

Forschungsprojekt Nr.: 06HS033

Abschlußbericht

Projektlaufzeit: 04/2007-09/2010

Autoinducer in der Pathogenese von *Erwinia amylovora* und deren Rolle für die Bekämpfung des Feuerbrands

Projektleitung: **Prof. Dr. Matthias Ullrich**
Jacobs University Bremen
School of Engineering and Science
Campus Ring 1
28759 Bremen
Tel.: 0421-2003245
Fax: 0421-2003249
Email: m.ullrich@jacobs-university.de

Projektbearbeitung: **Dr. Annette Wensing**
Jacobs University Bremen
School of Engineering and Science
Campus Ring 1
28759 Bremen
Tel.: 0421-2003665
Fax: 0421-2003249
Email: a.wensing@jacobs-university.de

Kooperationspartner: **Prof. Dr. Klaus Geider**
Julius Kühn-Institut
Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen
Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau
Schwabenheimer Str. 101
69221 Dossenheim
Tel.: 06221-86805 (-00 Sekr.)
Fax: 06221-86805-15
Email: Klaus.Geider@jki.bund.de

1. Ziele und Aufgabenstellung des Projektes

Kurz vor Projektbeginn wurde bei *Erwinia amylovora* ein neuer Typ von Autoinduktoren (Autoinducer) (AI-2) beschrieben. Während erste Vorversuche eine Bedeutung dieses Regulators für die Bildung von Virulenzfaktoren vermuten ließen, war die Rolle von AI-2 in der Pathogenese des Feuerbranderreger unklar. Für viele pathogene Bakterien wie zum Beispiel *Staphylococcus aureus* ist die durch Autoinducer vermittelte „Quorum Sensing“ Regulation so wichtig, dass eine Unterbrechung dieses Signalweges (Quorum Quenching) oder eine De-Regulation über das Einbringen von zusätzlichen Autoinducern (Quorum Sensing interference) als Alternative zum Antibiotikaeinsatz diskutiert wird.

Im Rahmen dieses Projektes sollten Untersuchungen durchgeführt werden, um die Bedeutung der Autoinducer in der Pathogenese des Feuerbranderreger besser zu verstehen. Es sollte geprüft werden, ob das Quorum Sensing System von *E. amylovora* einen neuen Angriffspunkt für die Feuerbrandbekämpfung bietet. Die Projektziele wurden in den folgenden Punkten zusammenfasst:

- Etablierung eines verlässlichen Verfahrens zur Bestimmung von AI-2 *in-vitro* und *in-planta*.
- Analyse der Wirkungsweise von AI-2 auf Transkription und Expression von Virulenzfaktoren.
- Untersuchungen zur Sekretion, Transport, Aufnahme und Abbau von AI-2.
- Identifikation von Bakterien, die durch schnellen Abbau von AI-2 den Regulator aus der Umgebung von *E. amylovora* entfernen und dadurch als Antagonisten besonders gut geeignet sind.

1.1. Planung und Ablauf des Projekts

Etablierung eines verlässlichen Verfahrens zur Bestimmung von AI-2 *in-vitro* und *in-planta*.

Zu Beginn des Projektes sollte in verschiedenen *E. amylovora* Stämmen die Abhängigkeit der AI-2 Bildung vom Zellwachstum untersucht werden. Der Nachweis von Autoinducern erfolgt in der Regel indirekt über Bioassays mit geeigneten Reporterstämmen. Chemische Methoden für eine schnelle und spezifische Quantifizierung stehen nicht zur Verfügung. Daher lag ein erster Schwerpunkt des Projekts auf der Etablierung eines zuverlässigen Testsystems für den AI-2 Nachweis.

Es sollte an bisher veröffentlichte Methoden zu Indikatorstämmen und Testbedingungen angeknüpft werden und darauf aufbauend einzelne Parameter wie das Wachstumsmedium und die Kulturbedingungen genauer untersucht werden. Es wurde erwartet, dass z.B. die verwendete Kohlenstoffquelle einen erheblichen Einfluss auf Bildung und Nachweis von AI-2 haben kann. Mit den so optimierten Testbedingungen sollte in Kinetiken der zeitliche Verlauf der Bildung sowie die Anreicherung des AI-2 im Kulturüberstand bestimmt werden.

Im nächsten Schritt sollte in Experimenten an infiziertem Pflanzenmaterial begonnen werden. Geplant waren Versuche an Apfel-Sämlingen oder *in-vitro* Kulturen. Die Testpflanzen sollten mit einem definierten Inokulum von *E. amylovora* infiziert und nach bestimmten Intervallen auf die Gegenwart von bakteriellem AI-2 überprüft werden. Um einen Vergleich der pro Bakterium gebildeten AI-2 Menge *in-vitro* und *in-planta* zu erhalten, sollte die Bakteriendicht in der Pflanzenproben über quantitative PCR bestimmt werden.

Analyse der Wirkungsweise von AI-2 auf Transkription und Expression von Virulenzfaktoren.

Nachdem der Verlauf der AI-2 Anreicherung durch *E. amylovora* bestimmt worden ist, sollte die Wirkung des Autoinducers auf die Zelle analysiert werden. Dazu sollten zunächst Wildtyp-Stämme (wt) mit entsprechenden AI-2 negativen

luxS Mutanten verglichen werden. Wenn möglich sollte auch eine AI-2 Rezeptor Mutante erzeugt werden. Eine solche Mutante sollte auf Zugabe von AI-2 neutral reagieren, und ein ähnliches Verhalten wie eine *luxS* Mutante zeigen. Vergleichende Transkriptionsstudien zwischen wt, Biosynthese- und Rezeptor-Mutante sollten einen Überblick über die durch AI-2 regulierten Gene geben. Besondere Beachtung sollte in diesem Zusammenhang auf Genen liegen, die bereits als Pathogenitätsfaktoren bekannt sind, z. B. solche die an der Bildung von Exopolysacchariden und Siderophoren beteiligt sind.

Untersuchungen zur Sekretion, Transport, Aufnahme und Abbau von AI-2.

Ein weiterer Ansatz die Gen-Regulation durch AI-2 zu verstehen, ist der gezielte Abbau des Signalmoleküls im Medium. Während der Abbau bei AI-1 durch spezifische Enzyme (Lactonasen) bewirkt wird scheint der Abbau von AI-2 komplexer zu sein. Für *E. coli* Kulturen ist beschrieben worden, das AI-2 in der frühen Wachstumsphase gebildet und später, wenn keine Kohlenstoffquelle mehr vorhanden ist degradiert wird. Es sollte untersucht werden, ob bei *E. amylovora* eine ähnliche Verwendung vorliegt. Falls sich in AI-2 Kinetiken ein Abbau des Autoinducers durch *E. amylovora* zeigt, sollten die entsprechenden Enzyme charakterisiert werden.

Der Autoinducer-2 wird im Gegensatz zu AI-1 durch aktiven Transport von Membranproteinen in die Zelle befördert. Um welche Transportsysteme es sich dabei im Einzelnen handelt, ist noch unbekannt. In anderen pathogenen Bakterien wie *Burkholderia pseudomallei* wurde beschrieben, dass die Zellkommunikation bzw. Bildung von Virulenzfaktoren gestört ist wenn so genannte "multidrug-Efflux-Pumpen" nicht richtig funktionieren (Chan und Chua, 2005). An vorhandenen *E. amylovora* Transport-Mutanten, bei denen die Gene *acrB*, *norM* und *tolC* verändert sind, sollte ein möglicher Einfluss auf die Sekretion von AI-2 überprüft werden. Ziel war zu prüfen, ob durch den Einsatz von kommerziell erhältlichen Transporter-Hemmstoffen die Virulenz von *E. amylovora* beeinflusst werden kann.

Identifikation von Bakterien, die durch schnellen Abbau von AI-2 den Regulator aus der Umgebung von *E. amylovora* entfernen und dadurch als Antagonisten besonders gut geeignet sind.

Mohammadi und Geider (2006) hatten vor Projektbeginn für die Hemmwirkung von zwei antagonistischen Bakterien, *Erwinia billingiae* und *Erwinia tasmaniensis* auf *E. amylovora* angenommen, dass beide Bakterien die Konzentration von AI-2 im umgebenden Milieu beeinflussen und so eine Hemmung auf das Wachstum und die Virulenz von *E. amylovora* haben könnten. Daher sollte bei diesen Antagonisten die Synthese und der Abbau von AI-2 in Abhängigkeit vom Wachstum ermittelt werden. Neben den zwei genannten Arten sollten auch weitere Bakterien aus der umfangreichen Sammlung von Prof. Geider für diese Untersuchungen zur Verfügung gestellt werden. Aus diesen potentiellen Antagonisten sollten solche isoliert werden, die eine hohe AI-2 Produktion bzw. eine hohe Abbaurate besitzen. Es wurde angenommen, dass solche Stämme besonders geeignete Antagonisten für die Feuerbrandbekämpfung sein könnten. Es war vorgesehen, die Wirkung der Antagonisten in Blütentests, Birnenscheibenassays und in Klimakammerversuchen zu überprüfen und bei positiven Ergebnissen Freilandversuche in Kirschgartshausen durchzuführen.

