

Untersuchungen zur Genomstruktur
und Biofilmbildung von pathogenen
***Escherichia coli* Isolaten**

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

angefertigt am
Institut für Molekulare Infektionsbiologie
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Kai Michaelis
aus Oschatz

Würzburg, 2005

Eingereicht am: _____

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr.
1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. J. Hacker
2. Gutachter: Prof. Dr. J. Reidl

Tag des Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Der experimentelle Teil der hier vorliegenden Arbeit wurde von Januar 2001 bis Oktober 2004 am Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Weiterhin versichere ich, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat und ich zudem -neben dem Titel Diplom-Chemiker (Univ.)- bislang keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, November 2005

K a i M i c h a e l i s

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei zahlreichen Begleitern und Mitstreitern bedanken, die durch ihr Wirken ermöglicht haben, diese Dissertationsarbeit anfertigen zu können.

An erster Stelle sei meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Dr. h.c. mult. J. Hacker, herzlich gedankt, für eine interessante Themenstellung, die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe am Institut für Molekulare Infektionsbiologie die experimentellen Arbeiten hierfür durchführen zu können und sein stetes Interesse am Fortgang und Erfolg dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. J. Reidl danke ich für die freundliche Übernahme der Zweitbegutachtung dieser Dissertationsschrift.

Den größten Anteil am Gelingen dieser Arbeit hatte sicherlich mein Betreuer Dr. U. Dobrindt. Lieber Uli, auch Dir möchte ich sehr herzlich danken, dass Du mich in den letzten Jahren bei meinen experimentellen Arbeiten dirigiert hast und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standest. Nicht zuletzt ermöglichte Dein engagiertes Korrekturlesen meiner „Rohfassungen“ es, dieser Arbeit den Feinschliff zu geben. Wohl wissend, dass Du zu Hause -seit neuestem sogar zwei- liebe kleine Plagegeister hast, weiß ich dies umso mehr zu schätzen.

Ein großes Dankeschön geht auch an zwei Arbeitsgruppen vom Institut Pasteur (Paris) für die erfolgreiche Zusammenarbeit innerhalb unserer wissenschaftlicher Kooperationen. Die Arbeitsgruppe von Dr. Carmen Buchrieser half mit Know-how und Material bei der Herstellung des Pathoarrays, was im metaphorischen Sinne die „Grundsteinlegung“ dieser Arbeit war. Einen großen Beitrag zum praktischen Teil leistete auch die Arbeitsgruppe von Dr. Jean-Marc Ghigo durch eine exzellente Expertise in der Biofilmforschung und die gute Zusammenarbeit. Vielen Dank !!

Herrn Karsten Hiller von der TU Braunschweig danke ich für die angebotene Hilfe und Umsetzung der Programmierung der „ops“-Element-Sequenzanalyse. Lieber Karsten, zum Glück gibt es hilfsbereite Bioinformatiker wie Dich. Hab großen Dank für Deine uneigennütigen Bemühungen.

Außerdem trugen noch Arbeiten von Barbara Plaschke und Karin Lindner dazu bei, einige Experimente durchführen zu können. Beide Arbeitskolleginnen stellten Mutanten zur

Verfügung, die bei einigen Experimenten verwendet wurden. Auch hierfür mein besonderer Dank !!

Und nun zu Euch, liebe Kolleginnen und Kollegen. Es war wirklich eine tolle Zeit, die ich mit Euch allen erlebt habe und dafür möchte ich auch an Euch besondere Worte des Dankes richten:

Für die nette Atmosphäre in unserer guten Stube danke ich meiner Labor-WG Uschi, Bianca und Ted. Dann wären da auch noch Kollegen, die ich in die Schublade „alte *E. colis*“ stecken möchte: Gudrun, Sibylle, Gabi, Georg, Lubo und nicht zuletzt Barbara sowie die späteren Karin L. und Mella. Ihr hattet mich als Wiederkommenden nett in die Gruppe integriert und mir sofort einen guten Start erlaubt. Vielen Dank für die gemeinsame, intensive Zeit, auch außerhalb der Arbeit, die ich mit Euch verbringen durfte. Auch mit Euch „neueren *E. colis*“ Artur, Claudia, Stefan, Philippe, Caroline und Jarek hat es Spaß gemacht, zusammen zu arbeiten. Schade, dass die kurze Zeit nun schon vorbei ist. Des Weiteren möchte ich noch einige „nicht-*E. colis*“ erwähnen, die auch ein gewisses Wohlbefinden meinerseits -häufig durch Rumflachserie- erzeugten: Christa, Davina, Olli, Isa, Sabine R., Suse, Alex und nicht zu vergessen unsere „Institutsseele“ Hilde.

Im zurückliegenden Lebensabschnitt bin ich auf unterschiedlichen Etappen von vielen Menschen geprägt worden. Bei dieser Gelegenheit danke ich allen schulischen und akademischen Lehrern und Förderern, insbesondere diesen, die ein großes naturwissenschaftliches Interesse in mir geweckt haben und jenen, welche mir die Möglichkeit gaben, Laborarbeiten (abseits allgemeiner Praktika) zu erlernen und anzuwenden: Wolfgang in Tübingen, Bernd und Tobias in Würzburg sowie Steffi in Houston. Es hat mir sehr großen Spaß gemacht, mit Euch zusammen forschen zu dürfen.

Abschließend danke ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre Liebe, Freundschaft und Verbundenheit sowie dafür, mich immer unterstützt und ermutigt zu haben. Euer Rückhalt hat mir immer sehr viel Kraft gegeben -DANKE !!

Inhaltsverzeichnis:

I	Summary	1
II	Zusammenfassung	3
III	Einleitung	5
III.1	Genomweite Untersuchungen zellulärer Netzwerke von Mikroorganismen	5
III.2	<i>Escherichia coli</i> als virulenter Erreger und das Konzept der Pathogenitätsinseln (PAIs)	7
III.3	Virulenzfaktoren pathogener <i>E. coli</i>	9
III.4	Genregulation von Pathogenitäts-Determinanten	11
III.5	Kurzbeschreibung des <i>E. coli</i> Stammes 536	12
III.6	Der Transkriptionselongationsfaktor RfaH	14
III.7	Bakterielle Biofilme als Lebensgemeinschaften	16
III.8	Biofilmbildende Faktoren und Beschreibung des Autoporterproteins Antigen 43 bei <i>E. coli</i>	19
IV	Material	23
V	Methoden	29
V.1	Kultivierung der Bakterien	29
V.2	Herstellung kompetenter Zellen	29
V.2.1	Kompetente Zellen zur Aufnahme von Plasmid-DNA	29
V.2.2	Kompetente Zellen für die stabile chromosomale Integration linearer DNA-Fragmente (Datsenko und Wanner, 2000)	30
V.3	DNA-Techniken	30
V.3.1	Allgemeine DNA-Techniken	30
V.3.1.1	Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen	30
V.3.1.2	Horizontale Gelelektrophorese	30
V.3.1.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	31
V.3.1.4	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>E. coli</i> (Grimberg <i>et al.</i> , 1989)	31
V.3.1.5	Amplifizierung von DNA-Fragmenten durch PCR („polymerase chain reaction“)	32
V.3.1.6	Reinigung von PCR-Ansätzen	34
V.3.2	Rekombinante Plasmide	34
V.3.2.1	Klonierung von PCR-Produkten	34
V.3.2.2	Plasmidisolierung mit dem „Plasmid Midi-Kit“ (Qiagen)	34
V.3.2.3	Isolierung von Plasmid-DNA mit der Schnelllysate-Methode	36
V.3.2.4	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	37
V.3.2.5	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	37
V.3.2.6	Herstellung rekombinanter DNA-Moleküle	37
V.3.2.7	Transformation von Bakterienzellen	37
V.3.2.7.1	Transformation CaCl ₂ -kompetenter Zellen durch Hitzeschock	38
V.3.2.7.2	Transformation kompetenter Zellen durch Elektroporation	38
V.3.3	Geninaktivierung und Konstruktion chromosomaler <i>E. coli</i> Mutanten durch Allelaustausch	38
V.3.3.1	Bakterielle Konjugation	39
V.3.3.2	Stabile chromosomale Integration linearer DNA-Fragmente (Datsenko und Wanner, 2000)	39
V.3.3.3	Southernblot	40
V.3.3.3.1	Hybridisierung der Membran mit einer ³³ P-markierten DNA-Sonde	40
V.3.3.3.2	Hybridisierung der Membran mit einer ECL-markierten DNA-Sonde	41
V.4	RNA-Techniken	42
V.4.1	Konzentrationsbestimmung von RNA-Lösungen	42

V.4.2	RNA-Extraktion aus <i>E. coli</i> durch Phenol/Chloroform (Chuang et al., 1993)	43
V.4.3	Aufreinigen von RNA-Präparationen durch DNase-Behandlung und LiCl-Fällung	43
V.4.4	RNA-Isolierung aus <i>E. coli</i> mit dem „RNeasy-Mini-Kit“ (Qiagen)	44
V.4.5	Denaturierende Agarosegelelektrophorese von RNA-Lösungen	44
V.4.6	Northernblot	45
V.4.7	„Reverse transcription“-PCR (RT-PCR)	46
V.4.8	Semiquantitative RT-PCR	46
V.4.9	Unterscheidung von Transkriptmengen orthologer Gene durch RT-PCR und Restriktionsanalyse	47
V.5	Array-Techniken	47
V.5.1	Herstellung von DNA-Arrays	47
V.5.2	Hybridisierung von DNA-Arrays mit ³³ P-markierter Gesamt-DNA aus <i>E. coli</i>	47
V.5.3	Hybridisierung von DNA-Arrays mit ³³ P-markierter cDNA („expression profiling“)	49
V.5.4	Synthese eines externen RNA-Standards durch <i>in vitro</i> Transkription	49
V.5.5	Auswertung der DNA-Array-Hybridisierungen	49
V.6	Analyse von Reporterfusionen	50
V.6.1	Assay zur Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität (Miller, 1972)	50
V.6.2	Assay zur Bestimmung der Phasenvariationsfrequenz mit Hilfe eines Reportergens	51
V.6.3	Erzeugung der chromosomalen <i>agn43</i> -Transkriptionsfusionen	51
V.6.3.1	Deletion des <i>rfaH</i> Gens im Stamm <i>E. coli</i> 536 <i>lacZ</i>	51
V.6.3.2	Konstruktion der chromosomal integrierten Reporterfusionen <i>agn43</i> _{P_{AI III}} :: <i>lacZ</i> im Stamm 536 <i>lacZ</i> und 536 <i>lacZrfaH</i>	52
V.6.3.3	Konstruktion der chromosomal integrierten Reporterfusionen <i>agn43</i> _{P_{AI V}} :: <i>lacZ</i> im Stamm 536 <i>lacZ</i> und 536 <i>lacZrfaH</i>	53
V.6.3.4	Konstruktion der chromosomal integrierten Reporterfusionen <i>agn43</i> _{K-12} :: <i>lacZ</i> im Stamm MG1655 <i>lacZ</i> und MG1655 <i>lacZrfaH</i>	54
VI	Ergebnisse	55
VI.1	Genomanalysen von <i>E. coli</i> Isolaten durch DNA-Arrays	55
VI.1.1	Herstellung eines DNA-Arrays mit verschiedenen Virulenzfaktoren („Pathoarray“)	55
VI.1.2	Genomanalysen von verschiedenen <i>E. coli</i> Referenzstämmen mit dem „Pathoarray“	57
VI.1.2.1	Genomanalyse des uropathogenen Stammes 536 mit dem „Pathoarray“	57
VI.1.2.2	Genomanalyse der Deletionsmutante 536-21 mit dem „Pathoarray“	58
VI.1.2.3	Genomanalyse des intestinal pathogenen <i>E. coli</i> Isolates EDL 933 mit dem „Pathoarray“	59
VI.1.2.4	Genomanalyse des apathogenen Stammes MG1655 mit dem „Pathoarray“	60
VI.1.2.5	Vergleichende Genomanalysen der <i>E. coli</i> Stämme 536, EDL 933 und MG1655	61
VI.1.3	Genomanalysen von uropathogenen <i>E. coli</i> Isolaten mit dem MG1655-spezifischen DNA-Array	63
VI.1.3.1	Vergleichende Genomanalyse der uropathogenen Stämme <i>E. coli</i> 536, J96, J96-M1, 764 und 764-2 mit dem MG1655-spezifischen DNA-Array	63
VI.1.4	Zusammenfassung des Abschnitts „Genomanalysen“	66
VI.2	Untersuchungen zur Biofilmbildung	68
VI.2.1	Analyse der Biofilmbildung verschiedener <i>E. coli</i> Derivate	68
VI.2.2	Transkriptomanalysen mit Hinblick auf die Biofilmbildung von <i>rfaH</i> -Derivaten	69
VI.2.2.1	Optimierung des Protokolls für die Transkriptomanalyse	69
VI.2.2.2	Analyse des Einflusses von RfaH auf die Genexpression im Stamm <i>E. coli</i> 536 bei 37 °C in der logarithmischen Wachstumsphase	70
VI.2.2.3	Analyse des Einflusses von RfaH auf die Genexpression im Stamm <i>E. coli</i> 536 bei 30 °C in der logarithmischen Wachstumsphase	74
VI.2.2.4	Vergleich der Genexpression in der logarithmischen Wachstumsphase bei 37 °C und 30 °C	77
VI.2.2.5	Analyse des Einflusses von RfaH auf die Genexpression in Biofilmen von <i>E. coli</i> 536 und <i>E. coli</i> 536 <i>rfaH</i>	79

VI.2.2.6	Vergleich der Genexpression planktonischer Zellen mit Biofilm-Zellen	83
VI.2.3	Zusammenfassung des Abschnitts „Transkriptomanalysen“	87
VI.2.4	Untersuchungen zum Oberflächenprotein Antigen 43 und der <i>rfaH</i> -abhängigen Biofilmbildung	89
VI.2.4.1	Untersuchungen zum Einfluss von RfaH auf die Expression von Antigen 43	89
VI.2.4.2	Analyse der Kopienzahl von <i>agn43</i> Varianten im Stamm <i>E. coli</i> 536	90
VI.2.4.3	Unterscheidung der Transkriptmengen der <i>agn43</i> Varianten im Stamm <i>E. coli</i> 536	91
VI.2.4.4	Einfluss von Antigen 43 und weiterer Oberflächenfaktoren auf die Biofilmbildung	93
VI.2.4.5	Untersuchungen zur Expression und Regulation von <i>agn43</i> in Abhängigkeit von RfaH in <i>E. coli</i> 536 und MG1655	99
VI.2.4.6	Reporterfusionen der <i>agn43</i> Varianten in <i>E. coli</i> 536 und MG1655	100
VI.2.4.6.1	Deletion des <i>rfaH</i> Gens im Stamm <i>E. coli</i> 536 <i>lacZ</i>	101
VI.2.4.6.2	Konstruktion der chromosomal integrierten Reporterfusionen <i>agn43::lacZ</i> in sechs verschiedenen <i>E. coli</i> Stämmen	102
VI.2.4.7	Vergleich der Promotoraktivitäten der <i>agn43</i> Varianten unter Verwendung der chromosomalen <i>agn43::lacZ</i> -Transkriptionsfusionen	105
VI.2.4.7.1	Bestimmung der Promotoraktivität von <i>agn43</i> in M63-Minimalmedium bei 37 °C	105
VI.2.4.7.2	Bestimmung der Promotoraktivität von <i>agn43</i> in M63-Minimalmedium bei 42 °C	106
VI.2.4.7.3	Bestimmung der Promotoraktivität von <i>agn43</i> in M63-Minimalmedium bei 25 °C	107
VI.2.4.7.4	Bestimmung der Promotoraktivität von <i>agn43</i> in LB-Medium bei 37 °C	108
VI.2.4.8	Einfluss einer putativen Methyltransferase auf die Transkription beider <i>agn43</i> Varianten im Stamm 536	108
VI.2.4.9	Einfluss von RfaH auf die Phasenvariation beider <i>agn43</i> Varianten im Stamm 536	109
VI.2.5	Zusammenfassung des Abschnitts „Antigen 43 und Biofilmbildung“	110
VI.2.6	Untersuchungen zu weiteren RfaH-abhängig regulierten Faktoren	112
VI.2.6.1	Einfluss von RfaH auf die Expression von Yersiniabaktin	112
VI.2.6.2	Einfluss von RfaH auf die Expression von Curli-Fimbrien und extrazellulärer Matrix	112
VI.2.6.3	Einfluss von RfaH auf die Flagellen-Expression	113
VI.2.6.4	Bestimmung von potentiellen <i>ops</i> -Elementen im Genom von <i>E. coli</i> 536	114
VI.2.7	Zusammenfassung des Abschnitts „RfaH-abhängige Faktoren“	118
VII	Diskussion	119
VII.1	Einfluss von RfaH auf die Expression von <i>agn43</i>	119
VII.2	Einfluss von RfaH-abhängig exprimierten Oberflächenfaktoren auf die Biofilmbildung	122
VII.3	Transkriptomanalysen zur Bestimmung des RfaH-Regulons	127
VII.4	Transkriptomanalysen von <i>E. coli</i> Biofilmen	130
VII.4.1	Vergleich der Expressionsstudien von Biofilmen der Stämme <i>E. coli</i> 536 und MG1655	131
VII.4.2	Vergleich der Expressionsstudien von Biofilmen der Stämme <i>E. coli</i> 536 und TG1	132
VII.4.3	Analyse der in Biofilmen von <i>E. coli</i> 536 induzierten und reprimierten Gene	132
VII.5	Analyse des <i>E. coli</i> Genomgehaltes mit DNA-Arrays	134
VII.6	Ausblick und abschließende Bemerkungen	135
VIII	Literaturverzeichnis	138
IX	Anhang	152
	- Abkürzungsverzeichnis	152
	- Matrix des „Pathoarrays“	155
	- Oligonukleotide	160
	- Vergleich 536 und 536-21 (Genlisten)	161
	- Vergleich 536, EDL 933 und MG1655 (Genlisten)	164
	- Tagungsbeiträge	170
	- Publikationen	171
	- Lebenslauf	172

I Summary

Evolutionary adaptation is the driving force for the variability observed within genomes of all different *Escherichia coli* pathotypes. Beside the core genome, shared by all strains, also variable regions, which can be strain-specific, are scattered on the chromosome. These flexible regions mostly encode virulence factors as well as other fitness factors and are acquired through horizontal gene transfer but are also characterised by their instability.

To shed a closer light on the distribution of these virulence factors among different clinical isolates, DNA-arrays were used for genome comparisons. One aim of this Ph.D. thesis was the design of a DNA-array with specific probes for typical virulence-related genes of pathogenic *E. coli*.

With this tool in hand, the distribution of virulence genes among several *E. coli* isolates was analysed. In addition to virulence related genes, also differences in the core genome of well-known uropathogenic isolates of *E. coli* were detected using DNA-array technology. Furthermore, the core genome of different wildtype strains was compared with derivatives shown to have lost pathogenicity islands. The results confirmed the assumption that PAI deletion from core genome is a specific process and underlies a specific mechanism. The core genome itself was very conserved and the observed small differences related to genes derived from different bacteriophages. The majority of differences were detected for the flexible regions, which differ in a strain-specific manner.

DNA-array technology is also a versatile tool to gain insights in changes of gene expression levels caused by gene function disorders or environmental differences. The expression profiling approach using DNA-arrays was employed in the second part of this thesis. In this work, the RfaH-related regulon was studied by transcriptome analysis. Besides the already known effect of RfaH on facilitated capsule, LPS and α -haemolysin expression, the focus was set on genes involved in biofilm formation.

Comparison of the 536*rfaH* and the wildtype strain transcriptomes revealed a significant upregulation of *agn43* transcript levels. In order to study the underlying mechanisms of RfaH-dependent increased biofilm formation, selected mutants of *E. coli* K-12 and 536 were generated and tested for their biofilm forming capacities. In MG1655*rfaH* we could show that Agn43 is the major factor leading to biofilm formation. In addition, this phenotype was dependent on the LPS core truncation coming along within *rfaH* deficient strains. In conclusion, these results demonstrated that the LPS core truncation leads to unshielding of Agn43 in this strain, thus supporting autoaggregation and biofilm formation. Other surface structures like colanic acid had no influence on this effect.

In strain 536 biofilm formation was independent of *agn43*. Furthermore derivatives deficient in K15 capsule, colanic acid or O-antigen production of strain 536 did not exhibit an increase in biofilm formation, indicating that neither enhanced antigen 43 expression nor unshielding is leading to the biofilm phenotype observed for 536*rfaH*. Furthermore, a LPS core oligosaccharide truncation of strain 536 totally abolished biofilm formation, what was in strong contrast to the results obtained for

MG1655. The factor(s) forcing *E. coli* 536*rfaH* into strong biofilm development are still undisclosed. Taken together, *rfaH* mutants are superb biofilm formers *per se*, but the molecular reasons for the phenotype observed differ between the strains tested.

The enhanced transcription of *agn43* in *rfaH* mutants was investigated. Since RfaH as a transcriptional antiterminator in general promotes and not represses the transcription of genes, the increased levels of *agn43* mRNA should be the result of an indirect effect. Furthermore, no *ops* elements in the vicinity of *agn43* were found to be present in MG1655 or 536 strains. Therefore, the influence of RfaH on known regulatory elements of *agn43* transcription was studied. However, no changes in transcript levels of repressor *oxyR* and the derepressor *dam* methylase were detected by RT-PCR. In agreement with this observation, no significant disorder in the phase switch was detected, indicating that further factor(s) promote transcription of *agn43* in *rfaH*-deficient strains.

Besides the expression profiles of strains *E. coli* 536 and 536*rfaH* at 37 °C, also expression profiles at 30 °C and in biofilms were analysed. Typical differences in either stage were characterised. In general, when comparing the expression profiles from wildtype and mutant the changes observed were very small. However, the influence of temperature and also the mode of growth (planktonic cells vs. biofilm) affected the expression profiles in both strains more severely. With respect to temperature, genes from the core genome and also from pathogenicity islands showed altered expression. At 30 °C, expression of genes from the yersiniabactin island were induced compared to 37 °C. The reverse effect was seen for gene expression of salmochelin, indicating that these iron uptake systems may compensate each other at different temperatures. The expression of two other virulence factors was also temperature dependent. Genes from the α -haemolysin operon exhibited a higher expression at 37 °C and genes from the S-fimbrial operon were preferentially expressed at the lower temperature. The expression of α -haemolysin was generally favoured in the planktonic state compared to biofilms. Furthermore, expression of iron uptake systems was altered between biofilm and planktonic state. Genes from the *iro* gene cluster and *chuA* were preferentially expressed in planktonic state while genes of the yersiniabactin were induced in the biofilm, as well as genes from the type 1-, P- and curli-fimbrial operons. The expression of antigen 43, however, was lower in the biofilm compared to planktonic cells. Cells grown in biofilms showed also a shift from expression of genes of aerobic respiration to genes related to fermentation and anaerobic respiration.

In conclusion, *E. coli* strains not only differ in their genotypes, moreover complex phenotypic differences are observable. The obtained phenotypic differences in biofilm formation were shown to be multifactorial. The phenotype was attributed to variances in the composition of the outer membrane. In this context, the influence of LPS structures and adhesin expression was pointed out.

II Zusammenfassung

Das Kerngenom pathogener *Escherichia coli* Isolate wird von zahlreichen variablen Regionen unterbrochen, die meist durch horizontalen Gentransfer erworben wurden und über das ganze Chromosom verteilt sind. Diese variablen Bereiche tragen häufig Gene für Virulenz- und Fitnessfaktoren und sind oftmals nur instabil in das Chromosom integriert.

Um die Verbreitung variabler Bereiche, die insbesondere Virulenzfaktoren kodieren, innerhalb verschiedener klinischer Isolate näher untersuchen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein spezieller DNA-Array entwickelt. Dieser enthielt zahlreiche Sonden für Gene, die für die Virulenz von verschiedenen Erregern der Gattung *E. coli* als auch der Untergruppe *Shigella* charakteristisch sind. Mit diesem „Pathoarray“ wurde die Verbreitung von Virulenzgenen in unterschiedlichen *E. coli* Isolaten untersucht. Zusätzlich wurden Unterschiede im Kerngenom mit Hilfe eines kommerziell erwerbbaaren DNA-Arrays bestimmt. Ein Vergleich des Kerngenoms von uropathogenen Stämmen mit Derivaten, bei denen Pathogenitätsinseln deletiert sind, bestätigte die Auffassung, dass der Deletion von Pathogenitätsinseln ein spezieller Mechanismus zu Grunde liegt, von dem das Kerngenom nicht betroffen ist. Das Kerngenom der untersuchten Stämme war prinzipiell sehr konserviert und unterschied sich lediglich durch wenige Gene aus Bakteriophagen. Die größten Unterschiede wurden bei Genen beobachtet, die zum variablen Teil des Genoms gehören und charakteristisch für das jeweilige Isolat waren.

Mit Hilfe der DNA-Array Technologie lassen sich auch Änderungen von Expressionsprofilen studieren, die von Mutationen oder durch Umwelteinflüsse bedingt werden. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde durch Transkriptomanalysen das RfaH-abhängige Regulon untersucht, insbesondere im Hinblick auf solche Gene, die die Biofilmbildung beeinflussen.

Beim Vergleich der Transkriptome von *E. coli* 536*rfaH* mit dem Wildtyp wurde eine signifikant erhöhte Expression von Antigen 43 festgestellt. Im *E. coli* K-12 Stammhintergrund konnte dieses Oberflächenprotein als Hauptfaktor für die RfaH-abhängige Biofilmbildung identifiziert werden. Das verkürzte LPS-Kernoligosaccharid im Stamm MG1655*rfaH* hatte ebenfalls einen großen Einfluss auf die verstärkte Biofilmbildung. Vermutlich verstärkte die verbesserte Präsentation von Agn43 durch ein verkürztes LPS die Biofilmbildung signifikant. Andere Oberflächenstrukturen, wie die Colansäure-Kapsel, zeigten keinen Effekt auf die Biofilmbildung von *E. coli* MG1655*rfaH*.

Hingegen war im Stamm *E. coli* 536*rfaH* die Biofilmbildung unabhängig von Agn43 Expression. Auch andere Oberflächenfaktoren, die RfaH-abhängig exprimiert werden, wie die K15 Kapsel, die Colansäure-Kapsel, das LPS-Kernoligosaccharid und das LPS O-Antigen, trugen nicht zu einem verbesserten Biofilm-Phänotyp bei. Ein stark verkürztes LPS-Kernoligosaccharid verminderte im Stamm *E. coli* 536 sogar die Biofilmbildung. Außer der Erkenntnis, dass die starke Biofilmbildung weder durch die erhöhte Expression von Antigen 43 noch eine verbesserte Präsentation dieses Oberflächenmoleküls bedingt wurde, konnten für *E. coli* 536 die molekularen Ursachen dieses

Phänotyps noch nicht aufgeklärt werden. Schlussfolgernd aus diesen Beobachtungen wird die Biofilmbildung von *E. coli* prinzipiell durch eine *rfaH*-Mutation begünstigt; jedoch unterscheiden sich die molekularen Ursachen dieses Phänotyps bei den hier untersuchten Stämmen.

Die erhöhte Expression von Antigen 43 in *rfaH*-defizienten Stämmen sollte durch einen indirekten Effekt bedingt sein, da RfaH als Transkriptionsantiterminator die Transkription von *agn43* nicht vermindern, sondern vielmehr verbessern müsste. Zudem konnten keine *ops*-Elemente stromaufwärts der kodierenden Bereiche von *agn43* in den Stämmen MG1655 und 536 identifiziert werden. Deshalb wurde der Einfluss von RfaH auf die Regulatoren von *agn43* näher untersucht. Durch RT-PCR konnten jedoch keine veränderten Transkriptmengen von *oxyR* (Repressor) und der *dam*-kodierte Methylase (Derepressor) nachgewiesen werden. Im Einklang mit diesem Resultat konnte ebenfalls keine Beeinflussung der Phasenvariationsfrequenz von *agn43* durch RfaH festgestellt werden.

Neben den Expressionsprofilen der Stämme 536 und *536rfaH* bei 37 °C wurden auch die Expressionsprofile bei 30 °C sowie von Biofilmen analysiert. Prinzipiell konnten bei allen untersuchten Wachstumsbedingungen nur geringe Unterschiede zwischen 536 und *536rfaH* festgestellt werden. Beim Vergleich der unterschiedlichen Wachstumsbedingungen (Temperatureffekt und planktonische Zellen vs. Biofilm) wurden jedoch deutliche Unterschiede beobachtet. Sowohl Gene des Kerngenoms als auch Gene von Pathogenitätsinseln waren temperaturabhängig reguliert. Bei 37 °C wurden Gene des Yersiniabaktin-Operons stärker transkribiert als bei 30 °C. Im Gegensatz dazu war die Expression von Genen des *iro*-Genclusters bei 30 °C stärker als bei 37 °C. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Eisenaufnahme durch eine koordinierte temperaturabhängige Expression von verschiedenen Eisenaufnahmesystemen gesteuert werden kann. Die Expression von zwei weiteren Virulenzfaktoren war ebenfalls temperaturabhängig: Gene des α -Hämolyisin-Operons wurden bei 37 °C stärker exprimiert und Gene der S-Fimbrien-Determinante waren bei 30 °C induziert. Die Transkription von α -Hämolyisin war prinzipiell in planktonischen Zellen höher als in Biofilmen. Bei diesem Vergleich ergaben sich auch Unterschiede in der Expression von Eisenaufnahmesystemen. Gene des Yersiniabaktin-Operons waren in Biofilmen induziert; hingegen wurden die Gene des Salmochelin-Genclusters (*iro*) und des Hämin-Rezeptors *chuA* verstärkt in planktonischen Zellen exprimiert. Außerdem war eine verstärkte Expression von Typ 1-, P- und Curli-Fimbrien in Biofilmen beobachtbar. Die Expression von Antigen 43 erwies sich im Biofilm jedoch geringer als in planktonischen Zellen. Im Biofilm konnte des Weiteren noch eine erhöhte Expression von Genen für Gärung bzw. anaerobe Atmung festgestellt werden.

Bei *E. coli* Isolaten lassen sich neben genomischen Unterschieden auch phänotypische Unterschiede beobachten. Es wurde festgestellt, dass die Biofilmbildung von *E. coli* Isolaten abhängig von verschiedenen Faktoren und molekularen Mechanismen ist. Zudem konnte dargelegt werden, wie Unterschiede in der Zusammensetzung der äußeren Membran durch eine veränderte LPS-Struktur und die Expression von Adhäsinen die Biofilmbildung beeinflussen können.

III Einleitung

III.1 Genomweite Untersuchungen zellulärer Netzwerke von Mikroorganismen

Mikrobielle Erreger sind durch zahlreiche Virulenzfaktoren befähigt, sich erfolgreich im Wirt zu etablieren und in speziellen ökologischen Nischen zu persistieren. Durch ihre enorme Variabilität nimmt bei der Erforschung von Infektionsprozessen deshalb die Analyse der Gene und Genprodukte eine wesentliche und zentrale Rolle ein.

Die Verhaltensweisen von Mikroorganismen werden durch eine Vielzahl von Prozessen, die in ihren Zellen stattfinden, reguliert. Der Zustand einer Zelle lässt sich durch die Summe aller vorhandenen Moleküle einschließlich ihrer Wechselwirkungen beschreiben und ist demnach sehr komplexer Natur. In der klassischen Molekularbiologie beschränkte man sich deshalb auf einzelne Aspekte, um Veränderungen in den Zellen zu analysieren und die zu Grunde liegenden Prozesse zu verstehen. Um eine globale Sicht auf die dynamischen Änderungen der Zellzustände zu bekommen, wurden neue Methoden entwickelt, die oftmals in Hochdurchsatzverfahren mehrere Faktoren zu einem Zeitpunkt betrachten und eine komplexere Analyse ermöglichen. Die Sequenzierung des ersten kompletten mikrobiellen Genoms von *Haemophilus influenzae* war diesbezüglich ein wichtiger Meilenstein (Fleischmann *et al.*, 1995). Heutzutage ist man in der Lage, dieses automatisiert in viel kürzerer Zeit durchzuführen (Margulies *et al.*, 2005). Mehr als zweihundert Genome sind inzwischen sequenziert, annotiert und in Datenbanken verfügbar. Die Untersuchung und der Vergleich von verschiedenen Genomsequenzen wird als „Genomics“ bezeichnet.

Für die globale, funktionelle Analyse der Gene und Genprodukte wurden verschiedene Methoden („-omics“) entwickelt, um zelluläre Netzwerke genauer zu charakterisieren. Die Daten aus diesen komplexen Analysen werden in der Systembiologie zusammengeführt. Das Ziel der Systembiologie ist, durch die Bestimmung und den Vergleich von Zellzuständen, zelluläre Prozesse und Mechanismen in ihrer Gesamtheit mit Hilfe bioinformatischer Prozesse aufzuklären und zu verstehen. Die hier erwähnten Hochdurchsatzmethoden spielen dabei eine wichtige Rolle und können natürlich auch bei der Analyse von Infektionsprozessen angewendet werden.

Das „yeast two hybrid“-System analysiert Protein-Protein-Wechselwirkungen. Bei *Saccharomyces cerevisiae* wurde die globale Analyse dieser Wechselwirkungen durchgeführt und gab Hinweise auf das Vorliegen von möglichen Proteinkomplexen (Ito *et al.*, 2001; Uetz *et al.*, 2000). Mit Hilfe von „phage display“-Bibliotheken wurden ebenfalls alle auftretenden Protein-Protein-Wechselwirkungen von *S. cerevisiae* bestimmt und mit den Daten, die sich aus dem „yeast two hybrid“-Ansatz ergaben, verglichen (Bader und Hogue, 2002; Tong *et al.*, 2002). Beide Methoden gehören zu den „Interactomics“ und sind sehr aufwendig in ihrer Anwendung. Noch aufwendiger ist die globale Analyse von Stoffwechselprodukten, Zuckern und Lipiden. Bei diesem als „Metabolomics“

bezeichneten Gebiet werden die in der Zelle vorhandenen Biomoleküle hauptsächlich durch chromatographische Aufreinigungen separiert und anschließend im Massenspektrometer detektiert. Die komplette Bestimmung aller zellulären Proteine und ihrer Modifikationen wird „Proteomics“ genannt. Die Analyse des Proteoms ist die älteste der bislang entwickelten globalen Methoden. Hier werden zelluläre Proteine zunächst durch Gelelektrophorese zweidimensional aufgetrennt und anschließend aus der Gelmatrix isoliert (Gorg *et al.*, 2000). Die Proteine werden dann fragmentiert und die entstehenden Teilpeptide können durch Massenspektrometrie bestimmt werden (Hecker und Engelmann, 2000; Humphery-Smith *et al.*, 1997). Diese Technologie ist nicht ganz so komplex und lässt sich auch auf einzelne Kompartimente der Zellen anwenden.

Die Synthese von Proteinen kann auch indirekt, durch die bei der Genexpression synthetisierten mRNA-Moleküle, erforscht werden. Hierfür wurde die DNA-Chip Technologie entwickelt, die sehr schnell große Aufmerksamkeit erlangte (Schena *et al.*, 1995). Mit dieser sehr flexiblen, einfach handhabbaren Methode können Nukleinsäuren (-fragmente) von Genomen („Genomics“), als auch Transkriptpopulationen („Transcriptomics“) identifiziert werden; mit zum Teil so großer Genauigkeit, dass auch „single nucleotide polymorphisms“ nachweisbar sind. Hauptsächlich werden DNA-Chips jedoch benutzt, um die Mengen von verschiedenen mRNA-Molekülen zu untersuchen.

Das Grundprinzip basiert auf einer Methode von E. Southern. Hier wurde ein Nukleinsäurefragment eines Gemisches, fixiert auf einer Membran, durch Hybridbildung mit einem markierten, komplementären Strang (Sonde) nachgewiesen (Southern, 1975). DNA-Chips funktionieren ähnlich: hier werden meist tausende Sonden in geordneter Folge („arraying“) auf einer Membran fixiert und mit einem Pool markierter Nukleinsäuren hybridisiert (inverser Southernblot).

Ein DNA-Array ist die kompakte Anordnung eines komplexen Sondenpools auf einem Trägermaterial und ermöglicht somit die Expressionsmuster tausender Gene gleichzeitig studieren. Je nach Trägermaterial werden Makroarrays (Nylonmembran) von Mikroarrays (Glas, Plastik) unterschieden. Handelt es sich bei den Sonden um längere, doppelsträngige Fragmente (rekombinante Plasmide, PCR-Produkte) spricht man von DNA-Arrays und bei kürzeren einzelsträngigen Fragmenten von Oligonukleotidarrays. Letztere ermöglichen genauere, stringenter Hybridisierungen, was von Vorteil ist, wenn sehr ähnliche Nukleinsäurefragmente unterschieden werden sollen. Bei der „dual channel“-Technik werden zwei unterschiedlich markierte „Pools“ gleichzeitig mit einem Chip hybridisiert und bei der „one channel“-Technik entsprechend nur ein markierter Pool pro Chip. Die Chip-Herstellung erfolgt entweder photolithografisch oder durch Robotersysteme, die mittels feiner Nadelsysteme die DNA-Sonden auf die vorpräparierte Oberfläche auftragen („spotting“).

DNA-Chips lassen sich flexibel an die jeweilige Fragestellung anpassen: es können sowohl komplette Genome analysiert oder nur bestimmte Teilbereiche (Stoffwechselfgene, Virulenzfaktoren, Signalmoleküle, kodierende Bereiche, nicht-kodierende Bereiche etc.) betrachtet werden.

Das Transkriptom nicht-kodierender Bereiche von *Escherichia coli* wurde untersucht (Tjaden *et al.*, 2002). Auch regulatorische RNA-Moleküle, welche in letzter Zeit größere Aufmerksamkeit erlangten, lassen sich durch DNA-Chips identifizieren (Wassarman *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003).

Im Gegensatz zu Proteomanalysen durch 2D-Gelelektrophorese können Transkriptomanalysen mit Hilfe von DNA-Arrays auch von unbekanntem, nicht-sequenzierten Genomen durchgeführt werden. Hier wird das fragmentierte Genom in Vektoren kloniert, eine DNA-Bibliothek angelegt und von dieser ein DNA-Array hergestellt, das das komplette Genom statistisch abdeckt (Ramarathnam und Subramaniam, 2000). Nach der Transkriptomanalyse müssen dann nur die Klone der Spots sequenziert werden, die unterschiedlich reguliert sind. DNA-Chips sind somit ein modernes, flexibel und universell einsetzbares Werkzeug in der Molekularbiologie.

III.2 *Escherichia coli* als virulenter Erreger und das Konzept der Pathogenitätsinseln (PAIs)

Escherichia coli -im Jahr 1885 von Theodor Escherich erstmals beschrieben- ist ein Gram-negatives, fakultativ anaerobes Stäbchen, das sich phylogenetisch in die Gruppe der *Enterobacteriaceae* eingliedern lässt. Nähere Verwandte sind die oftmals pathogenen Bakterien der Gattungen *Shigella* (Untergruppe von *E. coli*), *Salmonella*, *Yersinia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* und *Citrobacter*. Im menschlichen Körper besiedelt *E. coli* (in der Regel als harmloses Bakterium) den Darm und ist dort ein wichtiger Bestandteil der natürlichen Darmflora (Robins-Browne und Hartland, 2002).

Prinzipiell lässt sich die Besiedlung eines Wirtes in drei Modelle fassen: Symbiose, Kommensalismus und Pathogenität bzw. Parasitismus. Je nach Charakter der Wechselbeziehung zwischen Mikrobe und Wirt kam es im Laufe der Evolution zur Anpassung der Mikroorganismen an die zu besiedelnden ökologischen Nischen und zu einer Lebensform, die auf eins der drei Modelle spezialisiert ist (Gross *et al.*, 2003).

Klinische Untersuchungen identifizierten das Vorkommen pathogener Varianten von *E. coli*, die spezifische Symptome hervorrufen und im Patienten für verschiedene Krankheitsbilder verantwortlich gemacht werden (Kaper *et al.*, 2004; MacFie *et al.*, 1999).

Humanpathogene Stämme lassen sich in verschiedene Pathotypen einteilen. Zu den intestinalen pathogenen Erregern, die Infektionen im Darmtrakt verursachen, gehören enterohämorrhagische (EHEC), enteropathogene (EPEC), enteroaggregative (EAEC), enterotoxische (ETEC) sowie enteroinvasive *E. coli* (EIEC) (Nataro und Kaper, 1998).

Uropathogene *E. coli* (UPEC), welche Erkrankungen der Harnwege -wie Cystitis oder Pyelonephritis- hervorrufen können, Sepsis auslösende *E. coli* (SEPEC) und Meningitis assoziierte *E. coli* (MENECC) werden als extraintestinal pathogene *E. coli* zusammengefasst (Redford und Welch, 2002).

Diagnostisch gruppiert man *E. coli* in verschiedene Serotypen, für die bestimmte Oberflächenmoleküle charakteristisch sind: LPS (O)-, Kapsel (K)- und Flagellen (H)-Antigene (Orskov *et al.*, 1977). Die verschiedenen Serotypen zeigen häufig unterschiedliche klinische Symptome im Patienten (Orskov und Orskov, 1992). O-, K- und H-Antigene sind jedoch nicht die Ursache der beobachtbaren klinischen Symptome, allerdings sind diese spezifisch für die jeweiligen klonalen Gruppen dieser pathogenen Erreger (Zingler *et al.*, 1992).

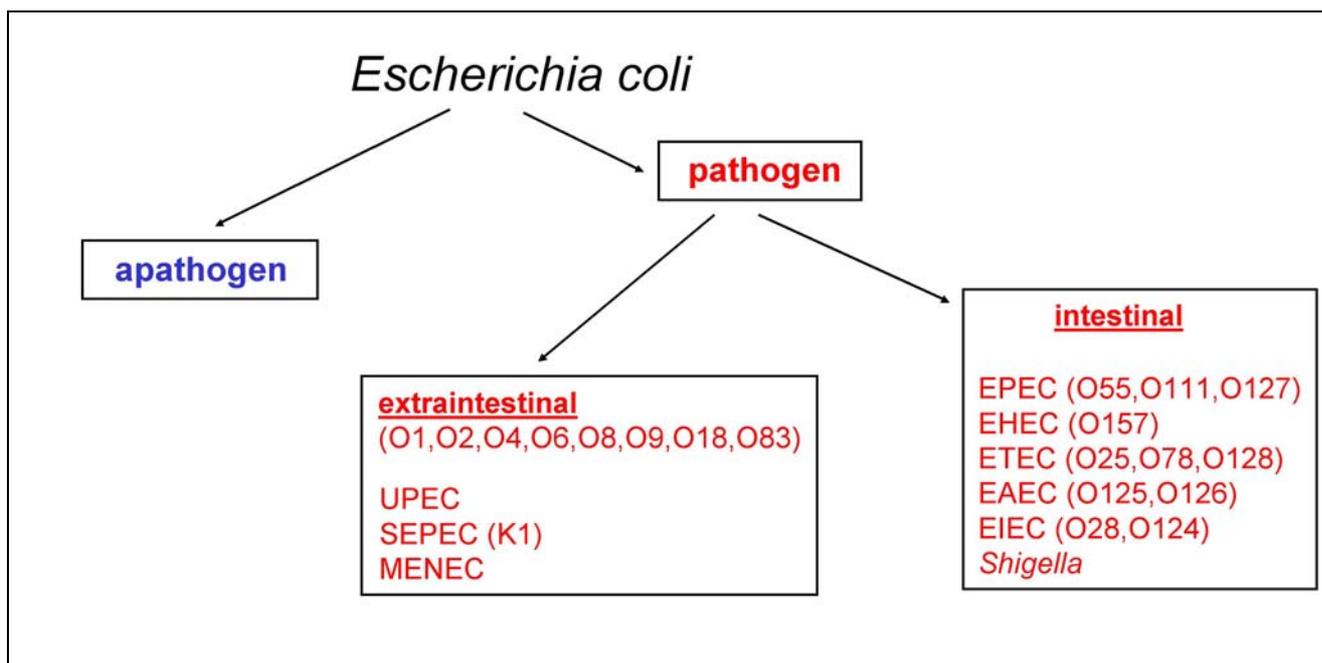


Abb. III.1: Klassifizierung von *E. coli* Isolaten und ihre wichtigsten Serotypen. Die wichtigsten Serotypen von pathogenen *E. coli* Isolaten wurden aus (Blanco *et al.*, 1994; Campos *et al.*, 2004; Evans und Evans, 1983; Levine, 1987; Nataro und Kaper, 1998; Orskov und Orskov, 1992) entnommen.

Für die Virulenz und das Auftreten verschiedener klinischer Symptome ist das Vorhandensein (sowie die Regulation und Expression) von Virulenz- und Fitnessfaktoren verantwortlich (Zingler *et al.*, 1993). Diese Faktoren sind meistens auf mobilen genetischen Elementen kodiert, die sich vom konservierten Kerngenom im G+C-Gehalt und, genauer betrachtet, auch in der Verwendung von Kodons unterscheiden (Hacker und Kaper, 2000). Diese genetischen Elemente wurden oftmals durch horizontalen Gentransfer erworben (Hochhut *et al.*, 2005).

