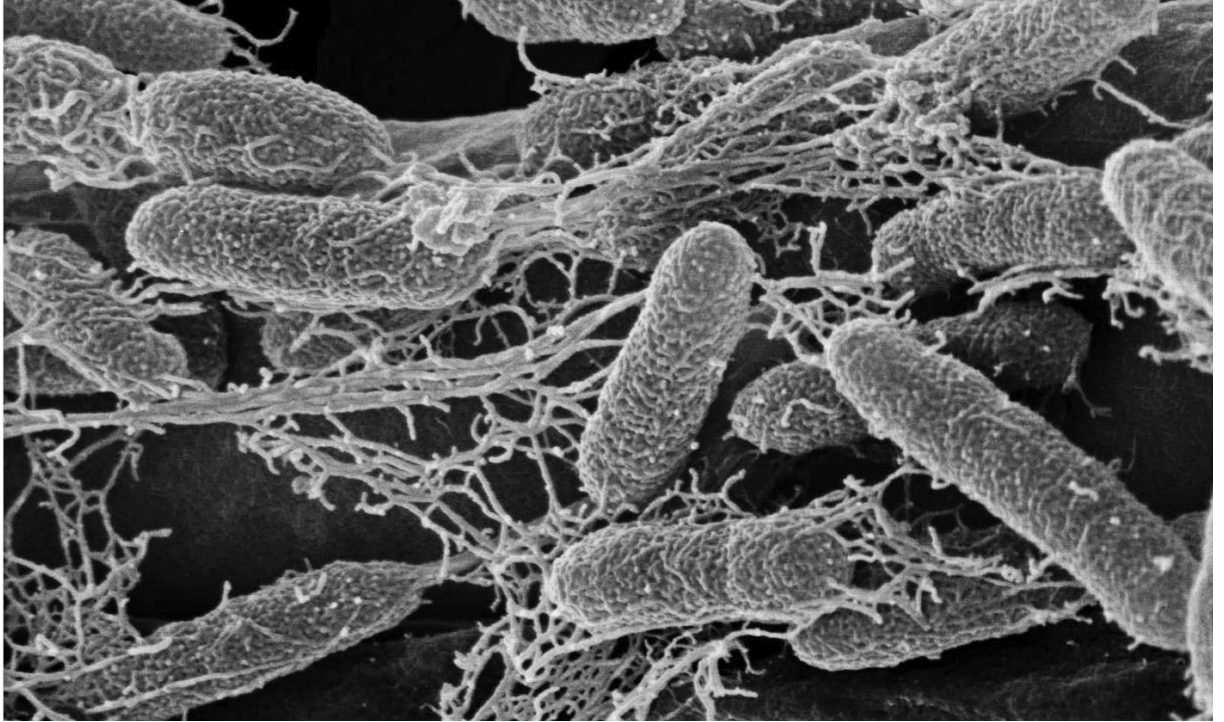


Vertreter der Gattung *Janthinobacterium* beim Bewachsen einer Pilzhyphe. Die netzartigen Strukturen stellen Teile des Biofilms dar. Die Biofilmbildung wird durch Quorum Sensing gesteuert und kann durch Quorum-Quenching-Maßnahmen verhindert werden.



Sprachstörungen in der Welt der Mikroben

Quorum Quenching

CHRISTEL VOLLSTEDT | WOLFGANG STREIT

Bakterien haben eine Art „Sprache“ entwickelt – das Quorum Sensing (QS) – durch die sie in der Lage sind, ihre Artgenossen wahrzunehmen und gemeinschaftlich zu handeln. Viele Prozesse, die zur Pathogenität oder Virulenz von Bakterien führen, werden über Quorum Sensing gesteuert. Unter Quorum Quenching (QQ) versteht man Mechanismen, die diese Sprache und damit das gemeinschaftliche Handeln stören. Quorum Quenching stellt eine vielversprechende Strategie dar, in die Kommunikation von pathogenen Bakterien einzugreifen und dadurch ihre Pathogenität abzuschwächen.

Die mit einem grünen Pfeil markierten Begriffe werden im Glossar auf Seite 148 erklärt.

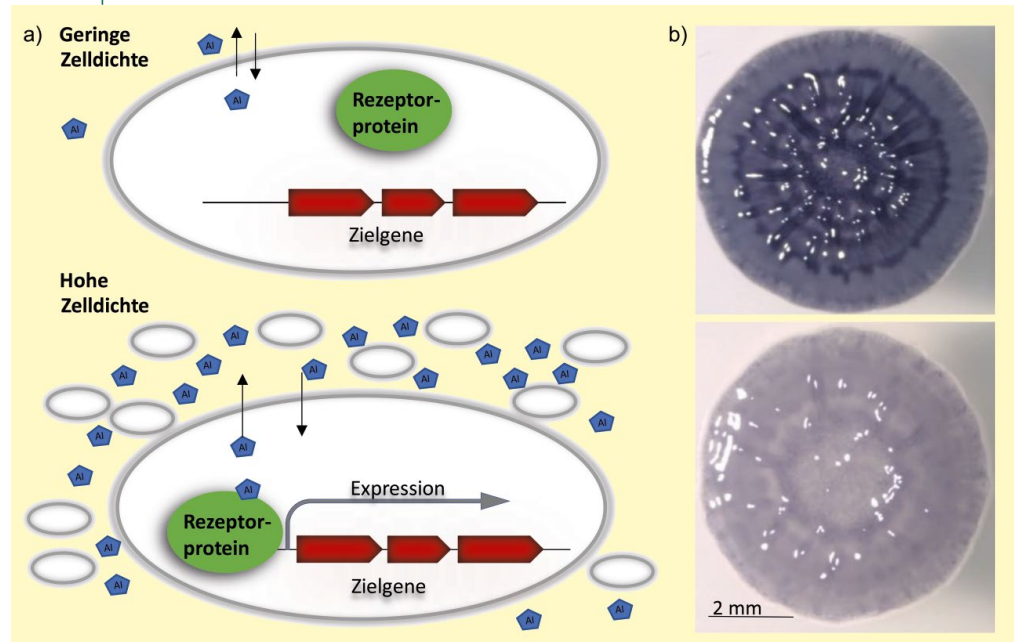
Die Art und Weise wie Bakterien kommunizieren wird als Quorum Sensing (QS) bezeichnet. Bakterielle QS-Systeme bestehen meist aus zwei zentralen Komponenten, einem Rezeptor, dem Signalempfänger und einer Synthese, dem Enzym, das die Signalmoleküle, auch Quorum-Sensing-Signal oder ► Autoinducer (AI) genannt, produziert. Bei einer niedrigen Populationsdichte verteilen sich die von den Bakterien produzierten und nach außen abgegebenen Autoinducer in der Umgebung, ohne von den Nachbarzellen wahrgenommen zu werden. Steigt die Anzahl der Bakterien, akkumulieren diese Signalstoffe im Medium. Ist ein bestimmter Schwellenwert an Signalmolekülen überschritten, wird dies von den Zellen in der Umgebung erkannt, und es kommt zur Expression bestimmter Zielgene (Abbildung 1). Auf diesem Weg können bei steigender Zellzahl eine Reihe von bakteriellen Aktivitäten wie z. B. die Resistenz gegen Antibiotika, die Biofilmbildung, die Biolumineszenz und die Sekretion von ► Virulenzfaktoren reguliert werden [1].