Obwohl die Synthese von AI-1 für *E. amylovora* unwahrscheinlich ist, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass von Antagonisten gebildete Signalmoleküle einen Einfluss auf das Pathogen haben. Untersuchungen dazu sollten durch heterologe Expression von AI-1 mit dem *Pantoea stewartii* Gen *esal* in *E. amylovora* durchgeführt werden. Bei *P. stewartii* hat AI-1 einen starken Einfluss auf die EPS-Synthese, die auch bei *E. amylovora* zur Pathogenitätsinduktion notwendig ist. Dies wurde durch Mutationen im *esal*-Gen von *P. stewartii* nachgewiesen. Die Mutanten verloren die Fähigkeit Biofilme zu bilden, eine Eigenschaft, die zur Kolonisierung von Oberflächen notwendig ist (Koutsoudis et al. 2006). Sollte AI-1 solche Auswirkungen auf den zellulären Stoffwechsel von *E. amylovora* haben, könnte die Virulenz durch Zugabe des artfremden Signalmoleküls verändert werden.

1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand an den angeknüpft wurde

Erwinia amylovora ist als Krankheitserreger vieler Pflanzen aus der Familie der *Rosaceae* bekannt. Im Apfel- und Birnenanbau ist der durch ihn hervorgerufene Feuerbrand die wichtigste bakterielle Krankheit. Unter günstigen klimatischen Bedingungen kann der Erreger epidemieartig auftreten und ganze Obstanlagen zerstören. Die Bekämpfungsmöglichkeiten sind gering und beschränken sich auf Präventivmaßnahmen wie Entfernung der Befallsstellen, Rodung befallener Bäume oder im Extremfall durch Spritzung mit Antibiotika.

Aufgrund seiner Bedeutung ist der Feuerbranderreger gut untersucht und wesentliche Faktoren der Epidemiologie und Pathogenese sind bekannt. Durch Transposonmutagenese und Komplementierung wurden Gene oder Gengruppen identifiziert, deren Funktion für eine erfolgreiche Infektion absolut notwendig ist. Dazu zählt die Fähigkeit durch Ausscheidung von Polysacchariden eine schützende Kapsel zu bilden, die Sekretion der Proteine HrpN und DspE sowie die Bildung von Siderophoren zur effizienten Aufnahme von Mineralstoffen. Der Verlust dieser Fähigkeiten schränkt die Vermehrung *in-vitro* nicht wesentlich ein, führt aber *in-vivo* zu apathogenen und in der Pflanze nicht lebensfähigen Bakterien.

Bakterien reagieren auf ihre Umwelt mit spezifischen Anpassungen. Über Sensoren oder Rezeptoren auf der Zelloberfläche werden Signale stofflicher und abiotischer Art wahrgenommen und ins Zellinnere übermittelt. Entsprechend den Anforderungen der Umgebung werden dann spezifische zelluläre Prozesse eingeleitet, die das System der Zelle auf die neuen Bedingungen einstellt. Auf molekularer Ebene spiegelt sich dieser Prozess durch Aktivierung oder Deaktivierung von Genen wieder, die ihrerseits durch Bindungsproteine oder sog. Transkriptionsfaktoren an- oder abgeschaltet werden. Bakterien leben in komplexen Gemeinschaften und kommunizieren mit ihren Nachbarn. Sie haben Systeme entwickelt, die in der Lage sind die vorhandene Zelldichte zu "fühlen"

und entsprechend zu reagieren. Dieser Vorgang wird als "Quorum Sensing" bezeichnet. Als Signalstoffe dienen niedermolekulare Substanzen die von jeder Zelle während des Wachstums gebildet und ins umgebende Milieu ausgeschieden werden. Sie reichern sich dort oder im Zellinneren an und bei Erreichen einer kritischen Konzentration werden adaptive Prozesse in Gang gesetzt, die die Zellen in die Lage versetzen, als Gruppe zu überleben. Die Bildung von Virulenzfaktoren wie z. B. die Induktion von Pectinasen bei *E. carotovora* oder die Einleitung der Konjugation des Ti-Plasmids bei *Agrobacterium tumefaciens* sind einige dieser Reaktionen. Eine wesentliche Bedeutung in der Pathogenese wird auch der Bildung eines sog. "Biofilms" zugesprochen. Darunter versteht man ein geordnetes Netzwerk von Bakterien, meist auf Oberflächen, die in einer extrazellulären Matrix (z. B. Exopolysaccharide, EPS) eingebettet sind und über Signalmoleküle miteinander kommunizieren.

Niedermolekulare Signalsubstanzen wie Autoinducer-1 (AI-1 oder AHL, acetyliertes Homoserinlacton) und Autoinducer-2 (AI-2, ein Furanosylboratdiester) wurden zuerst bei marinen Bakterien der Gattung *Vibrio* nachgewiesen, bei denen sie Biolumineszenz auslösen, sofern eine bestimmte Zelldichte und somit Autoinducerkonzentration überschritten wird. Mittlerweile wurden diese Signalmoleküle bei vielen anderen Gram-negativen Bakterien nachgewiesen. AI-1 ist weit verbreitet und unterscheidet sich chemisch bei verschiedenen Arten durch die Länge der Seitenkette, wodurch eine gewisse Spezifität in der Erkennung gewährleistet ist. Zwei Proteine spielen in diesem Prozess eine zentrale Rolle und zwar LuxI und LuxR. Während LuxI für die Bildung des Autoinducers mitverantwortlich ist, stellt LuxR den intrazellulären Rezeptor und Transkriptionsfaktor dar. Der Autoinducer AI-2 wurde zuerst bei *V. harveyi* gefunden und ist weniger gut charakterisiert als AI-1. Auch hier sind zwei Schlüsselproteine vorhanden um die Funktion zu gewährleisten. Während LuxS ein essentielles Enzym in der Synthese von AI-2 darstellt, ist LuxP der intrazelluläre Rezeptor für AI-2.

Beide Autoinducer wurden kürzlich bei *E. amylovora* beschrieben (Venturi *et al.*, 2004; Molina *et al.*, 2005, Mohammadi und Geider, 2006). Der Nachweis erfolgte durch Indikatorbakterienstämme, die bei Vorhandensein von Autoinducern mit Farb- oder Lichtemission reagieren. Venturi *et al.* wiesen AI-1 in Flüssigkulturen von *E. amylovora* und in bakteriell infizierten Pflanzen nach. Allerdings war die Menge der gebildeten Substanz gering und nur nach Extraktion, Konzentration und anschließender Dünnschichtchromatographie nachweisbar (Überschichtung mit Indikatorstamm). Die Wirkung von AI-1 auf *E. amylovora* wurde nicht untersucht. Versuche hierzu wurden von Molina *et al.* durchgeführt, die eine Steigerung der Levansucraseaktivität und Exopolysaccharidproduktion sowie eine gesteigerte Toleranz gegenüber freien Radikalen festgestellt haben, sofern AI-1 in bestimmten Konzentrationen vorhanden war. Die stoffliche Natur der Signalsubstanz wurde zwar nicht direkt nachgewiesen, aber die Expression einer Homoserinlactonase hatte zur Folge, dass die vermutete Wirkung weitgehend aufgehoben wurde. Indikatorbakterienstämme zeigten eine deutliche Reaktion auf Kulturüberstände von *E. amylovora*. Weiterhin wurden nach PCR Amplifikation und Sequenzierung homologe Gene von *luxI* und *luxR* gefunden. Kurz vor Projektbeginn wurde von Mohammadi und Geider das Vorhandensein von AI-2 in Kulturüberständen von *E. amylovora* beschrieben, wobei die *V. harveyi* Mutante BB170 als Indikatorstamm verwendet wurde. Das *luxS* Gen wurde über PCR Verfahren nachgewiesen, das Gen in einen Plasmidvektor ligiert und anschließend die Funktionalität des klonierten Fragments in Komplementierungstests bestätigt. Im Gegensatz zu Molina *et al.* und Venturi *et al.* konnten Mohammadi und Geider weder Hinweise auf die Bildung eines AI-1 ähnlichen Moleküls finden, noch konnten sie mit den publizierten Primern Amplifikate erhalten. Auch in Homologie-Vergleichen mit der vollständigen Genomsequenz von *E. amylovora* konnte sie keine Übereinstimmung mit den von Venturi *et al.* (2004) publizierten Sequenzdaten finden. Im Gegensatz zu den nordamerikanischen Stämmen sind die europäischen Stämme von *E. amylovora* relativ einheitlich (Jock und Geider, 2004) und daher wäre eine Beschränkung

der AI-1 Synthese auf italienische und schweizer Stämme nicht zu erwarten. Daher stand der Autoinducer 2 im Focus dieses Projektes.