Neben Phagen, Transposons, Integrons und Plasmiden gehören vor allem Pathogenitätsinseln (PAIs), als auch Genom- und Fitnessinseln (GEIs) zum flexiblen (mobilen) Genpool der Erreger (Hacker *et al.*, 2003; Hacker *et al.*, 2004). Das ursprüngliche Konzept der Pathogenitätsinseln wurde deshalb um den allgemeineren Terminus „Genomische Inseln“, die auch zum flexiblen Genpool gehören, aber keine Virulenzgene besitzen, erweitert (Hacker und Carniel, 2001). PAIs sind somit eine spezielle, wichtige Untergruppe von Genomischen Inseln (Dobrindt *et al.*, 2004; Hentschel und Hacker, 2001).

Im UPEC Stamm 536 wurde zum ersten Mal das Prinzip der Pathogenitätsinseln beschrieben (Blum *et al.*, 1994). Dieses Modell konnte daraufhin systematisch auf andere Erregertypen übertragen werden. PAIs sind in diversen Gram-negativen als auch Gram-positiven Erregern beschrieben worden (Dobrindt, *et al.*, 2004; Hochhut, *et al.*, 2005). Einige PAIs lassen sich spezifisch bestimmten Pathotypen zuordnen, andere hingegen haben ein weiter verteiltes Erregerspektrum, was das Auftreten ähnlicher, klinischer Symptome erklären lässt. So konnte die LEE-PAI bislang nur bei EPEC und EHEC Stämmen nachgewiesen werden (Elliott *et al.*, 2000; Sperandio *et al.*, 1998). Andere PAIs und

Virulenzgencluster werden jedoch sowohl bei intestinal als auch extraintestinal pathogenen *E. coli* beobachtet (Carniel, 1999; Carniel, 2001; Schubert *et al.*, 2004; Schubert *et al.*, 1998).

III.3 Virulenzfaktoren pathogener *E. coli*

Um Infektionen etablieren zu können, werden von den Erregern verschiedene Virulenzfaktoren synthetisiert und sezerniert. Im Allgemeinen werden Virulenzfaktoren als Genprodukte definiert, die für die Etablierung einer Infektion notwendig sind und auch die klinischen Symptome verursachen.

Virulenz- und Fitnessfaktoren ermöglichen den Bakterien eine verbesserte Persistenz unter sich ändernden Umwelteinflüssen in unterschiedlichen ökologischen Nischen. Beispielsweise erfordert die Besiedlung eines Wirts spezielle Faktoren, um sich gegen die wirtseigenen Immunabwehrmechanismen durchzusetzen und sich an die Limitation verschiedener, essentieller Ressourcen in dieser ökologischen Nische anzupassen. Insofern ermöglichen diese Faktoren einen Selektionsvorteil unter einschränkenden Umweltbedingungen innerhalb einer Bakterienpopulation. Im Folgenden sollen die wichtigsten Virulenzfaktoren pathogener *E. coli* kurz benannt werden.

Adhäsine:

Durch die Expression von Haftfaktoren (Adhäsinen) vermeiden Mikroorganismen, über einfache Wirtsabwehrmechanismen wie Harnfluss oder Schleimsekretion eliminiert zu werden (Klemm, 1982). Adhäsine sind häufig spezifisch für verschiedene *E. coli* Pathotypen und können für die Fähigkeit zur Besiedlung bestimmter Wirtsgewebe entscheidend sein (De Graaf und Mooi, 1986; Klemm, 1985).

Man unterscheidet Fimbrien-Adhäsine von Nichtfimbrien-Adhäsinen. Fimbrien-Adhäsine sind im Gegensatz zu den Nichtfimbrien-Adhäsinen dadurch gekennzeichnet, dass sich das Adhäsin auf der Spitze einer Schaft-ähnlichen Organelle (Fimbrie) befindet und nicht direkt auf der Zelloberfläche lokalisiert ist. Unterschieden werden Fimbrien anhand ihrer Rezeptorspezifitäten (Klemm und Schembri, 2000).

Eisenaufnahmesysteme:

Eisen ist ein essentieller Kofaktor, der enzymatische Reaktionen katalysiert, die bei zahlreichen Stoffwechselwegen eine wichtige Rolle spielen (Schaible und Kaufmann, 2005). Um Infektionen zu verhindern, reduziert der Wirtsorganismus das Vorkommen an verfügbarem Eisen. Im Wirt ist Eisen an verschiedene Proteine (u.a. Häm, Hämoproteine, Transferrin, Ferritin, Laktoferrin) komplex gebunden (Braun und Braun, 2002). Bakterien benötigen ungefähr die billionenfache Menge an Eisen als die, die im Körper frei verfügbar ist (Schaible und Kaufmann, 2004).

Deshalb exprimieren Mikroorganismen bestimmte Siderophore und Rezeptoren, die Eisen aus verschiedenen Quellen verfügbar machen können (Braun, 2003). Einige dieser genetischen Determinanten zur Eisenaufnahme sind hauptsächlich bei virulenten Erregern zu finden und sind ein weiterer Hinweis für Anpassung von Mikroben an spezielle ökologische Nischen.

Toxine und Proteasen:

Um sich die intrazellulären Eisen- und andere Nährstoffquellen eukaryotischer Zellen verfügbar machen zu können, werden außerdem verschiedene Hämo- und Cytolysine von pathogenen *E. coli* exprimiert (Litwin und Calderwood, 1993). Von Bedeutung für bestimmte Pathomechanismen sind des Weiteren noch verschiedene Proteasen und Effektormoleküle, die von einigen pathogenen *E. coli* sezerniert werden können, Zellfunktionen von Wirtszellen beeinflussen und diverse Symptome hervorrufen (Kaper, *et al.*, 2004).

Serumresistenz:

Auch die Serumresistenz ist ein wesentlicher Virulenzfaktor pathogener (insbesondere extraintestinal pathogener) *E. coli*, bei dem die angeborene, unspezifische Immunabwehr des Wirts durch verschiedene Oberflächenstrukturen der Bakterien, die eine Resistenz gegen den klassischen oder alternativen Aktivierungsweg des Komplementsystems vermitteln, unterlaufen wird.

O-Antigene als Teil des Lipopolysaccharids (LPS) können Resistenz gegen die alternative Aktivierung des Komplements vermitteln (Burns und Hull, 1999). Bei *E. coli* sind 173 verschiedene O-Antigene bekannt (Orskov und Orskov, 1992). Insbesondere lange O-Antigenketten werden mit erhöhter Virulenz, einem glatten Phänotyp und Serumresistenz in Verbindung gebracht (Burns und Hull, 1998).

Die Serumresistenz ist ein multifaktorielles Phänomen, bei der auch Proteasen involviert sein können, die eine Opsonisierung verhindern. So wird von *Shigella* z.B. die IgA-Protease SigA exprimiert und bei EHEC kann durch die Protease StcE das Komplementprotein C1 degradiert werden (Al-Hasani *et al.*, 2000; Lathem *et al.*, 2004; Lathem *et al.*, 2002).

Auch Kapseln können Oberflächenstrukturen maskieren, so dass bestimmte Epitope der bakteriellen Zelle für die Bindung von Komplementproteinen nicht (mehr) verfügbar sind. Die alternative Aktivierung des Komplements wird dadurch unterbunden und Wirtsabwehrmechanismen, wie die Aktivierung immunkompetenter Zellen, Phagozytose und Zellyse, werden verhindert (Burns und Hull, 1999).

Mikrobielle Erreger können demnach zahlreiche unterschiedliche Virulenzfaktoren kodieren, die sie befähigen sich erfolgreich im Wirt zu etablieren und dort in speziellen Nischen zu persistieren. Durch die enorme Variabilität sollte bei der Erforschung von Infektionsprozessen deshalb die Analyse der vorhandenen Virulenzfaktoren, ihr Expressionsprofil als auch ihre Regulation von wesentlicher und zentraler Bedeutung sein. Die in den letzten Jahren entwickelte DNA-Array Technologie bietet hierfür eine wichtige Plattform zur globalen Analyse dieser Gene.

III.4 Genregulation von Pathogenitäts-Determinanten

Für die Ausbildung von Infektionen ist nicht nur das Vorhandensein von Pathogenitätsfaktoren essentiell, sondern auch ihre Regulation durch verschiedene Mechanismen von entscheidender Bedeutung.

Bei Mikroorganismen werden Gencluster in der Regel polycistronisch exprimiert. Die differenzielle Expression der Gene wird prinzipiell von Sigmafaktoren gesteuert. Die Aktivität der Promotoren wird außerdem durch verschiedene Aktivator- und Repressormoleküle, die an spezifische DNA-Sequenzen binden, beeinflusst. Ein Repressor blockiert in der Regel den Zugang der RNA-Polymerase zum Promotor und Aktivatoren unterstützen eine Bindung der RNA-Polymerase (Muller-Hill, 1998). Klassische Beispiele sind der Repressor LacI und der Aktivatorkomplex CRP/cAMP, welche die Transkription von *lacZYA* regulieren (Reznikoff, 1992; Valentin-Hansen *et al.*, 1996). Im Falle von Virulenzfaktoren wird eine auf den Infektionsprozess fein abgestimmte, nicht konstitutive Genregulation benötigt, die oft an bestimmte Umweltsignale gekoppelt ist. Verschiedene Umweltsignale wie pH, Osmolarität, Temperatur, die Konzentration an frei verfügbarem Eisen, Sauerstoff und Nitroxiden sind u. a. abhängig von bestimmten Nischen im Wirt und haben deshalb einen großen Einfluss auf die Virulenz-Genregulation. Durch Umweltstimuli während des Infektionsprozesses wird z.B. von H-NS die Expression bestimmter Gene reguliert (White-Ziegler *et al.*, 2000). H-NS ist ein Repressor für viele Adhäsine, wie P-, S-, Typ 1- und Curli-Fimbrien, der zudem auch die α -Hämolyisin Produktion beeinflusst (Madrid *et al.*, 2002; Nieto *et al.*, 2000; White-Ziegler, *et al.*, 2000). Durch Umweltstimuli wird eine durch H-NS verursachte Blockade der Expression dieser Pathogenitätsfaktoren während des Infektionsprozesses aufgehoben. Im Falle von Eisen spielt der Fur-Repressor eine wichtige Rolle. Bei den *Enterobacteriaceae* wird die Transkription verschiedener Eisenaufnahmesysteme von diesem Repressorprotein reguliert. Fur ist ein DNA-bindendes Protein, das Eisen komplexiert und die Regulation von Eisenaufnahmesystemen und die Expression von Toxinen wie α -Hämolyisin und Shiga-Toxin beeinflusst (Litwin und Calderwood, 1993).

Mit Hilfe von Zwei-Komponenten-Systemen nehmen Bakterien bestimmte extrazelluläre Reize wahr. Dabei empfängt ein äußeres Membranprotein den Reiz, überträgt ein Signal an das „response“-Element, was zur Aktivierung oder Repression von bestimmten Operons führt.

„Quorum sensing“-Systeme ermöglichen Mikroorganismen interzelluläre Kommunikation (Zhang und Dong, 2004). Über Autoinduktoren („autoinducer“) wird dabei die Populationsdichte kommuniziert (Sperandio *et al.*, 2003). Sind bestimmte Populationsdichten erreicht, kommt es zu konzertierten Aktionen, bei denen sich viele einzelne Zellen wie ein größerer Makroorganismus verhalten können (Shapiro, 1998). „Quorum sensing“ ist ein Phänomen, das nicht nur Einfluss auf die eigene Spezies nimmt, sondern auch andere Mikroorganismen der Populationsgemeinschaft beeinflusst (Dong und Zhang, 2005; Raffa *et al.*, 2005). Bei Gram-negativen Bakterien können beispielsweise Biolumineszenz, Konjugation und die Expression bestimmter Virulenzfaktoren von den

Transkriptionsregulatoren der LuxR-Familie über die Zelldichte reguliert sein (Ahmer, 2004). Durch „quorum sensing“ wird z.B. bei EPEC und EHEC die Expression der LEE-PAI reguliert (Sperandio *et al.*, 2002; Sperandio *et al.*, 1999).

Zusätzliche Bedeutung für die Regulation der Genexpression hat auch die Transkriptionselongation (von Hippel, 1998). Hier werden Terminatorstrukturen mit Hilfe von Elongationsfaktoren (λ NQ-Protein, NusG, RfaH) von der RNA-Polymerase „überlesen“ (Roberts, 1993; Roberts *et al.*, 1998). Im Falle von RfaH hat dies zur Folge, dass viele extrazelluläre Moleküle und Komponenten der äußeren Membran in größeren Mengen sezerniert und exprimiert werden, deren Rolle als Pathogenitätsfaktor klar belegt ist. Kapsel und LPS sowie α -Hämolyysin und der Hämin-Rezeptor sind bekannte Beispiele dafür (Bailey *et al.*, 1997; Nagy *et al.*, 2001).

Ein weiterer wichtiger Regulationsmechanismus, der stochastisch erfolgen kann, ist die Phasenvariation (van der Woude und Baumler, 2004). Im Falle von Typ 1-Fimbrien steuern zwei ortsspezifische Rekombinasen die Transkription der Strukturgene der *fim*-Determinante durch die Inversion eines DNA-Fragments, auf dem der Promotor kodiert ist. FimB schaltet den Promotor in „ON“-Position und FimE bringt diesen in die „OFF“-Position („Flip-Flop“-Typ) (Klemm und Schembri, 2000). Die „switch“-Frequenz unterliegt verschiedenen Umwelteinflüssen. Zusätzlich beeinflussen DNA-„supercoiling“ und die Regulatorproteine H-NS und IHF die Expression der *fim*-Determinante (Olsen und Klemm, 1994; Schembri *et al.*, 1998). Das An-/ Abschalten von Virulenzfaktoren durch Phasenvariation wurde auch bei anderen Adhäsinen beobachtet. Bei P-Fimbrien und S-Fimbrien wird der „ON“-/„OFF“-„switch“ durch DNA-Methylierungsstellen gesteuert (van der Woude *et al.*, 1996). Die Transkription der P-/ S-Fimbrien-Operons hängt davon ab, welche GATC-Stellen im Promotorbereich methyliert sind, so dass der Repressor binden oder nicht binden kann (van der Woude *et al.*, 1992).

Zudem haben verschiedene andere Faktoren Einfluss auf die Genexpression. So haben neben der Verwendung von Kodons, der Ausbildung von Sekundärstrukturen der mRNA, der mRNA-Stabilität, auch antisense-RNAs und andere srRNA-Moleküle Einfluss auf die Protein-Biosynthese (Gottesman, 2004; Gottesman, 2005; Majdalani *et al.*, 2005; Weilbacher *et al.*, 2003).

Selbst Deletionen können einen positiven Einfluss auf die virulenten Eigenschaften von Erregern haben. So sind bei EIEC und *Shigella* größere chromosomale Deletionen („black holes“) beschrieben, die bewirken, dass die toxische Wirkung der Enterotoxine nicht mehr durch eine Lysin-Decarboxylase erniedrigt ist (Maurelli *et al.*, 1998).

III.5 Kurzbeschreibung des *E. coli* Stammes 536

Für die Charakterisierung und molekulargenetische Analyse von Pathogenitätsinseln ist *E. coli* 536 (O6:K15:H31) einer der bekanntesten Modellorganismen. Dieser Stamm wurde 1980 aus einem Patienten mit einer akuten Entzündung des Nierenbeckens (Pyelonephritis) isoliert (Berger *et al.*, 1982). Bei *E. coli* 536 wurden zahlreiche Virulenzfaktoren identifiziert, die charakteristisch für

extraintestinal pathogene *E. coli* sind und auf Pathogenitätsinseln kodiert werden (Dobrindt *et al.*, 2002; Schneider *et al.*, 2004). Die Virulenz wurde in verschiedenen Tiermodell-Experimenten untersucht (Dobrindt *et al.*, 1998; Hacker *et al.*, 1986; Knapp *et al.*, 1986; Marre *et al.*, 1986; Nagy *et al.*, 2002). Zahlreiche Gene, die für Adhäsine kodieren, sind auf dem Chromosom lokalisiert. Neben P-, S-, Pix- und Typ 1-Fimbrien sind dies außerdem noch das hitzeresistente Agglutinin, Hek-, F17- und CS12-ähnliche Adhäsine, Antigen 43 und Curli-Fimbrien (Dobrindt, *et al.*, 2002). Der Stamm 536 synthetisiert Flagellen und hat einen glatten („smooth“) Phänotyp. Die von diesem Stamm ausgeprägte Serumresistenz scheint nicht durch die K15 Kapsel-Determinante beeinflusst, sondern vom LPS und anderen Faktoren abhängig zu sein (Schneider, *et al.*, 2004). Der Aufbau der K15 Kapsel-Determinante zeigt Ähnlichkeiten sowohl zum Gruppe 2- als auch zum Gruppe 3-Typ. *E. coli* 536 kodiert außerdem noch zwei α -Hämolyisin-Determinanten, eine Hämoglobinprotease und mindestens vier Eisenaufnahmesysteme. Zu diesen gehören Salmochelin, Enterobaktin, ein Hämin-Transportsystem, ein HmuR-ähnlicher Hämin-Rezeptor sowie das Yersiniabaktin (Dobrindt *et al.*,).

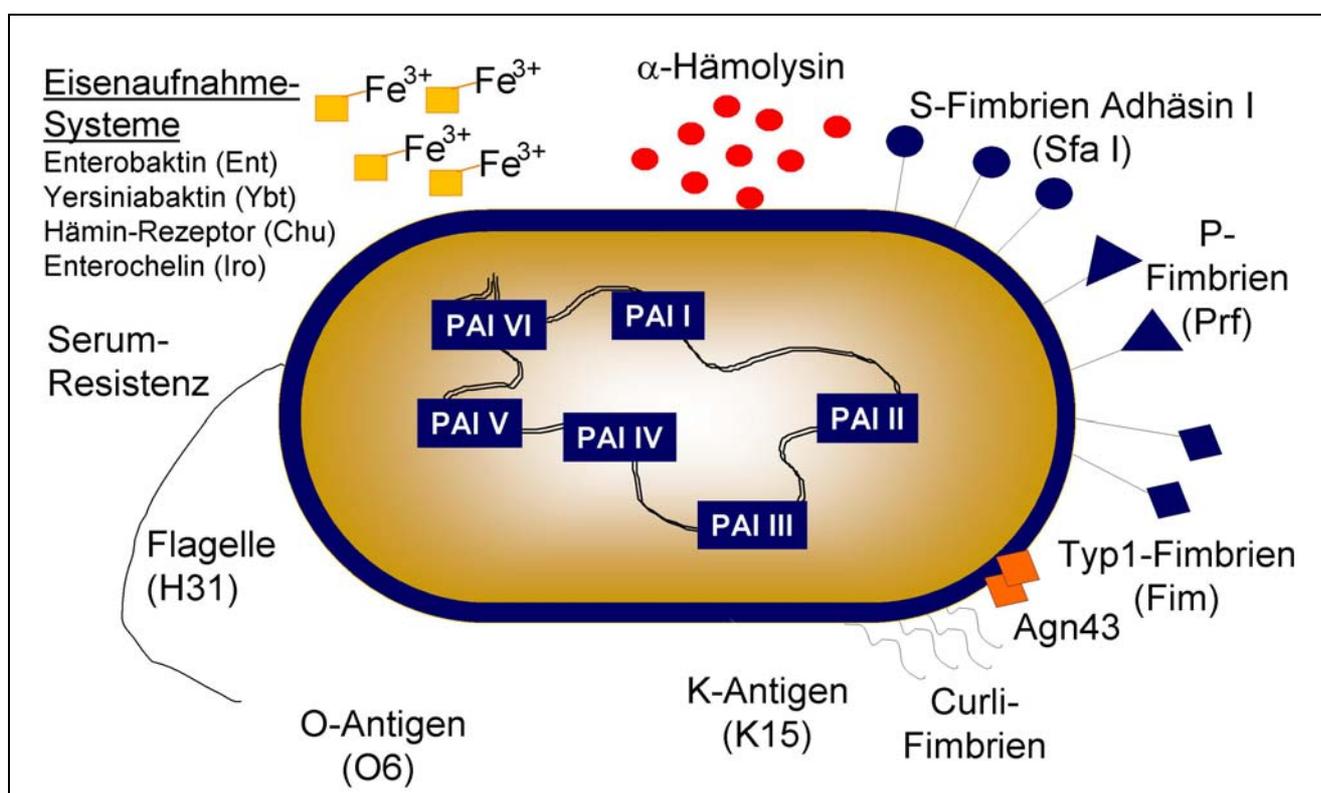


Abb. III.2: Überblick auf die Virulenzfaktoren des uropathogenen Isolates *E. coli* 536 (modifiziert nach J. Hacker).

Ein wesentliches Charakteristikum des UPEC-Stammes 536 sind Pathogenitätsinseln. Auf diesen DNA-Blöcken sind die meisten Virulenzfaktoren kodiert. Eine wichtige Eigenschaft ist ihre Instabilität und Mobilität (Middendorf *et al.*, 2001; Middendorf *et al.*, 2004). PAIs sind durch horizontalen Gentransfer entstanden, aber die Mechanismen ihrer Entstehung sind noch nicht vollständig geklärt. Neben Prophagen, Plasmiden, Transposons und anderen mobilen Elementen als Träger und „Überträger“ von DNA haben auch Rekombinationen, Deletionen und Inversionen

Einfluss auf ihre spätere Struktur (Hacker, *et al.*, 2003; Hacker, *et al.*, 2004). PAIs sind in tRNA-Gene integriert, von „direct repeats“ flankiert und kodieren Bakteriophagenintegrasen (Hacker und Kaper, 2000). Sie sind oft instabil und können aus dem Chromosom deletieren (Hochhut, *et al.*, 2005). Die Deletionen erfolgen meist durch ortsspezifische Rekombinationen. Es ist zusätzlich aber auch ein RecA-abhängiger Mechanismus, der durch homologe (allgemeine) Rekombination von IS100-Elementen erfolgt und eine Teildeletion der PAI III₅₃₆ zur Folge hat, beschrieben worden (Middendorf, *et al.*, 2004). Bei der Deletion entstehen zirkuläre Intermediate, die kein Replikon besitzen. Die Experimente bekräftigten, dass sich PAIs durch mutagene Effekte im Genom stabilisieren und manifestieren und dass auch Umweltfaktoren Einfluss auf die Deletion haben können.

In zahlreichen Experimenten wurde das Genom des uropathogenen Stammes 536 näher charakterisiert. Inzwischen ist die komplette Genomsequenz bestimmt worden. Die Analyse der Sequenz ergab, dass im Genom mindestens sechs PAIs und ein Prophage vorhanden sind (Dobrindt, *et al.*, 2005).

Tab. III.1: Aufstellung wichtiger Charakteristika der PAIs I-VI des Isolates *E. coli* 536.

Name	Integrations-ort (tRNA)	Größe (kb)	Integrase	„direct repeat“	kodierte Faktoren
PAI I	<i>selC</i>	77	P4-ähnlich (kryptisch)	16 bp	α-Hämolysin, F17- und CS12-ähnliche Fimbrien
PAI II	<i>leuX</i>	102	P4-ähnlich	18 bp	α-Hämolysin, P-Fimbrien
PAI III	<i>thrW</i>	68	<i>Shigella</i> -ähnlich (<i>Sfx</i>)	48 bp	S-Fimbrien, Antigen 43, Salmochelin
PAI IV	<i>asnT</i>	30	P4-ähnlich (kryptisch)	keine	Yersiniabaktin
PAI V	<i>pheV</i>	80	P4-ähnlich	23 bp	Pix-Fimbrien, Antigen 43, K15 Kapsel
PAI VI	<i>asnW</i>	~50	P4-ähnlich	16 bp	Polyketidbiosynthese

Insgesamt umfasst das Genom von *E. coli* 536 4,94 Mb und ist etwas kleiner als das vollständig sequenzierte Genom des extraintestinal pathogenen *E. coli* Stammes CFT073, aber deutlich größer als das Genom des apathogenen K-12 Stammes MG1655 (Blattner *et al.*, 1997; Welch *et al.*, 2002).

III.6 Der Transkriptionselongationsfaktor RfaH

Innerhalb der *Enterobacteriaceae* ist der Transkriptionselongationsfaktor RfaH weit verbreitet (Carter *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu dem strukturell sehr ähnlichen Transkriptionselongationsfaktor NusG, ist die Funktion von RfaH jedoch nicht lebensnotwendig für die bakterielle Zelle (Bailey *et al.*, 1996;

Richardson und Richardson, 2005). Allerdings weisen *rfaH* Mutanten eine stark verminderte Virulenz in verschiedenen Tiermodellen auf (Nagy *et al.*, 2005; Nagy *et al.*, 2004; Nagy, *et al.*, 2002). Es wurde dargelegt, dass RfaH die Genexpression insbesondere von Virulenzfaktoren und anderen Oberflächenmolekülen reguliert (Bailey, *et al.*, 1997). Bislang konnte für RfaH in *E. coli* und anderen Enterobakterien die positive Genregulation des *rfa*-Operons (Lipopolysaccharid-Core) (Sanderson und Stocker, 1981), des *rfb*-Operons (O-Antigen) (Wang *et al.*, 1998), des *cps*-Operons (Colansäure) (Stout, 1996), des *kps*-Operons (Kapsel) (Stevens *et al.*, 1994), des *hly*-Operons (α -Hämolyisin) (Koronakis *et al.*, 1988), des Hämin-Rezeptors *chuA* (Nagy, *et al.*, 2001), des Cytotoxisch-nekrotisierenden Faktors *cnf* (Landraud *et al.*, 2003) sowie des F-Faktors *tra* (Beutin und Achtman, 1979) nachgewiesen werden. Die Regulation dieser Gene durch RfaH erfolgt durch einen Mechanismus, der als Transkriptionsantitermination bezeichnet wird. RfaH vermittelt hierbei indirekt Protein-Nukleinsäure Wechselwirkungen mit der RNA-Polymerase (Artsimovitch und Landick, 2002). In Analogie zu NusG ist die Struktur von RfaH aus zwei wichtigen Domänen aufgebaut: Die RNP-ähnliche Domäne hat sowohl Protein- als auch Nukleinsäure-bindende Funktionen und das KOW-Motiv bestimmt die Interaktion von RNA-Polymerase und Ribosomen (Steiner *et al.*, 2002).

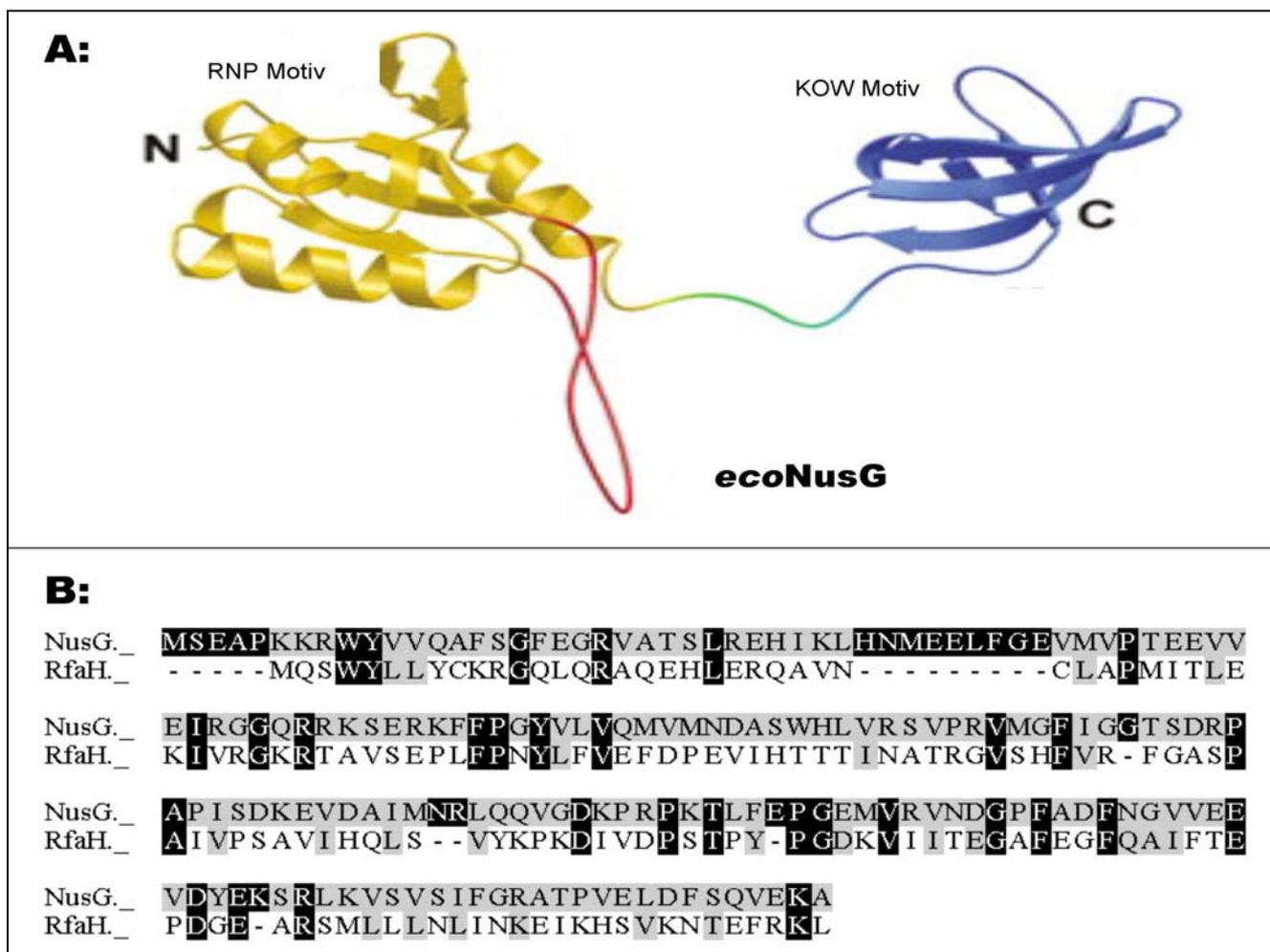


Abb. III.3: A:) Struktur des RfaH homologen Proteins NusG nach (Steiner, *et al.*, 2002) und B:) Sequenzvergleich beider Proteine.

Die Funktion von RfaH ist abhängig von einem DNA-Motiv, das „JUMP-start“ benannt wurde (Stevens, *et al.*, 1994). Innerhalb der „JUMP-start“ Region befindet sich ein als „ops“ bezeichnetes Sequenzmotiv (Nieto *et al.*, 1996). Die Wechselwirkung von RfaH mit RNA-Polymerase und DNA konnte inzwischen auf das *ops*-Element beschränkt werden (Artsimovitch und Landick, 2000; Bailey, *et al.*, 1997; Santangelo und Roberts, 2002). Der Mechanismus der Transkriptionselongation durch RfaH wurde von der Arbeitsgruppe von Robert Landick untersucht und 2002 beschrieben (Artsimovitch und Landick, 2002). Das *ops*-Element ist ein relativ konserviertes 8-12 bp großes Sequenzmotiv, welches sich in Transkriptionsrichtung auf dem kodierenden Strang befindet. Am *ops*-Element pausierende Transkriptionselongationskomplexe binden zunächst RfaH. Diese Bindung von RfaH am Transkriptionselongationskomplex führt zu einer Konformationsänderung der RNA-Polymerase und verhindert die Dissoziation des Transkriptionselongationskomplexes an ausgebildeten Haarnadelschleifen der RNA, die normalerweise zu einer Termination dieses Komplexes führen würde. Dieser Mechanismus ermöglicht den Zellen, Transkripte um bis zu 20 kb zu verlängern (Landraud, *et al.*, 2003). Zudem bewirkt die Bindung von RfaH an den Transkriptionselongationskomplex eine schnellere Synthese der Transkripte durch die RNA-Polymerase (Artsimovitch und Landick, 2002).

Es ist ein interessantes Phänomen, dass RfaH ausschließlich die Transkription von Faktoren reguliert, die in der Zellhülle lokalisiert sind oder sezerniert werden. Dies erscheint besonders relevant in Bezug auf die Erforschung der Virulenz-abhängigen Genexpression, aber auch -wie im Rahmen dieser Arbeit untersucht- in Bezug auf die Biofilmbildung. Bislang ist das RfaH-Regulon noch nicht näher charakterisiert.

III.7 Bakterielle Biofilme als Lebensgemeinschaften

E. coli 536 ist in der Lage Biofilme zu bilden. Dieser Effekt wird jedoch signifikant verstärkt, wenn das *rfaH* Gen mutiert ist (Beloin *et al.*, 2005). Die Bestimmung der Genomsequenz von *E. coli* 536 lieferte eine wichtige Grundlage, um die Biofilmbildung dieses Stammes mit Hilfe von DNA-Arrays genauer untersuchen zu können.

Die nähere Analyse der Biofilmbildung ist von Bedeutung, weil diese Fähigkeit als Virulenzfaktor betrachtet werden kann und zudem eine Eigenschaft (nicht nur pathogener) Erreger ist, die insbesondere in medizinischen Versorgungseinrichtungen zahlreiche Probleme verursacht, was durch immer öfter auftretende Antibiotikaresistenzen noch weiter verschlimmert wird (Costerton *et al.*, 1999; Ketyi, 1994; Kiersek-Pearson und Karatan, 2005).

Testreihen für Antibiotikaresistenzen sind häufig anhand planktonischer Modellsysteme durchgeführt worden. Bakterien in Biofilmen können bis zu tausendfach resistenter gegenüber Antibiotika sein (Danese, 2002; Russell, 2003). Ursachen für die schlechte Wirkung von Antibiotika in Biofilmen sind Adsorption durch und katalytische Wirkung von der extrazellulären Matrix, aber auch reduziertes Wachstum, ein verminderter Stoffwechsel sowie geringe Replikationsraten der Bakterien (Fux *et al.*,

2005). Neben effektiven „multidrug efflux pumps“, die in der Zellhülle ausgebildet werden, ist die Biofilmbildung ein wesentlicher Mechanismus von Bakterien, um der toxischen Wirkung von Antibiotika zu entgehen (Davies, 2003; Drenkard, 2003). Interessanterweise beeinflussen verschiedene Antibiotikaklassen die Biofilmbildung in unterschiedlichem Maße: β -Lactam-Antibiotika hemmen und Aminoglycosid-Antibiotika induzieren die Biofilmbildung (Gallant *et al.*, 2005; Hoffman *et al.*, 2005).

Die Besiedlung von Leitungen, industriellen Anlagen oder Schiffsrümpfen durch Biofilme erniedrigt die Haltbarkeit, führt zu erhöhter Korrosion („biofouling“) und kann Verstopfungen in Leitungssystemen verursachen (Beech und Sunner, 2004; Videla und Herrera, 2005). Allerdings gibt es auch positive Aspekte dieses Phänomens, da bei biologischen Fermentationsprozessen weitaus höhere Zelldichten und Biomassen durch Biofilme erreicht werden können. Biofilme sind essentiell bei der Besiedlung von Darm, Schleimhäuten und Haut (Flemming und Wingender, 2001). Dies zeigt, dass die Erforschung von Biofilmen neben der Beantwortung grundlegender akademischer Fragen auch zur Verbesserung von verschiedenen Anwendungen und Lebensprozessen führt.

Im Allgemeinen sind Biofilme definiert als organisierte, strukturierte Ansammlungen (Populationen) von Mikroorganismen an Grenzflächen (oft fest / flüssig), die normalerweise von einer extrazellulären, polymeren Matrix (EPS) eingeschlossen werden (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Diese gelartige Matrix besteht aus einer komplexen Mischung verschiedener langkettiger Makromoleküle, wie Exopolysacchariden, Proteinen aber auch DNA, die für die Struktur ausschlaggebend sind (Branda *et al.*, 2005; Costerton *et al.*, 1995). Gram-negative Bakterien leben in Biofilmen innerhalb pilzförmig ausgebildeter Mikrokolonien, welche durch Wasserkanäle getrennt sind und die Versorgung mit Nährstoffen sowie das Aussondern von Abfallprodukten gewährleisten. Dies hat zur Folge, dass es zur Ausbildung von Stoffgradienten (Sauerstoff, Salze und Stoffwechselprodukte) innerhalb der Mikrokolonien kommt (Ghigo, 2003).

Prinzipiell kann das Verhalten, sich zu diesen Aggregaten zusammenzuschließen, als die normale, gewöhnliche Lebensform von Mikroorganismen betrachtet werden. Nicht nur in einer kargen Umwelt und bei Nahrungsmangel („starvation“) neigen Mikroorganismen dazu, sich zu größeren, an Oberflächen haftenden Aggregaten zusammenzuschließen (Stoodley *et al.*, 2002). Biofilme sind synergistische Gemeinschaften, die Mikroorganismen z.B. vor Austrocknung, UV-Licht, pH-Extremen und zu hohen Salzbelastungen schützen.

Es wurde berichtet, dass *Vibrio cholerae* die Biofilmbildung durch „quorum sensing“ reguliert (Hammer und Bassler, 2003; Zhu und Mekalanos, 2003). Durch Kommunikationsprozesse („sensing“) werden Arbeitsteilung, der Austausch von Stoffen und auch Gentransfermechanismen in Biofilmen gesteuert. Das Verhalten in dieser Gemeinschaft gleicht somit einem multizellulären Makroorganismus. Medizinische Komplikationen durch Biofilme werden hauptsächlich deshalb verursacht, weil Gerätschaften wie Implantate, Kontaktlinsen, Schläuche und Katheter besiedelt werden, sowie dadurch, dass Unempfindlichkeiten gegenüber Antibiotika verstärkt werden und außerdem eine schlechtere Aktivierung des Komplementsystems erfolgt (Davies, 2003; Nicolle,

2005). So werden Mikroorganismen in Biofilmen kaum phagozytiert, da die humorale, aber auch die zelluläre Immunabwehr im Wirt kaum effektiv aktiviert werden kann.

Insbesondere nosokomiale Infektionen, aber auch chronische, persistierende Infektionen können durch Biofilme verursacht werden. Innerhalb von ausgebildeten „Beulen“ an der Oberfläche der Harnblasenepithelzellen sind uropathogene *E. coli* beobachtet worden, die intrazelluläre Biofilme im Gewebe bildeten (Anderson *et al.*, 2003). Diese „Beulen“ dienen den Erregern als Reservoir, so dass chronische Infektionen verursacht werden können (Anderson *et al.*, 2004a; Anderson *et al.*, 2004b).

Charakteristisch für Biofilme Gram-negativer Mikroorganismen sind eine polyanionische oder neutrale extrazelluläre Matrix (Branda, *et al.*, 2005). Hilfreich für Infektionsprozesse ist die Bindung von Eisenionen an dieser Matrix. Dies kann die Persistenz in eisenarmen Nischen, wie sie z.B. im Wirt vorliegen, erleichtern. Gram-positive Biofilme bestehen hingegen aus einer polykationischen Matrix und haben andere Strukturen (Hall-Stoodley, *et al.*, 2004; Schachter, 2003).

Die Ausbildung eines Biofilms vollzieht sich dynamisch, in fünf von einander abgrenzbaren Stufen (Ghigo, 2003; Watnick und Kolter, 2000).

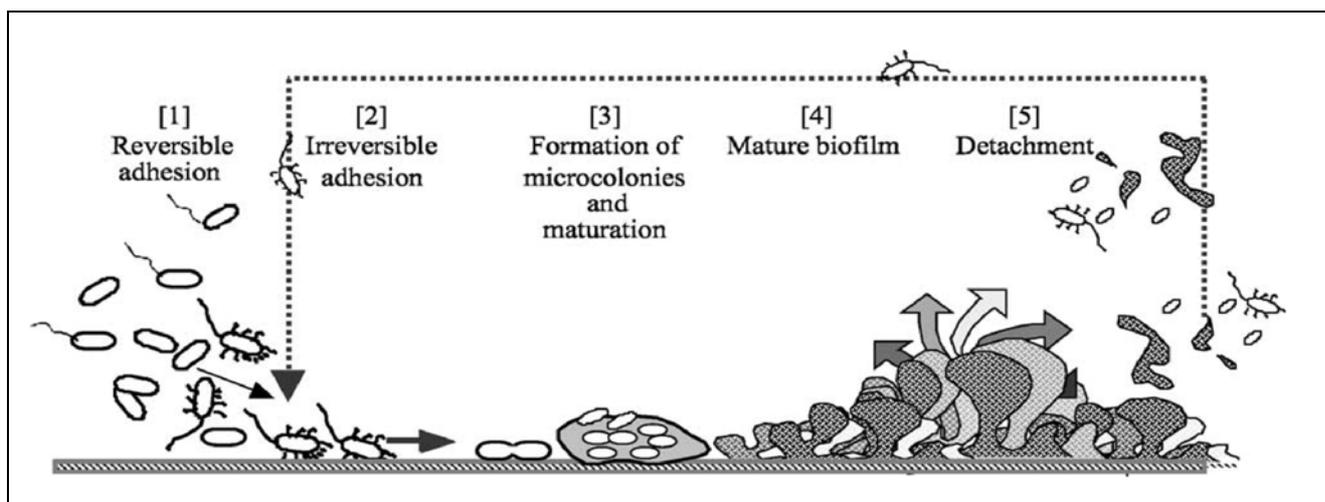


Abb. III.4: Die fünf Phasen der Biofilmbildung von Mikroorganismen. [1]- reversible Haftung, [2]- irreversible Haftung, [3]- Bildung von Mikrokolonien, [4]- Biofilmbildung mit extrazellulärer Matrix, [5]- Ablösen einzelner Mikroorganismen oder Biofilmtteile. (© Jean-Marc Ghigo, Institut Pasteur, Paris)

Die Bakterien beginnen zuerst reversibel an der Oberfläche zu haften. Dann erfolgt durch das Ausscheiden von Substanzen und die Produktion von Polysacchariden eine Konditionierung der Oberfläche. Es folgt die Bildung von Mikrokolonien begleitet von einem vermehrten Zellwachstum. Durch die erhöhte Produktion von Makromolekülen beginnt der Biofilm zu reifen und bildet die charakteristische dreidimensionale, pilzförmige Struktur aus. Diese reife Struktur kann sich in manchen Fällen bewegen und auf der Oberfläche entlang gleiten. Einzelne Zellen aus dem Verbund können sich lösen, an neuen Stellen adhären und wiederum neue Mikrokolonien bilden, aus denen dann die pilzförmige Struktur entsteht.

Es wurde gezeigt, dass bei *E. coli* die initiale Bildung des Biofilms durch das Cpx-Zwei-Komponentensystem reguliert ist (Dorel *et al.*, 1999). Wieviele und welche Genaktivitäten in Biofilmen geändert sind, wird noch kontrovers diskutiert und ist offensichtlich sehr abhängig von der Auswahl der experimentellen Bedingungen (Beloin und Ghigo, 2005; Sauer, 2003). Molekulare Analysen haben ergeben, dass insbesondere Gene, die für Beweglichkeit und Adhärenz verantwortlich sind, zur Ausbildung von Biofilmen notwendig sind (Lazazzera, 2005). Im gereiften Biofilm scheinen im Vergleich zum planktonischen Wachstum insbesondere Genaktivitäten, die Stoffwechsel, Translation sowie Regulation beeinflussen, verändert zu sein (Beloin und Ghigo, 2005; Beloin *et al.*, 2004; Schembri *et al.*, 2003a).

III.8 Biofilmbildende Faktoren und Beschreibung des Autotransporterproteins Antigen 43 bei *E. coli*

Oberflächenstrukturen haben eine wichtige Funktion für die Ausbildung von bakteriellen Biofilmen. Unterschiedliche Experimente ergaben, dass Flagellen und Fimbrien die Biofilmbildung unterstützen (Lauriano *et al.*, 2004; Otto und Hermansson, 2004; Otto *et al.*, 2001). Der Pilus selbst und weniger das auf dem Fimbrien-Schaft sitzende Adhäsion ist dabei von Bedeutung. Auch eine Begünstigung der Biofilmbildung durch Sex-Pili wurde gezeigt (Ghigo, 2001). Die Expression des F-Pilus beschleunigt nicht nur die initiale Adhäsion, sondern fördert auch eine viel schnellere Reifung des Biofilms. Die Bildung von Colansäure ist unnötig für die Haftung an der Oberfläche, hat allerdings großen Einfluss auf die Ausbildung der dreidimensionalen Struktur und die Schichtdicke des Biofilms (Prigent-Combaret *et al.*, 2000). Auch Zellulose, andere Exopolysaccharide und saccharidische Oberflächenkomponenten sowie Curli-Fimbrien begünstigen die Biofilmbildung von Bakterien (Danese *et al.*, 2000a; Ferrieres und Clarke, 2003; Prigent-Combaret, *et al.*, 2000).

Ein wichtiger Faktor für die Ausbildung von Mikrokolonien in Biofilmen ist das Oberflächenprotein Antigen 43 (Agn43), das ausschließlich bei *E. coli* Stämmen vorzufinden ist (Danese *et al.*, 2000b). *In vitro* führt die Expression von Agn43 zu verklumpten Bakterienaggregaten, ein Prozess, der als Autoaggregation beschrieben wird (Henderson *et al.*, 1997a). Wie die als Adhäsine bzw. Invasine charakterisierten homologen Proteine AIDA-I und TibA gehört Agn43 zur großen Klasse der Autotransporter.

