

**Untersuchungen zum Einfluß der
Pathogenitätsinseln I₅₃₆ und II₅₃₆
auf die Genexpression
des uropathogenen
Escherichia coli Stammes 536.**

Dissertation zur Erlangung
des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Katharine Piechaczek
aus Klosterbruch

Würzburg, 2001

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzende:

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Hacker
2. Gutachter: Prof. Dr. R. Gross

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Diese Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Des weiteren erkläre ich, daß ich früher weder akademische Grade erworben noch zu erwerben versucht habe.

Würzburg im Juni 2001

Katharine Piechaczek

Für meine Familie

Die Experimente zur vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von Februar 1997 bis Dezember 2000 am Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. J. Hacker für die gute wissenschaftliche Zusammenarbeit und ständige Diskussionsbereitschaft sowie die Möglichkeit zum selbständigen Experimentieren bedanken.

Bei Prof. Dr. M. Hecker und S. Gertz vom Institut für Mikrobiologie in Greiswald möchte ich mich herzlich bedanken für die Einführung in die Welt der 2 D-Gele. Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. M. Hecker bedanken, daß er mir im seinem Labor die Möglichkeit zur Auswertung meiner Gele mit dem Melanie Programm gegeben hat.

Bei Prof. Dr. G. Fischer vom Max-Planck-Institut und Dr. A. Schierhorn vom Biochemischen Institut in Halle möchte ich mich für die Zusammenarbeit bedanken. Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. A. Schierhorn für die Durchführung der MALDI-TOF-MS Analysen sowie für das freundschaftliche Arbeitsverhältnis und für die lehrreiche Zeit, die ich in ihrem Labor verbringen konnte bedanken.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Molekulare Infektionsbiologie sowie des Zentrums für Infektionsforschung bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und die vielen hilfreichen Anregungen und Diskussionen. Dr. Salam Khan danke ich für die Überlassung von S- und Prf-Fimbrien Antikörpern. Weiterhin danke ich allen, die beim Korrekturlesen dieser Arbeit beteiligt waren. Es war bestimmt nicht immer leicht meine „der, die, das“ Fehler zu ertragen. Bei Claudia Dietrich, Stephanie Theiß, Dagmar Kapfhammer und Rolf Köhler möchte ich mich besonders herzlich bedanken, daß sie sich immer alles geduldig angehört haben. Ohne sie wären die letzten zwei Jahre viel schwerer für mich gewesen. Mein Dank gilt auch Britta Janke, Ulrich Dobrindt und Knut Ohlsen die mir am Anfang der Doktorarbeit immer hilfreich zur Seite gestanden haben. Für die gute Atmosphäre in der *E. coli*- Arbeitsgruppe möchte ich mich bei Gudrun Balling, Barbara Middendorf und Sibylle Oswald bedanken.

Ganz zum Schluß bedanke ich mich noch herzlich bei meinen Eltern und Arek, daß sie mir mein Studium ermöglicht und mich während der Zeit in Würzburg immer mit voller Kraft unterstützt haben.

I ZUSAMMENFASSUNG	1
II SUMMARY	4
III EINLEITUNG	7
1 Virulenz-assoziierte Gene von extraintestinalen <i>Escherichia coli</i>	8
2 Regulation der Expression virulenz-assoziiierter Gene	11
3 Der uropathogene <i>E.coli</i> Stamm 536	15
4 Genom- und Proteomforschung	16
IV MATERIAL UND METHODEN	27
1 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide	28
1.1 Bakterienstämme	28
1.2 Plasmide	29
2 Oligonukleotide	30
3 Chemikalien	31
4 Geräte und Sonstiges	32
5 Medien und Nährböden	33
6 Antikörper	36
7 Puffer und Lösungen	36
8 Größenmarker	36
9 Methoden	38
9.1 Schnellysat-Methode mit Diatomeen-Erde (Boom et al., 1990)	38
9.2 Quiagen Midi-Präparation	39
9.3 Phenolisieren von Plasmid-DNA	41
9.4 Alkoholische Fällung von DNA	41
9.5 „Polymerase Chain Reaktion“ (PCR; Saiki et al., 1988)	42
9.6 Isolierung chromosomaler DNA (Grimberg et al., 1989)	43
9.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	43
9.8 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	44
9.9 Horizontale Gelelektrophorese	44
9.10 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (Gene Clean-Kit, Dianova)	45
9.11 Ligation von DNA-Fragmenten	45
9.12 Klonierung von PCR-Fragmenten (Sure-Clone-Kit, Pharmacia)	45
9.13 Herstellung kompetenter Bakterienzellen	46
CaCl ₂ -Methode	46
Elektrokompetente <i>E. coli</i> -Zellen	46
9.14 Transformation von Bakterienzellen	47
CaCl ₂ -kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	47
Elektroporation von <i>E. coli</i>	47
9.15 Bakterielle Konjugation	47
9.16 Southern-Blot mit dem VakuGene Blotter (Pharmacia)	48
9.17 Nicht-radioaktive DNA-Markierung und Hybridisierung von DNA (ECL-Kit, Amersham)	48
9.18 DNA-Sequenzierung	49
9.19 Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität (Miller, 1972)	50
9.20 Die zweidimensionale Gelelektrophorese	51

9.20.1 Probenvorbereitung.....	52
9.20.2 Rehydratisierung und Probenauftrag durch In-Gel Rehydratisierung	53
9.20.3 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung.....	54
9.20.5 Aufbewahrung der IPG-Streifen und Äquilibration	55
9.20.6 Die zweite Dimension: Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)	56
9.21 Membranprotein-Isolierung für die Zweidimensionale Gelelektrophorese	57
9.21.1 Phosphat-Methode (O'Connor 1996)	57
9.21.2 Die Saccharose-Methode	58
9.22 Isolation extrazellulärer Proteine für die zweidimensionale Gelelektrophorese.....	59
9.23 Zellaufschluß für die zweidimensionale Gelelektrophorese	59
9.23.1 Aufschluß durch Ultraschall	59
9.23.2 Aufschluß durch das French-Press-Verfahren	60
9.24 Proteinbestimmung.....	60
9.24.1 Proteinbestimmung nach Layne (1957).....	60
9.24.2 Proteinbestimmung nach Bradford	60
9.25 Proteinnachweismethoden.....	61
9.25.1 Coomassie-Blau-Färbung	61
9.25.2 Silberfärbung, modifiziert nach Blum et al. (1987).....	61
9.26 Western-Hybridisierung (Laemmli, 1970).....	62
9.26.1 Western-Blot.....	62
9.26.2 Antikörperreaktion.....	63
9.27 MALDI-TOF Massenspektrometrie.....	64
9.27.1 Verdau im Gel.....	64
9.27.2 Probenvorbereitung für MALDI-TOF Massenspektrometrie	64
9.27.3 MALDI-TOF Massenspektrometrie	64
9.27.4 Auswertung der Spektren.....	64
9.28 Qualitative Agglutination.....	65
Antikörperagglutinationstest.....	65
Hefeagglutinationstest (Ørskov and Ørskov, 1983).....	65
9.29 Nachweis der Hämolysinproduktion.....	65
9.30 Nachweis der Enterobaktinproduktion.....	65
9.31 Nachweis der Flagelleproduktion.....	66
9.32 Nachweis der Serumresistenz.....	66
9.33 Bestimmung der minimalen Inhibitionskonzentration (MIC) der kationischen antimikrobiellen Peptide (Steinberg et al., 1997).....	66
V ERGEBNISSE.....	68
1 Proteomanalyse des uropathogenen Stammes <i>E. coli</i> 536	69
1.1 2-D Analyse des Proteinexpressionsmusters des <i>E. coli</i> Stammes 536 und seiner Derivate nach radioaktiver Markierung der Proteine.....	70
1.2 Analytische und präparative zweidimensionale Gelelektrophorese.....	74
1.2.1 Analyse von Gesamtzellextrakten-Analytische 2 D Gele.....	74
1.2.2 Analyse von Gesamtzellextrakten-Präparative 2-D Gele	76
Protein Name	80
1.2.4 Einfluß der Pathogenitätsinseln I und II sowie der tRNA _{5^{Leu}} auf die Proteinexpression des <i>E. coli</i> Stammes 536	82
1.3 Einfluß der Pathogenitätsinseln I und II sowie der tRNA _{5^{Leu}} auf die Expression von extrazellulären Proteinen.....	83

2 Einfluß von <i>leuX</i> und PAI _{I536} /PAI _{II536} auf das Membranproteinmuster des uropathogenen <i>E. coli</i> Stammes 536	86
2.1 Eindimensionale Analyse der Expression von äußeren Membranproteinen des <i>E. coli</i> Stammes 536	86
2.2 Untersuchungen des Einflusses der PAI _{I536} /PAI _{II536} und der tRNA _{5^{Leu}} auf die OmpT-Expression beim <i>E. coli</i> Stamm 536	88
2.3 Zweidimensionale Analyse der Expression von äußeren Membranproteinen des <i>E. coli</i> Stammes 536	89
2.3.1 Membranprotein-Isolierung für die Zweidimensionale Gelelektrophorese – Phosphat-Methode	89
2.3.2 Membranproteinisolierung für die zweidimensionale Gelelektrophorese – Saccharose-Methode	94
3 Einfluß des <i>ygaG</i> -Gens auf die Genexpression des <i>E. coli</i> Stammes 536	97
3.1 Identifizierung des <i>ygaG</i> -Gens.....	97
3.2 Konstruktion einer <i>ygaG</i> -Mutante im <i>E. coli</i> Stamm 536	98
3.3 Charakterisierung des <i>ygaG</i> -negativen <i>E. coli</i> Stammes 536Δ <i>ygaG</i>	103
4 Einfluß der <i>leuX</i> -kodierten tRNA _{5^{Leu}} auf die Transkription von Typ 1-Fimbrien	107
4.1 Klonierung der „upstream“- und „downstream“-Bereiche des <i>fimB</i> - und <i>fimE</i> -Gens sowie Fusion mit dem promotorlosen Gen der β-Galaktosidase.....	107
4.2 Integration der Reportergenfusion in das Chromosom von β-Galaktosidase-negativen Derivaten des <i>E. coli</i> Stammes 536.....	108
4.3 Untersuchung des Einflusses von Umweltfaktoren auf die <i>fimB</i> - und <i>fimE</i> -Promotoraktivität in dem <i>E. coli</i> Stamm 536 und seinem <i>leuX</i> -negativen Derivat 536Δ102	110
4.3.1 Einfluß des Nährmediums auf die Regulation der <i>fimB</i> - und <i>fimE</i> -Transkription ..	110
4.3.2 Einfluß der Temperatur auf die Regulation der <i>fimB</i> - und <i>fimE</i> -Transkription.....	111
VI DISKUSSION	114
Die Proteomanalyse des uropathogenen Stammes <i>E. coli</i> 536.....	115
1 Pathogenitätsinsel I ₅₃₆ - und II ₅₃₆ -abhängige Proteine des <i>E. coli</i> Stammes 536.....	116
2 <i>leuX</i> -abhängige Proteine des <i>E. coli</i> Stammes 536	118
VII LITERATUR	134
VIII ANHANG	148
1 Restriktionskarten der in dieser Arbeit konstruierten Plasmide	149
2 Zusammenfassung der Unterschiede in der Proteinexpression bei dem <i>E. coli</i> Stamm 536 und seinen Derivaten.	155
3 Abkürzungen	159
4 Publikationen	161
4.1 Originalarbeiten.....	161
4.2 Übersichtsarbeiten.....	161
4.3 Tagungsbeiträge	161
5 Lebenslauf	163

I

Zusammenfassung

Escherichia coli wird als der häufigste Erreger von Harnwegsinfektionen des Menschen beschrieben. Um die Krankheit auslösen zu können, benötigen die Bakterien ganz bestimmte Eigenschaften, die als Virulenzfaktoren bezeichnet werden und durch die sie sich von apathogenen Stämmen unterscheiden. Der uropathogene *E. coli* Stamm 536 (O6:K15:H31) exprimiert verschiedene Virulenzfaktoren wie α -Hämolysin, die Adhäsine S-, P-related (Prf) und Typ 1-Fimbrien sowie das Kapselantigen K15. Außerdem wurden auch Enterobaktin- und Yersiniabaktin-Produktion sowie Serumresistenz nachgewiesen. Die Ausprägung der Virulenz hängt unter anderem mit dem Vorhandensein von Pathogenitätsinseln (PAI I₅₃₆-V₅₃₆) zusammen, die mit seltenen tRNA-Genen assoziiert sind. Die Deletion der Inseln PAI I₅₃₆ und PAI II₅₃₆ führt zum Verlust der Virulenz und zur Zerstörung der entsprechenden tRNA Gene. Es wurde festgestellt, daß die *leuX*-kodierte tRNA_{5^{Leu}}, die mit der PAI II₅₃₆ assoziiert ist, einen Einfluß auf die Expression von Typ 1-Fimbrien sowie auf die Serumresistenz, Motilität und die Enterobaktin- und α -Hämolysin-Produktion hat.

Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Bedeutung der *leuX*-kodierten tRNA_{5^{Leu}} und der Pathogenitätsinseln I₅₃₆ und II₅₃₆ für die Expression von Proteinen sowie Typ 1-Fimbrien bei dem *E. coli* Stamm 536.

Dazu wurde zunächst eine Proteomanalyse durchgeführt. Mit der Hilfe von 2D-Gelen wurde der Einfluß von *leuX*-kodierten tRNA_{5^{Leu}} und PAI I₅₃₆ und PAI II₅₃₆ auf die Expression verschiedener Proteine im *E. coli* Stamm 536 (PAI I₅₃₆⁺, PAI II₅₃₆⁺, *leuX*⁺) und seinen Mutanten: 536-21 (PAI I₅₃₆⁻, PAI II₅₃₆⁻, *leuX*⁻), 536 Δ 102 (PAI I₅₃₆⁺, PAI II₅₃₆⁺, *leuX*⁻) und 536R3 (PAI I₅₃₆⁻, PAI II₅₃₆⁻, *leuX*⁺) untersucht. Mit Hilfe von präparativen Gelen konnten in den zytosolischen Fraktionen 39 Unterschiede in der Expression von Proteinen nachgewiesen werden. Von diesen differentiell exprimierten Proteinen wurden 37 mit Hilfe von MALDI-TOF-MS identifiziert. Die zwei weiteren Proteine konnten nicht identifiziert werden. Es handelt sich wahrscheinlich um Proteine die für den *E. coli* Stamm 536 spezifisch sind. Von den 37 Proteinen gehören acht zu Proteinen, die in die Aminosäurebiosynthese involviert sind, vier Proteine spielen eine Rolle beim Eisentransport, drei sind periplasmatische Bindeproteine, die Komponenten verschiedener ABC-Transporter sind. Außerdem wurden Proteine mit bisher unbekannt Funktionen gefunden. In den Kulturüberstandsfraktionen der untersuchten Stämme konnten drei Unterschiede in der Expression von Proteine nachgewiesen werden. Zwei Proteine wurden mit Hilfe von MALDI-TOF-MS identifiziert. Es handelt sich um das Flagellin FliC und das OsmY-Protein.

Außerdem wurde der Einfluß der *leuX*-kodierte tRNA₅^{Leu} auf die Expression der Membranproteine der jeweiligen Stämme untersucht. Zu diesem Zwecke wurden sowohl ein- wie auch zweidimensionale Gele durchgeführt. Mit Hilfe von eindimensionaler Gelelektrophorese konnten nur bei Anzucht der untersuchten Bakterien im LB-Medium mit 50 % Humanserum Unterschiede in der Expression der Proteine detektiert werden. Die Proteine wurden aber nicht identifiziert. Ein Effekt der tRNA₅^{Leu} auf die Expression der OmpT-Protease konnte mittels „Western Blot“ ausgeschlossen werden. Mit Hilfe von zweidimensionalen Gelen konnten zwischen den untersuchten Stämmen mehrere Unterschiede in der Expression von Proteinen festgestellt werden. Dabei konnten vier Unterschiede in der Proteinexpression detektiert werden. Bei diesen Proteinen handelt es sich um das OmpA-Protein, das Flagellin FliC und die ATP-Synthase. Ein Protein konnte nicht zugeordnet werden. Alle Proteine, die mittels 2 D-Gelelektrophorese gefunden wurden, zeigten eine *leuX*-Abhängigkeit. Alle MALDI-TOF-MS Analysen wurden in Kooperation mit Prof. G. Fischer und Dr. A. Schierhorn in Halle durchgeführt.

Mit Hilfe der 2 D-Gelelektrophorese wurde ein *leuX*-abhängiges Protein (YgaG), das ein Analogon des LuxS-Proteins ist, gefunden. Das LuxS-Protein ist ein Bestandteil des „Quorum sensing“-Systems von *Vibrio harveyi* und wird in ähnlicher Form bei vielen Bakterien beschrieben. Sein Einfluß auf die Pathogenität wurde bei vielen Bakterien beschrieben. Aus diesem Grund wurde eine *ygaG*-Mutante im *E. coli* Stamm 536 hergestellt. Anschließend wurde der Einfluß des YgaG-Proteins auf die Expression von Virulenzfaktoren überprüft und ein Proteomvergleich zwischen dem Wildtyp Stamm *E. coli* 536 und der *ygaG*-Mutante wurde durchgeführt. Es konnten Unterschiede in der Expression kleiner Proteine im pH-Bereich von 4 bis 5 detektiert werden. Ob jedoch das YgaG-Protein einen Einfluß auf die Virulenz des Stammes *E. coli* 536 ist unklar. Die Expression der bekannten Virulenzfaktoren wurde von YgaG nicht beeinflusst.

Weiterhin wurden Transkriptionsfusionen zwischen den Promotoren der *fimB*- und *fimE*-Gene mit dem promotorlosen β -Galaktosidase-Gen (*lacZ*) konstruiert. Es sollte damit die Frage beantwortet werden, ob die *leuX*-kodierte tRNA₅^{Leu} als potentieller Regulator die Transkription von Typ 1-Fimbrien beeinflusst. Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Transkription von *fimB* und *fimE* zwischen dem Wildtyp Stamm 536 und der *leuX*-Mutante 536 Δ 102 festgestellt werden.

II

Summary

Escherichia coli is one of the common causes of urinary tract infections. Pathogenic *E. coli* differ from non-pathogenic *E. coli* variants by the presence of certain virulence factors which contribute to their ability to cause disease. The uropathogenic *E. coli* strain 536 (O6:K15:H31) is able to produce different virulence factors such as α -hemolysin, fimbrial adhesins (P-, type 1 and S-fimbriae) and specific capsules. Furthermore the bacteria produce iron uptake systems like enterobactin and yersiniabactin and have the capacity to survive in human serum. The development of pathogenicity is connected to pathogenicity islands (PAI I₅₃₆-V₅₃₆). All four PAIs are associated with tRNA genes. The deletion of PAI I₅₃₆ and PAI II₅₃₆ results in the truncation of the associated tRNA gene and loss of virulence. The deletion of PAI II₅₃₆ results in the truncation of the *leuX* gene. PAI II₅₃₆ as well as *leuX* deletion mutants show a reduced production of type 1 fimbriae, flagellae and of the iron uptake system enterobactin. Furthermore, they show delayed hemolysin production and a reduced serum resistance. Additionally, the *leuX*-encoded tRNA_{5^{Leu}} may also regulate the expression of various other genes.

The aim of this work was the further characterization and analysis of the role of PAI I₅₃₆/II₅₃₆ and of the tRNA_{5^{Leu}} for protein expression as well as for the regulation and expression of two site-specific recombinases, FimB and FimE, of the *E. coli* strain 536.

Firstly, the protein expression patterns of *E. coli* 536 and different derivatives were studied. Differences in the protein expression pattern of the wild-type strain *E. coli* 536, its mutants 536-21 (PAI I₅₃₆⁻, PAI II₅₃₆⁻, *leuX*⁻), 536 Δ 102 (PAI I₅₃₆⁺, PAI II₅₃₆⁺, *leuX*⁻) and strain 536R3 (PAI I₅₃₆⁻, PAI II₅₃₆⁻, *leuX*⁺) were analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. With the help of preparative 2 D-gel electrophoresis 39 differentially expressed intracellular proteins could be identified. The identities of 37 proteins have been determined by MALDI-TOF mass spectrometry in Halle. Two of these proteins show no matches in sequence databases. The identified proteins can be classified into different functional categories. Eight of these proteins are involved in housekeeping processes, i. e. amino acid biosynthesis. Four proteins were identified which are involved in iron uptake and three proteins are periplasmic binding proteins which are components of ABC-transporters. Additionally hypothetical and unknown proteins have also been found. The preparations of the culture supernatants resulted in 2 D proteinpatterns from which three protein spots whose expression is markedly altered in the different strains are identified. Two of them have been

identified by MALDI-TOF mass spectrometry, namely the flagellin protein (FliC) and the OsmY protein.

The influence of the tRNA₅^{Leu} on the expression of outer membrane proteins was also studied. Differences in the protein expression patterns of the wild-type strain 536 and the mutants were analyzed by one- and two-dimensional gel electrophoresis. By the application of one-dimensional gel electrophoresis it was possible to identify differences in the protein expression patterns only when the bacteria were grown in 50 % human serum. The identification of these proteins was not possible. Western blot analysis with an OmpT-specific antiserum showed no differences in the OmpT expression between the different strain tested. The analysis of 2 D protein patterns of outer membrane preparation resulted in the detection of some protein spots whose expression was altered in the different strain backgrounds. Three protein spots of interest were identified as the outer membrane protein A (OmpA), the flagellin (FliC) and the ATP synthase. The expression of all of these proteins is *leuX*-dependent.

It was identified during the proteom analysis that the expression of the YgaG protein was shown to be reduced in a *leuX*-negative background. This protein shows a strong homology to the LuxS protein of *Vibrio harveyi*. The LuxS protein is a component of the quorum sensing system. It has been shown that many bacteria express proteins similar to LuxS of *V. harveyi* and that quorum sensing may play a role in pathogenicity. To investigate whether YgaG contributes to the virulence of the *E. coli* strain 536, a *ygaG* deletion mutant was made. In addition, differences in the protein expression pattern of the wild-type strain *E. coli* 536 and the *ygaG* mutant were analyzed by 2 D gel electrophoresis. It was shown that the expression of some small proteins in the pH range from 4 to 5 can be linked to the presence or absence of the YgaG protein. Whether YgaG contributes to the virulence of the *E. coli* Strain 536 has not been investigated.

In order to get a deeper insight into the role of the tRNA₅^{Leu} as a potential regulator of the expression of the type 1-fimbriae, a transcriptional fusion between the promoter area of *fimB* and *fimE* and the *lacZ* gene lacking its own promoter was constructed. However the transcription of *fimB* and *fimE* did not show any significant differences between the wild-type strain 536 and the *leuX*-mutant 536Δ102.

III

Einleitung

1 Virulenz-assoziierte Gene von extraintestinalen *Escherichia coli*

Der deutsche Kinderarzt Theodor Escherich, der im Jahre 1885 das „Bacterium coli commune“ beschrieb, konnte nicht ahnen, daß dieses später nach ihm benannte *Escherichia coli* zum weltberühmten Modellobjekt der Molekularbiologie aufsteigen sollte. Es gibt neben den apathogenen *Escherichia coli* Stämmen auch pathogene Varianten, die verschiedene Infektionskrankheiten verursachen können. Dabei unterscheidet man Infektionen des Darmtraktes, sog. intestinale Infektionen, die u. a. von enterohämorrhagischen (EHEC), enteropathogenen (EPEC), enteroinvasiven (EIEC) und enterotoxischen (ETEC) *E. coli* Stämmen hervorgerufen werden können, von extraintestinalen Infektionen. Letztere betreffen vor allem den Urogenitaltrakt und stellen die häufigsten bakteriellen Infektionen in den westlichen Industriestaaten dar (Johnson, 1991; Donnenberg und Welch, 1996). Die entsprechenden Stämme werden als uropathogene *E. coli* Stämme (UPEC) bezeichnet und verursachen Blasenentzündung (Cystitis) oder Nierenbeckenentzündung (Pyelonephritis). Weitere extraintestinale Infektionen, die durch *E. coli* verursacht werden, sind Sepsis und Neugeborenen-Meningitis (Ørskov and Ørskov, 1985).

Alle diese pathogenen *E. coli*-Stämme exprimieren verschiedene Virulenzfaktoren und unterscheiden sich dadurch von apathogenen Stämmen. Zu diesen Faktoren gehören die Produktion von O-Antigenen und Kapseln, die Produktion von Hämolytinen, Siderophorbildung, Serumresistenz und die Expression von Adhäsinen. Sie können auf großen Plasmiden, Phagen oder aber auch chromosomal kodiert vorliegen (Mühldorfer and Hacker, 1994).

Die Adhäsine ermöglichen den ersten Schritt einer Infektion. Durch die Anheftung der Bakterien an bestimmte Wirtszellen wird die Entfernung der Keime durch Körperflüssigkeiten wie Urin oder Blut verhindert (Reid et al., 1987). Bei den Adhäsinen unterscheidet man Fimbrienadhäsine von Nicht-Fimbrienadhäsinen. Bei den Fimbrienadhäsinen handelt sich um stabförmige Organellen, die nach außen präsentiert sind. Bei Nicht-Fimbrienadhäsinen ist das Adhäsin direkt mit der Zelloberfläche assoziiert (Hacker, 1990, 1992). Die meisten pathogenen Bakterien bilden jedoch Fimbrien aus. Es sind elektronenmikroskopisch erkennbare, stabförmige Strukturen mit einer Länge bis zu 2 µm und einem Durchmesser bis zu 7 nm. Sie setzen sich zum größten Teil aus einer Vielzahl von identischen Proteinen, der Hauptstruktur-Untereinheit, zusammen. Daneben sind noch weitere

Proteine, die Neben-Untereinheiten, in die Fimbrienstruktur integriert. Die Gene für Adhärenzfaktoren liegen als "Cluster" im Genom der Bakterien vor. Die genetische Zusammensetzung von unterschiedlichen Adhäsindeterminanten ist sehr ähnlich untereinander und die entsprechenden Gene liegen häufig in derselben Reihenfolge vor. Die Gene gliedern sich in vier Bereiche. Im ersten Bereich befinden sich die regulatorischen Gene, im zweiten das Gen für die Hauptuntereinheit. Die Genprodukte im dritten Bereich sind für den Transport und den Zusammenbau der einzelnen Komponenten verantwortlich, während in der vierten Region die Gene für die Neben-Untereinheit liegen (Hacker, 1990, 1992).

Extraintestinale *E. coli* Stämme können Typ 1-, P- und S-Fimbrien exprimieren, die sich hinsichtlich ihrer Rezeptorspezifitäten unterscheiden und damit die Bindung an verschiedene Zielstrukturen ermöglichen. Die Typ 1-Fimbrien vermitteln die Bindung an Mannose-haltige Rezeptoren (Krogfelt, 1991). Da diese Bindung durch die Zugabe von Mannose hemmbar ist, spricht man auch von Mannose-sensitiver (MS) Bindung. Typ 1-Fimbrien sind sowohl unter pathogenen *E. coli* Stämmen als auch unter apathogenen Isolaten weit verbreitet. Deshalb war anfangs ihre Bedeutung für die Pathogenese umstritten. Allerdings binden Bakterien über Typ 1-Fimbrien an die Zellen der unteren Harnwege. Krogfelt und Mitarbeiter konnte *in vivo* zeigen, daß die Typ 1-Fimbrien vermehrt während der Harnwegsinfektion exprimiert werden und daß sich der Phasenvariable Promotorbereich des *fim*-Operon ständig in „on“-Position befand (Struve et al., 1999). Es wurde auch in anderen Experimenten gezeigt, daß bei den Fäkal-, Cystitis- und Pyelonephritis-Isolaten der Promotor zu einem größeren Prozentsatz in „on“-Position vorlag als in der "off"-Position (Lim et al., 1998; Guyer et al., 2001). Es wird auch beschrieben, daß die Typ 1-Fimbrien eine Invasion in Blasen-Epithelzellen vermitteln (Martinez et al., 2000; Schilling et al., 2001). Auch die Mastzellen der Blase werden über Typ 1-Fimbrien aktiviert, was wenn die Immunantwort schwach oder nicht regulierbar ist, verschiedene pathologische Konsequenzen für den Wirt haben kann (Abraham et al., 2001; Malaviya et al., 1999). Außerdem verstärken die Typ 1-Fimbrien die Entzündungsreaktionen (Connell et al., 1996). Diese Ergebnisse zeigen, daß die Expression der Typ 1-Fimbrien sehr wichtig für die Entstehung und Entwicklung der Harnwegsinfektionen ist.

Die Mehrzahl der UPEC-Stämme exprimieren P-Fimbrien, die Digalaktosidreste von Glykolipiden erkennen. Derartige Reste finden sich unter anderem auf Epithelien des Urogenitaltraktes und somit spielen P-Fimbrien bei den Infektionen in diesem Bereich eine

wichtige Rolle (Strömberg et al., 1990). S-Fimbrien erkennen α -Sialyl-(2-3)- β -Gal-haltige Strukturen auf eukaryontischen Zellen (Hacker, 1990) und scheinen eine besondere Rolle bei Sepsis und Neugeborenenmeningitis zu spielen, kommen aber auch bei Harnwegsisolaten von *E. coli* vor (Korhonen et al., 1985).

Neben den Adhäsinen exprimieren die extraintestinalen *E. coli* Stämme eine Reihe von Toxinen. Viele uropathogene Stämme können das Toxin α -Hämolyysin produzieren. Das α -Hämolyysin ist ein porenbildendes Toxin, das Erythrozyten lysieren kann. Es wirkt auch toxisch auf viele kernhaltige Zellen wie Leukozyten, Endothelzellen und Nierentubulus-Epithelzellen (Jonas et al., 1993). Die Expression von α -Hämolyysin wird auch mit einer Verbesserung der Serumresistenz in Verbindung gebracht (Siegfried et al., 1995). Das Gencluster für α -Hämolyysin ist bei den meisten menschlichen *E. coli* Isolaten chromosomal kodiert, während man bei den tierischen Isolaten das Gencluster häufig plasmidkodiert findet (Welch et al., 1981, 1983; Hacker and Hughes, 1985). Auffallend häufig findet man bei extraintestinalen Isolaten α -Hämolyysingencluster in enger Assoziation mit Fimbrienadhäsingenbereichen (Low et al., 1984; Hacker et al., 1990). Diese Kopplung könnte auf einen möglichen Selektionsvorteil im Verlauf einer Infektion hindeuten (Low et al., 1984).

Für das Wachstum von Bakterien ist Eisen essentiell. Die Konzentration an freien Fe^{3+} -Ionen im Wirtsorganismus wird sehr gering gehalten, was zu den natürlichen Abwehrmechanismen des Wirts gehört. Deswegen ist die Fähigkeit zur Bildung von Siderophoren ein weiterer wichtiger Faktor, der zur Pathogenität beiträgt. Siderophore sind niedermolekulare, wasserlösliche Verbindungen, die Eisen mit hoher Spezifität und Affinität koordinativ binden. Die meisten extraintestinalen *E. coli* Stämme produzieren das Siderophor Aerobaktin. Das Enterobaktin ist sowohl unter pathogenen als auch unter apathogenen Stämmen verbreitet (Mühldorfer and Hacker, 1994). Außerdem ist das Siderophor Yersiniabaktin bei vielen Enterobakterien verbreitet (Schubert et al., 1998).

Oberflächen (O)- und Kapsel (K)-Antigene haben ebenfalls eine Bedeutung für die Virulenz. Die Kapselantigene verhindern die Phagozytose der Bakterien und somit auch die effektive Immunabwehr des Wirtes. Zusätzlich werden K-Antigene mit der Serumresistenz in Verbindung gebracht, weil sie die Aktivierung des alternativen Weges des Komplementsystems hemmen (Ørskov and Ørskov, 1985). Auch die Oberflächen-Antigene tragen mit zur Serumresistenz bei (Burns and Hull, 1998). Für *E. coli* konnte gezeigt werden,

daß neben den K- und O-Antigenen auch das äußere Membranprotein OmpA die Serumresistenz und auch die Virulenz beeinflusst (Weiser and Gotschlich, 1991). Bei *Bordetella pertussis* wurden zwei weitere Membranproteine identifiziert, die für die Serumresistenz von Bedeutung sind (Fernandez and Weiss, 1994). Auch die Anzahl der Proteine in der Membran beeinflusst die Serumresistenz. Bei *S. typhimurium* konnte gezeigt werden, daß unabhängig von der LPS-Struktur eine größere Zahl an exprimierten Membranproteinen die Resistenz gegen die lytische Aktivität von Serum erhöht (Galdiero et al., 1990). Bei der Serumresistenz handelt sich also um ein multifaktorielles System, das von vielen unterschiedlichen Faktoren beeinflusst wird.

Als ein potentieller Virulenzfaktor wird auch die Protease OmpT, die in der äußeren Membran lokalisiert ist, angesehen. Das Vorhandensein von OmpT in klinischen Isolaten von *E. coli* deutet darauf hin, daß die Protease im Verlauf einer Urogenitalerkrankung eine Rolle spielen könnte (Webb et al., 1996). Es ist wahrscheinlich, daß OmpT die antimikrobiellen Peptide, die von den Epithelzellen des Urogenitaltraktes sekretiert werden, degradiert (Stumpe et al., 1998).

Neben den oben genannten Faktoren kann auch die Expression von Flagellen für die Virulenz von Bedeutung sein. Flagellen von *E. coli* sind in der Lage, Plasminogen zu aktivieren (Lähteenmäki et al., 1994) und könnten somit zur Pathogenität beitragen. Bei *Helicobacter pylori* und *Proteus mirabilis* wurde gezeigt, daß die Beweglichkeit mit der Virulenz der Bakterien gekoppelt ist (Allison et al., 1992; Leying et al., 1992). Auch bei *Vibrio cholerae* wurde ein Zusammenhang zwischen der Expression von Virulenzfaktoren und der Motilität gefunden (Harkey et al., 1994; Gardel und Mekalanos, 1996).

2 Regulation der Expression virulenz-assoziiierter Gene

Ein pathogener Mikroorganismus exprimiert seine Virulenzfaktoren in der Regel nicht konstitutiv, sondern sie unterliegen der strengen Kontrolle verschiedener umweltbedingter Faktoren (Gross, 1993). Die Expression wird den vorherrschenden Bedingungen angepaßt (Miller et al., 1989). Zu den Parametern, die auf die Regulation von Virulenzfaktoren Einfluß haben, gehören Temperatur, Eisenkonzentration, Osmolarität, pH und Wachstumsphase. Pathogene Bakterien nutzen einen oder mehrere dieser Faktoren, um zu identifizieren in welcher Mikroumgebung des Wirtes sie sich gerade befinden.

Für die Wahrnehmung und weitere Übertragung von extrazellulären Reizen werden unter anderem die Zwei-Komponenten-Systeme benutzt. Diese Systeme wurden in Gram-negativen Bakterien entdeckt und regulieren viele bakterielle Funktionen, einschließlich derer, die für die Pathogenität zuständig sind (Miller et al., 1989). Beispiele für Zwei-Komponenten-Systeme sind das BvgS/ BvgA in *Bordetella pertussis* (Arico et al., 1989), ToxR/ ToxS in *Vibrio cholerae* (Di Rita, 1992), PhoQ/ PhoP in *Salmonella typhimurium* (Miller et al., 1989) und EnvZ/OmpR in *Salmonella* und *E. coli* (Forst et al., 1994).

Die Regulation der Expression von Virulenzfaktoren kann auch auf der Transkriptionsebene erfolgen. In diesem Fall ist sie abhängig von der Bindung von Aktivator- bzw. Repressorproteinen an spezifische DNA-Sequenzen. Ein bekanntes Beispiel ist das *lac*-Operon, das durch den CRP/cAMP-Komplex aktiviert wird (Reznikoff et al., 1992). Ein globaler Regulator vieler Operone in *E. coli* ist das Lrp („leucine responsive regulatory protein“, Calvo and Matthews, 1994). Es aktiviert bzw. reprimiert die Expression der von ihm kontrollierten Gene (Newman et al., 1992).

Auch die DNA-Topologie gehört zu den globalen Regulationstrategien. Das Ausmaß des DNA-„Supercoilings“ wird durch die verschiedenen Umweltparameter beeinflusst, was wiederum auf die transkriptionale Aktivität der Promotoren Einfluß hat (Dorman, 1991). In *E. coli* beeinflussen IHF (integration host factor), H-NS und DNA-„Supercoiling“ die Typ 1-Fimbrien Expression (Dorman 1995). Außerdem konnte gezeigt werden, daß in *E. coli* H-NS auch an der Regulation der P- und S-Fimbrien Expression beteiligt ist (Göransson et al., 1990; Morschhäuser et al., 1993).

Ein weiterer Regulationsprozess ist die Phasenvariation. Darunter versteht man das An- und Abschalten der Expression von Virulenzgenen innerhalb einer Bakterienpopulation. Dies ermöglicht der Population, sich an die verschiedenen Bedingungen im Wirtsorganismus anzupassen. Ein bekanntes Beispiel ist die Phasenvariation der Typ 1-Fimbrien.

Diese Variabilität beruht auf der Inversion eines 314 bp DNA-Fragmentes, auf dem sich der Promotor für die Typ 1-Fimbrien Hauptuntereinheit befindet (Abb. 1).

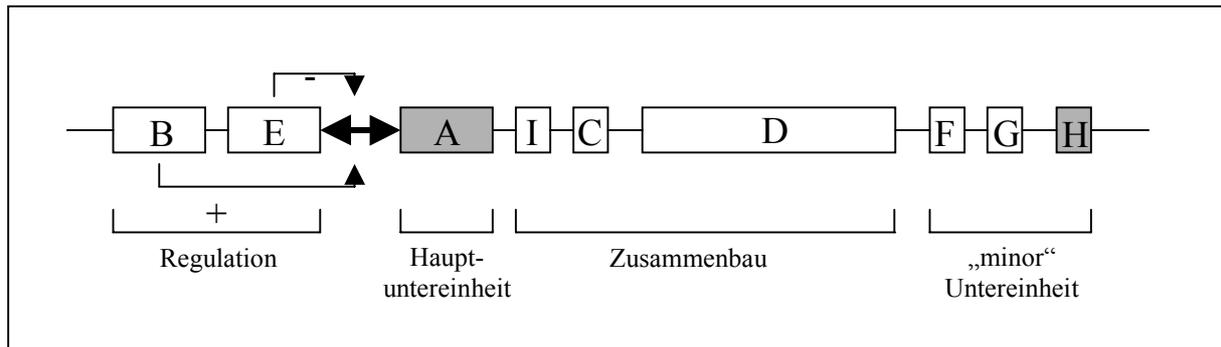


Abb. 1. Genetische Organisation der Typ 1-Fimbriendeterminante (*fim*). Die Funktionen der einzelnen Gene sind angegeben. Die Hauptstrukturuntereinheiten und das eigentliche Adhäsin sind hervorgehoben.

In Abhängigkeit von der Orientierung dieses DNA-Elementes ist die Fimbrienproduktion an- oder abgeschaltet (Abraham et al., 1985). Für die jeweilige Orientierung des Fragmentes sind zwei „site“-spezifische Rekombinasen, FimB und FimE, zuständig (Klemm, 1986). Die Rekombinase FimB bewirkt sowohl den Switch in die „on“ wie auch in die „off“-Position, während FimE nur den Switch in die „off“-Position durchführt. Die Frequenz der Phasenvariation wird von verschiedenen Umweltfaktoren beeinflusst. Zum einen wird das Mengenverhältnis der beiden Rekombinasen u.a. durch die Temperatur, die Medienzusammensetzung wie auch durch den „Supercoiling“-Grad der DNA beeinflusst. Zum anderen sind auch mindestens die drei globalen Regulatoren H-NS, IHF und LRP in die Expression der Fimbrien involviert (Eisenstein et al., 1987; Blomfield et al., 1993; Gally et al., 1994; Blomfield et al., 1997).

Die P- und S-Fimbrien unterliegen auch einer Phasenvariation. Die Expression wird ebenfalls durch Umweltsignale beeinflusst und es sind mehrere globale Regulatoren beteiligt (Göransson et al., 1990; Morschhäuser et al., 1993). Hier jedoch findet keine Umorganisation der chromosomalen Region statt, wie es bei Typ 1-Fimbrien der Fall ist, sondern der „on“- bzw. „off“-Zustand der Transkription ist von dem Methylierungszustand zweier *dam*-Methylierungsstellen stromaufwärts des Promotors abhängig.

In den letzten Jahren wurde auch eine neue Form der Regulation der Genexpression beschrieben. Hierbei handelt es sich um das sogenannte „Quorum sensing“. Die Bakterien müssen innerhalb eines Wirtes eine kritische Zelldichte erreichen, um sich effektiv zu etablieren. „Quorum sensing“ nennt man die Kontrolle der Genexpression in Abhängigkeit von der Zelldichte. Diese Art der Kontrolle kommt sowohl bei Gram-negativen wie Gram-

positiven Bakterien vor (Williams et al., 2000). Dieses Phänomen wurde zuerst bei der Regulation der Biolumineszenz bei marinen *Vibrio* Stämmen beschrieben. In diesem System werden von den Bakterien kleine Moleküle, die Acyl-Homoserinlactone (Acyl-HSL), synthetisiert und sekretiert. Diese sogenannten „Autoinducer“ induzieren beim Erreichen von entsprechenden Konzentrationen die Expression eines transkriptionalen Regulators, LuxR, welcher die Expression der Gene, die für Biolumineszenz benötigt werden, aktiviert. Außerdem wird auch die „Autoinducer“ (LuxI)-Biosynthese aktiviert. Dieses System wurde auch bei verschiedenen tier- und pflanzenpathogenen Bakterien identifiziert (Dunny and Winans 1999; Hardman et al., 1998; Swift et al., 1999a,b). Zum Beispiel existieren bei *Pseudomonas aeruginosa* zwei LuxI/R Paare (LasI/R und RhlI/R), deren Funktion die Kontrolle der Expression von Virulenzfaktoren ist (Passador et al., 1993; Ochsner et al., 1995; De Kievit et al., 1999). Zusätzlich zum LuxI/R System wurde auch noch ein anderes „Quorum sensing“-System beschrieben. Das marine Bakterium *Vibrio harveyi* synthetisiert neben dem Acyl-HSL „Autoinducer“ auch noch einen anderen Faktor, dessen Struktur unbekannt ist. Die beiden „Autoinducer“ werden durch die beiden Sensorproteine LuxN und LuxQ erkannt und das Signal wird dann weiter über LuxU an das Regulatorprotein LuxO geleitet (Bassler et al., 1994; Freeman et al., 1999a; Freeman et al., 1999b). Interessanterweise gibt es bei *Vibrio harveyi* kein LuxI/LuxR System. Der AI-1 („Autoinducer“ 1)-Synthetase wird durch die Gene *luxL* und *luxM* und AI-2 („Autoinducer“ 2)-Synthetase durch das *luxS* Gen kodiert und diese Gene zeigen keine Homologie zu der *luxI* Familie der Autoinducer-Synthetasen.

Auch bei anderen Bakterien, sowohl Gram-negativen wie Gram-positiven, wurden hochkonservierte *luxS*-homologe Gene gefunden. Zu diesen Bakterien gehören unter anderem *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus* und viele andere (Surette et al., 1999a). Die meisten dieser Bakterien zeigen auch AI-2 Aktivität und bei *E. coli*, *S. typhimurium*, *V. cholerae* und *H. pylori* wurden auch *luxS* Mutanten hergestellt, in denen die AI-2 Produktion eliminiert war (Surette et al., 1999a). Auch wenn man die genaue Funktion des AI-2 bei den anderen Bakterien nicht kennt, gibt es mehrere Hinweise auf seine Rolle in der Pathogenität bei *E. coli*, *S. typhimurium* und *V. cholerae* (Surette et al., 1999a; Surette et al., 1998; Surette et al., 1999b; Sperandio et al., 1999).

3 Der uropathogene *E.coli* Stamm 536

Im Genom vieler pathogener Bakterien befinden sich die virulenzassoziierte Gene häufig auf sogenannten Pathogenitätsinseln (PAIs). Eine der Eigenschaften vieler PAIs ist, daß sie aus dem Chromosom deletieren können. In diesem Fall kann man auch von einem irreversiblen Regulationsmechanismus reden. Durch die Deletion der Bereiche und DNA-„Rearrangements“ ändert sich die Expression der virulenzassoziierten Gene, die sich auf den Pathogenitätsinseln befinden, irreversibel (Ott, 1993). Dieses trifft z. B. auf die PAI I₅₃₆ und II₅₃₆ des uropathogenen *E.coli* Stammes 536 (O6:K15:H31) zu, die beide deletiert werden können. Dieser Stamm exprimiert eine Vielzahl von Virulenzfaktoren wie Typ 1-, S- und P- verwandte Fimbrien, Enterobaktin und Yersiniabaktin, Flagellen, α -Hämolysin und K- und O-Antigene. Außerdem ist der Stamm serumresistent (Hacker et al., 1992, Hacker et al., 1999). Die entsprechenden Gene sind auf den fünf bis jetzt bekannten PAIs des Stammes 536 lokalisiert (siehe Tab.1) (Blum et al., 1994; Steiner, 1997; Dobrindt et al., 2000).

Tab. 1: Charakterisitika der Pathogenitätsinseln (PAIs) des *E.coli* Stammes 536

Bezeichnung	Größe	Lokalisation (min)	Virulenzgene	Assoziiertes tRNA-Gen
PAI I ₅₃₆	ca. 70 kb	82	<i>hly</i>	<i>selC</i>
PAI II ₅₃₆	102 kb	97	<i>hly, prf, hra</i>	<i>leuX</i>
PAI III ₅₃₆	> 60 kb	5,6	<i>sfaC-H, iro</i>	<i>thrW</i>
PAI IV ₅₃₆	30,7 kb	44	<i>fyuA, irp1-9</i>	<i>asnT</i>
PAI V ₅₃₆	> 30 kb	67	<i>kps</i>	<i>pheV</i>

Die PAIs I₅₃₆ und II₅₃₆ werden jeweils von 16 bp bzw. 18 bp „direct repeats“ flankiert und können mit relativ hoher Frequenz durch Rekombination zwischen diesen Sequenzen deletieren (Blum et al., 1994). Die Deletion der PAIs resultiert in der avirulenten Mutante 536-21 (Hacker et al., 1983), die abgesehen von O- und K-Antigenen keinen der Virulenzfaktoren des Wildtyps mehr exprimiert. Somit bewirkt die Deletion auch das Abschalten der Virulenzgene, die nicht auf den PAIs lokalisiert sind. Die Deletion der PAI III₅₃₆ und IV₅₃₆ konnte bis jetzt noch nicht gezeigt werden.

Eine der Eigenschaften von Pathogenitätsinseln ist, daß sie oft mit tRNA-Genen, die häufig als Integrationsorte für Fremd-DNA dienen, assoziiert sind. Auch bei dem *E. coli* Stamm 536 konnte die Integration der fünf PAIs in tRNA-spezifische Gene nachgewiesen werden (siehe Tab. 1). Es konnte gezeigt werden, daß das tRNA_{5^{Leu}}-kodierende Gen *leuX* mit der PAI II₅₃₆ assoziiert ist. Infolge der Deletion wird das Gen am 3'-Ende um 6 bp verkürzt. Durch die Herstellung der *leuX*-negativen Mutante 536Δ102 und der Komplementation des *E. coli*-Stammes 536-21 konnte gezeigt werden, daß allein das Fehlen dieser Leucyl-tRNA die Expression von Typ 1-Fimbrien, Enterobaktin, Flagellen sowie die Serumresistenz beeinflusst (Blum, 1994; Ritter et al., 1995). Bei dieser *leuX*-kodierten tRNA handelt es sich um eine seltenere Leucyl-tRNA, was die Expression vieler verschiedener Virulenzfaktoren bei dem *E. coli* Stamm 536 in eine Abhängigkeit von der Verfügbarkeit solcher seltenen tRNAs stellt.

4 Genom- und Proteomforschung

Im Jahre 1995 wurde ein großer Schritt in der Geschichte der Naturwissenschaft gemacht. Die DNA-Sequenz eines sich selbst vermehrenden Organismus, *Haemophilus influenzae*, wurde vollständig entschlüsselt (Fleischmann et al., 1995). Mit dem Ereignis hat die "Ära des Genoms" angefangen. In den letzten Jahren wurden 51 (Stand: Mai 2001) verschiedene mikrobielle Genome vollständig sequenziert. In ein paar Jahren werden die Sequenzen aller wichtigen human-, tier- und pflanzenpathogenen Bakterien-Stämme bekannt sein, was die Entwicklung von Impfstoffen, antimikrobiellen Agentien und diagnostischen Tests erleichtern wird. Auch für verschiedene *E. coli* Stämme gibt es Genomprojekte. Im Jahr 1997 wurde die Sequenz des apathogenen *E. coli* K-12 Stammes MG1655 veröffentlicht (Blattner et al., 1997). Die Genome der pathogenen *E. coli* Stämme CFT073 (UPEC), H10407 (ETEC), 2348/69 (EPEC), 042 (EAEC) und RS218 (NBM) werden zur Zeit an der Universität von Wisconsin sequenziert. Die Sequenzen von *E. coli* O157:H7 EDL933 und VT2-Sakai wurden bereits veröffentlicht (Perna et al., 2001 und Hayashi et al., 2001).

Es existieren sehr viele Methoden, die es uns ermöglichen, neue Virulenzgene bzw. Virulenzfaktoren zu charakterisieren. In den letzten zehn Jahren wurden neben der Genomsequenzierung verschiedene neue molekularbiologische Techniken entwickelt, die zur Detektion und Charakterisierung von unbekanntem Virulenzfaktoren geeignet sind (einige Beispiele siehe Tab. 2).

Tab.2: Beispiele der Methoden zur Detektion von Virulenzgenen

Methode	Anwendung
IVET („ <i>In vivo</i> expression technology“)	Identifizierung von Promotorfragmenten, die im Zusammenhang mit <i>in vivo</i> Expressionssignalen und der Induktion von <i>in vivo</i> relevanten Virulenzfaktoren stehen
Transposon-Mutagenese	Charakterisierung von „knockout“ Mutationen und Phänotypen
STM („Signature-tagged mutagenesis“)	Identifizierung von spezifischen Genprodukten, die im Wirtsorganismus exprimiert werden und für das Überleben der Bakterien in ihrem Wirtsorganismus nötig sind
RDA (repräsentative Differenzanalyse)	Charakterisierung von genomischen Unterschieden zwischen zwei verwandten Organismen
PFGE (Pulsfeldgelelektrophorese)	Vergleich von Genomen bzw. großen DNA-Fragmenten, Herstellung von physikalischen Genomkarten
Genomics/Proteomics	Charakterisierung von Unterschieden in der Genomsequenz oder Protein-Expression zwischen pathogenen und apathogenen Bakterien

Neben der Sequenzierung der Genome wird auch eine Analyse der Sequenzen bzw. der Funktion der möglichen kodierten Proteine durchgeführt. Es können zur Zeit jedoch ungefähr 30-50 % aller postulierten offenen Leseraster (ORFs) eines sequenzierten Genoms keiner Funktion zugewiesen werden. Zur Zeit scheinen die Methoden, die zu den sogenannten „functional genomics“-Methoden zusammengesetzt werden, am aussichtsreichsten für die Funktionsaufklärung. Zu den „functional genomics“ gehören unter anderem die Analyse der Gentranskription (Transkriptomanalyse) und der Proteinexpression (Proteomanalyse). Es ist auch möglich, durch die Verbindung aller drei Methoden eine umfassende Analyse des untersuchten Organismus durchzuführen (siehe Abb. 2).

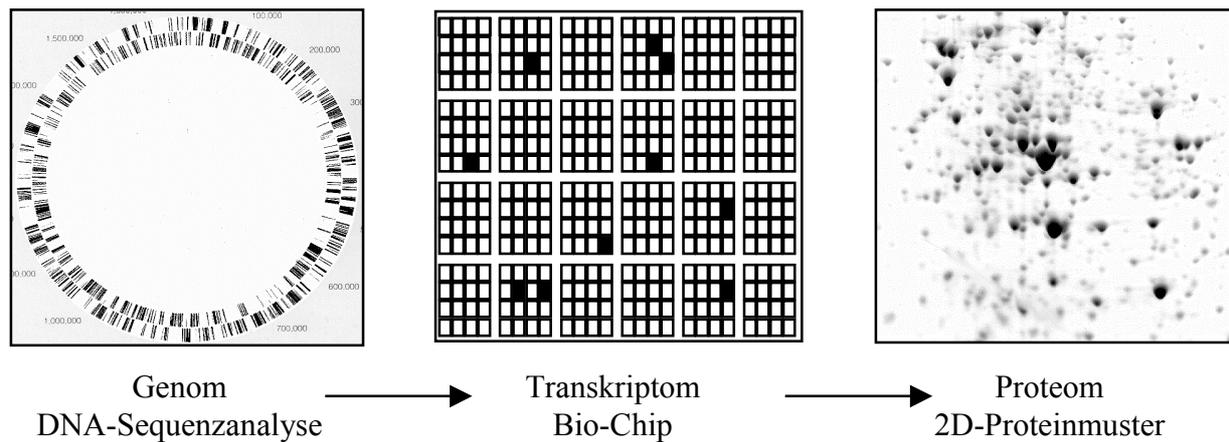


Abb. 2: Die Verbindung der Methoden der DNA-Sequenzanalyse mit der Analyse der Gentranskription und der Proteinexpression.