2. Material und Methoden

In den Versuchen wurden eine Reihe mikrobiologischer und molekularbiologischer Standardmethoden verwendet und falls nötig für die Arbeit mit *Erwinia* Arten angepasst. Bakterienstämme wurden routinemäßig auf Standard I Medium kultiviert. Für *V. harveyi* wurde LB verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für *E. coli* und 28°C für alle andern Bakterien.

Bioassays zum AI-2 Nachweis wurden in modifiziertem AB Medium (Abn.) durchgeführt. Bioassays zum AI-1 Nachweis erfolgten in LB. Lumineszenz- und Fluoreszenz Messungen erfolgten in einem Microplate Reader der Firma BMG Labtech (Typ Omega). Pflanzenversuche an Apfelblüten, unreifen Birnenscheiben und Apfelsämlingen folgten den veröffentlichten Protokollen.

Zur Gewinnung von Mutanten wurden über Resistenzkassetten markierte Konstrukte für doppelt homologe Rekombination (Marker Exchange Mutagenese). Die korrekte Insertion des Konstrukts wurde durch PCR überprüft.

Zur Zufallsmutagenese wurde ein modifiziertes Tn5 Transposon verwendet (Donor-Plasmid pRL27). Dieses System ergibt über eine hyperaktive Transposase sehr hohe Ausbeuten an Transposonmutanten und lässt sich sowohl über Konjugation als auch über Elektroporation in *Erwinia* einsetzen. Zusätzlich erleichtert ein konditionaler Replikationsursprung auf dem Transposon die Identifikation der jeweiligen Insetionsstelle (Rescue cloning).

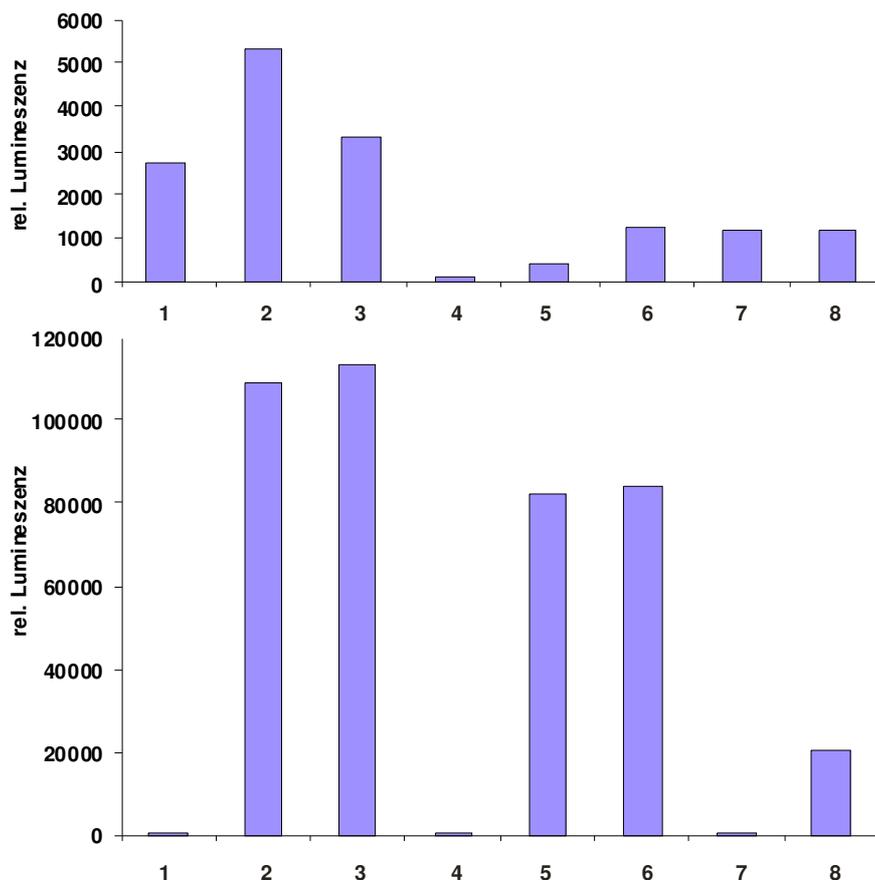
Der Labornachweis von Virulenzfaktoren erfolgte ebenfalls nach veröffentlichten Protokollen. Die EPS Produktion wurde in MM2c Minimal Medium über eine Ausfällung des EPS durch Cetyl Pyridium Chlorid.

3. Ergebnisse

Etablierung eines verlässlichen Verfahrens zur Bestimmung von AI-2 *in-vitro*.

Eine wichtige Grundlage zur Analyse der AI-2 Bildung durch *E. amylovora* war die Etablierung eines verlässlichen Testsystems. Der häufig verwendete Indikatorstamm *V. harveyi* BB170 luminesziert in Anwesenheit von AI-2 während er durch eine Mutation im *luxN* Gen nicht mehr auf AI-1 reagiert. Da BB170 allerdings selber in der Lage ist AI-2 zu produzieren, gestalten sich quantitative Messungen mit diesem Stamm ausgesprochen schwierig. Gerade niedrig konzentrierte Proben sind vor diesem Hintergrund nicht auswertbar.

Abbildung 1: Quantifizierung von AI-2 mit den Indikatorstämmen *V. harveyi* BB170 (A) und MM32 (B). Getestet wurden Überstände von (2) *V. harveyi* BB170, den *E. amylovora* Isolaten (3) Ea1/79 und (6) MR1, den entsprechenden *luxS* Mutanten (4) Ea1/79-K47 und (7) MR1-K1 sowie von den komplementierten Mutanten (5) Ea1/79-K47(pBBR*luxS*) und (8) MR1-K1(pBBR*luxS*). In Probe (1) wurde als Negativkontrolle frisches ABn Medium zugegeben.



Um diese Problematik zu umgehen, wurde ein neuer Indikatorstamm, *V. harveyi* MM32, verwendet. Es handelt sich im Gegensatz zum BB170 um eine Doppelmutante von *luxN* und dem AI-2 Biosynthesegen *luxS*. Dadurch bildet dieser Indikatorstamm kein eigenes AI-2 mehr und zeigt auch bei längeren Inkubationszeiten nur wenig Hintergrund-Lumineszenz.

Auch bei niedrigen AI-2 Konzentrationen und AI-2 negativen Proben liefert MM32 reproduzierbare Ergebnisse (Abb. 1). Durch die enge Kopplung von Biolumineszenz an den Energiehaushalt des Indikatorstammes beeinflusst das verwendete Kulturmedium stark das Meßergebnis. Um eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten wurde ein modifiziertes AB Medium auf Glycerinbasis verwendet, das für ein besseres Wachstum von *E. amylovora* mit Nicotinsäure supplementiert wurde (ABn). Sowohl der Indikatorstamm, als auch *E. amylovora* und die getesteten Antagonisten zeigen in diesem Medium ein gutes Wachstum, was die Verwendung als einheitliches Meßsystem ermöglicht.

Zeitlicher Verlauf von AI-2 Bildung und Akkumulation.