Quorum Sensing ist sowohl bei Gram-negativen als auch bei Gram-positiven Bakterien verbreitet und wurde

erstmals bei dem Meeresbakterium *Aliivibrio (Vibrio) fischeri* beschrieben. In *A. fischeri* wird die Biolumineszenz über QS reguliert. Im Laufe der Evolution hat sich eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen mit verschiedenen QS-Signalmolekülen entwickelt. Die häufigsten AI-Moleküle sind die N-Acyl-Homoserinlaktone (AHLs) bei Gram-negativen Bakterien. Sie bestehen aus einer Acylkette, die über eine Amidbindung mit einem Homoserinlaktonring verbunden ist (Abbildung 2). Aufgrund der verschiedenen Varianten dieser Verbindungen mit unterschiedlicher Acylkettenlänge und unterschiedlichen Substitutionen dienen die AHLs zur artspezifischen Kommunikation. Im Gegensatz zu den AHLs hat sich mit dem Autoinducer-2 (AI-2) ein AI entwickelt, der die Kommunikation zwischen Organismen unterschiedlicher Arten zulässt. Der AI-2 kommt sowohl bei Gram-negativen als auch bei Gram-positiven Bakterien vor und gilt als eine Art Universalsprache. Die Synthese von AI-2 wurde in einer Reihe von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien, einschließlich der Krankheitserreger *Salmonella typhimurium* und *Vibrio cholerae* sowie beim hyperthermophilen Archaeon *Pyrococcus furiosus* nachgewiesen.

In *Vibrio harveyi* ist der AI-2 z. B. an der Induktion der Biolumineszenz beteiligt. In pathogenen *E. coli*-Stämmen wird die Produktion von Virulenzfaktoren durch AI-2-Moleküle reguliert. Strukturell handelt es sich bei dem AI-2 um einen Furanosylboratdiester, dessen Synthese durch eine S-Ribosylhomocysteinase katalysiert wird (z. B. LuxS). Ein Rezeptor für AI-2-Moleküle wurde in zahlreichen Bakterienspezies identifiziert, was die Vermutung, dass AI-2 zur interspezifischen Kommunikation genutzt wird, bekräftigt [2]. Neben dem AI-2 verwenden Gram-positive Bakterien zur Kommunikation zyklische und lineare Oligopeptide als Signalmoleküle, die sogenannten Autoinducer-Peptide (AIP), die über spezielle Transportsysteme aus der Zelle transportiert werden. Im Zytosol werden die AIPs zunächst als Vorstufen (oder Pro-AIPs) synthetisiert und dann abhängig vom jeweiligen Organismus intrazellulär oder extrazellulär weiter modifiziert [3]. Transmembrane Histidinsensorkinasen detektieren die AIPs nach Erreichen eines bestimmten Schwellenwertes und geben das Signal über ein ► Zweikomponentensystem in die Zelle weiter, wodurch die Expression u. a. von Virulenz-, Kompetenz- und Sporulationsgenen induziert wird. Bei *Staphylococcus*

ABB. 1 | QUORUM SENSING BEI BAKTERIEN



a) Mechanismus des Quorum Sensing (QS). Bei geringer Zelldichte liegt der Autoinducer (AI, blau) ebenfalls in geringer Konzentration vor (oben). Das Rezeptorprotein kann die Transkription der Zielgene nicht induzieren. Mit steigender Zellzahl nimmt die Konzentration des Autoinducers zu (unten). Wird ein Schwellenwert (Quorum) überschritten, kommt es zur Bindung des Autoinducers an den Rezeptor, und die Zielgene können transkribiert werden. **b) Einfluss des QS auf die Genexpression in *Janthinobacterium* sp.** Durch die Deletion der Autoinducersynthese können keine Signalmoleküle mehr produziert werden, und die QS-gesteuerte Expression der Zielgene, in diesem Fall des violetten Farbstoffs Violacein, wird reduziert. Die Violaceinproduktion im Wildtypstamm (oben) wird sichtbar in der Verfärbung der Kolonie. In der QS-Mutante (unten) ist dies deutlich reduziert (Aufnahme nach 72-stündigem Wachstum). Außerdem führt das Fehlen des Signalmoleküls zu einem veränderten Koloniewachstum auf Agarplatten, was in den Unterschieden in der Koloniestruktur deutlich wird.

aureus, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* und *Clostridium perfringens* sind AIP-basierte QS-Systeme gut charakterisiert.

Neben den bereits beschriebenen QS-Signalen wurden weitere Signalmoleküle entdeckt. Das pflanzenassoziierte Bakterium *Xanthomonas campestris* und auch humanpathogene Stämme wie *Pseudomonas aeruginosa* und *Burkholderia cenocepacia*, produzieren *cis*-11-Methyl-2-dodecensäure, den sogenannten Diffusible Signal Factor

IN KÜRZE

- Die Sprache der Bakterien wird als **Quorum Sensing** bezeichnet und erfolgt über Signalmoleküle, die Autoinducer genannt werden.
- Erkennen die Bakterien eine ausreichende **Anhäufung der Signalmoleküle** und damit weiterer Artgenossen, werden Prozesse gestartet, die oftmals für den Wirt pathogen sind.
- Diese Prozesse können unterdrückt werden, indem die bakterielle „Unterhaltung“ gestört wird. Dies wird als **Quorum Quenching** bezeichnet.
- Moleküle und Enzyme, die das Quorum Sensing stören, könnten die **Antibiotika der Zukunft** sein und Infektionen vermeiden.

