-Methionin	63-68-3	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
Pyranin	6358-69-6	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
<i>o</i> -Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid	369-07-3	Carl ROTH GmbH & Co KG., Karlsruhe, BRD
2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid	111072-31-2	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
Farbstoffe		
Bengalrosa	632-62-9	Carl ROTH GmbH & Co KG., Karlsruhe, BRD
Nilblausulfat	3625-57-8	Carl ROTH GmbH & Co KG., Karlsruhe, BRD
Phenolrot	143-74-8	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
Toluidinblau	92-31-9	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD

Tabelle 44: Materialien zum Nachweis/Quantifizierung des QS und des Biofilms

Chemikalie	CAS-Nummer	Bezugsquelle
Materialien zur Biofilmanzucht		
96 Multiwellplatte Flat Bottom mit Deckel	-	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, BRD
96 Multiwellplatten Flat Bottom schwarz Fluoronunc®	-	Nunc, Thermo Scientific GmbH, Schwerte, BRD
Sealing Tape, Clear Polyolefin, advanced optical	- -	Thermo Scientific GmbH, Schwerte, BRD
Calgary Biofilm Device ⁵⁵ High-Throughput MBEC-HTP Assay	-	Innovotech Inc., Edmonton, CA
Glassubstrat, Deckgläser #5, Borosilikatglas	-	Menzel GmbH, Braunschweig, BRD

Tabelle 45: Verwendete Chemikalien zur Herstellung der Immobilisierung

Chemikalie	CAS-Nummer	Bezugsquelle
Chemikalien zur Herstellung der Hydrogele		
Polyethylenglykoldiacrylat MW 575	26570-48-9	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
Polyethylenglykoldiacrylat MW 700	26570-48-9	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
Polyethylenglykoldiacrylat MW 2000	26570-48-9	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
Polyethylenglykoldiacrylat MW 6000	26570-48-9	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
2,2-Dimethoxy-1,2-diphenylethanone	91274-91-8	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
1-Vinyl-2-Pyrrolidinon	88-12-0	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
Chemikalien zur Silanisierung und zur anschließenden Derivatisierung sowie deren Substrate		
3-Aminopropyltriethoxysilan	919-30-2	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
2-(Carboxymethylthio)ethyltrimethylsilan	18269-42-6	ABCR GmbH & Co KG., Karlsruhe, BRD
Glycidoxypropyltrimethoxysilan	2530-83-3	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
3-(Trimethoxysilyl)propylmethacrylat	2530-85-0	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid	1892-57-5	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
Hellmanex®	-	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, BRD
N-Hydroxysulfosuccinimid	106627-54-7	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
D-(+)-Maltose	6363-53-7	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
2-(N-Morpholino)ethanesulfonsäure	4432-31-9	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
Glassubstrat, Deckgläser #5, Borosilikatglas	-	Menzel GmbH, Braunschweig, BRD
Si-Wafer, P/Bor <100>, Dicke: 525 ± 25 µm; Widerstand: 1-30 ohm cm ²	-	Si Mat, Silicon Materials, Kaufering, BRD
Adsorptionsträgermaterialien		
Aerosil 200 (Siliziumdioxid)	7631-86-9	Degussa AG, Frankfurt, BRD
Hydroxylapatit	12167-74-7	Alfa Aesar, Karlsruhe, BRD
Spherglass (Kalksodaglas-Kügelchen)	-	Potters Europe, Kirchheimbolanden, BRD
Martinal ON 320 (Aluminiumhydroxid)	8064-00-4	Martinswerk GmbH, Bergheim, BRD
Poly(methacrylsäure-co ethylenglykoldimethacrylat)	-	Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik intern, BRD

V. Verwendete Geräte und zugehörige Software

Tabelle 46 listet die in dieser Arbeit verwendeten Geräte in thematischen Gruppen auf.