Die Translokation durch die Zellmembran erfolgt bei Autotransporterproteinen durch einen Mechanismus, der als Typ V-Sekretion bezeichnet wird (Henderson *et al.*, 1998). Alle Autotransporter unterliegen posttranslationalen Modifikationsprozessen. Im N-terminalen Bereich des „precursor“-Proteins ist ein Signalpeptid kodiert, welches nach Translokation durch die Cytoplasmamembran abgespalten wird. Diese Translokation ist *sec*-abhängig (Typ II-System). Nach der Translokation durch die Cytoplasmamembran bildet die C-terminal-kodierte Autotransporterdomäne (β -Domäne) eine Pore in der äußeren Membran aus, durch welche die „passenger“-Domäne (α -Domäne) dann an die Zelloberfläche transportiert werden kann. Der Transportkanal besitzt die Form eines „ β -barrels“

und ist bei allen Autotransporterproteinen konserviert. Bislang noch ungeklärt ist die genaue strukturelle Zusammensetzung des Transportkanals (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004). Es werden zwei Strukturmodelle diskutiert. Die durch die Röntgenstruktur bestimmte Porengröße des Transportkanals ließ schlussfolgern, dass entweder die ungefaltete „passenger“-Domäne durch ein „ β -barrel“-Monomer transportiert wird oder die Translokation des gefalteten Proteins durch die Pore eines „ β -barrel“-Hexamers erfolgen sollte (Desvaux *et al.*, 2004; Henderson *et al.*, 2004; Newman und Stathopoulos, 2004). Nach der autokatalytischen Abspaltung von der Autotransporterdomäne wird die „passenger“-Domäne dann entweder in der äußeren Membran verankert oder sezerniert.

Bei den Agn43-ähnlichen Proteinen AIDA-I und TibA wurde noch ein weiterer Proteinmodifikationsschritt beobachtet. Beide Proteine können durch eine stromaufwärts von *aida* bzw. *tibA* kodierte Glykosyltransferase, die von *aah* bzw. *tibC* kodiert wird, modifiziert werden (Benz und Schmidt, 2001; Lindenthal und Elsinghorst, 1999). Diese Modifikation ist bei der Kolonisierung von Wirtszellen für die Adhärenz und Invasion notwendig, hat aber keinen Einfluss auf das Autoaggregationsverhalten. Bislang konnte bei *agn43*-Orthologen keine stromaufwärts kodierte Glykosyltransferase identifiziert werden. Die Modifikation durch Glykosylierung von Agn43 Varianten wird z.Z. untersucht. Dieser Prozess ist bislang nur für EHEC 86-24 beobachtet worden, wurde aber noch nicht näher charakterisiert (Torres *et al.*, 2002).

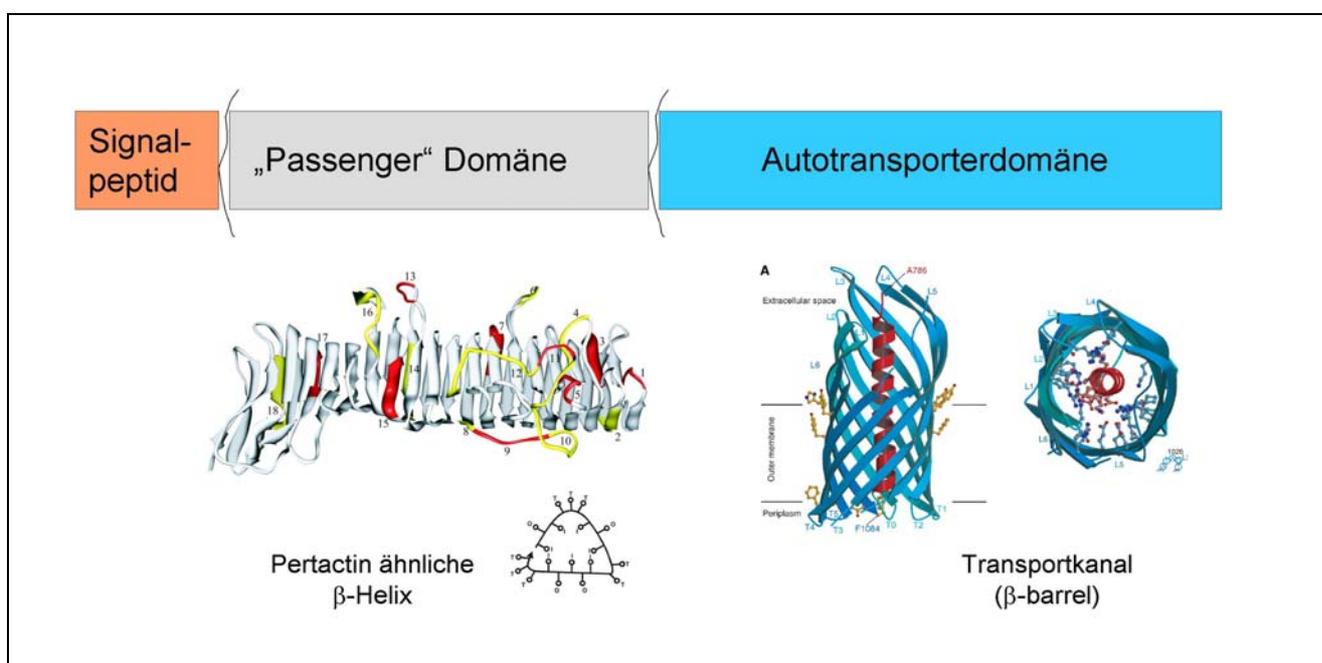


Abb. III.5: Aufbau und Struktur von Antigen 43. Das „precursor“-Protein unterliegt posttranslationalen Modifikationen. Die „passenger“-Domäne wird nach Abspaltung von Signalpeptid und Autotransporterdomäne in der äußeren Membran verankert oder sezerniert. Die „passenger“-Domäne von Agn43 besitzt eine große Ähnlichkeit zur β -Helix von Pertactin. Die hier abgebildeten Strukturen wurden aus (Emsley *et al.*, 1996) und (Oomen *et al.*, 2004) entnommen.

Die Expression von Antigen 43 ist im Gegensatz zu AIDA-I und TibA phasenvariabel und bestimmt die Zellmorphologie (Hasman *et al.*, 2000; Henderson, *et al.*, 1997a; Henderson *et al.*, 1997b;

Kjaergaard *et al.*, 2000; Owen *et al.*, 1996). Im „ON“-Zustand werden raue, kräuselige Kolonien beobachtet und im „OFF“-Zustand haben die Kolonien eine glatte Struktur. Die Transkription von *agn43* ist abhängig vom Sigmafaktor σ^{70} (Wallecha *et al.*, 2002). Des Weiteren befindet sich im Promotorbereich ein Bindemotiv für den Repressor OxyR (Haagmans und van der Woude, 2000; Henderson und Owen, 1999; Waldron *et al.*, 2002). Die Bindung des Repressors an den Promotor kann durch die Methylierung von drei GATC-Stellen durch die Methyltransferase Dam verhindert werden (Correnti *et al.*, 2002; Owen, *et al.*, 1996). Sowohl die Bindung des Repressors OxyR als auch die Methylierung durch Dam ist nicht reversibel (Correnti, *et al.*, 2002). Somit kann die Phasenvariation nur nach Replikation der DNA innerhalb eines Zellteilungsprozesses erfolgen (Wallecha *et al.*, 2003). Der semimethylierte oder unmethylierte *agn43*-Promotor wird dann entweder durch Dam modifiziert oder durch OxyR blockiert (Waldron, *et al.*, 2002; Wallecha, *et al.*, 2003). Auch die Expression von anderen Zelloberflächenproteinen nimmt Einfluss auf die Expression von Antigen 43. Die dominante Expression von P- und Typ 1-Fimbrien gegenüber der Expression von Antigen 43 wurde durch den Redox-Zustand von OxyR in der Zelle erklärt (Schembri *et al.*, 2002a; Schembri *et al.*, 2003b; Schembri und Klemm, 2001; Schembri *et al.*, 2002b). Jedoch zeigten Bindungsstudien, dass sowohl die reduzierte als auch die oxidierte Form des Repressors gleichermaßen an den Promotor binden kann (Wallecha, *et al.*, 2003). Diese widersprüchlichen Beobachtungen werden in der Literatur kontrovers diskutiert (Haagmans und van der Woude, 2000; Hasman *et al.*, 1999; Schembri, *et al.*, 2003b; Schembri und Klemm, 2001; Wallecha, *et al.*, 2003; Wallecha, *et al.*, 2002).

Neben Autoaggregation und Biofilmbildung fördert die Expression von Antigen 43 die Bindung und Adsorption von Bakteriophagen. Im „OFF“-Zustand des *agn43*-Promotors ist die Infektion von *E. coli* durch Bakteriophagen stark behindert (Gabig *et al.*, 2002; Wegrzyn und Thomas, 2002).

Die Funktion und Expression von Agn43 während der Kolonisierung von Wirtsorganismen ist noch nicht näher untersucht. Die „passenger“-Domäne hat eine starke Ähnlichkeit zu Pertactin, einem wichtigen Virulenzfaktor von *Bordetella pertussis*. Auch RGD-Motive für die Bindung von β -Integrinen und Kalzium-Bindemotive lassen auf eine unterstützende Funktion von Agn43 im Infektionsprozess, ähnlich der von AIDA-I und TibA, schließen (Henderson und Owen, 1999; Torres, *et al.*, 2002). Jedoch wurde bisher nur für AIDA-I ein eukaryotischer Rezeptor beschrieben, an dem die glykosylierte Form dieses Proteins binden kann (Laarmann und Schmidt, 2003). Hingegen muss eine mögliche Bindung von Agn43 an eukaryotische Rezeptoren noch untersucht werden.

Neben der Autoaggregation und Biofilmbildung charakterisieren diese Beobachtungen Antigen 43 als einen möglichen Virulenzfaktor, der genauer im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht werden sollte.

Zielsetzung dieser Arbeit:

Genomvariabilität und Biofilmbildung von *Escherichia coli* sind wichtige Aspekte bei der Charakterisierung von pathogenen Isolaten.

Zur Untersuchung der Genomplastizität pathogener *E. coli* Isolate sollte ein spezieller DNA-Array („Pathoarray“) entwickelt werden, auf dem Sonden mit bestimmten Pathogenitätsfaktoren fixiert sind. Die Sonden sollten sich aus folgenden drei Gruppen zusammensetzen:

- kodierende Bereiche (ORFs) der fünf bislang bekannten Pathogenitätsinseln (PAIs) des Stammes *E. coli* 536
- sämtliche in öffentlich zugänglichen Datenbanken (Genbank) verfügbare Virulenzfaktoren von extraintestinal pathogenen *E. coli*
- sowie die wichtigsten Virulenzfaktoren intestinal pathogener *E. coli*.

Durch die Hybridisierung von genomischer DNA verschiedener *E. coli* Isolate sollte die Genomvariabilität bei *E. coli* näher untersucht werden. Hierfür sollte der „Pathoarray“ (flexibler Genpool) zusammen mit einem kommerziell erwerbbaaren DNA-Array, auf dem Sonden aller kodierenden Bereiche (ORFs) des Stammes MG1655 fixiert sind (Kerngenom), eingesetzt werden.

Zudem sollte die Biofilmbildung anhand des uropathogenen Stammes *E. coli* 536 näher untersucht werden. Zu diesen Untersuchungen sollten ebenfalls beide DNA-Arrays eingesetzt werden. Über die Untersuchung des Expressionsprofils des Stammes 536*rfaH*, sollten die Genprodukte identifiziert werden, welche für die starke Biofilmbildung dieser Mutante verantwortlich sein könnten. Diese Faktoren sollten in einem weiteren Schritt durch andere Untersuchungen überprüft sowie Einflüsse von Umweltfaktoren auf die Regulation dieser Genprodukte bestimmt werden.

IV Material

Geräte:

Analysenwaage	Chyo JL 180
Autoklaven	Webceco
Brutschränke	Memmert Tv40b; Heraeus B5050E
Computerprogramme	Microsoft Office; Endnote; Vector NTI; ClustalW; Boxshade; Array Vision; Genedata Expressionist, Genespring
Elektrophoresekammern	institutseigene Werkstatt; Biorad
Elektroporationsgerät	Equibio Easyject Prima 1,8-2,5 kV
Geigerzähler	Berthold; Herfurth
Geldokumentation	BioRad Gel Doc 2000
Gene Linker	BioRad GS Gene Linker
Grobwaagen	Sartorius Basic, OHAUS Navigator
Heizblöcke	Eppendorf-Thermostat 5320; Liebisch 2099DA
Hybridisierungsöfen	Hybaid Mini 10
Kühlzentrifugen	Beckmann J2-21 mit JA10 und JA20 Festwinkelrotoren; Heraeus Biofuge; Minifuge RF
Magnetrührer	Janke und Kunkel KMO 2
Mikrowellenöfen	Phillips M630
Netzgeräte	BioRad Power Pac 300
Nylonmembran	Nytran Supercharge, Schleicher & Schüll BioSciences
PCR-Thermocycler	Biometra T3 Thermocycler
pH-Meter	WTW pH 525, WTW pH 526
Phosphoimager	Typhoon 8600 Variable Mode Imager, Molecular Dynamics
Photometer	Amersham Biosciences Ultrospec 3100 pro
Pipetten	Gilson P20, P200; Eppendorf Reference 0,5-10 µl, 100-1000 µl
Röntgenfilme	X-ray Retina; Fuji Röntgenfilm RX
Schüttelinkubatoren	New Brunswick Scientific Innova 4300; B. Braun Biotech Certomat BS-1
Speedvac-Concentrator	Savant Speedvac SC110
Sterilbank	NuAir
Sterilfilter	Schleicher & Schuell, 0,45µm und 0,22µm
Tischzentrifuge	Eppendorf 5415C; Hettrich Mikro 20
Ultraschallgerät	Branso Sonifer B12

Vakuum-Blot-System

Pharmacia Biotech

Vortex

Vortex-Genie 2, Scientific Industries

Bakterienstämme:**Tab. IV.1:** Aufstellung der verwendeten Bakterienstämme und ihre Charakteristika.

Bakterienstamm	Beschreibung/Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	F-, Φ 80dlacZ Δ M15, <i>recA, endA, gyrA, thi, hsdR, supE, rel</i> λ -, <i>deoR, \Delta(lacZYA-argF)</i>	Bethesda Research Laboratories (BRL)
<i>E. coli</i> HB101	<i>thi, hsdS, supE, recA, ara, leuB, proA, lacY, rps L, xyl, mtl, Str</i>	(Boyer und Roulland-Dussoix, 1969)
<i>E. coli</i> SY327 λ pir	F-, <i>araD, \Delta(lac-pro), argE, nalA, recA, Rif, \lambdapir</i>	(Miller und Mekalanos, 1988)
<i>E. coli</i> Sm10 λ pir	<i>lacY, tonA, recA, Muc</i> +, <i>thi, thr, leu, supE, RP4 -2-Tc::Mu, Kan, \lambdapir</i>	(Miller und Mekalanos, 1988)
<i>E. coli</i> 536	uropathogenes <i>E. coli</i> Isolat (O6:K15:H31), serumresistent, Str	(Berger, <i>et al.</i> , 1982)
<i>E. coli</i> 536 <i>agn43</i> _{PAI III}	536 Derivat, Deletion des <i>agn43</i> Allels der PAI III ₅₃₆	(Lindner, 2005)
<i>E. coli</i> 536 <i>agn43</i> _{PAI V}	536 Derivat, Deletion des <i>agn43</i> Allels der PAI V ₅₃₆	(Lindner, 2005)
<i>E. coli</i> 536 <i>agn43</i> _{PAI III} <i>agn43</i> _{PAI V}	536 Derivat, Deletion der <i>agn43</i> Allele der PAI III ₅₃₆ und der PAI V ₅₃₆	(Lindner, 2005)
<i>E. coli</i> 536 <i>rfaH</i>	536 Derivat, Insertionsmutante <i>rfaH::Kan</i>	(Dobrindt, 1999)
<i>E. coli</i> 536 <i>rfaHagn43</i> _{PAI III}	536 <i>rfaH</i> Derivat, Deletion des <i>agn43</i> Allels der PAI III ₅₃₆	(Lindner, 2005)
<i>E. coli</i> 536 <i>rfaHagn43</i> _{PAI V}	536 <i>rfaH</i> Derivat, Deletion des <i>agn43</i> Allels der PAI V ₅₃₆	(Lindner, 2005)
<i>E. coli</i> 536 <i>rfaHagn43</i> _{PAI III} <i>agn43</i> _{PAI V}	536 <i>rfaH</i> Derivat, Deletion der <i>agn43</i> Allele der PAI III ₅₃₆ und der PAI V ₅₃₆	(Lindner, 2005)
<i>E. coli</i> 536 <i>lacZ</i>	536 Derivat, Deletion des <i>lacZ</i> Gens	(Dobrindt, 1999)
<i>E. coli</i> 536 <i>lacZrfaH</i>	536 <i>lacZ</i> Derivat, Deletion des <i>rfaH</i> Gens	diese Arbeit
<i>E. coli</i> 536 <i>lacZagn43</i> _{PAI III} :: <i>lacZ</i>	536 <i>lacZ</i> Derivat, Transkriptionsfusion <i>agn43</i> _{PAI III} :: <i>lacZ, Cm</i>	diese Arbeit

<i>E. coli</i> 536 <i>lacZ</i> <i>agn43</i> _{PAI V} :: <i>lacZ</i>	536 <i>lacZ</i> Derivat, Transkriptionsfusion <i>agn43</i> _{PAI V} :: <i>lacZ</i> , Cm	diese Arbeit
<i>E. coli</i> 536 <i>lacZ</i> <i>rfaH</i> <i>agn43</i> _{PAI III} :: <i>lacZ</i>	536 <i>lacZ</i> <i>rfaH</i> Derivat, Transkriptionsfusion <i>agn43</i> _{PAI III} :: <i>lacZ</i> , Cm	diese Arbeit
<i>E. coli</i> 536 <i>lacZ</i> <i>rfaH</i> <i>agn43</i> _{PAI V} :: <i>lacZ</i>	536 <i>lacZ</i> <i>rfaH</i> Derivat, Transkriptionsfusion <i>agn43</i> _{PAI V} :: <i>lacZ</i> , Cm	diese Arbeit
<i>E. coli</i> MG1655	Wildtypisches Isolat <i>E. coli</i> K-12	(Blattner, <i>et al.</i> , 1997)
<i>E. coli</i> MG1655 <i>rfaH</i>	MG1655 Derivat, Deletion des <i>rfaH</i> Gens	(Beloin, <i>et al.</i> , 2005)
<i>E. coli</i> MG1655 <i>oxyR</i>	MG1655 Derivat, Insertionsmutante <i>oxyR</i> ::Kan	(Roux <i>et al.</i> , 2005)
<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacZ</i>	MG1655 Derivat, Deletion des <i>lacZ</i> Gens	Ghigo, unveröffentlicht
<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacZ</i> <i>agn43</i> _{K-12} :: <i>lacZ</i>	MG1655 <i>lacZ</i> Derivat, Transkriptionsfusion <i>agn43</i> _{K-12} :: <i>lacZ</i> , Cm	diese Arbeit
<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacZ</i> <i>rfaH</i>	MG1655 <i>lacZ</i> Derivat, Deletion des <i>rfaH</i> Gens	diese Arbeit
<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacZ</i> <i>rfaH</i> <i>agn43</i> _{K-12} :: <i>lacZ</i>	MG1655 <i>lacZ</i> <i>rfaH</i> Derivat, Transkriptionsfusion <i>agn43</i> _{K-12} :: <i>lacZ</i> , Cm	diese Arbeit

Vektoren und rekombinante Plasmide:

Tab. IV.2: Aufstellung der verwendeten Plasmide und ihre Charakteristika.

Vektor/Plasmid	Beschreibung	Referenz
pKS Bluescript	pUC19 Derivat, Klonierungsvektor, Phagemid; CoIE1- <i>ori</i> , Amp ^R	Stratagene
pUC18 / pUC19	„high copy“-Klonierungsvektor; CoIE1- <i>ori</i> , Amp ^R	Amersham
pGEM-T-easy	Klonierungsvektor, Phagemid, besitzt 3'-T-Überhänge zur Klonierung von PCR-Fragmenten; CoIE1- <i>ori</i> , Amp ^R	Promega
pKD46	Hilfsplasmid mit λ-Red Rekombinationssystem, Promotor Arabinose-induzierbar, (<i>P</i> _{araB} -γ-β-exo); temperatursensitives R101- <i>ori</i> , Amp ^R	(Datsenko und Wanner, 2000)

pKD3	Template-Plasmid zum Amplifizieren der <i>FRT</i> -flankierten <i>cat</i> -Kassette; <i>pir</i> -abhängiges <i>oriRγ</i> , Amp ^R , Cm ^R	(Datsenko und Wanner, 2000)
pJB20	pKD3 Derivat, Template-Plasmid zum Amplifizieren der <i>FRT</i> -flankierten <i>lacZ-cat</i> -Kassette; <i>pir</i> -abhängiges <i>oriRγ</i> , Amp ^R , Cm ^R	Waldor, unveröffentlicht
pCP20	Hilfsplasmid mit FLP-Rekombinase, Promotor Temperatur-induzierbar, temperatursensitives <i>ori</i> , Amp ^R , Cm ^R	(Datsenko und Wanner, 2000)
pCVD442	Suizide-Vektor, <i>pir</i> -abhängiges <i>oriR6K</i> , <i>mobRP4</i> , <i>sacB</i> , Amp ^R	(Mobley <i>et al.</i> , 1993)
pKEK229	pCVD442 Derivat, <i>pir</i> -abhängiges <i>oriR6K</i> , <i>mobRP4</i> , <i>sacB</i> , Amp ^R	Reidl, unveröffentlicht
pKM01-1	pGEM-T-easy Derivat, trägt ein 400 bp großes <i>actA</i> -Fragment aus <i>Candida albicans</i> , 3,5 kb	diese Arbeit
pKM01-2	pGEM-T-easy Derivat, trägt ein 5400 bp großes Fragment mit dem rRNA-Operon aus <i>E. coli</i> ; 8,5 kb	diese Arbeit
pKM03-1-A/N	pGEM-T-easy Derivat, trägt ein 997 bp großes Fragment des N-Terminus des <i>agn43_{PAI III}</i> Gens aus <i>E. coli</i> 536; 4,1 kb	diese Arbeit
pKM03-2-A/N	pGEM-T-easy Derivat, trägt ein 994 bp großes Fragment des N-Terminus des <i>agn43_{PAI V}</i> Gens aus <i>E. coli</i> 536; 4,1 kb	diese Arbeit
pKM03-3-S/S	pGEM-T-easy Derivat, trägt ein 1339 bp großes Fragment vom C-Terminus des <i>agn43_{PAI III}</i> Gens aus <i>E. coli</i> 536; 4,4 kb	diese Arbeit
pKM03-4-S/S	pGEM-T-easy Derivat, trägt ein 1407 bp großes Fragment vom C-Terminus des <i>agn43_{PAI V}</i> Gens aus <i>E. coli</i> 536; 4,4 kb	diese Arbeit
pKM03-5-N/S	pGEM-T-easy Derivat, trägt eine 4178 bp große Kassette kodierend für <i>lacZ</i> und <i>cat</i> aus dem Plasmid pJB20 ; 7,3 kb	diese Arbeit
pKM03-6-N/S	pGEM-T-easy Derivat, trägt eine 3,1 kb große <i>lacZ</i> Kassette aus dem Plasmid pJB20 ; 6,2 kb	diese Arbeit

pKM03-7-#9	pKEK229 Derivat, <i>pir</i> -abhängiges <i>oriR6K</i> , <i>mobRP4</i> , <i>sacB</i> , <i>Amp^R</i> , <i>Cm^R</i> ; "targeting"-Konstrukt mit <i>cat</i> -Kassette für die <i>lacZ</i> -Transkriptionsfusion im <i>agn43_{PAI III}</i> -Lokus; 12,4 kb	diese Arbeit
pKM03-8-#2+3	pKEK229 Derivat, <i>pir</i> -abhängiges <i>oriR6K</i> , <i>mobRP4</i> , <i>sacB</i> , <i>Amp^R</i> , <i>Cm^R</i> ; "targeting"-Konstrukt mit <i>cat</i> -Kassette für die <i>lacZ</i> -Transkriptionsfusion im <i>agn43_{PAI V}</i> -Lokus; 12,4 kb	diese Arbeit
pKM03-9-#1+4	pKEK229 Derivat, <i>pir</i> -abhängiges <i>oriR6K</i> , <i>mobRP4</i> , <i>sacB</i> , <i>Amp^R</i> ; Konstrukt ohne <i>cat</i> -Kassette für die <i>lacZ</i> -Transkriptionsfusion im <i>agn43_{PAI III}</i> -Lokus; 11,3 kb	diese Arbeit
pKM03-10-#35	pKEK229 Derivat, <i>pir</i> -abhängiges <i>oriR6K</i> , <i>mobRP4</i> , <i>sacB</i> , <i>Amp^R</i> ; Konstrukt ohne <i>cat</i> -Kassette für die <i>lacZ</i> -Transkriptionsfusion im <i>agn43_{PAI V}</i> -Lokus; 11,3 kb	diese Arbeit

Oligonukleotide:

Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg und zum Teil auch von den Firmen Operon Biotechnologies, Köln und Sigma-ARK, Darmstadt bezogen.

Eine Liste der verwendeten Oligonukleotide befindet sich im Anhang.

Verbrauchsmaterialien:

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck Biosciences, Schwalbach; Carl Roth, Karlsruhe; Bio-Rad Laboratories, München; Greiner Bio-One, Frickenhausen; Eppendorf, Hamburg; Peqlab Biotechnologie, Erlangen; Nunc, Wiesbaden; Applichem, Darmstadt und Sigma-Aldrich, Taufkirchen bezogen. Nährstoffe und Agar wurden von Difco, Oxoid und Gibco geliefert. Die Radiochemikalien wurden bei Amersham Biosciences/GE Healthcare, Freiburg bestellt.

Enzyme und Kits:

Die Enzyme stammten von folgenden Firmen:

New England Biolabs, Frankfurt/Main; Promega, Mannheim; Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe; Qiagen, Hilden; Amersham Biosciences/GE Healthcare, Freiburg; BD Biosciences/Clontech, Heidelberg; und Roche Diagnostics, Mannheim.

Wachstumsmedien:LB-Medium:

NaCl	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
Bactotrypton	10 g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

LB-Agar:

LB-Medium + Agar 16 g/l

Antibiotika und andere Medienzusätze:

	<u>Stammlösung:</u>	<u>Endkonzentration:</u>
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O _{dest.}	100 µg/ml
Chloramphenicol	30 mg/ml in 100% EtOH	15 µg/ml
Kanamycin	25 mg/ml in H ₂ O _{dest.}	25 µg/ml
Streptomycin	100 mg/ml in H ₂ O _{dest.}	100 µg/ml
Tetracyclin	12,5 mg/ml in 50% EtOH	12,5 µg/ml
IPTG	100 mM	1 mM
X-Gal	2 % in DMSO	0,005 %

Datenbanken und Programme:

Microsoft Office, Arrayvision, Analyst, Genespring, ClustalW, Boxshade, Readseq,
www.ncbi.nlm.nih.gov

V Methoden

Falls nicht anders angegeben, sind die Protokolle zur Durchführung der Experimente dem „CHS Laboratory Manual“ (Sambrook *et al.*, 1989) bzw. den „Current Protocols In Molecular Biology“ (John Wiley & Sons, Inc., 2003) entnommen. Reagenzien, kommerzielle Kits und Assays wurden unter Berücksichtigung der Anleitungen des Herstellers verwendet.

V.1 Kultivierung der Bakterien

Die zur Durchführung der Experimente benötigten Bakterienkulturen werden in der Regel als ÜN-Kultur in LB-Medium unter Selektionsdruck bei 37 °C und 220 U/min im Schüttelinkubator angezogen. Davon abweichende Anzuchtbedingungen sind im jeweiligen Experiment beschrieben.

V.2 Herstellung kompetenter Zellen

Um lineare DNA-Fragmente (zur chromosomalen Integration) und rekombinante Plasmide aufnehmen zu können, muss die bakterielle Zellwand und Zellmembran zunächst transformationskompetent gemacht werden. Dieses kann durch Behandlung der Zellen mit speziellen Waschlösungen erreicht werden.

V.2.1 Kompetente Zellen zur Aufnahme von Plasmid-DNA

Behandlung mit CaCl₂

50 ml LB-Medium werden mit 0,5 ml ÜN-Kultur beimpft und bei 37 °C geschüttelt, bis die Kultur eine OD_{600nm} von 0,7 aufweist. Die Kultur wird im Eisbad abgekühlt und 5 min mit 2000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wird in 20 ml eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und für mindestens 20 min auf Eis inkubiert. Danach werden die Zellen erneut bei 2000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wird anschließend in insgesamt 2,5 ml 100 mM CaCl₂ aufgenommen, mit Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 15 % (v/v) versetzt, in 100 µl Portionen aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Kompetente Zellen für die Elektroporation

200 ml LB-Medium werden mit 2 ml einer ÜN-Kultur des betreffenden Stammes beimpft und bei 37 °C bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 geschüttelt. Die Bakterienkultur wird 5 min bei 2000 x g und 4 °C zentrifugiert. Hiernach werden die Bakterien dreimal in sterilem, eiskaltem 10 %-igem Glycerin (v/v) gewaschen und zwar erst mit 100 % des Ausgangsvolumens, dann mit 50 % und schließlich mit 10 % des ursprünglichen Volumens. Im Anschluss wird das gewaschene Pellet in 600 µl 10 %-igem (v/v) Glycerin resuspendiert und in Aliquots zu 40 µl bei -80 °C aufbewahrt.

V.2.2 Kompetente Zellen für die stabile chromosomale Integration linearer DNA-Fragmente (Datsenko und Wanner, 2000)

Eine ÜN-Kultur des betreffenden *E. coli* Stammes mit dem „Helfer“-Plasmid pKD46 wird unter Selektionsdruck bei 30 °C inkubiert. Mit 0,5 ml dieser ÜN-Kultur werden 50 ml LB-Medium (Ampicillin 100 µg / ml, L-Arabinose 10 mM / ml) beimpft und im Inkubator bei 30 °C bis zu einer Zelldichte OD_{600nm} von 0,7-0,8 bebrütet. Die Bakterienkultur wird im Eisbad auf ca. 0 °C gekühlt. Die Zellen werden bei 4000 x g und max. 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wird insgesamt viermal in 20 ml eiskalter Waschlösung (zweimal in Wasser und zweimal in 10 %-iger Glycerin-Lösung) resuspendiert und zentrifugiert. Anschließend werden die Zellen in 5 ml Wasser resuspendiert und bis zur Elektroporation im Eisbad belassen.

V.3 DNA-Techniken

V.3.1 Allgemein

V.3.1.1 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgt im Spektrophotometer durch Bestimmung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ist die Konzentration direkt proportional zur Absorption. Werden Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet, entspricht eine Absorption A₂₆₀ von 1 einer Konzentration von ca. 50 µg / ml an doppelsträngiger DNA bzw. von ca. 33 µg / ml im Falle einzelsträngiger Oligonukleotide. Die Reinheit von Nukleinsäure-Lösungen hängt vom Verhältnis der Absorption bei 280 nm und 260 nm ab. Nukleinsäure-Lösungen weisen eine ausreichende Reinheit auf, wenn das Verhältnis von A₂₆₀/A₂₈₀ über 1,8 liegt.

V.3.1.2 Horizontale Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge wird die horizontale, nicht denaturierende Agarosegel-Elektrophorese verwendet. Die zu verwendende Konzentration des Agarosegels richtet sich nach den Fragmentgrößen. Hinreichend für die meisten Anwendungen ist eine Konzentration zwischen 0,8-1,5 % Agarose (w/v) im entsprechenden Laufpuffer (1 x TAE). Zur Herstellung des Agarosegels wird die Agarose in 1 x TAE-Laufpuffer aufgeköcht und vollständig gelöst. Das Gel wird gegossen und in eine mit Laufpuffer befüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die Proben werden mit 1/9 Volumen Stop-Puffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Bei 110 V sind innerhalb von 40 min 100 bp bis 10 kb große DNA-Fragmente im Agarosegel ausreichend aufgetrennt. Werden Gelelektrophoresen über Nacht durchgeführt, genügen 24 V. Nach der Migration werden die aufgetrennten DNA-Fragmente im Ethidiumbromid-Bad (10 mg/ml) angefärbt und durch

Fluoreszenz im UV-Licht nachgewiesen. Förderlich ist es, vorher unspezifisch gebundenes Ethidiumbromid im Wasserbad abzuspülen. Nach Bedarf können die gefärbten Agarosegele zur Dokumentation fotografiert werden.

50 x Tris-Acetat-Puffer (TAE) pH 7,2:

Tris	242 g
Eisessig	57,1 ml
0,5 M EDTA, pH 8,0	100 ml
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

10 x Stop-Puffer:

0,25 % Bromphenolblau (w/v)
0,25 % Xylen-Cyanol (w/v)
15 % Ficoll Typ 400 in H ₂ O _{bidest.} (w/v)

V.3.1.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente aus Agarosegelen werden mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) isoliert. Auf dem Tisch des UV-Illuminators werden die entsprechenden, im Ethidiumbromidbad angefärbten, DNA-Fragmente ausgeschnitten, gewogen und mit dem dreifachen Gewicht QC-Puffer versetzt und bei 50 °C inkubiert, bis sich die Agarose im Puffer löst. Wenn der Elutionsansatz geschüttelt wird, kann sich die Agarose leichter lösen. Der gelbe QC-Puffer enthält einen Indikator für den pH-Wert. Es ist darauf zu achten, dass der Indikator seine gelbe Farbe behält. Die Lösung wird auf eine Reinigungssäule gegeben und abzentrifugiert. Im Anschluss werden 0,6 ml PE-Waschpuffer aufgetragen und abzentrifugiert. Mit 30 µl Wasser wird die an der Matrix der Säule gebundene DNA eluiert. Nach einem Zentrifugationsschritt befindet sich die gereinigte DNA im Eluat. Ausbeute und Reinheit werden spektrometrisch bestimmt.

V.3.1.4 Isolierung chromosomaler DNA aus *E. coli* (Grimberg *et al.*, 1989)

1 ml einer ÜN-Kultur des betreffenden *E. coli* Stammes wird in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 0,5 ml TNE-Puffer suspendiert, erneut abzentrifugiert, in 270 µl TNEX-Puffer aufgenommen, mit 30 µl Lysozymlösung (5 mg/ml) versetzt und 10-15 min bei 37 °C inkubiert. Bei einigen *E. coli* Stämmen ist es vorteilhaft, die DNasen durch Hitzebehandlung zu inaktivieren. Es empfiehlt sich deshalb, den Ansatz 20 min bei 80 °C zu inkubieren. Anschließend wird nach Zugabe von 20 µl Proteinase K-Lösung (20 mg / ml) 90 min bei 65 °C inkubiert. Der Ansatz wird zuweilen gemischt und sollte im Verlauf der Inkubation vollständig aufklaren. Aus dem Gemisch wird die DNA durch den Zusatz von 15 µl 5 M NaCl-Lösung und 0,7 ml Ethanol ausgefällt, abzentrifugiert, mit 0,4 ml 80 %-igem Ethanol (v/v) gewaschen und kurz an der Luft getrocknet. Das DNA-Pellet wird in 200 µl H₂O_{bidest.} gelöst und die Ausbeute und Reinheit werden spektrometrisch

bestimmt. Manchmal können weitere Reinigungsschritte durch Phenol/Chloroform-Extraktion Umsetzungen der DNA mit Enzymen erleichtern.

TNE-Puffer:

Tris-HCl, pH 8,0	10 mM
NaCl	10 mM
EDTA, pH 8,0	10 mM

TNEX-Puffer:

TNE-Puffer	
Triton X-100	1 % (w/v)

Reste von Proteinen in DNA-haltigen Lösungen werden durch Extraktion mit Phenol/Chloroform entfernt. Zu 400 µl DNA-Lösung werden 80 µl Wasser-gesättigte Phenol-Lösung (pH 7,5) pipettiert. Es wird 2 min geschüttelt und anschließend 2 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird vorsichtig abgenommen und mit 160 µl Phenol/Chloroform (1:1 (v/v)) erneut extrahiert. Diese Behandlung wird solange wiederholt, bis die Interphase vollständig klar ist. Verbleibende Phenolreste werden hiernach durch zweimalige Extraktion mit 100 µl Chloroform entfernt. Um die DNA aus der wässrigen Phase zu fällen, wird diese in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 10 µl 3 M NaOAc-Lösung (pH 4,8) sowie mit 10 µl 5 M NaCl-Lösung versetzt und mit 1 ml Ethanol (2,5-faches Volumen) vermennt. Nach Inkubation bei -20 °C für 20 min wird zentrifugiert, das Pellet zweimal mit 70% Ethanol (v/v) gewaschen und kurz an der Luft getrocknet. Das getrocknete DNA-Pellet wird in einem geeigneten Volumen H₂O_{bidest.} aufgenommen. Ausbeute und Reinheit werden spektrometrisch bestimmt.

V.3.1.5 Amplifizierung von DNA-Fragmenten durch PCR („polymerase chain reaction“)

Durch die „polymerase chain reaction“ (PCR) lassen sich *in vitro* gezielt DNA-Fragmente eines Genpools exponentiell anreichern.

Für kurze DNA-Fragmente (bis ca. 4 kb) wird folgender PCR-Mix auf Eis pipettiert:

PCR-Mix:

10 x Polymerase Puffer (Qiagen)	3 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,2 µl
10 mM dNTP-Mix	0,7 µl
„forward“-Primer (100 pM)	0,2 µl
„reverse“-Primer (100 pM)	0,2 µl
Template-DNA	50 ng
Taq-Polymerase (5 U / µl, Qiagen)	0,07 µl
H ₂ O _{bidest.}	ad 30 µl

Programmierung des Thermocyclers für die PCR-Reaktion:

1.) Denaturierung; (94 °C)	2 min
2.) Denaturierung; (90 °C)	20 sec
3.) Annealing; (58 °C)	40 sec
4.) Elongation; (72 °C)	40 sec-4 min
5.) Wiederholung der Schritte 2.); 3.); 4.);	34 x
6.) Elongation; (72 °C)	5 min
7.) Abkühlen (4 °C)	

Die Primer werden nach Möglichkeit so gewählt, dass die zur DNA komplementäre Sequenz bei einer Länge von 19 Nukleotiden 11 Guanidine (G) oder Cytosine (C) enthält und somit eine Annealing-Temperatur von ca. 60 °C aufweist. Die Polymerase verlängert den Primer um ca. 900 bp pro Minute; somit richtet sich die Dauer von Schritt 4 nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Die Proben werden erst in den Thermocycler gestellt, wenn das Pelletier-Element auf 90 °C vorgeheizt ist. Ein Teil des Ansatzes (2-5 µl) wird nach der PCR-Reaktion durch Gelelektrophorese überprüft.

Für längere DNA-Fragmente (4 kb bis 8 kb) wird folgender PCR-Mix auf Eis pipettiert:

PCR-Mix:

10 x PCR-Puffer (Eurogentec)	6 µl
MgCl ₂ (50 mM)	4 µl
10 mM dNTP-Mix	2 µl
„forward“-Primer (100 pM)	0,5 µl
„reverse“-Primer (100 pM)	0,5 µl
Template-DNA	50 ng
Dap-Goldstar (4 U / µl, Eurogentec)	1 µl
H ₂ O _{bidest.}	ad 60 µl

Programmierung des Thermocyclers für die PCR-Reaktion:

1.) Denaturierung; (94 °C)	2 min
2.) Denaturierung; (90 °C)	30 sec
3.) Annealing; (58 °C)	50 sec
4.) Elongation; (68 °C)	5-8 min
5.) Wiederholung der Schritte 2.); 3.); 4.);	39 x
6.) Elongation; (68 °C)	5 min
7.) Abkühlen (4 °C)	

V.3.1.6 Reinigung von PCR-Ansätzen

PCR-Ansätze, die synthetisiert werden, um durch homologe Rekombination nach dem Verfahren von Datsenko (Datsenko und Wanner, 2000) chromosomal zu integrieren, sind vor der Elektroporation mit dem „PCR Purification Kit“ (Qiagen) aufzureinigen.

Der PCR-Ansatz wird mit dem fünffachen Volumen PB-Puffer versetzt, auf die Reinigungssäule pipettiert und abzentrifugiert. Im Anschluss werden 0,6 ml PE-Waschpuffer auf die Säule gegeben und abzentrifugiert. Um die DNA von der Matrix der Säule zu eluieren, werden 30 µl H₂O aufgetragen und dann zentrifugiert. Nach dem Zentrifugationsschritt befindet sich die gereinigte DNA im Eluat. Ausbeute und Reinheit werden spektrophotometrisch bestimmt.

V.3.2 Rekombinante Plasmide

V.3.2.1 Klonierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte, die durch eine *Taq*-Polymerase synthetisiert wurden, können nach Elektrophorese und Gelelektion direkt mit dem „pGEM-T easy-Kit“ (Promega) verwendet werden. Wurden die PCR-Produkte hingegen mit einer „proof reading“-Polymerase synthetisiert, dann werden sie erst aufgereinigt und anschließend 20 min bei 72 °C mit dATP (4 mM) und *Taq*-Polymerase inkubiert. Nach Gelelektrophorese wird das DNA-Fragment isoliert, gereinigt und mit dem „pGEM-T easy-Kit“ (Promega) weiterverarbeitet.

Ligations-Ansatz:

2 x Ligase-Puffer (Promega)	1,5 µl
gereinigtes PCR-Produkt	50 ng
pGEM-T easy Vektor (Promega)	0,5 µl
Ligase (10 U / µl, Promega)	1 µl
H ₂ O _{bidest.}	ad 15 µl

50 ng aufgereinigtes DNA-Fragment werden mit 0,5 µl pGEM-T easy Vektor (Promega) über Nacht bei 12 °C ligiert. Der Ligationsansatz wird transformiert und die transformierten Zellen auf die entsprechenden rekombinanten Plasmide selektioniert und geprüft.

V.3.2.2 Plasmidisolierung mit dem „Plasmid Midi-Kit“ (Qiagen)

Es werden 100 ml Bakterienkultur unter entsprechendem Selektionsdruck ÜN bei 37 °C angezogen und bei 4000 x g zentrifugiert. Das Pellet in 4 ml Lösung P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml Lösung P2 wird die Suspension vorsichtig durchmischt, 5 min auf Eis belassen und mit 4 ml kalter Lösung P3 versetzt. Der Ansatz wird nun sehr vorsichtig gemischt, 10 min bei -20 °C eingefroren und 15 min bei 16000 x g zentrifugiert. Der klare Überstand wird vorsichtig abpipettiert und auf eine mit

4 ml QBT-Puffer vorequilibrierte Säule (Tip-100) gegeben. Nachdem der Überstand vollständig durch die Säulenmatrix gelaufen ist, wird die an das Säulenmaterial gebundene Plasmid-DNA zweimal mit je 10 ml Puffer QC gewaschen und anschließend mit 5 ml Puffer QF von der Matrix eluiert. Das Eluat wird mit 12 ml Ethanol gemischt und 15 min bei -80 °C gekühlt, um die Plasmid-DNA auszufällen. Nach Zentrifugation bei 4 °C und 16000 x g wird das Pelett mit eiskaltem 70 %-igem Ethanol (v/v) gewaschen, 5 min an der Luft getrocknet und in 100 µl H₂O gelöst. Ausbeute und Reinheit werden spektrometrisch bestimmt. Um die Qiagen-Säule wiederzuverwenden, wird die Matrix mit 50 ml Lösung HS gewaschen, mit 10 ml Puffer QPT regeneriert und bis zum weiteren Gebrauch im mit 0,1 % Natrium-Azid (w/v) versetzten Puffer QPT bei 4 °C gelagert.

P1 (Resuspensionspuffer):

100 µg / ml RNase A
50 mM Tris-HCl
10 mM EDTA
pH 8,0

P2 (Lysierungspuffer):

200 mM NaOH
1 % SDS (w/v)

P3 (Neutralisationspuffer):

3,0 M KOAc
pH 5,5

QBT (Equilibrierungspuffer):

750 mM NaCl
50 mM MOPS
15 % Ethanol (v/v)
pH 7,0
0,15 % Triton X-100 (v/v)

QC (Waschpuffer):

1,0 M NaCl
50 mM MOPS
15 % Ethanol (v/v)
pH 7,0

QF (Elutionspuffer):

1,25 M NaCl
50 mM Tris-HCl
15 % Ethanol (v/v)
pH 8,5

HS (Waschlösung):

1,5 M NaCl
50 mM MOPS
pH 8,5
20 % Ethanol (v/v)

QPT (Equilibrierungspuffer):

0,4 M NaCl
50 mM MOPS
pH 7,0
0,15 % Triton X-100 (v/v)

V.3.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA mit der Schnelllysat-Methode

Eine unter Selektionsdruck angezogene 2 ml ÜN-Kultur wird in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 180 µl P1-Puffer resuspendiert mit 180 µl Puffer P2 versetzt. Der Ansatz wird mehrmals vorsichtig durchmischt. Nach ca. 5-10 min sollte die Lösung aufklaren; dann werden 180 µl Lösung P3 zugegeben. Die Lösung wird gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Ausgefällene chromosomale DNA und Zelltrümmer werden anschließend abzentrifugiert. Der klare Überstand wird abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 10 µl 5 M NaCl-Lösung sowie 1,4 ml Ethanol zugegeben, 10 min bei -20 °C gekühlt und hiernach zentrifugiert. Das Pellet wird zweimal mit 180 µl 70 %-igem Ethanol (v/v) gewaschen, 5 min getrocknet und in 50 µl H₂O_{bidest.} gelöst. Die so gewonnene Plasmid-DNA ist noch mit großen Anteilen RNA verunreinigt. Für Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen empfiehlt sich die Zugabe von 1-2 µl RNase A (1 mg/ml) zum Spaltansatz. Im Falle von Anwendungen, bei denen RNA-Verunreinigungen stören, kann die Plasmid-Lösung erst mit RNase A behandelt (ca. 20-30 min) und dann durch Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt werden.