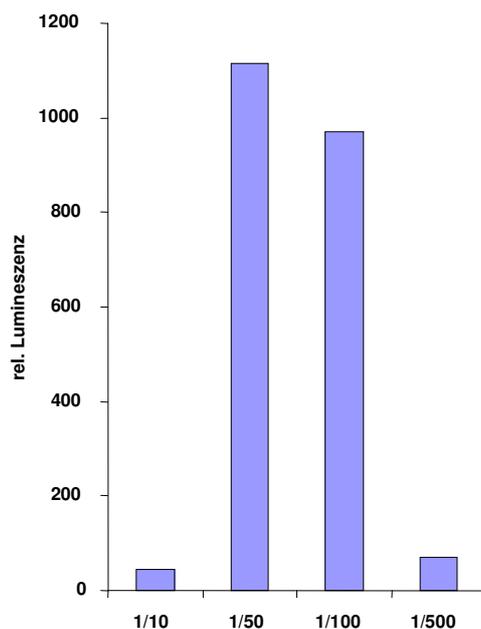
Die Messungen der AI-2 Konzentrationen über den Wachstumsverlauf von *E. amylovora* zeigten eine stetige Akkumulation des Autoinducers mit zunehmender Zelldichte. Der Indikatorstamm MM32 reagierte auf Kulturüberstände aus der späten stationären Phase von *E. amylovora* mit etwas weniger Biolumineszenz als auf Überstände aus der frühen stationären Phase. Dieser Rückgang fiel allerdings deutlich schwächer aus als bei Bakterien, für die ein aktiver Abbau von AI-2 beschrieben wurde, wie z.B. *E. coli*. Auch lies sich dieser Rückgang nicht durch längere Inkubationszeiten verstärken und zeigte Schwankungen. Diese Beobachtungen lassen sich eher durch einen inhibitorischen Effekt des Stationärphase-Überstandes auf die Biolumineszenz des Indikatorstammes erklären. Durch die enge Kopplung der Biolumineszenz an den Energiehaushalt der Zelle ist ein leichter Rückgang der Biolumineszenz durch Zugabe von Stoffwechselendprodukten aus toten und lysierenden *E. amylovora* Zellen mit der Stationärphase-Überständen zu erwarten. Auch eine

Analyse der Genomsequenz von *E. amylovora* zeigte keinen Hinweis auf AI-2 Abbausysteme mit Homologien zu *E. coli* oder *Salmonella*. Auch bei den beiden Antagonisten, *E. billingiae* und *E. tasmaniensis*, wurde eine zunehmende Anreicherung von AI-2 aber kein Abbau des Signals in der stationären Wachstumsphase beobachtet.

In-planta Nachweis von AI-2.

Erste Versuche zum AI-2 Nachweis aus Pflanzengewebe ergaben ein überraschendes Ergebnis. Verschiedene Extrakte aus nicht infiziertem Wirtspflanzenmaterial zeigten eine Induktion der Biolumineszenz im Indikatorstamm MM32 (Abb.2). Eine Quantifizierung dieses Signals ist nur schwer möglich, da neben der induzierenden Wirkung einer Signalsubstanz auch immer eine Inhibierung durch andere Inhaltsstoffe auftritt. Der als Indikator verwendete *V. harvey* ist ein marines Bakterium und nicht an pflanzliche Abwehrsubstanzen angepasst. Zusätzlich schwankt der Gehalt an inhibitorischen

Abbildung 2: Biolumineszenz von AI-2 Indikatorstamm MM32 nach Inkubation mit verdünntem Wirtspflanzenextrakt. Eine Verdünnungsreihe des Extrakts (1/10 bis 1/500) ist notwendig um bakterizide Substanzen in dem Extrakt so weit zu verdünnen das der Indikatorstamm nicht geschädigt wird.



Substanzen zwischen Pflanzenextrakten sehr stark. Um einen Überblick über die Aktivität unterschiedlicher Pflanzenextrakte zu erhalten wurden daher grundsätzlich mehrere Verdünnungsstufen im Bioassay getestet (Abb.2). Die so erhaltenen Ergebnisse lassen einen qualitativen, aber nur bedingt einen quantitativen Vergleich zu.

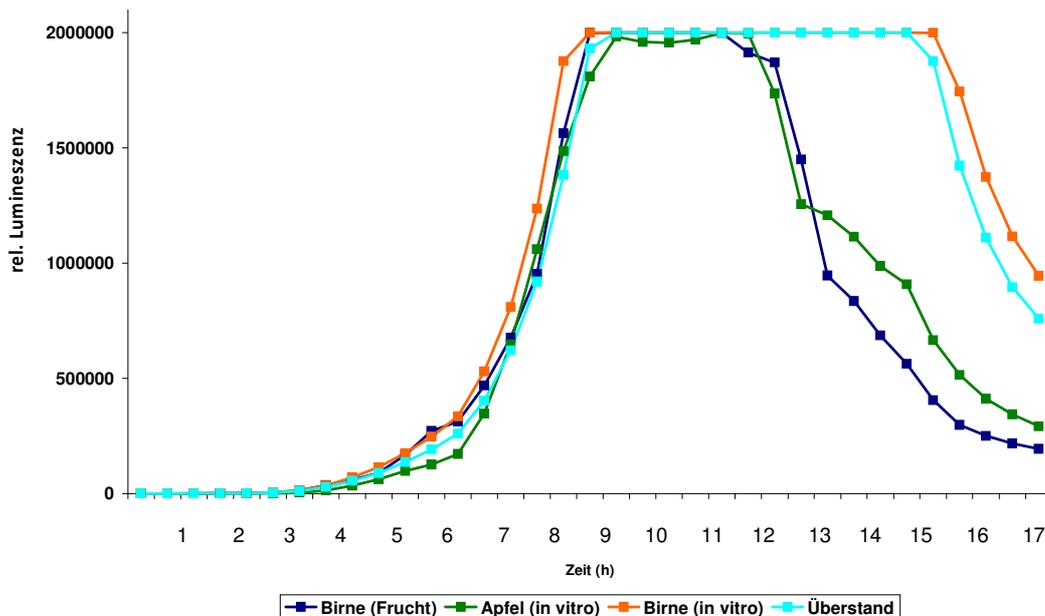
Eine Unterscheidung zwischen der pflanzlichen Substanz und bakteriellem AI-2 im Infektionsversuch ist nicht möglich. Da auch keine Feuerbrands-Wirtspflanze gefunden wurde, von der diese AI-2 ähnliche Substanz nicht gebildet wird, ist auch eine vergleichender Inokulationsversuch zwischen AI-2 produzierendem *E. amylovora* und einer negativen Mutante nur bedingt aussagekräftig (siehe unten).

Sterile *in-vitro* Pflanzen.

Um auszuschließen, dass es sich bei der in Pflanzenextrakten nachgewiesenen Substanz um eine Kontamination mit bakteriellem AI-2 durch epiphytische Besiedlung handelt, wurde Pflanzenmaterial aus sterilen *in vitro* Kulturen

Abbildung 3: Quantifizierung von AI-2 mit dem Indikatorstamm *V. harveyi* MM32.

Getestet wurden Extrakte aus sterilen, *in vitro* kultivierten Apfel- und Birnenpflanzen sowie aus unreifen Birnen. Als Positivkontrolle wurde AI-2 haltiger Kulturüberstand von Ea1 zugegeben.



von Apfel und Birne untersucht. Die Extrakte verursachten ebenso eine Induktion, wie die Proben aus Freilandmaterial oder Zugabe von bakteriellem AI-2 aus *Erwinia* Kulturüberstand (Abb. 3). Eine Induktion von Autoinducer 1 (AI-1) abhängigen Indikatorstämmen durch die gleichen Pflanzenextrakte konnte nicht nachgewiesen werden. Eine Kontamination durch bakterielle Autoinducer ist nach diesen Ergebnissen unwahrscheinlich.

Eigenschaften der AI-2 ähnlichen Substanz.

Eine einfache Aufreinigung oder chemische Charakterisierung für bakterielles AI-2 ist nicht beschrieben, der chemische Nachweis ist sehr komplex. Um einen ersten Hinweis darauf zu erhalten, ob die pflanzliche Substanz die MM32 induziert auch weitere Ähnlichkeiten zum bakteriellen AI-2 aufweist, wurden unterschiedliche Behandlungen von AI-2 haltigen Kulturüberständen und von Pflanzenextrakt miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass sowohl im Pflanzenextrakt, als auch in der Kontrolle die Aktivität durch eine pH Absenkung mit anschließender Neutralisierung nicht beeinträchtigt war. Beide Signalmoleküle waren also säurestabil. Nach Hitzebehandlung oder nach starker pH Erhöhung mit anschließender Neutralisation ging die Aktivität dagegen verloren. Unter allen Testbedingungen verhielten sich Pflanzenextrakt und bakterieller Überstand gleich.

Lokalisierung der AI-2 ähnlichen Substanz.

Eine genauere Untergliederung der Pflanzenproben in Blatt, Stiel und Kallusgewebe zeigte keine Untergliederung nach Gewebetyp, die Substanz war in allen Proben nachweisbar. Auch eine Untergliederung nach Gewebealter ergab keine Differenzierung. Im Vergleich zwischen Knospen, Blüten und Früchten unterschiedlicher Entwicklungsstadien war die AI-2 ähnliche Substanz schon ab dem Knospenstadium nachweisbar (Pflanzenmaterial aus Gewächshaus und aus Freilandproben). Auch Extrakte aus unterschiedlich weit entwickelten Apfelblättern verursachten alle eine Induktion von MM32. Ein quantitativer Vergleich der Proben war nicht möglich, da der Gehalt an

Wachstumsinhibitoren zu stark variierte. Es konnte über einen Waschschrift auf XAD-4 Säulen ein Teil der inhibitorischen Komponenten abgetrennt werden. Da jedoch nicht alle Inhibitoren an das Säulenmaterial gebunden werden konnten, waren auch die vorbehandelten Extrakte nicht quantitativ auswertbar.