Tabelle 46: Verwendete Geräte und deren Bedien- und Auswertesoftware

Gerät	Beschreibung	Hersteller
Expression der AHL-lactonasen		
INFORS HT Minitron	Brutschrank	Infors GmbH, Einsbach, BRD
INFORS HT Labfors 3B 7 L	Benchtop Bioreaktor	Infors GmbH, Einsbach, BRD
405-DPAS-SC K8S/425	pH-Elektrode	Mettler-Toledo GmbH, Giessen, BRD
InPro6820/12/420	Sauerstoffsonde	Mettler-Toledo GmbH, Giessen, BRD
Iris 5	Software zur Steuerung des Bioreaktors	Infors GmbH, Einsbach, BRD
Watson-Marlow 505 U und 101 U	Pumpe	Watson-Marlow GmbH, Rommerskirchen, BRD
Aufreinigung der AHL-lactonasen		
Panda PLUS	Homogenisator	GEA Niro Soavi S.p.A., Parma, IT
ÄKTApurifier™	Flüssigchromatographiesystem	GE Healthcare GmbH, Freiburg, BRD
ÄKTAexplorer™ 100	Flüssigchromatographiesystem	GE Healthcare GmbH, Freiburg, BRD
UNICORN 5.20	Software der ÄKTA-Systeme	GE Healthcare GmbH, Freiburg, BRD
Geräte zu Herstellung und Charakterisierung der Immobilisierungsmethoden		
UV-H255	UV-Schrank	Hartmann Feinwerkbau GmbH, Obermörlen, BRD
Vacutherm® 6000	Vakuumtrockenschrank	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenseebold, BRD
MP150 D	Manuelle Laborpresse	Maassen GmbH, Reutlingen, BRD
Physica MCR 301 mit Tru Gap™ Device	Rheometer	Anton Paar Germany GmbH, Ostfildern, BRD
Rheoplus/32 v3.40	Software für Physica MCr301	Anton Paar Germany GmbH, Ostfildern, BRD
SENTECH SE800	Spektroskopisches Ellipsometer	SENTECH Instruments, Berlin, BRD
Spectra Ray	Software für SENTECH SE800	SENTECH Instruments, Berlin, BRD
OCA 40	Kontaktwinkelmessgerät	Data Physics Instruments GmbH, Filderstadt, BRD
SCA20	Software für OCA 40	Data Physics Instruments GmbH, Filderstadt, BRD
Equinox 55 mit Diamant-ATR-Einheit DuraSamplIRII™	Infrarotspektroskop	Bruker Optics GmbH, Ettlingen, BRD
OPUS_65	Software für IR-Spektroskop	Bruker Optics GmbH, Ettlingen, BRD
BELSORP-max	Adsorptionsmessinstrument	Rubotherm GmbH, Bochum, GmbH
BELSORP-max	BELSORP-max-Messsoftware	Rubotherm GmbH, Bochum, GmbH
BELMaster 6.1.0.2	BELSORP-max-Auswertesoftware	Rubotherm GmbH, Bochum, GmbH