P1-Puffer:

50 mM Tris-HCl
10 mM EDTA
pH 8,0

P2-Puffer:

200 mM NaOH
1 % SDS (w/v)

P3-Puffer:

3,0 M KOAc
pH 5,5

V.3.2.4 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Die genaue Zusammensetzung des Spaltansatzes richtet sich nach den Angaben des Herstellers. Für einen 30 µl Reaktionsansatz werden ca. 0,4-2 µg in H₂O_{bidest.} gelöste DNA mit 3 µl des entsprechenden 10 x Reaktionspuffers sowie mit ca. 2 U des zu verwendenden Restriktionsenzym gemischt und der Ansatz mit H₂O_{bidest.} auf 30 µl aufgefüllt. Die Temperatur, bei der die Spaltungsansätze für 2-3 h inkubiert werden, ist von der verwendeten Endonuklease abhängig, liegt aber in der Regel bei 37 °C. Zum Entfernen von RNA-Verunreinigungen kann dem Spaltansatz 1 µl RNase A (10 mg/ml) zugesetzt werden. Soll die DNA weiter aufgearbeitet werden, wird das Restriktionsenzym durch Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt. Die Vollständigkeit des Verdaus sollte durch Gelelektrophorese überprüft werden. Die Spaltung von chromosomaler DNA wird in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt, wobei die fünffache Menge an Restriktionsenzym, bezogen auf eine Plasmidspaltung, eingesetzt wird.

V.3.2.5 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Wurde die Vektor-DNA nur mit einem Restriktionsenzym gespalten, sollten die Endstellen des linearisierten Vektors dephosphoryliert werden, um eine Religation des Vektors zu verhindern. Um die 5'-Phosphatgruppen von der doppelsträngigen DNA abzuspalten, werden zur Vektor-DNA 0,1 Volumen 10 x Phosphatasepuffer sowie 2 U alkalische Phosphatase (New England Biolabs) pipettiert. Dieser Ansatz wird bei 37 °C 60 min inkubiert. Anschließend werden 1 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0), 5 µl 10 % SDS (w/v) und 10 µl Proteinase K (1 mg/ml) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 30 min bei 56 °C inkubiert, anschließend mit Phenol/Chloroform extrahiert. Die DNA wird aus der wässrigen Phase mit Ethanol ausgefällt, gewaschen und in H₂O_{bidest.} aufgenommen.

V.3.2.6 Herstellung rekombinanter DNA-Moleküle

Vektor- und Insert-DNA werden mit entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten, ggf. modifiziert (dephosphoryliert), aufgereinigt und im molaren Verhältnis 1:3 gemischt. Der Ligationsansatz enthält des Weiteren 4 µl 10 x Ligationspuffer und 1 µl T4 Ligase (10 U, New England Biolabs) bei einem Gesamtvolumen von 40 µl. Es wird ÜN bei 12 °C inkubiert. Der Ligationsansatz wird transformiert und die transformierten Zellen auf die entsprechenden Plasmidkonstrukte selektioniert und geprüft.

V.3.2.7 Transformation von Bakterienzellen

Zur Aufnahme exogener DNA durch *E. coli* aus dem sie umgebenden Medium müssen diese transformationskompetent sein. Erreicht wird eine Permeabilität der Zellmembran zur Aufnahme von

DNA entweder durch die Behandlung der Zellen mit CaCl_2 kombiniert mit einem Hitzeschock oder durch kurze Elektroimpulse bestimmter Feldstärke.

V.3.2.7.1 Transformation CaCl_2 -kompetenter Zellen durch Hitzeschock

Vom Ligationsansatz werden 10 μl bzw. von einer Plasmidpräparation ca. 200 ng DNA mit 100 μl CaCl_2 -kompetenten Zellen vermischt und 30-60 min auf Eis inkubiert. Durch einen kurzen Hitzeschock (60 s, 42 °C) erfolgt die Aufnahme der DNA in die Zellen. Im Anschluss wird der Transformationsansatz nochmals kurz auf Eis gestellt, mit 0,6 ml LB versetzt und bei 37 °C 1-2 h bebrütet, um die Expression der plasmidkodierten Resistenzgene zu ermöglichen. Danach wird kurz gevortext und 50 μl auf Selektionsagar ausplattiert. Die verbleibende Suspension wird zentrifugiert, 500 μl des Überstands werden abpipettiert und verworfen. Das Zellpellet wird im verbleibenden Rest resuspendiert und auf einer weiteren Selektionsagarplatte verteilt. Die Platten werden über Nacht bebrütet. Von einigen auf dem Selektionsagar gewachsenen Kolonien werden die Plasmide isoliert und überprüft.

V.3.2.7.2 Transformation kompetenter Zellen durch Elektroporation

Bei dieser Methode können ausschließlich salzfreie DNA-Lösungen verwendet werden und die zu transformierende DNA muss dementsprechend aufgereinigt sein. Ein 40 μl Aliquot elektrokompenter Zellen wird langsam auf Eis aufgetaut, mit ca. 50 ng DNA-Lösung gemischt und im Eisbad in eine Elektroporations-Küvette pipettiert. Die Kontaktstellen der Küvette werden kurz trocken gewischt und in die Elektroporationsapparatur gestellt. Die Transformation erfolgt durch einen Elektroimpuls bei 2,5 kV. Die Bakteriensuspension wird sofort in 0,7 ml LB-Medium pipettiert und dann bei 37 °C für 1-2 h inkubiert. Danach wird kurz gevortext und 50 μl auf Selektionsagar ausplattiert. Die verbleibende Suspension wird zentrifugiert, 500 μl des Überstands werden abgezogen und verworfen. Das Zellpellet wird im verbliebenen Rest resuspendiert und auf einer weiteren Selektionsagarplatte verteilt. Die Platten werden über Nacht bebrütet. Von einigen auf dem Selektionsagar gewachsenen Kolonien werden die Plasmide isoliert und überprüft.

V.3.3 Geninaktivierung und Konstruktion chromosomaler *E. coli* Mutanten durch Allelaustausch

Mit Hilfe von Suizid-Plasmiden und linearen, doppelsträngigen DNA-Fragmenten (PCR-Produkte) können über homologe Rekombination Allele im Chromosom ausgetauscht und mutiert werden. Die entsprechenden Konstrukte werden in die Zellen elektroporiert oder konjugiert.

V.3.3.1 **Bakterielle Konjugation**

Jeweils 4 ml Kultur des Donor- und Rezipientenstammes werden bei 37 °C bis zu einer OD_{600nm} von 0,5-0,7 angezogen. Es werden je 100 µl beider Kulturen miteinander vermischt, auf LB-Agar ausplattiert und ÜN bei 37 °C bebrütet. Der gewachsene Bakterienrasen wird in 2 ml LB-Medium suspendiert. Verschiedene Verdünnungsstufen der Suspension werden auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert, um erfolgreiche Konjuganten zu selektionieren.

V.3.3.2 **Stabile chromosomale Integration linearer DNA-Fragmente (Datsenko und Wanner, 2000)**

Bei dieser Methode wird ein Rekombinationssystem (*redα*, *redβ* und *gam*) aus dem Phagen λ verwendet, welches auf dem „Helfer“-Plasmid pKD46 kodiert ist. Dieses Hilfssystem verhindert einerseits den Abbau linearer DNA in der Zelle durch Exonukleasen und vermittelt außerdem die homologe Rekombination von DNA-Fragmenten mit besonders kurzen (ca. 50 bp langen) homologen Bereichen. PCR-Fragmente, die mit Hilfe von Oligonukleotiden synthetisiert wurden, die einerseits einen kurzen homologen Bereich für die Rekombination enthalten und außerdem die Amplifikation einer Genkassette ermöglichen, lassen sich somit als „targeting“-Konstrukte verwenden.

Als Template für eine PCR, bei der die *cat*-Genkassette flankiert von *FRT*-sites amplifiziert wird, dient der Vektor pKD3. Die hierfür verwendeten Oligonukleotide sind im 5'-Bereich zur Ziel-DNA komplementär (ca. 50 bp). Nach der Amplifikation wird der PCR-Ansatz mit *DpnI* behandelt, um störende Template DNA zu spalten und anschließend aufgereinigt. Zirka 1 µg salzfreies PCR-Fragment wird in kompetente *E. coli* transformiert, die pKD46 enthalten. Die Transformation erfolgt durch einen Elektroimpuls bei 2,5 kV. Die Bakteriensuspension wird sofort mit 0,7 ml LB-Medium versetzt und bei 37 °C für 1-2 h inkubiert. Hiernach wird kurz zentrifugiert, das Zellpellet in 150 µl LB suspendiert und dann auf einer Selektionsagarplatte (20 µg/ml Cm) ausplattiert. Die Platten werden über Nacht bebrütet. Bei einigen auf dem Selektionsagar gewachsenen Kolonien wird durch PCR überprüft, ob die Genkassette stabil in den Zielbereich des Chromosoms integriert ist. Von diesen Mutanten werden ÜN-Kulturen in LB bei 37 °C angezogen und die Zellen solange passagiert, bis sie Ampicillin-sensitiv werden und das Temperatur-sensitive Plasmid pKD46 nicht mehr nachweisbar ist.

Auf dem Plasmid pCP20 lässt sich die FLP-Rekombinase induziert exprimieren. Durch ortsspezifische Rekombination der flankierenden *FRT*-sites durch FLP kann die Genkassette aus dem Chromosom entfernt werden.

Mutanten, bei denen die Genkassette entfernt werden soll, werden mit pCP20 transformiert. Es wird bei 30 °C auf Ampicillin-resistente Zellen selektioniert. Von diesen Kolonien werden dann ÜN-Kulturen bei 43 °C ohne Selektionsdruck angezogen. Durch die erhöhte Temperatur wird die

Expression der FLP-Rekombinase induziert. Die Zellen werden dann so oft passagiert, bis sie Sensitivität gegenüber Cm und Amp zeigen und daher weder Genkassette noch pCP20 tragen.

Ist die Genkassette entfernt, kann ein weiteres Allel an einem anderen Locus des Chromosoms mit der gleichen Resistenz-Kassette mutiert werden.

V.3.3.3 Southernblot

Ein Restriktionsverdau von 5 µg chromosomaler DNA wird im Agarosegel aufgetrennt und im Ethidiumbromidbad angefärbt. Wenn die DNA nahezu vollständig gespalten und sauber aufgetrennt ist, wird das Gel zusammen mit einem Lineal fotografiert und für das Blotten präpariert. Das Gel wird dann nacheinander für je 30 min mit Depurinisierungslösung (0,25 N HCl), Denaturierungslösung (0,5 N NaOH; 1,5 M NaCl) und Neutralisierungslösung (0,5 M Tris-HCl, pH 7,5; 1,5 M NaCl) überschichtet und auf einem Schütteltisch inkubiert. Eine Nylonmembran (Nytran Supercharge, Schleicher & Schüll BioSciences) wird auf Gelgröße zugeschnitten, beschriftet, dann kurz mit Wasser und hiernach mit 20 x SSC-Lösung (3 M NaCl 0,3 M Na-Citrat, pH 7,2) befeuchtet. In einer Schale wird die Blot-Apparatur vorbereitet. Ein erhöhter Einsatz in der Schale wird mit Whatmanpapier bedeckt, so dass die Enden des Papiers den Boden der Schale berühren. Auf das Papier wird das Gel platziert, mit 20 x SSC benetzt und mit der Nylonmembran bedeckt. Es ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen zwischen Gel und Nylonmembran bzw. Whatmanpapier eingeschlossen werden. Die Nylonmembran wird mit einem Stapel saugfähigem Papier bedeckt, welches die durch Kapillarkräfte langsam aufsteigende Transfer-Lösung (20 x SSC) aufsaugen soll. Die Schale wird bis auf Höhe des Agarosegels mit 20 x SSC befüllt, um den Transfer der DNA-Fragmente auf die Membran zu ermöglichen. Der Transfer erfolgt über Nacht. Am nächsten Tag wird die Blot-Apparatur auseinander genommen. Das Gel wird erneut gefärbt, um zu überprüfen, ob die DNA vollständig transferiert wurde. Die Nylonmembran wird ca. 1 min in 0,4 N NaOH geschwenkt und kurz in 0,2 M Tris-HCl, pH 7,5 neutralisiert. Der Feuchtigkeitfilm auf der Membran wird vorsichtig abgetupft und die DNA wird durch UV-Bestrahlung (dem Gel zugewandte Seite) im „Crosslinker“ (Programm C3) auf der Membran fixiert.

20 x SSC (pH7,2):

NaCl	175,3 g
Trinatriumcitrat x 2 H ₂ O	88,2 g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
(mit 10 N HCl pH 7,2 einstellen)	

V.3.3.3.1 Hybridisierung der Membran mit einer ³³P-markierten DNA-Sonde

Ein als Sonde geeignetes DNA-Fragment (ca. 0,2-0,5 µg) wird im Gemisch mit 1 µl eines komplementären Primers (100 pM) gemischt, 5 min auf 90 °C erhitzt und langsam auf RT abgekühlt.

Zu diesem Gemisch wird auf Eis 4 μl 10 x Klenow-Puffer, 1 μl Klenow-Fragment (New England Biolabs), je 2 μl dCTP, dGTP, dTTP (5 mM) und 0,8 μl α - ^{33}P -dATP pipettiert und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ auf 40 μl Gesamtvolumen gebracht. Der Ansatz wird 1-2 h bei 37 °C inkubiert und durch Gelfiltration über ein Sephadex G-50 Säulchen (Amersham) von ^{33}P -dATP-Resten befreit. Zur Denaturierung wird die Sonde 5 min aufgekocht und bis zur Verwendung im Eisbad belassen.

Im Hybridisierungssofen wird die Nylonmembran ca. eine Stunde bei 65 °C in Hybridisierungspuffer vorhybridisiert. Der Hybridisierungspuffer wird verworfen, durch neuen ersetzt und die denaturierte Sonde wird hinzugefügt. Es wird ÜN bei 65 °C im Hybridisierungssofen inkubiert. Durch Waschen im Ofen für je 10 min bei 65 °C mit zunächst 5 ml, dann 10 ml und schließlich 20 ml Waschlösung wird unspezifisch gebundenes Sondenmaterial entfernt. Die Membran wird kurz in 2 x SSPE geschwenkt, Restfeuchtigkeit abgetupft und in Plastikfolie eingeschweißt. Durch Autoradiografie oder durch Phosphoimaging werden die Signale dann detektiert.

20 x SSPE (pH7,4):

NaCl	175,3 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	27,6 g
EDTA	7,4 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	ad 1000 ml
(mit 10 N NaOH pH 7,4 einstellen)	

50 x Denhart's Reagenz:

Ficoll (400000 g / mol)	0,5 g
Polyvinylpyrrolidin (40000 g / mol)	0,5 g
Rinderserumalbumin (BSA)	0,5 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	ad 50 ml

Hybridisierungslösung:

5 x SSPE
2 % SDS (w/v)
1 x Denhart's Reagenz
100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Heringssperma-DNA (aufgekocht, Ultraschall-behandelt)

Waschlösung:

0,5 x SSPE
0,2 % SDS (w/v)

V.3.3.3.2 Hybridisierung der Membran mit einer ECL-markierten DNA-Sonde

Die Sonde wird unter Verwendung von nichtradioaktiven Materialien mit dem ECLTM-Kit (GE Healthcare) markiert und durch eine enzymatische Reaktion, die ein lumineszierendes Signal induziert, detektiert.

Zur Markierung werden 200 ng Sonde, gelöst in 10 µl H₂O_{bidest.}, erst bei 96 °C 5 min denaturiert, dann sofort im Eisbad abgekühlt und im Anschluss kurz zentrifugiert. Auf Eis werden zuerst 10 µl Labelling-Reagenz 1 (enthält die Peroxidase für die enzymatische Reaktion) und dann 10 µl Labelling-Reagenz 2 (Glutaraldehyd-Lösung) mit der Sonde vermischt. Durch Zugabe von Glutaraldehyd wird die an der Peroxidase elektrostatisch gebundene Sonde mit dieser kovalent verknüpft. Hierfür wird der Ansatz 15 min bei 37 °C inkubiert und dann bis zur weiteren Verwendung auf Eis belassen. Die Membran wird in 10 ml Hybridisierungslösung des ECL-Kits ca. 1 h bei 42 °C vorhybridisiert, dann mit der markierten Sonde versetzt und über Nacht bei 42 °C im Hybridisierungssofen inkubiert.

Hiernach wird die Membran 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. Um Restfeuchtigkeit auf der Membranoberfläche zu entfernen, wird diese abgetupft und mit einem Gemisch aus je 4 ml Detektionslösung 1 und 2 benetzt. Die Reduktion von Wasserstoffperoxid (Lösung 1) durch die Peroxidase wird mit einer Lichtreaktion gekoppelt, bei der durch Oxidation von Luminol (Lösung 2) Licht im blauen Spektralbereich entsteht. Der Flüssigkeitsfilm des Detektionsgemisches wird hierfür ca. 1 min auf der Oberfläche hin und her bewegt. Nach kurzem Abtropfen wird die Membran in Folie eingeschlagen und die Signale durch einen Hyperfilm-ECL detektiert.

Waschlösung I: 0,5 x SSC; 0,4 % SDS (w/v)

Waschlösung II: 2 x SSC

V.4 RNA-Techniken

Beim Arbeiten mit RNA muss darauf geachtet werden, dass alle verwendeten Lösungen frei von RNasen sind. Das Tragen von Handschuhen und die DEPC-Behandlung von Wasser für die zu verwendeten Lösungen sind aus diesem Grund unabdingbar.

V.4.1 Konzentrationsbestimmung von RNA-Lösungen

Die Konzentrationsbestimmung von RNA-Lösungen erfolgt (analog DNA-Konzentrationsbestimmungen) im Spektrophotometer durch Bestimmung der Absorptionen bei den Wellenlängen 260 nm, 280 nm und 320 nm. Eine Konzentration von 40 µg / ml RNA entspricht einer Absorption A₂₆₀ von 1. Bei einem Verhältnis von A₂₆₀ / A₂₈₀ über 2,0 ist die RNA-Lösungen hinreichend sauber. Eine Absorption bei 320 nm deutet auf freie rNTP's und Verunreinigungen durch RNasen hin.

V.4.2 RNA-Extraktion aus *E. coli* durch Phenol/Chloroform (Chuang *et al.*, 1993)

Die Zellen einer 30 ml Kultur werden auf 8 g zerstoßenes, auf -80 °C vorgekühltes Eis gegossen und 2 min bei 8000 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 600 µl eiskaltem KMT-Puffer suspendiert, sofort in ein auf 80 °C vorgewärmtes Gemisch aus 200 µl wassergesättigter, saurer Phenol-Lösung (pH 4), 10 µl β-Mercaptoethanol und 600 µl NEMST-Puffer pipettiert und kräftig gevortext. Der Ansatz wird ca. 2 min bei 98 °C inkubiert, 5 min geschüttelt und 5 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wird ein weiteres Mal mit Phenol extrahiert, dann auf zwei Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und mit 0,1 Volumen 3 M NaOAc sowie 2,5 Volumen Ethanol bei -80 °C gefällt. Das Pellet wird in Gegenwart von 100 µl Chloroform in 350 µl DEPC-Wasser gelöst. Die wässrige Phase wird dann zweimal mit saurem Phenol, zweimal mit Chloroform und zweimal mit Diethylether extrahiert. Die RNA wird durch Zugabe von 1 Volumen LiCl-Puffer über Nacht bei -80 °C gefällt. RNA-Lösungen können bei -80 °C oder bei -20 °C über Chloroform gelagert werden. Durch den sehr guten Zellaufschluss eignet sich diese Methode auch bei schwer aufzuschließenden Matrices, wie z. B. Biofilme und führt zu Ausbeuten von deutlich mehr als 1 mg RNA pro Ansatz.

KMT-Puffer:

10 mM KCl
5 mM MgCl₂
10 mM Tris, pH 7,4

NEMST-Puffer:

0,4 M NaCl
40 mM EDTA
1 % β-Mercaptoethanol (v/v)
1 % SDS (w/v)
20 mM Tris, pH 7,4

LiCl-Puffer:

4 M LiCl
20 mM Tris/HCl, pH 7,5
10 mM EDTA

V.4.3 Aufreinigen von RNA-Präparationen durch DNase-Behandlung und LiCl-Fällung

Die RNA-Lösung (ca. 200-300 µg) wird mit 15 µl 10 x „One-Phor-all“-Puffer (Amersham Biosciences/GE Healthcare, Freiburg) versetzt, auf ein Volumen von 150 µl gebracht und auf kontaminierende RNasen überprüft. Dazu werden im Spektrophotometer die Absorptionen eines

Aliquots bei 260 nm, 280 nm und 320 nm bestimmt und mit einem Ansatz verglichen, der 1 h bei 37 °C inkubiert wurde. Ein Ansteigen des 320 nm Wertes bei gleichzeitigem Sinken des 260 nm Wertes deutet auf eine Kontamination von RNasen hin. Ist die Lösung frei von RNasen, werden zur RNA-Lösung 5 µl DNase I (5 U/µl, Amersham Biosciences/GE Healthcare, Freiburg) pipettiert und das Gemisch 30 min bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz wird Chloroform extrahiert, gefällt und das Pellet mit 70 %-igem Ethanol (v/v) gewaschen. Die DNase I-Behandlung wird ein weiteres Mal wiederholt. Nach der Extraktion wird die RNA über Nacht mit 1 Volumen LiCl-Puffer gefällt, zentrifugiert, zweimal mit 70 %-igem Ethanol (v/v) gewaschen und in 50-60 µl DEPC-Wasser gelöst. Ausbeute und Reinheit werden spektrometrisch bestimmt. Durch eine geeignete PCR-Reaktion (40 Zyklen) wird kontrolliert, ob die RNA-Lösung noch mit DNA-Resten kontaminiert ist.

V.4.4 RNA-Isolierung aus *E. coli* mit dem „RNeasy-Mini-Kit“ (Qiagen)

Um den Zellaufschluss zu erleichtern, wird das Zellpellet einer 1,5 ml Kultur dreimal bei -80 °C Schock-gefroren und angetaut, hiernach in 100 µl TE-Puffer (2 mg/ml Lysozym) suspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Im Anschluss werden 350 µl Lysispuffer (RLT-Puffer mit 1 % β-Mercaptoethanol (v/v)) zum Ansatz gegeben und dieser gut durchmischt. Das Lysat wird anschließend mit 10 µl β-Mercaptoethanol und 250 µl EtOH versetzt, gemischt, auf eine „RNeasy“-Säule aufgetragen und 15 s bei 8000 x g zentrifugiert. Die Säulenmatrix wird dann einmal mit 700 µl RW1-Puffer und zweimal mit 50 µl RPE-Puffer gespült. Es wird 2 min bei > 8000 x g zentrifugiert, um letzte Waschpufferreste zu entfernen, bevor die RNA mit 45 µl RNase-freiem H₂O von der Säule eluiert wird. Ausbeute und Reinheit werden spektrometrisch bestimmt. Die RNA-Lösung wird bei -20 °C gelagert.

V.4.5 Denaturierende Agarosegelelektrophorese von RNA-Lösungen

In der Regel wird für die Elektrophorese von RNA ein 1,5 % Agarose (w/v) / Formaldehydgel verwendet. Dazu werden 1,4 g Agarose in 105 ml H₂O_{dest.} aufgekocht und anschließend auf 60 °C abgekühlt und mit 12 ml 10 x MOPS-Puffer sowie 3,6 ml 37 % Formaldehyd (v/v, pH >4) vermischt. Nach dem Gießen wird das Gel 30 min im Laufpuffer (1 x MOPS) äquilibriert. Die RNA-Proben (15 µl) werden mit 30 µl 1,5 x RNA-Denaturierungs-Puffer gemischt, 5 min bei 65 °C inkubiert, auf 20 °C abgekühlt und mit 2 µl RNA-Proben-Puffer versetzt. Nach dem Beladen des Gels wird bei konstanter Spannung (120 V) für 2 h die Elektrophorese durchgeführt. Danach wird das Gel ca. 15 min in H₂O_{dest.} gespült, um überschüssiges Formaldehyd zu entfernen, mit EtBr-Lösung angefärbt und fotografiert. Die Banden der 23S-, 16S-, 5S rRNA sollten distinkt sichtbar sein und keine Spuren von Degradation aufweisen.

10 x MOPS-Puffer (pH 7,0):

MOPS	83,72 g (0,4 M)
NaOAc	8,23 g (0,1 M)
0,5 M EDTA, pH 8,0	20 ml (0,01 M)
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

1,5 x RNA-Denaturierungs-Puffer

Formamid (deionisiert)	1 ml
37 % Formaldehyd (v/v)	350 µl
10 x MOPS	100 µl

10 x RNA-Proben-Puffer:

50 % Glycerin (v/v)
10 mM EDTA, pH 8,0
0,25 % Bromphenolblau (w/v)
0,25 % Xylencyanol (w/v)

V.4.6 Northernblot

In 72 ml Wasser wird 1,0 g Agarose aufgekocht, auf 60 °C abgekühlt und mit 10 ml 10 x MOPS-Puffer versetzt. Zu diesem Gemisch werden unter Rühren 18 ml Formaldehyd-Lösung (12,3 M) gegeben. Das Gel wird gegossen und dann in der Elektrophoreseapparatur mit 1 x MOPS-Puffer bedeckt. Die RNA-Lösung (5 µl) wird mit 4 µl 10 x MOPS, 7 µl Formaldehyd sowie 20 µl Formamid gemischt, 60 min bei 55 °C inkubiert und anschließend im Eisbad abgekühlt. Zu den Proben werden 2 µl Ladepuffer gegeben, um dann das Gel zu beladen. Die Elektrophorese erfolgt bei 90 V für 2-3 Stunden. Im Anschluss wird zweimal 20 min in 0,5 M NH₄OAc-Lösung equilibriert, um restliches Formaldehyd zu entfernen. Das Gel wird im Ethidiumbromidbad gefärbt und zusammen mit einem Lineal fotografiert. Die Banden der 23S-, 16S-, 5S rRNA sollten distinkt sichtbar sein sowie keine Spuren von Degradation aufweisen. Eine Nylonmembran (Nytran Supercharge, Schleicher & Schüll BioSciences) wird auf Gelgröße zugeschnitten, erst kurz mit Wasser und hiernach mit 20 x SSC-Lösung (3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7,2) befeuchtet. In einer Schale wird die Blot-Apparatur vorbereitet. Ein erhöhter Einsatz in der Schale wird mit Whatmanpapier bedeckt, sodass die Enden des Papiers in das Pufferreservoir eintauchen können. Auf das Papier wird das Gel platziert, mit 20 x SSC benetzt und mit der Nylonmembran bedeckt. Es ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen zwischen Gel und Nylonmembran bzw. Whatmanpapier eingeschlossen werden. Die Nylonmembran wird mit einem Stapel saugfähigem Papier bedeckt, um die durch Kapillarkräfte langsam aufsteigende Transfer-Lösung (20 x SSC) aufzusaugen. Die Schale wird bis auf Höhe des Agarosegels mit 20 x SSC befüllt. Der Transfer erfolgt über Nacht. Die Blot-Apparatur wird am nächsten Tag auseinander genommen. Das Gel wird erneut gefärbt, um zu überprüfen ob die RNA vollständig transferiert wurde. Der Feuchtigkeitsfilm auf der Membran wird vorsichtig abgetupft und die RNA wird durch

UV-Bestrahlung (dem Gel zugewandte Seite) im „crosslinker“ (Programm C3) auf der Membran fixiert. Vor dem Hybridisieren wird die Membran in 6 x SSC equilibriert und bei 42 °C 20 min in 12 ml Hybridisierungslösung vorhybridisiert. Die ³³P-markierte DNA-Sonde (ca. 300 ng) wird 10 min bei 98 °C denaturiert, rasch im Eisbad abgekühlt und zum Hybridisierungsansatz gegeben. Es wird über Nacht bei 42 °C hybridisiert. Danach wird zunächst zweimal mit 2 x SSC / 0,1 % SDS (w/v) und dann zweimal mit 0,2 x SSC / 0,1 % SDS (w/v) bei 20 °C für je 5 min gewaschen. Die Hybridisierungssignale werden dann auf einem Röntgenfilm oder im Phosphoimager detektiert. Falls starkes Hintergrundsignal vorhanden ist, wird wiederum zweimal mit 0,2 x SSC / 0,1 % SDS (w/v) bei 42 °C für je 15 min gewaschen. Sollte weiterhin Hintergrundsignal stören, erfolgt ein weiterer Waschgang (zweimal mit 0,1 x SSC / 0,1 % SDS (w/v) bei 68 °C für je 15 min).

V.4.7 „Reverse transcription“-PCR (RT-PCR)

Eine sensitive Methode, um Transkripte zu detektieren, ist die Amplifikation von cDNA nach reverser Transkription. Hierfür werden 2 µg Gesamt-RNA mit 320 ng Zufallshexamer-Primern gemischt, 3 min bei 65 °C inkubiert und im Eisbad abgekühlt. Zu diesem Ansatz werden auf Eis 4 µl 10 x RT-Puffer (Qiagen), 1 µl Reverse Transkriptase („Omniscript“, 4 U / µl, Qiagen), 4 µl dNTP-Mix (5 mM) und 0,5 µl RNase-Inhibitor (Roche, 40 U / µl) pipettiert. Der Ansatz wird auf 40 µl aufgefüllt und zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Von Aliquots dieses Ansatzes werden nach der reversen Transkription durch PCR-Reaktionen die entsprechenden cDNA-Fragmente angereichert. Nach Agarosegelelektrophorese und Färben im Ethidiumbromidbad werden die angereicherten Fragmente aus den unterschiedlichen cDNA-Pools verglichen. Nützliche Kontrollen sind einerseits interne Mengenstandards (unbeeinflusste Gene), externe Mengenstandards für den RT-Schritt (Fremd-RNA bekannter Menge) und eine Negativkontrolle auf DNA-Verunreinigungen (PCR ohne RT-Schritt). Die erhaltenen Resultate sind zur groben Quantifizierung der Transkriptmengen ausreichend.

V.4.8 Semiquantitative RT-PCR

Mit dieser Abwandlung der RT-PCR können RNA-Mengen genauer quantifiziert werden. Das Vorgehen ist dem oben Beschriebenen analog, nur wird die Anreicherung der cDNA durch die PCR-Reaktion nach jedem einzelnen Zyklus verfolgt. Zum Quantifizieren werden mehrere Aliquots cDNA des gleichen Transkripts mit unterschiedlicher Zyklenzahl amplifiziert. So ist gewährleistet, dass die Amplifikation im linearen Bereich (ungesättigt) erfolgt ist und somit die relativen Mengen zweier cDNA-Pools zueinander vergleichbar bestimmt werden können. Das Verhältnis wird aus dem Quotienten 2^N (Pool1) zu 2^N (Pool2) ermittelt (N bestimmt hierbei die Anzahl an Zyklen, nach welchem das Transkript nachweisbar ist). Die o.g. Kontrollen sind bei semiquantitativer RT-PCR unabdingbar.

V.4.9 Unterscheidung von Transkriptmengen orthologer Gene durch RT-PCR und Restriktionsanalyse

Um die Transkriptmengen orthologer Gene desselben cDNA-Pools möglichst vergleichbar zu bestimmen, wird der RT-Schritt und die Anreicherung dieser Transkripte durch PCR im selben Ansatz und somit unter exakt gleichen Bedingungen vorgenommen. Aliquots der PCR-Reaktion werden dann durch Restriktionsendonukleasen gespalten, die eine Differenzierung dieser Fragmente erlauben. Nach Gelelektrophorese können die Mengen dieser Transkripte dann unterschieden und miteinander verglichen werden.

V.5 Array-Techniken

V.5.1 Herstellung von DNA-Arrays

Die zahlreichen Sonden für den DNA-Array werden in möglichst großer Menge (je nach Bedarf an Membranen) durch PCR-Synthese angereichert, denaturiert (0,5 M NaOH / 1,5 M NaCl) und in bekannter Anordnung (384 Napfschale) mit Hilfe eines Robotersystems auf eine Nylonmembran (Genetix Membran N, 222 mm x 222 mm) aufgetragen. Die Membran wird vor dem Spotten in 10 mM TE-Lösung äquilibriert. Um Schwankungen der aufgetragenen Menge auszugleichen, wird ca. zwölfmal auf dieselbe Stelle gespottet. Nach dem Spotten wird die Membran zum Fixieren der Sonden 15 min in 0,5 M NaOH / 1,5 M NaCl inkubiert, kurz in Wasser gespült und auf Whatman-Papier entfeuchtet. Die Membranen werden bis zum Gebrauch in Plastikfolie verpackt bei Raumtemperatur gelagert. Neben den PCR-Produkten werden geeignete Positiv- und Negativkontrollen sowie interne und externe Mengenstandards zum Normalisieren der unterschiedlichen Hybridisierungen auf die Membran gespottet.

V.5.2 Hybridisierung von DNA-Arrays mit ³³P-markierter Gesamt-DNA aus *E. coli*

Um genomische Unterschiede verschiedener *E. coli* Stämme zu detektieren, wird markierte Gesamt-DNA mit einem DNA-Array hybridisiert, die Signalintensitäten bestimmt, am Computer ausgewertet und verglichen.

Für die Markierung wird in einem 20 µl Ansatz 3 µg Gesamt-DNA mit 1 µg Zufallshexamer-Primern gemischt, 6 min bei 96 °C denaturiert und im Eisbad abgekühlt. Auf Eis werden 3 µl 10x-Reaktionspuffer, je 1 µl dCTP, dGTP, dTTP (je 5 mM), 2 µl [α -³³P]-dATP und 2 µl Klenow-Fragment (New England Biolabs, 5 U/µl) zu diesem Ansatz gegeben, gevortext, zentrifugiert und ca. 90 min bei 37 °C inkubiert. Durch Gelfiltration über ein Sephadex G-50 Säulchen (Amersham Biosciences/GE Healthcare, Freiburg) werden ³³P-dATP-Reste abgetrennt. Zur Denaturierung wird die markierte DNA 5 min aufgekocht und bis zur Verwendung im Eisbad belassen.

Der DNA-Array wird zur Hybridisierung erst bei Raumtemperatur in 2 x SSPE voräquiliert und anschließend in Hybridisierungspuffer 2 h bei 65 °C vorhybridisiert. Der Hybridisierungspuffer wird durch neuen ersetzt (12 ml) und mit markierter denaturierter Gesamt-DNA gemischt. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 65 °C. Unspezifisch gebundenes Sondenmaterial wird durch je zehnminütiges Waschen bei 65 °C mit erst 5 ml, dann 10 ml und schließlich zweimal mit je 20 ml Waschlösung entfernt. Die Membran wird erst kurz in 2 x SSPE geschwenkt, Restfeuchtigkeit mit Kleenex-Papier aufgesaugt und hiernach in Plastikfolie eingeschweißt. Durch Phosphoimaging werden die Signale detektiert. Die Membran wird anschließend durch zweimaliges Behandeln mit kochender Strip-Lösung für 15 min auf einem Schütteltisch inkubiert und in 2 x SSPE äquiliert, um die hybridisierten Fragmente zu entfernen. Bis zur Wiederverwendung wird der DNA-Array in Plastefolie eingeschweißt und bei -20 °C gelagert.

20 x SSPE (pH 7,4):

NaCl	175,3 g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	27,6 g
EDTA	7,4 g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
(mit 10 N NaOH pH 7,4 einstellen)	

50 x Denhart's Reagenz:

Ficoll (400000 g / mol)	0,5 g
Polyvinylpyrrolidin (40000 g / mol)	0,5 g
Rinderserumalbumin (BSA)	0,5 g
H ₂ O _{dest.}	ad 50 ml

Hybridisierungslösung:

5 x SSPE
2 % SDS (w/v)
1 x Denhart's Reagenz
100 µg/ml Heringssperma-DNA (aufgekocht, Ultraschall-behandelt)

Waschlösung:

0,5 x SSPE
0,2 % SDS (w/v)

Striplösung:

10 mM Tris, pH 7,5
1 mM EDTA
1 % SDS (w/v)

V.5.3 Hybridisierung von DNA-Arrays mit ³³P-markierter cDNA („expression profiling“)

Um die zellulären Expressionsprofile der Gene unter bestimmten Bedingungen zu vergleichen, werden die jeweiligen RNA-Pools durch reverse Transkription in markierte cDNA-Pools umgeschrieben und separat mit je einem DNA-Array hybridisiert.

Für die Markierung werden in einem 15 µl Ansatz 30 µg RNA mit 5 µg Zufallshexamer-Primern gemischt, 10 min bei 68 °C inkubiert und auf Eis gestellt. Zu dieser Probe werden je 4 µl dCTP, dGTP, dTTP (je 5 mM), 3,5 µl [α -³³P]-dATP, 0,5 µl RNase-Inhibitor (Roche, 40U/µl), 4 µl 10 x RT-Puffer (Qiagen), 1 µl Reverse Transkriptase („Omniscript“, 4 U/µl, Qiagen) sowie 10 ng externer RNA-Standard pipettiert. Als externer RNA-Standard wird *in vitro* Transkript des *act* Gens aus *Candida albicans* eingesetzt, da hierfür eine entsprechende Sonde auf die Membran gespottet ist. Der Ansatz wird auf 40 µl aufgefüllt, gevortext, zentrifugiert und zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Durch Gelfiltration über ein Sephadex G-50 Säulchen (GE Healthcare) werden ³³P-dATP-Reste von der markierten cDNA abgetrennt. Die cDNA wird 8 min denaturiert und bis zur Verwendung im Eisbad belassen. Die Hybridisierung erfolgt analog der für ³³P-markierte Gesamt-DNA beschriebenen Prozedur.

V.5.4 Synthese eines externen RNA-Standards durch *in vitro* Transkription

Um einen externen RNA-Standard für das „expression profiling“ verwenden zu können, wurde eine *act*-Sonde aus *Candida albicans* auf den DNA-Array gespottet. Für die *in vitro* Transkription wurde ein *act* kodierendes PCR-Fragment in pGEM-T easy kloniert, flankiert von Promotoren der SP6- bzw. T7-RNA-Polymerase. Zirka 3 µg dieses rekombinaten Plasmids werden mit *SphI* linearisiert, aufgereinigt und als „template“ für die Synthese von „sense“-*act*-Transkript durch die SP6-RNA-Polymerase eingesetzt. Eine 200 µl Reaktion mit 20 µl 10x-Puffer, 8 µl rNTPs (10 mM), 60 µl DTT (0,1 mM), 8 µg „template“-DNA, 1,5 µl SP6-RNA Polymerase (50 U/µl) und der entsprechenden Menge H₂O wird 30 min bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz wird mit dem RNeasy-Kit (Qiagen) aufgereinigt. Hiernach wird mit DNaseI die „template“-DNA entfernt (1 h Inkubation bei 37 °C) und das *in vitro*-Transkriptionsprodukt nochmals mit dem RNeasy-Kit (Qiagen) behandelt. Es wird die Konzentration bestimmt und das Fragment durch Gelelektrophorese eines Aliquots überprüft.

V.5.5 Auswertung der DNA-Array-Hybridisierungen

Mit Hilfe des Programms „Array Vision 6.0“ (Imaging Research) werden die Signalintensitäten der Hybridisierungsmuster bestimmt. Zum Vergleich der Daten unterschiedlicher Hybridisierungen werden die einzelnen Signale auf die Summe aller Signalintensitäten normalisiert. Die erhaltenen

Daten werden im Anschluss mit Hilfe des Programms „Expressionist“ (Genedata) oder „Genespring“ (Silicon Genetics) bearbeitet und die signifikantesten Unterschiede bestimmt.

V.6 Analyse von Reporterfusionen

V.6.1 Assay zur Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität (Miller, 1972)

Reportergene werden unter anderem verwendet, um Promotoraktivitäten (Transkriptionsfusion), aber auch posttranskriptionelle Einflüsse auf die Proteinsynthese (Translationsfusion) eines bestimmten Gens zu messen. Bei einer *lacZ*-Reporterfusion werden Einflüsse verschiedener Faktoren auf die Expression des fusionierten Gens indirekt gemessen. Die Aktivität der β -Galaktosidase dient hierbei als Maß für die Expression des fusionierten Gens.

Zur Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität werden die Zellen zentrifugiert, in 0,9 % NaCl (w/v) gewaschen und auf eine OD_{600nm} von 0,8-0,9 eingestellt. Für jede Probe wird ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß vorbereitet, in das jeweils 0,9 ml Z-Puffer, 20 μ l 0,1 % SDS (w/v) und 40 μ l Chloroform pipettiert sind. Zu diesen Ansätzen werden 200 μ l Bakteriensuspension gegeben, das Gemisch 2 min gevortext, 5 min bei 30 °C inkubiert und dann nochmals 2 min gevortext. Anschließend werden 200 μ l ONPG-Lösung zugegeben, die Ansätze kurz kräftig gemischt und solange bei 30 °C inkubiert, bis eine leichte Gelbfärbung eintritt. Die Reaktion wird dann durch Zugabe von 0,5 ml 1 M Na₂CO₃-Lösung gestoppt. Die Inkubationszeit wird notiert, im Spektrophotometer die Absorptionswerte der Probe bei 420 und 550 nm bestimmt und dann die β -Galaktosidaseaktivität nach folgender Gleichung berechnet:

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

Z-Puffer:

Na₂HPO₄ 60 mM

NaH₂PO₄ 40 mM

KCl 10 mM

MgSO₄ 1 mM

β -Mercaptoethanol 50 mM

(pH auf 7,0 einstellen, luftdicht verschlossen bei 4 °C lagern)

ONPG-Lösung:

4 mg / ml ONPG in Phosphatpuffer

(0,1 M K₂HPO₄ und 0,1 M KH₂PO₄ zu pH 7,0 mischen)

(bei -20 °C lagern)

V.6.2 Assay zur Bestimmung der Phasenvariationsfrequenz mit Hilfe eines Reportergens

Der Stamm mit der entsprechenden *lacZ*-Reportergenfusion wird auf X-Gal-Indikatorplatten ausplattiert. Zellen einer „ON“-Kolonie und einer „OFF“-Kolonie werden suspendiert und ein Aliquot davon (entsprechend verdünnt) auf einer X-Gal-Indikatorplatte plattiert. Der verbliebene Rest der Suspension wird 2-8 Stunden unter Schütteln inkubiert und davon dann die Generationszahl bestimmt. Ein entsprechend verdünntes Aliquot wird außerdem auf einer X-Gal-Indikatorplatte ausplattiert. Aus der Differenz $(\text{„ON“}/\text{Gesamt})_{\text{VOR}}$ und $(\text{„ON“}/\text{Gesamt})_{\text{NACH}}$ bzw. $(\text{„OFF“}/\text{Gesamt})_{\text{VOR}}$ und $(\text{„OFF“}/\text{Gesamt})_{\text{NACH}}$ wird die „switching“-Rate ON/OFF bzw. die „switching“-Rate OFF/ON bestimmt. Diese wird mit der Generationszahl ins Verhältnis gesetzt und ergibt die Phasenvariationsfrequenz.

V.6.3 Erzeugung der chromosomalen *agn43*-Transkriptionsfusionen

V.6.3.1 Deletion des *rfaH* Gens im Stamm *E. coli* 536*lacZ*

Zunächst wurde im Stamm 536*lacZ* (Dobrindt, 1999) der *rfaH*-Lokus deletiert. Hierfür wurde die von Datsenko und Wanner beschriebene Methode gewählt (Datsenko und Wanner, 2000). Der Stamm 536*lacZ* wurde mit dem Hilfsplasmid pKD46 transformiert. In dieses Derivat wurde dann zur chromosomalen Integration ein durch PCR amplifiziertes Fragment („targeting“-Konstrukt) transformiert. Dieses Fragment enthält kurze, flankierenden Enden (Primersequenz), die homolog zum *rfaH* Gen sind und außerdem eine Chloramphenicol-Kassette zur Selektion auf das Integrationsereignis. Nach Selektion gegen Chloramphenicol wurden einzelne Kolonien durch PCR überprüft. Hierfür wurde der *rfaH*-Lokus mit flankierenden Primern amplifiziert. Durch die in den *rfaH* Lokus integrierte *cat*-Kassette wurde ein Fragment erhalten, welches im Vergleich zum wildtypischen *rfaH* Lokus um 0,5 kb vergrößert war. Die Zellen wurden durch Sensitivität gegenüber Ampicillin auf Verlust von pKD46 (temperatursensitiver *ori*) getestet und im Anschluss mit pCP20 transformiert. Durch Temperatur-abhängige Induktion der auf pCP20 kodierten FLP-Rekombinase wurde der *cat*-Marker aus dem *rfaH*-Lokus entfernt. Dieses Ereignis wurde wiederum durch PCR überprüft, wobei durch den Verlust der *cat*-Kassette ein 0,6 kb kleineres Fragment als im Wildtyp erhalten wurde. Diese Zellen wurden durch Sensitivität gegenüber Ampicillin und Chloramphenicol auf Verlust von pCP20 (temperatursensitiver *ori*) überprüft. Der Phänotyp beider unabhängig voneinander erzeugten 536*lacZ*/*rfaH* Derivate wurde durch X-Gal/Blutagarplatten überprüft. Beide Mutanten zeigten keine β -Galactosidase-Aktivität und wiesen im Vergleich zum Wildtyp reduzierte Hämolysehöfe auf. Somit konnte die erfolgreiche Deletion von *rfaH* im Stamm 536*lacZ* phänotypisch und durch PCR-Analyse bestätigt werden.