Bei der Transkriptomanalyse wird ein „DNA-Array“ aus bis zu mehreren tausend verschiedenen DNA-Sequenzen aus synthetischen Oligonukleotiden oder PCR-Produkten konstruiert. Nach der Hybridisierung mit isolierten und markierten mRNAs oder auch cDNAs kann man aufgrund der Hybridisierungssignale schnell Aufschlüsse über die Genregulation erhalten (Marshall und Hodgson, 1998; Harrington et al., 2000).

Mit der Entwicklung der Methoden zur schnellen Analyse von Proteinen begann die sogenannte „Post-Genom Ära“. Im Jahre 1994 wurde von den Australiern Marc Wilkins und Keith Williams der Begriff des „Proteoms“ geprägt. Er bezeichnet die Gesamtheit aller Proteine, die zu einem bestimmten Zeitpunkt vom Genom einer Zelle oder eines Organismus exprimiert werden. Um biologische Funktionen und regulatorische Netzwerke der Zelle vollständig zu verstehen, ist es von Vorteil, Proteine als funktionelle Produkte des Genoms zu charakterisieren (VanBogelen et al., 1999). Im Gegensatz zum Genom ist das Proteom nicht statisch, sondern verhält sich in Abhängigkeit von inneren und äußeren Parametern extrem dynamisch und flexibel.

Die Proteomanalyse ist eine wichtige Ergänzung zur Genomanalyse, denn das komplexe Netzwerk der Zellregulation läßt sich nicht durch das Entschlüsseln von genomischer DNA eines Organismus charakterisieren. Auch gibt es nur eine geringe Korrelation zwischen den Mengen an mRNA und den entsprechenden Genprodukten, so daß man nur mit Hilfe der Proteomanalyse feststellen kann, welche Proteine unter bestimmten Bedingungen wie stark exprimiert und eventuell posttranslational verändert werden. Die Proteomanalyse ist auch eine

wichtige Methode für die Analyse der genetischen Variabilität. So wurde z. B. mit Hilfe von 2-D-Gelen bei dem Stamm *H. influenzae* NCTC 8143 eine Tryptophanase detektiert, die nicht bei *H. influenzae* Rd gefunden wurde (Link et al., 1997). Auch für die bakterielle Epidemiologie und Taxonomie werden die vergleichende Proteomanalysen durchgeführt. Es wurden z. B. über die 2-D-Auftrennung von zellulären Proteinen 29 Isolate der 6 verschiedenen *Listeria*-Arten klassifiziert (Gormon et al., 1995). Es wurden dabei bei jedem der Stämme 600 Proteine detektiert. Nur wenige davon waren konserviert zwischen den Isolaten. Für die Untersuchung zur Expression von Virulenzfaktoren wird immer öfter die Proteomanalyse angewandt. Bei der sog. Substraktiven Proteomanalyse vergleicht man zwei oder mehrere unterschiedliche Zustände einer Zelle oder verschiedene Organismen (pathogene und apathogene Bakterien usw.) und versucht, spezifische qualitative und quantitative Veränderungen zu identifizieren. So wurde z. B. eine vergleichende Analyse des Proteoms von zwei avirulenten *Mycobacterium bovis* BCG-Impfstämmen (Chicago und Kopenhagen) mit zwei virulenten *Mycobacterium tuberculosis* Stämmen (H37Rv und Erdman) durchgeführt. Als Ziel wurde die Identifizierung von Proteinen, die bei der Diagnose, der Therapie und der Entwicklung von Impfstoffen wichtig sein könnten, gesetzt. Von den über 200 identifizierten Proteinen sind wahrscheinlich elf als Antigene für eine mögliche Impfstoffentwicklung geeignet (Jungblut et al., 1999). Proteomanalyse kann auch bei den Untersuchungen der *in vivo*-Genexpression angewendet werden. Deiwick und Hensel haben rekombinante DNA-Techniken mit der Analyse des Proteoms verbunden, um die Virulenzgene zu identifizieren und zu charakterisieren, die bei *Salmonella typhimurium*-Infektionen im Mausmodell exprimiert werden (Deiwick und Hensel, 1999). Auch die Wirtsantwort auf die Infektion kann man auf der Ebene des Proteoms verfolgen. Skrabkova und Mitarbeiter haben einen globalen Wechsel in der Proteinsynthese bei Makrophagen nach *Francisella tularensis*-Infektion in der Maus beschrieben. Man konnte dabei infizierte von nichtinfizierten Makrophagen auf Grund der verschiedenen Proteome unterscheiden (Kovarova et al., 1992). Auch bei der Identifizierung von immunogenen Proteinen ist die zweidimensionale Gelelektrophorese (2-D) die Methode der Wahl. Bei *Helicobacter pylori* konnte man mit Hilfe von 2-D-Gelelektrophorese und Immunoblotting mit humanem Serum, über 30 immunogene Proteine finden (McAtee et al., 1998).

Eine der größten Herausforderungen der Proteomanalyse ist die reproduzierbare Auftrennung der komplexen Proteingemische unter Beibehaltung der quantitativen Verhältnisse. Derzeit ist die 2-D Elektrophorese die einzige Methode, die diese Aufgabe bewältigen kann. Die 2-D Elektrophorese nimmt eine Sonderstellung gegenüber den herkömmlichen eindimensionalen Elektrophoresemethoden ein. Zum einen garantiert sie beste Auflösung, da die Proteine nach zwei voneinander unabhängigen Kriterien, nämlich isoelektrischem Punkt und Molekulargewicht, getrennt werden. Zum anderen können mit der 2-D Elektrophorese mehrere hundert Genprodukte gleichzeitig analysiert werden, womit sich diese Elektrophoresetechnik in Kombination mit computerunterstützten Bildauswertungssystemen sehr gut zur umfassenden Untersuchung von Proteomen einsetzen läßt.

Bei den elektrophoretischen Trennmethoden werden die zwei wichtigsten physikalisch-chemischen Eigenschaften der Proteine, nämlich Molekulargröße und Ladungszustand, zu ihrer Trennung verwendet. Unter dem Namen Elektrophorese werden Trennverfahren zusammengefaßt, die die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Gleichstromfeld ausnutzen. Man unterscheidet trägerfreie und trägergebundene Elektrophoresesysteme. Die wichtigsten Trägermaterialien für die allgemein so benannten Gelelektrophoresen sind Stärke, Agarose und Polyacrylamid. Bei der Gelelektrophorese werden die einzelnen Substanzen nicht nur durch ihre unterschiedlichen Ladungen getrennt, sondern zusätzlich noch durch einen Siebeffekt des Gels aufgrund der unterschiedlichen Größe und Gestalt des Materials. Außerdem unterscheidet man zwischen eindimensionalen und zweidimensionalen Elektrophoreseverfahren. Eindimensionale Trenntechniken wie die Disk-Elektrophorese und SDS-Elektrophorese sowie die isoelektrische Fokussierung sind leistungsfähige Methoden zur Trennung und Charakterisierung von Proteinen. Sie können aber nur 50-100 Proteine auftrennen. Für die Analyse von vielen hunderten Proteinen, wie sie in ganzen Zellen oder Geweben vorkommen, ist dieses Auflösungsvermögen unzureichend.

1975 entwickelte O'Farrell die zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2-D PAGE), die die Proteine nach Ladung und Molekulargewicht trennt und damit die gleichzeitige Untersuchung von mehreren Genprodukten auf einem einzigen Gel ermöglicht (O'Farrell, 1975). Obwohl bis zum Jahre 1975 schon Elektrophoresemethoden bekannt waren, die die Proteine nach den Parametern isoelektrischer Punkt und Molekulargewicht auftrennten (Stegemann, 1970), wird die Veröffentlichung von O'Farrell als die Geburtsstunde der hochauflösenden 2-D Elektrophorese bezeichnet. Während sich die bisher bekannten 2-D

Techniken auf die Trennung löslicher Proteine beschränkten, gelang es O'Farrell mit Substanzen wie Harnstoff, Mercaptoethanol und dem Detergenz Nonidet P-40 für die Probenvorbereitung wie auch für die isoelektrische Fokussierung zum ersten Mal, ganze Zellinhalte in viele hundert Proteinspots aufzutrennen. Die Arbeit von O'Farrell bildete die Grundlage für weitere Entwicklungen auf diesem Gebiet. Besonders die Entwicklung von immobilisierten pH-Gradienten (Görg et al., 1985) führte zu deutlichen Verbesserungen im Auflösungsvermögen und der Reproduzierbarkeit der 2-D Technik.

Der erste Schritt bei der zweidimensionalen Trennung von Proteinen nach O'Farrell ist die Durchführung der isoelektrischen Fokussierung, wobei der pH-Gradient im Fokussierungsgel durch die Verwendung von Trägerampholyten erzeugt wird. Trägerampholyte sind ein heterogenes Synthesegemisch, das aus amphoteren, kleinmolekularen Oligoamino-Oligocarbonsäuren besteht. Die Moleküle wandern nach dem Anlegen eines elektrischen Feldes zu ihren jeweiligen isoelektrischen Punkten und erzeugen so einen pH-Gradient. Leider sind so erzeugte pH-Gradienten nicht zeitstabil und wandern in Abhängigkeit von der Fokussierungszeit unter Plateaubildung in Richtung der Kathode. Dies führt nicht nur zum Verlust der basischen Proteine, sondern der pH-Gradient verliert außerdem seine Linearität (Righetti, 1983). Um das zu kompensieren, wurde von O'Farrell die sogenannte NEPHGE (non equilibrium pH Gradient gel electrophoresis) eingeführt (O'Farrell et al., 1977). Da hier die Proteine ihren isoelektrischen Punkt nicht erreichen, ist die Reproduzierbarkeit der Methode sehr gering. Ein weiteres Problem besteht darin, daß Trägerampholyte, die verschiedenen Produktionschargen entstammen, unterschiedlich zusammengesetzt sind und ein in einem Labor optimierter pH-Gradient nur unter großen Schwierigkeiten zu reproduzieren ist. Die hochauflösende 2-D Elektrophorese mit immobilisierten pH-Gradienten unterscheidet sich grundsätzlich von der klassischen Methode. Die isoelektrische Fokussierung wird hier nicht in mit Trägerampholyten erzeugten pH-Gradienten, sondern mit immobilisierten pH-Gradienten (IPG) durchgeführt (Bjellqvist et al., 1982). Der immobilisierte pH-Gradient ist ein fester Bestandteil des Gels und entsteht durch die Kopolymerisation der *Immobiline*[®] (Acrylamidderivate mit puffernden Gruppen) mit den Acrylamidmonomeren. Das hat im Vergleich zu den Trägerampholytgelten folgende Vorteile, die sich auch positiv auf die Reproduzierbarkeit der 2-D Elektrophorese auswirken (Görg 1991; Görg et al., 1988):

- Der pH-Gradient ist zeitstabil, da er kovalent an die Matrix gebunden ist. Dadurch bleiben auch die basischen Proteine erhalten.
- Zur Herstellung des immobilisierten pH Gradienten werden in der Regel chemisch definierte Einzelsubstanzen verwendet, so daß der Verlauf des pH-Gradienten unabhängig von der Produktionscharge ist.

Die isoelektrische Fokussierung mit immobilisierten pH-Gradienten wird im Gegensatz zur Trägerampholyt-Fokussierung nicht in Rundgelen durchgeführt, sondern man verwendet auf Folie polymerisierte Flachgele. Dieser Unterschied in der Geometrie der ersten Dimension hat ebenfalls Konsequenzen für die Erlangung von konstanten Spotpositionen entlang der pH-Achse. Die Gelstreifen sind dimensionsstabil und leichter zu handhaben.

Die zweite Dimension wird entweder horizontal oder vertikal durchgeführt. Bevor die IEF-Gele auf die Oberfläche eines SDS-Gels aufgelegt werden können, müssen die fokussierten Proteine noch mit SDS beladen werden. Die Rezeptur dieses sogenannten Äquilibrierungspuffers unterscheidet sich für Trägerampholyt-Gele und IPG-Gele. Die im IPG-Gel fixierten funktionellen Gruppen der *Immobiline*[®] verursachen im Kontaktbereich von IPG-Gel und horizontalem SDS-Gel elektroendosmotische Effekte, die zu einem unvollständigen Proteintransfer führen. Durch Zugabe von 30 % Glycerin und 6 M Harnstoff zum Äquilibrierungspuffer konnten die Probleme, die mit den elektroendosmotischen Effekten in Zusammenhang stehen, von Görg und Mitarbeitern gelöst werden (Görg et al., 1987). Die zweidimensionale Elektrophorese, mit der Fähigkeit mehrere hundert Genprodukte gleichzeitig untersuchen zu können, bietet nicht nur vielfältige analytische Möglichkeiten für Studien der Genomexpression und der sie beeinflussenden Faktoren, sondern sie ist auch ein guter Ausgangspunkt für weitere proteinchemische Untersuchungen zur Identifizierung und Charakterisierung interessanter Proteinspots (Lottspeich et al., 1989; Wilm et al., 1996). Während man noch vor wenigen Jahren die Proteine, die man sequenzieren wollte, über mehrere chromatographische Schritte reinigen und isolieren mußte, können jetzt diese Untersuchungen mit Hilfe der Massenspektrometrie bzw. Sequenz- und Aminosäureanalyse-Techniken im Anschluß an die 2-D Elektrophorese durchgeführt werden (Eckerskorn et al., 1988), (siehe Abb. 3).

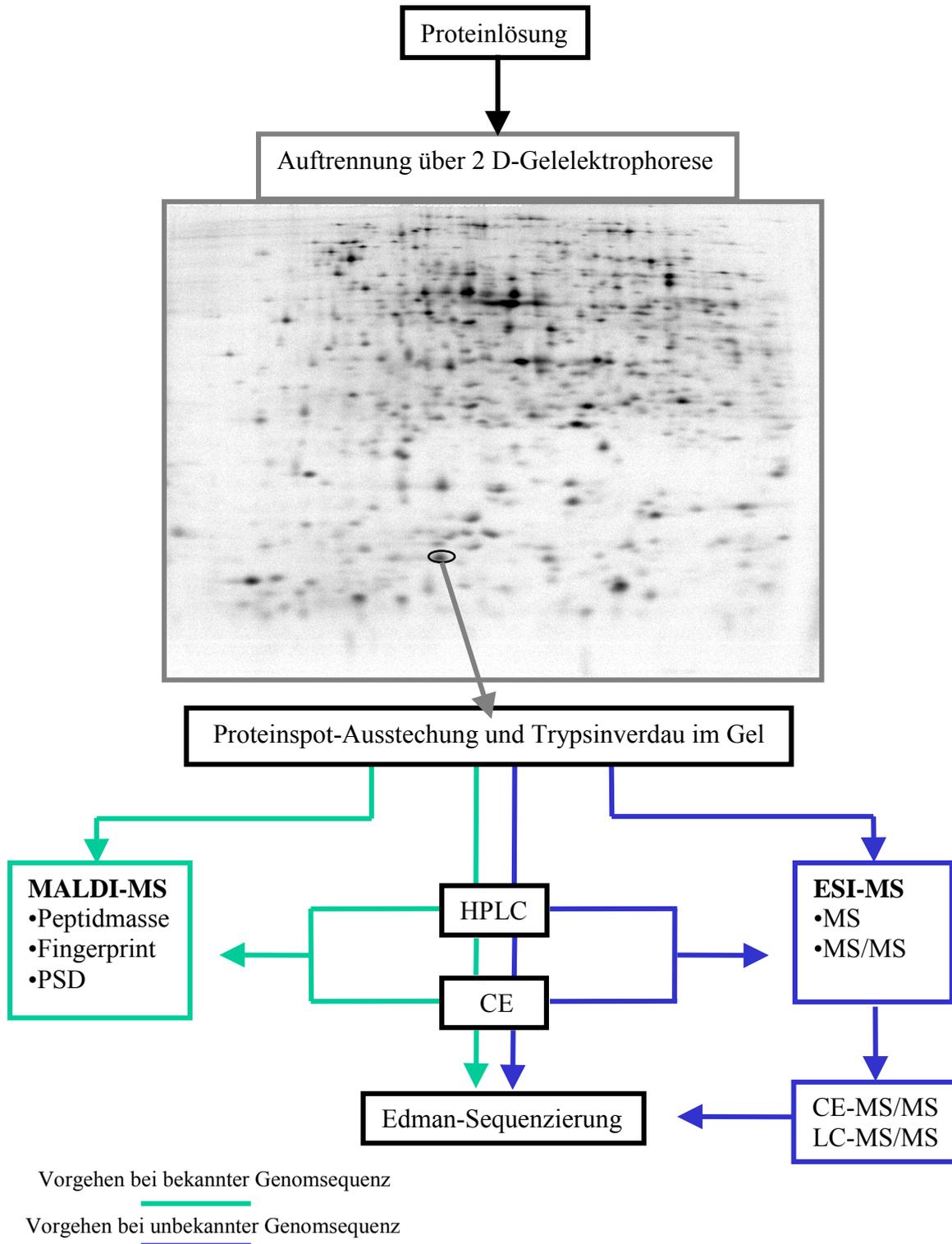


Abb.3: Schematische Darstellung von Proteincharakterisierungsmöglichkeiten im Anschluß an die 2-D Elektrophorese (MALDI-MS: „matrix assisted laser desorption ionisation mass spectrometry“; PSD: „post-source decay“; ESI-MS: „electrospray ionisation mass spectrometry“; MS: „mass spectrometry“; MS/MS: „tandem mass spectrometry“; HPLC: „high performance liquid chromatography“; CE: „capillary electrophoresis“; CE-MS/MS: „tandem mass spectrometry-capillary electrophoresis“)

Im Grunde gibt es zwei Ausgangspunkte für die Identifizierung von zweidimensional aufgetrennten Proteinen. Überwiegend werden aus den coomassiegefärbten 2 D-Gelen ausgestochene Proteinspots als Ausgangsmaterial verwendet. Zum anderen erfolgt die Identifizierung nach Transfer der Proteine auf eine Membran. Die dann folgende Vorgehensweise richtet sich zum einen nach der Ausgangsmenge der Proteine und danach ob das Genom des untersuchten Organismus schon sequenziert wurde.

In den letzten zehn Jahren wurde die Massenspektrometrie (MS) die Technik der Wahl bei der Charakterisierung von Proteinen. Dafür liegen drei Gründe vor. Zum einen wurde eine neue Methode für die Ionisation von Proteinen und Peptiden entwickelt, speziell die „matrix-assisted laser desorption-ionisation“ (MALDI) und „electrospray ionisation“ (ESI). Diese Methoden in Kombination mit „time-of-flight“ (TOF) und neuen Hybridmassenspektrometern führten zu einer hohen Sensitivität und Selektivität. Der zweite Grund ist das schnelle Wachstum von Genom-Daten, die für die Auswertung von MS notwendig sind. Der dritte Grund ist, daß MS detaillierte Informationen über post-translationale Modifikationen, besonders Phosphorylierung und Glykosylierung, liefern kann. Bei MALDI werden meistens trypsinverdaute Proteine mit einem großen Überschuß einer UV-absorbierenden Matrix gemischt und als kleine Tropfen auf einen Probenträger aufgetropft. Ein pulsierender Laser ($\lambda = 337 \text{ nm}$) beschiesst die Proben in Vakuum. Dabei entstehen in einer Gaswolke ionisierte Peptide, die durch das elektrische Feld in Richtung des Detektors geführt werden (siehe Abb.

4)

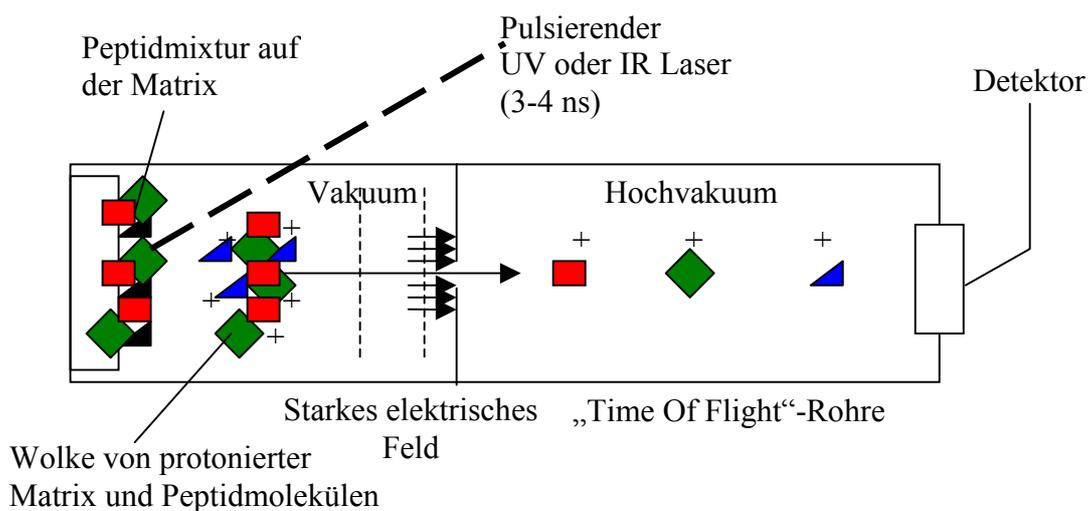


Abb. 4: Schematische Darstellung der Proteinidentifizierung durch MALDI-TOF-MS. Dargestellt ist ein Querschnitt eines MS-Vakuum-Rohres. Durch den pulsierenden Laserstrahl werden die Peptide aus der Matrix in einer Gaswolke herausgeschossen und positiv geladen. Durch Anlegen eines starken elektrischen Feldes werden die geladenen Peptide in Abhängigkeit ihrer Masse in Richtung Detektor geführt.

MALDI-TOF-MS wird als Meilenstein in der Proteomanalyse angesehen. Die Methode ist relativ kostengünstig und auch nicht sehr zeitaufwendig. Jedoch hat auch diese Methode ihre Grenzen. Zum einen ist die Ionisation der Peptide selektiv und nicht quantitativ. Zum anderen sind manche Proteine in so kleinen Mengen vertreten, daß nur wenige Peptide nach dem Trypsinverdau detektierbar sind. Das macht es dann unmöglich, auf Grund der wenigen vorhandenen Massen, auf die Sequenz des Proteins zurückzuschließen. Eine Möglichkeit, um mehr Informationen über das untersuchte Protein zu bekommen, ist die Benutzung des „tandem mass spectrometry“ oder „electrospray ionization“-Methode (ESI). Die Auftrennung der Proteine über 2 D-Gelelektrophorese zusammen mit der Sequenzanalyse mittels MS führt in der Zukunft zur Aufklärung von vielen Fragestellungen in der Medizinischen Mikrobiologie. Die daraus gewonnenen neuen Erkenntnisse werden dazu beitragen, daß neue Möglichkeiten der Diagnose und Therapie von Infektionskrankheiten entwickelt werden können.

Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war eine genaue Untersuchung des Einflusses der Pathogenitätsinseln und der *leuX*-kodierenden tRNA_{5^{LeuX}} auf die Expression von Virulenzfaktoren und Proteinen bei dem uropathogenen *Escherichia coli* Stamm 536.

Im ersten Abschnitt sollte zu diesem Zweck die Methode der 2D-Gelelektrophorese etabliert und angewendet werden. Es sollten verschiedene Auftrennungsmethoden (mit radiaktiv markierten Proteinen, analytischen bzw. präparative Mengen der Proteine) angewendet werden. Außerdem sollten außer der cytosolischen Fraktionen auch Überstands- und Membranproteine aufgetrennt werden.

Im zweiten Abschnitt sollte der Einfluß der *leuX*-kodierte tRNA_{5^{Leu}} auf die Serumresistenz des *E. coli* Stammes 536 untersucht werden. Zu diesem Zweck sollten neben der 2 D-Gelelektrophorese auch die eindimensionale Gele und „Western-Blot“-Techniken angewandt werden. Somit sollten Proteine gefunden werden die möglicherweise Einfluß auf die Serumresistenz haben. Des weiteren sollte auch untersucht werden, ob und wie das *leuX*-Gen die Resistenz der Bakterien gegenüber der kationischen Peptide beeinflusst.

Im dritten Abschnitt sollten transkriptionelle *lacZ*-Fusionen mit den beiden regulatorischen Integrasen FimB und FimE bei dem Wildtyp und *leuX*-negativen Stamm 536 hergestellt werden. Der Einfluß des genetischen Hintergrundes und verschiedener Umweltfaktoren auf die Typ 1-Fimbrien Transkription sollte untersucht werden.

IV

Material

und

Methoden

1 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

1.1 Bakterienstämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in den Tabellen 3 und 4 aufgeführt.

Tab.3: In dieser Arbeit verwendete *E.coli* K-12 Stämme

<i>E.coli</i> Stamm	Eigenschaften	Referenz oder Herkunft
XL1-Blue	<i>RecA1, endA1, gyrA96, thi1, hsdR17</i> (Γ_k^- , m_k^-), <i>supE44, relA1, λ^-, lac^-</i> [F' <i>proA⁺B⁺, lacI^q, lacZΔM15,</i> Tn10(Tc ^R)]	Bullock et al., 1987
SY327 λ pir	F ⁻ , <i>araD, Δ(lac-pro), argE (Am), Rif^R,</i> <i>nalA, recA56, λpir</i>	Miller and Mekalanos, 1988
Sm10 λ pir	<i>thi1, thr1, leuB6, supE44, tonA21,</i> <i>lacY1, recA⁻, ::RP4-2-Tc::Mu, Km^R,</i> <i>λpir</i>	Miller and Mekalanos, 1988

Tab.4: In dieser Arbeit verwendete Bakterien-Wildstämme und deren Mutanten

<i>E.coli</i> Wildstamm	Eigenschaften	Referenz oder Herkunft
536	O6:K15:H31, <i>hly⁺, fim⁺, sfa⁺, prf⁺, ent⁺, fla⁺,</i> serumresistent, Sm ^R	Berger et al, 1982
536-21	Aus 536, Pai I ⁻ , Pai II ⁻ , <i>hly⁻, fim⁺, sfa⁺, prf⁺,</i> <i>ent⁺, fla⁺,</i> serumsensitiv, Sm ^R	Hacker et al, 1983
536-225	Aus 536, Pai I ⁺ , Pai II ⁻ , <i>leuX, hly^{+/-}, fim⁺, sfa⁺,</i> <i>prf⁺, ent⁺, fla⁺,</i> serumsensitiv, Sm ^R	Knapp, 1982
536 Δ 102	Aus 536, Pai I ⁺ , Pai II ⁺ , <i>leuX, hly⁺, fim⁺, sfa⁺,</i> <i>prf⁺, ent⁺, fla⁺,</i> serumsensitiv, Sm ^R	Ritter et al., 1997
536R3	Aus 536-21, Pai I ⁻ , Pai II ⁻ , <i>hly⁻, fim⁺, sfa⁺, prf⁺,</i> <i>ent⁺, fla⁺,</i> <i>leuX</i> -Integration in λ -attB, serumresistent, Sm ^R , Ap ^R	Dobrindt et al., 1998

536 <i>lacZ</i>	Aus 536, Pai I ⁺ , Pai II ⁺ , <i>leuX</i> ⁺ , <i>hly</i> ⁺ , <i>fim</i> ⁺ , <i>sfa</i> ⁺ , <i>prf</i> ⁺ , <i>ent</i> ⁺ , <i>fla</i> ⁺ , <i>lacZ</i> , serumresistent, Sm ^R	Dobrindt and Hacker, 2001
536Δ102 <i>lacZ</i>	Aus 536Δ102, Pai I ⁺ , Pai II ⁺ , <i>leuX</i> , <i>hly</i> ⁺ , <i>fim</i> ⁺ , <i>sfa</i> ⁺ , <i>prf</i> ⁺ , <i>ent</i> ⁺ , <i>fla</i> ⁺ , <i>lacZ</i> , serumsensitiv, Sm ^R	Dobrindt and Hacker, 2001
536- <i>fimB</i> :: <i>lacZ</i>	Aus 536 <i>lacZ</i> , <i>lacZ</i> ⁺ , <i>fimB</i> ⁻	diese Arbeit
536- <i>fimE</i> :: <i>lacZ</i>	Aus 536 <i>lacZ</i> , <i>lacZ</i> ⁺ , <i>fimE</i> ⁻	diese Arbeit
536Δ102- <i>fimB</i> :: <i>lacZ</i>	Aus 536Δ102 <i>lacZ</i> , <i>lacZ</i> ⁺ , <i>fimB</i> ⁻	diese Arbeit
536Δ102- <i>fimE</i> :: <i>lacZ</i>	Aus 536Δ102 <i>lacZ</i> , <i>lacZ</i> ⁺ , <i>fimE</i> ⁻	diese Arbeit
536Δ <i>yagG</i>	Aus 536, <i>yagG</i> ⁻	diese Arbeit
536Δ <i>yagG</i> (pGKP1)	Aus 536Δ <i>yagG</i> , <i>yagG</i> ⁺	diese Arbeit

1.2 Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten und konstruierten Plasmide sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tab.5: In dieser Arbeit verwendete und konstruierte Plasmide

Bezeichnung	Vektor	Eigenschaften	Herkunft oder Referenz
pUC19		Ap ^r , <i>lacZ</i> α, <i>ori</i> ColE1	C. Yanisch-Perron et al., 1985
pGM-T Easy		Ap ^r , <i>lacZ</i> α, <i>fl ori</i>	Promega
pCVD442		<i>ori</i> R6K, <i>mob</i> RP4, <i>sacB</i> , Ap ^R	Donnenberg and Kaper, 1991
pTAC3953		promotorloses <i>lacZ</i> , Ap ^R	Bronsted und Atlung, 1994
pKP1	pUC19	pUC19/ <i>fimB</i> „down“, Ap ^R	diese Arbeit
pKP2	pUC19	pUC19/ <i>fimE</i> „down“, Ap ^R	diese Arbeit
pKP3	pUC19	pUC19/ <i>fimB</i> :: <i>lacZ</i> , Ap ^R	diese Arbeit
pKP4	pUC19	pUC19/ <i>fimE</i> :: <i>lacZ</i> , Ap ^R	diese Arbeit
pGKP1	pGMTeasy	pGM-T Easy/ <i>yagG</i>	diese Arbeit

pTKP1	pTAC3953	pTAC3953/ <i>fimB</i> “up“:: <i>lacZ</i> , Ap ^R	diese Arbeit
pTKP2	pTAC3953	pTAC3953 <i>fimE</i> “up“:: <i>lacZ</i> , Ap ^R	diese Arbeit
pCKP1	pCVD442	pCVD442/ <i>fimB</i> :: <i>lacZ</i> , Ap ^R	diese Arbeit
pCKP2	pCVD442	pCVD442/ <i>fimE</i> :: <i>lacZ</i> , Ap ^R	diese Arbeit
pCKP3	pCVD442	pCVD442/ <i>ygaG</i> -„up“ und „downstream“-Bereich, Ap ^R	diese Arbeit

2 Oligonukleotide

Die für PCR-Reaktionen und Sequenzierungen verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen. Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in der Tabelle 5 aufgeführt. Die mit * versehenen Basen sind im Vergleich zu den wildtypischen Sequenzen verändert.

Tab.6: Oligonukleotide und ihre Verwendung

Name	Länge	Sequenz (5'-3')	Verwendung
<i>fimB</i> 1	28-mer	CGAACATTGACCAGCTGGAAGACTTCG G	Amplifizierung von <i>fimB</i> - „upstream“-Bereich
<i>fimB</i> 2	27-mer	CCTCACTAAGTCTAGAGTGATACCCAG	Amplifizierung von <i>fimB</i> - „upstream“-Bereich
<i>fimB</i> 3	34-mer	AAAGCTCTAGACCGGATTATCTC*GA*G ACATCGCA	Amplifizierung von <i>fimB</i> - „downstream“-Bereich
<i>fimB</i> 4	22-mer	TTAGCACGTTCCCGGGTCCAGC	Amplifizierung von <i>fimB</i> - „downstream“-Bereich
<i>fimE</i> 1	25-mer	GCATTAATAACAGCTGTAATGAAAC	Amplifizierung von <i>fimE</i> - „upstream“-Bereich
<i>fimE</i> 2	23-mer	TATTCTGTTATCTAGAGACCGAG	Amplifizierung von <i>fimE</i> - „upstream“-Bereich
<i>fimE</i> 3	39-mer	AAAGCTCTAGAGCGAGAAGAAGCTC*G AG*TTAACTTAATT	Amplifizierung von <i>fimE</i> - „downstream“-Bereich

fimE4	20-mer	ATTAGCAGCACCCGGGGTTG	Amplifizierung von <i>fimE</i> - „downstream“-Bereich
ygaG1	31-mer	ACGCGTGACGTCGGACGTGAAACCCGC ACCG	Amplifizierung von <i>ygaG</i> -„upstream“-Bereich
ygaG2	29-mer	AAAGCTCTAGAGCGTGCGCACCGCCTC CG	Amplifizierung von <i>ygaG</i> -„upstream“-Bereich
ygaG3	33-mer	AAAGCTCTAGAGCAGGCGAGTC*TCGA GTATATG	Amplifizierung von <i>ygaG</i> -„downstream“- Bereich
ygaG4	31-mer	TCCCCGGGGGACGTAGCGGGCCTTAA ACAG	Amplifizierung von <i>ygaG</i> -„downstream“- Bereich
ygaGa	24-mer	GGCTTTTTTCAATTAATTGTGAAG	Amplifizierung von <i>ygaG</i>
ygaGb	23-mer	CTGGGAAGAAAGAGTTCAGAAAA	Amplifizierung von <i>ygaG</i>
lacZ1	23-mer	GACCATGATTACGGATTCACTGG	Amplifizierung von <i>lacZ</i>
lacZ2	24-mer	GCGTTAAAGTTGTTCTGCTTCATC	Amplifizierung von <i>lacZ</i>
lacZin	21-mer	CGTTGACAACCCTTCCCGCTA	Überprüfung des Inserts in pCVD442
fimEin	26-mer	GTGAGTAAACGTGGTTATCTTACCGG	Überprüfung des Inserts in pCVD442
fimBin	22-mer	CCCGCCATCAGGCTGAGCATAA	Überprüfung des Inserts in pCVD442

3 Chemikalien

Alle benötigten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham, Braunschweig; BioRad, München; Clontech, Heidelberg; Difco, Augsburg; Fluka, Deisenhofen; Gibco BRL, Eggenstein; Merck, Darmstadt; Oxoid, Wesel; Pharmacia Biotech, Freiburg; Roche Diagnostics, Mannheim; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma, Deisenhofen.

Die Enzyme stammten von den Firmen:

Eurogentec, Seraing, Belgien; Gibco BRL, Eggenstein; Amersham, Braunschweig; Pharmacia Biotech, Freiburg; Promega, Heidelberg; Roche Diagnostics, Mannheim; Quiagen, Hilden.

Folgende Kits wurden verwendet:

- „ECLTM Direct Nucleic Acid Labeling And Detection System“, Amersham, Braunschweig
- Genclean^R Kit“, Dianova, Hamburg
- SureCloneTM Ligation Kit“, Pharmacia Biotech, Freiburg
- „T7 sequencing“-Kit, Pharmacia Biotech, Freiburg

4 Geräte und Sonstiges

Analysenwaage	Chyo Balance Corp
Autoklav	Webeco
Brutschränke	Memmert Tv40b Heraeus B5050E
Cleanbench	Nunc Intermed
Computerprogramme	Microsoft Office 4.2, Melanie
Elektrophoresekammern	BioRad Institutswerkstatt
Filme	Fuji Röntgenfilm RX X-Ray
FrenchPress	
Geltrockner	BioRad 1125 B
Gene Linker	BioRad Gene Linker GS
Grobwaagen	Chyo Electronic Balance MP-3000
Hybridisierungsofen	Hybaid Mini 10
IPG-Streifen	Pharmacia Biotech
Kühlzentrifuge	Beckman J2-21 JA10- und JA20-Festwinkelrotoren Biofuge
Magnetrührer	Janke und Kunkel KMO 2
Mikropipetten	Gilson P20, P200 und P1000 Eppendorf Reference 0,5-10 µl und 100-1000 µl
Mikrowellenofen	Phillips M630
Multiphor II Elektrophoreseeinheit	Pharmacia Biotech
MultiTemp III Kühler	Pharmacia Biotech

Netzgeräte	BioRad Power Pac 300 Pharmacia EPS 3500 XL Power Supply Pharmacia EPS 1001 Power Supply
Nylonmembran	Pall Biodyne B, 0,45 µm
Ölvakuumpumpe	Univac Uniequipe
PCR-Thermocycler	Bio-Med Thermocycler 60/2 Techne Progene
pH-Meter	WTW pH 523
Photometer	UNICAM 8625 Pharmacia Ultrospec 3000
Schüttelinkubatoren	Bühler W55 swip Innova TM 4300
Speedvac-Concentrator	UNIVAPO 150H Uniequipe
Sterilfilter	Schleicher & Schuell, 0,45 µm und 0,22 µm
Tischinkubator	Eppendorf Thermostat 5320
Tischzentrifuge	Eppendorf 5415C
Ultraschallgerät	Branso Sonifer B12
Ultrazentrifuge	Sorvall
Vakuum-Blot-System	Pharmacia Biotech
Verstärkerfolien	Dr. Goos Special 200
Videoprintanlage	Mitsubishi, Hitachi, Cybertech Cb 1
Vortex	Vortex-Genie 2, Scientific Industries

5 Medien und Nährböden

Nährmedien wurden durch 20 min Autoklavieren bei 121°C sterilisiert. Feste Nährmedien wurden durch Zusatz von 1,5% (w/v) Agar zur Nährlösung hergestellt.

LB- (Luria-Bertani-) Medium (Sambrook et al., 1989)

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml pH 7,5

Saccharoseplatten (7 % Saccharose)

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
H ₂ O _{bidest}	ad 860 ml pH 7,5
nach dem Autoklavieren 140 ml 50 % Saccharose	

Schwärmagarplatten

LB-Medium
0,3 % Agar

M9-Medium (Sambrook et al., 1989)

Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	6 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	0,5 g
NH ₄ Cl	1 g
H ₂ O _{bidest}	ad 972 ml pH 7,4

Nach dem Autoklavieren wurden folgende getrennt sterilisierte Komponenten zugesetzt:

1 M MgSO ₄ x 7 H ₂ O + 1M MgCl ₂	1 ml
1M CaCl ₂ x H ₂ O	0,1 ml
10 mM Thiamin	5 ml
20% (w/v) Glukose	20 ml
10% (w/v) Casaminosäuren	5 ml

X-Gal-Medium:

LB-Medium mit folgenden Zusätzen:

IPTG (0,1 M)	0,5	ml/l
X-Gal (2%, (w/v) in N',N'-Dimethylformamid)	3	ml/l

CAS-Agarplatten (Schwyn und Neilands, 1987)

Lösung 1: In 50 ml H₂O_{bidest} werden 60,5 mg CAS (Chrome Azurol S) gelöst sowie 10 ml Fe(III)-Lösung (1M FeCl₃ x 6 H₂O; 10 mM HCl) zugegeben.

Diese Lösung wird langsam unter ständigem Rühren folgendem Gemisch zugefügt: 72,9 mg HDTMA (Hexadecyltrimethylammoniumbromid) gelöst in 40 ml H₂O_{bidest}

Sterilfiltriert

Lösung 2:	100 ml 10 x MM9-Salze	KH ₂ PO ₄	3 g/l
		NaCl	5 g/l
		NH ₄ Cl	10 g/l

30,24 g PIPES

12 g NaOH (50%)

15 g Agar

Autoklavieren

Zugabe folgender Lösungen nach der Abkühlung der Lösung 2:

30 ml 10 % Casamino­säure

10 ml 20 % Glucose

Langsames Zugeben der Lösung 1 zu Lösung 2 an der Glaswand entlang und unter ständigen Rühren.

Antibiotika

Antibiotika-Stammlösungen wurden sterilfiltriert und den autoklavierten Medien nach dem Abkühlen auf 45°C zugesetzt. Die Antibiotika-Stammlösungen wurden bei -20°C gelagert.

Tab7: In dieser Arbeit verwendete Antibiotikakonzentrationen

Antibiotikum	Endkonzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Lösungsmittel
Ampicillin	100	H ₂ O _{bidest}
Streptomycin	100	H ₂ O _{bidest}

6 Antikörper

Folgende Antikörper wurden in dieser Arbeit verwendet:

Kaninchen-anti-OmpT-AK (T. Korkonen, University of Helsinki, Finnland)

Schwein-anti-Kaninchen-HRP-AK (Dako, Hamburg)

Kaninchen-anti-Sfa-AK (S. Khan, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Würzburg)

Kaninchen-anti-Prf-AK (S. Khan, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Würzburg)

7 Puffer und Lösungen

Für Enzymreaktionen wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer und Lösungen verwendet. Alle selbst angesetzten Puffer und Lösungen sind unter den jeweiligen Methoden beschrieben. Für alle Lösungen wurde steriles H₂O_{bidest} eingesetzt.

8 Größenmarker

Zur Bestimmung der Fragmentgrößen von in Agarosegelen aufgetrennten Nukleinsäurefragmenten und der Größe der Proteine in den PAGE-Gelen wurden die folgenden Größenmarker eingesetzt.

Protein-Größenmarker

<u>Low-Molecular Weight Marker</u>	<u>kDa</u>	<u>Rainbow Marker</u>	<u>kDa</u>
Phosphorylase B	97,4	Blau	250
BSA	66,2	Rot	160
Ovalbumin	45,0	Grün	105
Carbonylanhydrase	31,0	Gelb	75
β -Lactoglobulin	21,5	Lila	50
Lysozym	14,4	Blau	35
		Orange	30
		Grün	25
		Blau	15
		Rot	10

DNA-Größenmarker

1 kb-Leiter

Fragment	Größe in kb
1	10,00
2	28,00
3	6,00
4	5,00
5	4,00
6	3,50
7	3,00
8	2,50
9	2,00
10	1,50
11	1,00
12	0,75
13	0,50
14	0,25

9 Methoden

Soweit nicht anders angegeben, sind die Anleitungen dem „CHS Laboratory Manual“ (Sambrook et al., 1989) entnommen.

9.1 Schnellysat-Methode mit Diatomeen-Erde (Boom et al., 1990)

3 ml einer unter entsprechendem Selektionsdruck gewachsenen ÜN-Kultur werden in einem Eppendorfgesäß 1 min bei 13000 Upm abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in 150 µl Puffer I vollständig resuspendiert. Anschließend werden 150 µl Puffer II zugegeben, durch mehrmaliges Invertieren gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Die Lösung sollte dabei aufklaren. Danach werden 150 µl Lösung III zugegeben, kurz gemischt und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Zelltrümmer und chromosomale DNA werden durch 5 min Zentrifugieren pelletiert und der klare Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu diesem Überstand werden 900 µl L6-Puffer und 50 µl Diatomeen-Erde-Suspension gegeben und nach dem Vortexen 1 min bei RT stehen gelassen, wobei die DNA an die Diatomeenerde bindet. Auf die Vakuumapparatur werden spezielle Fritten aufgesetzt, auf die wiederum Spritzen gesteckt werden. Das Reaktionsgemisch wird in eine Spritze gegeben und durch Anlegen des Vakuums durch die Fritte gesaugt, wobei die Diatomeenerde und die daran gebundene DNA in der Fritte verbleibt. Danach werden 2 ml Waschlösung durchgesaugt, die Fritte auf ein Eppendorfgesäß gesetzt und 20 sec zentrifugiert. Die Fritten werden auf ein neues Eppendorfgesäß gesteckt und mit 50 µl H₂O_{bidest} 5 min inkubiert. Nach 30 sec Zentrifugieren befindet sich die gereinigte Plasmid-DNA im Reaktionsgefäß und wird bei -20°C aufbewahrt.

Puffer I:
5 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5
2 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
1 ml RNase 10 mg/ml
ad 100 ml H₂O_{bidest}

Puffer II:
0,2 N NaOH
1 % SDS

Puffer III:
3 M NaAcetat pH 4,8

L6-Puffer:	100 ml 0,1 M Tris-HCl pH 6,4 8,8 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 13,2 ml H ₂ O _{bidest} 2,6 ml Triton X-100 120 g Guanidin (Thiocyanat-Salz, Sigma, G-6639)
Diatomeen-Erde- Suspension:	10 g Diatomeenerde 50 ml H ₂ O _{bidest} 500 µl HCl konz.
Waschlösung:	10 ml 5 M NaCl 5 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5 2,5 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 ad 250 ml H ₂ O _{bidest} 250 ml EtOH

9.2 Quiagen Midi-Präparation

Der Plasmidisolierungskit von Quiagen wird für die Isolierung von High- und Low-copy-Plasmiden verwendet. Dazu werden 50 ml (bei high-copy-Plasmiden) bzw. 200 ml (bei low-copy-Plasmiden) Bakterienkultur unter entsprechendem Selektionsdruck ÜN bei 37 °C angezogen und in JA20-Röhrchen bei 6000 Upm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 4 ml bzw. 8 ml Lösung P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml bzw. 8 ml Lösung P2 wird die Suspension vorsichtig geschüttelt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden 4 ml bzw. 8 ml kalte Lösung P3 zugegeben, geschüttelt und 15 min auf Eis inkubiert. Zelltrümmer und chromosomale DNA werden durch 30 minütiges Zentrifugieren bei 15000 Upm und 4 °C entfernt. Der klare Überstand wird auf eine bereits mit 4 ml QBT-Puffer equilibrierte Säule (Tip-100) gegeben. Nach der Passage des Überstandes, der die Plasmid DNA enthält, wird die Säule zweimal mit jeweils 10 ml Puffer QC gewaschen. Die an das Säulenmaterial gebundene Plasmid-DNA wird anschließend durch Zugabe von 5 ml Elutionspuffer QF eluiert und mit 0,7 Volumen Isopropanol bei RT gefällt. Die Plasmid-DNA wird durch Zentrifugation für 30 min mit 13000 Upm bei 4 °C pelletiert, mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen, 5 min an der Luft getrocknet und in einem

geeigneten Volumen H₂O aufgenommen. Die Regeneration der Quiagen-Säule erfolgt durch Waschen mit 50 ml Lösung HS und 10 ml Puffer QPT. Die Säule kann anschließend in Puffer QPT mit 0,1 % Natrium-Azid im Kühlschrank gelagert werden.

P1 (Resuspensionspuffer):	100 µg / ml RNase A 50 mM Tris-HCl 10 mM EDTA pH 8,0
P2 (Lysispuffer):	200 mM NaOH 1 % SDS
P3 (Neutralisationspuffer):	3,0 M K-Acetat pH 5,5
QBT (Equilibrierungspuffer):	750 mM NaCl 50 mM MOPS 15 % Ethanol pH 7,0 0,15 % Triton X-100
QC (Waschpuffer):	1,0 M NaCl 50 mM MOPS 15 % Ethanol pH 7,0
QF (Elutionspuffer):	1,25 M NaCl 50 mM Tris-HCl 15 % Ethanol pH 8,5

HS (Waschlösung):	1,5 M NaCl
	50 mM MOPS
	pH 8,5
	20 % Ethanol
QPT (Equilibrierungspuffer):	0,4 M NaCl
	50 mM MOPS
	pH 7,0
	0,15 % Triton X-100

9.3 Phenolisieren von Plasmid-DNA

Das Phenolisieren dient der Entfernung von Proteinen aus wässrigen DNA-Lösungen. Dazu wird der Ansatz mit 1 Volumen Phenol/Chloroform (1:1) versetzt, kräftig geschüttelt bis eine homogene weiße Phase entsteht und anschließend 2 min zentrifugiert. Durch die Zentrifugation wird die wässrige Phase von der organischen Phase getrennt, wobei sich die denaturierten Proteine in der Interphase ansammeln. Die obere Phase wird in ein neues Eppendorfggefäß überführt und mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) auf die gleiche Weise ausgeschüttelt, um Phenolreste zu entfernen, die bei der weiteren Verarbeitung der DNA stören könnten. Die wässrige Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA, wie unten beschrieben, gefällt.

9.4 Alkoholische Fällung von DNA

Zur Fällung von DNA aus wässriger Lösung wird diese mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat pH 4,8 und 2,5 Volumen 96%igem Ethanol versetzt, gut gemischt und für 1-24 Stunden bei -80 °C gefällt. Danach wird die gefällte DNA 10 min bei 13000 Upm in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert, das Pellet zur Entfernung von Salzen mit 70%igem Ethanol gewaschen und in der Speedvac getrocknet. Das Pellet wird nun in einem geeigneten Volumen H₂O_{bidest} gelöst und bei -20 °C gelagert.

9.5 „Polymerase Chain Reaktion“ (PCR; Saiki et al., 1988)

Mit dieser Methode können Nukleotidsequenzen *in vitro* amplifiziert werden. Die DNA-Sequenz des PCR-Produktes kann dabei gezielt verändert werden oder es können gewünschte Restriktionsschnittstellen in das zu amplifizierende Fragment eingebaut werden. Dadurch wird die Klonierung des Fragmentes erleichtert.

Für die PCR-Reaktion wird folgender Ansatz in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß vorbereitet:

10 x Taq-Polymerase Puffer	10 µl
20 mM dNTP-Mix	4 µl
0,5 µg/µl Primer 1	2 µl
0,5 µg/µl Primer 2	2 µl
100 ng/µl Template-DNA	1 µl
25 mM MgCl ₂	abgestimmt auf jeweilige PCR-Reaktion
H ₂ O _{bidest}	ad 100 µl

Am Thermocycler wird der Ablauf der Reaktion programmiert. Zunächst erfolgt ein 2 minütiges Denaturieren bei 95°C. Im Anschluß werden 30 bis 35 Amplifikationszyklen durchgeführt: die Denaturierung der DNA für 90 s bei 95°C, gefolgt vom Annealing der Primer für 60 s bei der errechneten Temperatur sowie der Primer-Extension bei 72°C (1 min je kb zu amplifizierender DNA). Zum Abschluß wird noch eine 10 minütige Amplifikation bei 72°C durchgeführt. Diese dient dem Auffüllen noch nicht vollständig synthetisierter PCR-Produkte. Ein Teil des Ansatzes wird dann zur Überprüfung der Reaktion auf ein Agarosegel aufgetragen.

Formel zur Errechnung der Primer-Annealing-Temperatur:

$$T_m = 69,3 + 0,4 (\% \text{ GC-Gehalt}) - \frac{650}{\text{Länge des Oligos}}$$

9.6 Isolierung chromosomaler DNA (Grimberg et al., 1989)

Die Zellen von 1 ml einer Übernachtskultur des jeweiligen Stammes werden in ein Eppendorfgefäß überführt und in der Tischzentrifuge für 2 min mit 13000 Upm abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wird einmal mit 1 ml TNE-Lösung gewaschen und anschließend in 270 µl TNEX-Puffer aufgenommen. Dem Ansatz werden 30 µl frische Lysozym-Lösung (5 mg/ml) hinzugefügt. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C erfolgt die Zugabe von 15 µl Proteinase K (20 mg/ml) und eine weitere Inkubation von 2-6 h bei 65 °C bis die Lösung klar ist. Die chromosomale DNA wird durch Zugabe von 1/20 Volumen 5 M NaCl (15 µl) und 500 µl Ethanol ausgefällt, danach in der Kühlzentrifuge mit 13000 Upm für 10 min zentrifugiert, zweimal mit 80%igem Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Das Pellet wird in 100 µl H₂O_{bidest} aufgenommen.

TNE: 10 mM Tris pH 8,0
 10 mM NaCl
 10 mM EDTA pH 8,0

TNEX: TNE
 1 % Triton X-100

9.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgt mit Hilfe von Quarzküvetten (Schichtdicke 1 cm) im Photometer. Dazu wird eine 1:100 Verdünnung der zu untersuchenden Probe in H₂O_{bidest} hergestellt und die optische Dichte (OD) bei 260 nm sowie 280 nm bestimmt. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors ergibt sich die OD für 1 µl der Probe. Bei doppelsträngiger DNA entspricht eine OD-Einheit 50 µg DNA/ml, bei RNA 40 µg/ml und bei Oligonukleotiden 33 µg/ml. Durch Messung der Absorption bei 280 nm kann die Reinheit der Untersuchungsprobe bestimmt werden. Die Nukleinsäuren liegen in ausreichender Reinheit vor, wenn das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ über 1,8 liegt.

9.8 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Restriktion von DNA wird jeweils der dem Enzym entsprechende 10-fach konzentrierte Puffer eingesetzt. Die Verwendung der entsprechenden Puffer, Inkubationstemperaturen und Inkubationsdauer erfolgt nach Angaben des Herstellers. Für die Spaltung von 1 µg DNA wird 1 Unit des geeigneten Restriktionsenzym verwendet. Bei analytischen Plasmid-Spaltungen wird 1-2 µg DNA in einem 20 µl Ansatz für 2 h bei entsprechender Temperatur (meist 37 °C) gespalten. Präparative Plasmid-Spaltung und Verdau von chromosomaler DNA werden in einem Gesamtvolumen von 40 µl durchgeführt, wobei die 10-fache Menge an DNA und entsprechend mehr Restriktionsenzym eingesetzt wird.