Wirtspflanzenbereich und AI-2 ähnlichen Substanz.

Es wurden Extrakte aus Feuerbrandwirtspflanzen sowie aus Nichtwirtspflanzen aus der Familie *Rosaceae* aber auch Pflanzen aus anderen Familien getestet. Innerhalb der Rosaceae gab es sowohl positive (z.B. Apfel, Birne, Erdbeere) als auch negativ getestete Arten (z.B. Brombeere). Auch andere Pflanzen zeigten eine induzierende Wirkung auf MM32, so z.B. Ackerwinde. Alle getesteten Feuerbrandwirtspflanzen waren positiv.

Analyse der Wirkungsweise von AI-2 auf Transkription und Expression von Virulenzfaktoren.

Für die Biosynthese von AI-2 sind die S-Adenosylhomocysteine Nucleosidase Pfs und die S-Ribosylhomocysteinase LuxS erforderlich. Das *luxS*-Gen verschiedener *Erwinia* Stämme ist hochkonserviert und wurde daher als target für eine marker-exchange Mutagenese gewählt. Durch doppelt homologe Rekombination wurden in zwei verschiedenen *E. amylovora* Isolaten, dem Obstbaumisolat Ea1/79 und dem Himbeerstamm MR1, die *luxS*-negativen Mutanten Ea1/79-K47 und MR1-K1 erzeugt. Die korrekte Insertion des knock-out Konstrukts wurde durch PCR Amplifikation überprüft. Zur Kontrolle wurde die *luxS*-Mutation in den Stämmen Ea1/79-K47(pBBR*luxS*) und MR1-K1(pBBR*luxS*) durch ein Plasmid kodiertes *luxS* komplementiert. Die AI-2 Defizienz bzw. die Komplementation der Mutanten wurde mittels Bioassay nachgewiesen (siehe Abb. 1).

Für die Transkriptionsanalysen war auch die Herstellung einer AI-2 Rezeptormutante in *E. amylovora* vorgesehen. In der Genom-Sequenz konnte allerdings kein Homolog zu bekannten AI-2 Rezeptoren identifiziert werden.

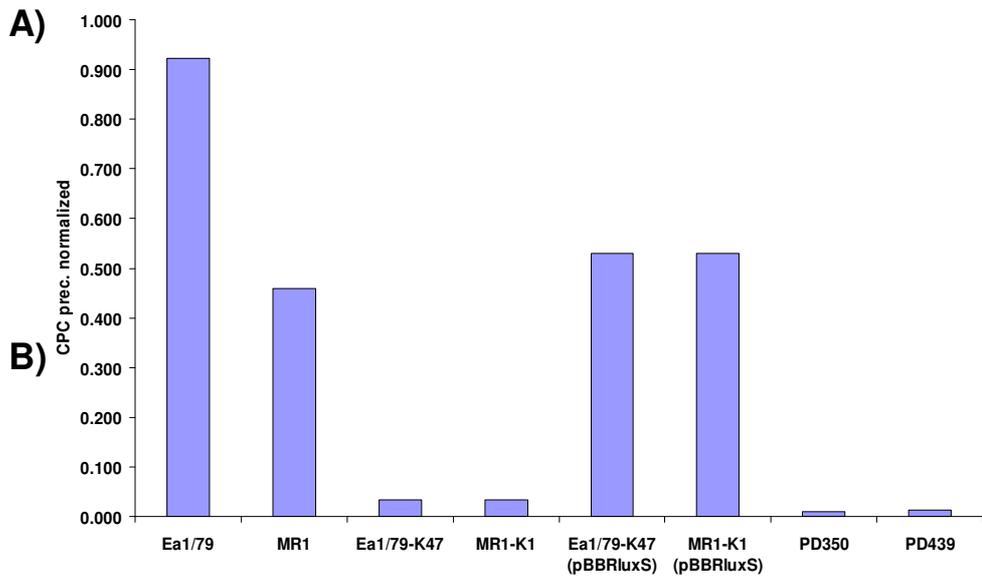
Ohne eine Rezeptormutante kann in Transkriptionsstudien nicht exakt zwischen regulatorischen und metabolischen Auswirkungen der *luxS* Mutation unterschieden werden, daher wurden die geplanten RNA Analysen zurückgestellt. Stattdessen wurde zunächst im Vergleich zwischen wt, *luxS* Mutanten und komplementierten Mutanten der Einfluss auf bereits charakterisierte Virulenzfaktoren überprüft.

Bildung von Exopolysacchariden.

Die Bildung von Exopolysacchariden (EPS) ist im Laborversuch über eine Trübungsmessung gut quantifizierbar. Von EPS-negative Biosynthesemutanten ist bekannt, dass sie sich in Inokulations-Experimenten avirulent verhalten. Ein Vergleich zwischen *E. amylovora* wt und den *luxS* Mutanten zeigte in Flüssigkultur eine deutliche Reduktion der EPS Synthese (Abb. 4). Es wird nur noch eine Restmenge an EPS produziert, daher sind weitere regulatorische Mutanten für einen besseren Vergleich mit den *luxS* Mutanten besser geeignet als EPS-Biosynthese Mutanten. Die aus früheren Studien stammenden Mutanten PD350 und PD439 zeigen ebenfalls eine stark verringerte EPS Produktion (Abb. 4A). Im Pflanzenversuch über die Inokulation von unreifen Birnenscheiben zeigt sich zwischen PD350 und PD439 und der *luxS* Mutation dagegen ein deutlicher Unterschied (Abb. 4B). PD350 und PD439 verursachen zwar noch Nekrosen im Pflanzengewebe, aber es wird wie schon in Flüssigkultur kaum Schleim gebildet. Dagegen ist die Schleimproduktion durch die AI-2 negative Mutante auf den Birnenscheiben deutlich sichtbar und genau so stark wie beim wt. Dieses Ergebnis stützt die Hypothese, dass sich im Pflanzengewebe eine AI-2 ähnliche Substanz findet. In diesem Fall kann die Pflanzenkomponente den fehlenden bakteriellen Autoinducer ersetzen und die *in-vitro* fehlende EPS Produktion *in-planta* wiederherstellen.

Virulenz der AI-2 negativen Mutanten im Pflanzenversuch.

Der oben angeführte Birnenscheibenassay liefert einen erster Hinweis auf das Verhalten der *luxS* Mutanten im Inokulationsversuch, allerdings unterscheiden



B)



Abbildung 4: Vergleich der EPS Produktion *in vitro* (A) und *in planta* (B).
 Untersucht wurden Mutanten in der Regulation der EPS Produktion (PD350, PD439) und in *luxS* (Ea1/79-K47 und MR1-K1).

sich hier die Infektionsbedingungen sehr von den natürlichen Blüten oder Wundinfektionen. Über die Inokulation von Apfelblüten und über Wundinokulation junger Apfeltriebe wurde das Verhalten unter praxisnäheren Infektionsbedingungen untersucht. Weder in der Besiedlung von Apfelblüten noch in der Bildung von Triebinfectionen nach Wundinokulation zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen wt und *luxS* Mutante. Wir vermuten, dass auch hier wieder die pflanzliche AI-2 ähnliche Substanz den im Labor beobachteten Phänotyp komplementiert. Bis zum Projektende konnten wir keine Feuerbrand-Wirtspflanze identifizieren, die diese Substanz nicht bildet (siehe

oben). Daher ist eine abschließende Aussage über die Bedeutung der AI-2 abhängigen Regulation für den Feuerbranderreger zurzeit nicht möglich.

Untersuchungen zur Sekretion von AI-2.

Um zu prüfen, ob AI-2 über multidrug-Efflux Transporter in die Umgebung sekretiert wird, wurden verschiedene Transportermutanten (AcrB, NorM und TolC) mit dem jeweiligen wt verglichen. Die Stämme wurden unter optimalen Produktionsbedingungen für AI-2 kultiviert. Anschließend wurde der AI-2 Gehalt der Kulturen im Bioassay bestimmt und auf die Zelldichte der Kulturen normalisiert. Keine der Mutanten zeigte signifikante Abweichungen zum wt. Entweder ist keines dieser Proteine an der AI-2 Sekretion beteiligt, oder in den Transportermutanten konnte ein sekundärer Transporter die fehlende Funktion übernehmen. Es bietet sich hier kein direkter Anhaltspunkt für eine mögliche Unterbrechung des Signalweges über Transporter-Hemmung.

Inhibition der AI-2 Regulation über chemische Inhibitoren.