V.6.3.2 Konstruktion der chromosomal integrierten Reporterfusionen *agn43*_{PAI III}::*lacZ* im Stamm *536lacZ* und *536lacZrfaH*

Für die Konstruktion der chromosomalen Reporterfusionen von *agn43*_{PAI III}::*lacZ* wurde ein 997 bp großes Fragment vom N-terminalen Bereich des *agn43*_{PAI III} Gens mit Hilfe von Primern, versehen mit den Schnittstellen *ApaI* bzw. *NotI*, durch PCR aus dem Chromosom des Stammes 536 amplifiziert und in den Vektor pGEM-T-easy kloniert; dieses resultierte im Plasmid pKM03-1-A/N. Die Amplifikation eines 1339 bp großen Fragments vom C-terminalen Bereich des *agn43*_{PAI III} Allels mit Hilfe von Primern, versehen mit den Schnittstellen *SalI* bzw. *SacI* und die Klonierung in den Vektor pGEM-T-easy ergab Plasmid pKM03-3-S/S. Außerdem wurde durch die Klonierung eines 4178 bp großen Fragments aus pJB20 Plasmid pKM03-5-N/S konstruiert. Dieses Insert wurde mit einer *NotI* bzw. *SalI* Schnittstelle amplifiziert und kodiert neben *cat* auch ein promotorloses *lacZ*. Beide Gene liegen in entgegengesetzter Transkriptionsrichtung zueinander auf diesem Fragment und besitzen eine eigene Ribosomenbindestelle sowie eine Terminationssequenz.

Alle drei klonierten Fragmente (N-terminaler und C-terminaler Bereich von *agn43*_{PAI III} sowie *lacZ/cat*) wurden dann schrittweise in den Suicide-Vektor pKEK229 umkloniert und ergaben das Plasmid pKM03-8-#9. Mit diesem Plasmid sollte dann eine chromosomale Transkriptionsfusion *agn43*_{PAI III}::*lacZ* erzeugt werden. Zur chromosomalen Integration wurde das Plasmid pKM03-8-#9 linearisiert und in die Stämme *536lacZ* pKD46 bzw. *536lacZrfaH* pKD46 transformiert (modifiziert nach Datsenko und Wanner). Die erhaltenen Mutanten konnten trotz dieses linearisierten „targeting“-Plasmids mit *pir*-abhängigem *oriR6K* nicht von Plasmid-Hintergrund befreit werden. Die Gründe hierfür wurden nicht näher untersucht, vielmehr wurde eine andere Strategie gewählt: Das Plasmid-kodierte „targeting“-Konstrukt wurde durch PCR amplifiziert, mit *DpnI* inkubiert (um „template“-DNA zu spalten), aufgereingt und dann in die Stämme *536lacZ* pKD46 bzw. *536lacZrfaH* pKD46 transformiert (Datsenko und Wanner). Die chromosomale Integration in den Fusionsmutanten wurde nach Selektion gegen Chloramphenicol durch PCR überprüft und außerdem durch Southernblot-Hybridisierung bestätigt. Für die Southernblotanalyse wurde *EcoRI* gespaltene DNA verwendet und sowohl mit einer *lacZ*-Sonde, einer Sonde homolog zur Autotransporterdomäne von *agn43* und einer *cat*-Sonde hybridisiert. Als Kontrolle wurde gDNA der Stämme 536 und *536agn43*_{PAI III}*agn43*_{PAI V} verwendet. Die *lacZ*-Sonde hybridisierte mit einem Fragment von ca. 9 kb in den Kontrollstämmen (wildtypisches *lacZ*) und von ca. 6-7 kb in den Fusionsmutanten *agn43*_{PAI III}::*lacZ* (erwartet: 6434 bp). Die *agn43*-Sonde erzeugt zwei starke Banden im 536 Wildtyp (beide *agn43* Varianten), welche in der Deletionsmutante *536agn43*_{PAI III}*agn43*_{PAI V} fehlten. Die Fusionsmutanten erzeugten kein Signal auf Höhe des *agn43*_{PAI III}-Gens (7428 bp), jedoch ein Signal für das *agn43*_{PAI V}-Gen (6460 bp). Weitere Signale von geringerer Stärke lassen sich durch eine unspezifische Hybridisierung mit der β -Domäne anderer Autotransporter erklären. Durch Hybridisierung mit einer *cat*-Sonde wurden bei den Fusionsmutanten Signale in der Höhe von ca. 3 kb erhalten (erwartet: 3350 bp). Alle drei Blots

bestätigten somit die Integration des „targeting“-Fragments in den *agn43*_{PAI III}-Lokus im Stamm *536lacZ* und *536lacZrfaH*.

V.6.3.3 Konstruktion der chromosomal integrierten Reporterfusionen *agn43*_{PAI V}::*lacZ* im Stamm *536lacZ* und *536lacZrfaH*

Für die Konstruktion der chromosomalen Reporterfusionen *agn43*_{PAI V}::*lacZ* wurde ein 994 bp großes Fragment vom N-terminalen Bereich des *agn43*_{PAI V} Gens mit Hilfe von Primern, versehen mit den Schnittstellen *ApaI* bzw. *NotI*, durch PCR aus dem Chromosom des Stammes 536 amplifiziert, in den Vektor pGEM-T-easy kloniert und resultierte im Plasmid pKM03-2-A/N. Die Amplifikation eines 1407 bp großen Fragments vom C-terminalen Bereich des *agn43*_{PAI V} Gens mit Hilfe von Primern, versehen mit den Schnittstellen *SalI* bzw. *SacI* und die Klonierung in den Vektor pGEM-T-easy ergab Plasmid pKM03-4-S/S. Außerdem wurde durch die Klonierung eines 4178 bp großen Fragments aus pJB20 Plasmid pKM03-5-N/S konstruiert mit Hilfe von Primern, die eine *NotI* bzw. *SalI* Schnittstelle aufwiesen. Dieses Fragment kodiert für *cat* und ein promotorloses *lacZ*. Alle drei klonierten Fragmente (N-terminaler und C-terminaler Bereich von *agn43*_{PAI V} sowie *lacZ/cat*) wurden dann wiederum in den Suicide-Vektor pKEK229 umklont und ergaben das „targeting“-Plasmid pKM03-8-#2+3. Mit diesem Plasmid sollte dann eine chromosomale Transkriptionsfusion *agn43*_{PAI V}::*lacZ* erzeugt werden. Zur chromosomalen Integration wurde das Plasmid-kodierte „targeting“-Konstrukt durch PCR amplifiziert, mit *DpnI* inkubiert (um „template“-DNA zu spalten), aufgereinigt und dann in die Stämme *536lacZ* pKD46 bzw. *536lacZrfaH* pKD46 transformiert (Datsenko und Wanner). Die chromosomale Integration in den Fusionsmutanten wurde nach Selektion gegen Chloramphenicol durch PCR überprüft und außerdem durch Southernblot-Hybridisierung bestätigt. Die Southernblotanalyse erfolgte mit *EcoRI* gespaltener DNA, die sowohl mit einer *lacZ*-Sonde, einer Sonde homolog zur Autotransporterdomäne von *agn43* und einer *cat*-Sonde hybridisiert wurde. Als Kontrolle wurden die Stämme 536 und *536agn43*_{PAI III}*agn43*_{PAI V} verwendet. Die *lacZ*-Sonde hybridisierte mit einem Fragment von ca. 9 kb in den Kontrollstämmen (wildtypisches *lacZ*) und von ca. 7-8 kb in den Fusionsmutanten *agn43*_{PAI V}::*lacZ* (erwartet: 7241 bp). Die *agn43*-Sonde erzeugte zwei starke Banden im Wildtyp (beide *agn43* Varianten), welche in der Deletionsmutante fehlen. Die Fusionsmutanten erzeugten kein Signal auf Höhe des *agn43*_{PAI V}-Gens (6460 bp), jedoch ein Signal für das *agn43*_{PAI III}-Gen (7428 bp). Weitere Signale von geringerer Stärke lassen sich durch eine unspezifische Hybridisierung mit der β -Domäne anderer Autotransporter erklären. Durch Hybridisierung mit einer *cat*-Sonde wurden bei den Fusionsmutanten Signale in der Höhe von ca. 1,5 kb erhalten (erwartet: 1390 bp). Alle drei Blots bestätigten somit die Integration des „targeting“-Fragments in den *agn43*_{PAI V}-Lokus im Stamm *536lacZ* und *536lacZrfaH*.

V.6.3.4 Konstruktion der chromosomal integrierten Reporterfusionen *agn43*_{K-12}::*lacZ* im Stamm MG1655*lacZ* und MG1655*lacZrfaH*

Für die Transkriptionsfusion *agn43*::*lacZ* im Stamm MG1655*lacZ* und MG1655*lacZrfaH* wurde das gleiche „targeting“-Konstrukt wie für die Fusion *agn43*_{PAI III}::*lacZ* verwendet, da beide Varianten eine sehr ähnliche Sequenz aufweisen. Im Stamm MG1655*lacZrfaH*::*cat* wurde mit Hilfe von pCP20 zunächst der Marker zurückgewonnen (nach Datsenko und Wanner). Beide Stämme MG1655*lacZ* und MG1655*lacZrfaH* wurden im ersten Schritt mit dem Plasmid pKD46 und anschließend mit dem „targeting“-Konstrukt transformiert (analog Datsenko und Wanner). Nach Selektion gegen Chloramphenicol wurden Einzelkolonien durch PCR überprüft. Die Transkriptionsfusionen wurden durch Southernblotanalyse bestätigt. Hierfür wurde *EcoRI* gespaltene chromosomale DNA mit einer *lacZ*-Sonde und einer *agn43*-Sonde hybridisiert. Als Kontrolle diente DNA der Ausgangsstämme MG1655*lacZ* und MG1655*lacZrfaH*. Die Hybridisierung mit der *lacZ*-Sonde zeigt bei den Transkriptionsfusionen im Southernblot ein Signal bei ca. 8 kb (erwartet: 7844 bp). Wie zu erwarten, konnte bei den Kontrollen kein Signal beobachtet werden. Hingegen lieferte die Hybridisierung mit der *agn43*-Sonde ein Signal bei den Kontrollen (Fragmentgröße: 8668 bp), jedoch nicht bei den Transkriptionsfusionen. Daraus wird ersichtlich, dass das „targeting“-Konstrukt erfolgreich in den *agn43*_{K-12}-Lokus der Stämme MG1655*lacZ* und MG1655*lacZrfaH* integriert wurde.

VI Ergebnisse

VI.1 Genomanalysen von *E. coli* Isolaten durch DNA-Arrays

VI.1.1 Herstellung eines DNA-Arrays mit verschiedenen Virulenzfaktoren („Pathoarray“)

Für die molekularbiologischen Analysen bekannter Virulenzfaktoren von pathogenen *Escherichia coli* wurde ein spezieller DNA-Array hergestellt. Mit diesem „Pathoarray“ wurden sowohl die Hybridisierungsmuster der chromosomalen DNA verschiedener *E. coli* Stämme bestimmt als auch Unterschiede in den Expressionsprofilen von bestimmten Mutanten untersucht. Darüber hinaus wurde der Einfluss verschiedener Wachstumsbedingungen auf das Transkriptom analysiert.

Für die Entwicklung des DNA-Arrays wurde zunächst die Datenbank „Genebank“ systematisch nach allen bis dato (Stand Juni 2001) verfügbaren Gensequenzen (ORFs) durchsucht, die spezifisch für extraintestinal pathogene *E. coli* (ExPEC) beschrieben wurden. Außerdem wurden die auf den Pathogenitätsinseln (PAI I₅₃₆, PAI II₅₃₆, PAI III₅₃₆, PAI IV₅₃₆ und PAI V₅₃₆) des *E. coli* Stammes 536 kodierten ORFs bestimmt und zum Sondendesign verwendet. Zudem wurden Sonden für ORFs der LEE-PAI, für Gene der neun größten „O-Islands“ des EHEC-Stammes EDL 933 und für Gene der PAIs von *S. flexneri* (SHI-O, SHI-1, SHI-2) sowie für charakteristische Gene von intestinal pathogenen *E. coli* (EHEC, EPEC, EIEC, ETEC, EAEC und DAEC) als Sonden für den „Pathoarray“ ausgewählt.

Für diese oben aufgeführten Gene und ORFs wurden jeweils spezifische Primerpaare ausgewählt, um diese mit Hilfe von PCR zu amplifizieren. Die Primer wurden so gewählt, dass erstens die PCR-Fragmente eine Länge von 400-450 bp aufwiesen und zweitens aus dem mittleren Bereich der ORFs amplifiziert wurden, drittens eine zur DNA komplementäre Sequenzfolge von 19-23 Nukleotiden hatten und viertens eine Annealing-Temperatur von 60 °C besaßen. Bei kleinen ORFs wurden entsprechend kleinere Fragmente amplifiziert. ORFs kleiner als 200 bp wurden nicht berücksichtigt. In Einzelfällen wurden Primer gewählt, die unmittelbar stromaufwärts bzw. stromabwärts an den jeweiligen ORF banden. Diese Kriterien ermöglichten eine standardisierte Amplifikation der PCR-Produkte, ohne die jeweilige PCR-Reaktion einzeln optimieren zu müssen. Außerdem sollten damit ähnliche Bindungseigenschaften bei den späteren Hybridisierungen gewährleistet werden. Auf etwaige, zufällig auftretende Homologien der verschiedenen PCR-Produkte, die Kreuzhybridisierungen verursachen könnten, konnte infolge der großen Anzahl an Sonden keine besondere Rücksicht genommen werden.

Die amplifizierten PCR-Fragmente wurden durch Agarosegelelektrophorese hinsichtlich ihrer Größe und Reinheit überprüft. Die nachfolgende Abbildung (VI.1) zeigt exemplarisch das Ergebnis einiger PCR-Reaktionen die dann später als Gensonden auf dem DNA-Array eingesetzt wurden.

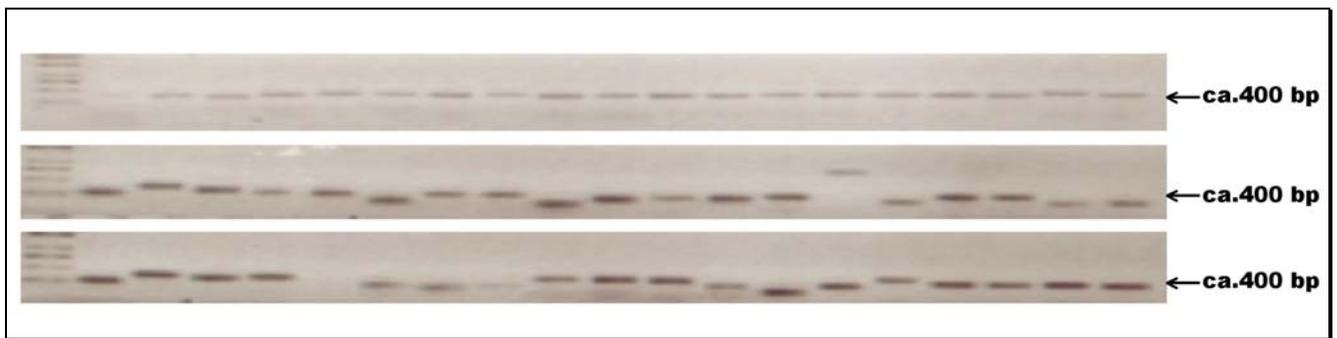


Abb. VI.1: Beispiel für die Amplifikation von DNA-Sonden, die für den „Pathoarray“ verwendet wurden. Alle eingesetzten Sonden waren spezifisch, ohne Nebenprodukte und wiesen eine Größe von ca. 400 bp auf.

Stimmte die Fragmentgröße mit der im Voraus berechneten Größe überein und waren des Weiteren keine Spuren von Nebenprodukten erkennbar, wurden die PCR-Reaktionen für den „Pathoarray“ verwendet. Dazu wurde der PCR-Ansatz (90 μ l) in einen Napf einer 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert und die jeweilige Position protokolliert. Zusätzlich zu den Gensonden wurden noch verschiedene Kontrollen hinzugefügt: gDNA unterschiedlicher Konzentration (10-40 ng/ μ l) der *E. coli* Stämme 536 und MG1655 diente als Positivkontrolle und die DNA von *Candida albicans* wurde als Negativkontrolle integriert. Zudem wurden auch Sonden des *fim*-Genclusters aus *E. coli* und *actA* aus *C. albicans* beim Design des „Pathoarrays“ berücksichtigt, um die Hybridisierungen bei der Datenanalyse standardisieren zu können. Am Institut Pasteur (Paris) wurden die Sonden aus den 96 well-Platten mit einer Pipettierhilfe in ein 384 well-Format übertragen. Die Gensonden wurden in Duplikaten mit Hilfe eines Spot-Roboters, angeordnet als 32 x 48 Matrix, auf die Membran aufgetragen und im Anschluss fixiert. Dem Anhang dieser Arbeit ist eine genaue Beschreibung der gespotteten Matrix beigelegt. Die Abbildung (VI.2) gibt einen exemplarischen Überblick über die verschiedenen Sondengruppen, die für den „Pathoarray“ verwendet wurden.

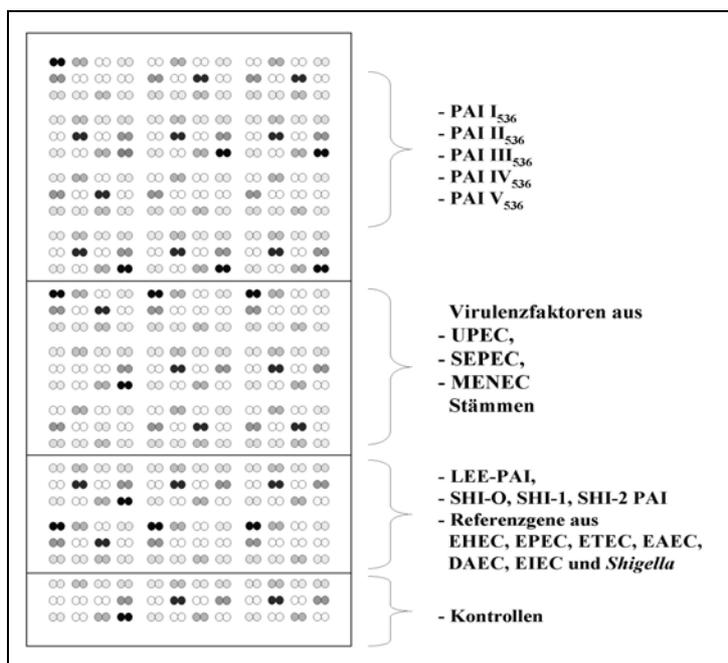


Abb. VI.2: Schematische Darstellung des „Pathoarrays“. Neben Virulenz-faktoren verschiedener *E. coli* Pathotypen wurden hauptsächlich kodierende Bereiche (ORFs) von Pathogenitätsinseln als Sonden auf dem „Pathoarray“ verwendet.

VI.1.2 Genomanalysen von verschiedenen *E. coli* Referenzstämmen mit dem „Pathoarray“

VI.1.2.1 Genomanalyse des uropathogenen Stammes 536 mit dem „Pathoarray“

Um die Signalstärken und die Spezifität der auf den „Pathoarray“ aufgetragenen Sonden zu überprüfen, wurde dieser mit markierter chromosomaler DNA von verschiedenen *E. coli* Referenzgenomen hybridisiert.

Die Abbildung (VI.3) zeigt die 50 Spots mit den stärksten Hybridisierungssignalen und das Hybridisierungsmuster des „Pathoarrays“ mit gDNA des Stammes 536. Von diesem extraintestinal pathogenen *E. coli* Isolat wurden die ORFs der bis dato sequenzierten PAIs (PAI I₅₃₆, PAI II₅₃₆, PAI III₅₃₆, PAI IV₅₃₆ und PAI V₅₃₆) als Gensonden auf dem „Pathoarray“ fixiert. Aus der Grafik ist ersichtlich, dass diese Gensonden auch tatsächlich starke Hybridisierungssignale aufwiesen.

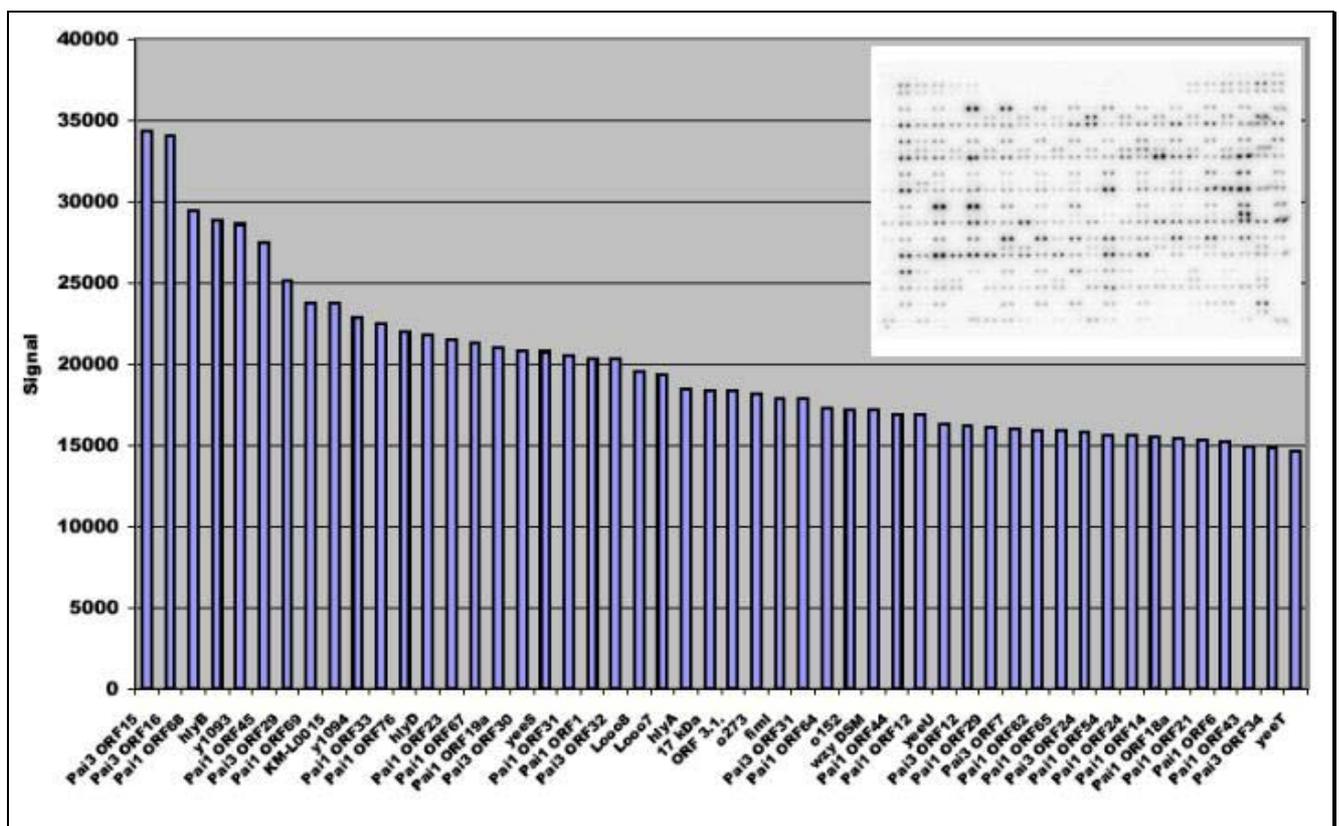


Abb. VI.3: Analyse des Hybridisierungsmusters des „Pathoarrays“ des Referenzstammes *E. coli* 536. Die Signalintensitäten für die 50 Sonden mit den stärksten Signalen sind dargestellt. Diese Sonden konnten als spezifisch für kodierende Bereiche der PAIs des Stammes 536 analysiert werden.

VI.1.2.2 Genomanalyse der Deletionsmutante 536-21 mit dem „Pathoarray“

Neben der DNA des Wildtypstammes 536 wurde außerdem noch gDNA der Deletionsmutante 536-21, einem Derivat, bei dem die PAI I₅₃₆ und PAI II₅₃₆ deletiert sind, mit dem „Pathoarray“ hybridisiert und mit dem Wildtyp verglichen. Aus der Abbildung (VI.4) ist erkennbar, dass im Hybridisierungsmuster des Stammes *E. coli* 536-21 bei einigen Sonden im Gegensatz zum Wildtyp keine oder viel schwächere Signale auftraten.

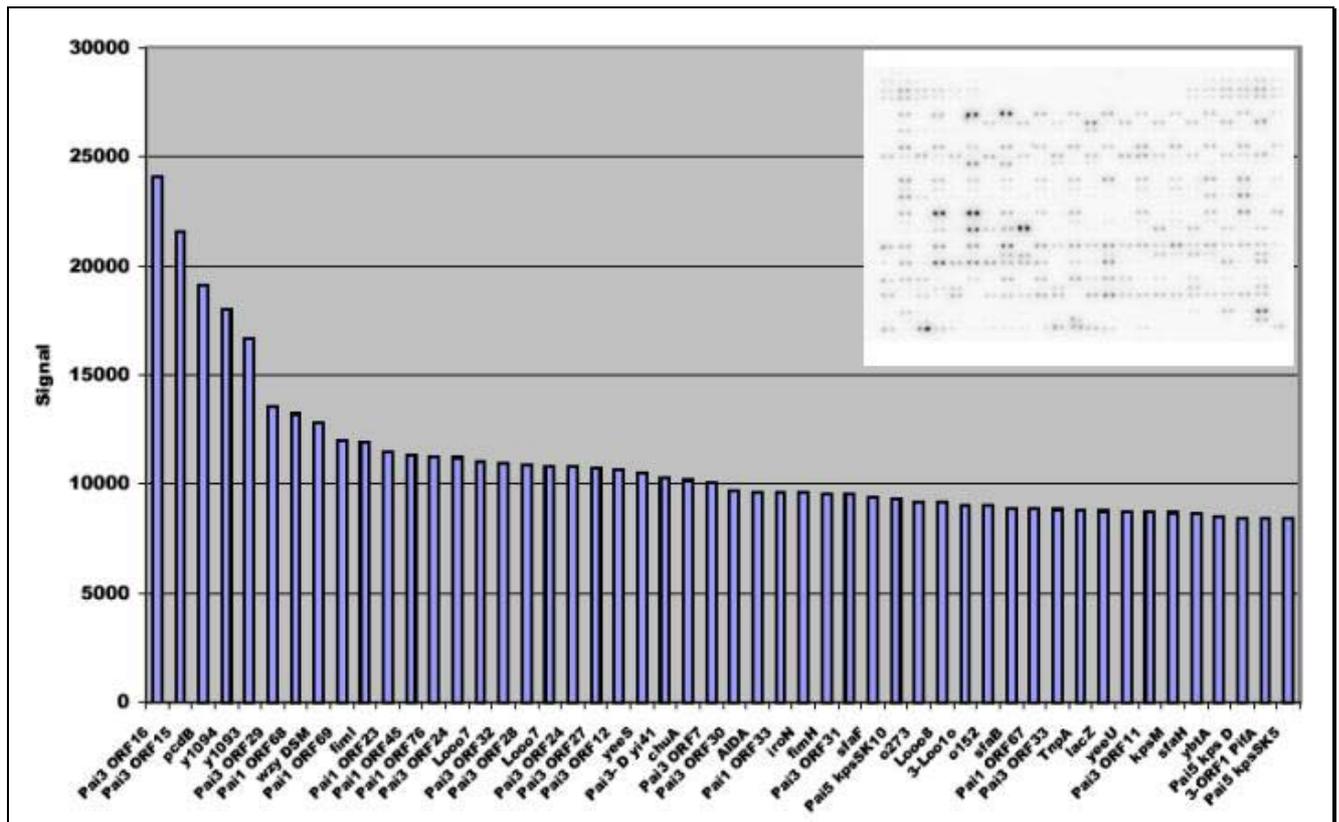


Abb. VI.4: Analyse des Hybridisierungsmusters des „Pathoarrays“ der Deletionsmutante *E. coli* 536-21. Die Signalintensitäten für die 50 Sonden mit den stärksten Signalen sind abgebildet. Der Vergleich mit dem Hybridisierungsmuster von 536 (Abb. VI.3) belegt die genomischen Unterschiede beider Stämme. Die genauere Betrachtung der Daten zeigte, dass im Stamm 536-21 die PAI I₅₃₆ und PAI II₅₃₆ deletiert sind.

Eine nähere Analyse ergab, dass diese Sonden der PAI I₅₃₆ und PAI II₅₃₆ zuzurechnen sind und deshalb durch die markierte DNA der Deletionsmutante folglich keine Hybridisierungssignale mit diesen Sonden auftreten konnten. Dies lässt sich auch anhand eines Schnittmengendiagramms und im Scatterplot erkennen, bei dem der 536 Wildtypstamm mit der Deletionsmutante 536-21 verglichen wurde. Von 918 Sonden wurden für dieses Stammpaar 494 als Positivsignal aus dem Datensatz herausgefiltert. Hiervon waren 221 Signale spezifisch für den Stamm 536, 244 wurden von beiden Stämmen geteilt und bei lediglich 29 wurde ein Positivsignal nur dem Stamm 536-21 zugerechnet. Diese Ergebnisse zeigten eine gute Korrelation mit den erwarteten Resultaten dieses

Kontrollexperimenten. Die Genlisten für die drei Bereiche aus dem Schnittmengendiagramm sind im Anhang aufgeführt. Aus einer detaillierteren Analyse der Genlisten ging hervor, dass erstens die 29 dem Stamm 536-21 spezifisch zugeordneten Gensonden durch falsch-negative Signale des Stammes 536 verursacht wurden; zweitens die 221 spezifischen Signale für den Stamm 536 größtenteils Gene der PAI I₅₃₆ und PAI II₅₃₆ betrafen, welche in der Deletionsmutante 536-21 nicht vorhanden sind; und drittens die Schnittmenge neben wenigen Genen der PAI I₅₃₆ (falsch-positive Signale des Stammes 536-21) hauptsächlich durch Gene der PAI III₅₃₆, PAI IV₅₃₆ und PAI V₅₃₆ sowie Virulenzfaktoren von extraintestinal pathogenen *E. coli* charakterisiert ist. Aus diesen Ergebnissen ließ sich eine Fehlerquote von 5-10 % abschätzen.

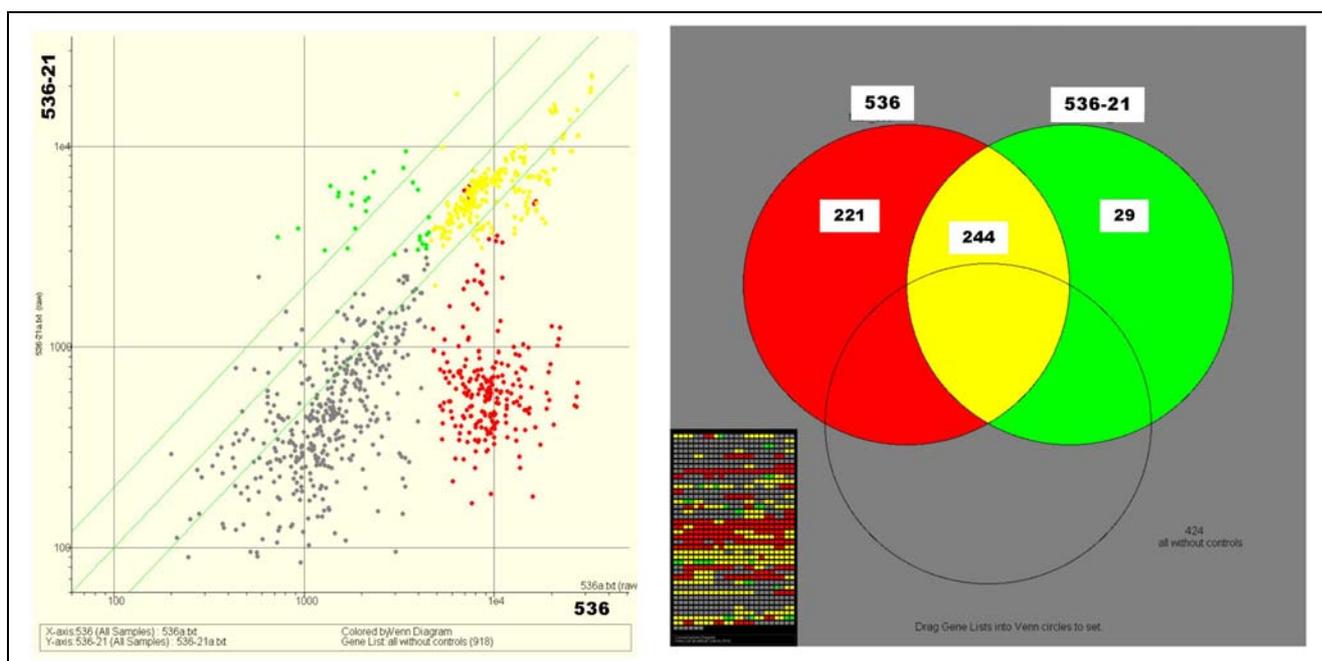


Abb. VI.5: Vergleich der Hybridisierungsmuster des „Pathoarrays“ der Stämme *E. coli* 536 und 536-21. Das Schnittmengendiagramm stellt die Unterschiede und Übereinstimmungen für die Spots dar, welche als Positivsignal für beide Stämme bestimmt wurden. Sonden spezifisch für *E. coli* 536 sind rot dargestellt, Sonden spezifisch für *E. coli* 536 sind grün koloriert und Sonden spezifisch für beide Stämme wurden gelb eingefärbt. Der Scatterplot zeigt den Vergleich der Signalintensitäten beider Datensätze. Signale, die dem Hintergrund zugewiesen wurden, sind grau unterlegt.

VI.1.2.3 Genomanalyse des intestinal pathogenen *E. coli* Isolates EDL 933 mit dem „Pathoarray“

Als Referenz für intestinal pathogene *E. coli* wurde der EHEC Stamm EDL 933, dessen Genomsequenz verfügbar ist, ausgewählt und das Hybridisierungsmuster der gDNA dieses Stammes mit Hilfe des „Pathoarrays“ analysiert. Im Vergleich zum Stamm 536 zeigte das Hybridisierungsmuster dieses Stammes, dass bei jenen Sonden sehr starke Hybridisierungssignale auftraten, die spezifisch für diesen intestinal pathogenen Pathotyp sind. Die Signalintensitäten dieses Stammes sind in der Abbildung (VI.6) dargestellt.

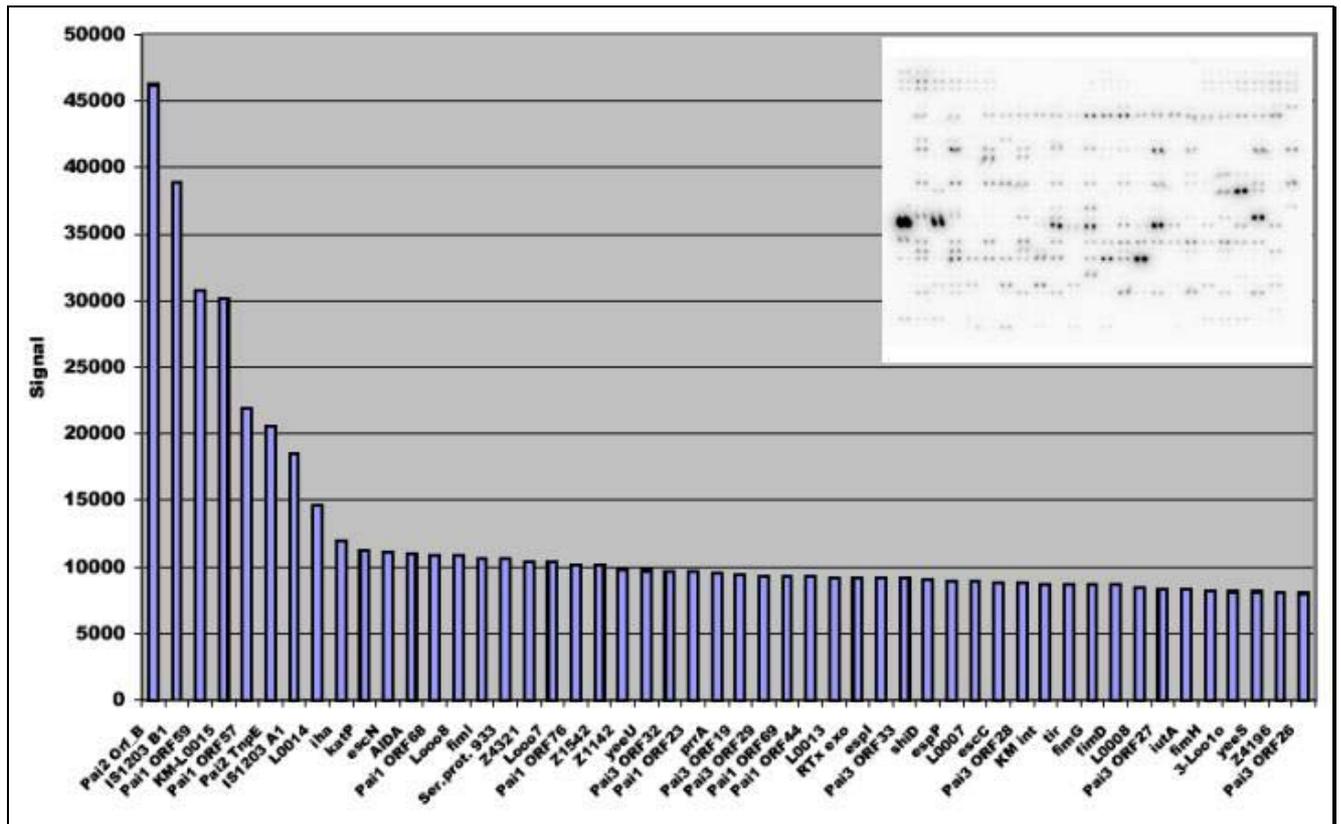


Abb. VI.6: Analyse des Hybridisierungsmusters des „Pathoarrays“ des EHEC Stammes *E. coli* EDL 933. Die Signalintensitäten für die 50 Sonden mit den stärksten Signalen sind abgebildet. Sowohl Gensonden spezifisch für intestinal pathogene *E. coli* als auch für PAIs von extraintestinal pathogenen *E. coli* zeigten starke Hybridisierungssignale mit dem „Pathoarray“.

VI.1.2.4 Genomanalyse des apathogenen Stammes MG1655 mit dem „Pathoarray“

Schließlich wurde noch gDNA des kommensalen, apathogenen Stammes MG1655 mit dem „Pathoarray“ hybridisiert. Dieser Stamm kodiert fast keine Virulenzfaktoren, die als Sonden auf dem „Pathoarray“ verwendet wurden. Aus dem Hybridisierungsmuster war ersichtlich, dass einige Spots Hybridisierungssignale aufwiesen, die deutlich über dem Hintergrundsignal der Membran lagen. Diese offensichtlich falsch positiven Signale waren ein Hinweis auf mögliche Kreuzhybridisierungen, die sich bei einer Sondengröße von 400 bp nicht (zwingend) ausschließen lassen. Die nachfolgende Abbildung (VI.7) mit den 50 stärksten Hybridisierungssignalen unterlegt, dass auch dieser Datensatz neben diesen Kreuzhybridisierungen spezifisch für Gene war, die im Stamm MG1655 vorhanden sind.

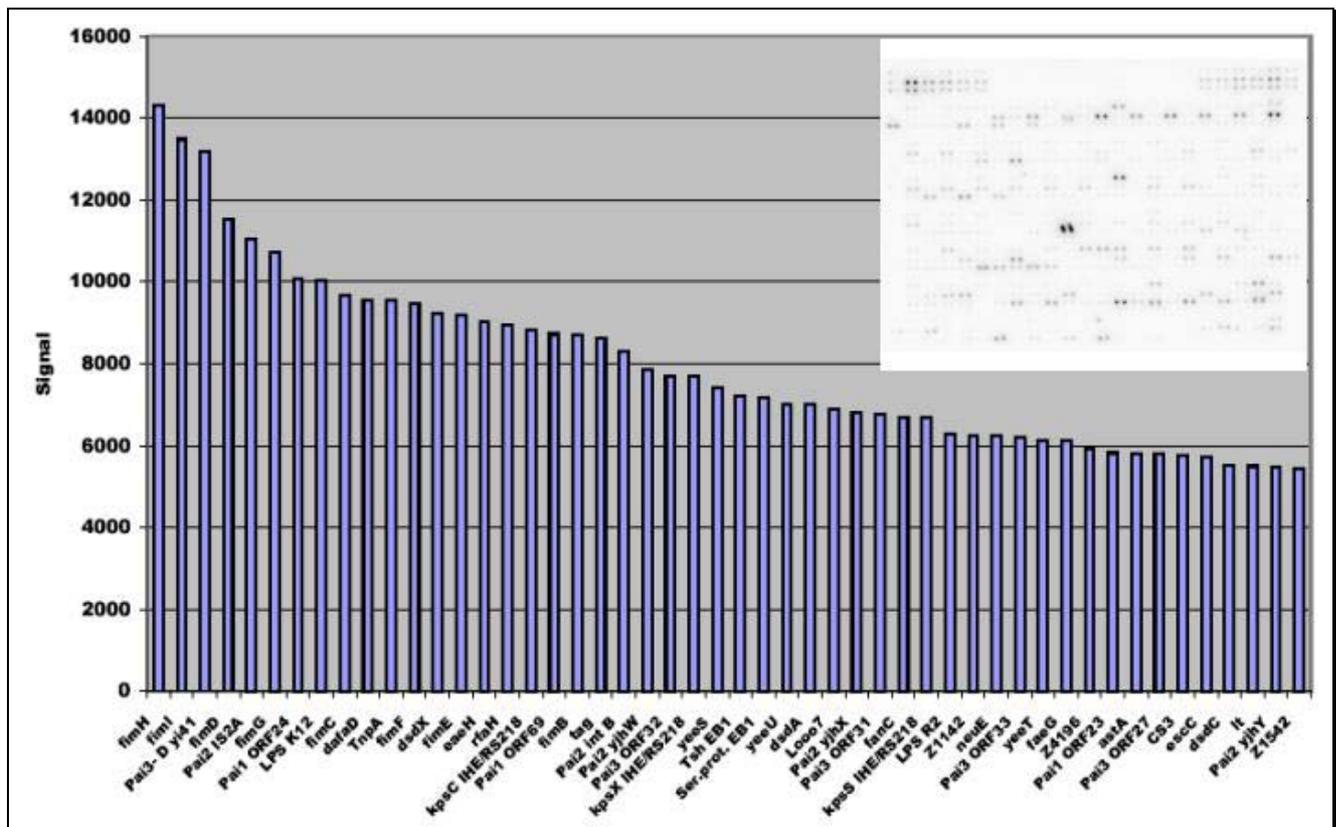


Abb. VI.7: Analyse des Hybridisierungsmusters des „Pathoarrays“ des apathogenen Referenzstammes *E. coli* MG1655 (Negativkontrolle). Die beobachteten Signalintensitäten für diesen Stamm sind erkennbar schwächer im Vergleich zu denen der pathogenen Stämme. Die Signalintensitäten für die 50 stärksten Sonden sind aufgeführt. Eine genauere Auswertung ergab, dass zum Teil Kreuzhybridisierungen mit Sonden auftraten, die aus pathogenen *E. coli* amplifiziert wurden.

VI.1.2.5 Vergleichende Genomanalysen der *E. coli* Stämme 536, EDL 933 und MG1655

Prinzipiell konnte festgestellt werden, dass bei der Analyse von *E. coli* Genomen mit dem „Pathoarray“ eine höhere Stringenz der Filterbedingungen eine größere Zahl falsch-negativer Resultate verursacht und dementsprechend eine geringere Stringenz eine höhere Rate an falsch-positiven Genen zur Folge haben würde. Diese Fehler, die hauptsächlich durch Kreuzhybridisierungen verursacht werden, lassen sich nie komplett ausschließen, jedoch zeigten die ermittelten Signalintensitäten die höchste Spezifität bei den Genomen, welche die entsprechenden Gene kodieren, was durch die vergleichende Analyse der Referenzgenome 536, EDL 933 und MG1655 bestätigt werden konnte. Durch stringente Filterbedingungen ließen sich die Signale den jeweiligen Pathotypen spezifisch zuordnen. Die Darstellung der Ergebnisse aus einer „principal component“-Analyse bestätigte deutlich, dass die Signale exemplarisch ausgewählter Kontroll- und Referenzstämme auf dem „Pathoarray“ in unterschiedlichen Bereichen des dreidimensionalen Raums clustern, somit charakteristisch für bestimmte Stämme sind und sich deshalb auch die genomische Varianz dieser Stämme aus den Hybridisierungsdaten sowohl berechnen als auch darstellen lässt. Werden die Datensätze der Hybridisierungen von gDNA der Stämme *E. coli* 536, MG1655 sowie von EDL 933

mit dem „Pathoarray“ verglichen nachdem charakteristische Filterbedingungen durchgeführt worden sind, wird ersichtlich, dass von den 918 Sonden des „Pathoarrays“, die für die verschiedenen Virulenzfaktoren pathogener *E. coli* auf dem Array integriert wurden, 334 spezifisch für den Stamm 536, 121 für den Stamm EDL 933 und nur sieben spezifisch für den Stamm MG1655 sind. Des Weiteren konnten 115 Sonden bestimmt werden, die sowohl im Genom des extraintestinal pathogenen Stammes 536, als auch im Genom des intestinal pathogenen Stammes EDL 933 positive Hybridisierungssignale aufwiesen. Lediglich vier Sonden hatten positive Hybridisierungssignale in allen drei Stämmen und 324 Spots hybridisierten mit keinen der drei hier verglichenen Stämme. Diese 324 Spots sind, wie eine genauere Analyse ergab, spezifisch für andere Pathotypen, hauptsächlich EAEC, ETEC, EIEC und *Shigella*. Diese Resultate sind im Schnittmengendiagramm in der Abbildung (VI.8) dargestellt. Die Genlisten für die jeweiligen Sonden dieses Diagramms sind im Anhang aufgeführt. Auch die dreidimensionale Überlagerung der Datensätze belegte eine deutlich erkennbare Gruppierung der stammspezifisch zugewiesenen Signale. Dies wurde durch die einzelne Darstellung der erhaltenen Hybridisierungssignale dieser Stämme bestätigt, da alle als positiv definierten Signale sich deutlich von Hintergrund trennen ließen.