9.9 Horizontale Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge wird die horizontale Agarosegel-Elektrophorese verwendet. Dabei wandern die DNA-Fragmente aufgrund ihrer negativen Ladung von der Kathode zur Anode, wobei sie entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Agarosegelkonzentration wird nach der erwarteten Fragmentgröße gewählt.

Zur Herstellung des Agarosegels wird die Agarose in dem geeigneten Laufpuffer in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sie vollständig gelöst ist. Nach Abkühlung wird die Agarose in eine Gelwanne mit justiertem Kamm gegossen. Nach dem Erstarren der Agarose wird der Kamm sorgfältig entfernt und das Gel in eine mit entsprechendem Laufpuffer gefüllte Gelkammer gelegt. Die Spaltansätze werden mit 1/10 Volumen Stopppuffer versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe erfolgt bei 90 V über 2 h oder bei 35 V ÜN. Nach erfolgter Gelelektrophorese kann die aufgetrennte DNA durch Inkubation des Gels in einem Ethidiumbromid-Bad 15 min angefärbt und anschließend unter UV-Licht analysiert werden.

50 x Tris-Acetat (TAE):	242 g Tris-Base
	57,1 ml 99,7 % Essigsäure
	100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
	ad 1 l H ₂ O _{bidest}

10 x Tris-Phosphat (TPE):	108 g Tris-Base 15,5 ml 85 % Phosphorsäure 40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 ad 1 l H ₂ O _{bidest}
6 x Stop-Puffer:	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylen-Cyanol 15 % Ficoll Typ 400 in H ₂ O _{bidest}

9.10 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (Gene Clean-Kit, Dianova)

DNA-Fragmente werden durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt, anschließend mit Ethidium Bromid (EtBr) gefärbt und die gewünschte Bande unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Das Agarosestück wird in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend werden 3 Volumen einer NaI-Lösung in die Reaktionsgefäße pipettiert und die Agarosestücke bei 50 °C so lange inkubiert, bis die Agarose vollständig geschmolzen ist. Danach wird der Ansatz mit 5-10 µl Glassmilch versetzt, gut gemischt und 5 min auf Eis gestellt, wodurch die DNA an die Glasmilch binden kann. Anschließend wird die Glasmilch für ca. 5 sec abzentrifugiert und 3 x mit 300 µl „New-Wash“-Puffer gewaschen. Das Pellet wird nun in 10 µl H₂O_{bidest} aufgenommen und 5 min bei 50 °C inkubiert, um die DNA zu eluieren. Die Glasmilch wird 1 min abzentrifugiert, und der Überstand mit der gelösten DNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

9.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Vektor- und Insert-DNA werden für die Ligation aufgereinigt. Der Ligationsansatz enthält Vektor- und Insert-DNA in einem Verhältnis von 1:3 in insgesamt 15 µl H₂O_{bidest}. Dazu gibt man 4 µl 5 x Ligationspuffer und 1 µl T4 DNA Ligase (1 U). Bei Ligation von „sticky end“-Fragmenten erfolgt die Inkubation ÜN bei 14°C und bei „blunt end“-Fragmenten ÜN bei RT.

9.12 Klonierung von PCR-Fragmenten (Sure-Clone-Kit, Pharmacia)

Der „Sure-Clon-Kit“ ermöglicht die schnelle Klonierung von PCR-Fragmenten in die *Sma*I-Schnittstelle des Vektors pUC18 oder in jede beliebige „blunt-end“-Schnittstelle anderer

Vektoren. Die PCR-Produkte besitzen an ihren 3'-Enden einen zusätzlichen Adenin-Rest und an den 5'-Enden fehlt die Phosphatgruppe. Die zusätzlichen Adenin-Reste können durch eine Behandlung mit Klenow-Enzym entfernt und die fehlenden 5'-Phosphate durch die T4-Polynukleotidkinase synthetisiert werden. Dazu werden 1-16 µl PCR-Produkt, 1 µl Klenow-Fragment, 2 µl 10 x Blunting/Kinasing-Puffer, 1 µl Polynukleotid-Kinase in ein Eppendorf Reaktionsgefäß pipettiert und mit H₂O_{bidest} auf 20 µl aufgefüllt. Der Ansatz wird für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 10 µl Phenol und 10 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt, gevortext und 1 min abzentrifugiert. Die wässrige Phase wird auf eine mit 500 µl Sephadex-Material bestückte Säule gegeben, 30 sec abzentrifugiert und das Eluat für die Ligation verwendet. Für die Ligation werden 2-7 µl des Eluates, 1 µl (50 ng) dephosphorylierter Vektor, 10 µl 2 x Ligationspuffer, 1 µl DTT-Lösung sowie 1 µl T4 DNA Ligase zusammenpipettiert und mit H₂O_{bidest} auf ein Reaktionsvolumen von 20 µl aufgefüllt. Die Ligation erfolgt für 1-2 Stunden bei 16 °C. Für die Transformation werden 2-5 µl des Ansatzes eingesetzt.

9.13 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Zur Aufnahme von rekombinanten Plasmiden muß die bakterielle Zellwand und Zellmembran transformationskompetent gemacht werden.

CaCl₂-Methode

50 ml LB-Medium werden mit 500 µl Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer Dichte von OD₆₀₀ von 0,6-0,7 bei 37 °C geschüttelt. Die Bakterienkultur wird auf zwei sterile JA20-Röhrchen verteilt und 5 min bei 6000 Upm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Pellets werden in je 12,5 ml eiskalter, steriler 0,1 M CaCl₂-Lösung suspendiert und wieder abzentrifugiert (10 min, 6000 Upm, 4 °C). Die Pellets werden in insgesamt 2,5 ml 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach mindestens 20 min Inkubation auf Eis wird 550 µl 86%iges Glycerin zugegeben, aliquotiert (200 µl) und bei -80 °C gelagert.

Elektrokompetente *E. coli*-Zellen

5 ml einer ÜN-Kultur werden in LB-Medium (500 ml) gegeben und bis OD₆₀₀ 0,5 gezüchtet. Die Bakterienkultur wird dann auf 2 JA10-Röhrchen aufgeteilt und für 5 min bei 6000 Upm abzentrifugiert. Anschließend werden die Bakterien mit 100 % Volumen sterilem, 10 %igem

Glyzerin gewaschen. Nach Zentrifugation (10 min, 6000 Upm, 4 °C) erfolgen zwei weitere Waschschrte mit 50 % Volumen und 10 % Volumen Glyzerin. Die Zellen werden nun in 1,5 ml 10 % Glyzerin resuspendiert und in Aliquots zu 40 µl bei -70 °C aufbewahrt.

9.14 Transformation von Bakterienzellen

CaCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen

Die CaCl₂-kompetenten Zellen werden auf Eis aufgetaut. Danach wird 1-100 ng Plasmid-DNA oder 20 µl Ligationsansatz zu den Zellen pipettiert und mit diesen vermischt. Der Ansatz wird für 30-60 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA in die Zellen erfolgt durch einen Hitzeschritt für 90 sec bei 42 °C. Anschließend wird das Reaktionsgefäß 2 min auf Eis abgekühlt. In das Reaktionsgefäß wird 1 ml LB-Medium zugegeben und für 1-2 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Danach werden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand bis auf 100 µl entfernt. Das Pellet wird im restlichen Überstand resuspendiert und auf einer Selektionsagarplatte ausplattiert, die ÜN bei 37 °C bebrütet wird.

Elektroporation von *E. coli*

Ein Aliquot (40 µl) elektrokompentener Zellen wird langsam auf Eis aufgetaut und mit ca. 200 ng DNA versetzt. Dieser Ansatz wird in eine sterile und auf Eis vorgekühlte Küvette (2 mm Spalt) pipettiert. Die Zellen sollen den Küvettenboden vollständig bedecken. Anschließend werden die Kontaktstellen getrocknet und die Küvette in die Elektroporationsapparatur gestellt. Die Elektroporation erfolgt bei 2,0 kV, 600 Ω, 25 µF. Sofort danach wird die Suspension mit 1 ml vorgewärmten LB-medium aufgefüllt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen werden bei 37 °C für ca. 2 Stunden inkubiert und anschließend auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausplattiert (max. 200 µl/Platte).

9.15 Bakterielle Konjugation

Jeweils 1 ml einer ÜN-Kultur des Donor- und Rezipientenstammes werden in 20 ml LB-Medium verdünnt und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 geschüttelt. Es werden 100 µl von den beiden Kulturen miteinander gemischt, auf LB-Platten ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wird der Bakterienrasen mit 2 ml LB-Medium abgeschwemmt.

Diese Suspension wird entsprechend verdünnt und auf Selektionsplatten ausplattiert, die nur das Wachstum erfolgreicher Konjuganten zulassen.

9.16 Southern-Blot mit dem VakuGene Blotter (Pharmacia)

10 µg chromosomale DNA wird mit einem geeigneten Restriktionsenzym gespalten und in einem 1%igen TPE-Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wird angefärbt und die DNA im Anschluß durch Vakuumblotten auf eine Nylonmembran transferiert. Die Membran wird auf Gelgröße zurechtgeschnitten und nacheinander für 5 min in H_2O_{bidest} und 20 x SSC geschwenkt. Die Membran wird nun auf die angefeuchtete poröse Trägerplatte der Blotkammer gelegt und mit einer Plastikmaske so abgedeckt, daß die Maske die Membran um etwa 2-4 mm überlappt. Das Agarosegel wird anschließend luftblasenfrei auf das Maskenfenster gelegt, die Kammer mit dem Rahmen verschlossen und anschließend das Vakuum angelegt (50 mbar). Die Geloberfläche wird jetzt nacheinander für jeweils 8 min mit Lösung I (Depurinierungslösung), Lösung II (Denaturierungslösung) und Lösung III (Neutralisierungslösung) vollständig bedeckt. Anschließend wird das Gel mit der eigentlichen Blotlösung (20 x SSC) für 40-50 min überschichtet. Nach dem Blotten wird das Gel für je 60 s in 0,4 N NaOH und 0,2 M Tris-HCl pH 7,5 überschichtet. Zum Schluß wird die Nylonmembran auf Whatman-Papier getrocknet und die DNA in einem UV-Crosslinker (Einstellung laut Herstellerangabe) kovalent an die Membran gebunden.

Lösung I (Depurinierungslösung):	0,25 N HCl
Lösung II (Denaturierungslösung):	0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl
Lösung III (Neutralisierungslösung):	1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl pH 7,5
20 x SSC	300 mM Na-Citrat pH 7,0; 3 M NaCl

9.17 Nicht-radioaktive DNA-Markierung und Hybridisierung von DNA (ECL-Kit, Amersham)

Die Methode der nicht-radioaktiven DNA-Markierung mit dem „enhanced chemiluminescence“ (ECL)-Kit beruht auf der elektrostatischen Bindung von positiv

geladenen Komplexen des Enzyms Peroxidase an die negativ geladene DNA. Durch Zugabe von Glutaraldehyd wird diese lockere Bindung in eine kovalente Bindung umgewandelt. Nach der Hybridisierung werden die Hybridisierungssignale durch eine Lichtreaktion auf einem Blaulicht-empfindlichen Film nachgewiesen. Dazu wird eine Detektionslösung zu der Membran gegeben, die aus zwei Reagenzien besteht. Die Reduktion von Wasserstoffperoxid (Reagenz 1) durch die Peroxidase wird mit einer Lichtreaktion gekoppelt, bei der durch Oxidation aus Luminol (Reagenz 2) Blaulicht entsteht. Diese Reaktion wird durch die Anwesenheit eines Enhancers verstärkt.

Nach dem Southern Blot (siehe 9.16) wird die Membran in ein Hybridisierungsröhrchen überführt und mit 12 ml 42 °C warmem Hybridmix bedeckt. Die Vorhybridisierung erfolgt unter Rotation im Hybridisierungssofen für 1 h bei 42 °C. Während dieser Zeit werden 15 µl gereinigte DNA 10 min bei 95 °C denaturiert und sofort 5 min auf Eis abgekühlt. Der Ansatz wird mit 15 µl DNA-Labeling-Reagenz, das die Peroxidase enthält, versetzt, kurz gemischt und nach der Zugabe von 15 µl Glutaraldehyd für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die markierte Sonde wird zu der Vorhybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgt ÜN bei 42 °C im Hybridisierungssofen. Am nächsten Tag wird der Blot 1 x für 20 min und 2 x für 10 min in vorgewärmter Waschlösung I bei 42 °C und anschließend 2 x für 5 min in Waschlösung II bei RT gewaschen. Die Membran wird dann mit je 8 ml Detektionslösung 1 und 2 benetzt und unter Schwenken 1 min inkubiert. Dann wird der Filter in Folie eingeschlagen und ein Hyperfilm-ECL aufgelegt. Nach 3-5 min Exponierzeit wird der Film entwickelt.

9.18 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung basiert auf einer DNA-Kettenverlängerungs-Reaktion nach der Sanger-Methode (Sanger et al., 1977). Grundlage der Sequenzierung ist die Fähigkeit von DNA-Polmerasen, außer Deoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP's) auch 2',3'-Dideoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTP's) als Substrat zu verwenden. Den ddNTP's fehlt sowohl die 2'- als auch die 3'-Hydroxylgruppe, so daß ihr Einbau aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe zu einem Abbruch der wachsenden Primerkette führt. Bei der automatischen DNA-Sequenzierung wird ein fluoreszenzmarkierter Primer eingesetzt, mit dem mittels PCR in vier verschiedenen Reaktionsansätzen basenspezifische Kettenabbruchprodukte unterschiedlicher Länge erzeugt werden. Die Reaktionsgemische werden auf ein

Sequenziergel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und die durch das Gel wandernden Banden durch einen Laser detektiert. Die so erhaltenen Daten werden im Computer gespeichert und analysiert.

Für die Sequenzierung wurde der Sequenzierungskit der Firma Amersham und der Sequenzer Modell 4000 der Firma MWG-Biotech verwendet.

PCR-Ansatz:

DNA/Primer-Prämix:	DNA 100 ng/kb
	Primer 1 μ l (2 pmol)
	H ₂ O ad 13 μ l

Aus dem Prämix werden jeweils 3 μ l entnommen und in neue Reaktionsgefäße gegeben, in denen je 1 μ l der verschiedenen Nukleotidmischungen A, T, G und C vorgelegt ist. Diese Ansätze werden gut gevortext, zentrifugiert und mit einem Tropfen Paraffinöl überschichtet. Anschließend wird die PCR-Reaktion unter folgenden Bedingungen durchgeführt.

PCR-Reaktion:

95 °C	2 min	Denaturierung
30 Zyklen	45 sec	95 °C Denaturierung
	45 sec	Annealing
	45 sec	70 °C Extension

Nach Beendigung der PCR werden 3 μ l Stop-Puffer zu den Proben hinzugegeben und diese bis zum Auftragen auf das Gel bei 4 °C gelagert. Von den Proben werden jeweils 1,5 μ l auf das Gel aufgetragen.

9.19 Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität (Miller, 1972)

Zur Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität unter verschiedenen Wachstumsbedingungen werden die Bakterien in M9- oder LB-Medium angezogen. Zu verschiedenen Zeitpunkten werden die Bakterien geerntet, mit 0,9 % (w/v) NaCl gewaschen und auf eine OD₆₀₀ von 0,8-

0,9 eingestellt. Für jede Probe werden 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße vorbereitet, in die 0,9 ml Z-Puffer, 20 µl 0,1 % (w/v) SDS und 40 µl Chloroform vorpipettiert wurden. Nach der Zugabe von 200 µl Bakteriensuspension wird der Ansatz 20 s gevortext und 5 min bei 30 °C vorinkubiert. Anschließend werden 200 µl ONPG-Lösung zugesetzt und die Ansätze nach kurzem Mischen weiterhin bei 30 °C inkubiert, bis eine deutliche Gelbfärbung eintritt (15-45 min). Die Reaktion wird durch Zugabe von 0,5 ml 1 M Na₂CO₃ gestoppt und die Reaktionszeit notiert. Die Absorption wird bei 420 und 550 nm gemessen. Als Leerwert dient ein Ansatz, bei dem anstelle der Bakteriensuspension 0,9 % (w/v) NaCl zugegeben wurde.

Die β-Galaktosidaseaktivität wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Units} = \frac{1000 \times \text{OD}_{420} - (1,75 \times \text{OD}_{550})}{t \text{ (min)} \times 0,1 \times \text{OD}_{600}}$$

Z-Puffer:	Na ₂ HPO ₄	60 mM
	NaH ₂ PO ₄	40 mM
	KCl	10 mM
	MgSO ₄	1 mM
	β-Mercaptoethanol	50 mM
	pH auf 7,0 einstellen, bei 4 °C lagern	

ONPG-Lösung:	4 mg/ml ONPG in Phosphatpuffer (0,1 M K ₂ HPO ₄ und 0,1 M KH ₂ PO ₄ zu pH 7,0 mischen), bei -20 °C lagern	
---------------------	---	--

9.20 Die zweidimensionale Gelelektrophorese

Die eindimensionalen Elektrophoresen können im günstigsten Fall nur ungefähr 50-100 Proteine auftrennen. Für die Analyse von vielen hunderten Proteinen, wie sie in ganzen Zellen vorkommen, ist dieses Auflösungsvermögen unzureichend. Für diesen Zweck entwickelte O'Farrell die zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2-D PAGE), die die Proteine nach zwei unabhängigen Kriterien, nämlich Ladung und Molekulargewicht, trennt

und damit die Untersuchung von mehreren hundert Genprodukten auf einem einzigen Gel ermöglicht.

9.20.1 Probenvorbereitung

9.20.1.1 Gesamtzellextrakte (nicht radioaktiv)

Idealerweise sollte eine gelungene Probenvorbereitung für die 2D-Elektrophorese dazu führen, daß die Proteine des Ausgangsmaterials komplett gelöst, deaggregiert, denaturiert und reduziert vorliegen. Störende Substanzen wie Lipide, Nukleinsäuren und Salze, die die Qualität der 2D-Elektrophorese beeinflussen, sollten entfernt werden. Für die analytische 2D-Elektrophorese mit nachfolgender Silberfärbung wird ca. 100 µg Protein aufgetragen; im präparativen Modus mit nachfolgender Coomassie-Färbung können die IPG-Streifen 1-2 mg Protein aufnehmen. Mit Hilfe von der MultiPhor-Anlage von Pharmacia können max. 12 von 18 cm langen IPG-Streifen prozessiert werden.

Die Bakterien werden in M9-Medium angezogen und 20 min bei 6000 Upm abzentrifugiert. Das Pellet wird mit 20 ml Tris-HCl Puffer (pH 7,0) zweimal gewaschen und in 7 ml Puffer mit Proteaseinhibitor resuspendiert. Das Bakterienpellet wird dann entweder mit der French-Press oder durch Ultraschallbehandlung (siehe 9.23.1) aufgeschlossen. Die Zelltrümmer werden durch die Zentrifugation für 20 min und 6000 Upm abgetrennt. Der Überstand wird in neue Proberöhrchen überführt und die Proteinkonzentration wird bestimmt (nach Bradford). Zu den Proben wird der 0,1 x Volumen DNase (1 mg/ml), RNase A (0,25 mg/ml) und 50 mM MgCl₂ Lösung zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Die Proben werden entweder in der Vakuumzentrifuge eingengt oder mit 4 x Volumen Aceton gefällt. Das Proteinpellet wird entsprechend der Proteinmenge in Rehydratisierungspuffer aufgenommen.

9.20.1.2 Gesamtzellextrakte (radioaktiv markiert)

Die Bakterien wachsen in M9-Medium bis sie die mittlere logarithmische Phase erreicht haben. Dann werden 3 ml der Kultur schnell in 20 ml Kölbchen überführt und mit 30 µCi ³⁵S-Methionin (in 20 µl H₂O_{bidest} gelöst) versehen und 5 Minuten inkubiert. Nach der Markierung stoppt man die Proteinsynthese durch die Zugabe von 200 µl Stopplösung und sofortige Überführung auf Eis. Die Kultur wird anschließend bei 4 °C, 10 Minuten und 13000 Upm abzentrifugiert. Das Pellet wird zweimal mit je 400 µl Waschlösung gewaschen und bei -20 °C gelagert oder sofort weiter verarbeitet. Der Zellaufschluß erfolgt durch sechs

einminütige Ultraschallbehandlungen mit einer Nadelsonde in 300 µl Aufschlußpuffer. Im Anschluß daran werden die Zelltrümmer abzentrifugiert und das Proteinlysate in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dabei wird das Volumen genau bestimmt. Für die Bestimmung der eingebauten Radioaktivität (cpm-Bestimmung; cpm: vom Counter gezählte Impulse pro Minute) werden 2 x 5 µl vom Proteinlysate auf Filterscheiben getropft und mit Trichloressigsäure (TCA) behandelt. Hierfür werden die Filterscheiben 20 Minuten in 10%igen TCA auf Eis gehalten um die aufgetropften Proteine zu fällen. Danach erfolgt ein zehnmütiger Waschschrift in 5 %igen TCA. Anschließend werden die Filterscheiben 2 x 5 Minuten mit Ethanol (96%) gewaschen und an der Luft getrocknet. Die anschließende cpm-Bestimmung erfolgt mittels Flüssigszintillation, indem man 1 ml Szintillationsflüssigkeit auf eine Filterscheibe gibt. Die Messung erfolgt dann ÜN. Für die IEF werden 3 Millionen cpm angesetzt. Hierfür wird die entsprechende Menge des Lysats in der SpeedVac getrocknet und danach in 300 µl Rehydrationslösung aufgenommen.

Stopplösung:	Chloramphenicol	1 mg/ml
	Methionin	0,01 M
	Tris-HCl	0,1 M
		pH 7,5
Waschlösung:	Tris-HCl	0,1 M
	EDTA	0,001 M
		pH 7,5
Aufschlußpuffer:	Tris-HCl	0,01 M
	EDTA	0,001 M
	PMSF	0,002 M
	DNase	100 µg/ml
	RNase	50 µg/ml
	pH 7,5	

9.20.2 Rehydratisierung und Probenauftrag durch In-Gel Rehydratisierung

Die getrockneten IPG-Streifen müssen vor Beginn der Fokussierung für 12-24 h rehydratisiert werden. Dazu pipettiert man die Rehydratisierungslösung in die Mitte der einzelnen

Vertiefungen des Kunststoffeinsatzes und legt die IPG-Streifen luftblasenfrei mit der Gelseite nach unten hinein. Die Menge an Rehydratisierungslösung richtet sich nach der Länge der IPG-Streifen. Für 180 mm lange IPG-Streifen werden 400 µl Lösung benutzt. Der Probenauftrag kann auf zwei Wegen durchgeführt werden. Entweder löst man die in der Vakuumzentrifuge getrocknete Probe mit der Rehydratisierungslösung oder man appliziert die Probe (ca. 100-200 µl) nach beendeter Rehydratisierung über Whatman-Streifen auf die IPG-Streifen. Nach der Rehydratisierung werden die IPG-Streifen mit deionisiertem Wasser gewaschen.

Rehydratisierungslösung:

8 M Harnstoff	2,4 g
1,5 M Thioharnstoff	0,76 g
12,9 mM DTT	50 mg
1% CHAPS	50 mg
0,04% Pharmalyte 3-10	26 µl
auf 5 ml H ₂ O _{bidest} auffüllen	

9.20.3 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung

Der erste Schritt bei der zweidimensionalen Trennung von Proteinen ist die Durchführung der isoelektrischen Fokussierung, die mit immobilisiertem pH-Gradienten (IPG) durchgeführt wird. Der immobilisierte pH-Gradient entsteht durch Kopolymerisation der *Immobiline*[®] (Acrylamidderivate mit puffernden Gruppen) mit den Acrylamidmonomeren. In der Praxis werden Polymerisationslösungen, die dem Anfangs- bzw. Endpunkt des pH-Gradienten entsprechen, mit einem Gradientenmischer erzeugt. Die isoelektrische Fokussierung mit immobilisierten pH-Gradienten wird auf Flachgelen durchgeführt, die auf Folie aufpolymerisiert sind. Die Oberfläche vom Kühlblock der Multiphor II-Anlage wird mit 2-3 ml Kerosene überschichtet und die „IPG-Streifen-Wanne“ luftblasenfrei daraufgelegt. Die IPG-Streifen werden mit dem positiven Ende zur Anode hingelegt. Mit Hilfe der IEF-Multiphor Cell von Pharmacia können max. zwölf 18 cm lange IPG-Streifen prozessiert werden. An beiden Enden der IPG-Streifen werden die Elektroden-Streifen draufgelegt, die mit deionisiertem Wasser befeuchtet sind. Auf die Elektroden-Streifen werden die Elektroden gelegt und alles wird mit Kerosene überschichtet. Die Multiphor II Kammer wird geschlossen, auf 20 °C gekühlt und der IEF-Lauf gestartet. Die Laufbedingungen sind von dem

pH-Gradienten und der Länge der IPG-Streifen abhängig. In dieser Arbeit wurden nur 18 cm lange IPG-Streifen benutzt.

Laufbedingungen:

				pH 4-7	pH6-11
1. Stufe	500V	1 mA	5W	2 h	2 h
2. Stufe	500V	1 mA	5W	2 h	5 h
3. Stufe	1500V	1 mA	5W	2 h	2 h
4. Stufe	3500V	1 mA	5W	2 h	2 h
5. Stufe	3500V	1 mA	5W	15 h	10 h

9.20.5 Aufbewahrung der IPG-Streifen und Äquilibration

Die IPG-Streifen werden nach dem Lauf aus der Kammer entnommen und entweder sofort weiterverwendet oder bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Alufolie gelagert. Bevor die IEF-Gele auf die Oberfläche eines SDS-Gels aufgelegt werden können, müssen die fokussierten Proteine noch mit SDS beladen werden, um einen optimalen Proteintransfer von der 1. zur 2. Dimension zu erzielen. Die im IPG-Gel fixierten funktionellen Gruppen der Immobiline R verursachen im Kontaktbereich von IPG-Gel und horizontalem SDS-Gel elektro-endoosmotische Effekte, die zu einem unvollständigen Proteintransfer führen. Durch Zugabe von 30 % Glycerin und 6 M Harnstoff zum Äquilibrationpuffer werden die Probleme gelöst. Die IPG-Streifen werden 2 x 15 min in 2 x 7 ml Äquilibrationlösung geschüttelt. Die Lösung des ersten Äquilibrationsschrittes enthält zusätzlich 1 % w/v DTT, die des zweiten 260 mM Jodacetamid, um Streifenbildung im silbergefärbten 2-D Gel zu vermeiden.

Äquilibrationlösung:

6 M Harnstoff	36 g
30 % Glycerol	34,8 ml
4 % SDS	4 g
50 mM Tris/HCl pH 6,8	10 ml
auf 50 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auffüllen	

A: 22,7 mM DTT (3,5 mg/ml)

B: 45 mg/ml Iodacetamid

Nach der Äquilibration werden die Streifen auf die Geloberfläche der 2. Dimension aufgelegt.

9.20.6 Die zweite Dimension: Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Die Proteine in der 2. Dimension werden durch eine diskontinuierliche SDS-PAGE aufgetrennt. Ein SDS-Gel besteht aus einem Trenn- und einem Sammelgel. Zunächst wird das Trenngel zwischen zwei Glasplatten, die durch 0,75 mm Spacer voneinander getrennt werden, bis etwa 2 cm unter den oberen Rand gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Die Acrylamidkonzentration des Trenngels wird in Abhängigkeit von der Größe der Proteine, die aufgetrennt werden sollen, gewählt. Nach 1 h wird das Isopropanol entfernt und das Sammelgel (4%ig) auf das Trenngel gegossen. Auch das Sammelgel wird mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation des Sammelgels wird der äquilibrierte IPG-Streifen luftblasenfrei aufgelegt und mit heißer Agarose überschichtet. Das Gel wird dann vertikal in der Gelelektrophoresekammer befestigt. Die Gelkammer wird mit 1 x Elektrophoresepuffer gefüllt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt ÜN bei 20 mA. Am nächsten Tag können die Proteine durch Anfärbung (Coomassie-Blau-Färbung, Silberfärbung) sichtbar gemacht werden.

Agarose zum Einbetten der IPGs ins 2D-Gel:

0,5 % Agarose in SDS-Laufpuffer

0,5 g Agarose

2,3 g SDS

12,5 ml 0.5 M Tris/HCl pH 6.8

auf 100 ml mit H₂O_{bidest}

10 x Elektrophoresepuffer:	Tris	30 g
	Glycin	144 g
	10 % SDS	100 ml
	H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml

Trenngel (12 %, w/v)	30 % Acrylamid und	
	0,8 % Bisacrylamid-Lsg	16 ml
	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	7,5 ml
	H ₂ O _{bidest}	15,7 ml
	10 % SDS	0,4 ml
	APS (100 mg/ml)	0,4 ml
	TEMED	0,016 ml
4% Sammelgel	30 % Acrylamid und	
	0,8 % Bisacrylamid-Lsg	1,5 ml
	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	2,25 ml
	H ₂ O _{bidest}	5 ml
	10 % SDS	0,09 ml
	APS	0,09 ml
	TEMED	0,008 ml

9.21 Membranprotein-Isolierung für die Zweidimensionale Gelelektrophorese

9.21.1 Phosphat-Methode (O'Connor 1996)

Die Bakterien werden in LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 1,2 bzw 1,5 angezchtet und dann abzentrifugiert. Das Pellet werden mit 0,9 % NaCl zweimal gewaschen und in Phosphat-Puffer (pH 6,0) resuspendiert. Die Zellen wurden durch Ultraschall aufgebrochen. Die Zelltrümmer werden bei 4 °C und 6000 Upm abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Es folgt eine Ultrazentrifugation für 1 Stunde bei 32000 x g und 4 °C. Das Pellet wird zweimal mit H₂O_{bidest} gewaschen und anschließend im Solubilisierungspuffer (9 M Harnstoff, 2 % [w/v] Triton X-100, 2 % 2-Mercaptoethanol, 2 % Pharmalyte 3-10) gelöst. Es folgt die Ultrazentrifugation bei 32000 x g und 15 °C. Der Überstand wird mit kaltem Aceton ÜN gefällt (1:4). Danach werden die Proteine durch 15 min Zentrifugation bei 6000 Upm und RT pelletiert und luftgetrocknet. Das Proteinpellet wird dann in

Solubilisierungspuffer aufgenommen und durch längeres Schütteln gelöst. Nichtlösliche Bestandteile werden abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt.

9.21.2 Die Saccharose-Methode

Die Bakterien werden bei 37 °C bis OD₆₀₀ von 0,5 bzw. 1,0 angezogen. Jeweils 1 ml Kultur wird abzentrifugiert, das Pellet wird in 225 µl Puffer 1 resuspendiert und nach der Zugabe von 25 µl eiskalten 5 mM EDTA (pH 8) und 25 µl Lysozym (6,4 mg/ml) kurz gevortext. Anschließend wird sofort 250 µl Puffer 2 zugegeben und 15 Minuten auf Eis gestellt. Danach werden 1 ml H₂O_{bidest} und 10 µl von 1M MgSO₄ zugefügt und dann 1 h bei 18000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand I wird für die weitere Periplasmaprotein-Isolation verwendet. Dafür wird der Überstand mit 10 % TCA Endkonzentration ÜN gefällt und am nächsten Tag abzentrifugiert und zweimal mit Aceton gewaschen. Das Sediment wird in 80 µl H₂O_{bidest} und 20 µl Laemmli-Puffer gelöst und 10 min bei 100 °C inkubiert. Die Proteine werden auf Mini-SDS-Gelen aufgetrennt.

Im Sediment I befinden sich die Gesamtmembranproteine. Das Sediment I wird mit 50 bis 100 µl 50 mM Tris-HCl (pH 8) überschichtet und nach fünfminütiger Zentrifugation entweder auf ein Gel aufgetragen oder weiter verarbeitet. Um die Außenmembran- von den Cytoplasmamembranproteinen zu trennen wird das Sediment I in 100 µl Puffer 3 resuspendiert. Innerhalb der dreißigminütigen Inkubation bei RT wird die Probe jede 5 min resuspendiert und anschließend 10 min in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Im Sediment II befinden sich die Außenmembranproteine. Für die eindimensionale Gel-Elektrophorese wird das Sediment II mit 50 µl 50 mM Tris-HCl (pH 8) überschichtet und 5 min zentrifugiert. Das Sediment wird dann in 80 µl H₂O_{bidest} und 20 µl Laemmlipuffer gelöst und 10 min bei 100 °C inkubiert. Die Proteine werden auf Mini-SDS-Gelen aufgetrennt. Für die zweidimensionale Gel-Elektrophorese werden jeweils mehrere Proben in 200 µl Rehydratisierungspuffer (siehe 9.20.2) resuspendiert, vereinigt und anschließend mit 10 % Endkonzentration TCA ÜN bei 4 °C gefällt. Am nächsten Tag wird die Probe 10 min bei 13000 Upm abzentrifugiert und dann zweimal mit eiskaltem Aceton gewaschen. Das Pellet wird dann 5 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet und im Rehydratisierungspuffer gelöst und wie 9.20.2 beschrieben weiter verarbeitet. Die Zytoplasmamembranproteine befinden sich im Überstand II. Der Überstand II wird mit 10 % TCA Endkonzentration, ÜN gefällt und am nächsten Tag 10 min bei 13000 Upm abzentrifugiert und zweimal mit Aceton gewaschen. Nach dem Trocknen in der Vakuumzentrifuge wird die Probe in 40 µl H₂O_{bidest} und 10 µl Laemmlipuffer

aufgenommen und 10 min bei 100 °C inkubiert. Die Proteine werden auf Mini-SDS-Gelen aufgetrennt.

Puffer 1:	0,2 M Tris-HCl 0,5 M Sucrose pH 8,0
Puffer 2:	0,2 M Tris-HCl 5 mM EDTA pH 8,0
Puffer 3:	50 mM Tris-HCl 10 mM MgCl ₂ 2 % Triton X-100 1 mg DNase

9.22 Isolation extrazellulärer Proteine für die zweidimensionale Gelelektrophorese

Nach der Ernte bei der gewünschten OD₆₀₀ werden die Zellen 10 min bei 8000 Upm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wird sterilfiltriert und ÜN bei 4 °C mit 10 % TCA Endkonzentration gefällt. Danach werden die extrazellulären Proteine durch 30 min Zentrifugation bei 8000 Upm und 4 °C pelletiert, mindestens zweimal mit 100 % unvergälltem Ethanol gewaschen und danach jeweils für 10 min bei 8000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wird das Proteinpellet nach Abkratzen mit einem Spatel in ein Eppendorfgefäß mit 1 ml Ethanol überführt und dort noch zwei weitere Male gewaschen. Das Pellet wird nach Entfernen des Ethanols getrocknet und schließlich in TE-Puffer mit Proteaseinhibitor aufgenommen. Durch längeres Schütteln gehen die Proteine in Lösung. Nichtlösliche Bestandteile werden abzentrifugiert.

9.23 Zellaufschluß für die zweidimensionale Gelelektrophorese

9.23.1 Aufschluß durch Ultraschall

Für die Herstellung eines Proteinkonzentrates durch Ultraschall werden 100 ml einer Kultur für 20 min bei 6000 Upm abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wird zweimal mit TE-Puffer gewaschen und in 5 ml Tris/EDTA/MgCl₂-Puffer aufgenommen und in Intervallen von ca. 30

sec solange beschallt, bis die Lösung deutlich aufgeklart ist. Während der Beschallung wird die Probe auf Eis gekühlt, um ein Erhitzen und damit die Zerstörung der Proteine zu verhindern. Anschließend werden die Zelltrümmer für 10 min bei 6000 Upm und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand bei –20 °C gelagert.

9.23.2 Aufschluß durch das French-Press-Verfahren

Das durch Zentrifugation erhaltene Zellpellet werden zweimal mit TE-Puffer (pH 7,5) gewaschen und anschließend in 3 bis 5 ml Tris/EDTA/MgCl₂-Puffer mit Proteaseinhibitor aufgenommen. Der Aufschluß der Zellen erfolgte mittels einer French-Press bei einem Druck von 12000 psi. Nach dem Abzentrifugieren der Zelltrümmer wurde das Lysat bei –20 °C aufbewahrt.

9.24 Proteinbestimmung

9.24.1 Proteinbestimmung nach Layne (1957)

Bei dieser Methode wird die Proteinkonzentration durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt. Hierzu wird die Proteinlösung so verdünnt, daß der Absorptionswert zwischen 0,1 und 1,0 liegt. Als Referenz wird der Lösungspuffer eingesetzt. Die Messung erfolgt in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. Für Proteingemische mit unbekanntem Absorptionskoeffizienten gilt annäherungsweise:

$$1,0 \times A_{280} = 1,0 \text{ mg/ml}$$

9.24.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Für die quantitative Gesamt-Proteinbestimmung der Bakterienlysate wurde der BCA (bicinchonicic acid) Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, Illinois, USA) verwendet. Sowohl von der Proteinstandard-Lösung als auch von den Bakterienlysate (100 µl) wurden Verdünnungsreihe hergestellt. Mittels der jeweils gemessenen Absorptionswerte und den bekannten Konzentrationen der Proteinstandard-Lösung wurden die gesuchten Proteinkonzentrationen der Bakterienlysate errechnet.

9.25 Proteinnachweismethoden

Die Proteine werden als gefärbte Komplexe nach ihrer Reaktion mit Farbstoffen oder Silbersalzen detektiert.

9.25.1 Coomassie-Blau-Färbung

Das Proteingel wird ÜN in der Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Anschließend wird das Gel in die Entfärbelösung überführt und mehrere Stunden bei RT geschüttelt. Dabei wird die Entfärbelösung mehrmals gewechselt.

Coomassie-Färbelösung: 0,2 % Coomassie Brilliant Blue R250 in
Methanol / Essigsäure / H₂O (Verhältnis 5:1:5)

Entfärbelösung: Methanol / Essigsäure / H₂O (Verhältnis 5:1:5)

9.25.2 Silberfärbung, modifiziert nach Blum et al. (1987)

Die Nachweisgrenze der Färbemethode beträgt ca. 10 ng Protein. Außerdem können die Proteine auch für eine MALDI-TOF Analyse eingesetzt werden.

Fixierlösung:	40 % Ethanol 10 % Eisessig
Waschlösung:	50 % Ethanol
Thiosulfatlösung:	0,02 % (w/v) Natriumthiosulfat
Silbernitratlösung:	0,2 % Silbernitrat
Entwicklerlösung:	2 % (w/v) Natriumcarbonat 0,05 % (v/v) Formaldehydlösung (37%ig)
Stopplösung:	1 % Glycin

Durchführung:

Fixierlösung:	2 h oder über Nacht
Waschlösung:	3 x 20 min
Thiosulfatlösung:	1 min
dest. Wasser:	2 x 20 sec
Silbernitratlösung:	20 min
dest. Wasser:	2 x 20 sec
Entwicklerlösung:	bis die Proteine sichtbar sind
Stopplösung:	10 min
dest. Wasser:	30 min

9.26 Western-Hybridisierung (Laemmli, 1970)

Zur Untersuchung der Expression des OmpT Proteins werden die Extrakte der Membranpräparation (siehe 9.21.2) angesetzt. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proteinbestandteile werden diese auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und das zu untersuchende Protein durch einen spezifischen Antikörper detektiert. Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird wie unter 9.20.6 beschrieben durchgeführt. Für die Ausbildung von Auftragstaschen im Sammelgel wird hier ein Gelkamm zwischen die Glasplatten eingeschoben. Die Gele werden im Mini-Format durchgeführt.

9.26.1 Western-Blot

Die mit SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine werden im Western-Blot auf einen Nitrozellulosefilter (Schleicher & Schuell BA S85 reinforced, 0,45 µm) übertragen. Durch eine antigenspezifische Antikörperreaktion kann dann ein bestimmtes Protein aus dem Gemisch an aufgetrennten Proteinen sichtbar gemacht werden. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgt horizontal in einer Blotapparatur mit Graphitplatten. Zuerst werden die Nitrozellulosemembran und 12 Whatmanpapierfilter auf Gelgröße zurechtgeschnitten. Die Membran wird 10 min in Anodenpuffer II inkubiert. Auf die mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ befeuchtete untere Graphitplatte legt man zunächst 6 Lagen mit Anodenpuffer I getränktem Whatmanpapiere, dann 3 Lagen mit Anodenpuffer II befeuchteten Papierfilter und auf diese die eingeweichte Nitrozellulosemembran. Auf diese wird dann das Gel gelegt und mit 3 Lagen in Kathodenpuffer getränktem Whatmanpapier bedeckt. Im Aufbau vorhandene Luftblasen

werden entfernt, bevor die obere Graphitplatte aufgelegt wird. Der Transfer erfolgt mit $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gelfläche für 1 h bei RT.

Anodenpuffer I:	Tris	0,3 M
	Methanol	20 % (v/v)
Anodenpuffer II:	Tris	25 mM
	Methanol	20 % (v/v)
Kathodenpuffer:	Tris	25 mM
	ϵ -Amino-n-capronsäure	40 mM
	Methanol	20 % (v/v)

9.26.2 Antikörperreaktion

Nach dem Elektrobotten werden zuerst die freien Proteinbindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran durch einstündige Inkubation in TBST mit 5 % Magermilch bei RT abgesättigt. Anschließend wird der Blot 1 h bei RT oder ÜN bei 4 °C in der Primär-Antikörperlösung inkubiert. Die Verdünnung des Primär-Antikörpers ist abhängig vom jeweiligen Serum und erfolgt in TBST mit 3 % Magermilch. Die Primär-Antikörperlösung wird abgezogen (kann erneut verwendet werden) und es wird 3 x 10 Minuten mit TBST gewaschen. Im Anschluß erfolgt eine einstündige Inkubation mit einem peroxidasegekoppelten Sekundär-Antikörper. Anschließend wird wiederum 3 x 10 Minuten mit TBST gewaschen und der Blot entwickelt. Als Substrat verwendet man die ECL-Entwicklungslösung (siehe 9.16).

TBST-Lösung:	Tris-HCl	10 mM
	NaCl	150 mM
	Tween 20	0,05 %
		pH 8

9.27 MALDI-TOF Massenspektrometrie

9.27.1 Verdau im Gel

Die Protein-Spots werden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und dreimal mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen. Anschließend werden die Gelstückchen dreimal mit 100 mM Ammonium-Bicarbonat gewaschen und vollständig unter Stickstoff getrocknet. Danach werden die Gelfragmente in 10-30 μl 100 mM Ammonium-Bicarbonat rehydratisiert und Trypsin wird zugesetzt. Der Verdau erfolgt bei 37 °C ÜN.

9.27.2 Probenvorbereitung für MALDI-TOF Massenspektrometrie

Die Matrix wird aus α -Cyano-4-hydroxycinnaminsäure in Aceton mit der Lösung der Nitrozellulose in Aceton (10 mg/ml) im Verhältnis 4:1 (v/v) zusammengemischt und 0,5 μl auf den Probenträger aufgetropft. Auf die Matrix wird dann ein kleiner Tropfen 1%ige TCA-Lösung aufgegeben und 1 μl des Überstandes vom Verdau aufpipettiert. Die Proben werden dann getrocknet und anschließend dreimal mit 10 μl 0,1%iger TCA gewaschen.

9.27.3 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Die MALDI Massenspektren werden mit einem Bruker REFLEX Mass Spektrometer bestimmt. Für die Kalibrierung wird Trypsin-Autolyseprodukt als interner Standard angesetzt.

9.27.4 Auswertung der Spektren

Für die Auswertung wird das MS-FIT Programm, das von der Universität Californien in San Francisco zu Verfügung gestellt ist, benutzt (UCSF, <http://prospector.ucsf.edu>). Es werden folgende Suchparameter eingegeben: Stamm *Escherichia coli*, Protease Trypsin, modifizierte Cysteinreste (S-Carbamido-methylcystein), Peptidmassen Monoisotopisch, maximaler Unterschied zwischen kalkulierten und gemessenen Massen 100 ppm. Mindestens bei vier sich gleichenden Peptiden wird die Suche als Erfolgreich angesehen.

9.28 Qualitative Agglutination

Antikörperagglutinationstest

Zum Nachweis von S- bzw. Prf-Fimbrien werden 10 µl Bakterienkultur auf einen Glasobjektträger getropft. Anschließend wird der jeweilige Antikörper zugegeben (Verdünnung 1:100). Die Inkubation erfolgt für 5 min auf Eis. Bei Fimbrien-positiven Stämmen ist nach dieser Zeit eine Verklumpung festzustellen.

Hefeagglutinationstest (Ørskov and Ørskov, 1983)

Typ 1-Fimbrien lassen sich durch mannosensitive Agglutination mit *S. cerevisiae* nachweisen. Dazu wird eine Spatelspitze frischer Bäckerhefe in 1 ml 0,9 % NaCl suspendiert. 30 µl der zu testenden Bakterienkultur werden mit dieser Suspension vermischt auf einen Glasobjektträger pipettiert. Die Inkubation erfolgt für einige Minuten auf Eis. Bei agglutinationspositiven Stämmen ist eine Verklumpung der Hefezellen zu beobachten. In Gegenwart von Mannose wird die Agglutination verhindert.

9.29 Nachweis der Hämolyseproduktion

Von einer ÜN-Kultur wird eine Verdünnungsreihe erstellt und die Bakterien so auf Blutagarplatten ausplattiert, daß Einzelkolonien entstehen. Die Platten werden bei 37 °C ÜN inkubiert. Bei hämolysepositiven Bakterien bildet sich um die einzelne Kolonie ein Lysehof, der durch die Lysierung der Erythrozyten zustanden kommt.

9.30 Nachweis der Enterobaktinproduktion

Die Bakterien werden so auf CAS-Agarplatten ausplattiert, daß die Einzelkolonien ungefähr gleich groß sind. Die Platten werden bei 37 °C ÜN inkubiert. Bei Enterobaktinpositiven Bakterien bildet sich um die einzelne Kolonie ein Hof.

9.31 Nachweis der Flagelleproduktion

In der Mitte von Schwärmagarplatten werden mit dem Zahnstocher einzelne Kolonien aufgestochen. Die Platten werden bei 37 °C ÜN inkubiert. Bei Flagellapositiven Bakterien bildet sich um die aufgestochene Kolonie ein kreisrunder Schwärmhof.

9.32 Nachweis der Serumresistenz

Eine ÜN-Kultur der zu untersuchenden Stämme wird jeweils 1:20 in 10 ml LB verdünnt und bis zu einer OD von 90 Klett bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen werden 2 x mit 0,9 % Saline gewaschen und bei 4000 Upm, 10 min abzentrifugiert. Nach Aufnahme in 5 ml 0,9 % NaCl wird eine Verdünnungsstufe von 10^{-2} erstellt. Diese entspricht der Ausgangsverdünnung (10^0) für den weiteren Versuch. Zur Bestimmung der Keimzahlen zum Zeitpunkt t_0 wird eine Verdünnungsreihe der Bakteriensuspension bis 10^{-4} erstellt und jeweils 100 µl der Verdünnungsstufen 10^{-3} und 10^{-4} auf LB-Agarplatten ausplattiert. Das Wachstum der Bakterienstämme wird in 90%igem Humanserum überprüft. Dazu werden 450 µl Humanserum mit 50 µl Bakteriensuspension der Ausgangsverdünnungsstufe (10^0) in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß gemischt und 3 h bei 37 °C geschüttelt. nach 1, 2 und 3 h werden diesem Ansatz jeweils 100 µl entnommen, eine Verdünnungsreihe bis 10^{-4} erstellt und die Verdünnungsstufen 10^{-3} und 10^{-4} auf LB-Agarplatten ausplattiert. nach Inkubation der LB-Agarplatten ÜN bei 37 °C können die Keimzahlen in Kolonie-bildenden Einheiten/ml (CFU/ml) kalkuliert werden.

9.33 Bestimmung der minimalen Inhibitionskonzentration (MIC) der kationischen antimikrobiellen Peptide (Steinberg et al., 1997)

Die Stämme werden ÜN bei 37 °C in MHB Medium angezogen, dann in MHB auf ungefähr $10^5 - 10^6$ CFU/ml verdünnt und jeweils 100 µl eines Stammes in eine Reihe einer U-förmigen Platte mit 96 Vertiefungen (Polypropylen, COSTAR) pipettiert. Für die Peptide werden Stammlösungen in 0,01 % Essigsäure hergestellt (in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aus Polypropylen). Für den eigentlichen Versuch wurden die Peptide weiter mit 0,01 % Essigsäure mit 0,02 % BSA verdünnt. Diese 10fach Stammlösungen wurden seriell 1:2 mit 0,01 % Essigsäure mit 0,02 % BSA in 1,5 ml Reaktionsgefäßen verdünnt und jeweils 11 µl pro Ansatz und Stamm zugegeben. Pro Stamm blieb ein Ansatz ohne Zugabe von kationischen Peptiden, um Wachstumsdefekte auszuschließen, die nicht auf die Peptide

zurückzuführen waren. Die Mikrotiterplatten wurden in einem Container mit feuchten Tüchern für 18 h bei 37 °C inkubiert und dann wurde das Wachstumsverhalten ermittelt. Die MIC ist dabei die Konzentration an Peptiden, bei der optisch kein Wachstum mehr zu erkennen ist. Die Bestimmung der MBK (minimale bakteriozide Konzentration) erfolgte durch Ausplattieren jeweils eines Aliquots aus vier nacheinander folgenden Ansätzen, beginnend mit der Verdünnung ohne optisches Wachstum. Die MBK ist definiert als die Konzentration an Peptid, bei der keine überlebenden Zellen mehr vorhanden waren.

V

Ergebnisse

1 Proteomanalyse des uropathogenen Stammes *E. coli* 536

In den letzten Jahren wurden verschiedene molekularbiologische Methoden entwickelt, die zur Detektion und Charakterisierung von Virulenzfaktoren eines Organismus geeignet sind. Dazu gehören auch Analysen, die mit den Begriffen „Genomics“ und „Proteomics“ beschrieben werden. Die zahlreichen Genomsequenzierungsprojekte haben einen Fortschritt im Bereich der „Proteomics“ ermöglicht. Die Veröffentlichung der DNA-Sequenz des *Escherichia coli* K-12 Stammes MG1655 vereinfacht also auch die Proteomanalyse von pathogenen *E. coli* Stämmen, da die Identifizierung von Proteinspots durch massenspektrometrische Verfahren möglich ist. Außerdem stellt die Genomsequenz lediglich den Bauplan eines Organismus dar, wohingegen das Proteom eine lebende Zelle in molekularen Dimensionen abzubilden vermag. Man erhofft sich mit den zweidimensionalen Gelen einen Einblick in die komplexen Veränderungen im Proteinsyntheseprofiling eines Organismus in Abhängigkeit vom Stammhintergrund oder von den Wachstumsbedingungen. Mit der Untersuchung von Proteinexpressionsmustern bei Wildtypstämmen und apathogenen Mutanten ist es möglich, neue potentielle Virulenzfaktoren oder Proteine zu finden.

Der uropathogene *E. coli* Stamm 536 exprimiert eine Reihe von Virulenzfaktoren, die entweder pathogenitätsinselnkodiert vorliegen oder über die *leuX*-kodierte tRNA_{5^{Leu}} reguliert werden. Für die Untersuchung des Einflusses der Pathogenitätsinseln I₅₃₆ und II₅₃₆ und der *leuX*-kodierten tRNA_{5^{Leu}} auf die Proteinexpression wurden zweidimensionale Gele mit immobilisierten pH-Gradienten vom Stamm *E. coli* 536 und seinen Derivaten durchgeführt. Es wurden sowohl radioaktiv markierte, analytische (für Silberfärbung) wie auch präparative (für Coomasiefärbung) Gele durchgeführt. Außerdem wurden verschiedene Zellfraktionen aufgetrennt. In der Tabelle 1 sind die Stämme und deren Eigenschaften zusammengefaßt. Für alle weiteren Untersuchungen wurden immer die gleichen Stämme benutzt.

Tab. 8: Eigenschaften des uropathogenen *E. coli* Stammes 536 und seiner Derivate.

Eigenschaften	Stamm			
	536	536-21	536Δ102	536R3
<i>leuX</i>	+	-	-	+
Pai I ₅₃₆	+	-	+	-
Pai II ₅₃₆	+	-	+	-
Typ 1-Fimbrien	+	-	-	+
S-Fimbrien	+	-	+	-
Prf-Fimbrien	+	-	+	-
Hämolysin	+	-	(+)	-
Flagelle	+	-	-	+
Enterobaktin	+	-	-	+
Überleben im Gegenwart von kationischen Peptiden	(+)	(+)	(+)	(+)
Serumresistenz	+	-	-	+

+ Eigenschaft ist bei dem Stamm vorhanden

(+) Eigenschaft ist im geringeren Masse im Vergleich zu dem Wildtyp exprimiert

- Eigenschaft ist bei dem Stamm nicht vorhanden

1.1 2-D Analyse des Proteinexpressionsmusters des *E. coli* Stammes 536 und seiner Derivate nach radioaktiver Markierung der Proteine

Die elektrophoretische Auftrennung der radioaktiv markierten Proteine ermöglichen eine Analyse von Proteinen, die nur innerhalb der Markierungszeit synthetisiert werden. Es werden dabei auch Proteine erfaßt, die in sehr kleinen Mengen vorkommen oder sehr schnell in der Zelle exprimiert werden.