(DSF), um unter anderem den Übergang zwischen einer planktonischen und einer Biofilm-assoziierten Lebensweise zu regulieren. In *P. aeruginosa* wurde neben den herkömmlichen AHL-Signalen auch 2-Heptyl-3-hydroxy-4-chinolon (PQS) als Quorum-Sensing-Signal identifiziert. Es wurde gezeigt, dass PQS die Expression des Virulenzfaktors LasB kontrolliert. Der humanpathogene Erreger *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 produziert ein weiteres QS-Signal, den Autoinducer 3 (AI-3), der maßgeblich an der Expression der Virulenzgene beteiligt ist. Die membran-gebundene Histidinkinase QseC nimmt neben dem AI-3 auch die Wirtshormone Adrenalin und Noradrenalin wahr, was für einen möglichen „Cross-Talk“ zwischen Bakterium und Wirt spricht [4]. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde gezeigt, dass sich AI-3-Analoga aus Produkten der Threonin-Dehydrogenase (Tdh) sowie unvollständigen ▶ Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Reaktionen ableiten und in einer großen Anzahl von Gram-positiven und Gram-negativen Krankheitserregern gebildet werden können [5]. Zusätzlich wurden weitere Signalmoleküle wie Indol, zyklische Dipeptide (2,5-Diketopiperazine, DKP) und 3,5-Dimethylpyrazin-2-ol (DPO) beschrieben, die sich von Aminosäuren ableiten und die Virulenz und Biofilm-

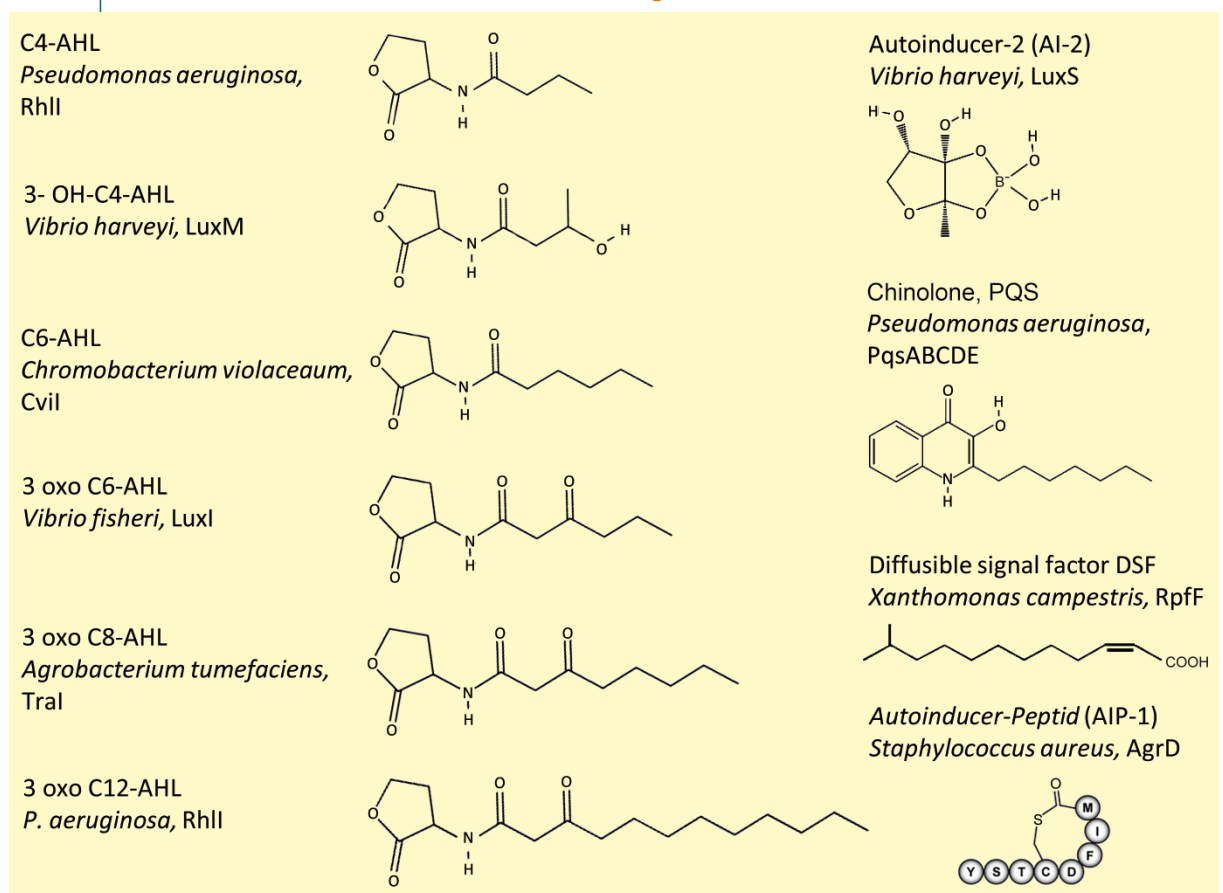
bildung in einigen Organismen verstärken, aber auch reduzieren können.

Wie die Kommunikation unterbrochen wird: Sprachstörung bei Bakterien

Wird der Prozess des QS gestört, spricht man von Quorum Quenching (QQ). An diesem Prozess können Enzyme oder chemische Komponenten beteiligt sein, die auf unterschiedliche Weise die Kommunikation der Bakterien hemmen. Aufgrund dieser Inhibition wird dann beispielsweise die Sekretion von Virulenzfaktoren, das Infektionsverhalten oder auch die oft unerwünschte Biofilmbildung gehemmt. QQ kann von den Zellen eines mikrobiellen Habitats zum einen dazu genutzt werden, um die eigens produzierten Signalmoleküle wieder abzubauen und zu verwerten, oder um Signalkaskaden von konkurrierenden Organismen zu stören und sich somit einen Wachstumsvorteil zu verschaffen [6]. Da viele Prozesse, die mit der Pathogenität der Bakterien zu tun haben, über Quorum Sensing reguliert werden, ist die Unterbrechung der Signalkaskade durch Enzyme oder chemische Inhibitoren eine geeignete Strategie, um z. B. bestimmte Infektionen zu verhindern. So wird Quorum Quenching zunehmend

Einen Übersichtsartikel zum Quorum Sensing finden Sie in *Biuz* 6/2020.

ABB. 2 | STRUKTURELLE VIELFALT VON BAKTERIELLEN QUORUM-SENSING-SIGNALMOLEKÜLEN



Dargestellt sind einige Autoinducer-Signalmoleküle und deren Vorkommen in den unterschiedlichen Organismen mit den dazugehörigen Synthesenzymen.