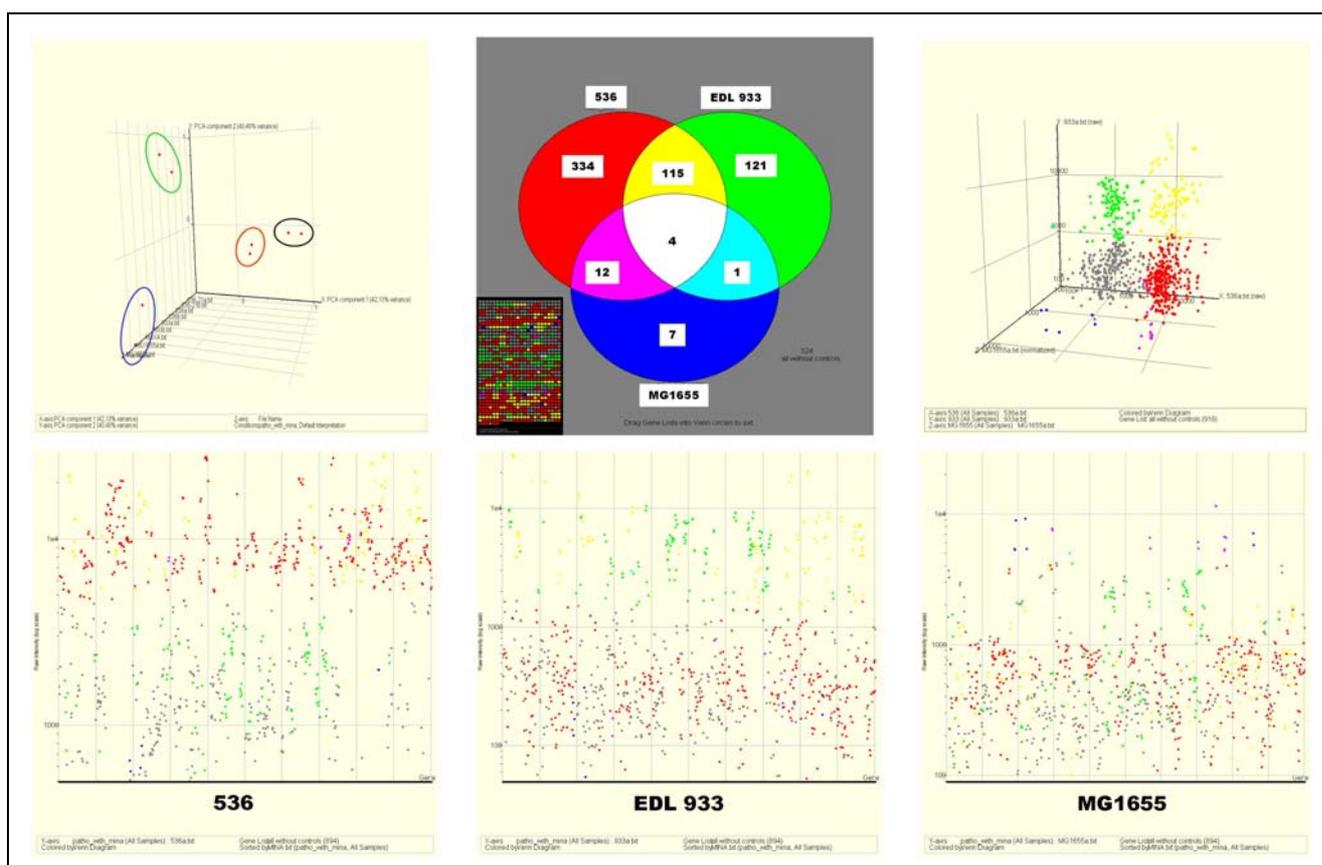


Abb. VI.8: Die „principal component“-Analyse mit den Datensätzen von *E. coli* 536 (*rot*), 536-21 (*schwarz*), EDL 933 (*grün*) und MG1655 (*blau*) stellt die genomische Varianz dieser Stämme graphisch dar. Aus der Schnittmengenanalyse der Hybridisierungssignale des „Pathoarrays“ gehen die Gemeinsamkeiten und Unterschiede für die Stämme 536, EDL 933 und MG1655 hervor. Der dreidimensionale Vergleich dieser Datensätze zeigt die Clusterbildung für die jeweiligen Schnittmengen. Die eindimensionale Darstellung dieser drei Datensätze belegt, dass sich positive Signale durch stringente Filterbedingungen vom jeweiligen Hintergrund separieren lassen.

Legt man diese Resultate zu Grunde, lassen sich zusammenfassend betrachtet mit Hilfe des „Pathoarrays“ durch DNA/DNA-Hybridisierungen vorhandene und nicht vorhandene Virulenzfaktoren verschiedener Stämme bestimmen und unterschiedlichen Pathotypen zuordnen. Trotz auftretender Hintergrundsignale und Kreuzhybridisierungen zeigten die Sonden des „Pathoarrays“ eine hohe Spezifität für die Virulenzgene der jeweiligen Pathotypen. Da auf diesem DNA-Array in der Summe jedoch ungenügend Sonden gespottet sind, die von allen *E. coli* Stämme kodiert werden (Kerngenom), ist die normalerweise übliche Transformation der Signale durch eine Normalisierung auf die Gesamtintensitäten aller Signale nicht sinnvoll, da dies zu starken Verzerrungen der einzelnen Signalintensitäten führen würde. Aus diesem Grund wurden für die hier aufgeführten Analysen die Rohdaten verwendet. Die jeweils kleinsten Intensitäten der Einzelsignale (Minima) von allen analysierten Stämmen wurden als Hintergrund definiert und von den entsprechenden Rohdaten subtrahiert. Beim Design des „Pathoarrays“ wurden alle Gene des *fim*-Genclusters als Positivkontrolle integriert. Die mittlere Signalintensität aller Spots dieses Genclusters diente als Trennlinie für „positiv“ (vorhanden) und „negativ“ (nicht vorhanden). Diese Behandlung ermöglichte eine zuverlässige „Feinjustierung“ der unterschiedlichen Rohdatenintensitäten der einzelnen Hybridisierungen und ergab eine durchgehend hohe Korrelation mit den zu erwartenden Ergebnissen dieser Kontrollexperimente. Die Spezifität der einzelnen Sonden des „Pathoarray“ konnte bestätigt werden.

VI.1.3 Genomanalysen von uropathogenen *E. coli* Isolaten mit dem MG1655-spezifischen DNA-Array

VI.1.3.1 Vergleichende Genomanalysen der uropathogenen Stämme *E. coli* 536, J96, J96-M1, 764 und 764-2 mit dem MG1655-spezifischen DNA-Array

Genomvariabilitäten spielen eine wichtige Rolle bei pathogenen *E. coli*. Neben spezifischen Virulenzfaktoren -hauptsächlich auf PAIs kodiert- haben auch andere im Kerngenom kodierte Faktoren Einfluss auf das Virulenzpotential. Der Einsatz von DNA-Arrays ermöglicht einen einfachen, zügigen Vergleich von klinischen Isolaten und bietet die Möglichkeit, Genomvariabilitäten sowie evolutionäre Anpassungen näher zu studieren. Genomumlagerungen, Deletionen und der Erwerb von mobilen genetischen Elementen durch horizontalen Gentransfer sind die wesentlichen Mechanismen dieser Anpassungen. Neben dem Erwerb neuer Genfunktionen durch Pathogenitätsinseln, Bakteriophagen und Plasmide können auch Deletionen für Veränderungen in den regulatorischen Netzwerken der Zelle verantwortlich sein. Den uropathogenen Stämmen 536, J96 und 764 ist gemein, dass alle drei Stämme genomisch instabile Gencluster besitzen, die für Virulenzfaktoren kodieren. Durch Deletion dieser DNA-Blöcke sind die Stämme 536-21, J96-M1 und 764-2 entstanden. Diese Stämme wurden mit Hilfe des MG1655 spezifischen DNA-Arrays untersucht und miteinander verglichen.

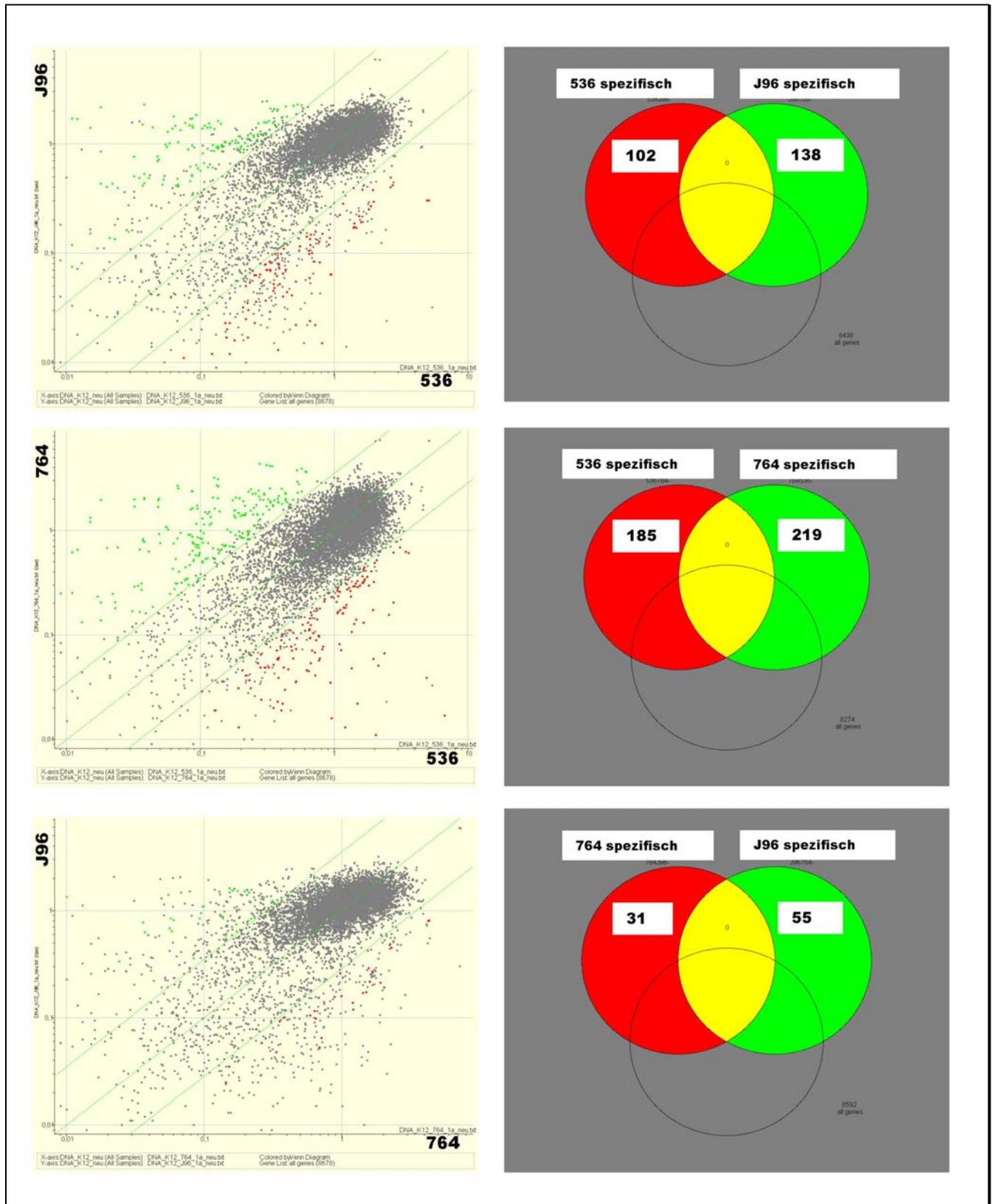


Abb. VI.9: Vergleich der Kerngenome der Stämme 536 und J96, 536 und 764 sowie 764 und J96. Das Kerngenom der analysierten Stämme variiert im Vergleich der Stämme untereinander zwischen 1 und 5 %, legt man zweifach erhöhte Signalintensitäten zu Grunde. Die Stämme J96 und 764 teilen die meisten ORFs (1 % Varianz); das Kerngenom der Stämme 536 und 764 unterschied sich am deutlichsten (5 % Varianz).

Als unterschiedlich (nur in einem Stamm vorhanden) wurden Hybridisierungssignale definiert, die, im Vergleich der Stammpaare untereinander, mindestens zweifach erhöhte Signalintensitäten aufwiesen. Der Vergleich zeigte, dass sich das Kerngenom aller drei Stämme nur unwesentlich voneinander unterscheidet. Die geringsten Unterschiede wurden beim Vergleich von J96 mit 764 beobachtet. Bei diesem Stammpaar wurden 15 bzw. 27 ORFs als nichtvorhanden aus dem Datensatz gefiltert. Dies entspricht ca. 1 % vom Kerngenom. Die deutlichsten Unterschiede wurden beim Stammpaar 536 / 764 festgestellt. 90 bzw. 110 ORFs (ca. 5 % vom Kerngenom) hatten hier mindestens doppelt so starke Signalintensitäten im Vergleich beider Stämme. Beim Vergleich von 536 mit J96 waren dies nur 51 bzw. 74 ORFs und damit ca. 3 % vom Kerngenom. Diese Gene beinhalteten IS-Elemente, Transportproteine, Enzyme, regulatorische Proteine, Faktoren für die Zellmembran, DNA-Reparaturproteine sowie ORFs mit bislang unbekannter Funktion.

Des Weiteren wurde das Kerngenom der Deletionsmutanten J96-M1 und 764-2 mit dem MG1655-spezifischen DNA-Array untersucht und mit den Ursprungsstämmen J96 und 764 verglichen. Diese Analysen sind in der Abbildung (VI.10) dargestellt. Im Vergleich der Stammpaare 764 / 764-2 und J96 / J96-M1 konnten nahezu keine Unterschiede der kodierenden Bereiche des Kerngenoms festgestellt werden. Das Stammpaar J96 / J96-M1 unterschied sich anhand des Hybridisierungsmusters nur durch ORF b1374, einem Genabschnitt mit Homologie zu Sequenzen von Bakteriophagen. Beim Vergleich des Paares 764 / 764-2 konnten nur unwesentlich mehr Unterschiede beobachtet werden: acht bzw. zehn Spots wurden aus diesem Datensatz gefiltert. Die Sequenzen dieser ORFs zeigten ebenfalls Homologien zu Sequenzen von Bakteriophagen.

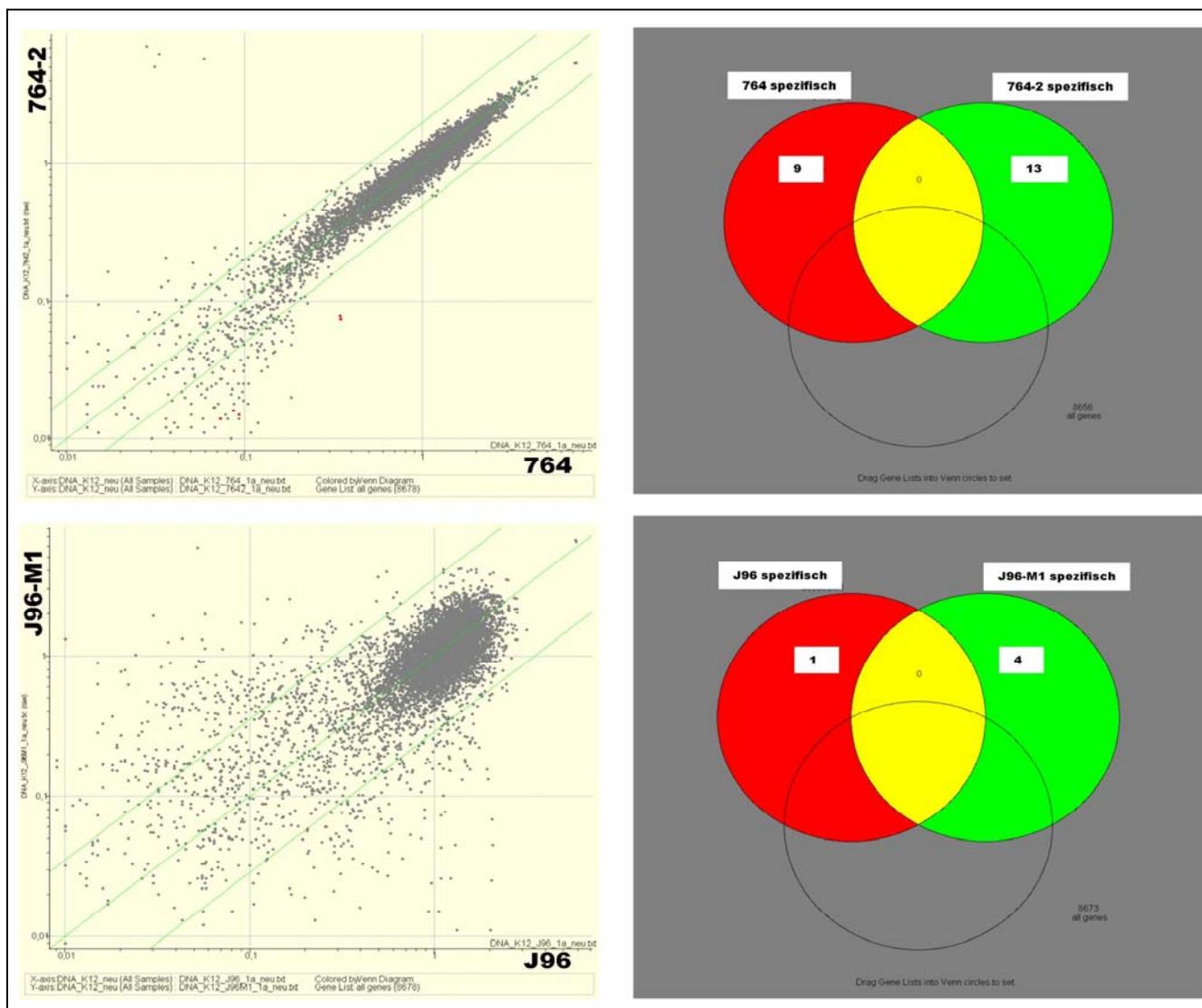


Abb. VI.10: Vergleich der Kerngenome der Stämme J96 und 764 mit den jeweiligen Deletionsmutanten J96-M1 und 764-2. Das Kerngenom der Deletionsmutanten variiert im Vergleich mit den Ursprungstämmen nur minimal. Einige ORFs mit Homologie zu Bakteriophagenen wurden als einziger Unterschied festgestellt.

VI.1.4 Zusammenfassung des Abschnitts „Genomanalysen“

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein DNA-Array mit spezifischen Virulenzfaktoren von pathogenen *E. coli* hergestellt. Dieser „Pathoarray“ umfasste den flexiblen Bereich des Genoms von *E. coli*. Als Sonden wurden alle bis dato bekannten Virulenzfaktoren von extraintestinal pathogenen *E. coli* und die bekanntesten Virulenzfaktoren intestinal pathogener *E. coli* verwendet. Durch die Analyse verschiedener Referenzstämmen konnte gezeigt werden, dass die Sonden spezifisch mit gDNA von verschiedenen *E. coli* Pathotypen hybridisieren. Trotz zum Teil auftretender Kreuzhybridisierungen ließen sich verschiedene *E. coli* Isolate mit diesem DNA-Array klassifizieren und die kodierten Virulenzfaktoren auf diesem Weg bestimmen.

Zusammen mit einem DNA-Array für das Kerngenom (K-12 Array) können die Genome von verschiedenen *E. coli* Isolaten näher charakterisiert werden. Auf diesem Wege wurde bestätigt, dass sich die Kerngenome der uropathogenen Stämme 536, J96 und 764 nicht wesentlich voneinander unterscheiden.

Ein Vergleich dieser uropathogenen *E. coli* mit Derivaten, die PAI-Deletionen haben belegte, dass sich das Kerngenom dieser Derivate nicht von den Ursprungsstämmen unterscheidet. Diese Beobachtung untermauert die Tatsache, dass die Deletion von PAIs spezifisch erfolgt und (daraus schließend) einem besonderen Mechanismus unterliegen sollte. Zudem bestätigen diese Beobachtungen die Modellvorstellung von der Erweiterung des Kerngenoms mit mobilen DNA-Elementen über horizontalen Gentransfer.

VI.2 Untersuchungen zur Biofilmbildung

VI.2.1 Analyse der Biofilmbildung verschiedener *E. coli* Derivate

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war, die Expression und Regulation von Genen zu untersuchen, die Einfluss auf die Ausbildung von Biofilmen haben.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe J.-M. Ghigo vom Institut Pasteur (Paris) wurden verschiedene Derivate des Stammes *E. coli* 536 hinsichtlich ihres Biofilm-Phänotyps getestet.

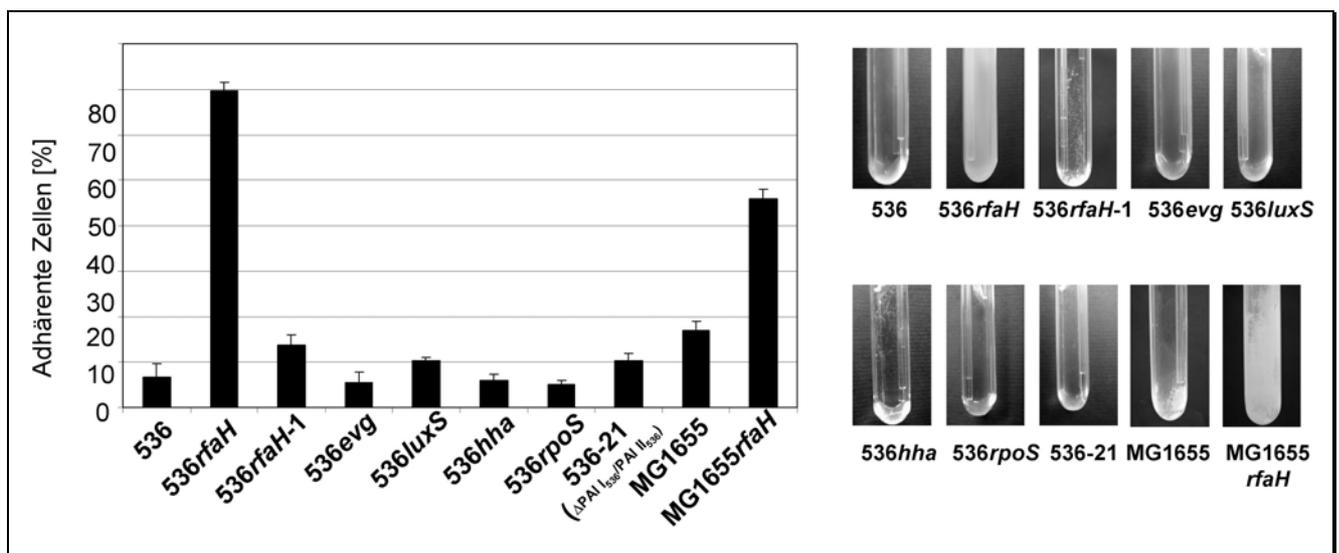


Abb. VI.11: Biofilmbildung verschiedener *E. coli* 536 Derivate sowie von MG1655 und MG1655*rfaH*. Die Abbildungen der Biofilmkammern und die graphische Darstellung belegen eine verstärkte Biofilmbildung der Mutanten *E. coli* 536*rfaH* und MG1655*rfaH*. (© Jean-Marc Ghigo, Institut Pasteur, Paris)

Aus der Abbildung (VI.11) ist ersichtlich, dass eine Inaktivierung von *rfaH* im Stamm 536 einen signifikant positiven Einfluss auf die Biofilmbildung hatte. Dieser Effekt konnte auch beim *E. coli* Stamm MG1655*rfaH* beobachtet werden. Im Stamm 536 führte die Inaktivierung des *rfaH* Gens zu einer zehnfach besseren Adhärenz an Glasoberflächen. Die Adhärenz von Zellen des Stammes MG1655*rfaH* war im Vergleich zum Wildtyp um das Dreifache erhöht. Diese Beobachtungen kennzeichneten RfaH als einen Repressor der Biofilmbildung. Sie lassen aber auch darauf schließen, dass in beiden Stämmen qualitative und quantitative Unterschiede vorhanden sein sollten, die Einfluss auf den Biofilm-Phänotyp haben.

VI.2.2 Transkriptomanalysen mit Hinblick auf die Biofilmbildung von *rfaH* Derivaten

VI.2.2.1 Optimierung des Protokolls für die Transkriptomanalyse

Um auf Transkriptionsebene nach Unterschieden in der Genexpression zwischen den Stämmen 536 und 536*rfaH* zu suchen, die für die verstärkte Biofilmbildung verantwortlich sein könnten, sollten mit dem kommerziell erwerbbaeren K-12 Array in Kombination mit dem *E. coli* „Pathoarray“ Transkriptionsanalysen durchgeführt werden.

Die bis dato in der Literatur beschriebenen Beispiele für Expressionsprofilanalysen beschränkten sich in erster Linie auf eukaryotische Systeme und waren auf DNA-Arrays von Prokaryoten nicht übertragbar, weil dort die cDNA mit Hilfe von Primern synthetisiert wird, die spezifisch an den poly-A-tail der eukaryotischen mRNA binden. Eine Polyadenylierung von mRNA in Prokaryoten wurde zwar beschrieben, findet jedoch nicht für alle Transkripte gleichermaßen statt (O'Hara *et al.*, 1993; Szalewska-Palasz *et al.*, 1998; Wrobel *et al.*, 1998). Sie ist abhängig von der Wachstumsphase, destabilisiert die Transkripte und betrifft lediglich einen geringen Anteil der gesamten mRNA-Population (Jasiecki und Wegrzyn, 2003; Wegrzyn, 2005). In veröffentlichten prokaryotischen Expressionsstudien wurden kommerziell erwerbbaere ORF-spezifische Primer-Gemische verwendet, die einerseits sehr kostenintensiv sind und auch nur für bereits vollständig sequenzierte Organismen verfügbar waren. Eine Verwendung dieser Primer-Sets für Expressionsstudien mit *E. coli* 536 hätte zu Ungenauigkeiten geführt und im besonderen die ORFs schlechter markiert, welche auf PAIs kodiert sind.

Durch verschiedene Vorversuche wurde ein Protokoll zur Expressionsanalyse mit DNA-Arrays schrittweise optimiert. In diesem Zusammenhang erwies sich das eingesetzte Verhältnis von Zufallshexamerprimern zu mRNA als besonders kritisch für die Markierungsreaktion.

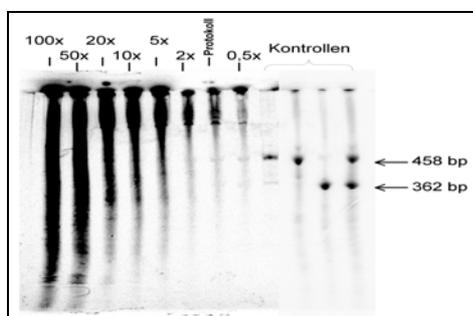


Abb. VI.12: Optimierung der reversen Transkription für die Markierung von cDNA für „expression profiling“-Experimente. Polyacrylamidgel mit radioaktiv markierter cDNA. Die Banden bei 458 bp und 362 bp wurden durch reverse Transkription mit 16S rRNA- und 23S rRNA-spezifischen Primern erhalten und dienten als Größenstandard. Das eingesetzte Verhältnis von mRNA und Zufallshexamerprimern hat sich als kritisch erwiesen.

Wie die Abbildung (VI.12) zeigt, führte erst der Einsatz der hundertfachen Menge an Zufallshexamerprimern (bezogen auf die Mengenangaben des Herstellers) zu einer effizienten Markierung der cDNA nach reverser Transkription. Die Markierungseffizienz lag nach

Berücksichtigung des optimierten Verhältnisses von Zufallshexamerprimer zu „template“-RNA bei über 90%. Eine Hybridisierung der DNA-Arrays mit cDNA nach Anwendung des verbesserten Protokolls führte schließlich zu Signalintensitäten, die die Auswertung der Expressionsprofile ermöglichte.

VI.2.2.2 Analyse des Einflusses von RfaH auf die Genexpression im Stamm *E. coli* 536 bei 37 °C in der logarithmischen Wachstumsphase

Im Gegensatz zu *E. coli* 536 ist *536rfaH* ein starker Biofilmbildner. Um RfaH-abhängig regulierte Gene zu identifizieren, wurden die Transkriptome beider Stämme in der logarithmischen Wachstumsphase bei 37 °C bestimmt und miteinander verglichen.

Werden die cDNA-Hybridisierungen mit der MG1655-spezifischen Membran von *E. coli* 536 und *536rfaH* direkt miteinander verglichen, sind prinzipiell keine starken Unterschiede festzustellen. Dies ist auch aus dem Scatterplot und der Signalüberlagerung beider Hybridisierungen in der Abbildung (VI.13) erkennbar.

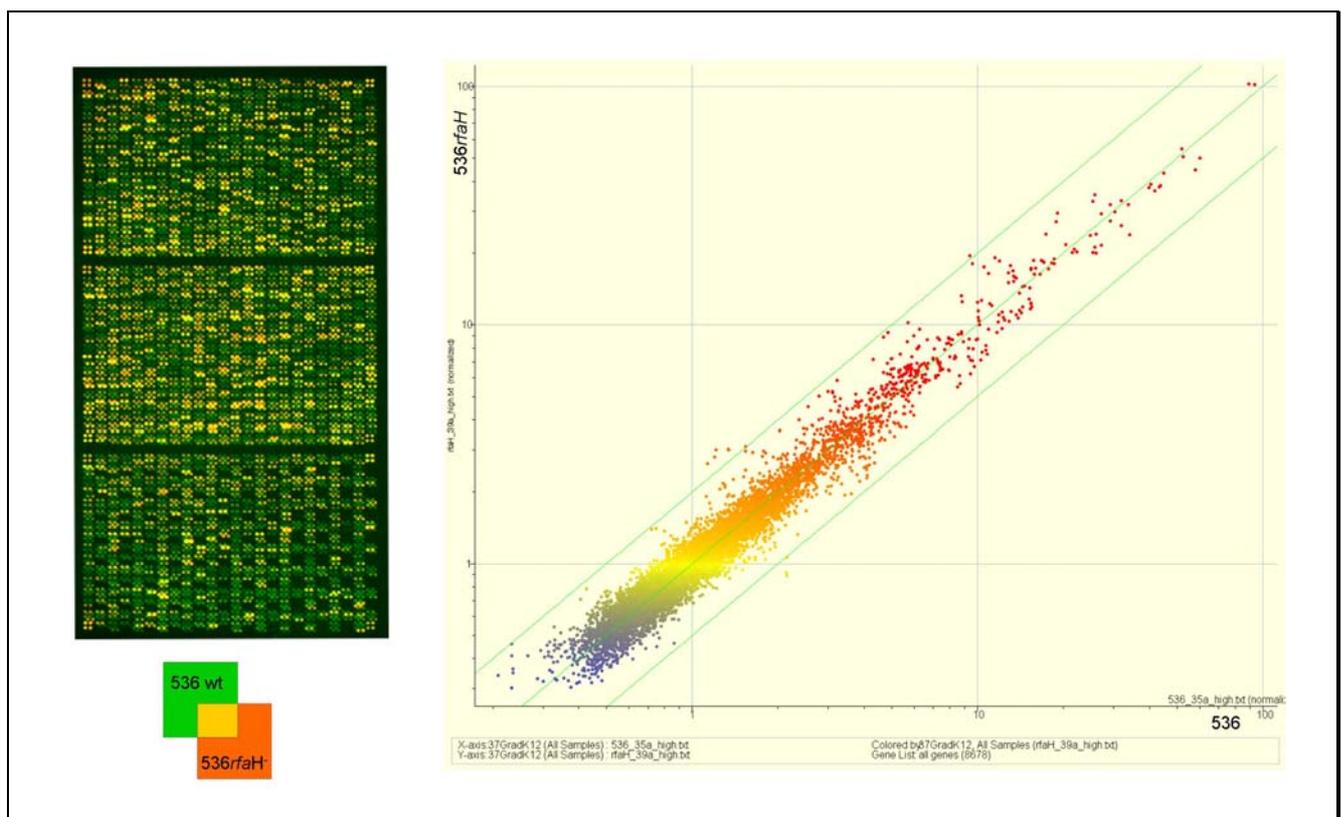


Abb. VI.13: Vergleich der Transkriptome von 536 und *536rfaH* bei 37 °C in der logarithmischen Wachstumsphase mit der MG1655-spezifischen Membran. Dargestellt ist eine Falschfarbenüberlagerung beider Hybridisierungsmuster und der Scatterplot. Die Transkriptome sind sehr ähnlich. Als signifikant unterschiedlich wurde die Expression von *cpsG* (induziert im Wildtyp) und *agn43* (reprimiert im Wildtyp) gefunden.

Mit Hilfe von Programmen zur Array-Datenanalyse (*Arrayvision* (Imaging Research), *Expressionist* (Genedata), *GeneSpring* (Silicon Genetics)) konnten lediglich nur zwei Gene identifiziert werden, die

beim Vergleich aller untersuchten Hybridisierungsmuster signifikant unterschiedlich exprimiert waren. In *E. coli* 536 war die (nahezu identische) Phosphomannomutase des Colansäure-Operons (*cpsG*) bzw. LPS-Operons (*manB*) und in *536rfaH* ein autoaggregierendes Protein der äußeren Membran (*b2000*, *flu*, *sap*, *agn43*) mehr als zweifach stärker exprimiert. Durch den Vergleich mit den Signalintensitäten von gDNA (als Referenz) wurde ermittelt, dass beide Gene insgesamt relativ schwach exprimiert sein sollten, da das Signal/Referenz-Verhältnis beider Gene im Vergleich zu anderen Transkripten sehr niedrig war.

Neben den Genen, die im Kerngenom kodiert sind und mit der MG1655-spezifischen Membran analysiert wurden, kodiert der Stamm 536 zahlreiche Gene auf PAIs. Die Transkriptmengen dieser Gene wurden mit Hilfe des „Pathoarrays“ bestimmt. In der Abbildung (VI.14) sind der Scatterplot und die Signalüberlagerung beider Transkriptome mit dem „Pathoarray“ dargestellt.

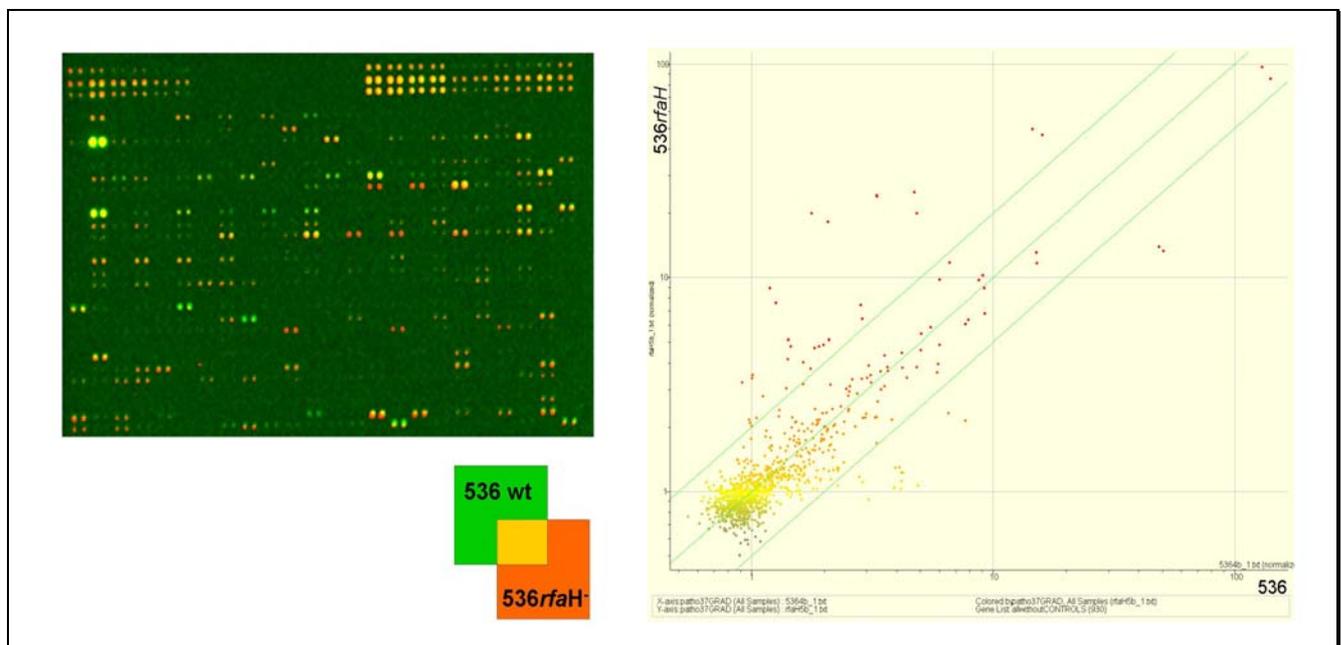


Abb. VI.14: Vergleich der Transkriptome von 536 und *536rfaH* bei 37 °C in der logarithmischen Wachstumsphase mit dem „Pathoarray“. Dargestellt ist eine Falschfarbenüberlagerung beider Hybridisierungsmuster und der Scatterplot. Die Transkriptome der PAI-kodierten Gene unterschieden sich stärker als die des Kerngenoms. Im Wildtyp wurden insbesondere Gene des Hämolyisin-Operons stärker exprimiert. In der *rfaH* Mutante waren die Gene der beiden *agn43* Varianten und Gene des Yersiniabaktin-Operons am stärksten induziert.

Im Gegensatz zu den Transkriptomen des Kerngenoms von 536 und *536rfaH*, wo nur wenige Unterschiede bemerkt wurden, waren bei der Expression von Genen der Pathogenitätsinseln mehrere signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante feststellbar. Beide auf PAI III₅₃₆ bzw. PAI V₅₃₆ kodierten *agn43* Varianten wurden neben Genen des Yersiniabaktin-Operons in *536rfaH* im Vergleich zum Wildtyp am stärksten induziert. Reprimiert waren in *536rfaH* insbesondere Gene des α -Hämolyisin-Operons sowie eine putative DNA-Methyltransferase *ORF35*_{PAI II} („Pathoarray“-Bezeichnung „PAI2 ORF1“), eine *IS100* Transposase (*pcdA*) und der Häm-Rezeptor *chuA*.

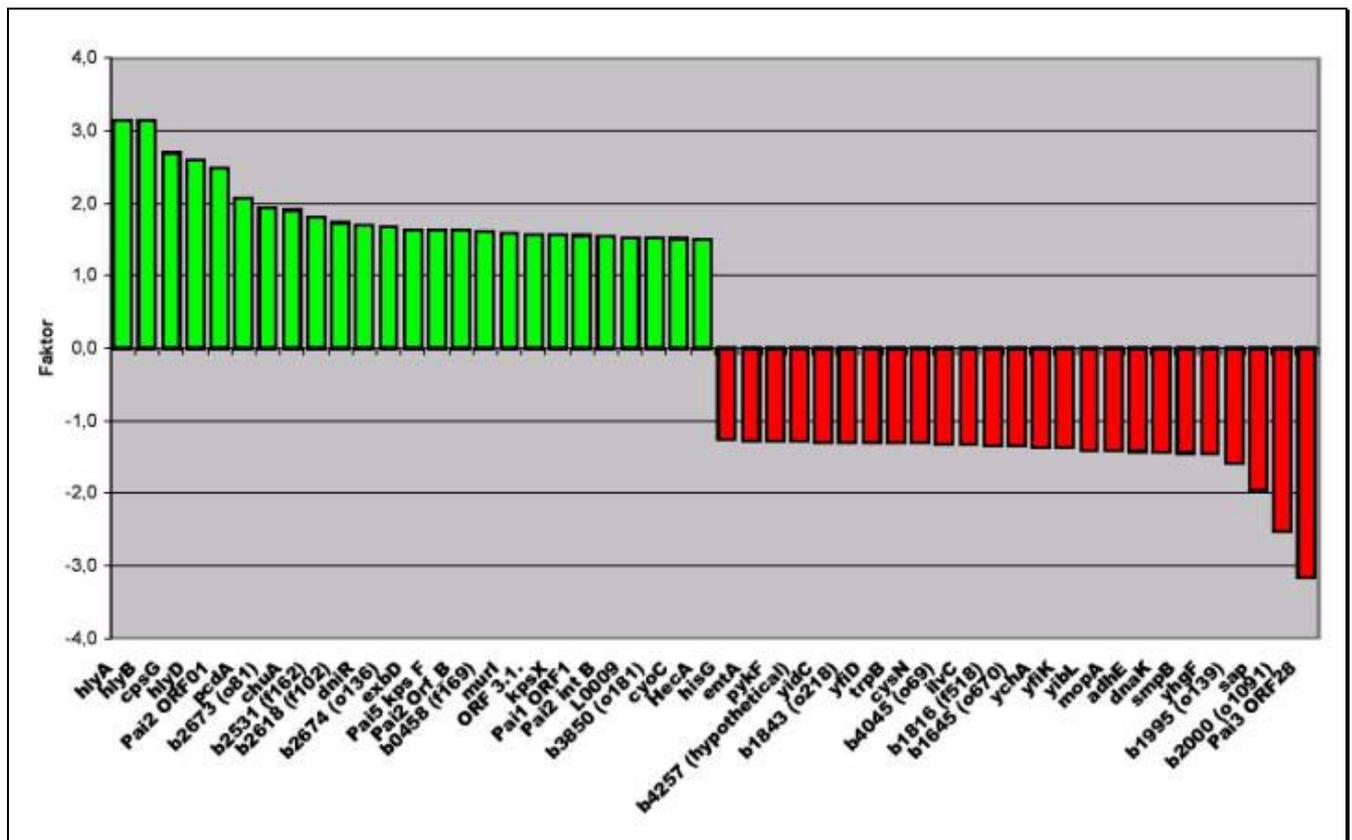


Abb. VI.15: Zusammenstellung der 25 am stärksten induzierten und die 25 am stärksten reprimierten Gene der Transkriptomanalyse mit dem K-12 Array und dem „Pathoarray“ von 536 (grün) im Vergleich zu 536*rfaH* (rot) während der logarithmischen Wachstumsphase bei 37 °C. Gene des Yersiniabaktin-Operons (*irp1*, *irp2*, *irp3*, *irp5*, *ybtQ*, *ybtP*) sind, obwohl signifikant in 536*rfaH* induziert, in dieser Darstellung nicht enthalten (Faktor < 1,35).

Werden die 25 am stärksten induzierten bzw. reprimierten Gene dieses Vergleichs in Kategorien unterteilt, so lassen sich 16 Gene den flexiblen DNA-Bereichen des Stammes 536 zuordnen. Die anderen Gene gehören zum Kerngenom und können in folgende Kategorien unterteilt werden: 15 Gene sind bislang nicht klassifiziert worden. Die drittgrößte Gruppe umfasste fünf Gene, welche Funktionen des Energiemetabolismus kodieren. Des Weiteren kodieren vier Gene die Biosynthese von Kofaktoren, drei Gene die Synthese von Aminosäuren, zwei Gene für Stoffwechsel und außerdem waren noch Faktoren aus verschiedenen anderen Kategorien (innere Membran, Murein-Sacculus, äußere Membran, Chaperon und Transport) unter den 50 am stärksten deregulierten Genen zu finden. Von den deregulierten Genen könnten insbesondere Gene für Funktionen der äußeren Zellhülle die Biofilmbildung beeinflussen.

Tab. VI.1: Genliste der 25 am stärksten induzierten und die 25 am stärksten reprimierten Gene von 536 und 536*rfaH* bei 37 °C mit Funktion und Accession-Nummer.