Für AI-2 sind in der Literatur eine Reihe von Inhibitoren beschrieben worden, die auch als Reinsubstanz erhältlich sind. Wir untersuchten Isatin, Indol, 5-Hydroxyindol, Ursolsäure und Zimtsäure. Im Reportergergen-Assay mit *V. harveyi* MM32 führten Zimtsäure, Isatin, Indol und 5-Hydroxyindol zu reduzierter Biolumineszenz trotz vorhandenem AI-2. Ursolsäure zeigte nicht den in der Literatur beschriebenen inhibitorischen Effekt. Im wt von *E. amylovora* wurde die Auswirkung der AI-2 Inhibitoren auf die EPS-Synthese untersucht. Auch hier zeigten Indol und Isatin eine inhibitorische Wirkung. Dagegen hatte 5-Hydroxyindol keine Auswirkung auf die EPS-Biosynthese. Zimtsäure führte im Minimalmedium zu einer Wachstumsreduktion, dadurch ist hier keine Aussage zur EPS Synthese möglich. Durch den Einsatz der Inhibitoren konnten wir einen weiteren Hinweis auf eine AI-2 abhängige Regulation von Virulenzfaktoren in *E. amylovora* liefern. Allerdings sind die Ergebnisse nur vorsichtig zu interpretieren, für viele der Substanzen sind bereits Wechselwirkungen mit

weiteren bakteriellen Regulatoren beschrieben worden. Eine Interferenz mit anderen Regulatoren der EPS Synthese kann nicht ausgeschlossen werden.

Komplementation der AI-2 Mutante über Zugabe des Autoinducers.

Wie bereits berichtet steht keine effiziente Aufreinigungsmethode für AI-2 zur Verfügung. Zur Komplementation der AI-2 Mutation unter Kulturbedingungen wurde also zunächst versucht, durch den fehlenden Autoinducer über Zugabe von Kulturüberständen und Pflanzenextrakten zuzugeben. Mit keinem der Testsysteme konnte die EPS Produktion der *luxS* Mutante wiederhergestellt werden. Die Überstände und Extrakte sind zu komplex und enthalten neben dem AI-2 zu viele andere Inhibitoren und Störsubstanzen. Der Autoinducer als Reinsubstanz wird laut Internet von einer amerikanischen und einer französischen Biotechnologie Firma angeboten. Keine der beiden Firmen konnte uns bis zum Projektende mit AI-2 beliefern. Nach letzter Auskunft der französischen Firma Chemstep wurde die AI-2 Produktion aufgrund niedriger Ausbeuten und Problemen mit dem Reinheitsgrad eingestellt. Eine direkte AI-2 Komplementation war daher in diesem Projekt nicht möglich.

Abbau des AI-2 Signalmoleküls.

In einer aktuellen Publikation wurde ein System zum Quorum Quenching des AI-2 Signalweges durch heterologe Expression der *E. coli* Phosphatase LsrK vorgestellt (Roy et al. 2010). Um ein ähnliches System zum Abbau des AI-2 Autoinducers von *E. amylovora* zu erhalten, wurden verschiedene Expressionsplasmide für *lsrK* konstruiert. In einem Screening in AI-2 produzierenden *E. coli* Stämmen konnte zunächst für kein Plasmid ein eindeutiger Abbau von AI-2 nachgewiesen werden. Durch eine feinere Titration der AI-2 Zugabe konnten inzwischen aktive Konstrukte identifiziert werden. Die AI-2 Abbaurate ist nicht sehr hoch, so dass falls zu viel AI-2 vorliegt kein Unterschied mehr zwischen LsrK behandelter und unbehandelter Probe sichtbar wird.

Gegen Projektende konnte in ersten Versuchen mit LsrK-haltigem Zellextrakt gezeigt werden, dass durch Inkubation des Extraktes unter ATP Zugabe sowohl der AI-2 Gehalt von bakteriellem Kulturüberstand als auch die AI-2 ähnliche Substanz in Pflanzenextrakt abgebaut werden. Auch wenn die bisherigen Abbauraten für ein vollständiges AI-2 Quorum Quenching nicht ausreichen, ist damit ein wichtiger Nachweis gelungen, dass es sich bei der pflanzlichen Substanz wirklich um ein dem AI-2 strukturell ähnliches Molekül handelt, das auch von einer AI-2 spezifischen Phosphatase erkannt wird.

Störung der Genregulation in *E. amylovora* durch heterologes AI-1.

Es sind einige Bakterienarten beschrieben worden, die zwar selber keine Autoinducer produzieren, aber auf heterolog gebildete Signalmoleküle reagieren können. Um prinzipiell zu klären, ob *E. amylovora* durch AI-1 Regulation beeinflussbar ist, wurde ein gut untersuchtes Synthese/Rezeptor Paar aus dem verwandten *P. stewartii* in den Feuerbranderreger transferiert. Die Expression des *esal* und *esaR* Genes hatte auf die EPS Synthese von *E. amylovora* exakt die gleiche Auswirkung wie im Ursprungsorganismus, *P. stewartii*. Durch die Bildung des Rezeptors EsaR wurde die EPS-Produktion stark herunter reguliert, durch Expression des Biosynthesegens *esal* wurde diese Repression wieder aufgehoben (Abb. 5).

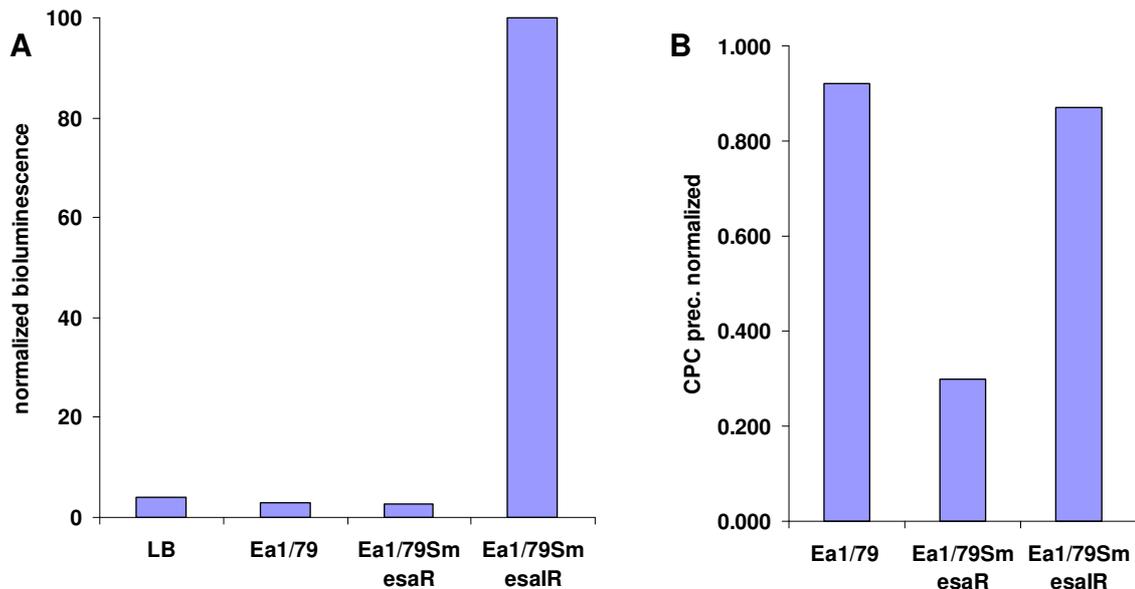
AI-1 Produktion in *E. billingiae*.

Der Feuerbrandantagonist *E. billingiae* ist in der Lage AI-1 zu bilden. Über Dünnschichtchromatographie und nachfolgende Überschichtung mit einem Indikatorstamm wurde versucht die Kettenlänge des gebildeten AI-1 Moleküls zu bestimmen. Auf den TLC-Platten konnte über den AI-1 Indikatorstamm *Chromobacterium violaceum* CV26 ein schwaches Signal auf Höhe des Referenz C8-AI-1 nachgewiesen werden. Um die Bedeutung des AI-1 für den Antagonisten abzuschätzen wurde über Transposonmutagenese eine Biosynthese-Mutante selektiert (Abb. 6A). Entgegen aller Erwartungen zeigte die AI-1 Mutante im Vergleich zum wt keine Beeinflussung weder im Hinblick auf

Abbildung 5: Einfluss von heterologem AI-1 auf *E. amylovora*.

A) Im Bioassay mit dem AI-1 Indikatorstamm *E. coli* pSB403 zeigen Ea1/79 und der mit dem AI-1 Rezeptor *esaR* transformierte Stamm keine AI-1 Bildung im Vergleich zur Medium Kontrolle (LB), während der *esal/R* transformierte Stamm ein deutliches AI-1 Signal gibt.