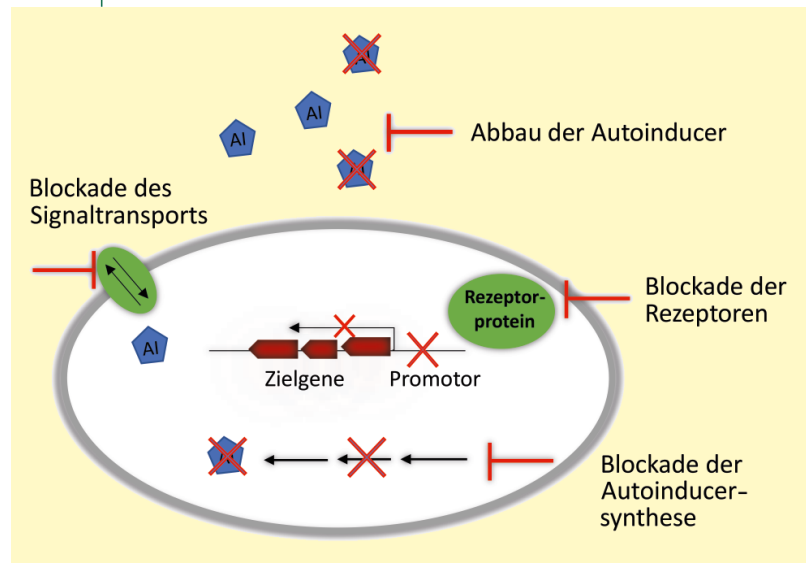
interessanter, um neue Antiinfektionstherapien zu entwickeln. Anders als beim Einsatz von Antibiotika, die auf wachstumsbezogene Prozesse der Organismen abzielen und damit einen hohen Selektionsdruck auf den Organismus ausüben, der zu Antibiotikaresistenzen führen kann, hat die Störung des Quorum Sensing durch Quorum Quenching zwar Auswirkungen auf die Virulenz und die Pathogenität der Organismen, wirkt meist aber nicht tödlich. Quorum Sensing kann in Organismen auf unterschiedliche Art gestört oder unterbrochen werden: durch die Hemmung der Biosynthese des QS-Signals, durch die Blockierung der Rezeptoren, den Transport des QS-Signals und die damit verbundene Weiterleitung sowie durch die Zerstörung des Moleküls selbst (Abbildung 3).

Blockade der Signalsynthese

Die Unterbrechung der Autoinducersynthese kann durch die Hemmung der Synthese der Vorläufermoleküle oder durch Hemmung der Autoinducersynthese selbst erfolgen. AHLs bestehen im Allgemeinen aus einem Homoserinlaktonting und einer Acylseitenkette mit 4 bis 18 Kohlenstoffatomen (Abbildung 2). S-Adenosylmethionin (SAM) ist das Hauptaminosäuresubstrat für den Homoserinlaktonting, während die Acylkette von einem 6-Kohlenstoff-Acyl-ACP (Acyl-Carrier-Protein) abgeleitet ist. Da SAM und Acyl-ACP essentielle Komponenten des anabolen Stoffwechsels der Organismen sind, ist eine komplette Inhibition für die Zelle tödlich. Das zeigt beispielsweise der Einsatz von Triclosan zur Hemmung der Acyl-ACP-Biosynthese. So ist Triclosan in hohen Dosen für Bakterien tödlich, während es in einer subletalen Konzentration die AHL-Synthese hemmt. Als SAM-Substratanaloga zur Inhibierung der AHL-Synthese sind z. B. Butyryl-S-Adenosylmethionin (butyryl-SAM) und Sinefungin beschrieben. Letzteres wirkt beispielsweise bakteriostatisch gegenüber Pneumokokken und vermindert die Biofilmbildung sowie die Produktion von AI-2. Unterschiedliche Screeningmethoden führten zur Identifizierung neuer Inhibitoren der Autoinducersynthesen.

Im Gram-negativen pflanzenpathogenen Bakterium *Burkholderia glumae*, dem Erreger der Reiskornfäule, ist das QS-System TofI/TofR an der Produktion des Virulenzfaktors Toxoflavin beteiligt. Toxoflavin verursacht neben der Reiskornfäule auch Welkesymptome an verschiedenen Kulturpflanzen wie z. B. Tomate und Paprika. Die gezielte Suche nach AHL-Antagonisten führte zur Identifizierung des TofI-Inhibitors J8-C8, der ein kompetitiver Inhibitor des Acyl-ACP-Carriers ist und die Toxoflavinproduktion unterdrückt. Ein weiteres Screening ergab, dass indolhaltige Moleküle, wie das Tryptophanderivat Indol-3-Essigsäure (das Pflanzenhormon Auxin), die AHL-Synthase BmaI1 aus *Burkholderia mallei* hemmen. An der Synthese des Autoinducer-2 sind zwei Enzyme beteiligt: die Nucleosidase MTAN (auch Pfs genannt) und LuxS. Es konnte gezeigt werden, dass das Enzym MTAN durch den Einsatz unterschiedlicher Immucillin-A-Derivate inhibiert wird. Immucilline sind synthetisch hergestellte Nucleosidana-

ABB. 3 | QUORUM-QUENCHING-MECHANISMEN IN BAKTERIEN



loga, die die AI-2-Produktion unterdrücken können, was wiederum zur Reduktion der Biofilmbildung führt. Die Aktivität von LuxS lässt sich auch noch auf anderem Wege inhibieren. Für verschiedene synthetisch hergestellte LuxS-Substratanaloga wurde gezeigt, dass sie als kompetitive Inhibitoren von LuxS wirken und somit die bakterielle Kommunikation stören. Damit stellen sie eine vielversprechende Klasse antibakterieller Wirkstoffe dar. Auch die Synthese kleiner Peptide, die aufgrund ihrer Homologie an das katalytische Zentrum von LuxS binden, führte zu einer abgeschwächten Virulenz in dem Gram-negativen Pathogen *Edwardsiella tarda*.

Das *Pseudomonas*-Chinolon-Signal (PQS) und 2-Heptyl-4-hydroxychinolin (HHQ) sind an der Produktion der Virulenzfaktoren und der Biofilmbildung in *P. aeruginosa* beteiligt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Derivate der Anthranilsäure die Produktion von HHQ und PQS hemmen. Des Weiteren wurden über ein Screening kleine Moleküle identifiziert, die ein Schlüsselenzym PqsD in der Synthese der Signalmoleküle hemmen, was zu einer starken Reduktion der Biofilmbildung in *P. aeruginosa* führt. Auch das von dem Pilz *Candida albicans* produzierte Farnesol führt bei *P. aeruginosa* zu einer geringeren Produktion von PQS und Pyocyanin. Andere verwandte Isoprenoidverbindungen hemmen die PQS-Produktion schon bei mikromolaren Konzentrationen, was darauf hindeutet, dass verwandte Verbindungen an Interspeziesinteraktionen mit *P. aeruginosa* beteiligt sein könnten. Im Gegensatz zu den Studien, die die Blockierung der Autoinducersynthese in Gram-negativen Bakterien betreffen, ist die Anzahl der Studien in Gram-positiven Organismen eher gering. Die Autoinducer der Gram-positiven Organismen sind modifizierte Oligopeptide. Die Enzyme, die an ihrer Herstellung beteiligt sind, sind ribosomale Proteine und Peptidasen, die für das Wachstum und Überleben der Zel-

len essentiell sind. Unter anderem wurden Strukturanaloga und ein pilzlicher Sekundärmetabolit (das Cyclohexanon Ambuic acid) identifiziert, welche die Biosynthese von zyklischen Peptiden in verschiedenen Gram-positiven Spezies wie *Staphylococcus aureus* oder *Listeria innocua* hemmen.