Gen	Faktor	"Patho- Array"	K12- Array	Genfunktion	b#	Gengruppe	Accession-Nr.
<i>hlyA</i>	3,1	+		α -Hämolyisin		Pathogenitätsinsel	
<i>hlyB</i>	3,1	+		α -Hämolyisin Sekretion		Pathogenitätsinsel	
<i>epsG</i>	2,7		+	Phosphomannomutase	b2048	Zentraler Metabolismus	AE000295
<i>hlyD</i>	2,6	+		α -Hämolyisin Sekretion		Pathogenitätsinsel	
<i>PAI2 ORF01</i>	2,5	+		put. Methyltransferase		Pathogenitätsinsel	
<i>pcdA</i>	2,1	+				Pathogenitätsinsel	
b2673	1,9		+	hypotetisch	b2673	nicht klassifiziert	AE000352
<i>chuA</i>	1,9	+		Hämin-Rezeptor		Pathogenitätsinsel	
b2531	1,8		+	hypotetisch	b2531	nicht klassifiziert	AE000339
b2618	1,7		+	hypotetisch	b2618	nicht klassifiziert	AE000347
<i>dniR</i>	1,7		+	regulatorisches Protein	b0211	Energiemetabolismus	AE000130
b2674	1,7		+	hypotetisch	b2674	nicht klassifiziert	AE000352
<i>exbD</i>	1,6		+	Biopolymer-Transport ExbD	b3005	Transportproteine	AE000383
<i>PAI5 kps F</i>	1,6	+		K15 Kapsel		Pathogenitätsinsel	
<i>PAI2 Orf_B</i>	1,6	+				Pathogenitätsinsel	
b0458	1,6		+	hypothetisch	b0458	nicht klassifiziert	AE000152
<i>murI</i>	1,6		+	Glutamatracemase	b3967	Zellstruktur	AE000471
<i>ORF 3.1.</i>	1,6	+				Pathogenitätsinsel	
<i>kpsX</i>	1,6	+		K15 Kapsel		Pathogenitätsinsel	
<i>PAI1 ORF1</i>	1,6	+				Pathogenitätsinsel	
<i>PAI2 int B</i>	1,5	+		P4 ähnliche Integrase		Pathogenitätsinsel	
<i>L0009</i>	1,5	+				Pathogenitätsinsel	
b3850	1,5		+	hypothetisch	b3850	nicht klassifiziert	AE000460
<i>eyoC</i>	1,5		+	Cytochromoxidase Untereinheit III	b0430	Energiemetabolismus	AE000149
<i>HecA</i>	1,5	+				Pathogenitätsinsel	
<i>hisG</i>	-1,3		+	ATP-Phosphoribosyltransferase	b2019	Aminosäurebiosynthese und Metabolismus	AE000293
<i>entA</i>	-1,3		+	(2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate)-Dehydrogenase	b0596	Biosynthese von Kofaktoren	AE000165
<i>pykF</i>	-1,3		+	Pyruvatkinase	b1676	Energiemetabolismus	AE000262
b4257	-1,3		+	hypothetisch	b4257	nicht klassifiziert	AE000496
<i>yidC</i>	-1,3		+	60 kD Protein	b3705	nicht klassifiziert	AE000447
b1843	-1,3		+	hypothetisch	b1843	nicht klassifiziert	AE000278
<i>yfiD</i>	-1,3		+	hypothetisch	b2579	Energiemetabolismus	AE000344
<i>trpB</i>	-1,3		+	Tryptophansynthese beta-Kette	b1261	Aminosäurebiosynthese and Metabolismus	AE000224
<i>eysN</i>	-1,3		+	ATP-Sulfatadenyltransferase	b2751	Zentraler Metabolismus	AE000358
b4045	-1,3		+	hypothetisch	b4045	nicht klassifiziert	AE000478
<i>ilvC</i>	-1,3		+	Ketolsäure-Isomerase	b3774	Aminosäurebiosynthese und Metabolismus	AE000454
b1816	-1,3		+	hypothetisch	b1816	nicht klassifiziert	AE000276
b1645	-1,3		+	hypothetisch	b1645	nicht klassifiziert	AE000259
<i>ycaA</i>	-1,4		+	hypothetisch	b1214	nicht klassifiziert	AE000219
<i>yfiK</i>	-1,4		+	hypothetisch	b2578	nicht klassifiziert	AE000344
<i>yibL</i>	-1,4		+	hypothetisch	b3602	nicht klassifiziert	AE000438
<i>mopA</i>	-1,4		+	Molybdopteringuaninedinukleotid-Biosynthese Protein A	b3857	Biosynthese von Kofaktoren	AE000461
<i>adhE</i>	-1,4		+	Alkohol/Acetaldehydedehydrogenase	b1241	Energiemetabolismus	AE000222
<i>dnaK</i>	-1,4		+	Hitzeschockprotein 70	b0014	zelluläre Prozesse (Adaptation. Schutz)	AE000112
<i>smpB</i>	-1,4		+	kleines B-Protein	b2620	nicht klassifiziert	AE000347
<i>yhgF</i>	-1,5		+	hypothetisch	b3407	nicht klassifiziert	AE000416
b1995	-1,6		+	hypothetisch	b1995	nicht klassifiziert	AE000291
<i>sap</i>	-2,0	+		Antigen 43		Pathogenitätsinsel	
b2000	-2,5		+	<i>flu</i> , Antigen43	b2000	äußeres Membranprotein	AE000291
<i>PAI3 ORF28</i>	-3,2	+		Antigen 43		Pathogenitätsinsel	

VI.2.2.3 Analyse des Einflusses von RfaH auf die Genexpression im Stamm *E. coli* 536 bei 30 °C in der logarithmischen Wachstumsphase

Auch die Transkriptome der logarithmischen Wachstumsphase bei 30 °C von *E. coli* 536 und *536rfaH* wurden bestimmt und miteinander verglichen. In Analogie zu den Experimenten bei 37 °C konnten nur kleinere Unterschiede beim Vergleich der beiden Transkriptome beobachtet werden. Die Scatterplots in der Abbildung (VI.16) bestätigen die relativ gute Korrelation beider Transkriptome.

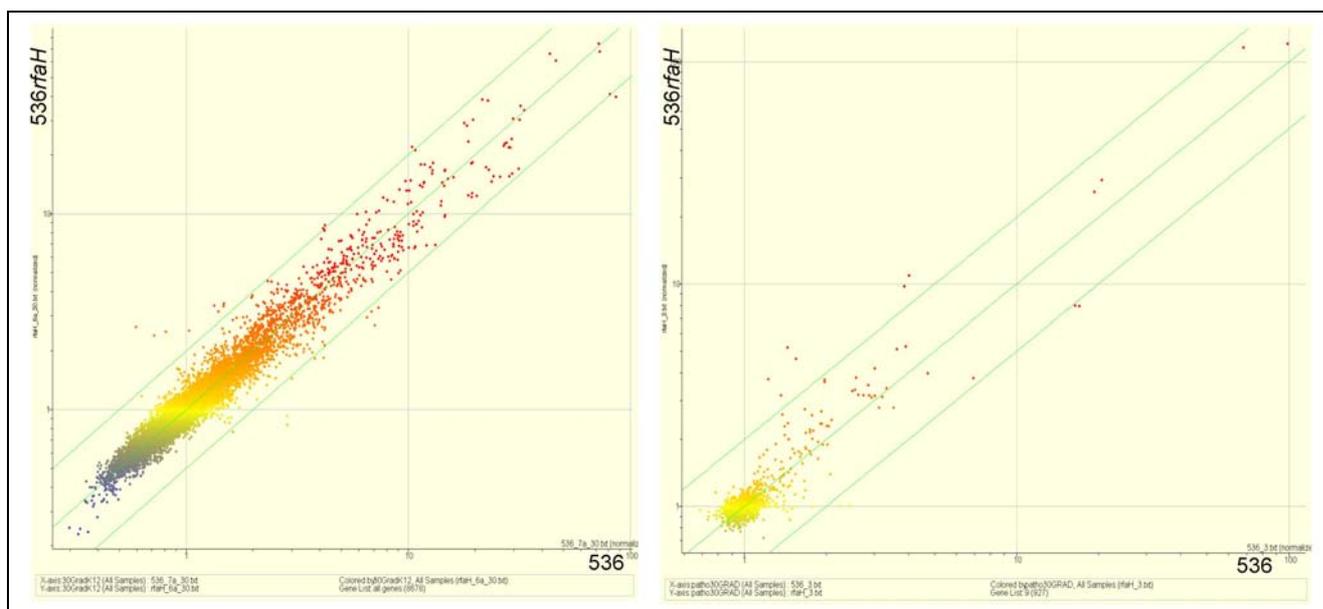


Abb. VI.16: Vergleich der Transkriptome von 536 und *536rfaH* bei 30 °C in der logarithmischen Wachstumsphase anhand von Scatterplots. Wie bereits bei den Experimenten bei 37 °C beobachtet, unterschieden sich die Transkriptome nicht wesentlich.

Die jeweils 25 am stärksten induzierten und reprimierten Genprodukte aus den Hybridisierungen von 536 bzw. *536rfaH* mit dem MG1655-spezifischen DNA-Array und dem „Pathoarray“ sind im Diagramm in der Abbildung (VI.17) aufgeführt.

In Analogie zu den Messungen bei 37 °C zeigte *E. coli* 536 im Vergleich zu *536rfaH* auch bei 30 °C eine stärkere Expression der Phosphomannomutase *cpsG*. Der bislang nicht klassifizierte ORF b0667 und Gene des α -Hämolyisin-Operons wurden im 536 Wildtyp ebenfalls stärker exprimiert. Allerdings war der Unterschied in der α -Hämolyisin-Expression nicht mehr so signifikant wie bei der höheren Temperatur. Die Expression von Antigen 43 („Pathoarray“-Bezeichnung „PAI3 ORF28“) wurde -wie bei 37 °C bereits beobachtet- in *536rfaH* am stärksten induziert. Des Weiteren zeigten neben Genen des Yersiniabaktin-Operons noch *osmC*, ein Gen, dessen Expression zur Adaptation an osmotischem Stress induziert wird und der bislang nicht klassifizierte ORF b1481 eine signifikant stärkere Expression in *536rfaH*.

Von den 50 am stärksten deregulierten Genen sind 17 auf Pathogenitätsinseln kodiert. Die anderen auf dem Kerngenom kodierten Faktoren wurden in folgende Gruppen gegliedert: sieben Gene sind bislang nicht charakterisiert, fünf kodieren Faktoren für bestimmte zelluläre Prozesse wie die Adaptation an

besondere Bedingungen, fünf weitere Gene kodieren Translationsfaktoren, drei für DNA-Replikation und Modifikation, drei weitere zentrale Stoffwechselfaktoren und weitere vier kodieren für Transportfunktionen. Außerdem waren noch Faktoren für die Synthese von Aminosäuren, Kofaktoren, Zellstruktur und Nukleotid-Biosynthese dereguliert. Aus der genaueren Betrachtung der deregulierten Gene konnte keine Hypothese aufgestellt werden, die die verstärkte Biofilmbildung von *536rfaH* erklären könnte.

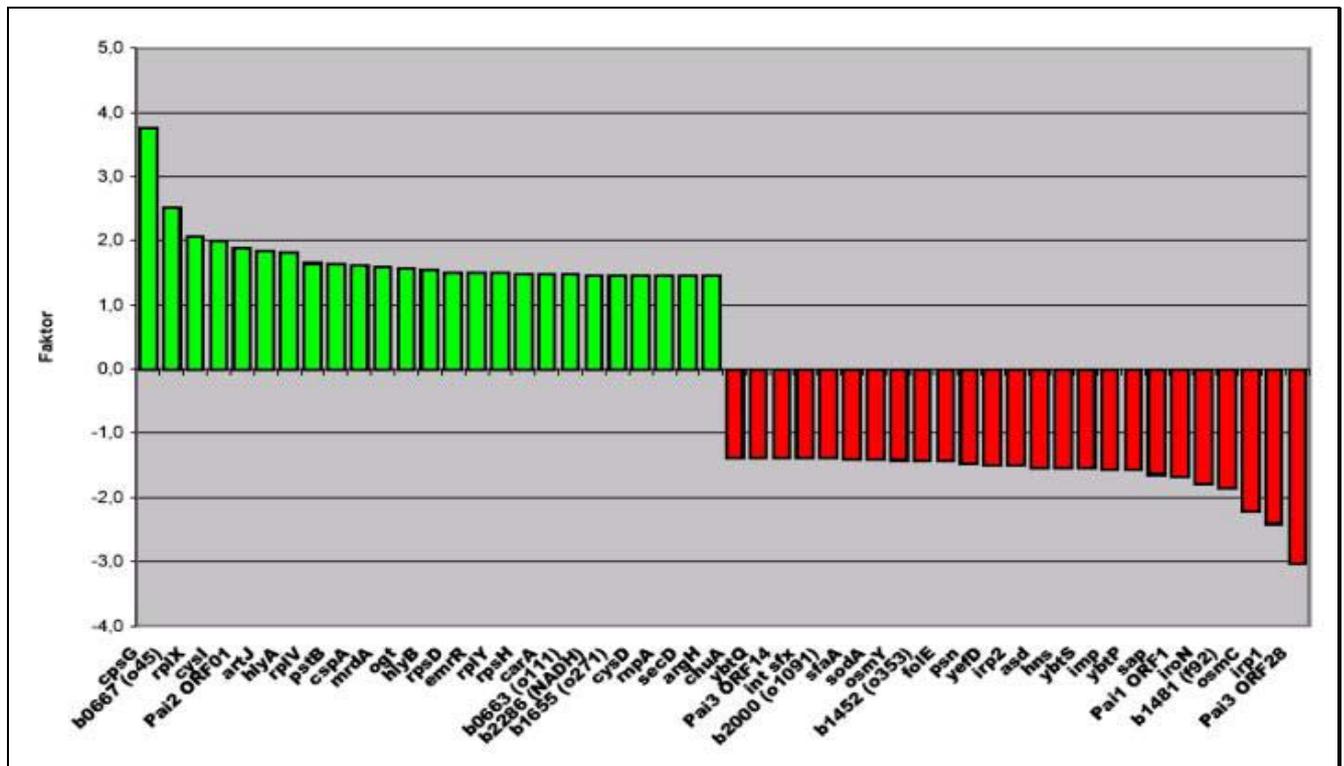


Abb. VI.17: Zusammenstellung der 25 am stärksten induzierten und die 25 am stärksten reprimierten Gene der Transkriptomanalyse mit dem K-12 Array und dem „Pathoarray“ von 536 (grün) im Vergleich zu *536rfaH* (rot) während der logarithmischen Wachstumsphase bei 30 °C. Wie bereits bei den Experimenten bei 37 °C beobachtet, unterschieden sich die Transkriptome nicht sehr stark. Am stärksten induziert ist die Transkription von *agn43* in *536rfaH* und *cpsG* in 536.

Tab. VI.2: Genliste der 25 am stärksten induzierten und die 25 am stärksten reprimierten Gene von 536 und 536*rfaH* bei 37 °C mit Funktion und Accession-Nummer.

Gen	Faktor	"Patho- Array"	K12- Array	Genfunktion	b#	Gengruppe	Accession-Nr.
<i>epsG</i>	3,8		+	Phosphomannomutase	b2048	Zentraler Metabolismus	AE000295
b0667	2,5		+	hypotetisch	b0667	nicht klassifiziert	AE000170
<i>rplX</i>	2,1		+	50s ribosomales Protein (Untereinheit)	b3309	Translation, Modifikation	AE000408
<i>eysI</i>	2,0		+	Sulfitereductase Hämoprotein alpha-Untereinheit	b2763	Zentraler Metabolismus	AE000360
<i>PAI2 ORF01</i>	1,9	+				Pathogenitätsinsel	
<i>artJ</i>	1,8		+	Arginine-bindendes Periplasmatisches Protein	b0860	Transportproteine	AE000188
<i>hlyA</i>	1,8	+				Pathogenitätsinsel	
<i>rplV</i>	1,7		+	50s ribosomales Protein (Untereinheit)	b3315	Translation, Modifikation	AE000408
<i>pstB</i>	1,6		+	Phosphattransport ATP-bindendes Protein PstB	b3725	Transportproteine	AE000449
<i>espA</i>	1,6		+	hypotetisch	b3556	zelluläre Prozesse (Adaptation. Schutz)	AE000433
<i>mrda</i>	1,6		+	hypotetisch	b0635	Zellstruktur	AE000168
<i>ogt</i>	1,6		+	O6-Methylguanin-DNA-Alkyltransferase	b1335	DNA Modifikation and Reparatur	AE000231
<i>hlyB</i>	1,6	+				Pathogenitätsinsel	
<i>rpsD</i>	1,5		+	30S Ribosomenuntereinheit	b3296	Translation, Modifikation	AE000407
<i>emrR</i>	1,5		+	EmrR Protein	b2684	Phagen, Transposons, Plasmide	AE000353
<i>rplY</i>	1,5		+	50s ribosomales Protein (Untereinheit)	b2185	Translation, Modifikation	AE000308
<i>rpsH</i>	1,5		+	30S Ribosomenuntereinheit	b3306	Translation, Modifikation	AE000408
<i>carA</i>	1,5		+	Carbamoylphosphatsynthase	b0032	Nukleotid Biosynthese	AE000113
b0663	1,5		+	hypotetisch	b0663	nicht klassifiziert	AE000170
b2286	1,5		+	NADH-Dehydrogenase I	b2286	nicht klassifiziert	AE000317
b1655	1,5		+	hypotetisch	b1655	nicht klassifiziert	AE000260
<i>eysD</i>	1,5		+	ATP-Sulfatadenyltransferase	b2752	Zentraler Metabolismus	AE000358
<i>rnpA</i>	1,5		+	RNase P, Protein Komponente	b3704	DNA Modifikation and Reparatur	AE000447
<i>secD</i>	1,4		+	Translokationskomplexprotein	b0408	Transportproteine	AE000147
<i>argH</i>	1,4		+	Argininosuccinate-Lyase	b3960	Aminosäurebiosynthese und Metabolismus	AE000470
<i>chuA</i>	-1,4	+		Häm-in-Rezeptor		Pathogenitätsinsel	
<i>ybtQ</i>	-1,4	+		Yersiniabaktinexpression		Pathogenitätsinsel	
<i>PAI3 ORF14</i>	-1,4	+				Pathogenitätsinsel	
<i>int sfx</i>	-1,4	+		Sfx-Integrase		Pathogenitätsinsel	
b2000	-1,4		+	<i>flu</i> . Antigen43	b2000	äußeres Membranprotein	AE000291
<i>sfaA</i>	-1,4	+		S-Fimbrien-Expression		Pathogenitätsinsel	
<i>soda</i>	-1,4		+	Mangansuperoxid-Dismutase	b3908	zelluläre Prozesse (Adaptation. Schutz)	AE000465
<i>osmY</i>	-1,4		+	Periplasma Protein	b4376	zelluläre Prozesse (Adaptation. Schutz)	AE000508
b1452	-1,4		+	hypotetisch	b1452	Putative Transport Proteine	AE000242
<i>folE</i>	-1,4		+	GTP Cyclohydrolase I	b2153	Biosynthese von Kofaktoren	AE000304
<i>psn</i>	-1,5	+		Yersiniabaktinexpression		Pathogenitätsinsel	
<i>yefD</i>	-1,5		+	hypotetisch	b2050	nicht klassifiziert	AE000295
<i>irp2</i>	-1,5	+		Yersiniabaktinexpression		Pathogenitätsinsel	
<i>asd</i>	-1,5		+	Aspartatesemialdehyde-Dehydrogenase	b3433	Aminosäurebiosynthese und Metabolismus	AE000420
<i>hns</i>	-1,5		+	DNA-bindendes Protein (Histone-ähnliches Protein Hlp-II)	b1237	DNA Modifikation and Reparatur	AE000222
<i>ybtS</i>	-1,5	+		Yersiniabaktinexpression		Pathogenitätsinsel	
<i>imp</i>	-1,6		+	Toleranzprotein für organische Lösungsmittel	b0054	zelluläre Prozesse (Adaptation. Schutz)	AE000115
<i>ybtP</i>	-1,6	+		Yersiniabaktinexpression		Pathogenitätsinsel	
<i>sap</i>	-1,6	+		Antigen 43		Pathogenitätsinsel	
<i>PAI1 ORF1</i>	-1,7	+				Pathogenitätsinsel	
<i>iroN</i>	-1,8	+		Salmochelinexpression		Pathogenitätsinsel	
b1481	-1,9		+	hypotetisch	b1481	nicht klassifiziert	AE000245
<i>osmC</i>	-2,2		+	hypotetisch	b1482	zelluläre Prozesse (Adaptation. Schutz)	AE000245
<i>irp1</i>	-2,4	+		Yersiniabaktinexpression		Pathogenitätsinsel	
<i>PAI3 ORF28</i>	-3,0	+		Antigen 43		Pathogenitätsinsel	

VI.2.2.4 Vergleich der Genexpression in der logarithmischen Wachstumsphase bei 37 °C und 30 °C

Werden die Transkriptome von 536 und 536*rfaH* bei 30 °C und 37 °C verglichen, ist erkennbar, dass der Einfluss der Temperatur durch stärkere Änderungen im Transkriptom gekennzeichnet war, als die zuvor analysierte Deletion von *rfaH* im Vergleich zum Wildtyp bewirkte. Eine genauere Analyse zeigte, dass diese Beobachtung sowohl für *E. coli* 536 als auch für *E. coli* 536*rfaH* zutreffend war.

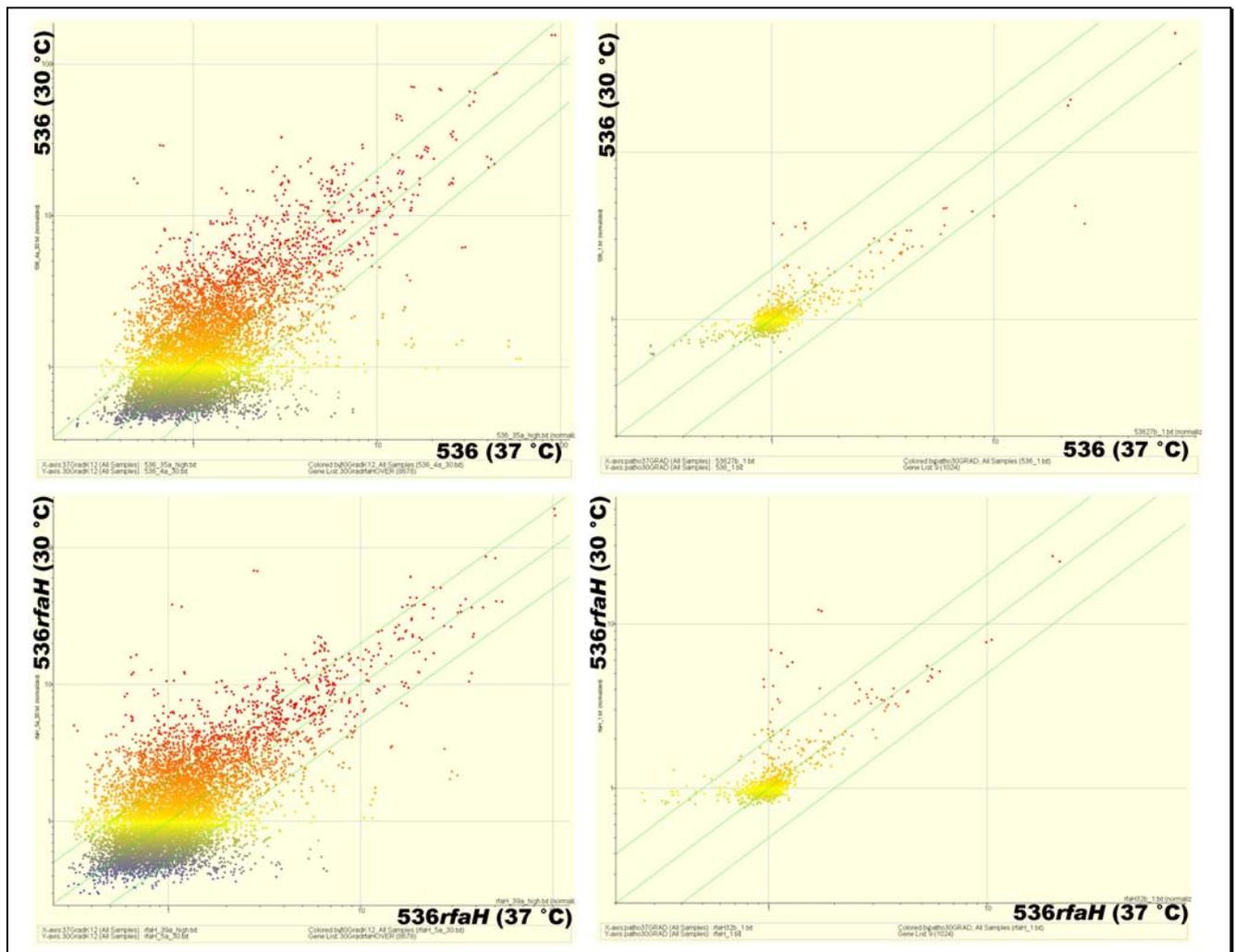


Abb. VI.18: Vergleich der Transkriptome von 536 bzw. 536*rfaH* bei unterschiedlichen Temperaturen. Dargestellt sind die Scatterplots beider Stämme jeweils von der K-12 Membran (Gene des Kerngenoms) und dem „Pathoarray“ (Gene von Pathogenitätsinseln). Die stärkere Streuung der Werte um die Diagonale zeigt, dass der Temperatureffekt einen stärkeren Einfluss auf Änderungen im Transkriptom hatte, als eine Deletion von *rfaH* (vergl. mit Abb. VI.13, 14, 16). Der Temperaturshift bewirkte bei beiden Stämmen ähnliche Änderungen im Transkriptom.

Der Vergleich der Transkriptome beider Stämme zwischen 37°C und 30°C während der logarithmischen Wachstumsphase ergab ähnliche Ergebnisse bei den deregulierten Genen. Bei 37 °C wurden sowohl im Wildtyp als auch in 536*rfaH* die Gene *ompT*, *fepA*, *artI*, b2673 und *yicF* stärker exprimiert. Der ORF b2673 kodiert vermutlich ein Gen für die Biosynthese von Kofaktoren für

Thioredoxin, Glutaredoxin und Glutathion. FepA, ein Ferrienterobaktinrezeptor-Vorläuferprotein, ist beim Transport von Kationen von Bedeutung. ArtI, ein Arginin-bindendes periplasmatisches Protein, ist in den Transport von Aminosäuren involviert. OmpT, ein Protease-Vorläuferprotein, beeinflusst die Zellstruktur der äußeren Membran. Die Funktion von *yicF* ist bislang noch nicht bekannt.

GdhA, eine Glutamatdehydrogenase, wurde im Wildtyp bei 30°C signifikant stärker exprimiert. Im Falle von 536 *rfaH* zeigte der bislang noch nicht klassifizierte ORF b0648 die stärkste Induktion bei 30 °C im Vergleich beider Temperaturen. Außerdem zeigten beide Stämme bei 30 °C eine Induktion von Genen des S-Fimbrien-Operons.

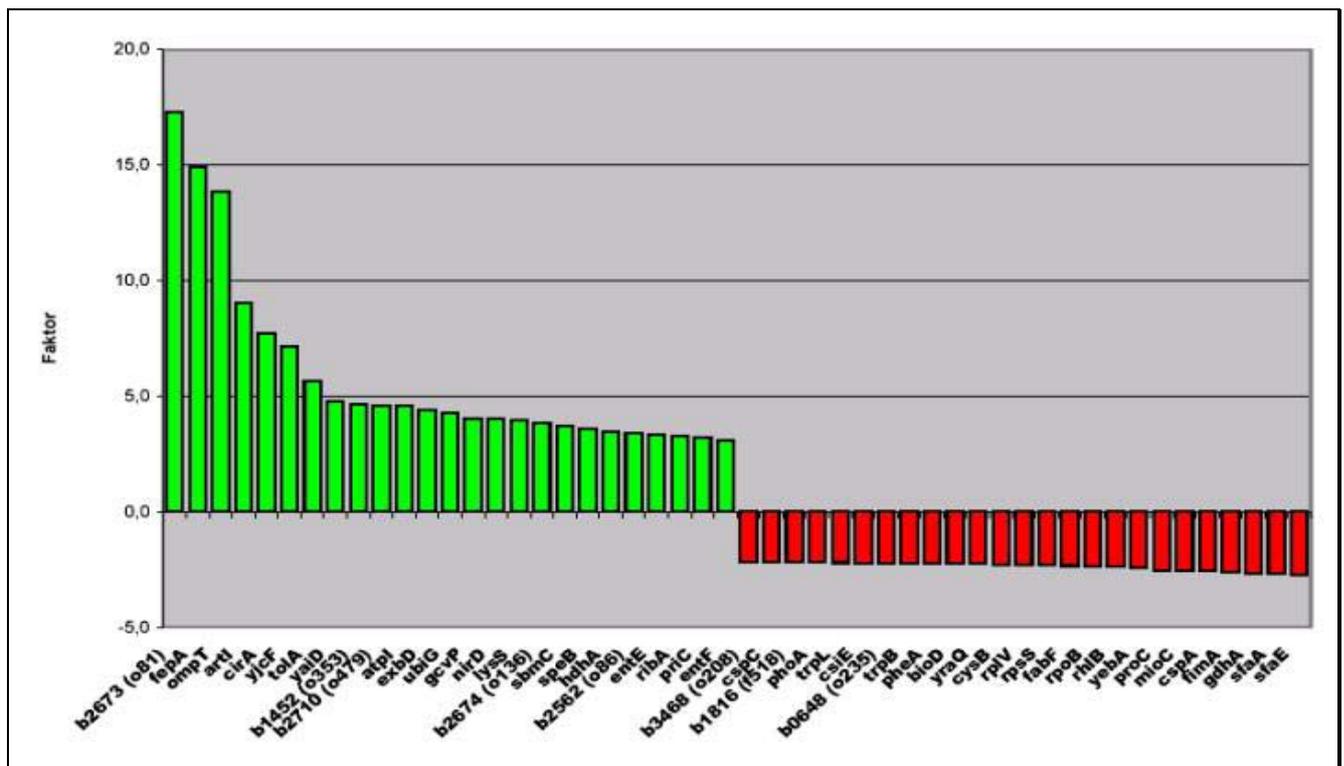


Abb. VI.19: Zusammenstellung der 25 am stärksten induzierten und die 25 am stärksten reprimierten Gene der Transkriptomanalyse von 536 bei 37 °C (grün) im Vergleich zu 30°C (rot) während der logarithmischen Wachstumsphase. Bei 37 °C ist eine erhöhte Expression von b2673, *fepA*, *ompT*, *artI*, *cirA* und *yicF* zu beobachten. Eine erhöhte Transkription von Genen des S-Fimbrien-Operons sowie von *gdhA* und *fimA* wurde im Wildtyp bei 30 °C beobachtet.

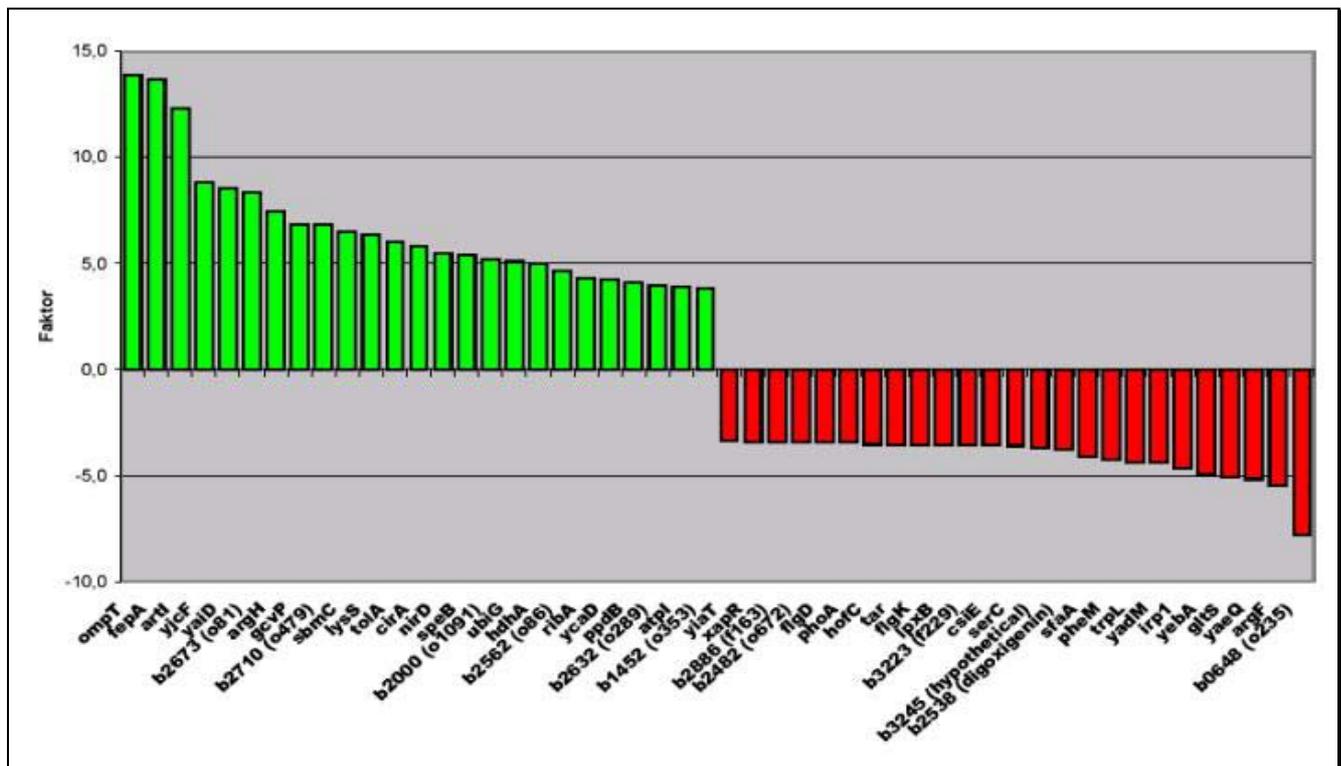


Abb. VI.20: Zusammenstellung der 25 am stärksten induzierten und die 25 am stärksten reprimierten Gene der Transkriptomanalyse von 536*rfaH* bei 37 °C (grün) im Vergleich zu 30 °C (rot) während der logarithmischen Wachstumsphase. Bei 37 °C war eine erhöhte Expression von *ompT*, *fepA*, *artI*, *yicF*, *yaiD* und *b2673* zu beobachten. Eine erhöhte Transkription von *b0648*, *argF* und *yaeQ* wurde bei 30 °C festgestellt.

Der Vergleich der Schnittmengen der Transkriptome von 536 und 536*rfaH* zeigte, dass verschiedene Gene sowohl von Pathogenitätsinseln als auch vom Kerngenom durch die unterschiedliche Temperatur dereguliert waren. Von den 19 Genen der Schnittmenge, die auf PAIs kodiert sind, wurden bei 30 °C Gene des S-Fimbrien-Operons und des Yersinabaktin-Operon stärker exprimiert. Bei 37 °C wurden hingegen Gene des *hly*-Operons, des *iro*-Genclusters und einer putativen DNA-Methyltransferase (*ORF35_{PAI II}*) stärker transkribiert. Des Weiteren wurden auch verschiedene Gene des Kerngenoms unterschiedlich stark bei den verglichenen Temperaturen exprimiert. Hierzu gehörten Gene für Aminosäuresynthese, Zellstruktur, Stoffwechsel, Transport, Translation, Transkription, verschiedene putative Enzyme und bislang unbekannte Faktoren.

VI.2.2.5 Analyse des Einflusses von RfaH auf die Genexpression in Biofilmen von *E. coli* 536 und *E. coli* 536*rfaH*

Neben der Transkriptomanalyse bei 37 °C und 30 °C wurde auch das Expressionsprofil von Zellen aus Biofilmen beider Stämme miteinander verglichen. Die Zellen wurden bei 37 °C gezüchtet und nach 48 Stunden aus dem Mikrofermenter geerntet. In Analogie zu den Untersuchungen der logarithmischen Wachstumsphase bei 37 °C bzw. 30 °C war auch hier festzustellen, dass sich die Transkriptome beider Stämme nicht sonderlich stark unterschieden.

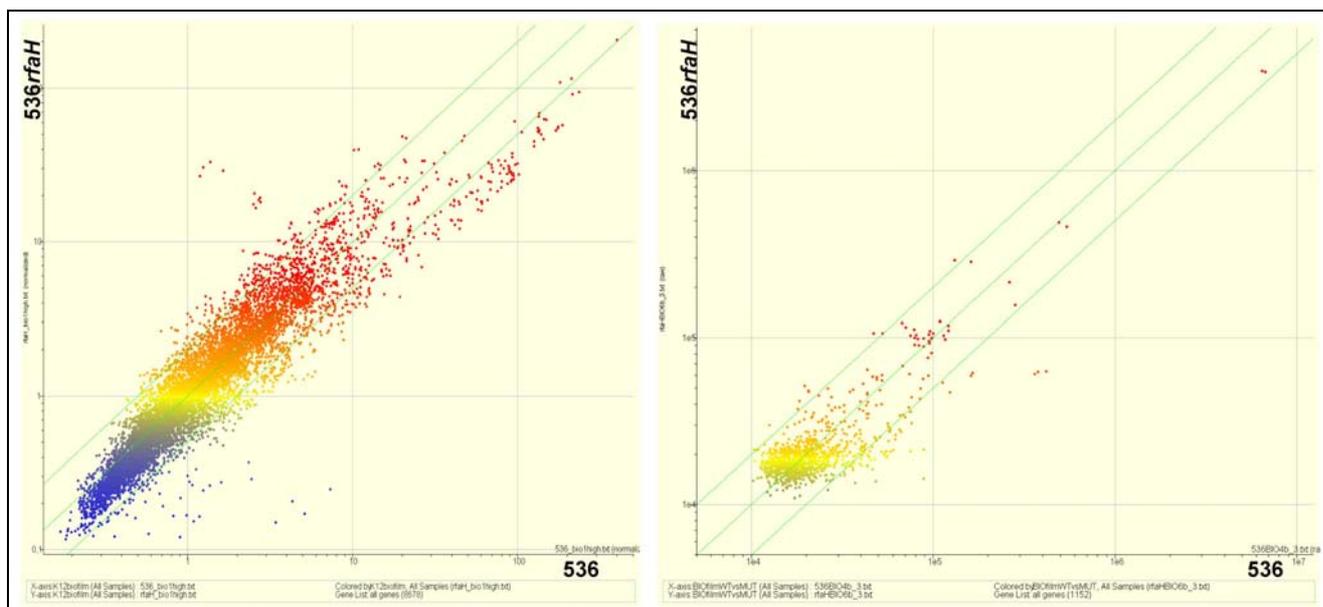


Abb. VI.21: Vergleich der Transkriptome der Stämme 536 und 536*rfaH* von Zellen, die aus Biofilmen geerntet wurden. Wie bereits bei 37 °C und 30 °C analysiert wurde, haben die Transkriptome von 536 und 536*rfaH* ein relativ ähnliches Expressionsprofil.

Im Wildtyp wurden nicht nur bei 37 °C und 30 °C sondern auch in Biofilmen Gene des α -Hämolyisin-Operons stärker exprimiert. Des Weiteren wurden Gene der P-Fimbrien-Determinante in Biofilmen stärker exprimiert als in 536*rfaH*. Wie bereits bei 37 °C und 30 °C analysiert wurde, wurden *cpsG*, ein Gen welches für die Phosphomannomutase des Colansäure-Operons bzw. des LPS-Operons kodiert und die putative DNA-Methyltransferase *ORF35*_{PAI II} („Pathoarray“-Bezeichnung „PAI2 ORF1“) ebenfalls im Wildtyp stärker exprimiert. Neben diesen Genen wurde auch die Transkription von *yibB* im Wildtyp induziert. Die genaue Funktion dieses Proteins ist noch unklar. Es nimmt vermutlich Einfluss auf strukturelle Komponenten der Zelle. Des Weiteren konnte im Wildtyp eine induzierte Expression von *yaeG* und *araB* festgestellt werden. *araB* kodiert eine Kinase, die im Abbau von Carbonkomponenten involviert ist. Die Funktion von *yaeQ* ist bislang nicht bekannt. Im Biofilm der *rfaH* Mutante wurde eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Expression von *cspA* und *cirA* festgestellt. *cspA* kodiert einen Regulator für die Adaptation an verschiedene Umweltbedingungen. Die Funktion von *cirA* ist nicht bekannt. Ebenfalls im Biofilm von 536*rfaH* erhöht war die Expression des globalen Regulator *hns*, einem DNA-bindenden Protein, welches unter anderem die Genregulation nach bestimmten Umweltstimuli beeinflusst. Wie bereits bei 30 °C beobachtet wurde, zeigte die *rfaH* Mutante auch im Biofilm eine stärkere Expression von *osmC* (Adaptation an osmotischen Stress), als der Wildtyp.

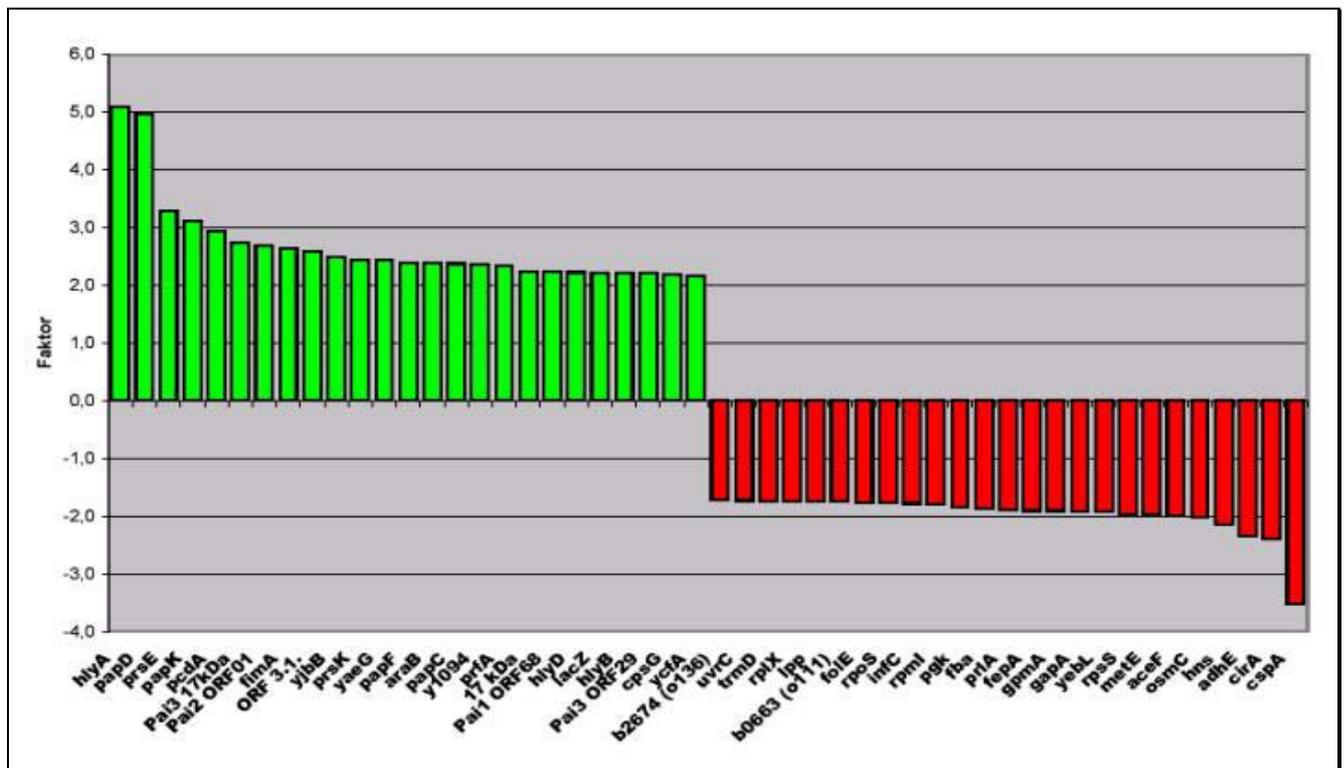


Abb. VI.22: Zusammenstellung der 25 am stärksten induzierten und die 25 am stärksten reprimierten Gene in Biofilmen von 536 (grün) im Vergleich zu 536*rfaH* (rot).

Von den 50 am stärksten deregulierten Genen in Biofilmen von 536 und 536*rfaH* kodieren 18 Faktoren von Pathogenitätsinseln. Die Gene des Kerngenoms konnten folgenden Untergruppen zugeordnet werden: sechs Gene kodierten Faktoren des Energiemetabolismus, fünf Gene Translationsfaktoren und vier Gene sind bislang nicht charakterisiert. Neben diesen gehörten noch andere Faktoren für nicht näher benannte Zellprozesse zu den 50 am stärksten deregulierten Genen in Biofilmen von 536 verglichen mit 536*rfaH*.

Tab. VI.3: Genliste der 25 am stärksten induzierten und die 25 am stärksten reprimierten Gene von 536 und 536*rfaH* in Biofilmen mit Funktion und Accession-Nummer.