Die Experimente wurden unter der Anleitung von Frau S. Gertz im Labor von Prof. Dr M. Hecker in Greiswald durchgeführt. Die Bakterien wurden unter gleichen Bedingungen in M9-Medium angezüchtet und in der mittleren logarithmischen Wachstumphase geerntet. Zur Markierung wurde 10 µCi ³⁵S-Methionin angesetzt. Nach dreiminütiger Markierung wurde die Proteinsynthese mit Chloramphenicol gestoppt, so daß keine neuen Proteine während des

Zellaufschlusses synthetisiert werden konnten. Die Zellen wurden mit Ultraschall aufgeschlossen und die Proteinmenge über die Bestimmung der eingebauten Radionuklide (cpm-Bestimmung; cpm: vom Counter gezählte Impulse pro Minute) festgestellt. Für die Gele wurde eine Proteinmenge verwendet, die 3 Millionen cpm entsprach. Es wurden von jedem Stamm zwei unabhängige Präparationen durchgeführt. Anschließend wurde aus jeder Präparation jeweils eine zweidimensionale Gelelektrophorese durchgeführt. Die Gele wurden nach dem Trocknen, nach drei Tagen Exposition mittels eines Phosphor-Imager ausgewertet (siehe Abb.4).

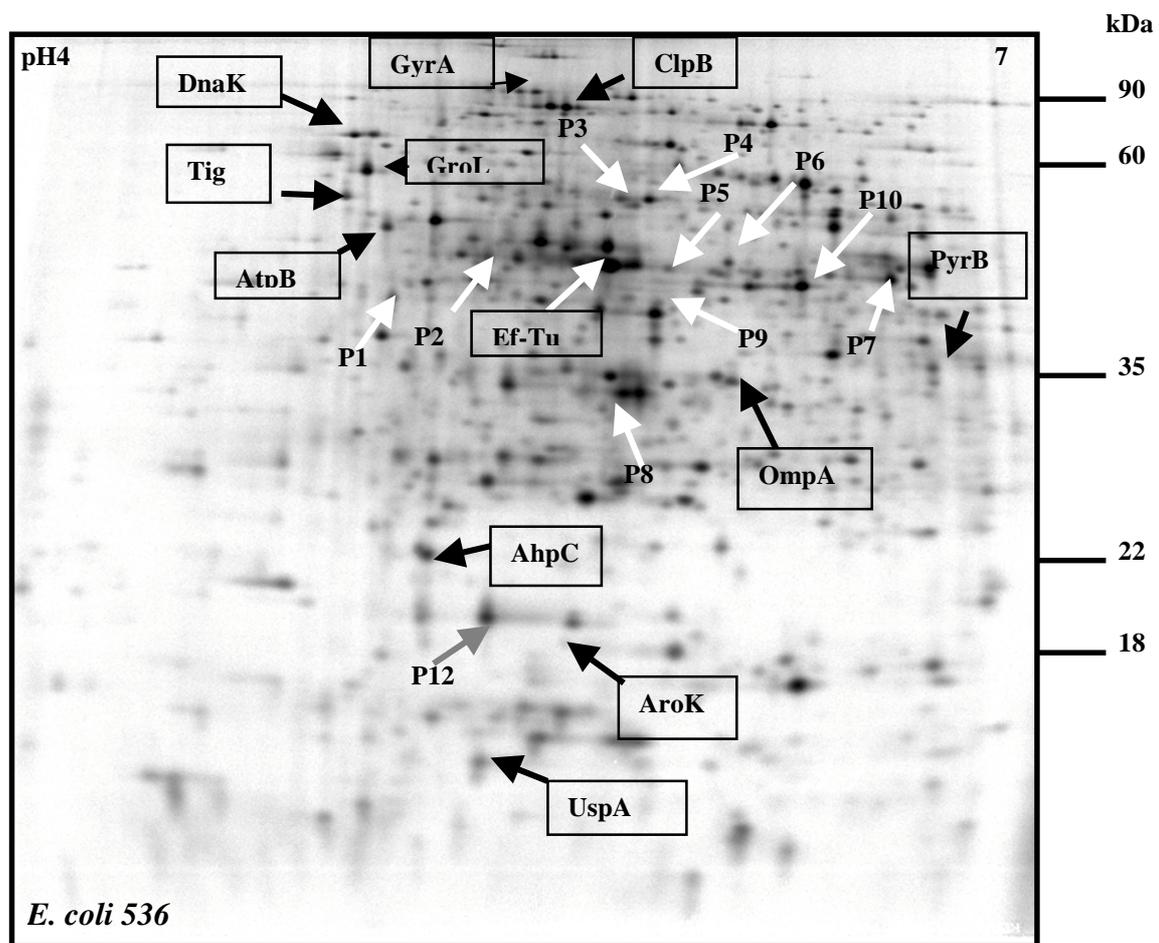


Abb. 4: Proteinexpressionsmuster des uropathogenen Stammes 536. Markerproteine sind mit schwarzen Pfeilen mit Umrandung markiert, mit weißen Pfeilen die Proteine, die Unterschiede in der Expression zwischen den untersuchten Stämmen aufweisen.

In Abb. 5 sind verschiedene Ausschnittsvergrößerungen von 2 D-Gele dargestellt, die die unterschiedliche Proteinexpression im Stamm 536 und seinen verschiedenen PAI I_{536}/II_{536} - und *leuX*-Mutanten veranschaulichen.

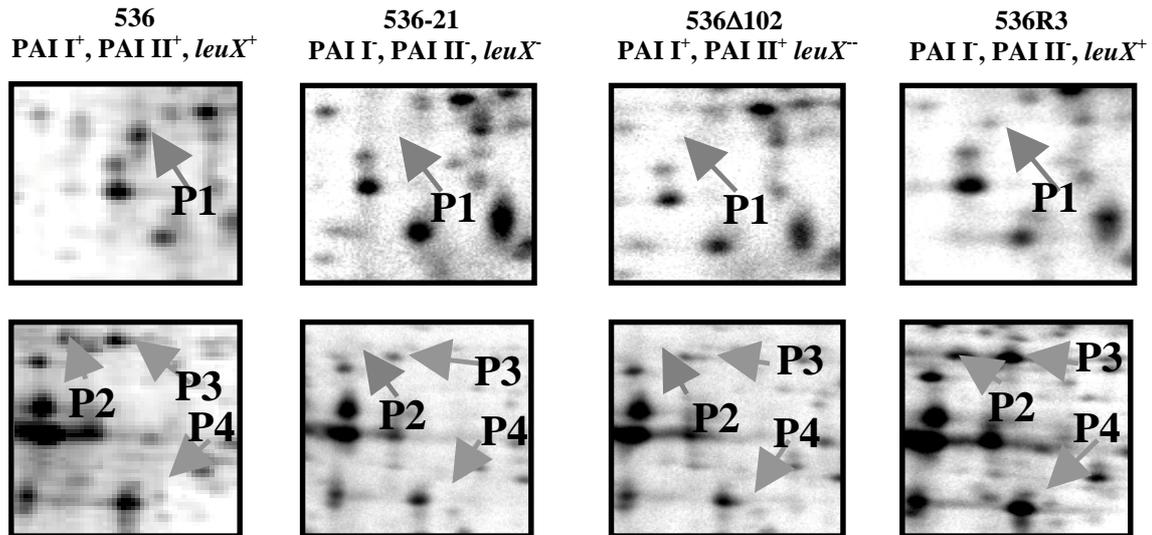


Abb.5: Beispiele der unterschiedlichen Proteinexpression im *E. coli* Stamm 536 und seinen Derivaten in Abhängigkeit von den PAIs I_{536} und II_{536} sowie der $tRNA_{5}^{Leu}$

Für die Auswertung wurde das computerunterstützte Bildauswertungssystem Melanie (BioRad) im Labor von Prof. M. Hecker in Greiswald benutzt. Die Gele wurden dazu digitalisiert. Anschließend wurde mit der Software die Spoterkennung und ein Gelvergleich durchgeführt. Beim Vergleich der Gele mit dem SWISS-2D-PAGE Mustergel von *E. coli* K-12 (<http://ca.expasy.org/ch2d/publi/ecoli.html>) konnten mehrere Proteine identifiziert werden, die als interne Markerproteine (Fixpunkte) beim Vergleich von 2 D Gelmuster der einzelnen Stämme dienten (siehe Tab. 9), da sie in allen untersuchten Mutanten exprimiert werden.

Tab. 9: Die Markerproteine bei *E. coli* Stamm 536 und seinen Derivaten, die bei der Analyse eingesetzt werden.

Proteine	
AhpC	Alkyl hydroperoxid Reduktase
AtpB	Membrangebundene ATP Synthase
AroK	Shikimate Kinase I
ClpB	Hitze Schock Protein
DnaK	Chaperon Protein
Ef-Tu	Elongations Faktor
GroEL	60 kDa Chaperon
GyrA	DNA-Topoisomerase II
OmpAa	Äußeres Membranprotein A
OmpAb	Äußeres Membranprotein A
PyrB	Aspartat Carbamoyltransferase
Tig	Trigger Faktor
UspA	Universelles Stressprotein

Nach der Auftrennung der radioaktiv markierten Proteine wurde festgestellt, daß der Wildtyp Stamm 536 sich in der Expression von elf Proteinen von seinen Mutanten unterscheidet (P1-P11 in Abb. 4 und Tab. 10). Bei P1, P2, P3, P4, P6 und P9 handelt es sich wahrscheinlich um *leuX*-abhängige Proteine (siehe Tab. 3), da sie nur bei den Stämmen exprimiert werden, die auch *leuX*-positiv sind [Wildtypstamm 536 (PAI⁺, PAII⁺, *leuX*⁺) und *leuX*-Komplementante 536R3 (PAI⁻, PAII⁻, *leuX*⁺)]. Bei den Proteinen P7, P10 und P11 handelt es sich wahrscheinlich um Pathogenitätsinsel-abhängige Proteine, weil sie bei den PAI-positiven Stämmen, 536 (PAI I⁺, PAI II⁺, *leuX*⁺) und 536Δ102 (PAI I⁺, PAI II⁺, *leuX*⁻) exprimiert werden. Das Expressionsmuster der Proteine P5 und P8 ist unklar. Das Protein P5 wurde nur bei dem Stamm 536-21 nicht detektiert, der sowohl PAI I₅₂₆/II₅₃₆⁻ wie auch *leuX*-negativ ist. Das Protein P8 wird dagegen nur bei dem Wildtypstamm 536 exprimiert.

Tab. 10: Proteine mit unterschiedlichen Expressionmuster bei *E.coli* 536 und seiner Derivate.

Protein	536 PAI I ⁺ , PAI II ⁺ , <i>leuX</i> ⁺	536-21 PAI I, PAI II, <i>leuX</i> ⁻	536Δ102 PAI I ⁺ , PAI II ⁺ , <i>leuX</i> ⁻	536R3 PAI I, PAI II, <i>leuX</i> ⁺
P1	+	-	-	+
P2	+	-	-	+
P3	+	-	-	+
P4	+	-	-	+
P5	++	-	++	+
P6	+	-	-	+
P7	++	+	++	+
P8	+	-	-	-
P9	++	-	-	+
P10	+	-	+	-
P11	+	-	+	-

++ starke Intensität des Proteinspots, + normale Intensität des Proteinspots, - Proteinspot nicht detektierbar

Nach der radioaktiven Markierung der Proteine und derer elektrophoretischer Auftrennung ist die weitere Analyse, wie Edman-Sequenzierung oder MALDI-TOF-MS, unmöglich. Um die Proteine, die sich in der Expression zwischen den untersuchten Stämmen unterscheiden zu identifizieren, mußte die analytische (für Silberfärbung) bzw. präparative (für Coomassiefärbung) zweidimensionale Gelelektrophorese durchgeführt werden.

1.2 Analytische und präparative zweidimensionale Gelelektrophorese

Um die Proteine, die sich im Expressionsmuster unterscheiden, mittels MALDI-TOF-MS analysieren zu können, wurden analytische und präparative 2 D-Gele durchgeführt.

1.2.1 Analyse von Gesamtzellextrakten-Analytische 2 D Gele

Für die analytischen Gele wurden 100-150 µg Proteinlysate auf IPG-Streifen mit einem pH-Gradienten von pH 4-7 aufgetragen. Es wurden für jeden untersuchten Stamm zwei verschiedene Präparationen durchgeführt. Aus jeder Präparation wurden die entsprechenden

Mengen des Proteinlysats auf zwei unabhängigen zweidimensionalen Gelen aufgetrennt. Als ein Unterschied in der Expression des Proteins wurde gewertet, wenn sich in beiden Präparationen und den dazu gehörigen Gelen das Proteinmuster reproduzieren ließ. Die Gele wurden mit Silber angefärbt und nach dem Digitalisieren teilweise mit dem Melanie Auswertungsprogramm und teilweise visuell ausgewertet. Der Wildtyp Stamm *E. coli* 536 unterscheidet sich in der Expression von zehn Proteinen von seinen Mutanten (P12-P21 in Abb. 6 und Tab. 11). Es wurden jedoch keine der Proteinspots gefunden, die bei den 2 D-Gele mit radioaktiv markierten Proteinen detektiert waren.

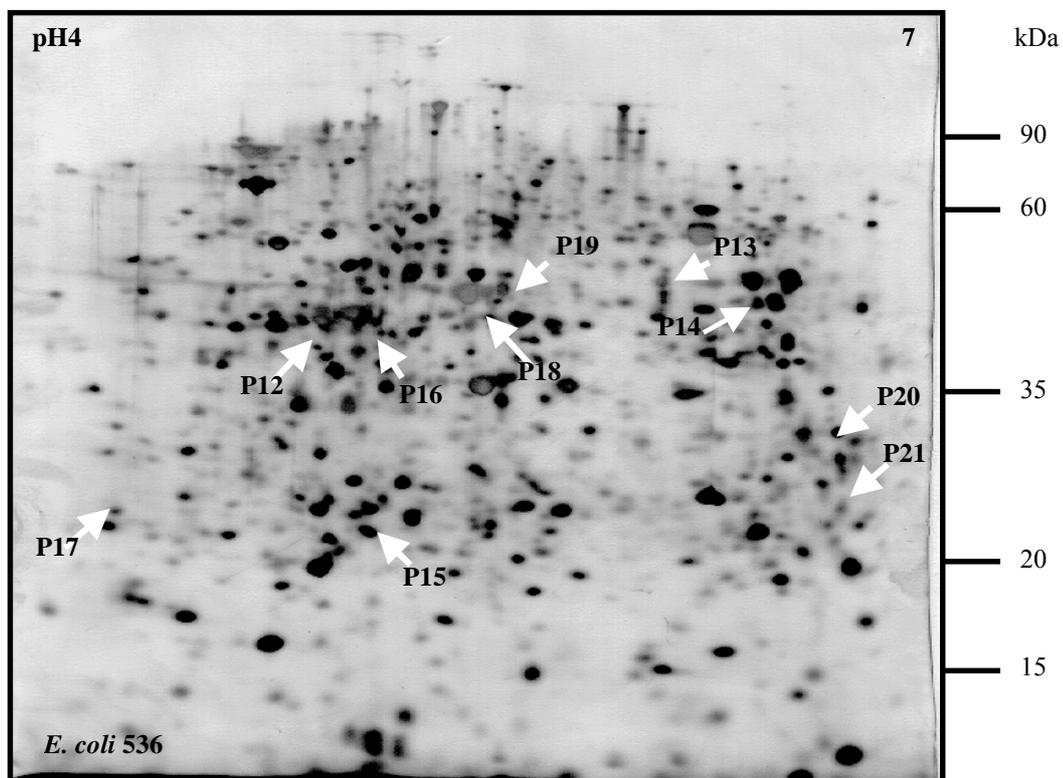


Abb. 6: Proteinexpressionsmuster des *E. coli* Stammes 536. Die Proteine, die Unterschiede in der Expression zwischen den untersuchten Stämmen aufweisen, sind mit weißen Pfeilen markiert. Das Gel wurde Silber gefärbt.

Drei der Proteine sind PAI I₅₃₆/II₅₃₆-abhängig (P14, P17 und P18). Die Expression dieser Proteine wird dabei negativ durch das Vorhandensein der Pathogenitätsinseln beeinflusst (siehe Tab. 11), da sie nur bei den Stämmen exprimiert werden, die auch PAI-negativ sind [536-21 (PAI I⁻, PAI II⁻, *leuX*⁻) und 536R3 (PAI I⁻, PAI II⁻, *leuX*⁺)]. Drei weitere Proteine sind wahrscheinlich *leuX*-abhängig (P13, P19 und P20). Sie werden durch die *leuX*-kodierte tRNA_{5^{Leu}} positiv beeinflusst, da sie nur bei den Stämmen exprimiert werden, die *leuX*-positiv sind [536 (PAI I⁺, PAI II⁺, *leuX*⁺) und 536R3 (PAI I⁻, PAI II⁻, *leuX*⁺)]. Vier andere Proteine

werden hingegen durch das *leuX* negativ beeinflusst (P12, P15, P16 und P21). Sie werden nur bei den *leuX*-negativen Mutanten exprimiert.

Tab. 11: Unterschiede in der Proteinexpression zwischen dem *E. coli* Stamm 536 und seiner Derivate

Protein	536 PAI I ⁺ , PAI II ⁺ , <i>leuX</i> ⁺	536-21 PAI I ⁻ , PAI II ⁻ , <i>leuX</i> ⁻	536Δ102 PAI I ⁺ , PAI II ⁺ , <i>leuX</i> ⁻	536R3 PAI I ⁻ , PAI II ⁻ , <i>leuX</i> ⁺
P12	-	+	+	-
P13	+	-	-	+
P14	+	++	+	++
P15	-	+	+	-
P16	-	+	+	-
P17	+	++	+	++
P18	-	+	-	+
P19	+	-	-	+
P20	+	-	-	+
P21	+	++	++	+

++ starke Intensität des Proteinspots, + normale Intensität des Proteinspots, - Proteinspot ist nicht detektierbar
P15 Protein, das auch bei den präparativen Gelen (Coomassie gefärbt) detektiert worden ist (dort Spot 41)

Ausgehend von analytischen Gelen konnte leider keine Identifizierung mittels MALDI-TOF-MS durchgeführt werden. Deswegen wurden anschließend präparative 2D-Gele ausgeführt.

1.2.2 Analyse von Gesamtzellextrakten-Präparative 2-D Gele

Für die präparativen 2 D-Gele wurden 700 bis 1000 µg Proteinlysate auf die IPG-Streifen mit einem pH-Gradienten von pH 4-7 aufgetragen. Die Vergleiche wurden jeweils dreimal von verschiedenen Präparationen durchgeführt. Für die weitere Analyse wurden nur die Spots in Betracht gezogen, deren unterschiedliche Expression sich in allen Präparationen reproduzieren ließ. Die Gele wurden mit Coomassie Brilliant Blue R-250 gefärbt. Es wurden insgesamt 39 Spots, deren Expression sich bei dem *E. coli* Stamm 536 und seinen Mutanten unterscheidet, detektiert (siehe Abb. 7 und Tab. 12). Ausgehend von Coomassie-gefärbten

Gelen wurden die Proteine mit MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry) identifiziert.

Bei der Präparation von Gesamtzellextrakten wurden in Abhängigkeit von der Menge des Proteinlysates, auf den 2 D-Gelen 600 bis 1500 Proteinspots aufgetrennt. Ein Standard 2 D-Gel von *E. coli* 536 ist in Abbildung 4 zu sehen.

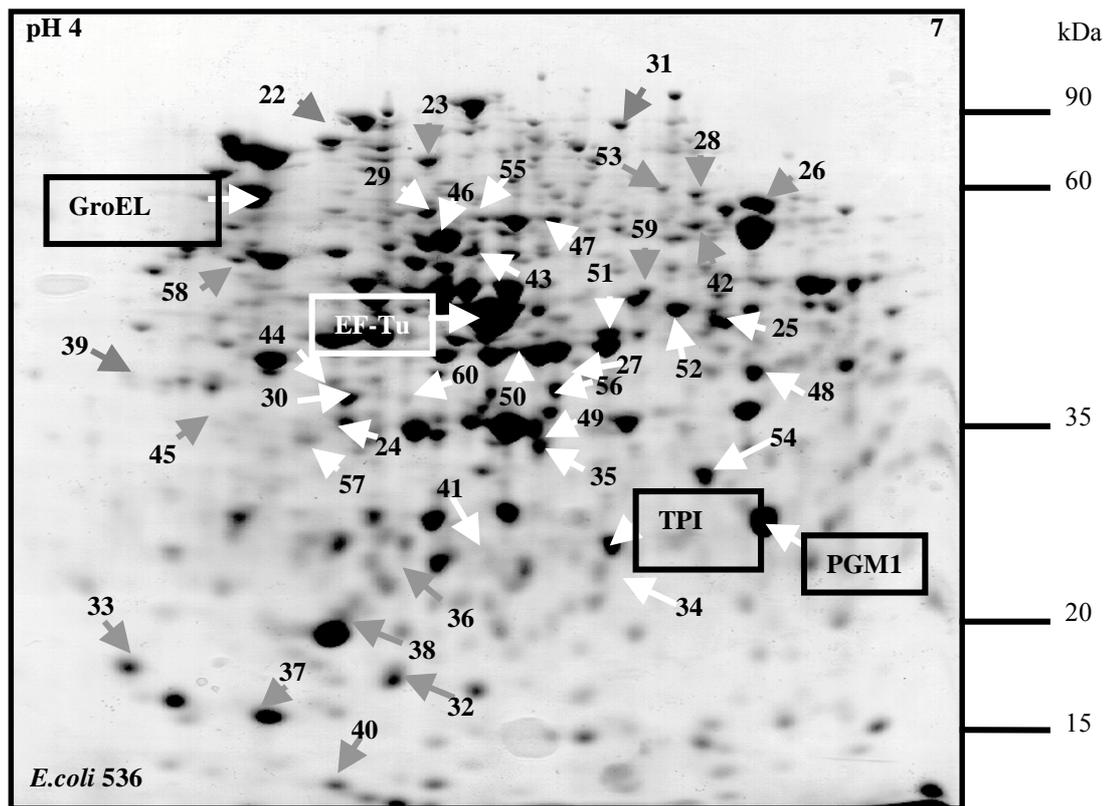


Abb. 7: Proteinexpressionsmuster des *E. coli* Stammes 536. Die Proteine, die Unterschiede in der Expression zwischen den untersuchten Stämmen aufweisen, sind mit weißen Pfeilen markiert, schwarze Pfeile mit Umrahmung markieren die Markerproteine.

Zur genaueren Charakterisierung wurden die molekularen Massen und isoelektrischen Punkte mit Hilfe von bekannten, internen Markerproteinen bestimmt. Zu den Markerproteinen gehörten der Elongationsfaktor EF-TU, die Enzyme Triosephosphat-Isomerase und Phosphoglycerat-Mutase 1 und das 60 kDa Chaperon GroEL (siehe Abb. 7). Es wurde auch einer der Proteinspots gefunden, der auch bei den analytischen (silbergefärbten) Gelen detektiert wurde. Es handelt sich dabei um Spots P41. Der entsprechende Spot bei den analytischen Gelen ist P15 (siehe Tab. 11).

Die Proteinexpressionsmuster wurden mit Hilfe der Melanie Software im Labor von Prof. Dr. M. Hecker in Greiswald verglichen. Auf diese Weise wurden 39 Unterschiede zwischen den

untersuchten Stämmen (Tab. 1) gefunden. Mit MALDI-TOF-MS konnten 37 Proteine identifiziert werden (siehe Tab. 12). Die MALDI-TOF-MS Analysen wurden von Dr. A. Schierhorn in Halle durchgeführt. Diese Proteine konnten in verschiedene funktionelle Kategorien klassifiziert werden.

Acht der Proteine sind in die Haushaltsprozesse der Bakterienzelle involviert, unter anderem in die „*de novo*“-Aminosäure-Biosynthese (Chorismat-Mutase TyrA und 2-Isopropylmalat-Synthase LeuA), in den Aminosäure-Katabolismus (Glutamat-Decarboxylase Alpha- und Beta-Untereinheit, DceA und DceB), die Biosynthese der Membranlipide (Malonyl-CoA-Acyl Carrier Protein-Transacylase, FabD), aber auch in den zentralen Metabolismus (Pyruvat-Kinase I, PykF). Es wurden sechs Proteine identifiziert, die an der Eisenaufnahme beteiligt sind (der Ferrichrom Eisen-Rezeptor FhuA, der Yersiniabaktin-Rezeptor FyuA, die Isochorismatase EntB, die Isochorismat-Synthase EntC, die Anthranilat-Synthase YbtS und die Salicyl-AMP-Ligase YbtE). Fünf Proteinspots die untersucht wurden, beinhalteten zwei verschiedene Proteine. Der Spot 27 bestand aus dem Putrescin-bindenden periplasmatischen Protein PotF und dem 6-Phosphofruktokinase-Isoenzym 2 (PfkB). Der Spot 42 beinhaltete die ATP-Synthase Alpha Untereinheit (AtpA) und ein periplasmatisches dipeptidbindendes Protein Dbp. Der Spot 43 bestand aus der Glutamat-Decarboxylase Alpha und Beta Untereinheit (DceA, DceB). Der Spot 51 setzte sich aus der Chorismat-Mutase TyrA und der Aspartat-Aminotransferase zusammen. Der Spot 54 beinhaltete die Cysteinyl-tRNA-Aminotransferase (CysS) und ein Protein, das nicht identifiziert werden konnte. Es wurden insgesamt drei periplasmatische Bindeproteine, die Komponenten von ABC Transportern sind, gefunden. Der Spot 26 setzte sich aus dem periplasmatischen oligopeptidbindenden Protein OppA, welches eine Rolle bei dem Transport von Oligopeptiden spielt. Der Spot 27 beinhaltete das Protein PotF, welches in den Putrescintransport involviert ist. Ein periplasmatisches dipeptidbindendes Protein (Dbp), welches eine Komponente des Dipeptid Transport Systems ist, wurde als Spot 42 identifiziert. Außerdem wurden auch zwei Proteine, die eine antioxidative Aktivität haben, gefunden: eine Thiol-Peroxidase TpX (Spot 37) und eine Alkylhydroperoxid-Reduktase AhpC (Spot 38). Es konnte auch die Expression von drei hypothetischen Proteinen (Spot 32-34), die bis jetzt noch nicht auf Proteinebene beschrieben wurden, nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich um das YgaG-Protein (Spot 32; siehe Abb. 8), YhbC (Spot 33) und YodA (Spot 34).

Fünf Proteine konnten nicht bei dem Vergleich mit dem Stamm MG1655 identifiziert werden. Die Peptidmassen der unbekannt Proteine wurden anschließend mit dem Genom vom *E. coli* Stamm O157:H7 EDL933 und *Yersinia pestis* Stämmen verglichen. Es konnten dabei drei Proteine identifiziert werden. Es handelte sich um die Salicyl-AMP-Ligase (YbtE; Spot 59) und die Anthranilat-Synthase (YbtS; Spot 56) von *Yersinia pestis* und ein putatives GTP-bindendes Faktor von *E. coli* O157:H7 EDL933 (Spot 60). Die zwei unbekannt, nicht identifizierbaren Proteine, die vielleicht in die Pathogenese des *E. coli* Stammes 536 involviert sind, wurden anschließend mit den PAI-Sequenzen verglichen. Es konnten jedoch keiner der zwei Proteine identifiziert werden.

In Abb. 8 sind verschiedene Ausschnittsvergrößerungen von 2 D-Gelen dargestellt, die die unterschiedliche Proteinexpression im Stamm 536 und seinen verschiedenen PAI I₅₃₆/II₅₃₆- und *leuX*-Mutanten veranschaulichen.

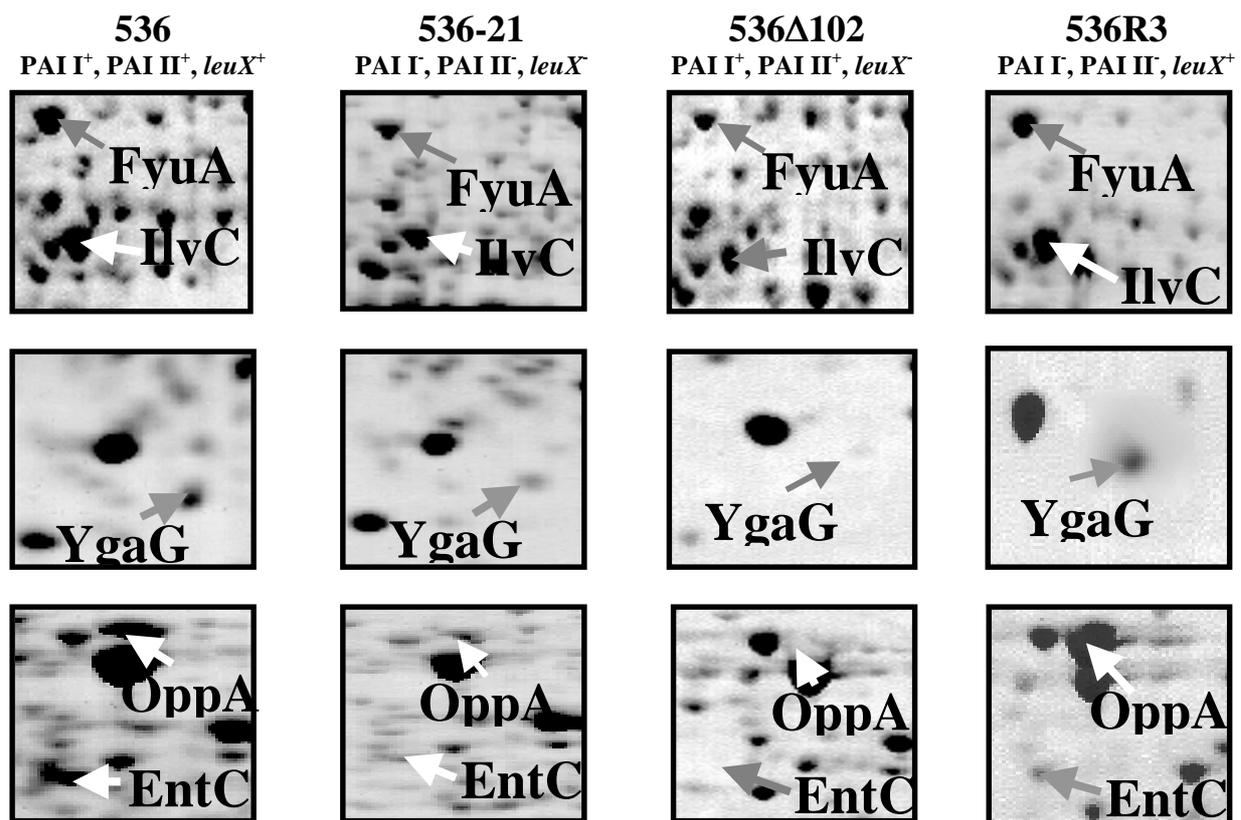


Abb. 8: Beispiele der unterschiedlichen Proteinexpression im *E. coli* Stamm 536 und seinen Derivaten in Abhängigkeit von den PAIs I₅₃₆ und II₅₃₆ sowie tRNA_{5^{Leu}}.

Die Unterschiede in der Expression der Gesamtzellextraktproteine wurden in der Tab. 12 zusammen gefaßt.

Tab. 12: Die Unterschiede in der Proteinexpression bei dem *E. coli* Stamm 536 und seinen Derivaten

Spot Nr	Protein Name	MALDI-TOF-MS			Stämme			
		Peptide		Sequenz abdeckung	536	536-21	536Δ102	536R3
		Matching	Total					
22	Ferrichrom-Eisen-Rezeptor, FhuA	16	42	25	+	++	+++	+
23	Pesticin-Rezeptor, FyuA	17	36	38	++	+	+	++
24	Isochorismatase, EntB	11	22	37	++	+	+	++
25	Isochorismat-Synthase, EntC	8	24	13	+++	+	+	++
26	Periplasmatisches Oligopeptid-bindendes Protein, OppA	19	45	58	+++	+	-	++
27	a) Putrescin-bindendes periplasmatisches Protein, PotF	11	27	37	++	+	+	++
	b) 6-Phosphofruktokinase 2, PfkB	8	27	40				
28	Pyruvat-Kinase I, PykF	13	19	31	++	+	+++	+
29	Transketolase I, TktA	9	19	20	+	++	+	++
30	Transaldolase B, TalB	7	11	38	++	+	+	++
31	α-Amylase, MalS	8	78	22	++	+	+	++
32	Hypothetisches 19,3 kDa Protein, YgaG	11	33	43	+++	++	+	++
33	Hypothetisches 16,8 kDa Protein, YhbC	7	24	38	++	+	+	++
34	Hypothetisches 24,8 kDa Protein, YodA	6	21	32	+++	+	+	++
35	Putatives Adhesin, YebL	9	28	35	-	+	++	-
35	Cystin bindendes periplasmatisches Protein, FliY	17	36	59	-	+	+	-
37	Thiol-Peroxidase, TpX	10	18	95	+	++	++	+
38	Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase, AhpC	7	31	47	+	++	++	+
39	Zellteilungsprotein, FtsZ	27	36	76	++	+	+	++
40	30S ribosomales Protein S6	9	36	56	++	+	++	+
41	“Phage shock protein A”, PspA	17	49	54	-	+	++	-

Fortsetzung Tabelle 12

42	a) ATP-Synthase α Kette, AtpA	14	38	36				
	b) Periplasmatisches dipeptidbindendes Protein, Dbp	17	38	44	++	+	+	++
43	a) Glutamat-decarboxylase β DceB	14	46	38	+	+	++	+
	b) Glutamat-decarboxylase α DceA	14	46	38				
44	Glutathion-Synthetase, GshB	9	15	27	+++	+	++	+
45	Malonyl-CoA-Acyl-carrier Protein-Transacylase, FabD	7	32	39	+	++	++	+
46	Ketol-acid Reductoisomerase, IlvC	12	20	31	++	+	+	++
47	2-Isopropylmalat-Synthase, LeuA	8	31	22	++	+	+	++
48	Phenylalanyl-tRNA-Synthase α -Kette, SyfA	8	29	29	+++	+	+	++
49	ATP-Phosphoribosyltransferase, HisG	10	15	54	++	+	+	++
50	Phospho-2-Dehydro-3-Deoxyheptonat-Aldolase, AroF	15	31	46	++	+	+	++
51	a) Chorismat-Mutase, TyrA	12	29	34	++	+	+	++
	b) Aspartat-Aminotransferase	17	19	46				
52	Tryptophan-Synthase β -Kette, TrpB	14	27	46	+++	+	+	++
53	Phosphoribosylaminoimidazolcarboxamid-formyltransferase, PurH	6	17	13	++	+	+	++
54	2,3,4,5-Tetrahydro-pyridin-2-Carboxylat-N-Succinyl-Transferase, DapD	6	7	26	+++	+	+	+++
55	Cysteiny-tRNA-Synthase, CysS	12	24	28	++	+	+	++
56	Anthranilat-Synthase, YbtS	15	25	60	+++	+	+	++
57	unbekannt	-	-	-	+	++	+	++
58	unbekannt	-	-	-	++	+	+	++
59	Salicyl-AMP-Ligase, YbtE	9	23	39	++	-	+	-
60	putatives GTP-bindendes Faktor, YhbZ	6	16	37	+	++	++	+

+++ sehr starke Intensität des Proteinspots, ++ starke Intensität des Proteinspots, + normale Intensität des Proteinspots, - Proteinspot ist nicht detektierbar

1.2.4 Einfluß der Pathogenitätsinseln I und II sowie der tRNA₅^{Leu} auf die Proteinexpression des *E. coli* Stammes 536

Für den Vergleich der Proteinexpressionsmuster zwischen den untersuchten Stämmen wurden nur solche Proteine herangezogen, deren Unterschiede in allen 2 D-Gelen reproduzierbar waren. Aufgrund der unterschiedlichen Proteinexpression in Abhängigkeit von der Präsenz der PAI I₅₃₆ und II₅₃₆ oder der tRNA₅^{Leu} konnten zwei Gruppen von Proteinen identifiziert werden (siehe Tab. 13).

Tab. 13: Einfluß der PAI I₅₃₆ und PAI II₅₃₆ sowie der tRNA₅^{Leu} auf die Proteinexpression des *E. coli* Stammes 536

Einfluß auf die Proteinexpression	Zahl der Proteine
PAI-abhängige positive Regulation	3
PAI-abhängige negative Regulation	2
<i>leuX</i> -abhängige positive Regulation	23
<i>leuX</i> -abhängige negative Regulation	7

Die eine Gruppe ist PAI-abhängig. Es gab drei Proteine, die positiv von der Präsenz der PAI I₅₃₆ und II₅₃₆ beeinflusst wurden. Dabei handelte es sich um die Pyruvat-Kinase 1 (Spot 28), ein 30S ribosomales Protein (Spot 40) und die Glutathion-Synthetase (Spot 44). Im Vergleich zu dem Wildtyp Stamm 536 war beim Stamm 536R3 (PAI I₅₃₆⁻, PAI II₅₃₆⁻, *leuX*⁺) und 536-21 (PAI I₅₃₆⁻, PAI II₅₃₆⁻, *leuX*⁺) eine geringere Intensität bei diesen Proteinspots zu sehen. Die Expression von zwei Proteinen wurde dagegen negativ beeinflusst, nämlich die der Transketolase 1 (Spot 29) und die eines unbekanntes Proteins (Spot 57). Die Intensität der beiden Proteinspots war bei den PAI-negativen Stämmen (536-21 und 536R3) höher als bei dem Wildtyp Stamm 536 (PAI I₅₃₆⁺, PAI II₅₃₆⁺, *leuX*⁺) und der *leuX*-Mutante 536Δ102 (PAI I⁺, PAI II₅₃₆⁺, *leuX*). In der Proteomanalyse wurde ein Protein (Spot 59, YbtE) gefunden, welches auf der PAI I₅₃₆ oder II₅₃₆ kodiert ist oder dessen Expression durch die PAIs beeinflusst wird. Das Protein wurde nicht bei PAI-negativen Mutanten (Stamm 536-21 und 536R3), sondern nur bei dem Wildtyp Stamm 536 und der *leuX*-Mutante 536Δ102 detektiert.

Die andere Gruppe beinhaltete *leuX*-abhängige Proteine. Die Expression von 23 Proteinen war von der tRNA₅^{Leu} abhängig (Spot 22-27, 31, 33, 34, 39, 46-56, 58), während die von 8

Proteinen (Spot 22, 35-38, 41, 45, 60) in Gegenwart der tRNA₅^{Leu} reduziert war. Der Stamm 536 exprimierte drei Proteine nicht, die in dem Stamm 536-21 (PAI I⁻, PAI II₅₃₆⁻, *leuX*) und 536Δ102 (PAI I⁺, PAI II₅₃₆⁺, *leuX*) detektierbar waren (Spot 35, 36 und 41).

1.3 Einfluß der Pathogenitätsinseln I und II sowie der tRNA₅^{Leu} auf die Expression von extrazellulären Proteinen

Um weitere mögliche PAI- und *leuX*-abhängige Proteine zu finden, wurden die Überstandsproteine isoliert. Zu diesem Zweck wurden die Bakterien in LB-Medium ÜN angezüchtet und danach abzentrifugiert. Um zu vermeiden, daß sich in dem Überstand noch Bakterienzellen befinden, wurde der Überstand sterilfiltriert und anschließend mit 10 % Endkonzentration Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Es wurden jeweils drei unabhängige Präparationen durchgeführt und sowohl analytische, wie auch präparative Gele hergestellt. Die Gele wurden dann visuell verglichen. Es wurden sowohl bei analytischen wie auch präparativen Gelen drei Proteinspots gefunden (siehe Abb. 9), deren Expression *leuX*-abhängig war. Für weiteren Untersuchungen wurden nur präparative Gele herangezogen. Die entsprechenden Proteine wurden mit Hilfe von MALDI-TOF-MS in Halle identifiziert (siehe Tab. 14).

Tab. 14: Identifizierung von *leuX*-abhängigen, extrazellulären Proteinen des *E. coli* Stammes 536 und seinen Derivaten

Spot Nr	Proteinname	MALDI-MS-MS			536	536-21	536Δ102	536R3
		Peptide		Sequenz-abdeckung				
		Matching	Total					
P61	Flagellin, 56,5 kDa	10	37	26 %	+++	-	-	+++
	Flagellin, 60,9 kDa	10	37	27 %				
P62	osmotisch induzierbares Protein OsmY	11	27	52 %	+	-	-	+
P63	nicht identifiziert	-	-	-	++	+	+	++

+++ sehr starke Intensität des Proteinspots, ++ starke Intensität des Proteinspots, + normale Intensität des Proteinspots, - kein Spot detektierbar

Von den drei Proteinen konnten zwei identifiziert werden. Es handelte sich dabei um das Flagellin-Protein (P61) und ein osmotisch induzierbares Protein OsmY (P62). Bei dem Vergleich mit PAI-Sequenzen konnte das dritte Protein nicht identifiziert werden.

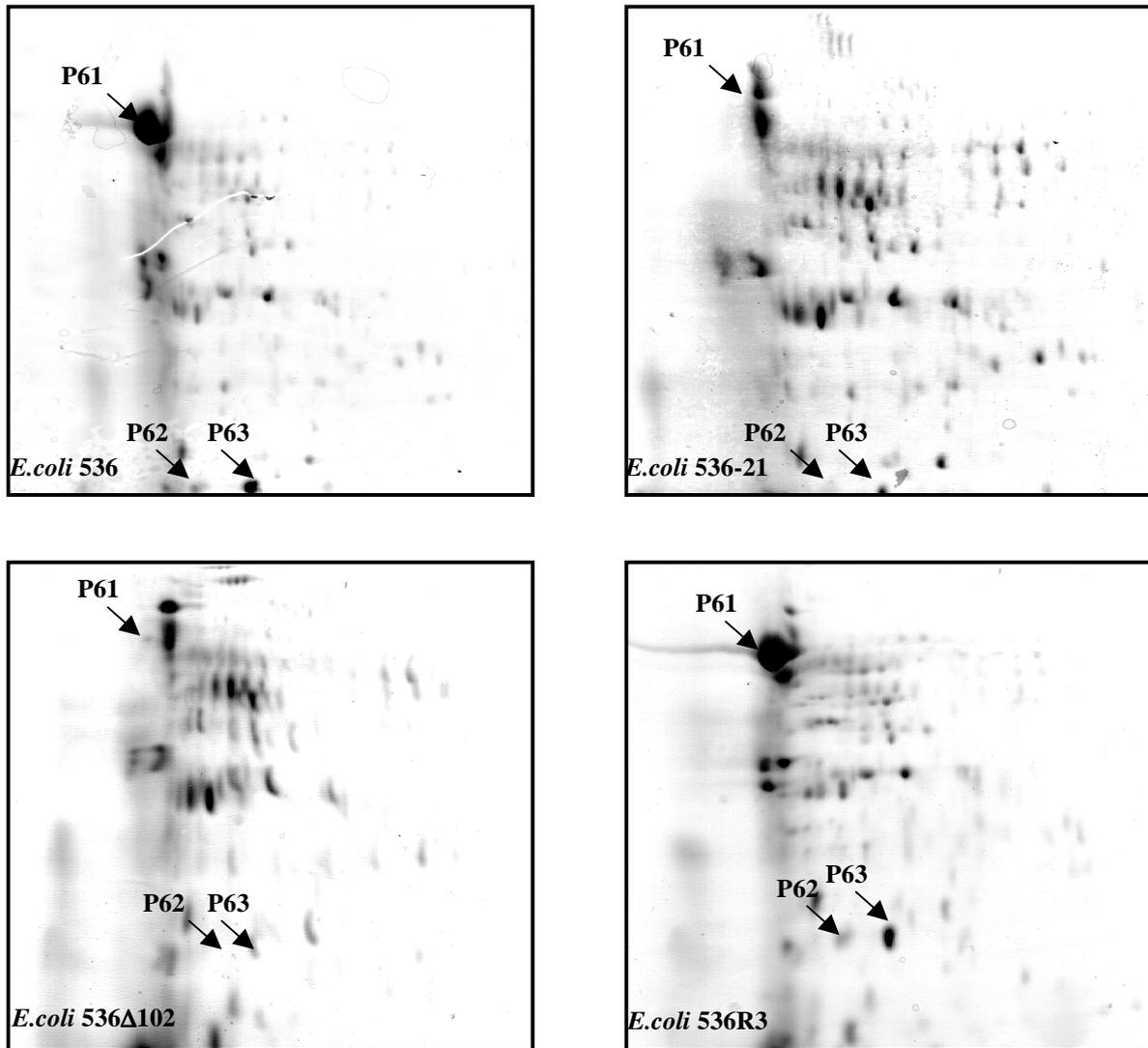


Abb. 6: Proteomanalyse von extrazellulären Proteinen des *E. coli* Stammes 536 und seinen verschiedenen Derivaten.

E. coli 536: PAI I⁺, PAI II⁺, *leuX*⁺

E. coli 536-21: PAI I⁻, PAI II⁻, *leuX*⁻

E. coli 536Δ102: PAI I⁺, PAI II⁺, *leuX*⁻

E. coli 536R3: PAI I⁻, PAI II⁻, *leuX*⁺

Zusammenfassung der Ergebnisse des Abschnitts 1

- Die Methode der 2D-Gelelektrophorese mit immobilisierten pH-Gradienten wurde etabliert.
- Für die Untersuchung des Einflusses der Pathogenitätsinseln I_{536} und II_{536} und der *leuX*-kodierten $tRNA_5^{Leu}$ auf die Proteinexpression wurde die Methode mit dem *E. coli* Stamm 536 und verschiedenen PAI I_{536}/II_{536} -negativen und *leuX*-negativen Derivaten durchgeführt.
- Es wurden sowohl radioaktiv markierte, analytische (für Silberfärbung) wie auch präparative (für Coomassie Färbung) Gele durchgeführt.
- Bei den Gelen mit radioaktiv markierten Gesamtzellextrakten konnten insgesamt 11 Unterschiede in der Proteinexpression zwischen dem *E. coli* Stamm 536 und seinen Derivaten gefunden werden. Davon waren 6 Proteine *leuX*- und drei Proteine PAI I_{536}/II_{536} -abhängig. Die Expression eines Proteins war sowohl PAI I_{536}/II_{536} - wie auch *leuX*-abhängig.
- Bei den 2 D-Gelen mit den analytischen Mengen (bis 150 μ g) von Gesamtzellextrakten konnten insgesamt 10 Unterschiede in der Proteinexpression zwischen den untersuchten Stämmen gefunden werden. Drei Proteine waren PAI I_{536}/II_{536} - und sieben Proteine *leuX*-abhängig.
- Bei der zweidimensionalen Auftrennung mit präparativen Mengen (über 700 μ g) von Gesamtzellextrakten konnten zwischen dem *E. coli* Stamm 536 und seinen Derivaten insgesamt 39 Unterschiede in der Proteinexpression in der Abhängigkeit von PAI I_{536}/II_{536} und $tRNA_5^{Leu}$ gefunden werden. Davon wurden 37 Proteine über MALDI-TOF-MS in Halle identifiziert. Dabei wurden Proteine, die u.a. in die Haushaltsprozesse der Bakterien involviert sind und die an der Eisenaufnahme beteiligt sind. Es wurden auch drei hypothetische Proteine, die bis jetzt noch nie auf Proteinebene beschrieben worden sind, gefunden. Zwei Proteine konnten nicht identifiziert werden. Diese stellen möglicherweise *E. coli* 536 spezifische Proteine dar, obwohl sie nicht PAI I_{536}/II_{536} kodiert vorliegen.
- Anschließend wurden die Überstandsproteine zweidimensional aufgetrennt. Sowohl auf den analytischen wie auch auf den präparativen Gelen wurden drei Unterschiede in der Proteinexpression gefunden. Zwei der Proteine wurden mit Hilfe von MALDI-TOF-MS in Halle identifiziert. Es handelte sich um Flagellin (FliC) und osmotisch induzierbares Protein (OsmY).

2 Einfluß von *leuX* und PAI I₅₃₆/PAI II₅₃₆ auf das Membranproteinmuster des uropathogenen *E. coli* Stammes 536

Der uropathogene *E. coli* Stamm 536 besitzt fünf Pathogenitätsinseln (PAIs) in seinem Chromosom, die für die Virulenz dieses Stammes von entscheidender Bedeutung sind. Die Pathogenitätsinseln sind mit tRNA-spezifischen Genen assoziiert. Die PAI I₅₃₆ und II₅₃₆ werden jeweils von 16 bp bzw. 18 bp DR („direct repeat“) flankiert und können mit relativ hoher Frequenz durch Rekombination zwischen diesen flankierenden Sequenzen deletieren (Blum et al., 1994). Durch die Deletion der Inseln werden die tRNA-spezifische Gene partiell zerstört (Blum et al., 1994). Die PAI II₅₃₆ ist mit dem Gen assoziiert, das für eine Leucin-spezifische tRNA kodiert (*leuX*). Es konnte gezeigt werden, daß das tRNA-Gen *leuX* die Expression verschiedener Gene in dem *E. coli* Stamm 536 beeinflusst unter anderem, auch die Serumresistenz.

Über die Faktoren, die bei der Serumresistenz eine Rolle spielen, ist wenig bekannt, aber Kapseln und O-Seitenketten sind von Bedeutung (Ørskov and Ørskov, 1985; Burns and Hull, 1998). Außerdem wurden bei *Bordetella pertussis* zwei Proteine beschrieben, die an der Serumresistenz beteiligt sind (Fernandez and Weiss, 1994). Bei einem *E. coli* K-1 Isolat konnte ein Einfluß des „outer membrane protein A“ (OmpA) auf die Serumresistenz nachgewiesen werden (Weiser and Gotschlich, 1991). Da also äußere Membranproteine möglicherweise die Serumresistenzeigenschaften eines Stammes beeinflussen können, wurden von dem Stamm 536 und seinen PAI I₅₃₆/II₅₃₆- und *leuX*-Mutanten (siehe Tab. 8) Membranproteine isoliert und anschließend entweder ein- oder zwei-dimensional aufgetrennt.

2.1 Eindimensionale Analyse der Expression von äußeren Membranproteinen des *E. coli* Stammes 536

Von dem *E. coli* Stamm 536 und seinen Derivaten (Tab. 8) wurden äußere Membranproteine aus der exponentiellen und der stationären Wachstumsphase isoliert und auf einem 12 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Bakterien wurden in verschiedenen Medien angezüchtet (LB- und M9-Medium). Es konnten keine größere Unterschiede zwischen den untersuchten Stämmen in der Abhängigkeit von der Wachstumsphase oder Medium festgestellt werden (siehe Abb. 10 A). Außerdem wurden die Bakterien im LB-Medium mit 50 %igen, inaktiven Humanserum angezüchtet, um einen möglichen Einfluß der Serumproteine auf das

Membranproteinmuster der Bakterien zu untersuchen. In diesem Fall konnten drei Unterschiede festgestellt werden (siehe Abb. 10 B).

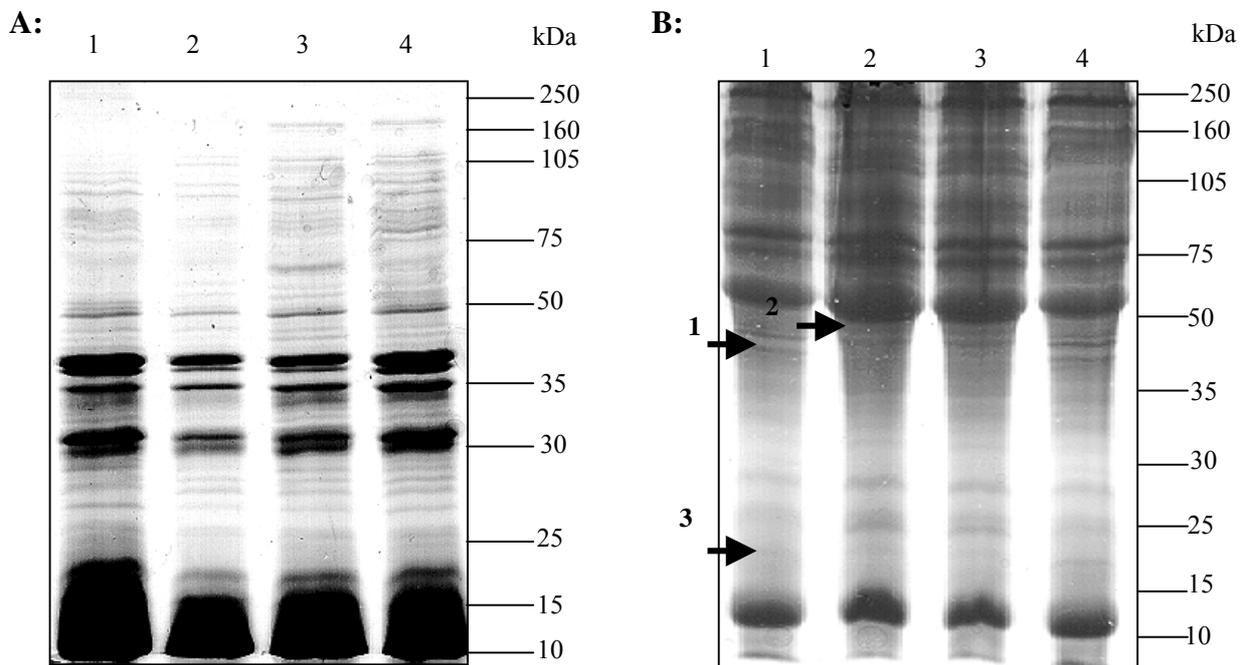


Abb. 10: Äußeres Membranproteinmuster der Stämme 536 (Spur 1), 536-21 (Spur 2), 536Δ102 (Spur 3) und 536R3 (Spur 4). Als Marker wurde der „Rainbow“-Marker von Biorad verwendet.

