



GenoMik-Transfer - Anwendungsorientierte
Genomforschung an Mikroorganismen

Schlussbericht

(gemäß BNBest-BMBF 98 (Stand: April 2006) Nr. 3.2)

Zuwendungsempfänger: Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (Schmitz-Streit)	Förderkennzeichen: 0315587B
Vorhabenbezeichnung: Charakterisierung und Evaluierung von neuartigen AI-2 interferierenden Aktivitäten und Identifizierung von kleinen Enzymstabilisierenden Molekülen	
Laufzeit des Vorhabens: 1.2.2010 bis 30.6.2014 (inklusive kostenneutrale Verlängerung aufgrund Elternzeit der Mitarbeiterin)	

I. Kurzdarstellung

1. Aufgabenstellung

Bei der Ausbildung von Biofilmen spielt die Zelldichte-abhängige zelluläre Kommunikation der Bakterien über den Austausch von niedermolekularen Signalmolekülen (*Quorum sensing*, QS) eine wesentliche Rolle. Durch gezielte Störungen dieser Kommunikation (Modifizierung oder Abbau der Signalmoleküle oder durch antagonistische Moleküle) kann die Biofilmbildung negativ beeinflusst werden. Zur Auffindung von Biomolekülen, die das QS stören, kann auf die natürlich vorkommenden Anti-Quorum sensing (*Quorum quenching*, QQ) Strategien zurückgegriffen werden, die kultivierbare und nicht kultivierte Bakterien etabliert haben.

Ziel des Projektes war es, neuartige bereits identifizierte QQ-Moleküle zu charakterisieren (GenoMIK+: Neue Antibiofilm-Klone aus marinen Metagenomdatenbanken), die mit der Interspezies-Kommunikation von Bakterien interferieren (AHL und insbesondere AI-2), um *Quorum Sensing*-abhängiges Verhalten, wie die Bildung von Biofilmen, verhindern zu können. Ziel des gesamten Verbundprojektes war es, innovative alternative Antibiofilmstrategien zu entwickeln, die auf Interferenz mit der Zell-Zellkommunikation basieren, und ein zukünftiges Anwendungspotential in Industrie und Medizin haben. Zusätzlich sollten kleine Enzym-stabilisierende Moleküle identifiziert werden.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die Forschungsarbeiten wurden im Institut für Allgemeine Mikrobiologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt. Zu Beginn des Projekts waren die mikrobiologischen und molekularbiologischen Methoden zur Bearbeitung der Fragestellung bereits in einem voll ausgestatteten Labor etabliert; eine Mitarbeiterin und eine technische Assistentin arbeiteten bereits an Fragestellungen, die zur Bekämpfung von mikrobiellen Biofilmen beitragen sollten resultierend aus dem Vorgängerprojekt GenoMIK+. Das Labor verfügte dabei über geeignete Räumlichkeiten und die notwendigen Genehmigungen, um auch potentiell infektiöses Material (Metagenome) handhaben zu dürfen und die Effekte von potentiellen QQ-Molekülen auf biotechnologisch- und medizinisch relevante Biofilmbildner der Sicherheitsstufe 2 zu untersuchen (Gentechniklabor der Sicherheitsstufe 2). Zu Beginn des Projektes konnte auf bereits etablierte Reporterstämme zurückgegriffen werden, die es ermöglichen Quorum quenching Moleküle zu identifizieren. Des Weiteren lagen eine große Anzahl aus Metagenombanken identifizierter Quorum quenching Klone vor (AHL-QQ Klone 196; AI-2-QQ Klone 61) auf die in der Projektphase zurückgegriffen werden sollte. Im Verlauf des Projekts konnte auf Großgeräte (z.B. Pickrobot, Sequenziersysteme, konfokales Mikroskop) der Geräteplattformen in zentralen Einrichtungen der Uni Kiel zurückgegriffen werden (ZBM, Zentrale Mikroskopie, Sequenzierplattform im IKM), um die entsprechende Fragestellungen beantworten zu können. Die weiterführenden Analysen zur Charakterisierung neuartiger QQ-Moleküle im Verlauf des Projektes erforderten die Etablierung neuartiger Methoden und die Anschaffung neuer Geräte (z.B. Plattenphotometer).