Blockierung des Rezeptors

Eine andere wirksame Strategie zur Verminderung der QS-gesteuerten bakteriellen Virulenz und Infektion ist die Inaktivierung von Rezeptoren durch Strukturanaloga der Signalmoleküle. Antagonisten blockieren die Rezeptorbindestelle und verhindern so die Bindung des QS-Signals. Durch die dadurch veränderte Konformation des Signal-Rezeptor-Komplexes kann dieser nicht mehr an die Promotorbereiche seiner Zielgene binden – die Expression wird unterdrückt. Sehr viele natürliche und auch synthetische Moleküle, die QS-Rezeptoren blockieren, wurden bereits identifiziert. Bromierte Furanone gehörten zu den ersten kleinen Molekülen, die als Inhibitoren des Quorum Sensings identifiziert wurden. Bromierte Furanone der Rotalge *Delisea pulchra* binden an verschiedene Rezeptoren, darunter LuxR, und verhindern so ein QS-kontrolliertes Verhalten wie ► Schwärmen bei *Serratia liquefaciens* oder die Biolumineszenz bei *A. fischeri* und *V. harveyi*. In *P. aeruginosa* werden die Rezeptoren LasR und RhIR durch Flavonoide inhibiert, wodurch die Produktion von Virulenzfaktoren unterdrückt wird. Zwei Hydroxyleinheiten am Flavon-A-Ring sind dabei für die starke Hemmung entscheidend [7]. Meta-Brom-Thiolakton (mBTL), ein Derivat des nativen Homoserinlaktons, hemmt sowohl die Produktion des Virulenzfaktors Pyocyanin als auch die Biofilmbildung durch Hemmung der QS-Rezeptoren LasR und RhIR in *P. aeruginosa*. Ebenfalls wurde gezeigt, dass mBTL *Caenorhabditis elegans* und menschliche Lungenepithelzellen vor der Abtötung durch *P. aeruginosa* schützen kann. Ein Screening mehrerer Extrakte aus Pflanzen- und Lebensmittelprodukten auf hemmende Eigenschaften gegenüber des Quorum Sensings von *P. aeruginosa* führte zur Identifizierung von Iberin, einem Isothiocyanat, welches von vielen Pflanzen aus der Familie der *Brassicaceae* produziert wird. Iberin verhindert die Bindung von C4-Homoserinlaktone an den Rezeptor RhIR, wodurch die Expression der durch Quorum Sensing regulierten Gene blockiert wird. Auch synthetisch hergestellte Dihydropyrrolon-(DHP)-Analoga oder Lactamderivate können als QS-Inhibitoren fungieren und die Biofilmbildung inhibieren [8].

Auf der Suche nach Strukturanaloga des AI-2-Moleküls konnten viele Moleküle identifiziert werden, die das Quorum Sensing unterbinden. Verwendete man die synthetischen AI-2-Analoga Isobutyl-DPD bzw. Phenyl-DPD in Kombination mit Antibiotika, führte dies zur nahezu vollständigen Beseitigung bereits vorhandener Biofilme von *E. coli* bzw. *P. aeruginosa*, die zuvor in Mikrofließkammern angezogen worden waren. Die Beseitigung von Bio-

filmen ist für die Medizin eine große Herausforderung. Hier stellt der kombinierte Einsatz von Antibiotika zusammen mit QS-Inhibitoren einen vielversprechenden Ansatz dar. Auch für das *V. harveyi*-Rezeptorprotein LuxP wurden mehrere synthetische DPD- oder AI-2-(S-THMF-Borat)-Analoga identifiziert, die mit dem natürlichen AI-2-Signal um die Bindung an LuxP konkurrieren.

QS-Systeme der Gram-positiven Organismen verwenden typischerweise sezernierte Oligopeptide (AIP) und Zweikomponentensysteme, die aus membrangebundenen Sensorkinaserezeptoren und zyttoplasmatischen ► Transkriptionsfaktoren bestehen, um die Genexpression zu regulieren. Im QS-System von *Staphylococcus aureus* detektiert die Sensorkinase AgrC das AIP-Signal und phosphoryliert den Antwortregulator AgrA, der wiederum in seiner phosphorylierten Form an die Promotorregion der QS-Zielgene binden kann und die Transkription induziert. In einem Hochdurchsatzscreening wurde der Quorum-Sensing-Inhibitor Savirin (*S. aureus* virulence inhibitor) identifiziert. Savirin blockiert die Bindung des Antwortregulators AgrA an die Promoterregion der Zielgene und hemmt damit das Quorum Sensing in *S. aureus*. Auf diese Weise in ihrer Kommunikation gestörte *S. aureus*-Bakterien verursachten im Mausmodell weniger Gewebeschäden als Bakterien, die zum Quorum Sensing in der Lage waren.

Der Gram-positive Mikroorganismus *Clostridium perfringens* verursacht Krankheiten wie den Gasbrand und Lebensmittelvergiftungen beim Menschen. Die Produktion der daran beteiligten Toxine wird durch das Zweikomponentensystem VirSR reguliert. Das QS-Signal ist hierbei ein fünfgliedriges Thiolaktonpeptid. Durch den Austausch zweier Aminosäuren in diesem Molekül, die für die Rezeptorbindung und Signalweiterleitung wichtig sind, konnte die Transkription des Toxingens (*pfoA*) in einem virulenten Stamm von *C. perfringens* abgeschwächt werden [9]. Hochdurchsatzscreenings und computergestützte Suchen nach kleinen Molekülen haben die Liste der bekannten ► Agonisten und ► Antagonisten verschiedener QS-Systeme erweitert. Aufbauend auf den bekannten hemmend wirkenden Verbindungsklassen können jetzt neue inhibitorische Verbindungen entwickelt werden.