A: Bakterien wurden im LB-Medium bis zu einer $OD_{600}=1$ angezüchtet. Als Isolierungsmethode wurde die Saccharose-Methode angewendet.

B: Bakterien wurden im LB-Medium mit 50 % inaktiven Serum ÜN ($OD_{600}=1,2$) angezüchtet. Als Isolierungsmethode wurde die Saccharose-Methode angewendet.

Es wurden bei beiden Gelen jeweils gleiche Menge an Proteinen aufgetrennt. Es ist jedoch deutlich, daß das Proteinmuster und die Intensitäten der einzelnen Banden, sich in Abhängigkeit von Mediumzusammensetzung, unterscheidet. Dies würde dafür sprechen, daß die Komponenten des inaktiven Humanserum die Expression vieler Proteine aktiviert. Der Wildtyp Stamm 536 exprimiert zwei Proteine im Größenbereich von ca. 45 bzw. 20 kDa (Protein 1 und 3, Abb. 10 B, Spur 1 und 4) die nicht bei den serumsensitiven Mutanten 536-21 und 536Δ102 detektiert worden sind. Bei der *leuX*-komplementante 536R3 war die Expression dieser beiden Proteine wieder hergestellt. Ein ca. 50 kDa Protein (Protein 2) wurde dagegen nur bei den *leuX*-negativen, serumsensitiven Stämmen exprimiert. Bei allen drei Proteinen handelt sich um *leuX*-abhängige Proteine, wobei das *leuX*-kodierte $tRNA_5^{Leu}$ sowohl positiv (Protein 1 und 3) wie negativ (Protein 2) die Expression beeinflusst. Ob jedoch diese drei von *leuX* beeinflussten Proteine, tatsächlich an der Serumresistenz des *E. coli* Stammes 536 beteiligt sind, muß erst durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

2.2 Untersuchungen des Einflusses der PAI I₅₃₆/II₅₃₆ und der tRNA_{5^{Leu}} auf die OmpT-Expression beim *E. coli* Stamm 536

Das OmpT-Protein, eine Protease, wird als ein potentieller Virulenzfaktor angesehen. Es wurde beschrieben, daß die OmpT-Protease antimikrobielle Peptide, die von den Epithelzellen des Urogenitaltraktes sekretiert werden, degradiert (Stumpe et al., 1998). Die antibakterielle Peptide gehören zur lokalen, nichtadaptiven Immunreaktion des Wirtes. Möglicherweise kann die OmpT-Protease auch zur Serumresistenz des *E. coli* Stammes 536 beitragen. Im Proteingel war eine identifizierung der OmpT-Bande schwierig. Deswegen wurde ein Westernblot mit einem OmpT-spezifischen polyklonalen Antikörper durchgeführt. Die Zelllysate der *E. coli* Stämme wurden in einem 12 %-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der OmpT-spezifischer Antikörper zeigte Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen und auch nach mehrmaliger Präadsorption konnte die Spezifität des Antikörpers nicht verbessert werden. Es wurden auch keine Unterschiede in der Expression von Proteinen, die im Größenbereich von OmpT (35,5 kDa) mit dem Antikörper reagierten, festgestellt werden (Abb. 11).

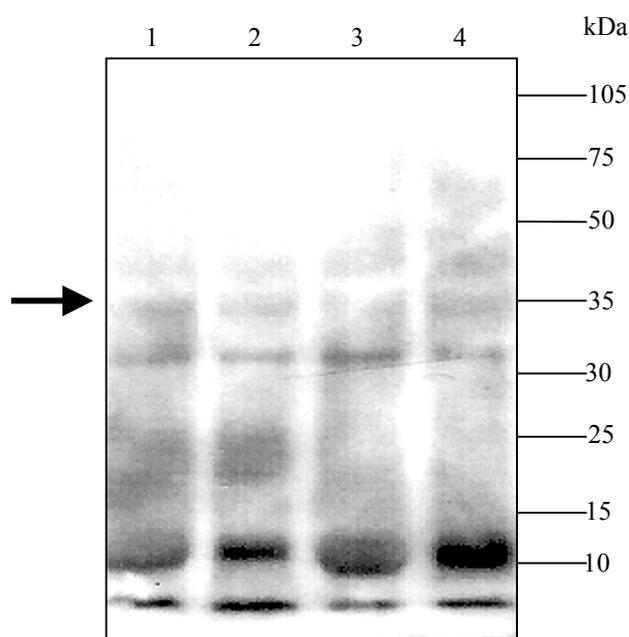


Abb. 11: Nachweis von OmpT in Zellextrakten verschiedener Derivate des *E. coli* Stammes 536. Westernblot mit einem OmpT-spezifischen Antikörper (Verdünnung 1:500). Die folgenden Stämme wurden getestet: 536 (Spur 1); 536-21 (Spur 2), 536Δ102 (Spur 3), 536R3 (Spur4).

Der Einfluß von der *leuX*-kodierte tRNA_{5^{Leu}} auf die Serumresistenz muß also durch andere Faktoren, möglicherweise durch die drei unter 2.1 beschriebene Proteine, erfolgen.

2.3 Zweidimensionale Analyse der Expression von äußeren Membranproteinen des *E. coli* Stammes 536

Da die eindimensionale Auftrennung keine oder sehr unsichere Ergebnisse geliefert hat (siehe Kapitel V 2.1 Abb. 10 A und 10 B), wurden anschließend die zweidimensionale Gele durchgeführt. Es wurden zwei Proteinisolierungsmethoden angewendet.

2.3.1 Membranprotein-Isolierung für die Zweidimensionale Gelelektrophorese – Phosphat-Methode

Zuerst wurde eine Phosphat-Methode nach O'Connor modifiziert (Shu-Yun Qi et al., 1996). Die Bakterien wurden im LB-Medium unter gleichen Bedingungen angezchtet und wie im Kapitel IV 9.21.1 beschrieben weiter bearbeitet. Bei den Membranproteinen handelt sich weitgehend um hydrophobe und somit schwer lösliche Proteine. Nach der klassischen Methode konnten die Proteine nur schlecht in die lösliche Form überführt und zweidimensional aufgetrennt werden. Um die zuerst schlechte Auftrennung der isolierten Proteine zu verbessern, wurden insgesamt drei verschiedene Solubilisierungspuffer getestet:

- A) 9 M Harnstoff, 2 % β -Mercaptoethanol, 2 % Triton X-100, 2 % Ampholyte (Puffer nach O'Connor)
- B) 9 M Harnstoff, 2 % β -Mercaptoethanol, 2 % Triton X-100, 2 % Ampholyte, 2 % CHAPS (modifiziert)
- C) 9 M Harnstoff, 2 % β -Mercaptoethanol, 2 % Triton X-100, 2 % Ampholyte, 4 % CHAPS (modifiziert)

Die besten Ergebnisse wurden mit Puffer C erreicht (Abb. 12). Es konnten aber mit der Methode nur kleine Mengen an Proteinen isoliert werden. Somit wurde nur bis zur 150 μ g Protein pro Gel aufgetrennt. Die 2 D-Gele wurden nach der Durchführung einer Silberfärbung unterzogen. Pro Stamm wurden drei unterschiedliche Präparationen auf ein Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt und dabei visuell sieben Unterschiede gefunden (Tab. 15, P64-P70).

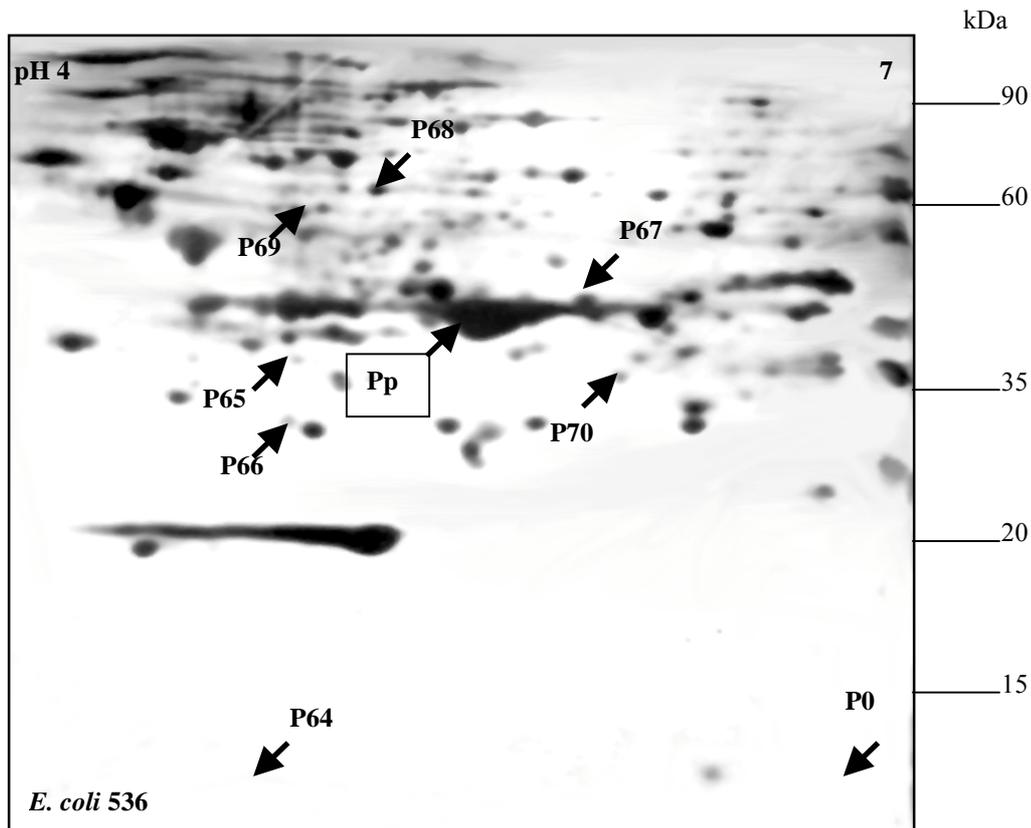


Abb. 12: Membranproteinexpressionsmuster des uropathogenen *E. coli* Stammes 536. Die Blindprobe ist mit P0, Markerprotein (EF-Tu) mit umrahmten Pp markiert.

Die Proteine wurden dann mittels MALDI-TOF-MS in Halle, unter der Anleitung von Dr. A. Schierhorn identifiziert. Dazu wurden die Proteinspots aus dem Gel ausgeschnitten und mit Trypsin im Gel verdaut (siehe Kapitel IV 9.27.1). Das Verdauungsenzym Trypsin hat die größte Spezifität von den Proteasen, und ist deshalb sehr gut geeignet für die Proteinfragmentierung. Es schneidet Peptidbindungen auf der C-terminalen Seite der positiv geladenen Reste Arginin und Lysin (falls der folgende Rest nicht Prolin ist). Somit entstehen nach dem Trypsinverdau, in Abhängigkeit von den vorhandenen Trypsinerkennungsstellen, definierte Peptidfragmente. Das Peptidgemisch wurde dann zusammen mit der Matrix (siehe Kapitel IV 9.27.2) auf einen Probenträger aufgetropft. Der so vorbereitete Probenträger wurde in den Massenspektrometer mit dem pulsierenden Laserstrahl beschossen. Dadurch wurden die in der Matrix eingebetteten Peptide von der Matrix abgetrennt, positiv geladen und durch Anlegen des elektrischen Feldes, in der Abhängigkeit von der Größe des Peptidfragmentes unterschiedlich schnell richtung Detektor geführt. Das an den Massenspektrometer angeschlossene Computer-System berechnete dann die detektierten Massen (siehe als Beispiel Tab. 15 und Abb. 13). Die so errechneten Peptidmassen wurden dann mit Hilfe des MS-FIT Programms ausgewertet (<http://prospector.ucsf.edu/>). Das Programm verglich die

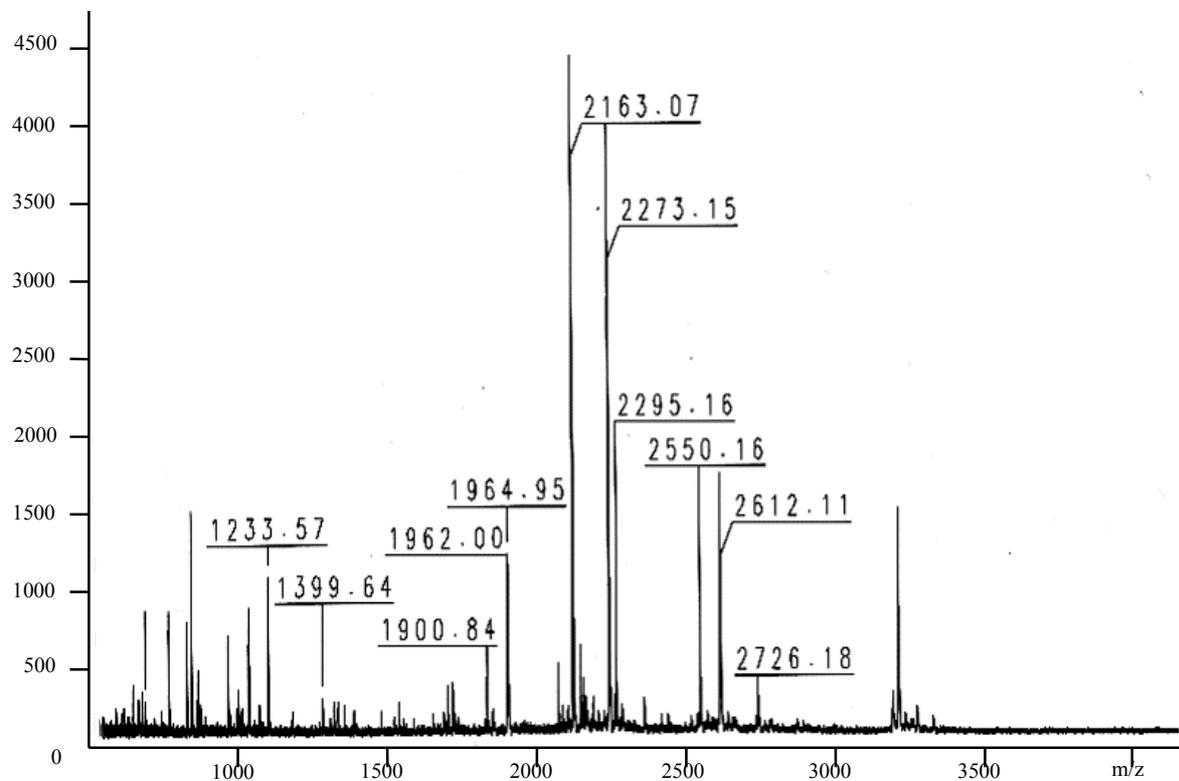
gemessene Massen mit allen bekannten theoretischen Massen der Proteine des *E. coli* Stammes MG1655 und anderen Bakterien und zeigte die somit identifizierten Proteine an. Die theoretischen Massen entstehen durch virtuellen Trypsinverdau von theoretischen Proteinen, die aufgrund der bekannten Genomsequenz den offenen Leserastern (ORFs) zugeordnet sind. Bei der Auswertung mußten mindestens vier der gemessenen Massen sich mit den theoretischen Massen abgleichen, um ein Protein erfolgreich identifizieren zu können. Außerdem war es für die Bestätigung der Identifizierung eines Proteins von Vorteil, wenn zusätzlich zu den normalen Peptidmassen, auch durch die Oxidation des vorhandenen Methionins, modifizierte Peptide detektiert worden sind. Diese Modifizierung korrelierte mit einer Erhöhung der eigentlichen Peptidmasse (siehe Tab. 15). Da es sich um ein silbergefärbtes Gel handelte, wurde auch ein Stück des Gels, wo sich kein sichtbarer Proteinspot befand, als Blindprobe genommen (P0), um eventuelle Verunreinigungen, die während des Färbevorgangs entstehen und als Massen detektiert werden, auszuschließen. Für die weitere Auswertung wurden immer die Massen, die bei der Blindprobe-Messung aufgetreten sind, abgezogen. Es wurde auch ein Spot ausgewählt, der bei allen Stämmen gleich stark exprimiert wurde, um die Genauigkeit der Messung zu überprüfen. Wie aufgrund der Gelvergleiche vermutet, handelte es sich bei diesem Protein um Elongationsfaktor EF-Tu. Es wurden dabei insgesamt 11 Massen zu den entsprechenden, theoretischen Peptiden zugeordnet, wobei 32% der Proteinsequenz abgedeckt wurde (Abb.13 und Tab. 15).

Tab. 15: Das detaillierte Ergebnisse der „MS-Fit“-Untersuchung von Spot Pp.

Gemessene Massen	Theoretische Massen	Peptidsequenz	Modifikation
837.4700	837.4947	(R)EHILLGR(Q)	
1233.5700	1233.6169	(K)GYRPQFYFR(T)	
1303.7300	1303.7837	(K)TTLTAAITTVLAK(T)	
1768.7800	1768.7866	(R)HYAHVDCPGHADYVK(N)	
<u>1780.9300</u>	<u>1780.9454</u>	<u>(K)MVVTLIHPIAMDDGLR(F)</u>	
<u>1796.8700</u>	<u>1796.9403</u>	<u>(K)MVVTLIHPIAMDDGLR(F)</u>	1Met-ox
1803.8700	1803.8877	(R)GITINTSHVEYDTPTR(H)	
<u>1812.9200</u>	<u>1812.9352</u>	<u>(K)MVVTLIHPIAMDDGLR(F)</u>	2Met-ox
1962.0000	1962.0224	(K)ILELAGFLDSYIPEPER(A)	
1964.9500	1964.9605	(R)ELLSQYDFPGDDTPIVR(G)	
2117.2800	2117.1647	(R)AIDKPFLPIEDVFSISGR(G)	

Es sind die gemessenen Massen mit den entsprechenden theoretischen Massen angegeben. Das modifizierte Peptid, seine Masse und die Massen mit Modifikationen sind unterstrichen.

a. i.

**Abb. 13:** Massenspektrum von Spot Pp.

In der Tabelle 16 sind die Ergebnisse der Auswertung für die ausgewählten Proteinspots zusammengefaßt.

Tab. 16: Untersuchung des Einflusses der PAI I₅₃₆/II₅₃₆ oder der tRNA₅^{Leu} auf die Expression von Membranproteinen des *E. coli* Stammes 536 mittels 2 D-Gelelektrophorese.

Spot Nr	Proteinname	MALDI-TOF-MS			536	536-21	536Δ102	536R3
		Peptide		Sequenz-abdeckung				
		Matching	Total					
P0	Blindprobe	-	-	-	-	-	-	-
P64	„DNA-Protection“ Protein	11	25	44 %	-	+	+	-
P65	keine Identifizierung	-	-	-	+	++	++	+
P66	Biotin-Synthase	4	29	13 %	+	++	++	+
P67	CTP-Synthase	4	16	25 %	+	-	+	-
P68	keine Identifizierung	-	-	-	++	+	+	+
P69	Polynukleotid-Phosphorylase	6	40	15 %	++	+	+	++
P70	keine Identifizierung	-	-	-	+	++	++	+
Pp	Elongationsfaktor (EF-Tu)	11	28	39 %	+++	+++	+++	+++

Die Proteine wurden nach der Phosphat-Methode isoliert.

+++ sehr starke Intensität des Spots, ++ mittel starke Intensität des Spots, + normale Intensität des Spots, - kein Spot detektierbar

Von den sieben unterschiedlichen Proteinspots konnten nur vier identifiziert werden (P64, P66, P67 und P69). Es handelte sich dabei um ein „DNA-Schutzprotein“, das während des Wachstums in Aktion tritt (P64), eine Biotin-Synthase (P66), eine CTP-Synthase (P67) und eine Polynukleotid-Phosphorylase (P69). Bei den anderen Spots konnte, nach dem Abzug von den gemessenen Massen der Blindprobe, kein Ergebnis erhalten werden. Außerdem sind die Ergebnisse bei den Proteinen P66 und P69 unsicher, weil nur 13 bzw 15 % der Proteinsequenz in den gefundenen Peptiden wiedergefunden werden konnten. Die Expression von fünf der Proteinen war wahrscheinlich *leuX*-abhängig (P64, P65, P66, P69 und P70). Die Stärke der Spots P64, P65, P66 und P70 wird negativ von der *leuX*-kodierte tRNA₅^{Leu}

beeinflusst, da die entsprechenden Spotintensitäten bei den *leuX*-Mutanten höher waren. Die Expression des Proteins P69 wird dagegen von *leuX* positiv beeinflusst. Das Protein P67 wird dagegen PAI I₅₃₆/II₅₃₆-abhängig exprimiert. Die Expression von Protein P68 wird wahrscheinlich sowohl von tRNA_{5^{Leu}} wie auch von PAI I₅₃₆/II₅₃₆ beeinflusst. Bei keinen der identifizierten Proteine handelte es sich um Membranproteine, was dafür spricht, daß die Phosphat-Methode sich nicht für die Isolierung von Membranproteinen eignet. Zusätzlich ergab sich das Problem, daß aufgrund geringer Proteinmenge nur analytische Gele durchgeführt werden konnten. Dadurch konnten nicht alle Proteine mittels MALDI-TOF-MS identifiziert werden.

2.3.2 Membranproteinisolierung für die zweidimensionale Gelelektrophorese – Saccharose-Methode

Mit der Methode konnten größeren Proteinmengen isoliert werden und somit war es auch möglich präparative Gele (Coomassie gefärbt) anzufertigen. Für jeden Stamm wurden jeweils zwei Präparationen durchgeführt werden von denen dann jeweils drei Gele gemacht wurden. Die Gele wurden visuell ausgewertet und vier Unterschiede in der Expression wurden gefunden. Drei der Proteine konnten mittels MALDI-TOF-MS in Halle identifiziert werden (Abb. 14 und Tab. 17). Bei diesen handelte es sich um das FliC-Protein (P71), die α -Untereinheit der ATP-Synthase (P72) und das äußere Membranprotein OmpA (P73). Die Expression aller Proteine war *leuX*-abhängig, wobei die ATP-Synthase und das unbekannte Protein wird von *leuX*-kodierte tRNA_{5^{Leu}} negativ beeinflusst. Das unbekannte Protein wurde anschließend mit den PAI-Sequenzen verglichen, konnte jedoch nicht identifiziert werden.

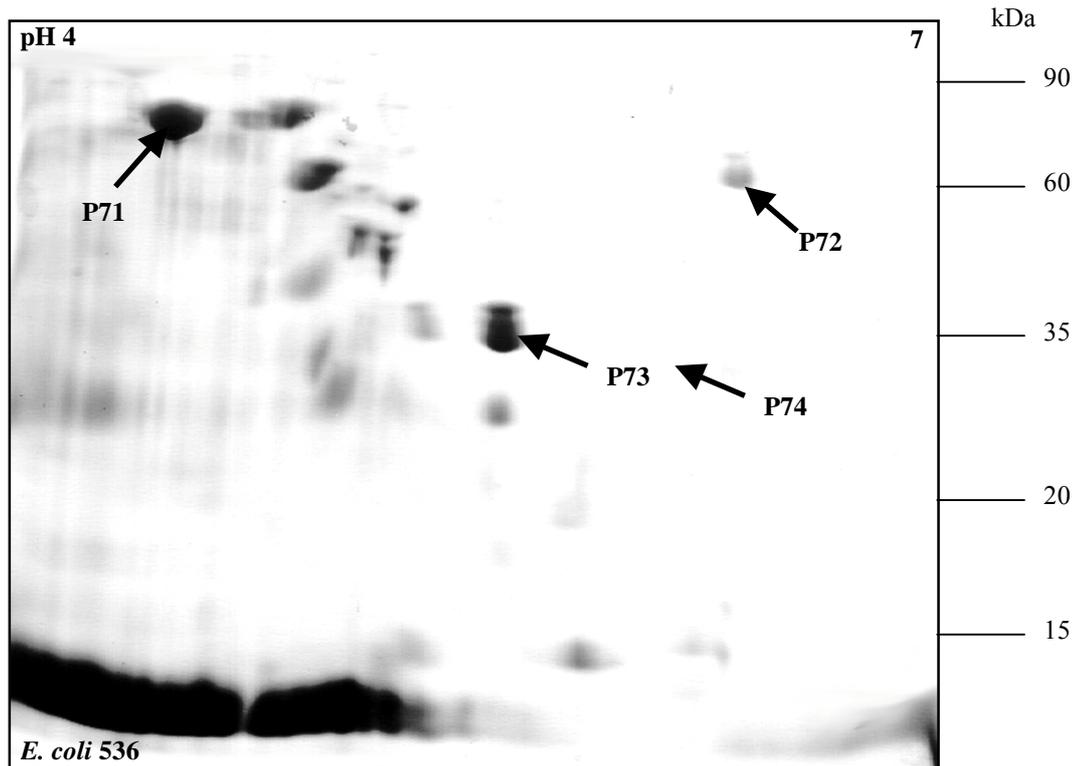


Abb. 14: Membranproteinmuster des uropathogenen *E. coli* Stammes 536. Mit schwarzen Pfeilen sind die Proteine markiert, die Unterschiede in der Expression zwischen den untersuchten Stämmen aufweisen.

In der Tabelle 17 sind die Ergebnisse der Identifizierung mittels MALDI-TOF-MS zusammengefaßt.

Tab. 17: Untersuchung des Einflusses der PAI I_{536}/II_{536} oder der $tRNA_5^{Leu}$ auf die Expression von Membranproteinen des *E. coli* Stammes 536 mittel 2 D-Gelelektrophorese.

Spot Nr	Proteinname	MALDI-TOF-MS			536	536-21	536 Δ 102	536R3
		Peptide		Sequenz-abdeckung				
		Matching	Total					
P71	Flagellin, FliC	12	38	35 %	+	-	-	+
P72	ATP-Synthase	11	16	26 %	+	++	++	+
P73	äußeres Membranprotein, OmpA	12	21	39 %	+	-	-	+
P74	nicht identifiziert	-	-	-	-	+	+	-

Die Proteine wurden nach Sacchrose-Methode isoliert ++ starke Intensität des Proteinspots, + normale Intensität des Proteinspots, - kein Proteinspot detektierbar

Zusammenfassung der Ergebnisse des Abschnitts 2

- Für die Untersuchung des Einflusses der Pathogenitätsinseln I₅₃₆ und II₅₃₆ und der *leuX*-kodierte tRNA_{5^{Leu}} auf die Expression von äußeren Membranproteinen wurden ein- und zweidimensionale Proteingele mit Membranpräparationen des Stammes 536 und seiner Derivate durchgeführt.
- Es wurden sowohl analytische (Silberfärbung) wie auch präparative (Coomassiefärbung) Proteinmengen aufgetrennt. Außerdem wurden verschiedene Methoden der Isolierung von Membranproteinen durchgeführt.
- Die eindimensionale Auftrennung der Membranproteinen ergab keine eindeutige Unterschiede zwischen den untersuchten Stämmen. Nur im Falle der Anzucht in 50 %igem Humanserum konnten zwischen den untersuchten Stämmen drei Unterschiede in der Expression von Proteinen gefunden werden.
- Um die OmpT-Protease in den eindimensionalen Gelen identifizieren zu können, wurde ein Western Blot mit einem OmpT-spezifischen polyklonalen Antikörper durchgeführt. Es konnten dabei keine Unterschiede in der Expression von OmpT zwischen den einzelnen Stämmen festgestellt werden.
- Für die zweidimensionale Auftrennung der Membranproteinen wurden zwei Isolierungsmethoden ausprobiert: die Phosphat- und die Saccharose-Methode.
- Die Phosphat-Methode führte nur zu geringen Proteinausbeute, so daß nur analytische Gele durchgeführt werden konnten, auf denen 7 Proteinspots mit unterschiedlicher Expression im jeweiligen Stammhintergrund entdeckt werden konnten. Davon konnten nur 4 Proteine mittels MALDI-TOF-MS identifiziert werden. Bei keinem der Proteine handelte es sich um ein Membranprotein.
- Bei der Saccharose-Methode konnten größeren Proteinmengen zweidimensional aufgetrennt werden. Es konnten 4 Unterschiede in der Expression der Proteine detektiert werden. Drei der Proteine konnten mittels MALDI-TOF-MS identifiziert werden. Es handelte sich dabei um das FliC-Protein, die α -Untereinheit der ATP-Synthase und das äußere Membranprotein OmpA.

3 Einfluß des *ygaG*-Gens auf die Genexpression des *E. coli* Stammes 536

3.1 Identifizierung des *ygaG*-Gens

Die Regulation der Genexpression in der Abhängigkeit von der Zelldichte wird „Quorum sensing“ genannt. Es wurden zwei „Quorum sensing“ Systeme beschrieben, die sowohl bei Gram-negativen wie Gram-positiven Bakterien zu finden sind. Bassler und Mitarbeiter haben 1999 ein hochkonserviertes Gen bei *E. coli* gefunden, das für eines der Elemente des AI-2-Systems („Autoinducer“ 2) kodiert. Bei diesem Gen (*ygaG*) handelt es sich um Analogon des *luxS*-Gens von *Vibrio harveyi*, dem im *E. coli* Stamm MG1655 bisher keine Funktion zugeordnet werden konnte (Surette et al., 1999a).

Im Laufe der Proteomanalyse des Stammes 536 und seinen Derivaten wurde ein Protein gefunden, das als hypothetisches 19,3 kDa YgaG-Protein identifiziert wurde. Das Protein wurde bei dem Wildtyp Stamm 536 und der *leuX*-Komplementante 536R3 stärker exprimiert als bei den PAI I₅₃₆/II₅₃₆ und *leuX*-Mutanten (siehe Abb. 15). Die DNA-Sequenzanalyse des *E. coli* K-12 Stammes MG1655 haben auch gezeigt, daß bei diesem Gen 21% aller Leucin-spezifischen Kodons von *leuX*-kodierten tRNA_{5^{Leu}} erkannt werden.

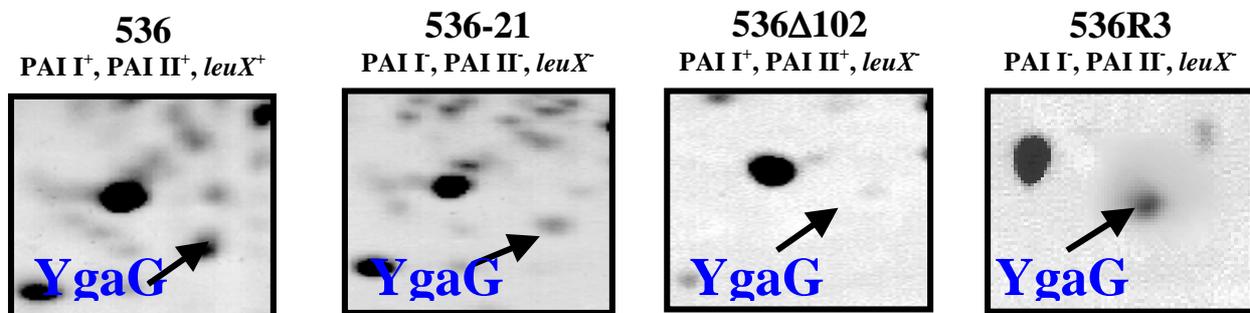


Abb. 15: Einfluß der tRNA_{5^{Leu}} auf die Expression des YgaG-Proteins im *E. coli* Stammes 536.

Aufgrund der Ergebnisse der Proteomanalyse und der Tatsache, daß das YgaG-Protein ein Analogon des LuxS-Proteins ist, das wahrscheinlich eine Rolle in der Pathogenität spielt, wurde das *ygaG*-Gen im *E. coli* Stamm 536 näher charakterisiert. Das Gen wurde mit *E. coli* MG1655-spezifischen Primern aus dem *E. coli* Stamm 536 amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in pUC19 kloniert und sequenziert. Die DNA-Sequenz wurde anschließend in die Proteinsequenz übersetzt und mit der *ygaG*-Sequenz von *Vibrio harveyi*, *E. coli* O157 : H7 und *Salmonella typhimurium* verglichen (siehe Abb. 16)

<i>V.h.</i>	BB120	MPLLLDSFTVDHTRMNAPAVRVAKTMQTPKGDITITVFDLRF TAPNKDIL
<i>E.c.</i>	O157:H7	MPLLLDSFTVDHTRMEAPAVRVAKTMNTPHGDAITVFDLRF CVPNKEVM
<i>S.T.</i>	LT2	NSDHTRMQAPAVRVAKTMNTPHGDAITVFDLRF CVPNKEVM
<i>E.c.</i>	536	MPLLLDSFTVDHTRMEAPAVRVAKTMNTPHGDAITVFDLRF CVPNKEVM
<i>V.h.</i>	BB120	SEKGIHTLEHLYAGFMRNHLNGDSVEIIDISPMGCRTGFYMSLIGTPD
<i>E.c.</i>	O157:H7	PERGIHTLEHLFAGFMRNHLNGNGVEIIDISPMGCRTGFYMSLIGTPS
<i>S.T.</i>	LT	PERGIHTLEHLFAGFMRDHLNGNGVEIIDISPMGCRTGFYMSLIGTPD
<i>E.c.</i>	536	PERGIHTLEHLFAGFMRNHLNGNGVEIIDISPMGCRTGFYMSLIGTPD
<i>V.h.</i>	BB120	EQRVADVWKAAMEDVCLKVQDQNQIPELNVYQCGTYQMHSLEAQDIAR
<i>E.c.</i>	O157:H7	EQQVADAWIAAMEDVCLKVENQNKIPELNEYQCGTAAMHSLDEAKQIAK
<i>S.T.</i>	LT2	EQRVADAWKAAMADVCLKVQDQNQIPELNVYQCGTYQMHSLSAQDIAR
<i>E.c.</i>	536	EQRVADAWKAAMEDVCLKVQDQNQIPELNVYQCGTYQMHSLEAQDIAR
<i>V.h.</i>	BB120	SILERDVAVNKNDELALPESMLRELRID
<i>E.c.</i>	O157:H7	NILEVGV RINSNEELALPKEKLQELHI
<i>S.T.</i>	LT2	HILERDVRVNSNKELALPKEKLQETDI
<i>E.c.</i>	536	NILERDVRINSNEELALPKEKLQELHI

Abb. 16: Vergleich der LuxS- und YgaG-Proteinsequenzen verschiedener Bakterien. Die Aminosäuren die nicht identisch mit dem LuxS_{V.h.} Protein sind wurden rot gekennzeichnet.

Die YgaG Proteinsequenz des Stammes 536 zeigte große Homologien zu der Sequenz des LuxS-Proteins bei *Vibrio harveyi*.

3.2 Konstruktion einer ygaG-Mutante im *E. coli* Stamm 536

Um die Funktion des YgaG-Proteins im *E. coli* Stamm 536 näher zu charakterisieren und um den Einfluß des Proteines auf Virulenz festzustellen, wurde durch genetische Manipulation das ygaG-Gen in diesem Stamm deletiert. Die Deletion des Gens erfolgte durch den Austausch der wildtypischen Sequenz gegen ein zu dieser homologes, jedoch verkürztes DNA-Fragment ohne den Teil des entsprechenden Strukturgens. Ein 882 bp großes DNA-Fragment des „upstream“-Bereiches und ein 965 bp großes Fragment des „downstream“-Bereiches von ygaG wurden im Suizidplasmid pCVD442 fusioniert. Zur Amplifikation mittels PCR wurden im Falle des „upstream“-Fragmentes die Primer ygaG1 und ygaG2 eingesetzt. Der „downstream“-Bereich des Gens wurde mit Hilfe des Primerpaares ygaG3 und ygaG4 amplifiziert. In Abb. 17 ist die Klonierung von pCKP3 dargestellt.

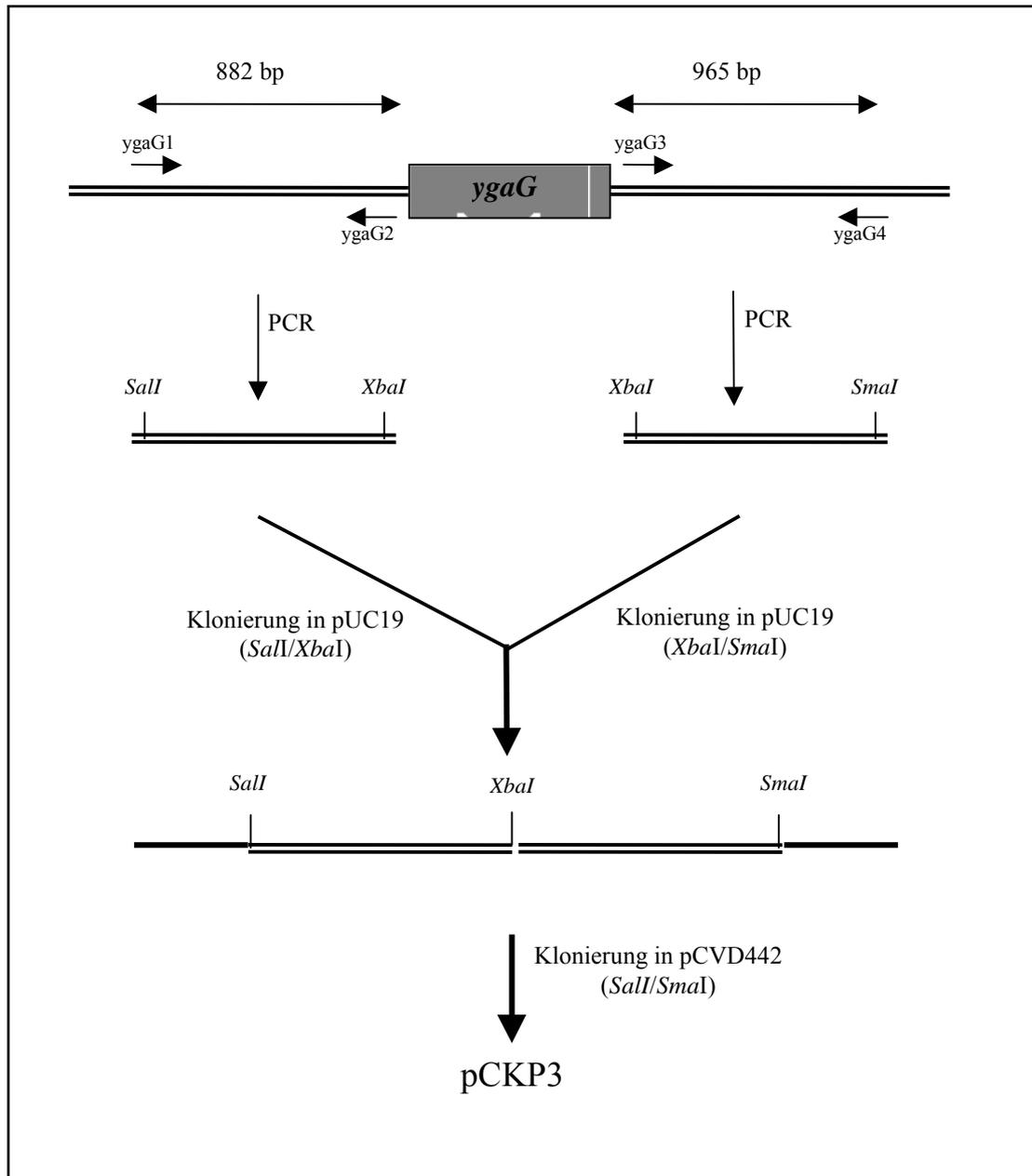


Abb. 17: Schematische Darstellung der Konstruktion des Plasmides pCKP3. Die Klonierungsstrategie ist im Text detailliert erklärt. Eine Plasmidkarte ist im Anhang abgebildet.

Das entstandene Konstrukt wurde pCKP3 genannt. Dieses Konstrukt enthält den R6K Replikationsursprung (*oriR6K*) und als Marker eine Ampicillinresistenz sowie das *sacB*-Gen aus *Bacillus subtilis*, welches für die Laevansaccharase kodiert (Abb. 18). Durch Konjugation wurde das Plasmid in den Stamm 536 übertragen. Aufgrund des *oriR6K* kann sich pCKP3 nur in *pir*⁺ Stämmen, aber nicht in Wildtyp Stämmen wie *E. coli* 536 replizieren. Folglich enthalten Klone des Stammes 536, die nach der Konjugation durch Selektion auf Sm/Ap erhalten wurden, das durch Einzelcrossover in das Chromosom integrierte Plasmid (Abb. 18).

Zum Austausch der plasmidkodierten *ygaG*-Deletion gegen des chromosomale vollständige *ygaG*-Gen muß ein zweites homologes Rekombinationsereignis erfolgen. Dazu wurden Klone mit chromosomal integriertem pCKP3 in 3 ml LB-Medium bei 37 °C ÜN angezogen. Mit 50 µl dieser Kultur wurden 3 ml frisches LB-Medium angeimpft und 8 Stunden bei 37 °C inkubiert. Diese wiederholte Kultur ohne Selektionsdruck ermöglicht den Bakterien durch ein zweites „crossover“ den Verlust des integrierten Plasmides. Diese 8 Stunden-Kulturen wurden als 10⁻²- und 10⁻³-Verdünnungsstufen auf LB-Agar, der kein NaCl aber 5 % (w/v) Saccharose enthält, ausplattiert und ÜN bei RT inkubiert. Auf diese Weise wurden Klone selektioniert, bei denen der Suizidvektor wieder durch ein zweites homologes Rekombinationsereignis aus dem Chromosom entfernt worden ist (Abb. 18). Klone die das Plasmid nicht verloren haben, können aufgrund der weiterhin exprimierten Laevansaccharase nicht wachsen. Dieses Enzym polymerisiert die im Agar enthaltene Fruktose, die durch Hydrolyse der Saccharose entsteht, zu Laevan, was für *E. coli* toxisch ist. Die Klone, die auf Saccharose wachsen können, müssen im Anschluß daraufhin untersucht werden, ob die Deletion erfolgreich war. Die so entstandene Mutante ohne *ygaG*-Gen wurde als *E. coli* Stamm 536Δ*ygaG* bezeichnet.

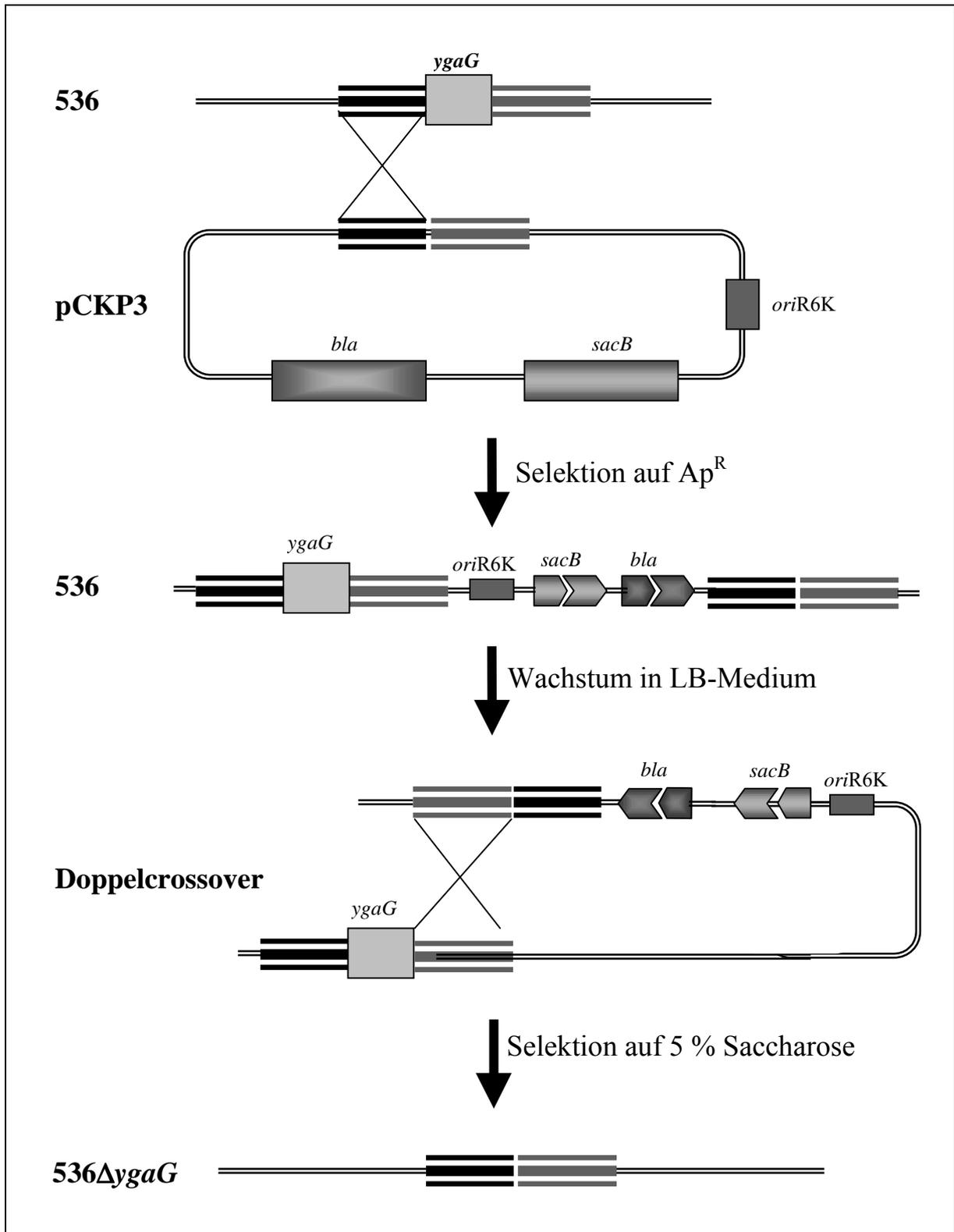


Abb. 18: Strategie zur Deletion des *ygaG*-Genes

Die erfolgreiche Deletion des *ygaG*-Gens dokumentieren ein Southern“-Blot und eine PCR-Ausschlußreaktion (Abb. 19 A, B).

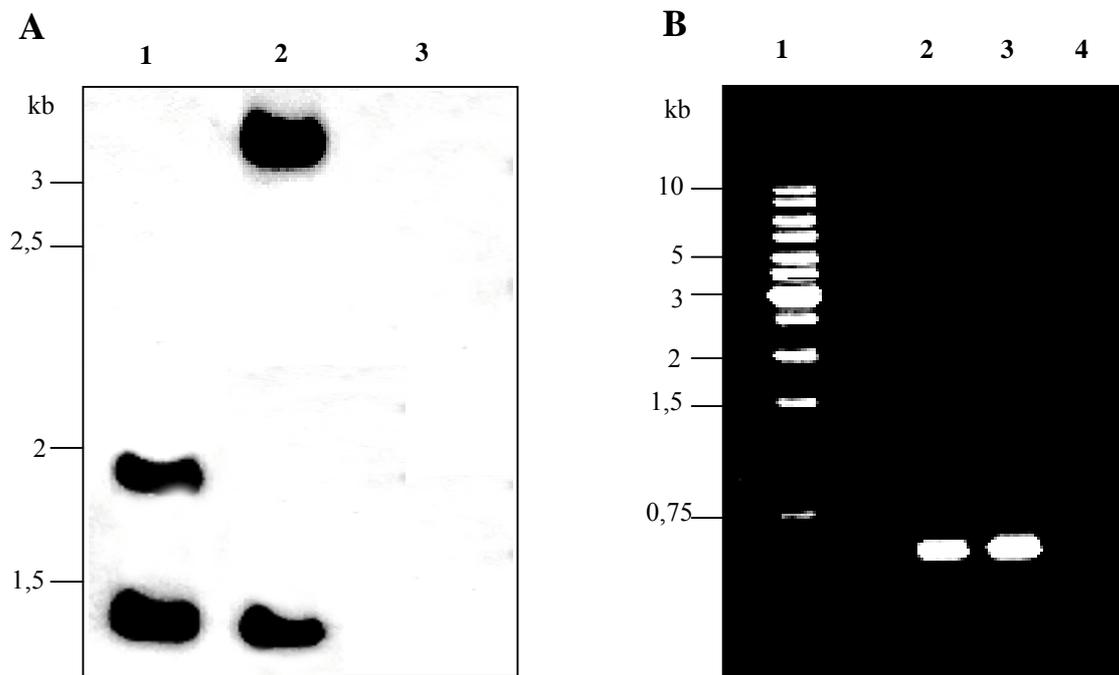


Abb. 19: Nachweis der *ygaG*-Deletion im *E. coli* Stamm 536 durch „Southern Blot“- (A) und PCR-Analyse (B).

(A) Für den „Southern Blot“ wurde *EcoRV*-verdaute chromosomale DNA mit einer Peroxidase-markierten 604 bp *ygaG*-spezifischen Sonde (PCR-Produkt, *ygaGa/ygaGb*) hybridisiert

Spur 1: 536, Spur 2: 536/pCKP3-Einzelcrossover-Klon, Spur 3: 536 Δ *ygaG*.

(B) Die PCR-Ausschlußreaktion wurde mit dem Primerpaar *ygaGa* und *ygaGb* durchgeführt.

Spur 1: Marker, Spur 2: 536, Spur 3: 536/pCKP3-Einzelcrossover-Klon, Spur 4: 536 Δ *ygaG*

Das *ygaG*-Gen besitzt eine *EcoRV*-Schnittstelle, die dazu führte, daß mit der *ygaG*-spezifischen Sonde im *E. coli* Stamm 536 zwei Banden von 1,44 kb und 1,93 kb detektiert worden sind. Aufgrund der Integration des Suizidplasmides pCKP3 in das Chromosom des Stammes 536 erfolgte eine Größenverschiebung des Restriktionsfragmentes der chromosomalen DNA das *ygaG* beinhaltet. Da auch der Suizidplasmid pCKP3 eine *EcoRV*-Schnittstelle erfolgte nach der Integration des pCKP3 Plasmides eine Größenverschiebung der 1,93 kb Bande auf 3,3 kb (Abb. 19 A, Spur 2), die 1,44 kb Bande blieb bestehen. Diese Größenverschiebung deutete darauf hin, daß die Einzelcrossover im „downstream“-Bereich des *ygaG*-Gens erfolgte. Nach der erfolgreichen *ygaG*-Deletion war das entsprechende Gen nicht mehr nachweisbar (Abb. 19 A, Spur 3). Der Stamm 536 Δ *ygaG* konnte mit dem Plasmid pGKP1 (siehe Anhang) komplementiert werden. Dazu wurde ein 1530 bp Fragment (*ygaG*-

Gen mit dem dazugehörigen Promotor) durch PCR (Primer: *ygaG1/ygaGb*) aus dem Genom des Stammes 536 amplifiziert und in den Vektor pGM T-Easy kloniert.

3.3 Charakterisierung des *ygaG*-negativen *E. coli* Stammes 536 Δ *ygaG*

Der *ygaG*-negative *E. coli* Stamm 536 wurde hinsichtlich seines Wachstumverhaltens und der phänotypischen Expression von bekannten Virulenzfaktoren mit dem Wildtyp und der *ygaG*-Komplementante des Stammes 536 verglichen. Auf das Wachstum in LB- und in M9-Minimalmedium wirkte sich die Deletion von *ygaG* nicht aus. Auch auf das Wachstum bei den unterschiedlichen Temperaturen hat das *ygaG*-Gen keinen Einfluß. Die weitere phänotypische Charakterisierung der *ygaG*-Deletionsmutante hinsichtlich der Expression von Virulenzfaktoren ist in Tab. 18 zusammengefaßt.

Tab. 18: Phänotypische Charakterisierung des Stammes 536 im Vergleich zum Wildtyp 536 und der Komplementante 536 Δ *ygaG*/pGKP1.

Eigenschaften	Stamm		
	536	536 Δ <i>ygaG</i>	536 Δ <i>ygaG</i> /pGKP1
<i>ygaG</i>	+	-	+
Pai I ₅₃₆	+	+	+
Pai II ₅₃₆	+	+	+
Typ 1-Fimbrien	+	+	+
S-Fimbrien	+	+	+
Prf-Fimbrien	+	+	+
α -Hämolysin	+	+	+
Flagelle	+	+	+
Enterobaktin	+	+	+
Serumresistenz	+	+	+

+ Eigenschaft ist bei dem Stamm vorhanden

- Eigenschaft ist nicht bei dem Stamm vorhanden

Soweit untersucht, beeinflusste YgaG-Protein nicht die Enterobaktin-, α -Hämolysin- und die Flagellenexpression. S-, Prf- und Typ 1-Fimbrien wurden bei allen Stämmen durch Agglutination mit spezifischen Antikörpern (S- und Prf-Fimbrien) bzw. durch Hefeagglutination (Typ 1-Fimbrien) nachgewiesen. Die Auswirkung der *ygaG*-Deletion auf

die Serumresistenz des Stammes 536 wurde im Serumresistenztest untersucht. Es konnte dabei kein Einfluß des YgaG-Proteins auf die Serumresistenz festgestellt werden.