*) Auf das Förderkennzeichen des BMBF soll auch in der Veröffentlichung hingewiesen werden.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Als Verbundpartner im Netzwerk GenoMik-Transfer sollten an der CAU Kiel neuartige AI-2 Quorum Quenching (QQ)-Biomoleküle nach folgendem zeitlichen Plan charakterisiert und kleine Enzym-stabilisierende Moleküle identifiziert werden:

Meilenstein 1: Entwicklung und Etablierung eines Screening-Systems, um AHL- oder AI-2 antagonistische Moleküle von QQ-Enzymen zu unterscheiden

Meilenstein 2: Identifizierung eines AHL-antagonistischen kleinen Moleküls

Meilenstein 3: Identifizierung verschiedener AI-2 Hydrolasen

Meilenstein 4: Identifizierung einer AI-2 Hydrolase zur Vermeidung von Biofilmen

Meilenstein 5: Identifizierung eines kleinen Moleküls zur Stabilisierung von Enzymen

Bei Abschluss der experimentellen Arbeiten Ende Juni 2014, waren alle Meilensteine mit Ausnahme von Meilenstein 5 erreicht und erfolgreich abgeschlossen.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Verschiedene Bakterien und Algen sind in der Lage, durch die Produktion von Enzymen und niedermolekularen Verbindungen die Zell-Zell-Kommunikation von Bakterien zu stören. Dabei gibt es verschiedene Strategien, wie z.B. Quorum-Quencher in Form von Lactonasen und Acylasen, die die Signalmoleküle zerstören, kompetitive Inhibitoren, die Rezeptoren blockieren, oder Inhibitoren des zentralen Regulators des QS-Systems, LuxR.

Innerhalb der Vorgänger-Projektes GenoMIK+ wurden bereits zahlreiche Metagenombanken konstruiert, die auf QQ-Aktivitäten gescreent wurden. Dafür wurde ein Reportersystem zur Identifizierung von AHL- und AI-2 QQ-Biomolekülen erfolgreich etabliert. Schließlich wurden 196 AHL- und 61 AI-2 interferierende QQ-Aktivitäten identifiziert. Insgesamt wurde begonnen 6 QQ-Aktivitäten näher zu charakterisieren und die entsprechenden QQ-ORFs zu identifizieren. Die entsprechend identifizierten QQ-Proteine wurden nach der Etablierung bekannter Biofilm-Analyse-Methoden im Labor (z.B. Untersuchung mit Kristallviolett und Durchflusszell-Experimente) *in vitro* und *in vivo* auf ihr Fähigkeit analysiert, Biofilmbildung zu inhibieren. In dieser Projektphase konnte also bereits auf ein vielfältiges Methodenarsenal, umfangreiche Vorarbeiten und Expertise der Mitarbeiterin (PostDoc) zur Erfüllung der Meilensteine zurückgegriffen werden.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Eine enge Zusammenarbeit erfolgte vor allem mit den Projektpartnern, die Arbeitsgruppen um Prof. Dr. W. Streit (Uni Hamburg), Prof. Dr. A. Liese (TUHH), Dr. H. Rohde (UKE) und Prof. Dr. S. Grond (Uni Göttingen). Zwischen der AG Streit und AG Schmitz-Streit wurden identifizierte QQ-Moleküle für weiterführende Analysen ausgetauscht. Eine enge Kooperation bestand mit AG Liese sowohl für die Immobilisierung identifizierter QQ-Proteine als auch für biochemische Analysen zu den Proteinen. Aus der AG Rohde wurden medizinisch-relevante Biofilm-bildende *Staphylococcus epidermis* und *S. aureus* Stämme zur Verfügung gestellt. Zudem wurden potentielle QQ-Proben mit

dem in unserem Labor etablierten Reportersystem überprüft. Der AG Grund wurden eine Auswahl von identifizierten Klonen, die AHL bzw. AI-2 QQ-Aktivitäten vermittelten, zur weiteren (biochemischen) Analyse übergeben. Zudem wurden natürliche kleine Moleküle zur Überprüfung auf QQ bereitgestellt.