210 Verwendete Geräte und zugehörige Software

Gerät	Beschreibung	Hersteller
Zetasizer 3000 HSA	Partikel- und Zeta-Potentialmesssystem	Malvern Instruments GmbH, Herrenberg, BRD
Zetasizer 3000 HSA-Advanced	Software für Zetasizer 3000HSA	Malvern Instruments GmbH, Herrenberg, BRD
Sonstige Geräte und Materialien		
Heraeus Fresco 17	Mikrozentrifuge	Thermo Scientific GmbH, Schwerte, BRD
Heraeus Multifuge 1 S-R	Zentrifuge	Thermo Scientific GmbH, Schwerte, BRD
Sorvall WX Ultra 80	Ultrazentrifuge	Thermo Scientific GmbH, Schwerte, BRD
Avanti J-26XP	Zentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, BRD
Spekol 1500	UV VIS Spektrophotometer	AnalytikJena AG, Jena, BRD
SpectraMax [®] Plus 384	Mikroplatten-Absorptions-Spektrophotometer	Molecular Devices (Germany) GmbH, Biberach an der Riss, BRD
SoftMax Pro 5	Software für SpectraMax [®] Plus 384	Molecular Devices (Germany) GmbH, Biberach an der Riss, BRD
Synergy 2	Multi-Mode Mikroplatten-Reader	BioTek Instruments Deutschland GmbH, Bad Friedrichshall, BRD
Gen5 1.07	Software für Synergy 2	BioTek Instruments Deutschland GmbH, Bad Friedrichshall, BRD
Infinite [®] M200Pro	Multi-Mode Mikroplatten-Reader	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, BRD
i-control 1.8 SP1	Software für Infinite [®] M200Pro	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, BRD
VHX-600 und VHX S-15 Digital Mikroskop	Lichtmikroskop	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, BRD
Chromera [®] Chromatography Data System DAD und RI	Software der HPLC	PerkinElmer LAS (Deutschland) GmbH, Rodgau, BRD
Digitalkamera Fujifilm LAS1000 in einer Intelligent Dark Box II	Auswertesystem für Western Blots	Raytest, Straubenhardt, BRD
Image Reader LAS 100 Pro VR6	Software der Digitalkamera Fujifilm LAS1000	Raytest, Straubenhardt, BRD
Ultraflex II TOF/TOF 200	MALDI-TOF	Bruker Dalton GmbH, Bremen, BRD
FlexControl und FlexAnalysis	Steuer- und Auswertesoftware des MALDI-TOF	Bruker Dalton GmbH, Bremen, BRD
ZipTipC18	Filterspitze zur Aufreinigung	Millipore, Billerica, USA
Aida Image Analyzer V4.10	Software zur Auswertung von Western Blots	Raytest GmbH, Straubenhardt, BRD
OriginPro 8G	Software zur Datenanalyse und Datenvisualisierung	Additive GmbH, Friedrichsdorf, BRD

Veröffentlichungen

In dieser Arbeit sind die folgenden Veröffentlichungen entstanden:

Weber, C. ; Burger-Kentischer; Müller, M.; Trick, I., Hirth, T.

Biofilmvermeidung durch natürliche Wirkstoffe – gezielte und langfristige Freisetzung durch ein PEG-basiertes Depotsystem

Biomaterialien 12 (1-4):2, 2011

Müller, M.; Weber, C. ; Kerger, C.; Burger-Kentischer; Trick, I., Hirth, T.

Vermeidung von Biofilm und Unterdrückung von Virulenzfaktoren pathogener Mikroorganismen an Grenzflächen

Bionanomaterialien 13 (1-4):18, 2012

Lebenslauf

Christina G. Weber

* 31. Juli 1982 in Heilbronn-Neckargartach

Schule

09/1993 – 07/1999

Mörike-Pro-Gymnasium, Neuenstadt

09/1999 – 07/2002

Albert-Schweitzer-Gymnasium, Neckarsulm

Studium

10/2002 – 09/2008

„Umweltschutztechnik (Diplom-Ingenieur)“
Universität Stuttgart

01/2006 – 06/2006

Auslandsstudium an der Háskóla Íslands, Reykjavík, Island

Studienarbeit:

Introduction of innate immunity in colon epithelial cells (HT-29)
by primary and secondary bile acids measured as the expression of
LL-37

Professor Guðmundur H. Guðmundson, Háskóli Íslands

Diplomarbeit:

Untersuchung von papier- und kartonbasierenden Lebensmittel-
verpackungen auf estrogen wirkende Substanzen mittels GC/MS
und Ermittlung der estrogenen Gesamtwirkung mittels E-Screen
Assay (MCF-7 Zellproliferation)

Professor Jörg Metzger, Universität Stuttgart

10/2009-05/2010

geprüfte Wissenschaftliche Hilfskraft am Fraunhofer-Institut für
Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik

06/2010-05/2012

Promotion

gefördert durch ein Stipendium der Deutschen Bundesstiftung
Umwelt DBU

Danksagungen

Eine Dissertation ist mehr als die Summe ihrer Teile: Neben neuen Erkenntnissen aus einer dreijährigen Forschung spiegeln sich auch die Beziehungen zu vielen lieben Menschen wieder. An dieser Stelle bedanke ich mich herzlich für Ihre Unterstützung und Ihren Glauben an mich und meine Arbeit.