Desweiteren wurde Proteomanalyse durchgeführt. Der *ygaG*-negativer Stamm 536 Δ *ygaG* und der Wildtyp Stamm 537 wurden im LB-Medium angezüchtet und in der früheren Stationären Phase geerntet. Die Bakterien wurden mit Hilfe der French-Press aufgeschlossen. Die Zellrohlysate wurden auf präpartiven 2-D Gele aufgetrennt. Es wurden von beiden Stämmen jeweils zwei unabhängige Proteinpräparationen durchgeführt. Die Rohlysaten aus jeder Präparation wurden jeweils zweimal unabhängig voneinander zweidimensional aufgetrennt. Die Gele wurden mit Coomassie gefärbt und visuell ausgewertet (Abb. 20). Es konnten keine signifikante Unterschiede, außer im niedermolekularen Bereich, festgestellt werden. Dort sieht man Unterschiede in der Stärke der Proteinexpression. Es gibt mehrere kleine Proteine, deren Molekularmasse kleiner ist als 15 kDa, die bei der *ygaG*-Mutante stärker exprimiert werden als bei dem Wildtyp Stamm. Außerdem konnte gezeigt werden, daß das YgaG-Protein nur bei dem *E. coli* Stamm 536 nachweisbar war (siehe Pfeil Abb. 19).

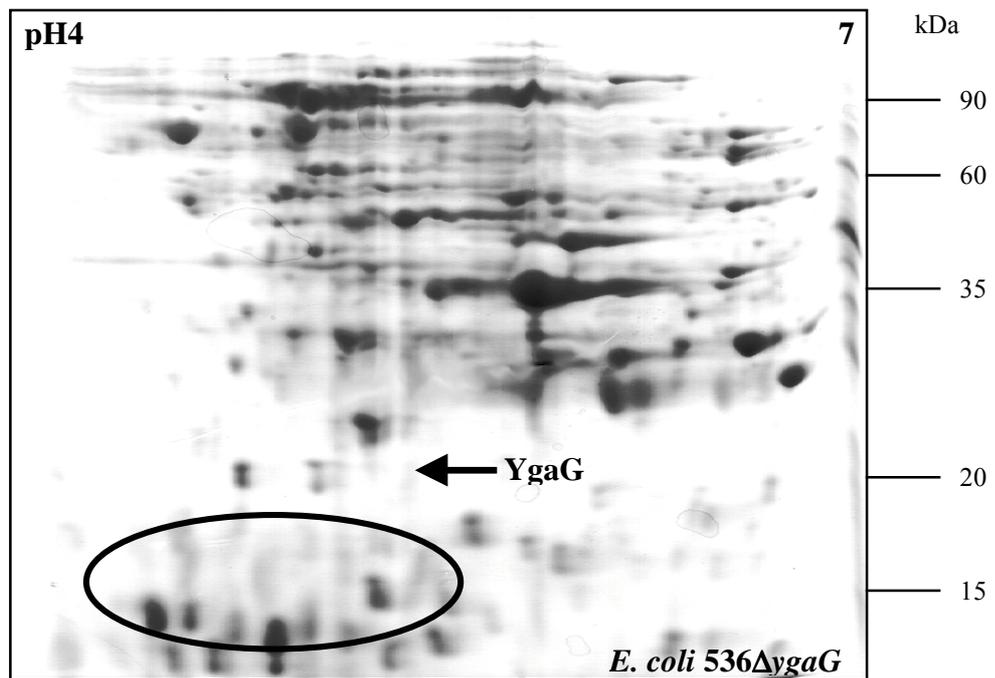
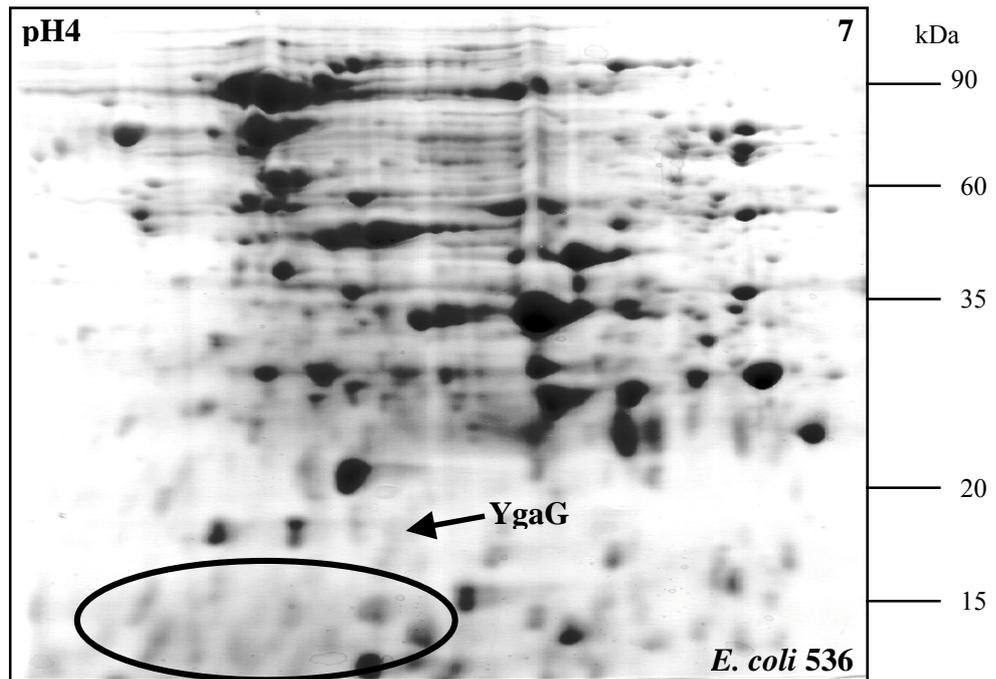


Abb. 20: Einfluß des YgaG-Proteins auf das Proteinexpressionsmuster des *E. coli* Stammes 536. Mit dem Pfeil wurde der *ygaG*-spezifischer Proteinspot markiert. Mit dem Kreis wurde der Bereich markiert, in dem sich eine Unterschiedliche Proteinexpression zeigte.

Zusammenfassung der Ergebnisse des Abschnitts 3

- Durch Proteomvergleiche zwischen dem *E. coli* Stamm 536 und seinen PAI I₅₃₆/II₅₃₆- sowie tRNA_{5^{Leu}}-negativen Derivaten wurde ein hypothetisches Protein YgaG gefunden, einem Analogon des LuxS-Proteins ist, das beim „Quorum sensing“ von *V. harveyi* eine Rolle spielt.
- Das *ygaG*-Gen beim *E. coli* Stamm 536 wurde amplifiziert und sequenziert. Die daraus abgeleitete Proteinsequenz wurde mit homologen LuxS-Sequenzen anderer Bakterien verglichen. Die Sequenz des *E. coli* Stammes 536 zeigte große Homologien zu der LuxS-Sequenz des *V. harveyi* Stammes.
- Es wurde eine *ygaG*-Deletionsmutante (536Δ*ygaG*) hergestellt.
- Eine Phänotypische Charakterisierung der *ygaG*-Deletionsmutante wurde durchgeführt. Der 536Δ*ygaG* Stamm wurde hinsichtlich seines Wachstumsverhaltens und der phänotypischen Expression von Virulenzfaktoren mit dem Wildtyp und einer *ygaG*-Komplementante des Stammes 536 verglichen. Es konnten dabei keine Unterschiede festgestellt werden.
- Eine Proteomanalyse des Stammes 536Δ*ygaG* wurde im Vergleich zum Wildtyp Stamm 536 durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß der *ygaG*-spezifischer Proteinspot nicht mehr detektierbar war. Außerdem wurden die Unterschieden in der Stärke der Proteinexpression im niedermolekularen Bereich festgestellt. Diese Proteine werden stärker bei der *ygaG*-Mutanten als bei dem Wildtyp Stamm 536 exprimiert.

4 Einfluß der *leuX*-kodierten tRNA_{5^{Leu}} auf die Transkription von Typ 1-Fimbrien

Die Tatsache, daß die *leuX*-kodierte tRNA_{5^{Leu}} die Expression von vielen Virulenzfaktoren, unter anderem auch die der Typ 1-Fimbrien, beeinflusst, führte zu der Frage wie diese potentielle Regulator die Transkription von *fimB* und *fimE* beeinflusst. Um diese Frage beantworten zu können, wurden Transkriptionsfusionen zwischen den Promotoren des *fimB*- und *fimE*-Gens und dem promotorlosen Gen der β -Galaktosidase (*lacZ*) konstruiert. Die Expression des Enzyms, das sich unter der Kontrolle der entsprechenden Promotoren befinden, läßt sich leicht mit Hilfe eines kolorimetrischen Tests bestimmen. Diese Fusionen wurden in den *fimB*- bzw. *fimE*-Lokus des Chromosomes eines β -Galaktosidase-negativen *E. coli* 536- und 536 Δ 102-Stammes integriert.

4.1 Klonierung der „upstream“- und „downstream“-Bereiche des *fimB*- und *fimE*-Gens sowie Fusion mit dem promotorlosen Gen der β -Galaktosidase

Anhand der von Friedrich (1997) bestimmten Sequenzen des „upstream“- und „downstream“-Bereiches von *fimB* des *E. coli* Stammes 536 konnten die Primerpaare *fimB1/fimB2* und *fimB3/fimB4* bzw. *fimE1/fimE2* und *fimE3/fimE4* ausgewählt werden. Der *fimB*-„downstream“-Bereich wurde mit den Primern *fimB3/fimB4* und der *fimE*-„downstream“-Bereich mit den Primern *fimE3/fimE4* amplifiziert und jeweils über die *XbaI*- und *SmaI*-Schnittstellen in den Vektor pUC19 kloniert. Die resultierenden Plasmide heißen pKP1 und pKP2. Das 779 bp große *fimB*-„upstream“- und 1100 bp große *fimE*-„upstream“-PCR-Produkt wurden jeweils über die *SalI*- und *XbaI*-Schnittstellen in den Vektor pTAC3953 kloniert. Dieser Vektor enthält ein promotorloses *lacZ*-Gen mit eigener Shine-Dalgarno-Sequenz. Aus den resultierenden Plasmiden pTKP1 (*fimB*) bzw. pTKP2 (*fimE*) wurden anschließend die jeweiligen „upstream“-Fragmente zusammen mit dem *lacZ*-Gen mit *SalI* und *XhoI* herausgespalten und in den *SalI/XhoI* geschnittenen Vektor pKP1 (*fimB*) bzw. pKP2 (*fimE*) kloniert. Dabei handelt sich um die Derivate des Plasmids pUC19, die einen 1038 bp großen „downstream“-Bereich von *fimB* (*XhoI/SmaI*) bzw. einen 1020 bp „downstream“-Bereich von *fimE* (*XhoI/SmaI*) enthalten. Aus den resultierenden Plasmiden pKP3 (*fimB*), bzw. pKP4 (*fimE*) wurden anschließend die mit *fimB*- bzw. *fimE*-spezifischen „up“- und „downstream“-Bereichen flankierte Reporterfusion mit *SalI* und *SmaI* herausgespalten und in den *SalI/SmaI* geschnittenen Vektor pCVD442 kloniert (Abb. 21). Die dadurch entstandenen

Plasmide pCKP1 (*fimB*) bzw. pCKP2 (*fimE*) wurden zur Intergration in den *fimB*- bzw. *fimE*-Lokus des *E. coli* 536*lacZ*- und 536 Δ 102*lacZ*-Chromosomes eingesetzt.

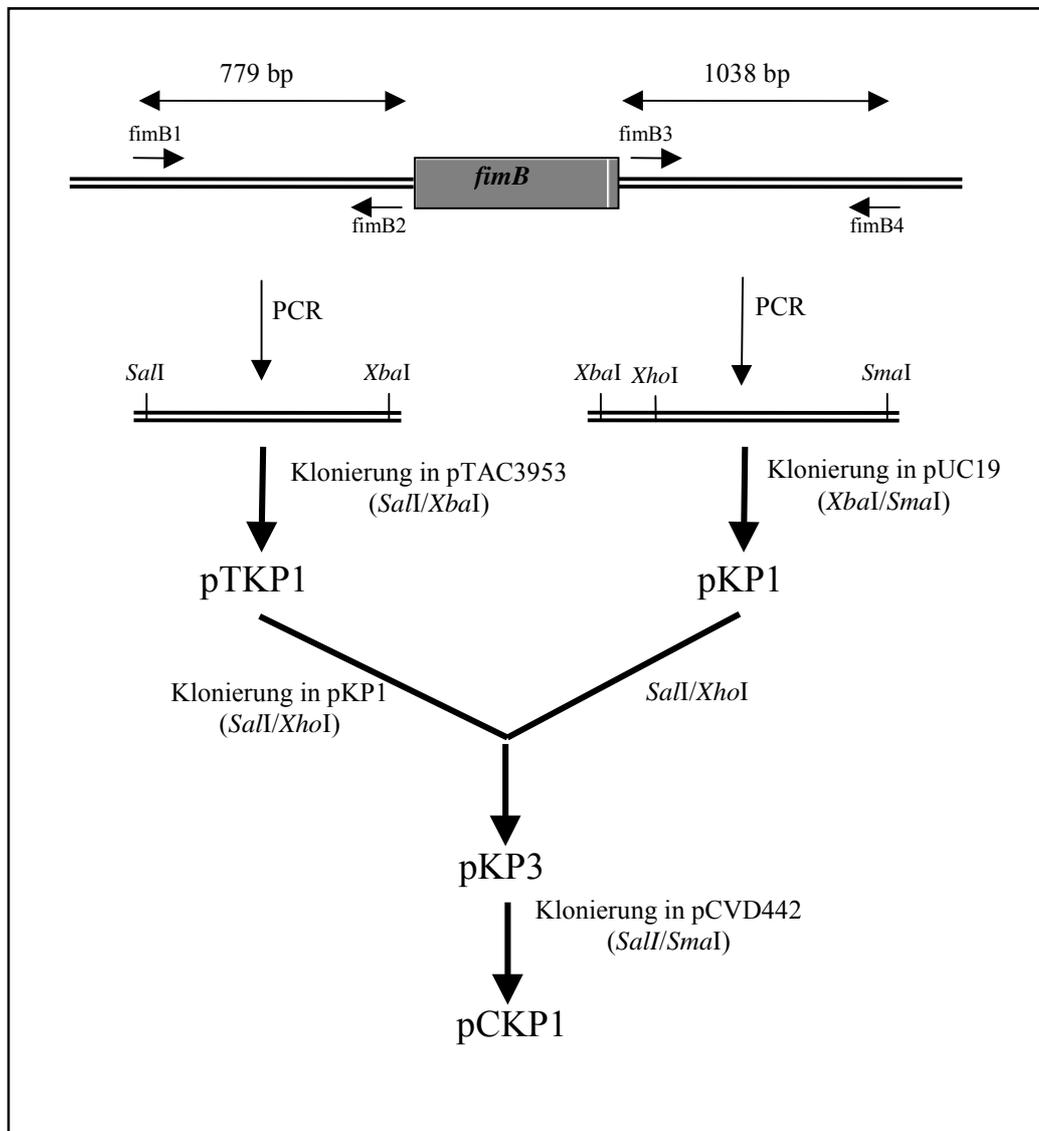


Abb. 21: Strategie zur Konstruktion des Plasmides pCKP1. Die dazugehörigen Plasmide sind im Anhang abgebildet. Die Strategie zur Konstruktion des Plasmides pCKP2 erfolgte analog zu der für pCKP1 Beschriebenen Vorgehensweise (siehe Text).

4.2 Integration der Reportergenfusion in das Chromosom von β -Galaktosidase-negativen Derivaten des *E. coli* Stammes 536

Die Integration der *lacZ*-Fusion in den *fimB*- bzw. *fimE*-Lokus des Stammes 536*lacZ* und 536 Δ 102*lacZ* mit Hilfe des Vektor pCKP1 (*fimB*) und pCKP2 (*fimE*) erfolgte analog der unter V.3.2 beschriebenen Vorgehensweise. Abb. 22 A und B zeigten „Southern Blots“ zum

Nachweis der erfolgreichen chromosomalen Integration. Die resultierende Stämme wurden *536fimB::lacZ* und *536Δ102fimB::lacZ* bzw. *536fimE::lacZ* und *536Δ102fimE::lacZ* genannt.

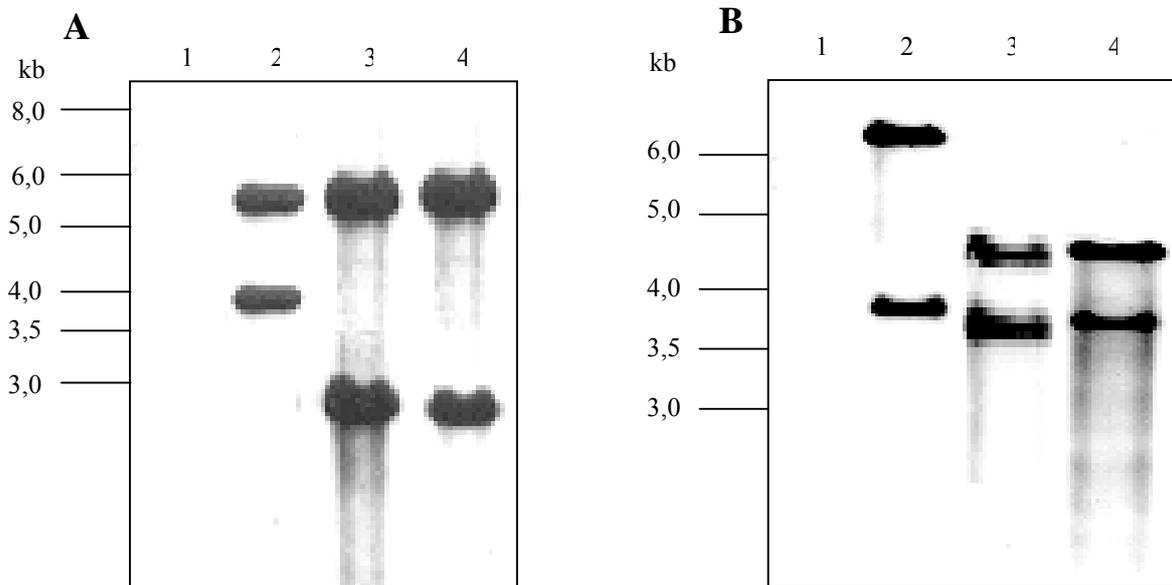


Abb. 22: „Southern Blot“-Analyse von *EcoRV*-gespaltener chromosomaler DNA des *E. coli* Stammes *536lacZ* und *536Δ102lacZ* nach Integration der Reporterfusion in den *fimB*- bzw. *fimE*-Lokus.

A: Spur 1, *536lacZ*; Spur 2, *536lacZ*/pCKP1-Einzelcrossover; Spur 3, *536fimB::lacZ*; Spur 4, *536Δ102fimB::lacZ*

B: Spur 1, *536lacZ*; Spur 2, *536lacZ*/pCKP2-Einzelcrossover; Spur 3, *536fimE::lacZ*; Spur 4, *536Δ102fimE::lacZ*

Die Hybridisierung wurde mit einer Peroxidase-markierten 1,2 kb *lacZ*-spezifischen Sonde (PCR-Produkt, *lacZ1/lacZ2*) durchgeführt.

Da das *lacZ*-Gen eine *EcoRV*-Schnittstelle besitzt, wurden mit der im *E. coli* Stamm nach durch „Einzelcrossover“ in das Chromosom integrierten pCKP1, zwei Banden von 3,8 kb und 5,85 kb detektiert. Diese Größenverschiebung deutete darauf hin, daß die homologe Rekombination im „downstream“-Bereich des *fimB*-Gens erfolgte. Nach der erfolgreichen zweiten homologen Rekombination erfolgte erneute Größenverschiebung des Restriktionsfragmentes der chromosomalen DNA. Die 3,8 kb Bande verkleinerte sich um die entsprechende Größe des entfernten Suizidvektors auf 2,7 kb. Dies deutet darauf hin, daß ein zweites homologes Rekombinationsereignis erfolgreich war. Ebenso wurden mit der *lacZ*-spezifischen Sonde im *E. coli* Stamm *536fimE::lacZ* bzw. *536Δ102fimE::lacZ*, nach der Integration des Plasmides pCKP2 in das Chromosom, zwei Banden von 3,8 kb und 7,5 kb detektiert. Diese Größenverschiebung deutete darauf hin, daß die homologe Rekombination im „upstream“-Bereich des *fimE*-Gens stattfand. Nach dem, durch ein zweites homologes

Rekombinationsereignis, der Suizidvektor entfernt worden ist, wurde eine Größenverschiebung der 7,5 kb Bande um ca. 3kb detektiert.

Die *fimB*- bzw. *fimE*-Transkription in entsprechenden Wachstumskulturen des *E. coli* Stammes 536*fimB*::*lacZ* bzw. 536*fimE*::*lacZ* wurde anhand der Reporterfusion untersucht und zu den β -Galaktosidaseaktivität des Stammes 536 Δ 102*fimB*::*lacZ* bzw. 536 Δ 102*fimE*::*lacZ* in Beziehung gesetzt.

4.3 Untersuchung des Einflusses von Umweltfaktoren auf die *fimB*- und *fimE*-Promotoraktivität in dem *E. coli* Stamm 536 und seinem *leuX*-negativen Derivat 536 Δ 102

Umwelteinflüsse spielen bei der Regulation von virulenzassoziierten Genen eine entscheidene Rolle. Um zu untersuchen, ob solche Umweltfaktoren auch auf die Regulation der *fimB*- und *fimE*-Gene bei dem Stamm 536 und der *leuX*-negativen Mutante einfluß nehmen, wurde die *fimB*- und *fimE*-Trankription in Abhängigkeit von zwei unterschiedlichen Umweltfaktoren, wie Temperatur und Medium untersucht. Zum Vergleich der Promotoraktivitäten unter den entsprechenden Wachstumsbedingungen wurden die vier Reporterstämme (536*fimB*::*lacZ*, 536*fimE*::*lacZ*, 536 Δ 102*fimB*::*lacZ* und 536 Δ 102*fimE*::*lacZ*) unter gleichen Bedingungen kultiviert. Zu verschiedenen Zeiten wurden den jeweiligen Kulturen Proben entnommen, deren β -Galaktosidaseaktivitäten (siehe IV.9.18) bestimmt wurde.

4.3.1 Einfluß des Nährmediums auf die Regulation der *fimB*- und *fimE*-Transkription

Um den Einfluß von Wachstum auf dem festem oder in flüssigem Medium auf die Transkriptionsaktivität der *fimB*- und *fimE*-Promotoren zu untersuchen, wurden die vier Reporterstämme sowohl in Flüssigkultur als auch auf LB-Agarplatten über einen Zeitraum von 48 h angezogen. Da bei der Anzucht auf Agarplatten eine Bestimmung der Wachstumsphase nur schwer möglich ist, wurden Verdünnungen einer ÜN-Kultur (1:200) auf Agarplatten ausplattiert und bei 37 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Inokulation wurden dann von einer Platte Zellen abgeschwemmt und anschließend für β -Galactosidasetests eingesetzt. Der Vergleich der erhaltenen β -Galaktosidaseaktivitäten nach Anzucht auf Agar und nach Anzucht in Flüssigkultur ist in Abb. 23 dargestellt.

Generell bewirkte die Anzucht auf festem Medium im Vergleich zur Anzucht in flüssigem Medium bei allen Reporterstämmen eine minimale Reduktion der β -Galaktosidaseaktivitäten nur bei 32 und 48 h.

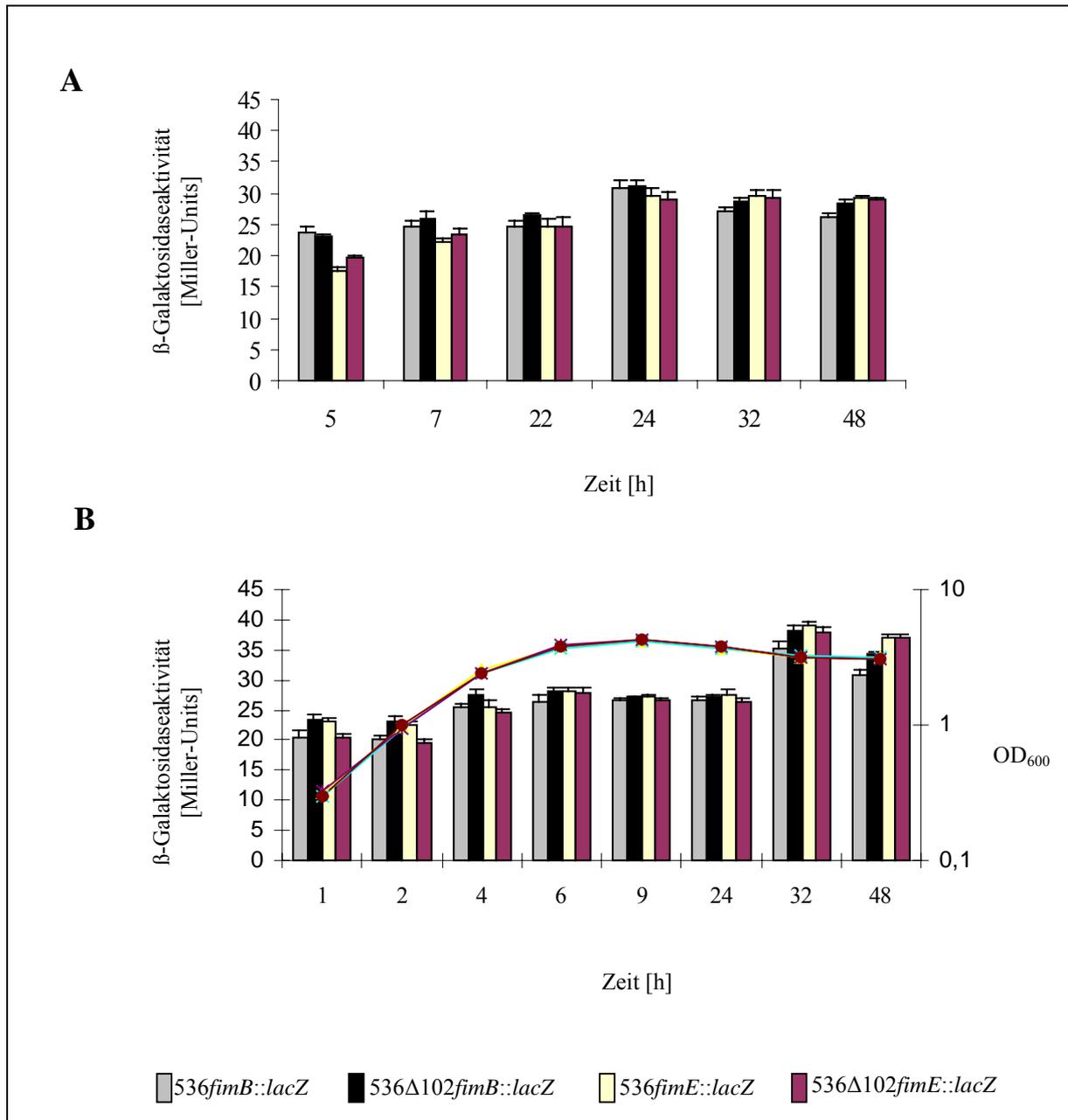


Abb. 23: Einfluß der *leuX*-kodierte tRNA_{5^{Leu}} auf die Expression der *fimB*- und *fimE*-Gene in Abhängigkeit von Wachstumsmedium. Die β -Galaktosidaseaktivitäten bei Anzucht auf festem Medium (**A**) wurden mit denen bei Anzucht in Flüssigkultur (**B**) verglichen. Die eingesetzten Reporterstämme wurden über einen Zeitraum von 48 h in Flüssigkultur bzw. auf festem Medium bei 37 °C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und deren β -Galaktosidaseaktivität bestimmt.

4.3.2 Einfluß der Temperatur auf die Regulation der *fimB*- und *fimE*-Transkription

Damit die Aktivitäten der untersuchten Promotoren in Abhängigkeit von der Wachstumstemperatur bestimmt werden konnten, wurden die Reporterstämme bei

Temperaturen von 30 °C und 37 °C über einen Zeitraum von 48 h angezchtet und verglichen (Abb. 24).

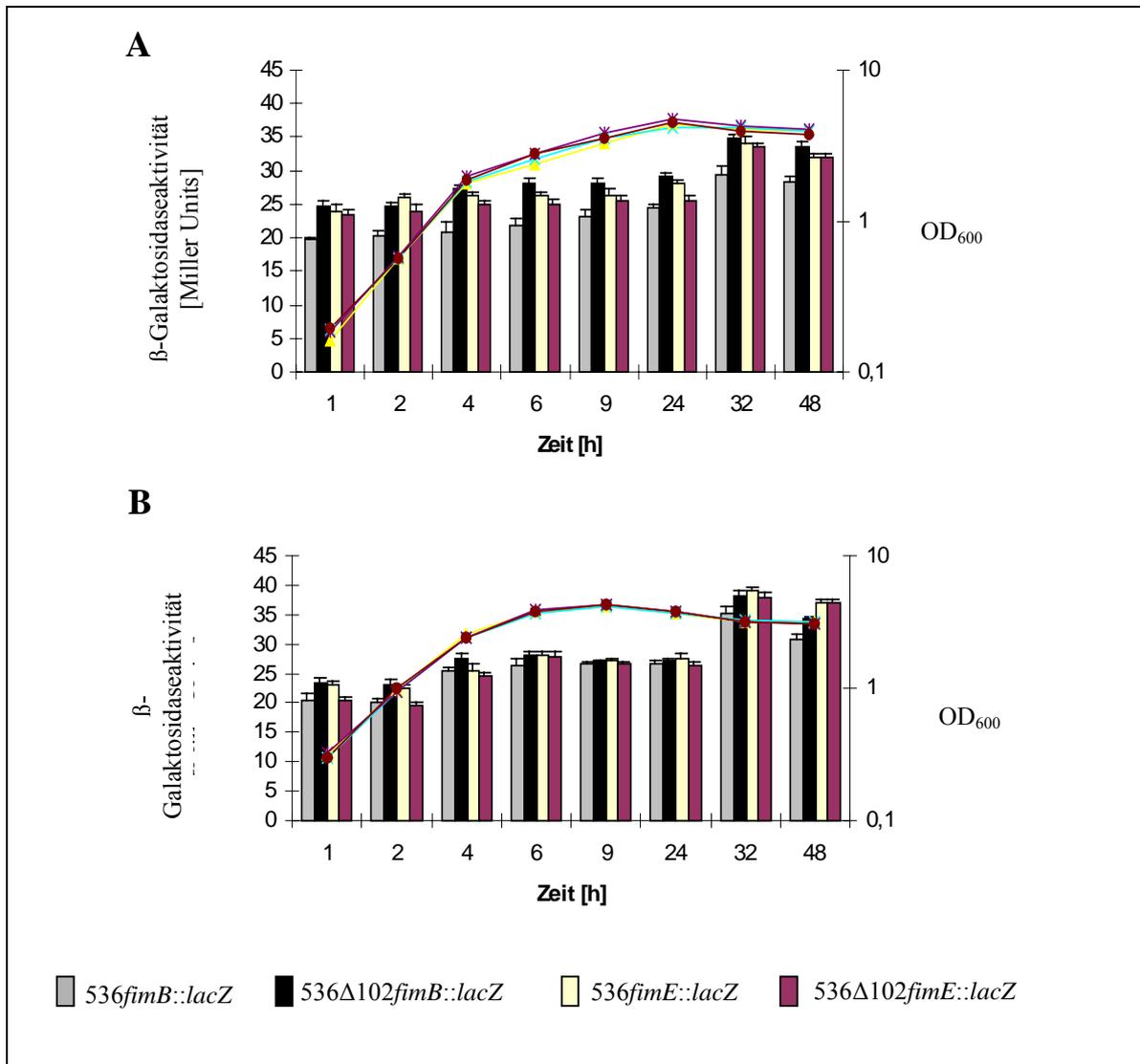


Abb. 24: Einfluß der $tRNA_5^{Leu}$ auf die Expression von *fimB*- und *fimE*-Genen in Abhängigkeit von Wachstumstemperatur. Die β -Galaktosidaseaktivitäten bei Anzucht in LB-Medium während des Wachstums bei folgenden Temperaturen wurde verglichen: 30 °C (A) und 37 °C (B). Die eingesetzten Reporterstämme wurden über einen Zeitraum von 48 h in Flüssigkultur bei der angegebenen Temperatur inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und deren β -Galaktosidaseaktivitäten bestimmt.

Zusammenfassung der Ergebnisse des Abschnitts 4

- Es wurden Transkriptionsfusionen zwischen den Promotoren des *fimB*- und *fimE*-Gens und dem promotorlosen Gen der β -Galaktosidase (*lacZ*) konstruiert.
- Diese Fusionen wurden in den *fimB*- bzw. *fimE*-Lokus des Chromosomes eines β -Galaktosidase-negativen *E. coli* 536- und 536 Δ 102-Stammes integriert, um den Einfluß der *leuX*-kodierte tRNA_{5^{Leu}} auf die Transkription von *fimB* und *fimE* zu überprüfen.
- Zum Vergleich der Promotoraktivitäten unter zwei unterschiedlichen Umweltfaktoren (Temperatur, Medium) wurden die vier Reporterstämme (536*fimB*::*lacZ*, 536*fimE*::*lacZ*, 536 Δ 102536*fimB*::*lacZ*, 536 Δ 102536*fimE*::*lacZ*) unter gleichen Bedingungen kultiviert. Zu verschiedenen Zeiten wurden den jeweiligen Kulturen Proben entnommen und deren β -Galaktosidaseaktivität bestimmt.
- Es konnten keine signifikante Unterschiede in Abhängigkeit von Temperatur und Wachstums zwischen den untersuchten Reporterstämmen festgestellt werden.

VI

Diskussion

Die Proteomanalyse des uropathogenen Stammes *E. coli* 536

E. coli gehört zur physiologischen Darmflora des Menschen. Zu den apathogenen Vertretern der *E. coli*-Gruppe gehört der *E. coli* Stamm K-12 MG1655. Die Sequenz des Stammes wurde 1997 von Blattner und Mitarbeitern publiziert und sie konnten keine der klassischen Virulenzgene identifizieren (Blattner et al., 1997). Das Genom pathogener *E. coli*-Stämme besteht aus dem sogenannten Kerngenom sowie aus zusätzlichen virulenzassoziierten Genen. Virulenzgene können chromosomal vorliegen, sind aber auch häufig auf mobilen genetischen Elementen wie z. B. Plasmiden, Bakteriophagen, Transposons oder Pathogenitätsinseln (PAIs) lokalisiert (Mühldorfer und Hacker, 1994). Bei letzteren handelt es sich um genetische Elemente, die unter den Bakterien weit verbreitet sind und bei der Evolution und Entstehung neuer pathogener Varianten durch horizontalen Gentransfer eine wichtige Rolle spielen (Groisman und Ochman, 1994; Hacker et al., 1999; Dobrindt und Hacker, 1999). Bis jetzt wurde die Struktur und Funktion der PAIs mittels Sequenzanalysen bzw. Inaktivierung von PAI-kodierten Genen erfaßt. Zur Zeit jedoch scheint hier die Analyse des Proteoms eine der aussichtsreichsten Alternativen zu sein, denn das komplexe Netzwerk der Zellregulation läßt sich nicht durch das Entschlüsseln von genomischer DNA eines Organismus charakterisieren. Mit Hilfe der Proteomanalyse wird die Charakterisierung von PAI-kodierten Genen und deren Einfluß auf die allgemeine Genexpression auf Proteinebene möglich. Mit Hilfe zweidimensionaler Gelelektrophorese und Massenspektrometrie lassen sich spezifische Genprodukte, je nach Wachstumsbedingungen oder genetischem Hintergrund, nachweisen und identifizieren. Im Anschluß daran ist die vergleichende Analyse der Proteine möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, u. a. mittels der Methoden der 2 D-Gelelektrophorese und MALDI-TOF-MS Proteine des uropathogenen *E. coli* Stammes 536 zu identifizieren und charakterisieren. Dabei handelte es sich um Proteine, die entweder PAI-kodiert vorliegen (PAI I₅₃₆ und PAI II₅₃₆) oder deren Expression von diesen beeinflusst wird. Außerdem wurde der Einfluß der *leuX*-kodierten tRNA_{5^{Leu}} auf die Proteinexpression des Stammes 536 und seiner Derivate analysiert.

Sowohl die Zellextrakte als auch unterschiedliche Zellfraktionen des *E. coli* Stammes 536 und seiner Derivate wurden für die Analysen verwendet. Mit Hilfe von 2 D-Gelen war es möglich, jeweils Proteinextrakte mit einer Proteinkonzentration von bis zu 1 mg aufzutrennen und anschließend einzelne Proteinspots zu identifizieren. Die Gele wurden nach zwei

Gesichtspunkten verglichen: Zum einen nach Proteinen, die in den PAI I₅₃₆/PAI II₅₃₆-negativen Stämmen nicht detektiert wurden, und zum anderen nach Proteinen, deren Expression durch diese PAIs oder die *leuX*-kodierte tRNA_{5^{Leu}} reprimiert oder induziert wurde. Durch 2 D-Gelelektrophorese von radioaktivmarkierten Zellextrakten von *E. coli* 536 und untersuchten Mutanten wurden 11 Proteine gefunden, deren Expression PAI I₅₃₆/II₅₃₆ bzw. *leuX*-abhängig ist. Eine entsprechende Analyse von nicht radioaktiv markierten Zellextrakten bzw. Kulturüberständen oder Membranfraktionen führte zur Beschreibung von 69 Proteinen, deren Expression PAI I₅₃₆/II₅₃₆ bzw. *leuX*-abhängig ist. Von diesen wurden 10 Proteine in den silbergefärbten Gelen, die restlichen 59 in Coomassiegefärbten Gelen entdeckt. Von den 10 Proteinspots aus den silbergefärbten Gelen konnte nur eines auch in den Coomassie-gefärbten Gelen gefunden werden. Es handelt sich um das Phage-Schock Protein (PspA). Außerdem wurden noch 58 andere Proteinspots detektiert, deren Expression sich innerhalb der untersuchten Stämmen unterscheidet. Davon konnten 47 mittels MALDI-TOF-MS und Datenbank Vergleiche identifiziert werden. Insgesamt wurden drei der Proteine als hypothetische Proteine und sechs als unbekannt definiert. Das Genom der klinischen Isolate und der *E. coli* Stamm 536 unterscheidet sich somit in der Größe als auch in seiner genetischen Information von den sequenzierten Laborstämmen wie z. B. *E. coli* MG1655.

1 Pathogenitätsinsel I₅₃₆- und II₅₃₆-abhängige Proteine des *E. coli* Stammes 536

Aufgrund der unterschiedlicher Proteinexpression in Abhängigkeit von der Präsenz der PAI I₅₃₆/II₅₃₆ oder der tRNA_{5^{Leu}} konnten zwei Gruppen von Proteinen identifiziert werden. Die eine Gruppen beinhaltet die Proteine, deren Expression von den Pathogenitätsinseln PAI I₅₃₆ und PAI II₅₃₆ entweder negativ oder positiv beeinflusst wird. Die dazu gehörigen Proteine sind auch im Proteom PAI-negativer Stämme zu sehen. Somit sind die entsprechenden Gene nicht auf den PAIs lokalisiert. Ihre Expression aber wird von Faktoren, möglicherweise von Regulator-Proteinen, welche auf einer der beiden Pathogenitätsinseln kodiert sind, beeinflusst. Anhand der Proteomanalyse zeigte sich, daß die Expression von insgesamt 12 Proteinen von den Pathogenitätsinseln I₅₃₆/II₅₃₆ abhängig ist. Die Expression von fünf Proteinen wird durch das Vorhandensein der PAI I₅₃₆ und PAI II₅₃₆ negativ beeinflusst. Eines der Proteine konnte in ausreichenden Mengen aufgetrennt, und als eine Transketolase (TktA) identifiziert werden. Das Enzym katalysiert zusammen mit einer Transaldolase die Umwandlung von Pentosephosphaten in zwei Fruktose-6-phosphate und ein Glycerinaldehyd-3-phosphat. Die Pentosephosphate sind Vorstufen der Nucleotidsynthese (Neidhardt et al., 1996). Ob und wie

die Pathogenitätsinseln I₅₃₆ und II₅₃₆ auf diesen Syntheseweg einwirken, ist unklar. Die erhöhte Expression der Transketolase bei den PAI I₅₃₆/II₅₃₆-negativen Mutanten würde jedoch dafür sprechen, daß die Pentosephosphate vermehrt abgebaut werden und somit nicht mehr in ausreichenden Mengen für die Nukleotidsynthese zur Verfügung stehen.

Die Expression von sieben Proteinen dagegen wurde durch die PAI I₅₃₆/II₅₃₆ positiv beeinflusst. Vier dieser Proteine konnten identifiziert werden. Eines der Proteine wurde bei der Membranproteinisolierung gefunden, obwohl es sich nicht um ein Membranprotein handelt, sondern um ein Enzym, welches an der Synthese von CTP (Cytosintriphosphat) und somit an der Nukleotidsynthese beteiligt ist. Der Nukleinsäuremetabolismus unterliegt einer strengen Kontrolle. Die Pyrimidinbiosynthese wird zum einen durch den ATP-Gehalt der Zelle aktiviert und zum anderen über das CTP gehemmt (Neidhardt et al., 1996). Es ist unklar wie die Pathogenitätsinseln I₅₃₆ und II₅₃₆ die Expression der Proteine, die an dem Nukleinsäuremetabolismus beteiligt sind, beeinflussen. In den letzten Monaten wurde die vollständige Sequenz beider Pathogenitätsinseln bestimmt. Dabei wurden auch potentielle Regulatoren gefunden. Ob sich darunter auch Regulatoren, die bei der Nukleotidsynthese eine Rolle spielen finden, ist nicht bekannt. Bei den anderen drei Proteinen handelte es sich um die Pyruvat-Kinase 1, ein 30S ribosomales Protein und die Glutathion-Synthetase. Die Glutathion-Synthetase bildet zusammen mit der γ -Glutamylcystein-Synthetase aus Glutamat, Cystein und Glycin ein Glutathion Molekül. Glutathion nimmt an einer Reihe von Entgiftungs- und Stoffwechselprozessen teil. Es ist z. B. ein Substrat für Peroxidase-Reaktionen und hilft so beim Abbau von Peroxiden, die von Oxidasen erzeugt werden. Peroxide sind für die Zelle toxisch, da sie beispielsweise SH-Gruppen der Proteine oxidieren (Voet, 1992).

Eines der gefundenen Proteine wird wahrscheinlich durch die PAI I₅₃₆ oder PAI II₅₃₆ kodierte Regulatoren beeinflusst, da es nur bei den PAI I₅₃₆/II₅₃₆-positiven Stämmen vorkommt. Das Protein konnte mittels MALDI-TOF-MS als die Salicyl-AMP-Ligase (YbtE) von *Yersinia pestis* identifiziert werden. Es handelt sich dabei um ein Protein das bei der Yersiniabaktinsynthese eine Rolle spielt (Gehring et al., 1998).

PAI I₅₃₆ und PAI II₅₃₆-kodierte Virulenzfaktoren wie α -Hämolysin oder Prf-Fimbrien konnten bei der Analyse nicht entdeckt werden. Dies kann damit erklärt werden, daß die Proteomanalyse nur einen Ausschnitt aller möglichen exprimierten Proteinen der Zelle

darstellt. Zum einen werden nicht alle Proteine auf dem Gel erfaßt, da nur definierte pH-Gradienten angewendet werden können. Zur Zeit sind Auftrennungen bis zu einem pH-Wert von 12 möglich. Jene Proteine, die einen höheren isoelektrischen Punkt (pI) haben, werden somit nicht oder nur unzureichend erfaßt. Zum anderen ist die Auftrennung von sehr kleinen (kleiner als 15 kDa) und sehr großen (größer als 200 kDa) Proteinen nur begrenzt möglich. Außerdem sind auf den analytischen und präparativen Gelen nur solche Proteine sichtbar, die in entsprechend großen Mengen vorliegen und somit für die herkömmlichen Färbemethoden ausreichend sind. Die Nachweisgrenze bei der Silberfärbung beispielweise beträgt ca. 10 ng. Ebenso können Proteine, die sehr schnell abgebaut oder nicht konstitutiv exprimiert werden, wie z. B. verschiedene Regulator-Proteine, nicht erfaßt werden. In diesen Fällen bietet sich die Methode der radioaktiven Markierung der Proteine an. Dies jedoch macht die Identifizierung mittels Edman-Sequenzierung oder MALDI-TOF-MS unmöglich. Stark hydrophobe Proteine wiederum, die normalerweise auch zu den Membranproteinen gehören, sind sehr schwer löslich und können deshalb nur unzureichend oder nicht zweidimensional aufgetrennt werden.

2 *leuX*-abhängige Proteine des *E. coli* Stammes 536

Die Bedeutung der Verfügbarkeit seltenerer tRNAs in verschiedenen Wachstumsphasen als regulatorisches Prinzip der bakteriellen Genexpression wurde mehrfach beschrieben (Andersson und Kurland, 1990; Saier Jr., 1995). Die seltene *leuX*-kodierte tRNA_{5^{Leu}} spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Expression von Virulenzfaktoren bei dem *E. coli* Stamm 536. Es konnte gezeigt werden daß, alleine das Fehlen dieser Leucyl-tRNA die Expression von Typ 1-Fimbrien, Enterobaktin und Flagellen, die Serumresistenz und die „*in vivo*“ Virulenz beeinflusst (Dobrindt et al., 1998; Ritter et al., 1995, 1997; Susa et al., 1996; Blum, 1994).

Im Rahmen der durchgeführten Proteomanalyse wurden auch Proteine entdeckt, die eine *leuX*-abhängige Expression zeigen. Dieser Proteingruppe gehören die meisten der bei der Proteomanalyse entdeckten Proteine an, was die zentrale Rolle der *leuX*-kodierten tRNA_{5^{Leu}} für die Regulation der Genexpression von *E. coli* 536 unterstreicht (siehe Abb. 25; Piechaczek et al., 1999). Im Laufe der Proteomanalyse wurden insgesamt 55 Proteine, die *leuX*-abhängig sind, gefunden. Die meisten der Proteine (33) werden positiv durch das *leuX*-kodierte

$tRNA_5^{Leu}$ beeinflusst. Drei der *leuX*-abhängigen Proteine wurden während der eindimensionalen Auftrennung der Membranfraktionen gefunden.

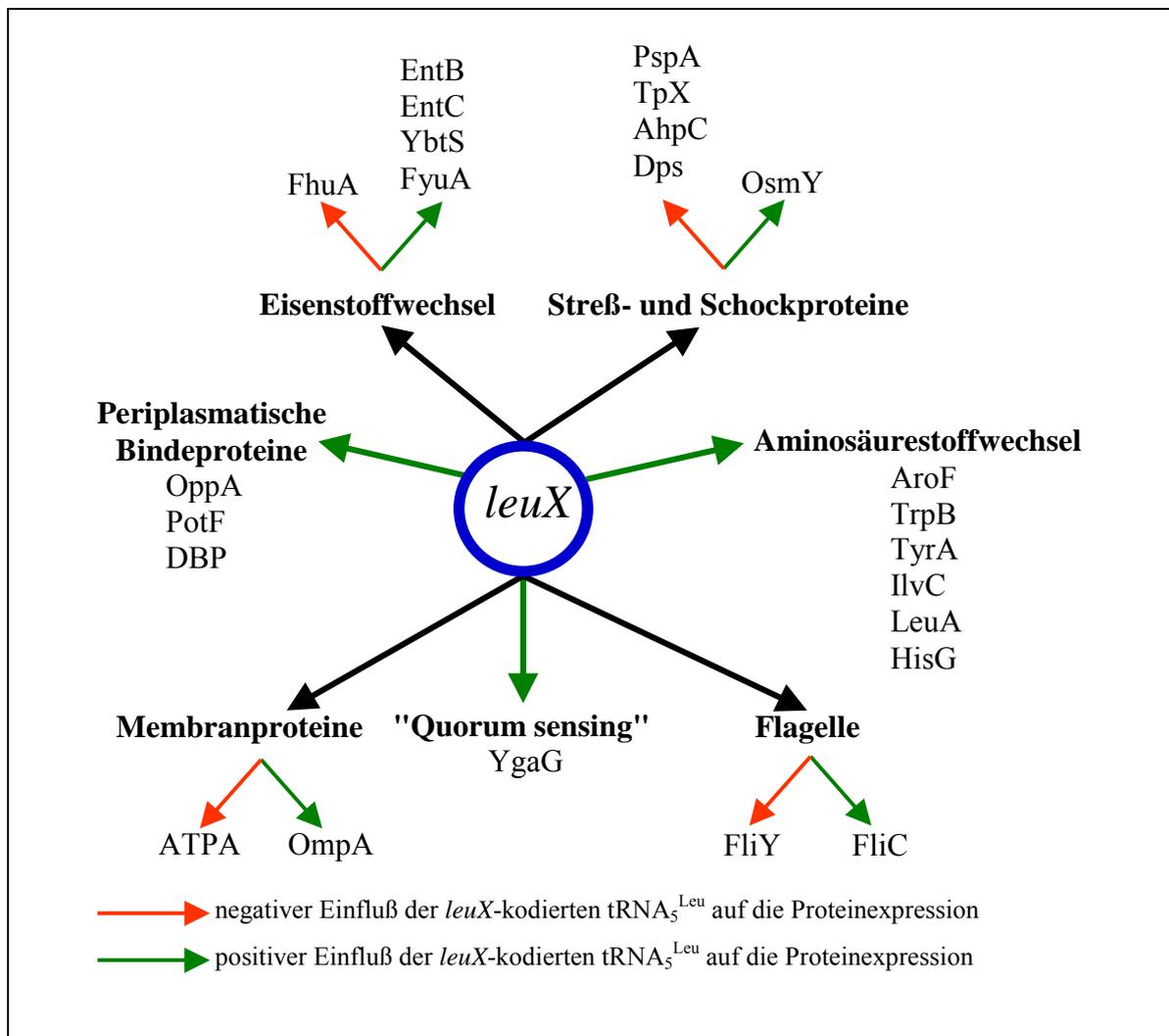


Abb. 25: Schematische Darstellung der zentralen Rolle der *leuX*-kodierten $tRNA_5^{Leu}$ für die Regulation der Genexpression von *E. coli* 536.

EntB: Isochorismatase; EntC: Isochorismat-Hydroxymutase; YbtS: Anthranilat-Synthase; FyuA: Pesticin-Rezeptor; FhuA: Ferrichrom-Eisen-Rezeptor; PspA: „Phage shock protein A“; TpX: Thiol-Peroxidase; AhpC: Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase; Dps: DNA-Schutzprotein; OsmY: osmotisch-induzierbares Protein; AroF: Phospho-2-Dehydro-3-Deoxyheptonat-Aldolase; TrpB: Tryptophan-Synthase; TyrA: Chorismat-Mutase; IlvC: Ketol-Acid-Reduktoisomerase; LeuA: 2-Isopropylmalat-Synthase; HisG: ATP-Phosphoribosyltransferase; FliY: Cystin bindendes periplasmatisches Protein; FliC: Flagellin; YgaG: hypothetisches 19,3 kDa Protein, OmpA: außen Membran Protein; OppA periplasmatisches Oligopeptid-bindendes Protein; PotF: Putrescin-bindendes periplasmatisches Protein; DBP: periplasmatisches dipeptidbindendes Protein

Proteine des Eisenstoffwechsels

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, daß die *leuX*-kodierte $tRNA_5^{Leu}$ die Expression von Genen beeinflusst, die für die Enterobaktinproduktion wichtig sind. Die *leuX*-negativen 536-Derivate sind nicht mehr in der Lage, Enterobaktin zu synthetisieren. Sie weisen lediglich

eine Akkumulation der letzten Enterobaktinvorstufe 2,3-Dihydroxybenzoesäure (2,3-DHBA) auf (Ritter et al., 1995).

Mit Hilfe der vergleichenden Proteomanalyse wurden diese Ergebnisse bestätigt. Zwei Enterobaktinbiosynthese-Enzyme EntB (Isochorismatase) und EntC (Isochorismat-Hydroxymutase) konnten nachgewiesen werden. Sie wurden im Wildtyp Stamm *E. coli* 536 stärker als in den *leuX*-negativen Mutanten exprimiert (Piechaczek et al., 1999).