Blockierung des Signaltransports

Autoinducer können entweder frei durch die Zytoplasmamembran diffundieren oder aktiv aus der Zelle transportiert werden, wo sie von membrangebundenen Zweikomponentensystemen erkannt oder durch ABC-Transporter importiert werden. Der opportunistisch-pathogene Mikroorganismus *P. aeruginosa* verpackt das Signalmolekül 2-Heptyl-3-hydroxy-4-chinolon (PQS) in Membranvesikel, die einen Austausch innerhalb einer Population ermöglichen. Stört man diesen Verpackungsvorgang, kann der Autoinducer nicht mehr transportiert werden und ist nahezu unwirksam. In *Escherichia coli* wird der AI-2 nach seinem Transport in die Zelle von der AI-2-Kinase LsrK phosphoryliert. Wird das Enzym LsrK (zusammen mit

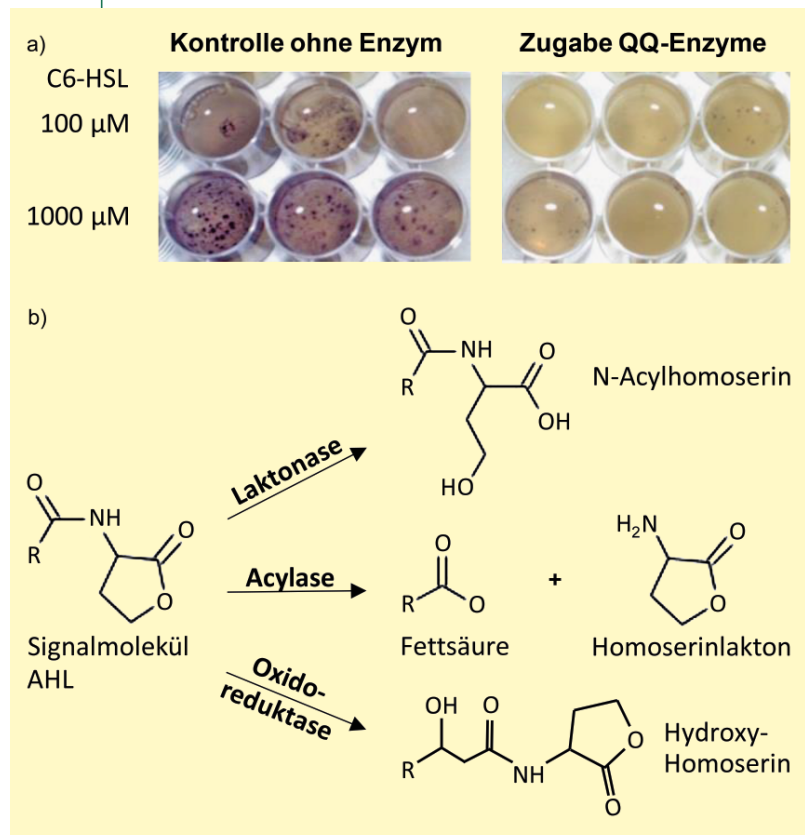
ATP) einer Bakterienkultur zugegeben, phosphoryliert die Kinase extrazelluläre AI-2-Moleküle, die dann aufgrund ihrer negativen Ladung nicht mehr in die Zellen transportiert werden und somit die Expression QS-gesteuerter Gene nicht mehr induzieren können. Antikörper können Quorum-Sensing-Moleküle binden und dadurch den Signaltransport stören. Der Antikörper AP4-24H11 richtet sich beispielsweise gegen AIP-4 aus *S. aureus* und RS2-1G9 gegen 3-oxo-C12-HSL aus *P. aeruginosa*. Auch für das Apolipoprotein B konnte gezeigt werden, dass es AIP-1 aus *S. aureus* binden kann.

Enzymatische Zerstörung der Signale

Eine sehr gut untersuchte Möglichkeit das bakterielle Quorum Sensing zu stören, ist der Abbau der Signalmoleküle. AHL-Signale können auf mehreren Wegen von Enzymen abgebaut werden. Laktonasen und Decarboxylasen spalten bzw. hydrolysieren den Laktonring. Acylasen und Deaminasen trennen den Homoserinlaktonteil und die Acylseitenkette, während Oxidoreduktasen die AHLs modifizieren, indem sie die Acylkette am dritten oder distalen Kohlenstoff oxidieren bzw. reduzieren, ohne die AHLs abzubauen (Abbildung 4). Enzyme, die AI-2 oder das 2-Alkyl-4-(1H)-Chinolon-Signalmolekül verändern, stellen zwei weitere Enzymfamilien dar, die für das enzymatische Quorum Quenching verantwortlich sind. AHL-abbauende Enzyme sind hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz und ihrer Struktur sehr divers und werden in Bakterien, Archaeen und Eukaryoten gefunden. Der häufigste enzymatische Abbau erfolgt durch AHL-Laktonasen, die in verschiedene Proteinfamilien eingeteilt werden können: Aminohydrolasen, Paraoxonasen und Metallo- β -Laktamasen. AHL-abbauende Enzyme wurden erstmals im Jahr 2000 detektiert, als in einem *Bacillus*-Stamm das Gen *aiiA* für ein 250 Aminosäure langes Protein aus der Gruppe der Metallohydrolasen identifiziert wurde, dessen Expression die Pathogenität des Pflanzenschädling *Pectobacterium carotovorum* reduzierte [10]. Da AHLs von Gram-positiven Mikroorganismen wie *Bacillus* zwar nicht gebildet werden, durchaus aber eine antibakterielle Wirkung auf diese haben können, geht man davon aus, dass die Expression von *aiiA* in *Bacillus* zum Abbau der AHLs führt und somit einen detoxifizierenden Effekt hat [11]. Die Laktonase QsdR1 aus *Sinorhizobium fredii* zeigt – wie AiiA – die typische \blacktriangleright HXHXDH-Zinkbindungsdomäne und kann die \blacktriangleright Motilität und Biofilmbildung bei *P. aeruginosa* hemmen. Des Weiteren zeigt QsdR1 einen Einfluss auf die kompetitive Besiedlung der Wurzeln in der Rhizosphäre von Klee- und Erbsepflanzen (*Vigna unguiculata*), was auf die Bedeutung von QS für die Wirtsinfektion hindeutet [12].

Kurze Zeit nach der Identifizierung von AiiA wurde ein *Variovorax paradoxus*-Stamm identifiziert, der in der Lage ist, AHL-Moleküle als einzige Energie- und Stickstoffquelle zu nutzen. Das Enzym, das für die Umsetzung verantwortlich ist, ist eine Acylase. AHL-Acylasen spalten AI-Signale an der Amidbindung und setzen die Fettsäure und

ABB. 4 | FUNKTIONSWEISE VON QUORUM-QUENCHING-ENZYMEN



a) Identifizierung von QQ-Enzymen mit Hilfe des Reporterstamms *C. violaceum* CV026. Durch Zugabe von Signalmolekülen wie C6-HSL bildet CV026 einen violetten Farbstoff (Violacein). Wird das Signalmolekül jedoch durch ein QQ-Enzym abgebaut, kann die Violaceinsynthese nicht mehr erfolgen. b) Funktionsweise der unterschiedlichen QQ-Enzyme. Abb. 4a modifiziert nach [16].

den Homoserinlaktoneinring frei. Während die Laktonase-Reaktion in saurer pH-Lösung zur Bildung von AHL umgekehrt werden kann, können die Acylaseprodukte nicht zu funktionellen AHLs regenerieren. Darüber hinaus kann die durch die AHL-Acylase produzierte Fettsäure schnell metabolisiert und das Homoserinlaktoneinring als Stickstoffquelle verwendet werden [13]. In vielen Organismen wie *P. aeruginosa*, *Ralstonia*-Stämmen und *Streptomyces*-Arten wurden weitere AHL-Acylasen gefunden. Auch wenn die AHL-Acylasen strukturell viele Ähnlichkeiten zueinander aufweisen, unterscheiden sie sich doch hinsichtlich ihres Substratspektrums. Während PvdQ aus *P. aeruginosa* und AiiM aus *Streptomyces* sp. keine oder nur sehr geringe Aktivität gegenüber AHLs mit Acylketten kürzer als acht Kohlenstoffatome aufweisen, baut AiiD aus *Ralstonia* sp. effektiv langkettige AHLs und auch kurzkettige AHLs ab, wenn auch mit geringerer Effizienz.