B) Die EPS-Bildung von *E. amylovora* wird durch heterologes AI-1 beeinflusst. In Anwesenheit des AI-1 Rezeptors *esaR* wird die EPS-Synthese reprimiert und ähnlich wie in *P. stewartii* wird diese Repression durch *esal* vermittelte AI-1 Synthese wieder aufgehoben.



EPS-Produktion noch in anderen Bereichen wie z.B. Motilität. Dieses fehlen eines Phänotyps ist sehr untypisch und womöglich ein Hinweis, dass weitere Quorum Sensing Systeme mit der AI-1 Regulation interagieren.

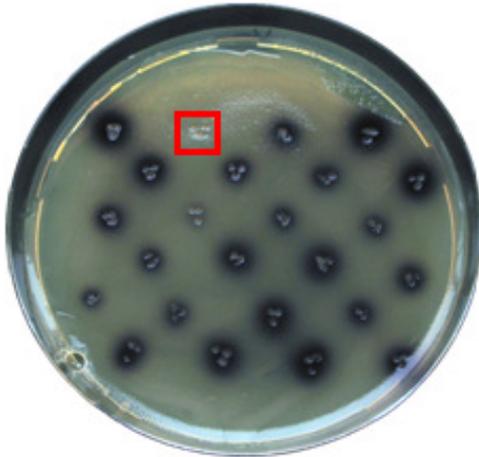
AI-1 Produktion in *E. tasmaniensis*.

In der Genomsequenz von *E. tasmaniensis* finden sich je ein eindeutiges Homolog AI-1 Rezeptor und Biosynthesegen. Dennoch lässt sich unter verschiedensten Wachstumsbedingungen keine AI-1 Produktion für *E. tasmaniensis* nachweisen. Das AI-1 Biosynthesegen scheint nicht exprimiert zu werden. Dass das Gen intakt ist, konnte durch eine Überexpression sowohl in *E. coli*, als auch in *E. tasmaniensis* nachgewiesen werden (Abb. 6B). Das nach Überexpression von *E. tamaniensis* gebildete AI-1 wird anders als des AI-1 von *E. billingiae* nicht von *Chromobacterium violaceum* CV26 erkannt. Es handelt

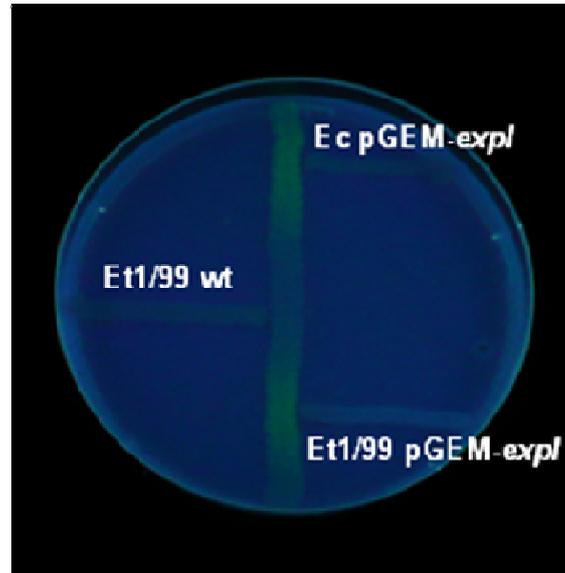
Abbildung 6: AI-1 Produktion in antagonistischen *Erwinia* Arten.

A) Screening von Transposonmutanten in *E. billingiae* (Eb661) nach AI-1 negativem Phänotyp (roter Kasten). **B)** Überexpression von *expl* aus *E. tasmaniensis* in *E. coli* (Ec) und in *E. tasmaniensis* (Et).

A)



B)



sich also um eine andere Struktur. Genau wie in *E. billingiae* zeigte aber auch hier ein Vergleich zwischen AI-1 Produzenten (Überexpression) und AI-1 negativem Stamm (wt) keinen offensichtlichen Phänotyp. Auch hier scheint ein voll funktionsfähiges Quorum Sensing System vorhanden zu sein, unter *in-vitro* Kulturbedingungen aber keine Auswirkung zu haben.

Auswirkung von AI-1 auf *E. amylovora*.

AI-1 ist kommerziell in verschiedenen Modifikationen und Kohlenstoff-Kettenlängen erhältlich. Wir haben untersucht, ob Zugabe von synthetischem AI-1 (Kettenlänge C4-C12) in *E. amylovora* ähnliche Effekte verursacht wie in *E. coli*. Dort ist unter anderem ein Einfluss von AI-1 auf Motilität und Säureresistenz beschrieben worden. Tests auf die Beweglichkeit von *E. amylovora* zeigten keinen Effekt von synthetischem AI-1. Über einen biolumineszenten Reporterstamm von *E. amylovora* wurde das Überleben nach Ansäuerung in Anwesenheit verschiedener AI-1 getestet. Auch hier konnte verbessertes Überleben beobachtet werden.

„eavesdropping“ Quorum Sensing Systeme.

Verschiedene Erwinien bilden ein homolog zu dem *E. coli* AI-1 Rezeptor *sdiA*, der auch als „eavesdropping“ System bezeichnet wird. *E. coli* produziert, ähnlich wie *E. amylovora*, kein eigenes AI-1 Signal. Das *sdiA* System reagiert vielmehr auf in der Umgebung vorhandenes AI-1 und ermöglicht es *E. coli* damit auf konkurrierende Bakterien zu reagieren. Unter anderen sind Motilität und Säureresistenz über das *sdiA* System reguliert. Wie im oberen Absatz berichtet, haben kommerziell erhältliche AI-1 Varianten in *E. amylovora* keinen Einfluss auf diese beiden Phänotypen. Das weist darauf hin, dass das Erwinia *sdiA* System nicht dem *E. coli* System entspricht. Entweder hat es eine andere Funktion oder der Rezeptor bindet eine andere AI-1 Struktur. Ebenfalls anders als in *E. coli* findet sich in den vorhandenen Erwinia Genomen in direkter Nachbarschaft zum *sdiA* Homolog ein open-reading frame (ORF) der entfernte Ähnlichkeit zu den beschriebenen AI-1 Biosynthese-Genen hat und möglicherweise ein AI-1 mit ungewöhnlicher Struktur bilden könnte. Die Übereinstimmung dieses ORF's zu definierten *luxI* Homologen ist nur sehr schwach, daher ist die Funktion unklar. Auch konnte für *E. amylovora* mit verschiedensten Indikatorstämmen kein Signal nachgewiesen werden. Dennoch implizieren Lage und Sequenzähnlichkeiten eine mögliche Bedeutung dieses ORF's für die Quorum-Sensing Regulation. Während die Abweichung zu bekannten AI-1 Biosynthesegenen hoch ist, ist unter den bisher sequenzierten Erwinia Arten ist das potentielle Protein gut konserviert (Abb. 7). Um zu testen, ob es sich hier um ein Erwinia-spezifisches Quorum-Sensing System handelt, wurde das *ahlI* Homolog unter Kontrolle des *lac* Promotors überexprimiert. Auch hier konnte mit verschiedensten Indikatorstämmen kein Signal nachgewiesen werden. Entweder waren die Expressionsplasmide inaktiv, oder es wird ein Autoinducer mit abweichender Struktur gebildet. In diesem Fall wäre es nötig, einen angepassten Reporterstamm zu produzieren.

3.1 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Innerhalb der Projektlaufzeit konnte eine Reihe grundlegender Informationen zur Quorum Sensing Regulation in *Erwinia* Arten erarbeitet werden. Ausgehend von diesen bisherigen Ergebnissen erscheint der Einsatz von AI-2 Quorum Quenching zur Feuerbrandbekämpfung im Freiland schwierig. Durch die unerwartete Interferenz einer pflanzlichen Substanz mit AI-2 ähnlichen Eigenschaften scheint dieses Signalmolekül im natürlichen System in sehr großen Mengen vorzukommen. Für einen vollständigen Abbau müssten extrem effiziente Systeme zur Verfügung stehen, die bisher erzielten Abbauraten würden nicht ausreichen. In medizinisch orientierten Studien werden allerdings immer neue gegen AI-2 Rezeptoren gerichtete Inhibitoren vorgestellt. Ein solcher Inhibitor gegen den bislang nicht identifizierten AI-2 Rezeptor aus *E. amylovora* könnte auch das pflanzliche Signalmolekül blockieren und ließe zur Feuerbrandbekämpfung einsetzen. Nach weiterer Charakterisierung ließe sich Bildung und Menge der pflanzlichen Substanz mit AI-2 ähnlichen Eigenschaften in laufende Züchtungsprojekte zur Erzeugung Feuerbrand-Resistenter Sorten einbinden. Obwohl die Rolle von AI-2 als Quorum-Sensing Signal in vielen Pathogenen wie *E. coli* oder *Salmonella typhimurium* gut charakterisiert ist, wird die Bedeutung von AI-2 als „universelles Signalsystem“ in der aktuellen Literatur zunehmend kontrovers diskutiert. Einige Arbeitsgruppen argumentieren, dass das *luxS* Gen nicht im eigentlichen Sinn als AI-2 Biosynthese-Gen zu sehen ist, sondern eine zentrale Rolle im S-Adenosylmethionin (SAM) Stoffwechsel einnimmt. Das gebildete AI-2 sei in vielen Bakterien ein reines Abbauprodukt nicht ein Signalmolekül. Andere aktuelle Arbeiten beschreiben eine klare regulatorische Funktion von AI-2. Auch unsere eigenen Ergebnisse sprechen deutlich für eine Signal-Funktion von AI-2 in *E. amylovora* und eine mögliche Wirts-Pathogen Interaktion über eine von der Pflanze gebildete, AI-2 ähnliche Substanz.