Das Enterobaktin ist ein zyklisches Trimer von 2,3-Dihydroxy-N-Benzoyserin (2,3-DHBS), welches Eisen mit hoher Spezifität und Affinität koordinativ bindet (Neidhardt et al., 1996). Im Gegensatz zu spezifischen Virulenzfaktoren wie Toxinen und Adhäsinen tragen Siderophore nur indirekt zur Pathogenität von Bakterien bei, indem sie für das Wachstum und Überleben der Bakterien in Wirtszellen essentielle Eisen zu Verfügung stellen. Das Enterobaktin entsteht aus Chorismat, der Vorstufe der aromatischen Aminosäuren, Folsäure und Ubichinon, über eine Serie von enzymatischen Reaktionen. Die Enterobaktinbiosynthese geschieht über zwei Stufen: Zunächst erfolgt die Umwandlung von Chorismat zu 2,3-Dihydroxybenzoesäure (DHB) durch EntC, EntB und EntA. Anschließend kommt es zur Synthese von Enterobaktin aus DHB und L-Serin durch den membrangebundenen EntDEFG-Multienzymkomplex (Earhard, 1987; Nahlik et al., 1987). Aus den Ergebnissen der Proteomanalyse sieht man, daß die Expression der EntB- und EntC-Enzyme von der *leuX*-kodierte tRNA_{5^{Leu}} positiv beeinflusst wurde. Dieser Einfluß basiert wahrscheinlich nicht auf einer verstärkten Transkription der entsprechenden Gene, sondern auf der Kodonzusammensetzung der *entB*- und *entC*-Transkripte. Beide weisen einen erhöhten Gehalt an *leuX*-spezifischen Kodons im Vergleich zur durchschnittlichen Kodonzusammensetzung auf. Wahrscheinlich werden sie deshalb in *leuX*-negativen Mutanten in geringeren Umfang synthetisiert. Das Chorismat ist auch die Vorstufe von anderen Stoffwechselprodukten wie aromatische Aminosäure, Folsäure und Ubichinon, die für das Wachstum der Zelle wichtig sind. Möglich wäre, daß die Expression beider Enzyme durch einen anderen Regulator, oder auch durch die *leuX*-kodierte tRNA_{5^{Leu}} selbst, herunterreguliert wird, um somit das Chorismat für andere Synthesewege zur Verfügung zu stellen. Es könnte zudem sein, daß die Expression der beiden Enzyme EntB und EntC in den *leuX*-Mutanten aufgrund der Akkumulation von DHB reduziert wird (Feedback-Regulation). Die genaue Regulation ist jedoch ungeklärt. Die Expression des Multienzymkomplexes EntDEFG ist auf jedem Fall *leuX*-abhängig, da die letzte Reaktion der Enterobaktinbiosynthese nicht stattfindet. Ob es sich hier jedoch um einen

direkten Einfluß der tRNA₅^{Leu} handelt ist noch unklar, da noch sehr wenig über die Funktionsweise der einzelnen Enzyme des Komplexes bekannt ist. Interessanterweise handelt es sich bei *entD* um ein Gen mit vielen seltenen Aminosäure-Kodons. Es wird zusammen mit *fepA*, einem Gen, das für den Enterobaktinrezeptor kodiert, transkribiert (Neidhardt et al., 1996). Bei diesen Genen werden 17 % (*entD*) bzw. 18,5 % (*fepA*) aller Leucin-spezifischen Kodons von der *leuX*-kodierte tRNA₅^{Leu} erkannt, was vielleicht für eine reduzierte Translation sprechen könnte. Es wird jedoch vermutet, daß erst ein 20 %iger Kodongehalt Einfluß auf die Translation eines Proteins nehmen kann. Somit ist der Einfluß der *leuX*-kodierte tRNA₅^{Leu} auf die Enterobaktinsynthese noch unklar.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Wachstumsversuche unter Eisen-Limitierung haben gezeigt, daß die *leuX*-negativen Stämme sehr wohl in der Lage sind, Eisen aufzunehmen. Es wurde mit Hilfe der 2 D-Gele festgestellt, daß der Ferrichrom-Eisen-Rezeptor FhuA in den *leuX*-Mutanten höher exprimiert wird. Das könnte darauf zurückzuführen sein, daß die Bakterien den Enterobaktinmangel durch andere Systeme kompensieren müssen oder daß die Expression von FhuA durch die *leuX*-kodierte tRNA₅^{Leu} negativ beeinflusst wird. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Erkenntnisse, daß die *leuX*-negativen Stämme eine reduzierte Kapazität für die Aufnahme von Eisen haben.

Die Proteine des Aminosäurenstoffwechsels

E. coli reagiert auf verschiedene Art und Weise auf Eisenmangel. Zum einen wird die Enterobaktinsynthese heraufreguliert, zum anderen werden die Enzyme des aromatischen Aminosäurenbiosyntheseweges wie AroF, TrpAB und PheA vermehrt gebildet (Foster et al., 1994). Außerdem reagieren die Bakterien auch mit der vermehrten Expression von Enzymen der „*de novo*“-Aminosäurebiosynthese-Enzymen auf den Nährstoffmangel.

Die Proteomanalyse zeigte, daß in den *leuX*-positiven Stämmen die Expression von AroF und TrpB erhöht war. Die zwei Proteine gehören zu den Enzymen, die an der Synthese von Tryptophan beteiligt sind. Insgesamt sind es 5 Operons, die an der Synthese, am Transport und am Abbau von Tryptophan beteiligt sind. Alle 5 Operons werden von einem Tryptophan-aktivierten *trp*-Repressor reguliert (Khodursky et al., 2000; Neidhardt et al., 1996). Das *trp*-Operon enthält 5 Gene, die für die Tryptophansynthese ausgehend von Chorismat wichtig sind. Die Transkription der *trp*-Gene wird sowohl über Repression wie auch über transkriptionelle Attenuation reguliert. Der *trp*-Repressor wird durch *trpR*-Gen kodiert. Das

Regulator-Gen *trpR* determiniert ein Effektorprotein, den Aporepressor. In Gegenwart des Corepressors Tryptophan, der mit hoher Affinität an das Aporepressorprotein bindet, verhindert der vollständige Repressor die Expression des Operons. Eine Erniedrigung der Tryptophankonzentration führt wieder zur Freigabe des Operators und zur mRNA-Synthese (Neidhardt et al., 1996). Die Wachstumsversuche in Minimalmedium M9 haben gezeigt, daß die *leuX*-negativen Stämme anfangs genauso gut wachsen wie der Wildtyp Stamm 536 und die *leuX*-Komplementante 536R3. Die *leuX*-negativen Stämmen erreichten jedoch früher die stationäre Phase. Vermutlich sind sie nicht mehr oder nur unzureichend in der Lage, die benötigten Makromoleküle aus den einfachen chemischen Verbindungen im Minimalmedium zu synthetisieren. Mit Hilfe von 2 D-Gelen wurde gezeigt, daß die Expression der Tryptophan-Synthase bei den *leuX*-negativen Stämmen vermindert ist. Das führt dazu, daß diese aromatische Aminosäure nicht in ausreichenden Maß synthetisiert werden kann, was den früheren Eintritt in die stationäre Phase erklären könnte. Die Sequenzbewertung zeigte, daß bei dem *trpR*-Gen 21,5 % aller Leucin-spezifischen Kodons von der *leuX*-kodierte tRNA_{5^{Leu}} erkannt werden. Das würde dafür sprechen, daß die *leuX*-Mutanten das TrpR-Protein nicht mehr bzw. nur unzureichend exprimieren können. Gleichzeitig würde die Repression des *trp*-Operons auch in Anwesenheit von Tryptophan nicht stattfinden. Somit erfordert wahrscheinlich die „*de novo*“ Biosynthese von Tryptophan bei unzureichender Repression des *trp*-Operon am Wachstumbeginn, wo noch ausreichende Menge des zugesetzten Tryptophans vorhanden ist, unnötige Energie. Dieses komplexe Regulationsnetzwerk der Aminosäurebiosynthese ist wahrscheinlich in den *leuX*-Mutanten gestört.

Das *aroHFG*-Operon kodiert jene Enzyme, die die ersten Reaktionen der aromatischen Aminosäurebiosynthese katalysieren. Die Chorismat-Mutase (TyrA) katalysiert den ersten Schritt in der Biosynthese von Tyrosin und Phenylalanin. Die Phospho-2-Dehydro-3-Deoxyheptonat Aldolase (AroF) und die Chorismat-Mutase werden auch über TrpR in der Anwesenheit von Tryptophan reguliert (Khodursky et al., 2000). Ein entscheidender Hinweis darauf, daß die *leuX*-kodierte tRNA_{5^{Leu}} einen wichtigen Einfluß auf den Metabolismus von *E. coli* Stamm 536 hat, wird dadurch deutlich, daß drei der durch die Proteomanalyse erfaßten Enzyme (AroF, TrpB und TyrA) an der „*de novo*“-Biosynthese aromatischer Aminosäuren beteiligt sind.

Mit Hilfe der Proteomanalyse konnte ein weiteres *leuX*-abhängiges Enzym, die Ketol-Acid-Reduktoisomerase (IlvC) gefunden werden. IlvC katalysiert den zweiten Schritt in der Valin

und Isoleucinbiosynthese (Neidhardt et al., 1996). Die *IlvC* Expression unterliegt vermutlich einem indirekten *leuX*-Einfluß. Indirekt deshalb, da beim *ilvC*-Gen der Gehalt an *leuX*-spezifischen Kodons im Vergleich zu allen Leucin-Kodons insgesamt nur 4,5 % beträgt. Dagegen werden bei dem kodierten Gen eines *IlvC*-Regulators, dem *IlvY*, 18 % aller Leucin-spezifischen Kodons von der *leuX*-kodierten $tRNA_5^{Leu}$ erkannt. Dies erklärt wahrscheinlich, daß das *IlvC*-Enzym in geringeren Mengen in *leuX*-Mutanten vorliegt als im Wildtyp.

Die Expression der 2-Isopropylmalat-Synthase (*LeuA*), einen Enzym der Leucin-Biosynthese, wird in Anwesenheit der *leuX*-kodierten $tRNA_5^{Leu}$ ebenfalls positiv beeinflusst. Auch hier erscheint der Gehalt von Leucin-spezifischen Kodons (14 %), die von der $tRNA_5^{Leu}$ erkannt werden, zu klein, um eine direkte Abhängigkeit von *leuX* erklären zu können. Einer der bekannten Regulatoren des *leuABCD*-Operons ist das „Leucine-Responsive Regulator Protein“ (LRP), das als globaler Regulator fungiert (Lin et al., 1992). Generell ausgedrückt aktiviert das Lrp-Protein jene Gene, die für die Bildung der Aminosäuren wichtig sind und reprimiert Gene des Aminosäurekatabolismus (Calvo et al., 1994; Newman et al., 1992). Bis jetzt ließ sich jedoch noch keine *leuX*-Abhängigkeit des Lrp-Proteins nachweisen.

Ein anderes Enzym, die ATP-Phosphoribosyltransferase (*HisG*) katalysiert die erste Reaktion im Histidinbiosyntheseweg und zwar die Umwandlung von 5-Phosphoribosyl- α -pyrophosphat zu Histidin. Dieses Intermediat ist auch an der Biosynthese von Tryptophan, Purin- und Pyrimidin-Nukleotiden beteiligt (Neidhardt et al., 1996, Voet, 1992). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß die Expression von *HisG* von $tRNA_5^{Leu}$ positiv beeinflusst wird.

Ein anderes Protein, das zwar nicht an der Aminosäure-Biosynthese beteiligt ist, aber die letzten zwei Reaktionen der „*de novo*“-Purinbiosynthese katalysiert, ist *PurH*. Die Expression von *PurH* ist genauso wie die der anderen oben beschriebenen Enzyme *leuX*-abhängig. Das *purH*-Gen hat jedoch keine Leucin-spezifischen Kodons, die von der *leuX*-kodierten $tRNA_5^{Leu}$ erkannt werden. Seine Regulation scheint somit nicht durch den direkten Einfluß der *leuX*-kodierten $tRNA_5^{Leu}$ zu geschehen.

Wie und ob die *leuX*-kodierte $tRNA_5^{Leu}$ einen Einfluß auf die „*de novo*“-Biosynthesewege hat, ist unklar. Die Ergebnisse würden jedoch das frühere Eintreten in die stationäre Phase der *leuX*-Mutanten erklären, da sie anscheinend nicht mehr in der Lage sind, die nötigen Zellbausteine wie Aminosäuren und Nukleotide in ausreichenden Mengen zu synthetisieren.

Es ist auch noch nie beschrieben worden, daß die Stoffwechsellenzyme Einfluß auf die Virulenz der Bakterien haben können. Sie sind jedoch auf jeden Fall für das Überleben und die Vermehrung im Wirt wichtig, da dort die entsprechenden Stoffwechselsubstrate nur mangelhaft vorliegen (Hacker und Kaper, 1999). Somit beeinflussen solche Fitnessfaktoren indirekt die Virulenz des *E. coli* Stammes 536.

Das „Quorum sensing“-Protein YgaG

Mittels Proteomanalyse wurde ein Protein gefunden, dessen Expression in den *leuX*-Mutanten herunterreguliert war (Piechaczek et al., 1999). Das Protein zeigte große Homologien zum LuxS-Protein von *Vibrio harveyi*. Dieses marine Bakterium exprimiert zwei unabhängige „Quorum sensing“-Systeme (Freeman und Bassler, 1999). Jedes System besteht aus dem „Autoinducer“ (AI-1 bzw. AI-2) und einem entsprechenden Sensor-Protein (LuxN bzw. LuxQ). Es wurde gezeigt, daß auch viele anderen Bakterien wie *E. coli* MG1655, *E. coli* O157:H7 und *Salmonella typhimurium* 14028 bzw. LT2 eine AI-2 Aktivität zeigen. Alle genannten Bakterien besitzen ein hochkonserviertes *luxS*-homologes Gen. Sequenzvergleiche zwischen *luxS* von *Vibrio harveyi* und *E. coli* MG1655 zeigen einen *ygaG*-ORF, dessen Funktion jedoch als unbekannt beschrieben wurde (Surette et al., 1999). Bei *E. coli* liegt das *ygaG*-Gen zwischen den *gshA*- und *emrB*-Genen (siehe Abb. 26), wobei das *ygaG*-Gen von einem eigenen Promotor transkribiert wird (Blattner et al., 1997).

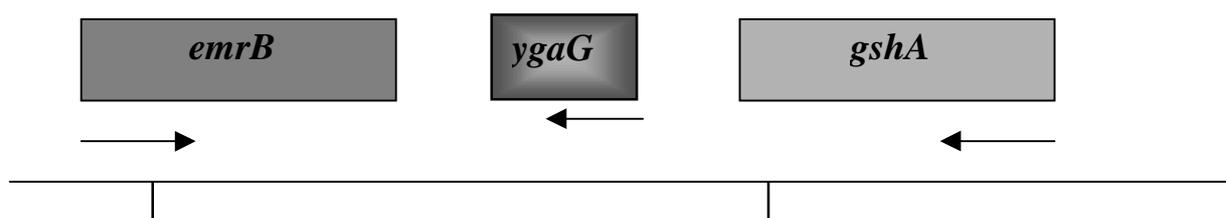


Abb. 26: Schematische Darstellung der genetischen Struktur der *ygaG*-Region in *E. coli* MG1655. Die Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtung der Gene an.

Es ist bekannt, daß sich die Regulation der AI-2-Produktion zwischen apathogenen und pathogenen Stämmen unterscheidet. Der *E. coli* Stamm O157:H7 exprimiert AI-2 bei einer Temperatur von 30 °C und 37 °C mit oder ohne Glukose, während der *E. coli* MG1655 Stamm kein AI-2 exprimieren kann, ohne eine Kohlenstoffquelle zur Verfügung zu haben. Der Autoinducer AI-2 induziert auch die Expression des Typ III Sekretionssystems, das

wichtig für die Virulenz von *E. coli* O157:H7 ist (Surette et al., 1999; Sperandio et al., 1999). Der Autoinducer AI-2 wird bei *Shigella flexneri* und enteroinvasiven *E. coli* in der späten log-Phase synthetisiert und beeinflusst die Expression des *virB*-Gens. Die Expression von Invasionsgenen wird jedoch nicht über das *luxS*-Genprodukt reguliert. Die hergestellten *luxS*-Mutanten zeigten intakte Virulenz (Day und Maurelli, 2001). Bei *Helicobacter pylori* wird beschrieben, daß der AI-2 keine Rolle bei der Regulation oder Modulation von bekannten oder putativen Virulenzfaktoren spielt. Auch die Vergleichende Proteomanalyse zwischen dem *H. pylori* Wildtyp Stamm und der *luxS*-negativen Mutante zeigte keinen Einfluß des Gens auf die Expression der Proteine (Joyce et al., 2000). Bei dem *E. coli* Stamm 536 konnte kein Einfluß der AI-2 bei der Regulation der Expression von bekannten Virulenzfaktoren festgestellt werden. Es konnte jedoch mit Hilfe von 2 D-Gelen gezeigt werden, daß das *luxS*- bzw. *ygaG*-Gen einen Einfluß auf die Proteinexpression hat. Besonders die Expression kleinerer Proteine im pH-Bereich von 4 bis 5 war betroffen. Die Expression der Proteine war bei der *ygaG*-Mutante höher als bei dem Wildtyp Stamm 536. Um welche Proteine es sich jedoch handelt, konnte zu diesem Zeitpunkt noch nicht überprüft werden. Auch der potentielle Einfluß des *ygaG*-Gens auf die „*in vivo*“ Virulenz des uropathogenen Stammes *E. coli* 536 konnte noch nicht aufgeklärt werden.

Flagelle

Bakterielle Flagellen sind aus Flagellin-Untereinheiten zusammengesetzt, die durch Polymerisation die Filamente der bakteriellen Flagelle bilden. Die Expression der Flagelle des *E. coli* Stammes 536 ist *leuX*-abhängig. Daher sind die *leuX*-Mutanten nicht mehr motil (Ritter et al., 1995). Es wird auch beschrieben, daß die Expression von Flagellen für die Virulenz von Bedeutung ist. Flagellen von *E. coli* sind in der Lage, Plasminogen zu aktivieren (Lähteenmäki et al., 1994). Außerdem ist das Flagellin (FliC) von *S. typhimurium* und *Pseudomonas aeruginosa* ein extrem starker Aktivator von „tumor necrosis factor alpha“ (TNF- α) produzierenden humanen Monocyten (McDermott et al., 2000).

Bei den 2 D-Gelvergleichen wurden zwei Proteine (FliC und FliY) identifiziert, die zu dem Flagella-Operon gehören.

Die Expression des FliY-Proteins wird negativ von der *leuX*-kodierte tRNA_{5^{Leu}} beeinflusst. Das *fliY*-Gen gehört zu dem *fliAZY*-Operon. Die genaue Funktion des Proteins ist noch nicht bekannt. Wahrscheinlich ist es am Transport von bisher unbekanntem Molekülen beteiligt.

Aufgrund der Homologie zu der Familie 3 von extrazellulären löslichen Bindeproteinen wird vermutet, daß das FliY-Protein an polare Aminosäuren oder Aminosäureanaloge bindet. In vielen Bakterien wurde beobachtet, daß solche kleine Aminosäureanaloge als „Autoinducer“ fungieren (Pearson et al., 1994). Das FliY-Protein könnte möglicherweise ein Rezeptor sein, der solche Signale erkennt und somit die Veränderung in der Transkription der Flagellengene bewirkt (Mytelka und Chamberline, 1996). Das Motilitätsregulon von *E. coli* besteht sowohl aus Genen, die für Strukturproteine kodieren, als auch aus Regulatorgenen, welche die Expression der einzelnen Komponenten und den Zusammenbau der Flagelle regulieren (Macnab, 1992). Die Regulation ist sehr komplex und abhängig von der hierarchisch angeordneten Transkription der Gene, die in drei Klassen aufgeteilt werden (Komeda, 1986; Helman, 1991). Das *fliY*-Gen gehört zu den Genen der Klasse II. Aufgrund der vermuteten Funktion als Rezeptor ist das Vorhandensein eines solchen Gens in einem der Klasse II zugehörigen Operon unklar. Alle bekannten Rezeptoren, die bei der Motilität eine Rolle spielen, werden durch Gene der Klasse III kodiert oder gehören zu den Proteinen, die nicht dem Motilitätsregulon angehören und nur sekundär eine Funktion bei der Chemotaxis übernehmen. Andererseits beschreibt Kutsukake und Mitarbeiter, daß das *fliY*-Gen in *S. typhimurium* von seinem eigenen Promotor und nicht von dem Flagella-Promotor transkribiert wird (Ikebe et al., 1999). Das Ergebnis würde dafür sprechen, daß das *fliY*-Gen nicht zu den Flagella-Genen gehört.

Die Expression von Flagellin (FliC) konnte sowohl im Kulturüberstand als auch in Membranproteinextrakten nachgewiesen werden. Die Expression des Flagellins ist *leuX*-abhängig, da sie nur bei dem Wildtyp Stamm *E. coli* 536 und der *leuX*-Komplementante 536R3 zu detektieren war. Das Ergebnis bestätigt auch die bisherigen Erkenntnisse, daß die *leuX*-Mutanten keine Flagelle mehr bilden können. Das *fliC*-Gen gehört zu den Klasse III Genen des Flagella-Operons. Für die Transkription dieser Gene sind alle Genprodukte notwendig, die an früherer Stelle in der Regulationkaskade stehen (Klasse I und II) (Kutsukake et al., 1990). Die Klasse I Gene (*flhD/flhC*) werden direkt über das zyklische AMP und das cAMP-CAP Protein reguliert. Da bei dem Gen *flhD* 28 % aller Leucin-spezifischen Kodons von der *leuX*-kodierten tRNA_{5^{Leu}} erkannt werden, kann man vermuten, daß schon der erste Schritt in der Flagella Synthese nicht zustande kommt.

Periplasmatische Bindeproteine

In dieser Arbeit wurden drei *leuX*-abhängige Proteine gefunden, die zu verschiedenen Transportsystemen gehören. Es handelt sich um ein periplasmatisches Dipeptid-bindendes Protein (DBP), ein periplasmatisches Oligopeptid-bindendes Protein (OppA) und ein periplasmatisches Putrescin-bindendes Protein (PotF). Die Expression aller drei Proteine wird positiv durch die *leuX*-kodierte tRNA_{5^{Leu}} beeinflusst.

Das PotF-Protein bindet Polyamine und gehört zu dem Putrescin Transportsystem (Neidhardt et al., 1996). Das DBP-Protein transportiert Peptide, die aus zwei oder drei L-Aminosäuren bestehen. Das Protein fungiert auch als Chemorezeptor (Abouhamad et al., 1999; Abouhamad und Manson, 1994). Das OppA-Protein gehört zu der Oligopeptid-Permease und bindet Peptide, die aus bis zu fünf Aminosäuren bestehen. Bei *Listeria monocytogenes* wird dem OppA-Protein auch eine Rolle bei dem intrazellulären Überleben und somit in der Virulenz zugesprochen (Borezee et al., 2000). Bei *E. coli* Stämmen wird dagegen beschrieben, daß das OppA-Protein eine Rolle bei dem „uptake“-Transport von Aminoglycosidantibiotika spielt. Aminoglykosid-resistente klinische Isolate von *E. coli* exprimieren in reduziertem Maße das Oligopeptid-bindende Protein (Acosta et al., 2000). Es wird aber auch beschrieben, daß das OppA-Protein zusätzlich zu der Funktion bei Transport und Chemotaxis eine Rolle bei dem Schutz gegen Streß spielen könnte. Das Protein verhindert z. B. den Aktivitätsverlust der Citrat-Synthase durch Konformationsänderung unter Hitzeschock-Bedingungen (Richarme and Caldas, 1997). Das *oppABCDF*-Operon wird unter anderem über das Lrp-Protein reguliert (Andrews et al., 1986a, Andrews et al., 1986b). Außerdem wurde beobachtet, daß die Expression des *opp*-Operons über Leucin im Medium heraufreguliert wird (Andrews et al., 1986). Für die Zukunft wäre es wichtig, mit Hilfe einer *oppA*-Deletionsmutante festzustellen wie sich die Expression von OppA-Protein bei dem *E. coli* Stamm 536 auf die Resistenz gegenüber von Aminoglycosidantibiotika auswirkt. Auch die Tatsache, daß das OppA-Protein bei *Listeria monocytogenes* eine Rolle in der Virulenz spielt, könnte bedeuten, daß das Protein ein guter Ansatzpunkt für die weitere Untersuchungen des Einflusses des Proteins auf die Virulenz bei dem *E. coli* Stamm 536 ist.

Schock- und Streßproteine

Die pathogenen Bakterien sind ständig verschiedenen Streßbedingungen, wie Nahrungsmangel, Temperaturschwankungen, Säure, osmotischem Streß oder der Wirtsabwehr ausgesetzt. Um in solchen Bedingungen überleben zu können, verfügen die Bakterien über ein komplexes Adaptationsnetz. Eine wichtige Komponente zum Schutz gegenüber diesen Umwelteinflüssen ist die Induktion von spezifischen und unspezifischen Streß- bzw. Schockproteinen.

Mit Hilfe von 2 D-Gelen wurde das PspA-Protein detektiert. Das Protein wurde nur bei den *leuX*-Mutanten gefunden, was für einen negativen Einfluß der *leuX*-kodierte tRNA_{5^{Leu}} sprechen würde. Es ist ein 28 kDa großes Protein, das mit der Cytoplasmamembran assoziiert ist. Es wird unabhängig von der Wachstumsphase unter verschiedenen Streßbedingungen wie Hitze, Einfluß von Ethanol oder durch Infektion mit Bakteriophagen exprimiert (Brissette et al., 1990). Das Protein wird von dem ersten Gen des *pspABCDE*-Operons kodiert (Brissette et al., 1991). Die Expression des Operons ist abhängig von dem PspF-Protein, einem NtrC-ähnlichen transkriptionalen Aktivator (Jovanovic et al., 1996). Das *psp*-Operon kann auch durch die Synthese eines einzelnen Phagenproteins, Protein IV (pIV), induziert werden (Brisette et al., 1990). Protein IV gehört zu der Sekretin-Familie, welche in vielen bakteriellen Sekretionssystemen gefunden wird (Genin und Boucher, 1994). Es konnte gezeigt werden, daß auch andere Sekretine das *psp*-Operon induzieren können (Possot et al., 1992; Wengelnik et al., 1996). Die genaue physiologische Rolle des *psp*-Operons ist unbekannt. Es scheint aber, daß das PspA-Protein eine Rolle bei dem Aufbau von Protonengradienten unter Streßbedingungen spielt (Kleerebezem et al., 1996). Es wurde auch gezeigt, daß das PspA-Protein bei dem Überleben von *E. coli* Stämmen in der stationären Phase bei einem pH-Wert von 9 wichtig ist (Weiner und Model, 1994). Außerdem ist das Protein ein negativer Regulator des *psp*-Operons, wahrscheinlich um die Expression unter normalen Wachstumsbedingungen zu kontrollieren (Weiner et al., 1991; Dworkin et al., 2000). Das PspB-Protein ist ein inneres Membranprotein, das in die Induktion des *psp*-Operons involviert ist (Weiner et al., 1991). PspC wird als ein positiver Regulator des Operons beschrieben, was die Expression von PspA-Protein als Antwort auf die Sekretinproduktion induziert (Brissette et al., 1991; Weiner et al., 1991). Die Funktion der PspD- und PspE-Proteine ist bis jetzt noch unbekannt. In *Y. enterocolitica* wurde 1999 ein *psp*-Operon, das homolog zu dem in *E. coli* ist, gefunden. Es wurde beobachtet, daß ein PspC-Protein, das homolog zu dem PspC-Protein in *E. coli* ist, wichtig für die Virulenz ist (Darwin und Miller, 1999; Darwin und Miller,

2001). Das PspA-Protein zeigt dagegen keinen Einfluß auf die Virulenzeigenschaften von *Y. enterocolitica*. Bis jetzt wurde ein derartiger Sachverhalt nicht für pathogene *E. coli* Stämme beschrieben. Es ist auch unklar warum das PspA-Protein bei dem *E. coli* Stamm 536 und der *leuX*-Komplementante 536R3 bisher nicht auf dem 2 D-Gel detektiert wurde. Wahrscheinlich liegt es unter der Nachweisgrenze der angewandten Färbemethoden.

Mit Hilfe der vergleichenden Proteomanalyse konnte festgestellt werden, daß die Streßproteine Thiol-Peroxidase (TpX) und Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase (AhpC) vermehrt bei den *leuX*-negativen Stämmen exprimiert wurden. Die beiden Proteine haben eine antioxidative Aktivität. Diese Enzyme haben eine wichtige Funktion in der Zelle da, Sauerstoff als der terminale Elektronenakzeptor der aeroben Atmung für alle aeroben Organismen essentiell ist. Andererseits ist er auch toxisch und Proteine wie z. B. TpX und AhpC mit antioxidativen Aktivitäten werden für den Schutz der Zelle gebraucht (Neidhardt et al., 1996).

Bei den 2 D-Gelvergleichen wurde auch das Dps-Protein („DNA-Schutzprotein während des Wachstums“) identifiziert. Es ist ein DNA-bindendes Protein, das wichtig für den Schutz der Zelle gegen Hydrogenperoxid ist (Almiron et al., 1992). Der *dps*-Promotor unterliegt einer komplexen Regulation. Die Transkription des *dps*-Genes wird in der log-Phase von OxyR-Regulator, in der stationären Phase von „histone-like“ IHF Protein und RpoS (alternative Sigmafaktor der stationären Phase) aktiviert. Diese komplexe Regulation suggeriert, daß die Expression des Dps-Proteins sehr wichtig für die Bakterien unter Peroxidstreß ist (Altuvia et al., 1994). Das Dps-Protein wurde nur in den *leuX*-negativen Stämmen 536-21 und 536 Δ 102 exprimiert.

Alle vier oben beschriebene Proteine (PspA, TpX, AhpC und Dps) werden von der *leuX*-kodierten tRNA₅^{Leu} negativ beeinflusst. Es scheint so, als ob die *leuX*-Mutanten vermehrt die Streßproteine exprimieren, um die wahrscheinliche Auswirkungen des Verlustes der tRNA₅^{Leu} auf andere Proteine zu kompensieren.

Ein Protein, dessen Expression *leuX*-abhängig ist, wurde nur in Kulturüberständen des Wildtypstammes 536 und der *leuX*-Komplementante 536R3 gefunden. Es handelt sich dabei um ein osmotisch-induzierbares Protein (OsmY). Die genaue Funktion des Proteins ist noch nicht bekannt. Es wird beschrieben, daß das Protein in der stationären Phase unter normalen

Wachstumsbedingungen exprimiert wird (Yim et al., 1994; Lange et al., 1996). Außerdem vermittelt das OsmY-Protein Resistenz gegenüber von Hitze-Streß. Die Transkription des *osmY*-Gens wird von RpoS aktiviert und von Lrp, cAMP-CRP und IHF reprimiert (Lange et al., 1993).

Membranproteine

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, den Einfluß der *leuX*-kodierte tRNA_{5^{Leu}} auf die Expression von Membranproteinen und somit auf die Serumresistenz bei dem uropathogenen *E. coli* Stamm 536 aufzuklären. Über die Faktoren, die bei der Serumresistenz eine Rolle spielen, ist wenig bekannt. Kapseln sind dabei allerdings von Bedeutung, weil sie die Aktivierung des alternativen Weges des Komplementsystems hemmen (Ørskov and Ørskov, 1985). Auch die Oberflächenantigene tragen zur Serumresistenz bei (Burns and Hull, 1998). Außerdem konnte für *E. coli* gezeigt werden, daß neben den K- und O-Antigen auch das äußere Membranprotein OmpA die Serumresistenz beeinflusst (Weiser and Gotschlich, 1991). Bei *Bordetella pertussis* wurden zwei Proteine beschrieben, die an der Serumresistenz beteiligt sind (Fernandez and Weiss, 1994).

Da äußere Membranproteine die Serumresistenzeigenschaften eines Stammes beeinflussen können, wurden von dem *E. coli* Stamm 536 und seinen PAI I₅₃₆/II₅₃₆- und *leuX*-Mutanten die Membranproteine isoliert und elektrophoretisch analysiert. Bei den Bakterien, die in 50 % inaktivem Humanserum angezüchtet wurden, konnten zwei Proteine mit einem Molekulargewicht von 45 und 20 kDa gefunden werden, dessen Expression durch *leuX* positiv beeinflusst wird. Diese Membranproteine stehen möglicherweise im Zusammenhang mit dem Verlust der Serumresistenz in den Stämmen 536-21 und 536Δ102.

Nach der zweidimensionalen Auftrennung der Membranproteine konnte das OmpA-Protein identifiziert werden. In der Arbeit von Ritter wurde mit Hilfe eines OmpA-spezifischen Antikörpers eine „Western Blot“-Analyse durchgeführt. Dabei konnte kein Einfluß der tRNA_{5^{Leu}} auf die Expression von OmpA festgestellt werden (Ritter, 1996). Der „Western Blot“ wurde jedoch mit eindimensional aufgetrennten Proteinen durchgeführt, wodurch die verschiedenen Isoformen des OmpA-Proteins nicht detektiert werden konnten. Gooley und Mitarbeiter konnten mit Hilfe von 2 D-Gelen bis zu sieben verschiedene Isoformen von OmpA identifizieren (Molloy et al., 2000). Dabei unterschieden sich die Proteinspots sowohl in der Ladung als auch in der Molekularmasse voneinander. Aufgrund der Ergebnisse der

Proteomanalyse und der Tatsache, daß das OmpA-Protein die Serumresistenz bei anderen *E. coli* Stämmen beeinflusst, sollte die Funktion und der potentielle Einfluß des Proteins auf die Serumresistenz im *E. coli* Stamm 536 näher untersucht werden. Von Vorteil wäre hier zuerst die Überprüfung der OmpA-Expression mit Hilfe von "Western-Blot" nach der zweidimensionalen Auftrennung. Die Herstellung der Deletionsmutante würde dann weiteren Aufschluß über die Funktions des OmpA-Proteins bei dem Stamm 536 geben.

Ein weiteres Membranprotein, dessen Expression durch die *leuX*-kodierte $tRNA_5^{Leu}$ negativ beeinflusst wird, ist die ATP-Synthase. Wie sich das Protein auf die Serumresistenz auswirken könnte, ist unklar. Bei *Salmonella typhimurium* wurde jedoch beschrieben, daß auch generell ein erhöhter Anteil von Proteinen in der Außenmembran die Resistenz gegenüber der Aktivität von Serum verändert (Galdiero et al., 1990). Die ATP-Synthase wurde auch bei der zweidimensionalen Auftrennung von Gesamtzelllysaten identifiziert. Hier jedoch war die Expression des Proteins in den *leuX*-positiven Stämmen höher. Eine mögliche Erklärung dafür ist, daß in den Gesamtzelllysaten unter dem detektierten Spot zwei Proteine identifiziert wurden. Dadurch könnte das Ergebnis verfälscht worden sein.

Ein weiteres Membranprotein, mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa, dessen Expression von *leuX*-kodierten $tRNA_5^{Leu}$ negativ beeinflusst wird, konnte nicht durch MALDI-TOF-MS identifiziert werden. Auch hier ist es noch nicht untersucht worden wie sich das Protein auf die Serumresistenz des Stammes 536 auswirken könnte.

Das OmpT-Protein wird als ein potentieller Virulenzfaktor angesehen. Es wurde beschrieben, daß die OmpT-Protease antimikrobielle Peptide degradiert (Stumpe et al., 1998). Die antibakteriellen Peptide gehören zur lokalen, nichtadaptiven Immunreaktionen des Wirtes. Deswegen könnte auch das OmpT-Protein Einfluß auf die Serumresistenz des *E. coli* Stammes 536 haben. Um das zu überprüfen, wurde die Expression des Proteins mit OmpT-spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Es konnte jedoch kein Unterschied in der Abhängigkeit von der $tRNA_5^{Leu}$, für die Expression des OmpT-Proteins festgestellt werden. Es werden jedoch auch in dem Fall von OmpT zwei verschieden geladene Isoformen beobachtet (Molloy et al., 2000). Somit muß mit Hilfe der 2 D-Gelelektrophorese noch überprüft werden, ob die *leuX*-kodierte $tRNA_5^{Leu}$ doch noch Einfluß auf die Expression von OmpT hat.

Fimbrien Adhäsine

Die Expression bakterieller Pathogenitätsfaktoren ist nicht konstitutiv, sondern wird durch eine Vielzahl physiologischer und chemisch-physikalischer Signale beeinflusst (Mekalanos, 1992; Finlay and Falkow, 1997). Eine Möglichkeit, *in vitro* die Relevanz einzelner oder kombinierter Faktoren auf die Regulation von Virulenzdeterminanten zu untersuchen, ist der Einsatz von Reporter-genfusionen. Derartige Genfusionen lieferten neue Erkenntnisse zur Regulation der P-Fimbrien (Baga et al., 1985) und der Typ 1-Fimbrien (Klemm und Christiansen, 1987). Außerdem konnten mit Hilfe chromosomaler *lacZ*-Fusionen die molekularen Prozesse der Phasenvariation analysiert werden (Abraham et al., 1985). Die Phasenvariation beruht auf der Inversion eines 314 bp DNA-Fragmentes, auf dem sich der Promotor für die Hauptuntereinheit der Typ 1-Fimbrien (*fimA*) befindet. Für die jeweilige Orientierung des Fragmentes sind zwei sequenzspezifische Rekombinasen, FimB und FimE, zuständig (Klemm, 1986).

In der vorliegenden Arbeit wurden Genfusionen zwischen den Promotorregionen der *fimB*- und *fimE*-Gene des uropathogenen *E. coli* Stammes 536 und dem *lacZ*-Reporter-gen konstruiert und stabil ins Chromosom integriert. Die Integration der Fusionkonstrukte in das Chromosom besitzt gegenüber dem Einsatz von Fusionsproteinen auf sogenannten „multi copy“-Vektoren den Vorteil, daß die Meßergebnisse nicht durch unerwünscht hohe Kopienzahlen verfälscht werden.

In verschiedenen Meßreihen (siehe Abb. 23 und Abb. 24) wurde nun der Einfluß von Umweltbedingungen auf die *fimB::lacZ*- bzw. *fimE::lacZ*-Expression analysiert. Die Messungen ergaben in beiden Fällen einen leichten Anstieg der Expression von β -Galaktosidase in der späten stationären Phase. Für die Typ 1-Fimbrien wurde eine Abhängigkeit der Fimbrienexpression von der Wachstumsphase beschrieben. So konnte gezeigt werden, daß die Hauptstrukturuntereinheit FimA in der exponentiellen Wachstumsphase verstärkt exprimiert und in der stationären Phase reprimiert wird (Dove et al., 1997). Der leichte Anstieg der *lacZ*-Expression in diesen Untersuchungen könnte darauf zurückgeführt werden, daß die β -Galaktosidase nach ihrer Produktion längere Zeit im Zytoplasma vorliegt und dadurch die Schwankung der Promotoraktivität erst nach einer gewissen Verzögerungszeit meßbar wird. Das Wachstum auf festem Medium führte im Vergleich zur Kultivierung im entsprechenden Flüssigmedium zu einer leichten Reduktion

der *fimB::lacZ*- und *fimE::lacZ*-Expression. Das Ergebnis bestätigt somit die frühere Beobachtung, daß Typ 1-Fimbrien in Flüssigmedien optimal exprimiert werden (Gally et al., 1993), da es hier zu einer höheren „Switching Frequenz“ in Richtung „Phase on“ kommt. Weiterhin wurde der Einfluß der Temperatur auf die Expression der *lacZ*-Fusionen untersucht. Es konnten dabei keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Nur bei dem Wildtyp Stamm *E. coli* 536 konnte bei 30 °C über den gesamten Wachstumsverlauf eine konstant geringere Expression der *fimB::lacZ*-Fusion als bei der *leuX*-Mutante 536Δ102 beobachtet werden. In der Literatur wird beschrieben, daß die optimale Expression der Typ 1-Fimbrien in Abhängigkeit von der Phasenvariation bei 37 °C erfolgte. Die Transkription von *fimB* ist bei 37 °C höher als bei 30 °C, während *fimE* bei 30 °C besser transkribiert wird (Gally et al., 1993). Diese Ergebnisse konnten leider in der Arbeit nicht bestätigt werden.

Die Untersuchungen dieser Arbeit haben gezeigt, daß die Proteomanalyse und MALDI-TOF-MS als wichtige Methoden zur Aufklärung von Unterschieden in der Proteinexpression bei Bakterien anzusehen sind. Die 2 D-Gelvergleiche haben gezeigt, daß die Expression von vielen Proteinen PAI I₅₃₆- und II₅₃₆-abhängig ist. Außerdem konnte gezeigt werden, daß die *leuX*-kodierte tRNA_{5^{Leu}} eine zentrale Rolle bei der Regulation der Genexpression von *E. coli* 536 hat. Diese Rolle ist nicht nur auf die Regulation der virulenzassoziierten Gene begrenzt, sondern erstreckt sich auch auf die Expression der Proteine, die z. B. für den Stoffwechsel der Zelle wichtig sind. Die „minor codon usage“-Theorie beschreibt den differentiellen Kodongebrauch als einen generellen Mechanismus, um auf Translationsebene die korrekte Expression spezialisierter Gene durch die selektive Verfügbarkeit von „minor“ tRNAs zu regulieren (Leskiw et al., 1991; Saier Jr., 1995). Der Gehalt der Leucin-spezifischen Kodons, die von tRNA_{5^{Leu}} erkannt werden, war jedoch nicht bei allen in dieser Arbeit identifizierten Proteinen ungewöhnlich groß, um die Rolle der *leuX*-kodierten tRNA_{5^{Leu}} bei der Expression der Proteine erklären zu können. Somit müssen noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die *leuX*-Abhängigkeit solcher Proteine aufzuklären.

VII

Literatur

- Abouhamad, W. N., Manson, M., Gibson, M. M., Higgins, C. F.** (1991) Peptide transport and chemotaxis in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: characterization of the dipeptide permease (Dpp) and the dipeptide-binding protein. *Mol. Microbiol.* **5**: 1035-1047.
- Abouhamad, W. N., and Manson, M. D.** (1994) The dipeptide permease of *Escherichia coli* closely resembles other bacterial transport systems and shows growth-phase-dependent expression. *Mol. Microbiol.* **14**: 1077-1092
- Abraham, J. M., Freitags, C. S., Clements, J. R. and Eisenstein, B. I.** (1985) An invertible element of DNA controls phase variation of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 5724-5727.
- Abraham, S. N., Shin, J.-S., Malaviya, R.** (2001) Type 1 Fimbriated *Escherichia coli*-Mast Cell Interaction in Cystitis. *J. Infect. Diseases* **183**: 51-55.
- Acosta M. B., Ferreira R. C., Padilla, G., Ferreira L. C., Costa S. O.** (2000) Altered expression of oligopeptide-binding protein (OppA) and aminoglycoside resistance in laboratory and clinical *Escherichia coli* strains. *J. Med. Microbiol.* **49**: 409-413.
- Allison, C., Coleman, N., Jones, P. L., and Hughes, C.** (1992) Ability of *Proteus mirabilis* to invade human urothelial cells is coupled to motility and swarming differentiation. *Infect. Immun.* **60**: 4740-4746.
- Almiron, M., Link, A. J., Furlong, D., Kolter, R.** (1992) A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes Devel.* **6**: 2646-2654.
- Altuvia, S., Almiron, M., Huisman, G., Kolter, R., Storz, G.** (1994) The *dps* promoter is activated by OxyR during growth and by IHF and RpoS in stationary phase. *Mol. Microbiol.* **13**: 265-272.
- Andrews, J. C., Blevins, T. C. Short, S. A.** (1986a) Regulation of peptide transport in *Escherichia coli*: induction of the *trp*-linked operon encoding the oligopeptide permease. *J. Bacteriol.* **165**: 428-433.
- Andrews, E. A., Short, S. A.** (1986b) *opp-lac* operon fusions and transkriptional regulation of the *Escherichia coli trp*-linked oligopeptide permease. *J. Bacteriol.* **165**: 434-442.
- Arico, B., Miller, J. F., Craig, R., Stibitz, S., Monack, D., Falkow, S., Gross, R. and Rappuoli, R.** (1989) Sequences required for expression of *Bordetella pertussis* virulence factors share homology with prokaryotic signal transduction proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 6671-6675.
- Baga, M., Göransson, M., Normark, S., Uhlin, B. E.** (1985) Transcriptional activation of Pap pilus virulence operon from uropathogenic *Escherichia coli*. *EMBO J.* **4**: 3887-3893.
- Bassler, B. L., Wright, M., Silverman, M. R.** (1994) Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Mol. Microbiol.* **13**: 273-286.
- Bassler, B. L., Wright, M., Silverman, M. R.** (1994) Sequence and function of LuxO, a negative regulator of luminescence in *Vibrio harveyi*. *Mol. Microbiol.* **12**: 403-412.

- Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P.G., Gianazza, E., Gorg, A., Westermeier, R., Postel, W.** (1982) Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J. Biochem. Biophys. Methods*. **6**: 317-339.
- Blattner, F. R., Plunkett, G., Rode, C. K., Perna, N. T., Burlund, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., Shao, Y.** (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-1474.
- Blomfield, I. C., Calie, P. J., Eberhardt, K. J., McClain, M. S., and Eisenstein, B. I.** (1993) Lrp stimulates phase variation of type 1 fimbriation in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **175**: 27-36.
- Blomfield, I.C., Kulasekara, D.H., Eisenstein, B.I.** (1997) Integration host factor stimulates both FimB- and FimE-mediated site-specific DNA inversion that controls phase variation of type 1 fimbriae expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **23**: 705-717.
- Blum, G.** (1994) Dissertation, Würzburg
- Blum, G., Ott, M., Lischewski, A., Ritter, A., Imrich, H., Tschaepe, H., and Hacker, J.** (1994) Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. *Infect. Immun.* **62**: 606-614.
- Blum, M., Beier, H., Gross, H. J.** (1987) Improved silverstaining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99.
- Boom, R., Sol, C. J., Salimans M. M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M. E., van der Noordaa, J.** (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 495-503.
- Borezee, E., Pellegrini, E., Berche, P.** (2000) OppA of *Listeria monocytogenes*, an oligopeptide-binding protein required for bacterial growth at low temperature and involved in intracellular survival. *Infect. Immun.* **68**: 7069-7077.
- Brissette, J. L., Russel, M., Weiner, L., Model, P.** (1990) Phage shock protein, a stress protein of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 862-866.
- Brissette, J. L., Weiner, L., Ripmaster, T. L., Model, P.** (1991) Characterization and sequence of the *Escherichia coli* stress-induced *psp* operon. *J. Mol. Biol.* **220**: 35-48.
- Burns, S. M., Hull, S. I.** (1998) Comparison of loss of serum resistance by defined lipopolysaccharide mutants and an acapsular mutant of uropathogenic *Escherichia coli* O75:K5. *Infect. Immun.* **66**: 4244-4253.
- Calvo, J. M., and Matthews, R. G.** (1994) The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **3**: 466-490.

- Connell, I., Agace, W., Klemm, P., Schembri, M., Marild, S., Svanborg, C.** (1996) Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **93**: 9827-9832.
- Darwin, A. J., and Miller, V. L.** (1999) Identification of *Yersinia enterocolitica* genes survival in an animal host using signature-tagged transposon mutagenesis. Mol. Microbiol. **32**: 51-62.
- Darwin, A. J. and Miller, V. L.** (2001) The *psp* locus of *Yersinia enterocolitica* is required for virulence and for growth *in vitro* when the Ysc type III secretion system is produced. Mol. Microbiol. **39**: 429-444.
- Day Jr, W. A., and Maurelli, A. T.** (2001) *Shigella flexneri* LuxS quorum-sensing system modulates *virB* expression but is not essential for virulence. Infect. Immun. **69**: 15-23.
- Deiwick, J., Hensel, M.** (1999) Regulation of virulence genes by environmental signals in *Salmonella typhimurium*. Electrophoresis. **20**: 813-817.
- De Kievit, T. R., Iglewski, B. H.** (1999) Quorum sensing, gene expression, and *Pseudomonas* biofilms. Methods. Enzymol. **310**: 117-128.
- DiRita, V. J.** (1992) Co-ordinate expression of virulence genes by ToxR in *Vibrio cholerae*. Mol. Microbiol. **6**: 451-458.
- Dobrindt U., Janke B., Piechaczek K., Nagy G., Ziebuhr W., Fischer G., Schierhorn A., Hecker M., Blum-Oehler G., Hacker J.** (2000) Toxin genes on pathogenicity islands: impact for microbial evolution. Int J Med Microbiol. **290**: 307-311.
- Dobrindt, U., Hacker, J.** Plasmids, phages and pathogenicity islands in relation with bacterial protein toxins: impact on the evolution of microbes. In: Sourcebook of Bacterial protein Toxins (Freer, J., Alouf, J., eds.) pp. 1-25. Academic Press, London 1999.
- Donnenberg, M. S. and Welch, R. A.** (1996) Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli*, pp. 135-174. In: H. Mobley und J. Warren (ed), Urinary tract infections: molecular pathogenesis and clinical management. ASM Press, Washington, D.C.
- Dorman, C. J.** (1991) DNA supercoiling and environmental regulation of gene expression in pathogenic bacteria. Infect. Immun. **59**: 745-749.
- Dove, S. L., Smith, S. G. J., Dorman, D. J.** (1997) Control of *Escherichia coli* type 1 fimbrial gene expression in stationary phase: a negative role for RpoS. Mol. Gen. Genet. **254**: 13-20.
- Dworkin, J., Jovanovic, G., Model, P.** (2000) The PspA protein of *Escherichia coli* is a negative regulator of σ^{54} -dependent transcription. J. Bacteriol. **182**: 311-319.
- Earhard, C. F.** Ferrienterobactin transport in *Escherichia coli*. In: Iron Transport in Microbes, Plants and Animals (Winkelmann, G., van der Helm, D., and Neilands, J.B., eds.) pp. 67-81. VCH Publishers, New York 1987.

- Eckerskorn, C., Jungblut, P., Mewes, W., Klose, J., Lottspeich, F.** (1988) Identification of mouse brain proteins after two-dimensional electrophoresis and electroblotting by microsequence analysis and amino acid composition analysis. *Electrophoresis*. **9**: 830-838.
- Eisenstein, B. I., Sweet, D. F., Vaughn, V., and Friedman, D. I.** (1987) Integration host factor IHF is required for the DNA inversion controlling phase variation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 6506-6510.
- Ernst, R. K., Guine, T., Miller, S. I.** (1999) How intracellular bacteria survive: surface modifications that promote resistance to host innate immune responses. *J. Infect. Dis.* **179**: 326-330.
- Fernandez, R. C., and Weiss, A. A.** (1994) Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. *Infect. Immun.* **62**:4727-4738.
- Finlay, B. B., and Falkow, S.** (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 136-169.
- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J., Dougherty, B. A., Merrick, J. M., McKenney, K., Sutton, G. G., FitzHugh, W., Fields, C. A., Gocayne, J. D., Scott, J. D., Shirley, R., Liu, L. I., Glodek, A., Kelley, J. M., Weidman, J. F., Phillips, C. A., Spriggs, T., Hedblom, E., Cotton, M. D., Utterback, T., Hanna, M. C., Nguyen, D. T., Saudek, D. M., Brandon, R. C., Fine, L. D., Fritchman, J. L., Fuhrmann, J. L., Geoghagen, N. S., Gnehm, C. L., McDonald, L. A., Small, K. V., Fraser, C. M., Smith, H. O. and Venter, J. C.** (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd *Science* **269**: 496-512
- Forst, S. A., Roberts, D. L.** (1994) Signal transduction by the EnvZ-OmpR phosphotransfer system in bacteria. *Res. Microbiol.* **145**: 363-373.
- Foster, M. S., Carroll, J. N., Niederhoffer, E. C.** (1994) Phenylalanine- and tyrosine-dependent production of enterobactin in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Letters* **117**: 79-84
- Freeman, J. A., Bassler, B. L.** (1999a) A genetic analysis of the function of LuxO, a two-component response regulator involved in quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Mol. Microbiol.* **31**: 665-677.
- Freeman, J. A., Bassler, B. L.** (1999b) Sequence and function of LuxU: a two-component phosphorelay protein that regulates quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *J. Bacteriol.* **181**: 899-906.
- Galdiero, F., Tufano, M. A., Galdiero, M., Masiello, S., Di Rosa, M.** (1990) Inflammatory effects of *Salmonella typhimurium* porins. *Infect. Immun.* **58**: 3183-3186.
- Gally, D. L., Bogan, J. A., Eisenstein, B. I., Blomfield, I. C.** (1993) Environmental regulation of the *fim* switch controlling type 1 fimbrial phase variation in *Escherichia coli* K-12: Effects of temperature and media. *J. Bacteriol.* **175**: 6186-6193.