Meinem Doktorvater, *Professor Thomas Hirth*, danke ich für die herausfordernde Themenstellung, mit der ich über mich hinauswachsen konnte, das mir entgegengebrachten Vertrauen in meine wissenschaftliche Arbeit und die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Professor Wolfgang Streit, danke ich dafür, dass er mir den Weg zur Biofilmforschung gewiesen hat, in dem ich drei Tage in seiner Arbeitsgruppe hospitieren konnte sowie für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich bedanke mich auch bei der *Deutschen Bundesstiftung Umwelt*, die meine Arbeit finanziell ermöglicht hat und bei *Dr. Hedda Schlegel-Starmann* für die unbürokratische Betreuung und ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt den besten Fachbetreuerinnen von allen: *Dr. Burger-Kentischer*, *Dr. Michaela Müller* und *Dr. Iris Trick*. Sie haben mich zu jeder Zeit mit vielen guten fachlichen Diskussionen und praktischen Ideen sowie mit viel Engagement und Herzblut unterstützt. Vielen, vielen Dank!!!!

Folgenden Personen gilt mein Dank dafür, dass sie mit ihrer großzügigen Bereitstellung von Stämmen und Plasmiden meine Arbeit erst ermöglichten: *W. Fast*, *R. McLean*, *C.W. Michiels*, *P. Oger* und *W. R. Streit*.

Christian Kerger und *Irene Henning*: Vielen lieben Dank euch beiden für eure unermüdliche Unterstützung bei der Proteinaufreinigung. Christian, herzlichen Dank für dein stets offenes Ohr und deine Freundschaft.

Stellvertretend für alle Kolleginnen und Kollegen aus den Abteilungen GTM, MBT und UBT, die mir bei meiner Arbeit zur Seite standen, bedanke ich mich bei *Dr. Ekkehard Hiller*, *Björn Moller*, *Monika Riedl*, *Gaby Bott* und *Susanne Größchen*. *Joachim Mayer* und *Stephanie Kleinbach*. Danke für eure Aufmunterung und euren unerschütterlichen Glauben an mich und meine Arbeit.

„Kind, für Deine Ausbildung ist uns Nichts zu teuer!“ Ich danke herzlich *meinen Eltern*, die mich bis hierher in jeglicher, nur erdenklicher Weise unterstützt haben.

Und nicht zu vergessen, die wichtigste Person von allen: *Christian Kohl*. Vielen Dank, dass Du immer mein ausgleichender Pol warst und geduldig diese Arbeit begleitet hast.

Mit dieser Dissertation werden die drei Grundvoraussetzungen zum Einsatz von *N*-Acylhomoserinlacton-Lactonasen zur Biofilmvermeidung in technischen Systemen geschaffen:

- die Gewährleistung der Verfügbarkeit durch Fermentation im Bioreaktor mit hoher Ausbeute und Aufreinigung mittels chromatographischer Verfahren,
- der Nachweis der Wirkung auf verschiedene Bakterienspezies hinsichtlich Biofilmbildung, Schwimm- und Schwarmverhalten und der Produktion von Virulenzfaktoren sowie
- die Bereitstellung einer Darreichungsform durch unterschiedliche Immobilisierungsstrategien wie Physisorption an partikulären Systemen, Chemisorption an Silan-funktionalisierten Flachsubstraten und dem Einschluss in ein PEG-basiertes Hydrogelsystem.

ISBN 978-3-8396-0555-4



9 783839 605554