

# Effect of micro-structured environments on bacterial surface motility, architecture and gene transfer in biofilms

## Zusammenfassung

Auf Grund vieler Vorteile ist das Wachstum innerhalb eines Biofilms ein vorwiegender Lebensstil von Bakterien in der Natur. Ein Biofilm setzt sich aus einer Gemeinschaft von Mikroben zusammen, die in einer Matrix aus sekretierten Polymeren eingebettet sind. Biofilme werden als Hotspots für horizontalen Gentransfer und die Entwicklung von Multiresistenzen angesehen. Die Nähe zu Nachbarzellen erleichtert vermutlich Gentransfer und Adaption. Viele Bakterienarten, einschließlich des menschlichen Pathogens *Neisseria gonorrhoeae*, bilden Biofilme auf abiotischen und biotischen Oberflächen. Insbesondere *N. gonorrhoeae* besitzt eine natürliche Kompetenz zur Aufnahme von DNA und zeigt eine Biofilmmatrix mit großen Mengen an extrazellulärer DNA, welche in vielen bakteriellen Biofilmen eine wichtige strukturelle Komponente bildet. Jedoch ist nicht bekannt, inwieweit extrazelluläre DNA zum Gentransfer in Biofilmen beiträgt, mit welchen Raten Gene getauscht werden oder welche Faktoren diesen Austausch beeinflussen.

Im ersten Teil dieser Dissertation, habe ich die räumliche und zeitliche Dynamik des Transfers von Genen für Multiresistenzen, innerhalb von Biofilmen des menschlichen Pathogens *N. gonorrhoeae* untersucht. Dafür haben wir einen Versuch entwickelt, mit dem direkt die Entwicklung von Doppelresistenzen durch Gentransfer zwischen zwei Gonokokken-Stämmen unterschiedlicher Einzelresistenz visualisiert werden kann. Wir konnten zeigen, dass Gentransfer durch Transformation in verschiedenen Stufen der Biofilmentwicklung effizient ist, jedoch die Rate des Gentransfers nach 24 h deutlich sinkt. Weiterhin wurde gezeigt, dass antigenische Variation des Typ IV Pilus den Anteil an Transformanten in jungen Biofilmen reduziert. Außerdem haben wir den Einfluss von Oberflächen Strukturierung auf die Biofilmbildung und die Rolle der Biofilm-Architektur in Bezug auf die Rate der Genausbreitung in *N. gonorrhoeae* mittels Mikrotopographien untersucht. Die Mikrostrukturierung der adhärenen Oberfläche beeinflusste die Architektur des Biofilms, welcher reduzierte Biomasse und eine erhöhte Rauheit

aufzeigte. Die Rate des Gentransfers blieb unabhängig von der Architektur des Biofilms, jedoch wurde die Ausbreitung von doppelresistenten Klonen stark beeinflusst. Unter selektivem Druck auf dichte Biofilme mittels Antibiotikakonzentrationen in Höhe ihrer MIC, hatten doppelresistente Bakterien keinen signifikanten Wachstumsvorteil. In lockeren Biofilmen unter gleichen Antibiotika Bedingungen, war die Ausbreitung von doppelresistenten Klonen prominent. Daraus schließen wir, dass Multiresistenzen sich rasch in Gonokokken-Biofilmen durch horizontalen Gentransfer bilden, jedoch die Ausbreitung von multiresistenten Klonen in dichten Biofilmen wesentlich unterdrückt wird.

Sich hin zu günstigeren Umgebungen zu bewegen, ist eine essentielle Eigenschaft für Bakterien. Das Verlängern und Einziehen von Typ IV Pili vermittelt eine Form der Bewegung, die als *twiching motility* bezeichnet wird und auch die Biofilmbildung beeinflusst. Die Dynamik des T4P und *twiching motility* werden durch Sauerstoffverfügbarkeit und zellulären Energieschwund reguliert. Im zweiten Teil dieser Dissertation haben wir einen Gonokokken-Stamm entwickelt und kalibriert, welcher das ratiometrische Protein *pHluorin* exprimiert, ein Derivat des grün-fluoreszente Proteins (GFP). Diese Arbeit war Teil einer Studie zum Effekt des elektrochemischen Protonengradienten auf Gonokokken-Motilität. Die Messungen des inneren pH bei unterschiedlichen äußeren pH Bedingungen zeigten, dass Homöostase in *N. gonorrhoeae* erstaunlich schwach im Vergleich zu anderen bakteriellen Arten wirkt.

Die natürliche Umgebung von Bakterien ist nicht flach und homogen, sondern besteht aus komplexen, heterogenen Substraten. Um einen Einblick in Kontrollmechanismen der bakteriellen Motilität zu erhalten, ist es sinnvoll zu untersuchen, wie Bakterien ihre Umgebung spüren und sich in beengenden, heterogenen Geometrien verhalten. T4P-abhängige Bewegung wird auch vom stäbchenförmigen Bakterium *Myxococcus xanthus* gezeigt. Im dritten Teil dieser Dissertation haben wir die Motilität von *M. xanthus* untersucht und fanden heraus, dass Rillen, in Größe vergleichbar zu den Bakterien, es in seiner Bewegung begrenzen. Die Bewegung von *M. xanthus* in den Rillen erwies sich als effizienter als auf flacher Oberfläche. Das motile Verhalten von *M. xanthus* auf strukturierten Oberflächen deutet an, dass Bakterien die Topographie einer Oberfläche spüren können und ihre Bewegung durch mikroskopische Erhöhungen gelenkt wird.

Zusammengefasst konnten wir zeigen, dass Oberflächentopographien die Typ IV Pilus abhängige Bewegung, die Biofilm Architektur und Populationsdynamiken bestimmen. Es bleibt von

Interesse den molekularen Mechanismus zu bestimmen, der die Biofilmbildung und seine Interaktion reguliert, einschließlich des Gentransfers, was Strategien zum Lösen von Problemen zur Biofilmbildung liefern könnte.