- Gally, D. L., Rucker, T. J., Blomfield, I. C.** (1994) The leucine-responsive regulatory protein binds to the *fim* switch to control phase variation of type 1 fimbrial expression in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **176**: 5665-5672.
- Gardel, C. L., Mekalanos, J. J.** (1996) Alterations in *Vibrio cholerae* motility phenotypes correlate with changes in virulence factor expression. *Infect. Immun.* **64**: 2246-2255.
- Genin, S., and Boucher, C. A.** (1994) A superfamily of proteins involved in different secretion pathways in gram-negative bacteria: modular structure and specificity of the N-terminal domain. *Mol. Gen. Genet.* **243**: 112-118.
- Gehring AM, DeMoll E, Fetherston JD, Mori I, Mayhew GF, Blattner FR, Walsh CT, Perry RD.** (1998) Iron acquisition in plague: modular logic in enzymatic biogenesis of yersiniabactin by *Yersinia pestis*. *Chem Biol.* **5**:573-86.
- Gewirtz, A. T., Simon, P. O. Jr., Schmitt, C. K., Taylor, L. J., Hagedorn, C. H., O'Brien, A. D., Neish, A. S., Madara, J. L.** (2001) *Salmonella typhimurium* translocates flagellin across intestinal epithelia, inducing a proinflammatory response. *J. Clin. Invest.* **107**: 99-109.
- Gormon, T., Phan-Thanh, L.** (1995) Identification and classification of Listeria by two-dimensional protein mapping. *Res. Microbiol.* **146**: 143-154.
- Göransson, M., Sonden, B., Nilsson, P., Dagberg, B., Forsman, K., Emanuelsson, K., and Uhlin, B. E.** (1990) Transcriptional silencing and thermoregulation of gene expression in *Escherichia coli*. *Nature* **344**: 682-685.
- Görg, A., Postel, S., Weser, J.** (1985) Improved horizontal two-dimensional electrophoresis with hybrid isoelectric focusing in immobilized pH gradients in the first dimension and laying-on transfer to the second dimension. *Electrophoresis* **6**: 599-604.
- Görg, A., Postel, W., Weser, J., Günther, S., Strahler, J. R., Hanash, S. M., Somerlot, L.** (1987) Horizontal two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension in the presence of nonionic detergents. *Electrophoresis* **8**: 45-51.
- Görg, A., Postel, W., Günther, S.** (1988) 2-D electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension. Critical parameters and remedies. In: C. Schafer-Nielsen, (ed.) *Electrophoresis '88*. Verlag Chemie, Weinheim 1988, pp: 57-72.
- Görg, A.** (1991) Two-dimensional electrophoresis. *Nature* **349**: 545-546
- Grimberg, J., Maguire, S., Belluscio, L.** (1989) A simple method for the preparation of plasmid and chromosomal DNA. *Nucleic Acids Research* **21**: 8893.
- Groisman E. A., Ochman H.** (1997) How Salmonella became a pathogen. *Trends Microbiol.* **5**: 343-349.
- Groisman E. A., Blanc-Potard, A.-B., und Uchiya, K.** (1999) Pathogenicity islands and the evolution of Salmonella virulence. In: *Pathogenity islands and other mobile virulence elements*, ed. J. B. Kaper, J. Hacker, pp 127-150. Washington:ASM

- Gross, R.** (1993) Signal transduction and virulence regulation in human and animal pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* **104**: 301-326.
- Guyer, D. M., Gunther IV, N. W., Mobley, H. L. T.** (2001) Secreted proteins and other features specific to uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Diseases.* **183**: 32-35.
- Hacker, J., Knapp, S., Goebel, W.** (1983) Spontaneous deletions and flanking regions of chromosomally inherited hemolysin determinant of an *Escherichia coli* O6 strain. *J. Bacteriol.* **154**: 1145-1154.
- Hacker, J., and Hughes, C.** (1985) Genetics of *Escherichia coli* hemolysin. *CTMI* **118**: 139-162.
- Hacker, J.** (1990) Genetic determinants coding for fimbriae and adhesions of extraintestinal *Escherichia coli*. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* **151**: 1-27.
- Hacker J.** (1992) Role of fimbrial adhesins in the pathogenesis of *Escherichia coli* infections. *Can J Microbiol.* **38**: 720-727.
- Hacker, J., und Kaper, J. B.** (1999) The concept of Pathogenicity islands. In: Pathogenicity islands and other mobile virulence elements, ed. JB Kaper, J Hacker, pp 1-11. Washington: ASM.
- Hardman, A. M., Stewart, G. S., Williams, P.** (1998) Quorum sensing and the cell-cell communication dependent regulation of gene expression in pathogenic and non-pathogenic bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **74**: 199-210.
- Harkey, C. W., Everiss, K. D., Peterson, K. M.** (1994) The *Vibrio cholerae* toxin-coregulated-pilus gene *tcpI* encodes a homolog of methyl-accepting chemotaxis proteins. *Infect. Immun.* **62**: 2669-2678.
- Harrington, C. A., Rosenow, C., Retief, J.** (2000) Monitoring gene expression using DNA microarrays. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**: 285-291.
- Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., Yokoyama, K., Han, C.-G., Ohtsubo, E., Nakayama, K., Murata, T., Tanaka, M., Tobe, T., Iida, T., Takami, H., Honda, T., Sasakawa, C., Ogasawara, N., Yasunaga, T., Kuhara, S., Shiba, T., Hattori, M. and Shinagawa, H.** (2001) Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12 *DNA Res.* **8**: 11-22
- Helmann, J. D.** (1991) Alternative sigma factors and the regulation of flagellar gene expression. *Mol. Microbiol.* **5**: 2874-2882.
- Higgins, D. E., DiRita, V. J.** (1996) Genetic analysis of the interaction between *Vibrio cholerae* transcription activator ToxR and *toxT* promoter DNA. *J. Bacteriol.* **178**: 1080-1087.
- Hoe, N. P., Minion, F. C., Goguen, J. D.** (1992) Temperature sensing in *Yersinia pestis*: regulation of *yopE* transcription by *lcrF*. *J. Bacteriol.* **174**: 4275-4286.
- Ikebe, T., Iyoda, S., Kutsukake, K.** (1999) Structure and expression of the *fliA* operon of *Salmonella typhimurium*. *Microbiology* **145**: 1389-1396.

- Johnson, J. R.** (1991) Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. Clin. Microbiol. Rev. **4**: 80-128.
- Jonas, D., Schultheis, B., Klas, C., Krammer, P. H., Bhakdi, S.** (1993) Cytocidal effects of *Escherichia coli* hemolysin on human T lymphocytes. Infect. Immun. **61**: 1715-1721.
- Jovanovic, G., Weiner, L., Model, P.** (1996) Identification, nucleotide sequence, and characterization of PspF, the transcriptional activator of the *Escherichia coli* stress-induced *psp* operon. J. Bacteriol. **178**: 1936-1945.
- Joyce, E. A., Bassler, B. L., Wright, A.** (2000) Evidence for a signaling system in *Helicobacter pylori*: detection of a *luxS*-encoded autoinducer. J. Bacteriol. **182**: 3638-3643.
- Jungblut, P. R., Schaible, U. E., Mollenkopf, H. J., Zimny-Arndt, U., Raupach, B., Mattow, J., Halada, P., Lamer, S., Hagens, K., Kaufmann, S. H.** (1999) Comparative proteome analysis of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. Mol. Microbiol. **33**: 1103-1117.
- Khodursky, A. B., Peter, B. J., Cozzarelli, N. R., Botstein, D., Brown, P. O., Yanofsky, C.** (2000) DNA microarray analysis of gene expression in response to physiological and genetic changes that affect tryptophan metabolism in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**: 12170-12175.
- Klemm, P., Jorgensen, B. J., van Die, I., de Ree, H., and Bergmans, H.** (1985) The *fim* gene cluster responsible for synthesis of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*, cloning and genetic organization. Mol. and Gen. Genet. **199**: 410-414.
- Klemm, P.** (1986) Two regulatory *fim* genes, *fimB* and *fimE*, control the phase variation of type 1 fimbria in *Escherichia coli*. EMBO J. **5**: 1389-1393.
- Klemm, P. and Christiansen, G.** (1987) Three *fim* genes required for the regulation of length and mediation of adhesion of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. Mol. Gen. Genet. **208**: 439-445.
- Kleerebezem, M., Crielaard, W., Tommassen, J.** (1996) Involvement of stress protein PspA (phage shock protein A) of *Escherichia coli* in maintenance of the protonmotive force under stress conditions. EMBO J. **15**: 162-171.
- Komeda, Y.** (1986) Transcriptional control of flagellar genes in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. **168**: 1315-1318.
- Korhonen, T. K., Vaisanen-Rhen, V., Rhen, M., Pere, A., Parkkinen, J., Finne, J.** (1984) *Escherichia coli* fimbriae recognizing sialyl galactosides. J. Bacteriol. **159**: 762-766.
- Korhonen, T. K., Valtonen, M. V., Parkkinen, J., Vaisanen-Rhen, V., Finne, J., Orskov, F., Orskov, I., Svenson, S. B., Makela, P. H.** (1985) Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis. Infect. Immun. **48**: 486-491.

- Kovarova, H., Stulik, J., Macela, A., Lefkovits, I., Skrabkova, Z.** (1992) Using two-dimensional gel electrophoresis to study immune response against intracellular bacterial infection. *Electrophoresis*. **13**: 741-2.
- Krogfelt, K. A.** (1991) Bacterial adhesion: genetics, biogenesis, and role in pathogenesis of fimbrial adhesions of *Escherichia coli*. *Rev. Bact. Dis.* **13**: 721-735.
- Kutsukake, K., Ohya, Y., Iino, T.** (1990) Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **172**: 741-747.
- Laehtenmaeki, K., Kukkonen, M., Hacker, J., Hynonen, U., and Korhonen, T. K.** (1994) Identification of plasminogen receptors of *Escherichia coli* and *Salmonella*. In 7th International Congresses of Bacteriology and Applied Microbiology Division; Prague, Czech Republic.
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lange, R., Barth, M., Hengge-Aronis, R.** (1993) Complex transcriptional control of the σ^S -dependent stationary-phase-induced and osmotically regulated *osmY (csi-5)* gene suggests novel roles for Lrp, cyclic AMP (cAMP) receptor protein-cAMP complex, and integration host factor in the stationary-phase response of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**: 7910-7917.
- Leying, H., Suerbaum, S., Geis, G., and Haas, R.** (1992) Cloning and genetic characterization of a *Helicobacter pylori* flagellin gene. *Mol. Microbiol.* **6**: 2863-2874.
- Lim, J. K., Iv, N. W. G., Zhao, H., Johnson, D. E., Keay, S. K. and Mobley, H. L. T.** (1998) *In vivo* phase variation of *Escherichia coli* type 1 fimbrial genes in women with urinary tract infection. *Infect. Immun.* **66**: 3303-3310.
- Lin, R., D'Ari, R., Newman, E.B.** (1992) σ^{placMu} insertions in genes of the leucine regulon: extension of the regulon to genes not regulated by leucine. *J. Bacteriol.* **174**: 1948-1955.
- Link, A. J., Hays, L. G., Carmack, E. B., Yates III, J. R.,** (1997) Identifying the major proteome components of *Haemophilus influenzae* type-strain NCTC 8143. *Electrophoresis* **18**: 1314-1334.
- Lottspeich, F., and Eckerskorn, C.** (1989) Two-dimensionally separated proteins are available for protein chemical analysis on microscale. In: B.J. Radola (ed.) *Electrophoresis forum '89*, pp: 72-83.
- Low, D., David, V., Lark, D., Schoolnik, G., Falkow, S.** (1984) Gene clusters governing the production of haemolysin and mannose-resistant haemagglutination are closely linked in *Escherichia coli* O4 and O6 isolates from urinary tract infections. *Infect. Immun.* **43**: 353-358.
- Macnab, R.** (1992) Genetics and biogenesis of bacterial flagella. *Annu. Rev. Genet.* **26**: 131-158.

- Malaviya, R., Gao, Z., Thankavel, K., Merwe, P. A., Abraham, S. N.** (1999) The mast cell tumor necrosis factor alpha response to FimH-expressing *Escherichia coli* is mediated by the glycosylphosphatidylinositol-anchored molecule CD48. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 8110-8115
- Mallow, E. B., Harris, A., Salzman, N., Russell, J. P., DeBerardinis, R. J., Ruchelli, E. and Bevins, C. L.** (1996) Human enteric defensins. *J. Biol. Chem.* **271**: 4038-4045.
- Marshall, A., Hodgson, J.** (1998) DNA chips: an array of possibilities. *Nat. Biotechnol.* **16**: 27-31.
- Martinez, J. J., Mulvey, M. A., Schilling, J. D., Pinkner, J. S., Hultgren, S. J.** (2000) Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *EMBO J.* **19**: 2803-2812.
- McAtee, C. P., Lim, M. Y., Fung, K., Velligan, M., Fry, K., Chow, T. P., Berg, D. E.** (1998) Characterization of a *Helicobacter pylori* vaccine candidate by proteome techniques. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* **714**: 325-33.
- McDaniel T. K., Jarvis K. G., Donnenberg M. S., Kaper J. B.** (1995) A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**: 1664-1668.
- McDermott P. F., Ciacci-Woolwine, F., Snipes, J. A., Mizel, S. B.** (2000) High-affinity interaction between gram-negative flagellin and a cell surface polypeptide results in human monocyte activation. *Infect. Immun.* **68**: 5525-5529.
- Mekalanos, J. J.** (1992) Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J. Bacteriol.* **174**: 1-7.
- Miller, S. J., and Mekalanos, J. J.** (1988) A novel suicide vektor and its use in construction of insertion mutants: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J. Bacteriol.* **170**: 2575-2583.
- Miller, J. F., Mekalanos, J. J., and Falkow, S.** (1989) Coordinate regulation and sensory transduction in the control of bacterial virulence. *Science* **243**: 916-922.
- Molloy, M. P., Herbert, B. R., Slade, M. B., Rabilloud, T., Nouwens, A. S., Williams, K. L., Gooley, A. A.** (2000) Proteomic analysis of the *Escherichia coli* outer membrane. *Eur. J. Biochem.* **267**: 2871-2881.
- Morschhaeuser, J., Vetter, V., Emoedy, L., and Hacker, J.** (1994) Adhesin regulatory genes as parts of large, unstable DNA regions of pathogenic *Escherichia coli*: cross-talk between different adhesin gene clusters. *Mol. Microbiol.* **11**: 555-566.
- Mühdorfer, I., and Hacker, J.** (1994) Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. *Microbio. Pathogen* **16**: 171-181.
- Mytelka, D. D., and Chamberlin, M. J.** (1996) *Escherichia coli* *fliAZY* operon. *J. Bacteriol.* **178**: 24-34.

- Nahlik, M. S., Fleming, T. P., McIntosh, M. A.** (1987) Cluster of genes controlling synthesis and activation of 2,3-dihydrobenzoic acid in production of enterobactin in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**: 4163-4170.
- Neidhardt, F. C.** (1996) *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology. Second edition. Volume 1. Editor in chief FC Neidhardt. ASM Press, Washington, D. C.
- Newman, E. B., D'Ari, R., Lin, R. T.** (1992) The leucine-Lrp regulon in *E. coli*: a global response in search of a raison d'etre. *Cell.* **68**: 617-619.
- Ochsner, U. A., Reiser, J.** (1995) Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **92**: 6424-6428.
- O'Farrell, P. H.** (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**: 4007-4021.
- O'Farrell, P. Z., Goodman, H. M., O'Farrell, P. H.** (1977) High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* **12**: 1133-1142.
- Reid G, Sobel JD.** (1987) Bacterial adherence in the pathogenesis of urinary tract infection: a review. *Rev Infect Dis.* **9**: 470-487.
- Ørskov, I., and Ørskov, F.** (1985) *Escherichia coli* in exrtaintestinal infections. *J. Hyg. Camb.* **95**: 551-575.
- Ott, M.** (1993) Dynamics of the bacterial genome: deletions and integrations as mechanism of bacterial virulence modulation. *Zbl. Bakt.* **278**: 457-468.
- Qi, S.-Y., Moir, A., O'Connor, C. D.** (1996) Proteom of *Salmonella typhimurium* SL1344: Identification of novel abundant cell envelope proteins and assignment to a two-dimensional reference map. *J. Bacteriol.* **178**: 5032-5038.
- Passador, L., Cook, J. M., Gambello, M. J., Rust, L., Iglewski, B. H.** (1993) Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science.* **260**: 1127-30.
- Pearson, J. P., Gray, K. M., Passador, L., Tucker, K. D., Eberhard, A., Iglewski, B. H., and Greenberg, E. P.** (1994) Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 197-201.
- Perna, N. T., Plunkett, G. III, Burland, V., Mau, B., Glasner, J. D., Rose, D. J., Mayhew, G. F., Evans, P. S., Gregor, J., Kirkpatrick, H. A., Posfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E. J., Davis, N. W., Lim, A., Dimalanta, E., Potamousis, K., Apodaca, J., Anantharaman, T. S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D. C., Welch, R. A., Blattner, F. R.** (2001) Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 *Nature* **409**: 529-533

- Piechaczek, K., Dobrindt, U., Schierhorn, A., Fischer, G. S., Hecker, M., Hacker, J.** (2000) Influence of pathogenicity islands and the minor *leuX*-encoded tRNA_{5^{Leu}} on the proteom pattern of the uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**: 75-84.
- Possot, O., d'Enfert, C., Reyss, I., Pugsley, A. P.** (1992) Pullulanase secretion in *Escherichia coli* K-12 requires a cytoplasmic protein and a putative polytopic cytoplasmic membrane protein. *Mol. Microbiol.* **6**: 95-105.
- Reid, G., and Sobel, J. D.** (1987) Bacterial adherence in the pathogenesis of urinary tract infections: a review. *Rev. Infect. Dis.* **9**: 470-487.
- Retznikoff W. S.** (1992) Catabolite gene activator protein activation of lac transcription. *J. Bacteriol.* **174**: 655-658.
- Richarme, G., and Caldas T. D.** (1997) Chaperone properties of the bacterial periplasmic substrate-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **272**: 15607-15612.
- Ritter, A., Blum, G., Emody, L., Kerenyi, M., Bock, A., Neuhierl, B., Rabsch, W., Scheutz, F., Hacker, J.** (1995) tRNA genes and pathogenicity islands: influence on virulence and metabolic properties of uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **17**: 109-121.
- Ritter, A.** (1996) Dissertation, Würzburg
- Ritter, A., Gally, D. L., Olsen, P. B., Dobrindt, U., Friedrich, A., Klemm, P., Hacker, J.** (1997) The Pai-associated *leuX* specific tRNA_{5(Leu)} affects type 1 fimbriation in pathogenic *Escherichia coli* by control of FimB recombinase expression. *Mol. Microbiol.* **25**: 871-882.
- Righetti P. G., Gianazza E, Bjellqvist B.** (1983) Modern aspects of isoelectric focusing: two-dimensional maps and immobilized pH gradients. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **8**: 189-108.
- Saier, Jr., M. H.** (1995) Differential codon usage: a safeguard against inappropriate expression of specialized genes? *FEBS Lett.* **362**: 1-4.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A.** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA-polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Sambrook, S., Fritsch, E. F., Maniatis, T.** (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbour, New York.
- Sanger, F., Niklen, S., Coulson, A. R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Schilling J. D., Mulvey, A. Hultgren S. J.** (2001) Structure and Function of *Escherichia coli* Type 1 Pilli: New Insight into the Pathogenesis of Urinary Tract Infections. *J. Infect. Diseases* **183**: 36-40.

- Schubert, S., Rakin, A., Karch, H., Carniel, E., Heesemann, J.** (1998) Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infect Immun.* **66**: 480-485.
- Siegfried, L., Kmetova, M., Janigova, V., Sasinka, M., Takacova, V.** (1995) Serum response of *Escherichia coli* strains causing dyspepsia and urinary tract infection: relation to α -hemolysin production and O type. *Infect. Immun.* **63**: 4543-4545.
- Sperandio, V., Mellies, J. L., Nguyen, W., Shin, S., Kaper, J. B.** (1999) Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **96**: 15196-15201.
- Srroemberg, N., Marklund, B.-I., Lund, B., Ilver, D., Hamers, A., Gaastra, W., Karlsson, K.-A., and Normark, S.** (1990) Host-specificity of uropathogenic *Escherichia coli* depends on differences in binding specificity to Gal \square 1-4 Gal-containing isoreceptors. *EMBO J.* **9**: 2001-2010.
- Stegemann, H.** (1970) Proteinfractionierungen in Polyacrylamid und die Anwendung auf die genetische Analyse bei Pflanzen. *Angew. Chem.* **82**: 640.
- Steinberg, D. A., Hurst, M. A., Fujii, C. A., Kung, A. H., Ho, J. F., Cheng, F.-C., Loury, D. J., Fiddes, J. C.** (1997) Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 1738-1742.
- Steiner T.** (1997) Molekularbiologische Charakterisierung von Pathogenitätsinseln virulenter Enterobakterien. Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- Struve C. and Krogfelt K. A.** (1999) *In vivo* detection of *Escherichia coli* type 1 fimbrial expression and phase variation during experimental urinary tract infection. *Microbiol.* **145**: 2683-2690.
- Stumpe, S., Schmid, R., Stephens, D. L., Georgiou, G., Bakker, E. P.** (1998) Identification of OmpT as the protease that hydrolyzes the antimicrobial peptide protamine before it enters growing cells of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**: 4002-4006.
- Surette, M. G., Bassler, B. L.** (1998) Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **95**: 7046-7050.
- Surette, M. G., Bassler, B. L.** (1999a) Regulation of autoinducer production in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **31**: 585-595.
- Surette, M. G., Miller, M. B., Bassler, B. L.** (1999b) Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **96**: 1639-1644.
- Susa, M., Kreft, B., Wasenauer, G., Ritter, A., Hacker, J., Marre, R.** (1996) Influence of cloned tRNA genes from uropathogenic *Escherichia coli* strain on adherence to primary human renal tubular epithelial cells and nephropathogenicity in rats. *Infect. Immun.*

- Swift, S., Lynch, M. J., Fish, L., Kirke, D. F., Tomas, J. M., Stewart, G. S., Williams, P.** (1999) Quorum sensing-dependent regulation and blockade of exoprotease production in *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.* **67**: 5192-5199.
- VanBogelen, R., Schiller, E., Thomas, J., Neidhardt, F.** (1999) Diagnosis of cellular states of microbial organisms using proteomics. *Electrophoresis* **20**: 2149-2159.
- Wattiau, P., Cornelis, G. R.** (1994) Identification of DNA sequences recognized by VirF, the transcriptional activator of the *Yersinia yop* regulon. *J. Bacteriol.* **176**: 3878-3884.
- Webb, R. M. and Lundrigan, M. D.** (1996) OmpT in *Escherichia coli* correlates with severity of disease in urinary tract infections. *Med. Microbiol. Letters.* **5**:8-14.
- Weiner, L., Brisette, J. L., Model, P.** (1991) Stress-induced expression of the *Escherichia coli* phage shock protein operon is dependent on σ^{54} and modulated by positive and negative feedback mechanisms. *Genes. Dev.* **5**: 1912-1923.
- Weiner, L. and Model, P.** (1994) Role of an *Escherichia coli* stress-induced operon in stationary-phase survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 2191-2195.
- Weiser, J. N., Gotschlich, E. C.** (1991) Outer membrane protein A (OmpA) contributes to serum resistance and pathogenicity of *Escherichia coli* K-1. *Infect. Immun.* **59**: 2252-2258.
- Welch, R. A., Dellinger, E. P., Minshew, B., Falkow S.** (1981) Haemolysin contributes to virulence of extra-intestinal *E. coli* infections. *Nature.* **294**: 665-667.
- Wengelnik, K., Marie, C., Russel, M., Bonas, U.** (1996) Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction. *J. Bacteriol.* **178**: 1061-1069.
- Williams, P., Camara, M., Hardman, A., Swift, S., Milton, D., Hope, V. J., Winzer, K., Middleton, B., Pritchard, D. I., Bycroft, B. W.** (2000) Quorum sensing and the population-dependent control of virulence. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **355**: 667-680.
- Wilm, M., Shevchenko, A., Houthaeve, T., Breit, S., Schweigerer, L., Fotsis, T., Mann, M.** (1996) Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature.* **379**: 466-469.
- Yanisch-Perron, C. J., Vieira, and Messing, J.** (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp 18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Yim, H. H., Brems, R. L. Villarejo, M.** (1994) Molecular characterization of the promoter of *osmY*, an *rpoS*-dependent gene. *J. Bacteriol.* **176**: 100-107.

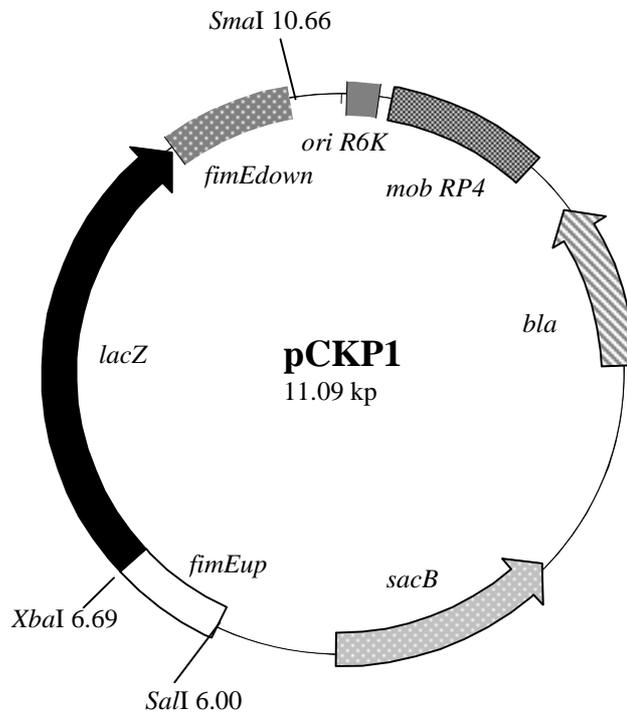
VIII

Anhang

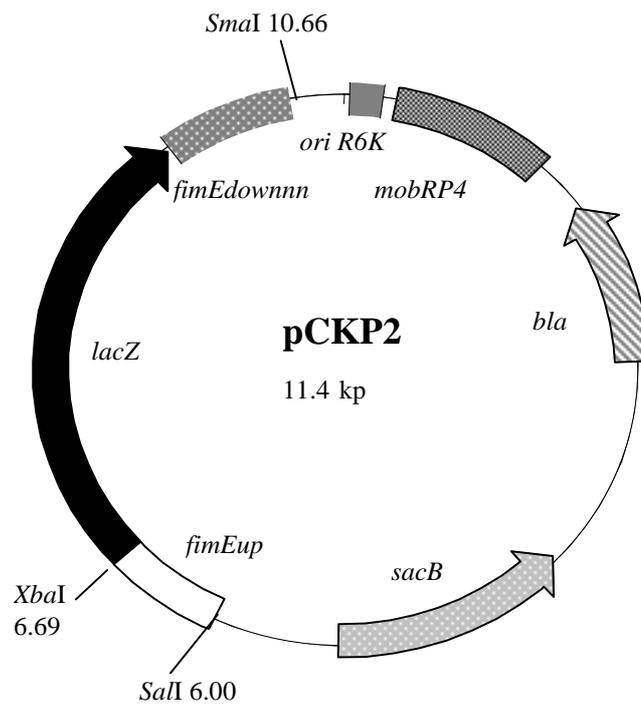
1 Restriktionskarten der in dieser Arbeit konstruierten Plasmide

Im folgenden sind Karten der Plasmide aufgeführt, die im Verlauf dieser Arbeit hergestellt wurden. Die Größe der Plasmide, der jeweilige Vektor sowie die einzelnen Inserts sind angegeben. Alle für die entsprechenden Klonierungen notwendigen Restriktionsstellen im Insert und in den Polylinkern sind dargestellt. Die Transkriptionsrichtung der Gene in den Plasmiden ist durch einen Pfeil angedeutet.

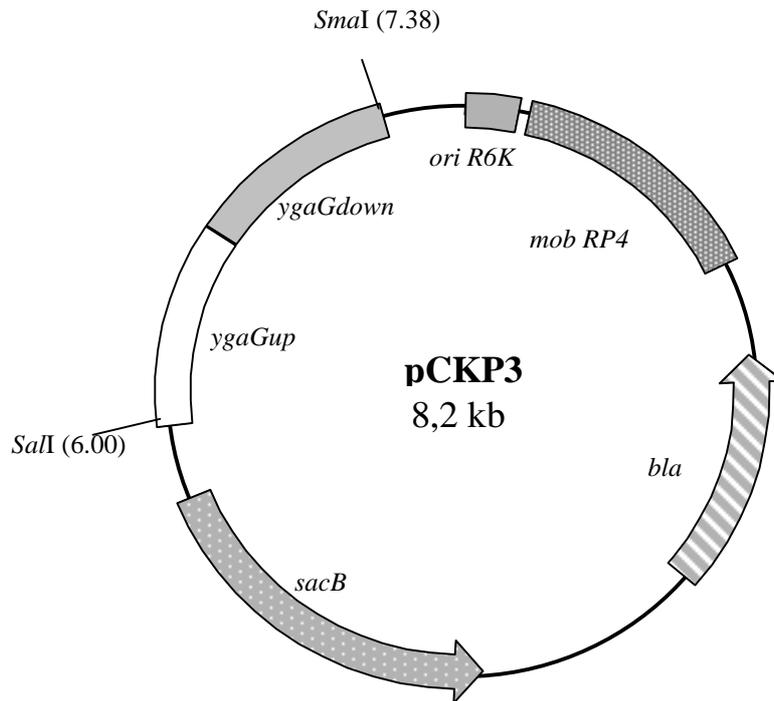
pCKP1: 4,9 kb Fragment („up- und downstream“-Bereiche von *fimB* mit *lacZ*-Gen) kloniert in pCVD442 (*SalI/SmaI*)



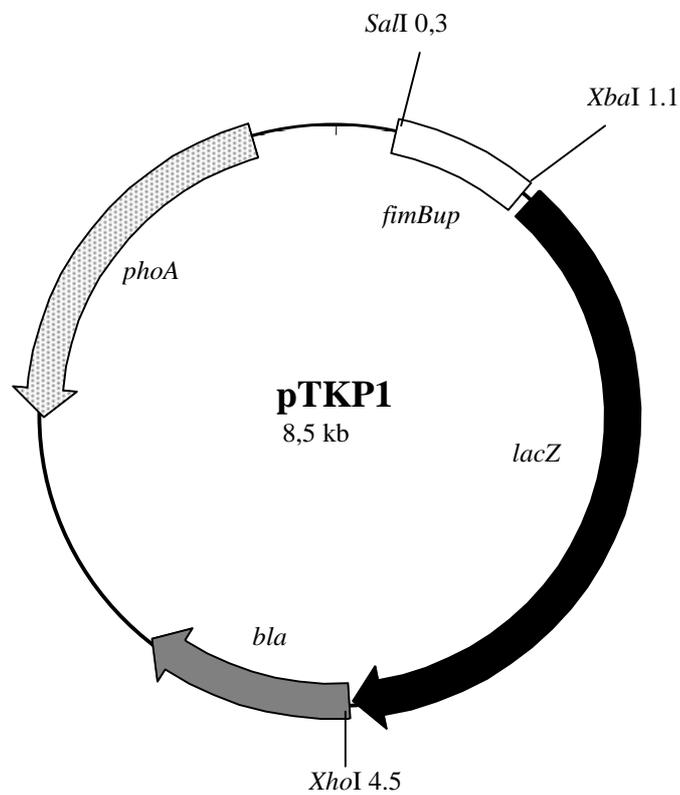
pCKP2: 5,2 kb Fragment („up- und downstream“-Bereiche von *fimE* mit *lacZ*-Gen) kloniert in pCVD442 (*SalI/SmaI*)



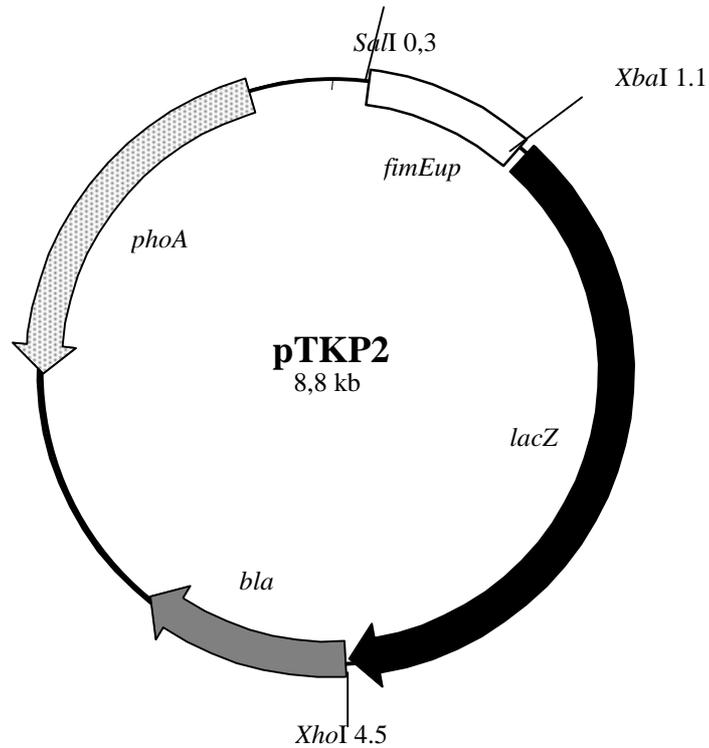
pCKP3: 1,85 kb Fragment kloniert in pCVD442 (*SalI/SmaI*)



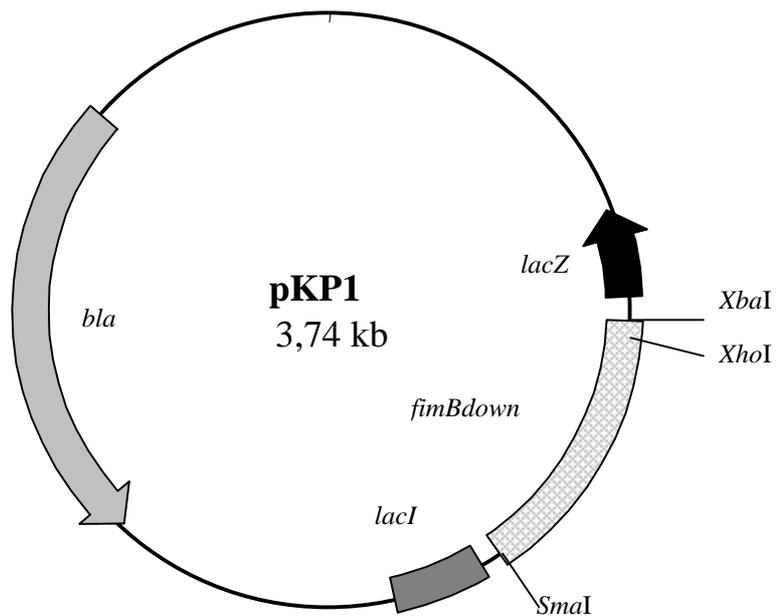
pTKP1: 779 bp Fragment („upstream“-Bereich von *fimB*) kloniert in pTAC3953 (*SalI/XbaI*)



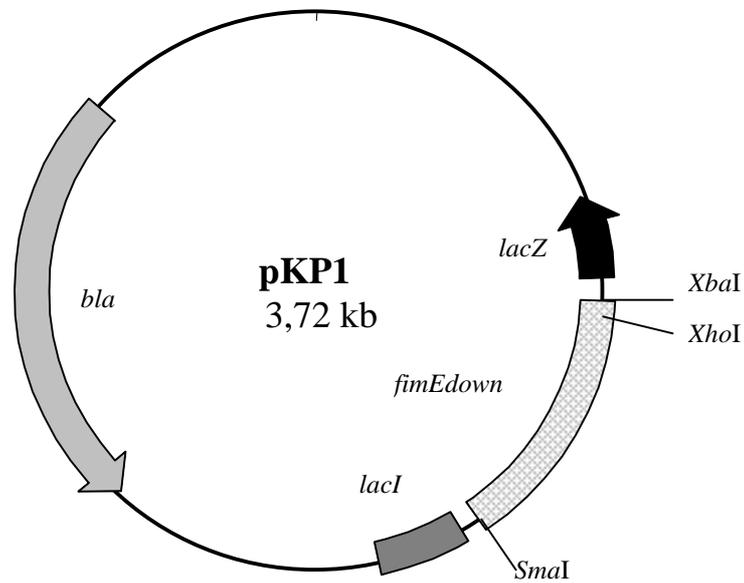
pTKP2: 1100 bp Fragment („upstream“-Bereich von *fimE*) kloniert in pTAC3953 (*Sal* I/*Xba* I)



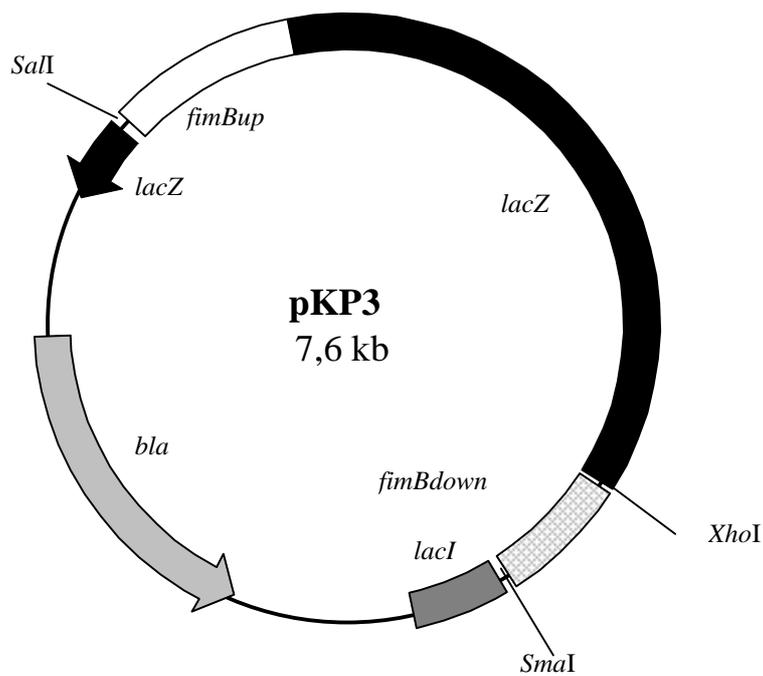
pKP1: 1038 bp Fragment („downstream“-Bereich von *fimB*) kloniert in pUC19 (*Xba*I/*Sma*I)



pKP2: 1020 bp Fragment („downstreambereich“ von *fimE*) kloniert in pUC19 (*XbaI/SmaI*)



pKP3: 4,0 kb Fragment („up“-Bereich von *fimB* mit *lacZ*-Gen) kloniert in pKP1 (*SalI/XhoI*)



2 Zusammenfassung der Unterschiede in der Proteinexpression bei dem *E. coli* Stamm 536 und seinen Derivaten.

Proteine nach der radioaktiver Markierung, Gesamtzellextrakte

Spot Nr	Protein Name	Stämme			
		536 PAI I ⁺ , PAI II ⁺ , <i>leuX</i> ⁺	536-21 PAI I, PAI II, <i>leuX</i> ⁻	536Δ102 PAI I ⁺ , PAI II ⁺ , <i>leuX</i> ⁻	536R3 PAI I, PAI II ⁻ , <i>leuX</i> ⁺
P1	-	+	-	-	+
P2	-	+	-	-	+
P3	-	+	-	-	+
P4	-	+	-	-	+
P5	-	++	-	++	+
P6	-	+	-	-	+
P7	-	++	+	++	+
P8	-	+	-	-	-
P9	-	++	-	-	+
P10	-	+	-	+	-
P11	-	+	-	+	-

Proteine im silbergefärbten Gel, Gesamtzellextrakte

P12	-	-	+	+	-
P13	-	+	-	-	+
P14	-	+	++	+	++
P15	-	-	+	+	-
P16	-	-	+	+	-
P17	-	+	++	+	++
P18	-	-	+	-	+
P19	-	+	-	-	+
P20	-	+	-	-	+
P21	-	+	++	++	+

Proteine im coomasiegefärbten Gel, Gesamtzellextrakte

P22	Ferrichrom-Eisen-Rezeptor, FhuA	+	++	+++	+
P23	Pesticin-Rezeptor, FyuA	++	+	+	++
P24	Isochorismatase, EntB	++	+	+	++
P25	Isochorismat-Synthase, EntC	+++	+	+	++
P26	Periplasmatisches Oligopeptid-bindendes Protein, OppA	+++	+	-	++

Spot Nr	Protein Name	Stämme			
		536 PAI I ⁺ , PAI II ⁺ , <i>leuX</i> ⁺	536-21 PAI I ⁺ , PAI II ⁻ , <i>leuX</i> ⁻	536Δ102 PAI I ⁺ , PAI II ⁺ , <i>leuX</i> ⁻	536R3 PAI I ⁻ , PAI II ⁻ , <i>leuX</i> ⁺
P27	a) Putrescin-bindendes periplasmatisches Protein, PotF b) 6-Phosphofructo-kinase 2, PfkB	++	+	+	++
P28	Pyruvat-Kinase I, PykF	++	+	+++	+
P29	Transketolase I, TktA	+	++	+	++
P30	Transaldolase B, TalB	++	+	+	++
P31	α-Amylase, MalS	++	+	+	++
P32	Hypothetisches 19,3 kDa Protein, YgaG	+++	++	+	++
P33	Hypothetisches 16,8 kDa Protein, YhbC	++	+	+	++
P34	Hypothetisches 24,8 kDa Protein, YodA	+++	+	+	++
P35	Putatives Adhesin, YebL	-	+	++	-
P36	Cystin bindendes periplasmatisches Protein, FliY	-	+	+	-
P37	Thiol-Peroxidase, TpX	+	++	++	+
P38	Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase, AhpC	+	++	++	+
P39	Zellteilungprotein, FtsZ	++	+	+	++
P40	30S ribosomales Protein S6	++	+	++	+
P41	“Phage shock protein A”, PspA	-	+	++	-
P42	a) ATP-Synthase α Kette, AtpA b) Periplasmatisches dipeptidbindendes Protein, Dbp	++	+	+	++
P43	a) Glutamat-decarbo-xylase β DceB b) Glutamat-decarbo-xylase α DceA	+	+	++	+
P44	Glutathion-Synthetase, GshB	+++	+	++	+
P45	Malonyl-CoA-Acyl-carrier Protein-Transacylase, FabD	+	++	++	+
P46	Ketol-acid Reductoisomerase, IlvC	++	+	+	++
P47	2-Isopropylmalat-Synthase, LeuA	++	+	+	++
P48	Phenylalanyl-tRNA-Synthase α-Kette, SyfA	+++	+	+	++
P49	ATP-Phosphoribosyl-transferase, HisG	++	+	+	++
P50	Phospho-2-Dehydro-3-Deoxyheptonat-Aldolase, AroF	++	+	+	++
P51	a) Chorismat-Mutase, TyrA b) Aspartat-Aminotransferase	++	+	+	++

Spot Nr	Protein Name	Stämme			
		536 PAI I ⁺ , PAI II ⁺ , <i>leuX</i> ⁺	536-21 PAI I, PAI II, <i>leuX</i>	536Δ102 PAI I ⁺ , PAI II ⁺ , <i>leuX</i>	536R3 PAI I, PAI II, <i>leuX</i> ⁺
P52	Tryptophan-Synthase β-Kette, TrpB	+++	+	+	++
P53	Phosphoribosylaminoimidazolcarboxamid-formyltransferase, PurH	++	+	+	++
P54	2,3,4,5-Tetrahydro-pyridin-2-Carboxylat-N-Succinyl-Transferase, DapD	+++	+	+	+++
P55	Cysteiny-tRNA-Synthase, CysS	++	+	+	++
P56	Anthranilat-Synthase, YbtS	+++	+	+	++
P57	unbekannt	+	++	+	++
P58	unbekannt	++	+	+	++
P59	Salicyl-AMP-Ligase, YbtE	++	-	+	-
P60	Putatives GTP-bindendes Faktor, YhbZ	+	++	++	+

Proteine im coomasiegefärbten Gel, Überstandfraktion

P61	Flagellin, 56,5 kDa Flagellin, 60,9 kDa	+++	-	-	+++
P62	osmotisch induzierbares Protein OsmY	+	-	-	+
P63	unbekannt	++	+	+	++

Proteine im silbergefärbten Gel, Membranfraktion

P64	„DNA-Protection“ Protein	-	+	+	-
P65	unbekannt	+	++	++	+
P66	Biotin-Synthase	+	++	++	+
P67	CTP-Synthase	+	-	+	-
P68	unbekannt	++	+	+	+
P69	Polynukleotid- Phosphorylase	++	+	+	++
P70	unbekannt	+	++	++	+

Proteine im coomasiegefärbten Gel, Membranfraktion

Spot Nr	Proteinname	Stämme			
		536 PAI I ⁺ , PAI II ⁺ , <i>leuX</i> ⁺	536-21 PAI I ⁻ , PAI II ⁻ , <i>leuX</i> ⁻	536Δ102 PAI I ⁺ , PAI II ⁺ , <i>leuX</i> ⁻	536R3 PAI I ⁻ , PAI II ⁻ , <i>leuX</i> ⁺
P71	Flagellin, FliC	+	-	-	+
P72	ATP-Synthase	+	++	++	+
P73	äußeres Membranprotein, OmpA	+	-	-	+
P74	unbekannt	-	+	+	-

+++ sehr starke Intensität des Proteinspots, ++ starke Intensität des Proteinspots, + normale Intensität des Proteinspots, - Proteinspot ist nicht detektierbar

3 Abkürzungen

mA	Milli-Ampere
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
dATP	Desoxyadenosin-5`-Triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-5`-Triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5`-Triphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5`-Triphosphat
dNTP	Desoxynukleotid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O _{bidest}	zweifach destilliertes Wasser
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LB	Luria Bertani Broth
M	Molar
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
min	Minuten
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
PAI	Pathogenitätsinsel
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
sec	Sekunde
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TPE	Tris-Phosphat-EDTA
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht

V	Volt
W	Watt
WT	Wildtyp
x g	fache Erdbeschleunigung
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -glukosid

4 Publikationen

4.1 Originalarbeiten

1. **Piechaczek, K., Dobrindt, U., Schierhorn, A., Fischer, G. S., Hecker, M., Hacker, J.** (2000) Influence of pathogenicity islands and the minor *leuX*-encoded tRNA_{5^{Leu}} on the proteom pattern of the uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**: 75-84.

4.2 Übersichtsarbeiten

1. **Hacker, J., Dobrindt, U., Janke, B., Nagy, G., Piechaczek, K., Blum-Oehler, G., Ölschläger, T.** (1999) Virulence factors of pathogenic *Escherichia coli*: structure, funktion, and impact on microbial evolution. *Nova Acta Leopoldina* **312**: 183-195
2. **Blum-Oehler, G., Dobrindt, U., Janke, B., Nagy, G., Piechaczek, K., Hacker, J.** (2000) Pathogenicity islands of uropathogenic *E. coli* and evolution of virulence. In: *Genes and proteins underlying microbial urinary tract infections*. Eds. L. Emödy, J. Hacker, G. Blum-oehler, T. Pal, pp 25-32. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
3. **Dobrindt, U., Janke, B., Piechaczek, K., Nagy, G., Ziebuhr, W., Fischer, G., Schierhorn, A., Hecker, M., Blum-Oehler, G., Hacker, J.** (2000) Toxin genes on pathogenicity islands: impact for microbial evolution. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**: 307-311.

4.3 Tagungsbeiträge

Die Kurzfassungen sind in den jeweiligen Tagungsbänden abgedruckt.

1. **Hacker, J., Blum-Oehler, G., Dobrindt, U., Heesemann, J., Janke, B., Mühldorfer, I., Piechaczek, K., Steiner, T.** (1998) Pathogenicity islands of extraintestinal *Escherichia coli*: structure, function and impact on microbial evolution. International Symposium on genomics in Infectious Diseases vom 11.-13.6-1998 in Würzburg.
2. **Piechaczek, K., Dobrindt, U., Gertz, S., Hecker, M., Hacker, J.** (1998) Untersuchungen zum Einfluß der *leuX*-kodierte tRNA_{5^{Leu}} auf die Expression von Proteinen des uropathogenen *E. coli* Stammes 536. VAAM / DGHM-Spätsommerschule „Pathogenitätsmechanismen“ vom 01.-03.10.1998 in Zinnowitz (Usedom)
3. **Piechaczek, K., Dobrindt, U., Gertz, S., Hecker, M., Hacker, J.** (1998) Untersuchungen zum Einfluß der *leuX*-kodierte tRNA_{5^{Leu}} auf die Expression von

- Proteinen des uropathogenen *E. coli* Stammes 536. 2. Arbeitstreffen: Signalketten und Mikrobielle Pathogenität. vom 11.-13.11.1998 in Staffelstein, Kloster Banz
4. **Blum-Oehler, G., Janke, B., Dobrindt, U., Nagy, G., Piechaczek, K., Jacobi, C., Starkuvenc, V., Gottschalk, G., und Hacker, J.** (1999) Pathogenitätsinseln von extraintestinalen *Escherichia coli*-Bakterien: Strukturelle und evolutionäre Aspekte. DECHEMA Jahrestagung vom 27.-29.04.1999 in Wiesbaden
 5. **Hacker, J., Dobrindt, U., Janke, B., Piechaczek, K., Nagy, G., Ziebuhr, W., Fischer, G., Schierhorn, A., Blum-Oehler, G.** (1999) Toxin genes on pathogenicity islands: impact for microbial evolution. ETOX-Meeting vom 27.6.-2.7.1999 in Ste. Maxime, Frankreich.
 6. **Blum-Oehler, G., Dobrindt, U., Janke, B., Piechaczek, K., Nagy, G., und Hacker, J.** (1999) Pathogenicity islands of uropathogenic *E. coli* and evolution of virulence. FEMS Tagung vom 16.-19.09.1999 in Pecs, Ungarn.
 7. **Hacker, J., Dobrindt, U., Piechaczek, K., Schierhorn, A., Fischer, G., Hecker, M.** (1999) Pathogenitätsinseln und „Proteomics“. Cold Spring Hiddensee-Meeting (C. S. H.) des Graduiertenkollegs der DFG „Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von Pro- und Eukaryotischen Genen“ vom 23.-26.09.1999 in Kloster, Insel Hiddensee.
 8. **Piechaczek, K., Dobrindt, U., Schierhorn, A., Fischer, G., Hecker, M., Hacker, J.** (1999) Influence of the tRNA_{5^{Leu}} on gene expression in the uropathogenic *E. coli* strain 536. 3. Arbeitstreffen Signalketten und Mikrobielle pathogenität: „Von der Biochemie bis zur Medizin“ vom 04.-06.11.1999 in Lutherstadt Wittenberg.
 9. **Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Janke, B., Nagy, G., Piechaczek, K., Jacobi, C., Gottschalk, G., Schierhorn, A., Fischer, G., Hecker, M., Hacker, J.** (1999) Pathogenicity islands of the uropathogenic *Escherichia coli* strain 536: structural and functional aspects. DECHEMA Workshop „Funktionale Genomforschung an Mikroorganismen“ vom 4.-5.11.1999 in Frankfurt.
 10. **Dobrindt, U., Piechaczek, K., Schierhorn, A., Fischer, G., and Hacker, J.,** (1999) Influence of the pathogenicity island associated gene *leuX* on gene expression in the uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. DECHEMA Workshop „Funktionale Genomforschung an Mikroorganismen“ vom 4.-5-11-1999 in Frankfurt.
 11. **Blum-Oehler, G., Dobrindt, U., Janke, B., Nagy, G., Piechaczek, K., Gottschalk, G., Hartsch, T., Johann, A., Fischer, G., Schierhorn, A., Hecker, M., Hacker, J.** (2000) The pathogenicity islands of the uropathogenic *E. coli* strain 536: structur and function. Microbiology 2000-Tagung vom 12.-16.3.2000 in München.

5 Lebenslauf

Name: Katharine Piechaczek
Geburtsdatum: 02. März 1969
Geburtsort: Klosterbruch/Polen

Ausbildung

1975-1983 Volksschule, Klein Dobern/Polen
1983-1987 Besuch des Gymnasiums in Groß Dobern
1987 Allgemeine Hochschulreife

1987-1989 Studium der Biologie an der Universität in Breslau/Polen

WS 91/92-SS 96 **Studium der Biologie an der Technischen Universität in
Darmstadt**

WS 93/94 Diplomvorprüfung im wissenschaftlichen Studiengang Biologie
in den Fächern Mikrobiologie, Botanik, Zoologie, Analytische
Chemie, Physik

Juli 95-Aug. 95 Praktikum bei Bayer AG, Abteilung der Biotechnologie
WS 95/96 Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Biochemie,
Immunologie und Kernchemie

WS 95/96-SS 96 Experimentelle Diplomarbeit am Institut für Biochemie der
Technischen Universität Darmstadt in der Abteilung von Prof.
Dr. H. G. Gassen unter der Anleitung von Dr. S. Wolf mit dem
Thema: „Reinigung der 5-Oxo-L-prolinase aus Schweineniere,
Nachweis zweier Untereinheiten sowie Untersuchungen zur
Gewebespezifität“

seit Januar 97 **Dissertation am Institut für Molekulare Infektionsbiologie
der Julius-Maximillian-Universität zu Würzburg**

Beginn der experimentellen Arbeit zur vorliegenden
Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. J. Hacker