Im Projektverlauf wurde auch die Möglichkeit untersucht über artfremde AI-1 Varianten in die Entwicklung von *E. amylovora* einzugreifen. Ein Homolog zum *sdjA* System aus *E. coli* zeigte in *Erwinia* keine Reaktion auf synthetische AI-1. Eine weitere Charakterisierung des Sensing-Spektrums dieses Rezeptors ist nötig, um abschätzen zu können ob sich ein Angriffspunkt in die Pathogen-Entwicklung bietet. Auch das benachbarte potentielle Biosynthesegen könnte hier von Relevanz sein. Unsere Ergebnisse dazu, dass Aktivierung oder Deaktivierung eines ersten AI-1 Systems in *E. tasmaniensis* und *E. billingiae* keinen direkten Phänotyp zeigen lassen vermuten, dass in den *Erwinia* Arten eine Redundanz von Quorum Sensing Regulatoren vorliegt. Ähnlich wurden in *Vibrio* Spezies bis zu 3 verschiedene Quorum Sensing Wege beschrieben, deren Regulation teilweise unabhängig voneinander ist und teilweise überlappt. Weitere Kenntnisse über das *Erwinia sdjA* und den benachbarten open reading frame sind nötig, bevor eine Einschätzung über praktische Eingriffsmöglichkeiten erfolgen kann.

4. Zusammenfassung

Die Interferenz mit Quorum-Sensing Regulations-Systemen kann einen neuen Ansatz zur Feuerbrandbekämpfung bieten. Die Bildung von AI-2 wurde für verschiedene Isolate von *E. amylovora* und antagonistischen Bakterien nachgewiesen. Unter Laborbedingungen beeinflusst AI-2 im Feuerbranderreger wichtige Virulenzfaktoren wie z.B. die EPS Biosynthese. Die Bildung einer AI-2 ähnlichen Substanz durch verschiedene Pflanzen könnte in der Pathogen-Wirtbeziehung zwischen *E. amylovora* und der Pflanze kritische Rolle spielen. Über spezifische Inhibitoren des AI-2 Rezeptors bietet sich ein möglicher Angriffspunkt für die Feuerbrandbekämpfung im Freiland. Bislang ist dieser Rezeptor in *E. amylovora* allerdings noch unbekannt und vorgestellte spezifische Inhibitoren sind noch nicht kommerziell erhältlich. Erfolgreiche Antagonisten wie *E. billingiae* und *E. tasmaniensis* sind in der Lage sowohl AI-2, als auch mindestens ein AI-1 Signal-Molekül zu bilden. Dabei erscheint die Expression

des ersten AI-1 Systems zwischen *E. billingiae* und *E. tasmaniensis* unterschiedlich reguliert. In beiden Arten deutet das Fehlen eines Phänotyps von Aktivierung oder Deaktivierung des AI-1 Systems stark auf ein eventuell redundantes zweites AI-1 System hin. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die Regulation und Interaktion zwischen verschiedenen Autoinducer Varianten besser zu verstehen.

5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

Schon im ersten Projektjahr musste die Projektplanung und Ausrichtung wesentlich angepasst werden. Durch das unerwartetes Ergebnis, dass auch in der Wirtspflanze ein Molekül mit ähnlichen Eigenschaften wie das bakterielle AI-2 sie aufweist vorkommt, musste die Pflanzeninteraktion mit der Feuerbranderreger viel stärker berücksichtigt werden. Der vorgestellte Komplex zur Charakterisierung der pflanzlichen Substanz wurde ergänzt und die Pflanzenversuche umorganisiert. Bildung und Lokalisation der pflanzlichen Substanz wurden untersucht. Die ursprünglich vorgesehenen Transkriptionsstudien wurden dafür reduziert. Da der AI-2 Rezeptor in *E. amylovora* bislang nicht identifiziert werden konnte, fehlte eine wichtige Voraussetzung für die RNA-Analysen. Es konnte ein erstes Abbausystem für pflanzliche Substanz und bakteriellen AI-2 etabliert werden.

Auch die vorgesehenen Pflanzenversuche zur Auswirkung von Autoinducern auf den Antagonismus zwischen *E. amylovora* und anderen Bakterien waren in der geplanten Form nicht durchführbar. Wieder hätte die von der Pflanze gebildete Substanz die erwarteten Interaktionen zwischen bakteriellen Signalmolekülen überlagert. Unsere Arbeiten konzentrierten sich daher stärker auf die *in-vitro* Regulation der AI-1 Produktion und wir konnten in diesem Bereich wichtige neue Daten zu Unterschieden zwischen verschiedenen Antagonisten liefern

6. Literatur

Eigenen Vorarbeiten des Antragstellers und Kooperationspartners:

- A. Burse, H. Weingart, and M. S. Ullrich (2004) NorM, an *Erwinia amylovora* Multidrug Efflux Pump Involved in In Vitro competition with other epiphytic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 693–703.
- A. Burse, H. Weingart, and M. S. Ullrich (2004) The phytoalexin-inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *MPMI* 17: 43-54.
- K. Geider, G. Auling, Z. Du, V. Jakovljevic, S. Jock, and B. Völksch (2006) *Erwinia tasmaniensis* sp. nov., a non-phytopathogenic bacterium from apple and pear trees. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 2937–2943.
- C. Goyer and M. S. Ullrich (2006) Identification of low-temperature-regulated genes in the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Can J Microbiol* 52: 468–475.
- S. Jock and K. Geider (2004) Molecular distinction of American *Erwinia amylovora* strains and of two Asian pear pathogens by analysis of PFGE patterns and *hrpN* genes. *Environmental Microbiology* 6: 480-490.
- M. Mohammadi and K. Geider (2007) Autoinducer-2 of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* and other plant-associated bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 266: 34-41.

Weitere Literaturangaben

- Chan Y Y, & Chua K L (2005) The *Burkholderia pseudomallei* BpeAB-OprB efflux pump: expression and impact on Quorum Sensing and virulence. *J Bacteriol* 187:4707-4719.
- Koutsoudis M D, Tsaltas D, Minogue T D & von Bodman S B (2006) Quorum-Sensing regulation governs bacterial adhesion, biofilm development, and host

- colonization in *Pantoea stewartii* subspecies *stewartii*. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 103: 5983–5988.
- Molina L, Constantinescu F, Michel L, Reimann C, Duffy B & Defago G (2003) Degradation of pathogen Quorum-Sensing molecules by soil bacteria: a preventive and curative biological control mechanism. *FEMS Microbiol Ecol* 45: 71–81.
- Molina L, Rezzonico F, Defago G & Duffy B (2005) Autoinduction in *Erwinia amylovora*: Evidence of an acyl-homoserine lactone signal in the fire blight pathogen. *J Bacteriol* 187: 3206–3213.
- Roy V, Fernandes R, Tsao CY & Bentley WE (2010) Cross species Quorum Quenching using a native AI-2 processing enzyme. *ACS Chem Biol* 5(2): 223–332
- Venturi V, Venuti C, Devescovi G, Lucchese C, Friscina A, Degrassi G, Aguilar C, & Mazzucchi U (2004) The plant pathogen *Erwinia amylovora* produces acyl-homoserine lactone signal molecules in vitro and in planta. *FEMS Microbiol Lett* 241: 179–183.

Bisher erfolgte Darstellung der Projektergebnisse

Teile dieses Projekts wurden auf verschiedenen nationalen und internationalen Tagungen vorgetragen (unter anderem Arbeitskreistreffen Phytobakteriologie der DPG, International Workshop of Fire Blight und Statusseminar Feuerbrand).

Die Publikation ist in Form eines wissenschaftlichen Papers mit ergänzenden Daten aus aktuell noch fortgeführten Experimenten zum Quorum Quenching durch LsrK vorgesehen.