AHL-Oxidoreduktasen modifizieren die 3-Oxo-Gruppe der AHLs und erzeugen entsprechende 3-Hydroxyderivate. Durch diese Modifikation werden die AHL-Signale nicht zerstört; es ändert sich nur die Effizienz, mit der das Signalmolekül von seinem kognitiven Rezeptor erkannt wird.

GLOSSAR

Agonist: Molekül, das durch die Besetzung eines Rezeptors die Signaltransduktion in der zugehörigen Zelle aktiviert. Ein Agonist kann sowohl eine zelleigene Substanz sein, als auch eine nicht-zelleigene Verbindung, die einen bestimmten Signalstoff in seiner Wirkung imitiert bzw. ersetzt.

Aminoacyl-tRNA-Synthetasen: Enzyme, die die tRNA (Transfer-RNA) mit der entsprechenden Aminosäure beladen, wodurch Aminoacyl-tRNA entsteht. Der Prozess erfolgt in zwei Schritten. Zunächst wird die Aminosäure unter ATP-Verbrauch zu Aminoacyl-AMP aktiviert. Im nächsten Schritt findet die Übertragung auf die tRNA statt. Für die unterschiedlichen Aminosäuren gibt es jeweils eine spezifische Aminoacyl-tRNA-Synthetase.

Antagonist: Molekül, das an einen Rezeptor bindet und die Bindung der natürlich vorkommenden Liganden somit blockiert, wodurch die daraus resultierenden Effekte aufgehoben werden.

Autoinducer: Signalmoleküle, die als Reaktion auf Änderungen in der Populationsdichte von den Zellen produziert werden. Mit zunehmender Dichte der Bakterienzellen steigt auch die Konzentration des Autoinducers. Dies führt wiederum zur Expression bestimmter Zielgene.

Motilität: Beschreibt die Bewegungsfähigkeit von Organismen und Zellorganellen.

Schwärmen: Bezeichnet die gemeinschaftliche Bewegung von Zellen auf Oberflächen. Es dient der Ausbreitung und der Nutzbarmachung von Nährstoffquellen in der Umgebung.

Signaltransduktion: Prozess, bei dem ein äußeres Signal von der Zelle wahrgenommen und in das Zellinnere weitergeleitet wird. Auf diesem Weg kommt es zur Umwandlung des Signals und zur Auslösung einer Zellantwort.

Transkriptionsfaktor: Protein oder Molekül, das für die Initiation der RNA-Polymerase bei der Transkription von Bedeutung ist. Transkriptionsfaktoren können an Proteine oder direkt an die DNA binden und so den Promotor aktivieren oder reprimieren.

Virulenzfaktor: Stoffwechselprodukt oder Strukturelement, das die krankmachende Wirkung von Mikroorganismen hervorruft.

Zinkbindungsdomäne: Als Zinkbindungsdomäne wird in einem Protein eine bestimmte Aminosäureanordnung bezeichnet, die die Bindung von Zinkionen ermöglicht. Metalloenzyme wie die Laktanasen benötigen die Bindung dieser Ionen für ihre katalytische Aktivität. Das Zinkbindemotiv der Laktanasen wird im Einbuchstaben-Aminosäurecode als HXHXDH angegeben. Das H steht für die Aminosäure Histidin und das D für Asparaginsäure. Die Stellen, die durch ein X markiert sind, können von unterschiedlichen Aminosäuren besetzt werden.

Zweikomponentensystem: Wichtiges System, das der Wahrnehmung und Übertragung von Umweltreizen bei Bakterien dient. Es besteht aus zwei Komponenten, der Sensorikine und dem Antwortregulator. Die Sensorikine liegt in der Zellmembran und nimmt den Umweltreiz wahr. Sie leitet den Reiz an den Antwortregulator weiter, der dadurch aktiviert wird. Der Regulator kann nun an Zielpromotoren binden und dadurch eine Reaktion der Zelle auslösen.

BpiB09 ist eine Oxidoreduktase, die die Reduktion von 3-Oxo-HSL zu 3-Hydroxy-HSL katalysiert. Wird das entsprechende Gen für dieses Enzym in *P. aeruginosa* exprimiert, so führt dies zu einer geringeren Produktion von Pyocyanin und zu einer verringerten Motilität und Biofilmbildung [14]. In einer Metagenombank konnte ebenfalls ein Enzym (QQ-2) identifiziert werden, das hohe Ähnlichkeit zu Oxidoreduktasen zeigt. QQ-2 scheint AHL und AI-2-Signalmoleküle zu QS-inaktiven Hydroxyderivaten zu reduzieren. Immobilisiert auf Glasoberflächen hemmt QQ-2 wirksam die Biofilmbildung des Krankheitserregers *Klebsiella oxytoca* sowie von klinischen *K. pneumoniae*-Isolaten aus Patienten mit Harnwegsinfektionen [15].

Angesichts steigender Fälle von im Krankenhaus erworbenen bakteriellen Infektionen und der globalen Prävalenz bakterieller Resistenzen ist die Erforschung neuer Wege zur Bekämpfung bakterieller Infektionen von entscheidender Bedeutung. Der selektive evolutionäre Druck, der durch die Wirkungsweise herkömmlicher Antibiotika auf Bakterien ausgeübt wird, hat zu einem Anstieg und der Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen geführt. Neue therapeutische Ansätze zur Bekämpfung bakterieller Infektionen und Resistenzen sind daher erforderlich. Das Quorum Quenching stellt langfristig vermutlich eine sehr gute Alternative zu den bekannten Antibiotikawirkstoffen dar, um mikrobielles Wachstum zu regulieren. Dabei hat es den Vorteil, dass es eben nicht die Zellen tötet, sondern sehr spezifisch in deren Wachstums- und Infektionsprozesse eingreift und diese überschreibt. Vor diesem Hintergrund kann man davon ausgehen, dass QS-spezifische Wirkstoffe grundsätzlich deutlich weniger Nebenwirkungen aufweisen als Antibiotika. Bis diese Wirkstoffe zur Bekämpfung von mikrobiellen Infektionen zum Einsatz gelangen, ist es allerdings noch ein sehr weiter Weg.