Die Zentrale Mikroskopie (Uni Kiel), das Zentrum für Molekularbiologie und Biochemie (ZBM, Uni Kiel) und die 1. Medizinische Klinik der Uni Kiel (IKM, Sequenzierplattform) waren aufgrund ihrer umfangreichen Geräte-Ausstattung unabdingbar zur Erfüllung verschiedener Meilensteine. Prof. Dr. Podschun (CAU Kiel) stellte uns als Leiter des nationalen Referenzlabors für *Klebsiella* zahlreiche klinische Isolate zur Verfügung.

II. Eingehende Darstellung

VERTRAULICH!**Berichtsblatt**

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart
3a. Titel des Berichts Charakterisierung und Evaluierung von neuartigen AI-2 interferierenden Aktivitäten und Identifizierung von kleinen Enzymstabilisierenden Molekülen	
3b. Titel der Publikation	
4a. Autoren des Berichts (Name, Vorname(n)) Schmitz-Streit, Ruth Weiland-Bräuer, Nancy	5. Abschlussdatum des Vorhabens 30.06.2014
4b. Autoren der Publikation (Name, Vorname(n))	6. Veröffentlichungsdatum
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Institut für Allgemeine Mikrobiologie Christian Albrechts Universität Am Botanischen Garten 1-9 24118 Kiel	7. Form der Publikation
	9. Ber. Nr. Durchführende Institution
	10. Förderkennzeichen *) 0315587B
	11a. Seitenzahl Bericht
	11b. Seitenzahl Publikation
13. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)	12. Literaturangaben
	14. Tabellen
	15. Abbildungen

16. Zusätzliche Angaben	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)	
18. Kurzfassung <p>Das Ziel des Projektes war es, neuartige (AHL- und) AI-2 interferierende Aktivitäten zu identifizieren und zu charakterisieren. Hierdurch sollten (AHL und) AI-2 modifizierende oder degradierende Enzyme oder kleine antagonistische Moleküle identifiziert werden, die die Entwicklung einer neuartigen Strategie zur erfolgreichen Inhibierung von Biofilmen im medizinischen und technischen Bereich ermöglichen sollten. Aus einer Vielzahl von metagenomischen QQ-Klonen wurden schließlich 10 AI-2 QQ-Proteine identifiziert und näher charakterisiert, deren Expression sowohl <i>in vivo</i> als auch <i>in vitro</i> erfolgreich die über AHL- und AI-2 gesteuerten Kommunikationswege störte und so Populationsdichte-abhängige Verhalten, wie Biofilmbildung behinderte. Generell weisen die identifizierten QQ-Proteine höchstwahrscheinlich ein großes Potential für eine zukünftige biotechnologische Anwendung auf. Die Identifizierung von 4 ORFs, die eine hohe AI-2 QQ Aktivität vermitteln, die zur vollständigen Inhibierung der <i>K. pneumoniae</i> Biofilmbildung führte, erscheinen besonders attraktiv für eine biotechnologische Anwendung. insbesondere die Immobilisierung des QQ-Proteins OR1 auf verschiedenen Oberflächen in Zusammenarbeit mit der TU Hamburg erwies sich als erfolgreich bei der Inhibierung vor allem medizinisch relevanter Biofilmbildner (<i>Klebsiella</i> Isolate, <i>Candida albicans</i>).</p>	
19. Schlagwörter Quorum Quenching, Biofilm, Biofilm Inhibierung	
20. Verlag	21. Preis