Zusammenfassung

Bakterien sind in der Lage, ihre Artgenossen in der Umgebung über unterschiedliche Signalmoleküle wahrzunehmen und über bestimmte Signalwege auf steigendes Zellwachstum gemeinschaftlich zu reagieren. Bezeichnet wird dieser Vorgang als Quorum Sensing und stellt ein Art bakterielle Sprache dar. Bei pathogenen Organismen führt diese Kommunikation meist zu Prozessen, die für den Wirt, wie z. B. uns Menschen, nicht wünschenswert sind. Zu diesen Prozessen gehört beispielsweise die Biofilmbildung auf Implantaten oder Kathetern, und das Anschalten von Virulenzfaktoren, die zu Lungenentzündungen und vielen weiteren Infektionskrankheiten führen. Bisher versucht man dieser Infektionen durch die Behandlung mit Antibiotika Herr zu werden. Dies führt allerdings nicht selten zur Entstehung von Antibiotikaresistenzen bei den Bakterien. In der Natur gilt jedoch: Wo es Signale gibt, gibt es auch Wege diese zu zerstören. Dieser Vorgang wird als Quorum Quenching (QQ) bezeichnet und stellt einen geeigneten Ansatz dar, um das pathogene Verhalten von Organismen ohne den Einsatz von Antibiotika zu vermindern oder gar zu verhindern.

Summary

Speech disorders in the world of microbes

Bacteria are able to sense their conspecifics in the environment via different signalling molecules and to react collectively to increasing cell growth via certain signalling pathways. This process is called Quorum Sensing and is a kind of bacterial language. In pathogenic organisms, this usually leads to processes that are not desirable for the host, such as us humans. These processes include, for example, biofilm formation on implants or catheters as well as induction of virulence factors that enable the development of pneumonia and many other infectious diseases. Until now, treatment with antibiotics has been used to try to control these infections, but this often leads to antibiotic resistance in the bacteria. In nature, however, where there are signals, there are also ways to destroy them. This process is called Quorum Quenching (QQ) and is a suitable approach to reduce or even prevent the pathogenic behaviour of organisms without the use of antibiotics.

Schlagworte:

Bakterielle Kommunikation, Quorum Sensing, Autoinducer, Signalblockade, Quorum Quenching.

Literatur

[1] K. Papenfort, B. L. Bassler (2016). Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 576–88.

[2] K. B. Xavier, B. L. Bassler (2003). LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 191–7.

[3] K. Y. Le, M. Otto (2015). Quorum-sensing regulation in staphylococci – an overview. *Front. Microbiol.* 6, 1174.

[4] M. M. Kendall, V. Sperandio (2016). What a Dinner Party! Mechanisms and Functions of Interkingdom Signaling in Host-Pathogen Associations. *mBio* 7, e01748.

[5] C. S. Kim et al. (2020). Characterization of Autoinducer-3 Structure and Biosynthesis in *E. coli*. *ACS Cent. Sci.* 6, 197–206.

[6] C. Grandclement et al. (2016). Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiol. Rev.* 40, 86–116.

[7] J. E. Paczkowski et al. (2017). Flavonoids Suppress *Pseudomonas aeruginosa* Virulence through Allosteric Inhibition of Quorum-sensing Receptors. *J. Biol. Chem.* 292, 4064–4076.

[8] B. Almohaywi et al. (2019). Dihydropyrrones as bacterial quorum sensing inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 29, 1054–1059.

[9] R. P. Singh et al. (2015). Rationale design of quorum-quenching peptides that target the VirSR system of *Clostridium perfringens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 362, fnv188.

[10] Y. H. Dong et al. (2000). AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 3526–31.

[11] G. F. Kaufmann et al. (2005). Revisiting quorum sensing: Discovery of additional chemical and biological functions for 3-oxo-N-acyl-homoserine lactones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 309–14.

[12] D. Krysciak et al. (2011). Involvement of multiple loci in quorum quenching of autoinducer I molecules in the nitrogen-fixing symbiont *Rhizobium (Sinorhizobium)* sp. strain NGR234. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5089–99.

[13] S. Fetzner (2015). Quorum quenching enzymes. *J. Biotechnol.* 201, 2–14.

[14] P. Bijtenhoorn et al. (2011). A novel metagenomic short-chain dehydrogenase/reductase attenuates *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence on *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 6, e26278.

[15] N. Weiland-Brauer et al. (2016) Highly Effective Inhibition of Biofilm Formation by the First Metagenome-Derived AI-2 Quenching Enzyme. *Front. Microbiol.* 7, 1098.

[16] M. J. Valera et al. (2016). GqqA, a novel protein in *Komagataeibacter europaeus* involved in bacterial quorum quenching and cellulose formation. *Microbial Cell Factories.* 15(1).

Die Autor*innen



©UHH, RRZ-MCC, Mentz

Christel Vollstedt, Jahrgang 1974, Studium der Biologie und Promotion im Fach Mikrobiologie (2005) an der Georg-August-Universität in Göttingen. Anschließend Postdoktorandin an der Georg-August-Universität in Göttingen und der Universität Duisburg mit Forschungsschwerpunkten in der Genomanalyse. Seit 2006 wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung für Mikrobiologie und Biotechnologie an der Universität Hamburg. Forschungsschwerpunkte sind die Zell-Zell-Kommunikation bei Bakterien sowie die Bildung mikrobieller Biofilme.



©UHH, RRZ-MCC, Mentz

Wolfgang R. Streit, Jahrgang 1964, Studium der Biologie und Promotion im Fach Mikrobiologie (1993) an der Philipps-Universität Marburg. 1994 Postdoc an der Philipps-Universität Marburg und von 1995 bis 1997 an der University of California, Davis (USA). Im Zeitraum von 1997 bis 1998 forschte er an der Universität Bielefeld und leitete im Anschluss bis 2004 eine Arbeitsgruppe an der Georg-August-Universität Göttingen am Institut für Mikrobiologie und Genetik, wo er im Juli 2002 im Fach Mikrobiologie habilitierte. Von 2004 bis 2006 Professor für das Fach Enzymtechnologie an der Universität Duisburg-Essen im Fachbereich Chemie. Seit 2006 Professor für Mikrobiologie und Biotechnologie an der Universität Hamburg. Forschungsschwerpunkte sind neben der bakteriellen Zell-Zell-Kommunikation Themen der Metagenomik und der Biotechnologie.

Korrespondenz:

Prof. Dr. Wolfgang Streit
 Institut für Pflanzenwissenschaften und Mikrobiologie
 Abteilung Mikrobiologie und Biotechnologie
 Ohnhorststr. 18
 22609 Hamburg
 E-Mail: wolfgang.streit@uni-hamburg.de