Gen	Faktor	"Patho- Array"	K12- Array	Genfunktion	b#	Gengruppe	Accession-Nr.
<i>hlyA</i>	5,1	+		α -Hämolyisin		Pathogenitätsinsel	
<i>papD</i>	5,0	+		P-Fimbrien-Expression		Pathogenitätsinsel	
<i>prsE</i>	3,3	+		P-Fimbrien-Expression		Pathogenitätsinsel	
<i>papK</i>	3,1	+		P-Fimbrien-Expression		Pathogenitätsinsel	
<i>pcdA</i>	3,0	+				Pathogenitätsinsel	
<i>PAI3 17kDa</i>	2,7	+				Pathogenitätsinsel	
<i>PAI2 ORF01</i>	2,7	+		put. Methyltransferase		Pathogenitätsinsel	
<i>fimA</i>	2,6		+	Typ 1-Fimbrien-Expression	b4314	Zellstruktur	AE000502
<i>ORF 3.1.</i>	2,6	+				Pathogenitätsinsel	
<i>yjbB</i>	2,5		+	hypotetisch	b4020	Strukturproteine	AE000475
<i>prsK</i>	2,4	+		P-Fimbrien-Expression		Pathogenitätsinsel	
<i>yaeG</i>	2,4		+	hypotetisch	b0162	Putative Regulatoren	AE000125
<i>papF</i>	2,4	+		P-Fimbrien-Expression		Pathogenitätsinsel	
<i>araB</i>	2,4		+	L-Ribulokinase	b0063	Kohlenstoffkatabolismus	AE000116
<i>papC</i>	2,4	+		P-Fimbrien-Expression		Pathogenitätsinsel	
<i>y1094</i>	2,4	+				Pathogenitätsinsel	
<i>prfA</i>	2,3	+		P-Fimbrien-Expression		Pathogenitätsinsel	
<i>17 kDa</i>	2,2	+				Pathogenitätsinsel	
<i>PAI1 ORF68</i>	2,2	+				Pathogenitätsinsel	
<i>hlyD</i>	2,2	+		α -Hämolyisin Sekretion		Pathogenitätsinsel	
<i>lacZ</i>	2,2		+	beta-Galaktosidase	b0344	Kohlenstoffkatabolismus	AE000141
<i>hlyB</i>	2,2	+		α -Hämolyisin Sekretion		Pathogenitätsinsel	
<i>PAI3 ORF29</i>	2,2	+				Pathogenitätsinsel	
<i>cpsG</i>	2,2		+	Phosphomannomutase	b2048	Zentraler Metabolismus	AE000295
<i>ycfA</i>	2,2		+	hypotetisch	b1156	nicht klassifiziert	AE000214
<i>b2674</i>	-1,7		+	hypotetisch	b2674	nicht klassifiziert	AE000352
<i>uvrC</i>	-1,7		+	Excinuclease ABC Untereinheit C	b1913	Transkription, RNA- Prozessing und Abbau	AE000284
<i>trmD</i>	-1,7		+	tRNA-Methyltransferase	b2607	Translation, Modifikation	AE000346
<i>rplX</i>	-1,7		+	50s ribosomales Protein (Untereinheit)	b3309	Translation, Modifikation	AE000408
<i>lpp</i>	-1,8		+	Äußeres Membran Lipoprotein	b1677	Zellstruktur	AE000263
<i>b0663</i>	-1,8		+	hypotetisch	b0663	nicht klassifiziert	AE000170
<i>folE</i>	-1,8		+	GTP Cyclohydrolase I	b2153	Biosynthese von Kofaktoren	AE000304
<i>rpoS</i>	-1,8		+	RNA-Polymerase sigma-Untereinheit RpoS (sigma-38)	b2741	Transkription, RNA- Prozessing und Abbau	AE000358
<i>infC</i>	-1,8		+	Initiations Faktor IF-3	b1718	Translation, Modifikation	AE000267
<i>rplM</i>	-1,8		+	50s ribosomales Protein (Untereinheit)	b1717	Translation, Modifikation	AE000266
<i>pgk</i>	-1,8		+	Phosphoglyceratekinase	b2926	Energiemetabolismus	AE000376
<i>fba</i>	-1,9		+	Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase	b2925	Energiemetabolismus	AE000376
<i>prlA</i>	-1,9		+	Vorläuferprotein Translokase Untereinheit	b3300	Putative Transport Proteine	AE000408
<i>fepA</i>	-1,9		+	Ferrierterobaktin-Rezeptor	b0584	Transportproteine	AE000163
<i>gpmA</i>	-1,9		+	Phosphoglyceratemutase 1	b0755	Energiemetabolismus	AE000178
<i>gapA</i>	-1,9		+	Glyceraldehyde-Dehydrogenase A	b1779	Energiemetabolismus	AE000273
<i>yebL</i>	-1,9		+	hypotetisch	b1857	nicht klassifiziert	AE000280
<i>rpsS</i>	-2,0		+	30S Ribosomenuntereinheit	b3316	Translation, Modifikation	AE000408
<i>metE</i>	-2,0		+	Homocystein-Methyltransferase	b3829	Aminosäurebiosynthese und Metabolismus	AE000458
<i>aceF</i>	-2,0		+	Pyruvate-Dehydrogenase	b0115	Energiemetabolismus	AE000120
<i>osmC</i>	-2,0		+	hypotetisch	b1482	zelluläre Prozesse (Adaptation. Schutz)	AE000245
<i>hns</i>	-2,1		+	DNA-bindendes Protein (Histone-ähnliches Protein Hlp-II)	b1237	DNA Modifikation and Reparatur	AE000222
<i>adhE</i>	-2,3		+	Alkohol/Acetaldehyde-Dehydrogenase	b1241	Energiemetabolismus	AE000222
<i>cirA</i>	-2,4		+	Colicin I Rezeptor Vorläuferprotein	b2155	Transportproteine zelluläre Prozesse	AE000304
<i>cspA</i>	-3,5		+	hypothetisch	b3556	(Adaptation. Schutz)	AE000433

VI.2.2.6 Vergleich der Genexpression planktonischer Zellen mit Biofilmzellen

Auch die Transkriptome von Zellen aus Biofilmen und Zellen aus Schüttelkulturen unterschieden sich viel signifikanter als der Vergleich 536 / 536*rfaH* bei identischen Wachstumsbedingungen gezeigt hat.

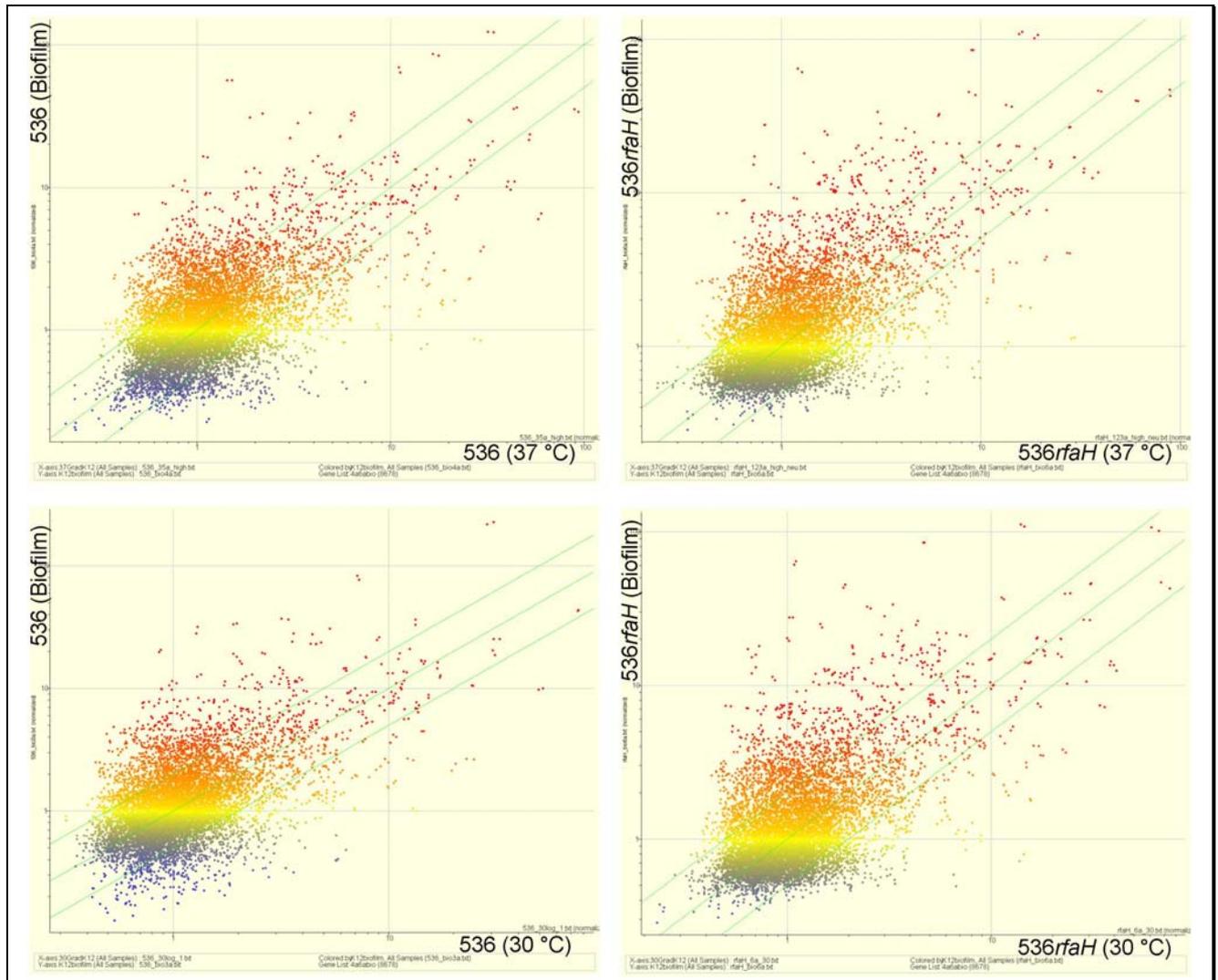


Abb. VI.23: Vergleich der Transkriptome von Zellen aus Biofilmen mit Zellen aus Schüttelkulturen. Die obere Reihe zeigt den Vergleich der Transkriptome bei 37 °C (planktonisch) mit Zellen aus Biofilmen (536 bzw. 536*rfaH*). In der unteren Reihe ist der Vergleich der Transkriptome bei 30 °C (planktonisch) mit Zellen aus Biofilmen (536 bzw. 536*rfaH*) dargestellt.

Die jeweils 50 am stärksten induzierten und reprimierten Gene beim Vergleich von planktonischen Zellen und Zellen aus Biofilmen von 536 und 536*rfaH* sind in den Diagrammen der Abbildungen (VI.24-27) dargestellt.

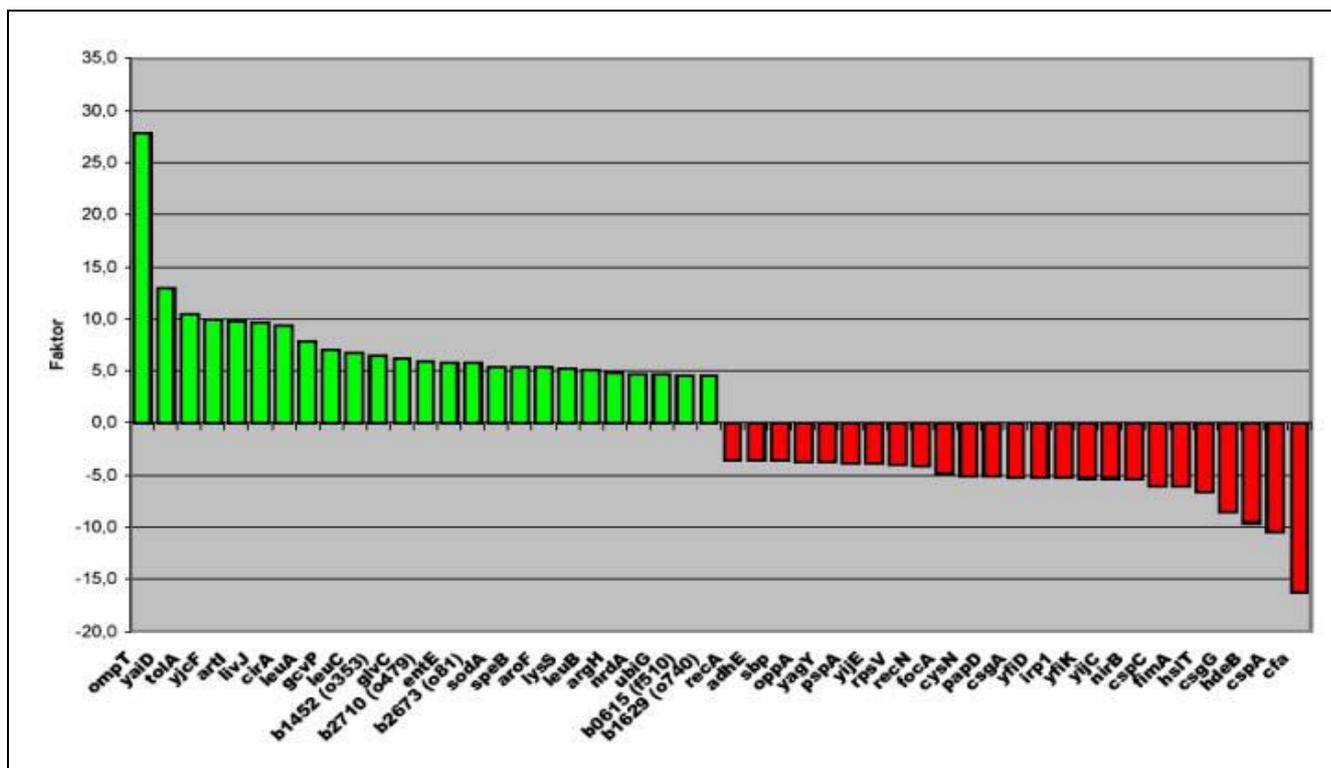


Abb. VI.24: Zusammenstellung der 25 am stärksten induzierten und die 25 am stärksten reprimierten Gene der Transkriptomanalyse von 536 (planktonisches Wachstum bei 37 °C in grün) mit Zellen aus dem Biofilm von 536 (rot).

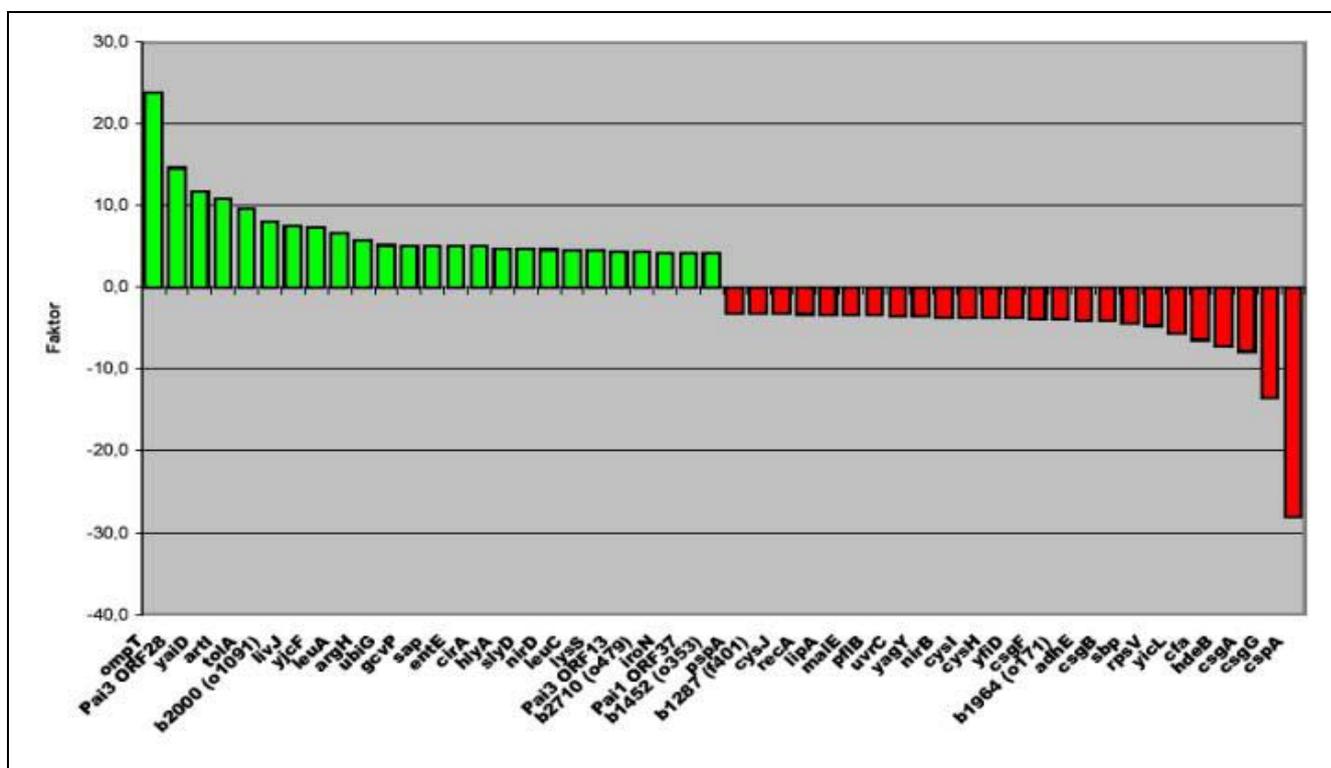


Abb. VI.25: Zusammenstellung der 25 am stärksten induzierten und die 25 am stärksten reprimierten Gene der Transkriptomanalyse von 536 *rfaH* (planktonisches Wachstum bei 37 °C in grün) mit Zellen aus dem Biofilm von 536 *rfaH* (rot).

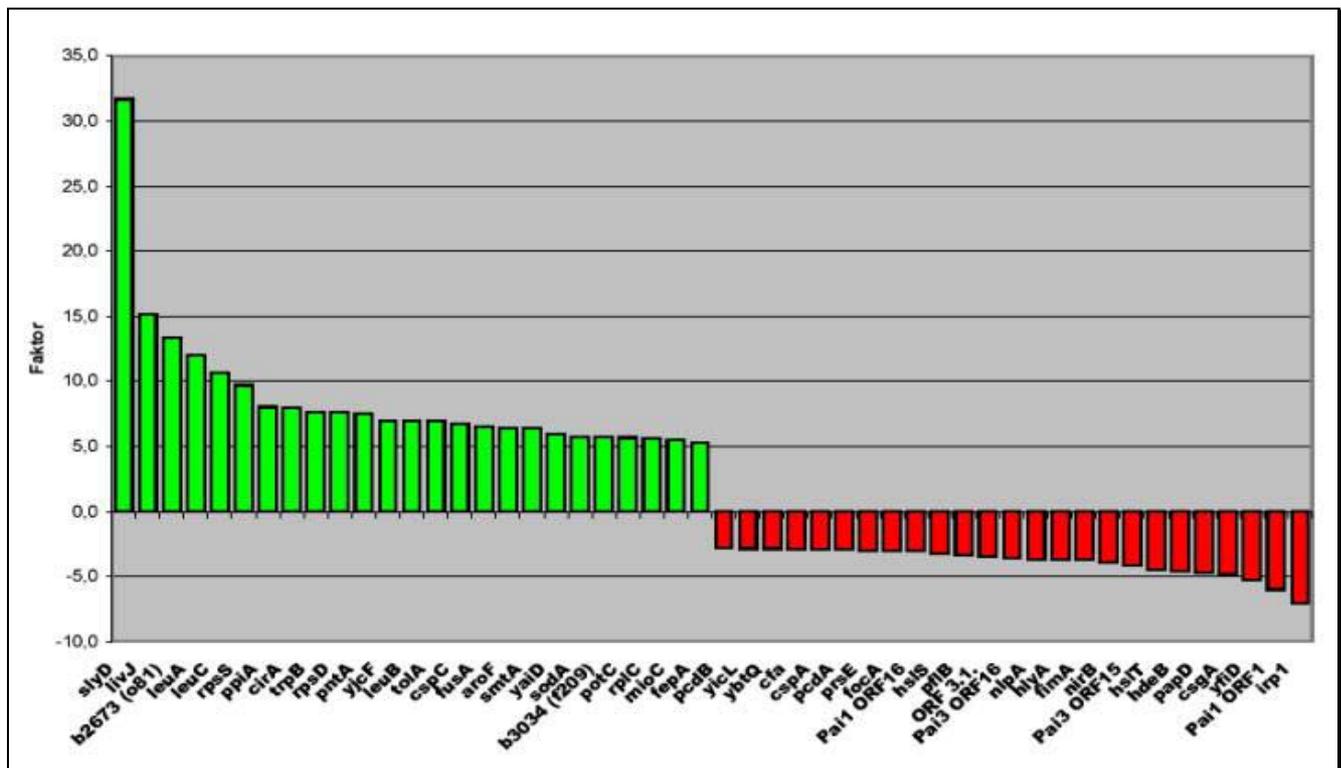


Abb. VI.26: Zusammenstellung der 25 am stärksten induzierten und die 25 am stärksten reprimierten Gene der Transkriptomanalyse von 536 (planktonisches Wachstum bei 30 °C in grün) mit Zellen aus dem Biofilm von 536 (rot).

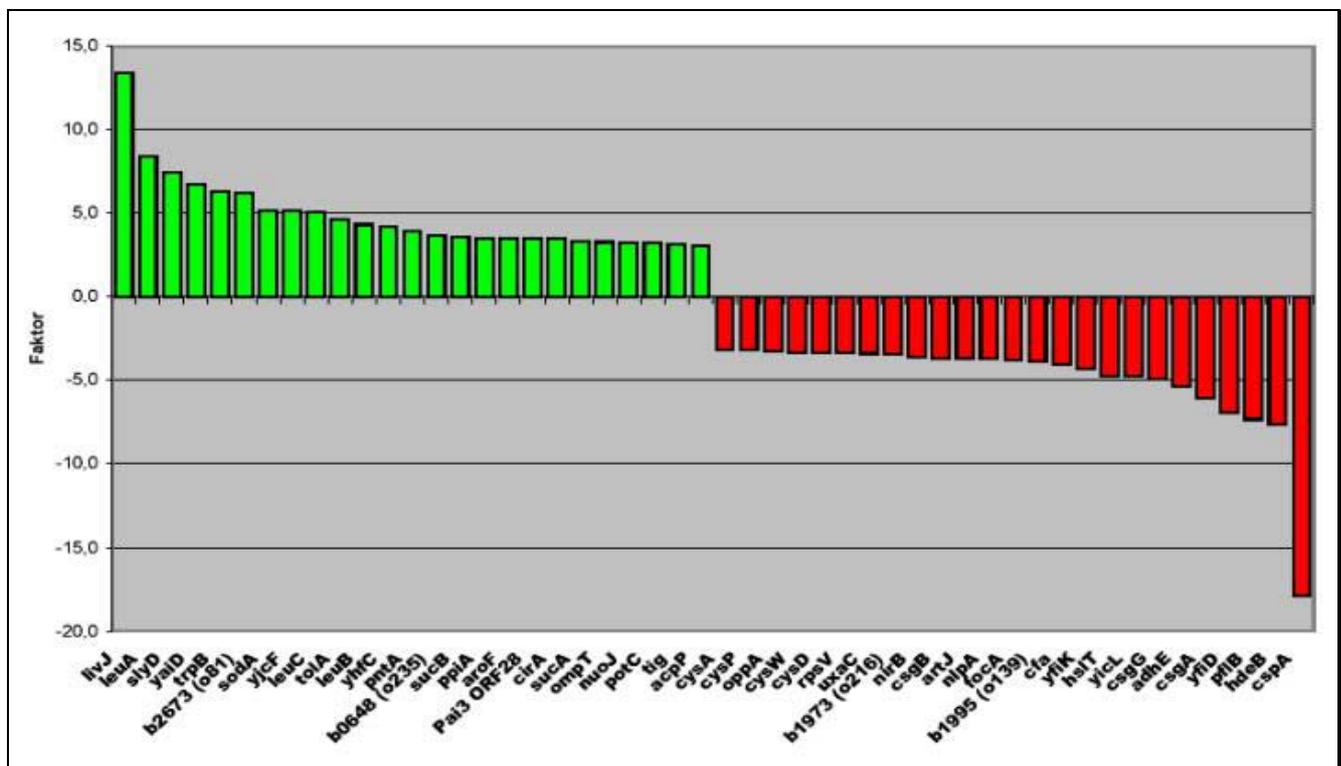


Abb. VI.27: Zusammenstellung der 25 am stärksten induzierten und die 25 am stärksten reprimierten Gene der Transkriptomanalyse von 536*rfaH* (planktonisches Wachstum bei 30 °C in grün) mit Zellen aus dem Biofilm von 536*rfaH* (rot).

Es wurde bereits festgestellt, dass die Transkriptome von planktonischen Zellen beim Vergleich der Stämme 536 und 536*rfaH* sowohl bei 37 °C und 30 °C als auch in Biofilmen relativ ähnlich gewesen sind. Um Gene zu identifizieren, die generell im Biofilm bzw. bei planktonisch wachsenden Zellen (37 °C bzw. 30 °C) induziert sind, wurden die Schnittmengen der Gene aus den in den Abbildungen (VI.24-27) dargestellten Analysen untersucht. Diese Schnittmengenanalyse wurde jedoch nicht auf die 25 jeweils am stärksten differenziell exprimierten Gene beschränkt, sondern mit den 100 stärksten deregulierten Genen (K-12 Membran) bzw. den 30 stärksten deregulierten Genen („Pathoarray“) durchgeführt. Diese willkürlich gewählte Anzahl ermöglichte eine umfassendere Analyse, ohne zu geringe Unterschiede berücksichtigen zu müssen. Da sich die Transkriptome von 536 und 536*rfaH* in keiner der untersuchten Bedingungen gravierend unterschieden, jedoch signifikante Unterschiede zwischen planktonischen Zellen und Biofilmzellen feststellbar waren, wurden für diesen Vergleich solche Signale in der Schnittmenge berücksichtigt, die in mindestens drei der vier Datensätze auftraten. Es konnten somit auch Gene mit einbezogen werden, die nicht signifikant, aber „tendenziell“ unterschiedlich exprimiert waren.

Durch diese Untersuchungen wurden verschiedene Gene sowohl des Kerngenoms als auch von Pathogenitätsinseln bestimmt, die in planktonischen Schüttelkulturen oder in Biofilmen bevorzugt exprimiert wurden.

In Biofilmen der Stämme 536 und 536*rfaH* wurden die Gene *hypA*, *nirB*, *pflB* und *yfiD* verstärkt exprimiert. Diese Gene kodieren Proteine, die am Energiestoffwechsel unter anaeroben Bedingungen beteiligt sind. Mit *hmpA*, *adhE*, *fhlA*, *hycA*, *hycD* und *gpmA* konnten weitere Gene identifiziert werden, die im Energiestoffwechsels involviert sind und die in Biofilmen überexprimiert wurden. Diese Gene kodieren ebenfalls Proteine des Carbonstoffwechsels (Gärung bzw. Glykolyse und Elektronentransport). Des Weiteren wurden Gene identifiziert (*pta*, *focA*, b0352, *rhaS* und *uxaC*), die einen veränderten Stoffwechsel-Katabolismus in Biofilmzellen bewirken. Auch eine veränderte Expression anderer Stoffwechselgene fand in Biofilmen von *E. coli* 536 statt. Hierzu zählen die Gene *speG* (Polyaminsynthese) und *cysHILNK* (Cystein-Synthesegene). Die in Biofilmen überexprimierten Gene *artJ*, *cysW*, *sbp* und *malE* sind im Transport von Anionen, Aminosäuren, Kohlenhydraten, Carbonsäuren und Alkoholen involviert. Für die Synthese von speziellen Kofaktoren, Fettsäuren und Lipoproteinen in Biofilmen wurden die Gene *nadA*, *lipA*, *nlpA* und *cfa* verstärkt exprimiert. Eine verstärkte Expression von Genen, die unter bestimmten Stressbedingungen exprimiert werden, konnten ebenfalls in Biofilmen beobachtet werden. Zu diesen gehören *recA*, *recN*, *uvrC*, *pspA* und *sieB*. Zudem konnten Gene (*arsC*, *thdF*, *cbpA*, *cspA*, *hslS* und *hslT*) identifiziert werden, die insbesondere für die Anpassungen an atypische Bedingungen exprimiert werden. Neben zahlreichen bislang nicht charakterisierten Genen (b1995, *hdeAB*, *yagYZ*, *yfeA*, *yfiGK*, *yiJC*, b0752, b1287, b2045, b2352 und *yicL*) wurden auch Proteine für die Synthese von Zelloberflächenmolekülen verstärkt im Biofilm exprimiert. Hierzu zählen insbesondere die Gene des Curli-Fimbrien-Operons (*csgABFG*) sowie *fimAGI* (Typ 1-Fimbrien). Zu den Genen des Kerngenoms, die in Biofilmen von *E. coli* 536 bzw. 536*rfaH* verstärkt exprimiert wurden, zählen außerdem noch *rpsV* (kodiert ein ribosomales

Protein für posttranslationale Modifikation) und *nrdD*, eine anaerobe Ribonukleosid-Triphosphat-Reduktase. In Biofilmen reprimiert wurden hingegen *nrdA* (Ribonukleosid-Diphosphat-Reduktase), *argH*, *ilvB*, *leuABC*, *trpBD*, *aroF* (Aminosäure-Synthese), *nuoJ* (aerobe Atmung), *mdh*, *sucB* (Tricarbonsäure-Zyklus), *artI*, *livJ*, *potC*, *glvC*, *febA*, (Transport von Molekülen), *nrdE*, *speB*, *gcvP*, *pntA*, *smtA*, *atpI* (Stoffwechsel), *entE*, *ubiG*, b2673, *acpP*, *nlpD* (Synthese von Kofaktoren, Fettsäuren und Lipoprotein), *ppiA*, *slyD*, *rplL*, *rpsS*, *lysS* (Translation und Modifikation), *tolA*, *cirA* (Colicin-ähnlich, Colicin-Rezeptor), *himA* (IHF, Restriktion/Modifikation), *sodA* (Mangan-Superoxid-Dismutase), *agn43*, *ompT* (Membranproteine) und b0710, b0947, b1018, b2562, b2674, b3034, b4144, *yaiD*, *yjbC*, *yjcF*, *ytfP*, b1452, b1641, b2710, *yhfC*, *yjjA* (unbekannte Funktion). Von den Genen, die auf PAIs kodiert sind, wurden Gene des α -Hämolyisin-Operons, der Hämin-Rezeptor *chuA*, Gene des *iro*-Genclusters, *agn43*, Gene des K15 Kapsel-Operons und eine *sfx*-Integrase verstärkt in planktonischen Zellen exprimiert.

Eine *IS100*-Transposase, Gene des Yersiniabaktin-Operons und Gene der P-Fimbrien-Determinante wurden hingegen prinzipiell in Biofilmen stärker exprimiert.

Die Unterschiede in der Genexpression in Biofilmen und planktonischen Zellen des Stammes 536 bzw. *536rfaH* betrafen hauptsächlich Gene des Kerngenoms (Stoffwechsel und andere zelluläre Funktionen), aber auch einige Gene, die zum flexiblen Genpool gehören. Bei diesen handelte es sich insbesondere um Faktoren, die sezerniert werden oder in der Zellhülle lokalisiert sind.

VI.2.3 Zusammenfassung des Abschnitts „Transkriptomanalysen“

Durch die Transkriptomanalysen von 536 und *536rfaH* konnte gezeigt werden, dass sich beide Stämme nicht gravierend in ihrer Genexpression unterschieden. Dies war sowohl für die durchgeführten Transkriptomanalysen der Schüttelkulturen bei 37 °C und 30 °C als auch der Biofilmzellen zutreffend. Wobei in der Tendenz bei Zellen aus Biofilmen etwas größere Änderungen in der differentiellen Genexpression zwischen 536 und *536rfaH* beobachtbar waren.

Der Einfluss der Temperatur (30 °C vs. 37 °C) auf die Genexpression von *E. coli* 536 bzw. *536rfaH* war hingegen viel stärker, als der Einfluss der *rfaH* Mutation (536 vs. *536rfaH*) auf die Genexpression des Stammes 536.

In der Summe noch größere Unterschiede in der Genexpression wurden beim Vergleich von Biofilmzellen mit planktonischen Zellen beobachtet.

Der Einfluss von RfaH auf die Genexpression zeigte, dass sowohl die Expression von Genen des flexiblen Genpools als auch die Expression von Genen des Kerngenoms betroffen war.

Durch diese Analyse konnten potentielle Faktoren bestimmt werden, die für die verstärkte Biofilmbildung von *536rfaH* ursächlich sein könnten. Das Oberflächenprotein Antigen 43 (flexibler Genpool) hatte eine deutlich erhöhte Expressionsrate in *536rfaH*. Dagegen wurden *cpsG* oder/und *manB*, zwei Gene mit großer Ähnlichkeit aus dem LPS-Operon bzw. aus dem Colansäure-Operon, in

536rfaH reprimiert. Auf diese Faktoren wurde die detailliertere Untersuchung der verstärkten Biofilmbildung von *536rfaH* fokussiert.

Die Genexpression in Biofilmzellen zeigte sich im Vergleich mit planktonischen Zellen gekennzeichnet durch Unterschiede im Stoffwechsel (z.B. Änderungen zur Expression von Genen für anaeroben Metabolismus) aber auch in der veränderten Expression von Genen für Proteine der äußeren Membran und Unterschiede in der Expression von Eisenaufnahmesystemen.

VI.2.4 Untersuchungen zum Oberflächenprotein Antigen 43 und der RfaH-abhängigen Biofilmbildung

VI.2.4.1 Untersuchungen zum Einfluss von RfaH auf die Expression von Antigen 43

Über eine Analyse des Transkriptomts sollten potentielle Faktoren bestimmt werden, deren Expression Einfluss auf die deutlich verstärkte Biofilmbildung des Stammes 536*rfaH* haben könnte.

Die Auswertung der Hybridisierungen und die Analyse der Expressionsprofile ergaben einen signifikanten Unterschied in der Expression von Antigen 43 im Stamm 536*rfaH* (logarithmische Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,6$) bei 37 °C), wenn das Transkriptom mit dem des Wildtyps verglichen wurde. Diese Beobachtung bezieht sich auf Wachstum im Minimalmedium M63. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass Antigen 43 insbesondere in Minimalmedium verstärkt exprimiert wird (Danese, *et al.*, 2000b).

Agn43 ist ein Protein, das auf der Zelloberfläche, gebunden an die äußere Membran, lokalisiert ist. Es sind bereits Studien veröffentlicht, die einen positiven Einfluss dieses Proteins auf die Biofilmbildung in den *E. coli* Stämmen MG1655 und BD1428 sowie heterolog exprimiert auch für *Pseudomonas fluorescens* beschreiben (Danese, *et al.*, 2000b; Kjaergaard, *et al.*, 2000; Klemm *et al.*, 2004).

Um die in der Transkriptomanalyse festgestellte in 536*rfaH* signifikant erhöhte Expression von Antigen 43 zu bestätigen, wurden die Transkriptmengen von *agn43* des Stammes 536 und 536*rfaH* mit Northernblot-Hybridisierungen, RT-PCR und semiquantitativer RT-PCR überprüft. RT-PCR und Northernblot bestätigten, dass im Stamm 536*rfaH* mehr *agn43*-Transkript vorhanden war als im Wildtyp. Mit Hilfe von semiquantitativer RT-PCR wurde der relative Unterschied der *agn43*-Transkriptmengen im Stamm 536 und 536*rfaH* verglichen. Bei gleicher „template“-Menge konnte in der *rfaH* Mutante bereits nach 24 Zyklen *agn43* cDNA nachgewiesen werden, jedoch im 536 Wildtyp erst nach 28 Zyklen. Aus diesen vier Zyklen Differenz ergab sich ein 16-facher Unterschied an *agn43*-Transkript in 536*rfaH* im Vergleich zum Wildtyp. Auch im Stamm *E. coli* MG1655 wurde der Einfluss von RfaH auf die Transkription von *agn43* untersucht. Die semiquantitative RT-PCR zeigte hier einen noch deutlicheren Unterschied. Eine Inaktivierung von *rfaH* führte im Stamm MG1655 zu einer hundertfach höheren Transkription von *agn43*.

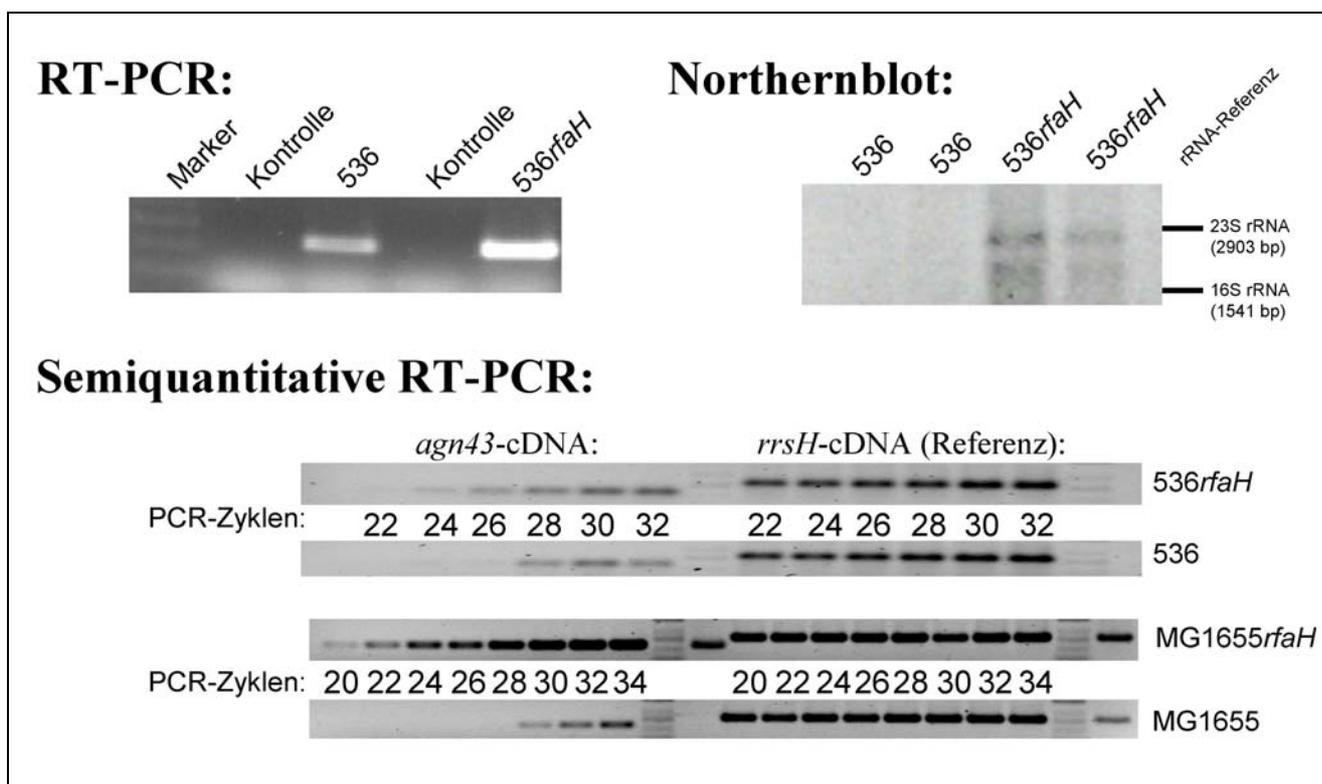


Abb. VI.28: Vergleich der Transkriptmengen für *agn43* von *E. coli* 536 und 536rfaH sowie von MG1655 und MG1655rfaH in der logarithmischen Wachstumsphase. Dargestellt sind die Resultate aus RT-PCR, Northernblot und semiquantitativer RT-PCR. Die Resultate belegten eine erhöhte Transkription von *agn43* in den Mutanten 536rfaH und MG1655rfaH.

VI.2.4.2 Analyse der Kopienzahl von *agn43* Varianten im Stamm *E. coli* 536

Vom Stamm 536 waren zum damaligen Zeitpunkt fünf PAIs (PAI I₅₃₆, PAI II₅₃₆, PAI III₅₃₆, PAI IV₅₃₆ und PAI V₅₃₆) sequenziert. Eine Analyse der Sequenzen dieser PAIs zeigte, dass sowohl auf PAI III₅₃₆, als auch auf PAI V₅₃₆ je eine Variante von *agn43* kodiert ist. Da die komplette Genomsequenz des Stammes 536 zum damaligen Zeitpunkt nicht verfügbar war, wurde durch PCR überprüft, ob neben diesen beiden *agn43* Varianten noch ein weiteres Allel im Kerngenom von 536 in der gleichen Region wie im Stamm MG1655 (ORF b2000) kodiert ist. Der entsprechende Bereich des Genoms im Stamm 536 wurde mit vier verschiedenen Primerpaaren überprüft, mit welchen im Stamm MG1655 ORF b2000 amplifiziert werden konnte. Mit den verwendeten Primerpaaren wurde kein Fragment in erwarteter Größe erhalten. Es war deshalb davon auszugehen, dass dieser Bereich im Genom der Stämme 536 und MG1655 unterschiedlich zusammengesetzt ist und der Stamm 536 insgesamt nur die Varianten *agn43*_{PAI III} und *agn43*_{PAI V} kodiert. Dieses Resultat konnte durch eine Southernblot-Hybridisierung bestätigt werden und ist in der Abbildung (VI.29) dargestellt.

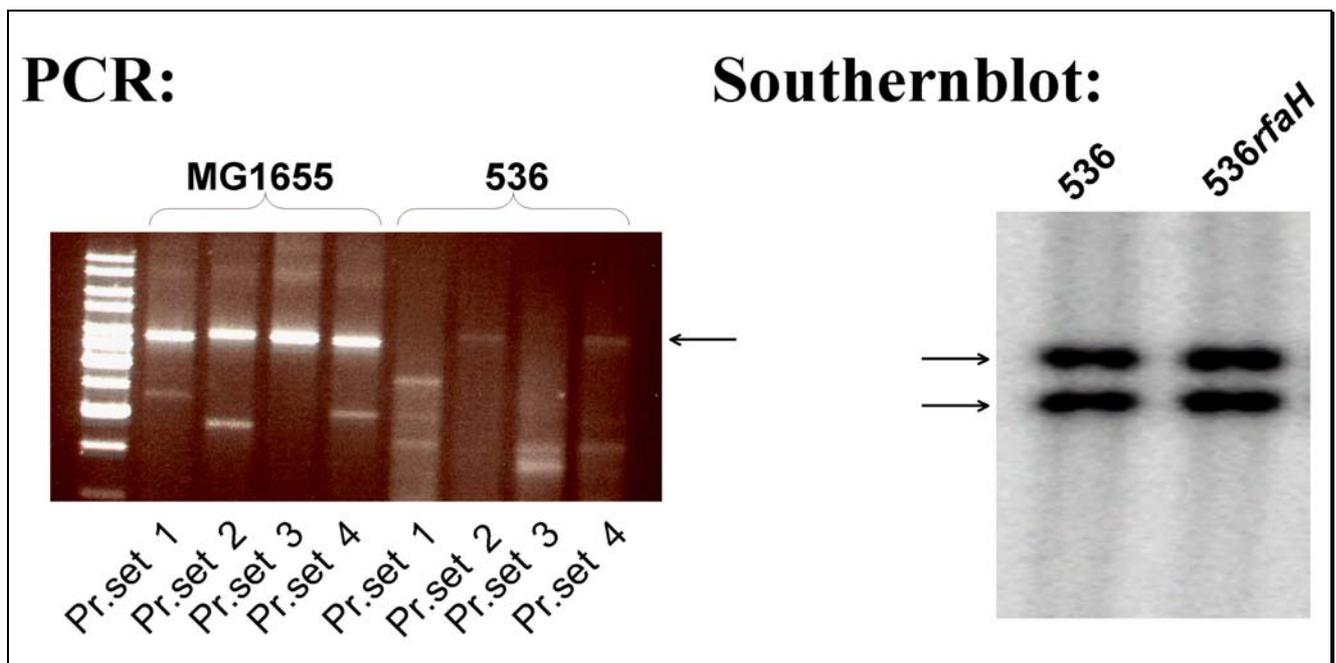


Abb. VI.29: Analyse der *agn43* Varianten im Stamm *E. coli* 536. Die PCR-Reaktionen spezifisch für b2000 (*agn43*) im Stamm MG1655 zeigen, dass diese Variante im Stamm 536 nicht vorhanden ist. Auch durch Southernblotanalyse konnten nur die Varianten *agn43*_{PAI III} und *agn43*_{PAI V} in *E. coli* 536 detektiert werden. Pr.set- Primerset

VI.2.4.3 Unterscheidung der Transkriptmengen der *agn43* Varianten im Stamm *E. coli* 536

Ein Sequenzvergleich der Proteine zeigte, dass Varianten Agn43_{PAI III} und Agn43_{PAI V} nicht identisch sind. Jedoch besitzen beide Varianten, *agn43*_{PAI III} und *agn43*_{PAI V}, einen ähnlichen, aber nicht identischen Promotorbereich und werden von unterschiedlichen DNA-Bereichen flankiert. Vermutlich wurden diese Gene aus unterschiedlichen Organismen durch horizontalen Gentransfer erworben und unterlagen keiner einfachen Genduplikation während der Evolution des Stammes 536. Die Genregulation von paralogen Genen unterliegt häufig Anpassungen an vorherrschende Umweltbedingungen (Lynch und Conergy, 2000; Lynch und Force, 2000). Bei paralogen Genen behält oftmals eine Kopie die ursprüngliche Funktion, während das andere Paralog „stummschaltet“ wird oder durch evolutionäre Anpassungen neue Funktionen erwerben kann (Prince und Pickett, 2002; Raes und Van de Peer, 2003). Eines der beiden Agn43 Varianten könnte dem Stamm 536 beispielsweise eine starke Adhärenz an Oberflächen ermöglichen, während das zweite die innerartliche Aggregation fördern oder andere Funktionen wahrnehmen könnte und im Verlauf evolutionärer Anpassungen für solche Funktionen optimiert wurde.

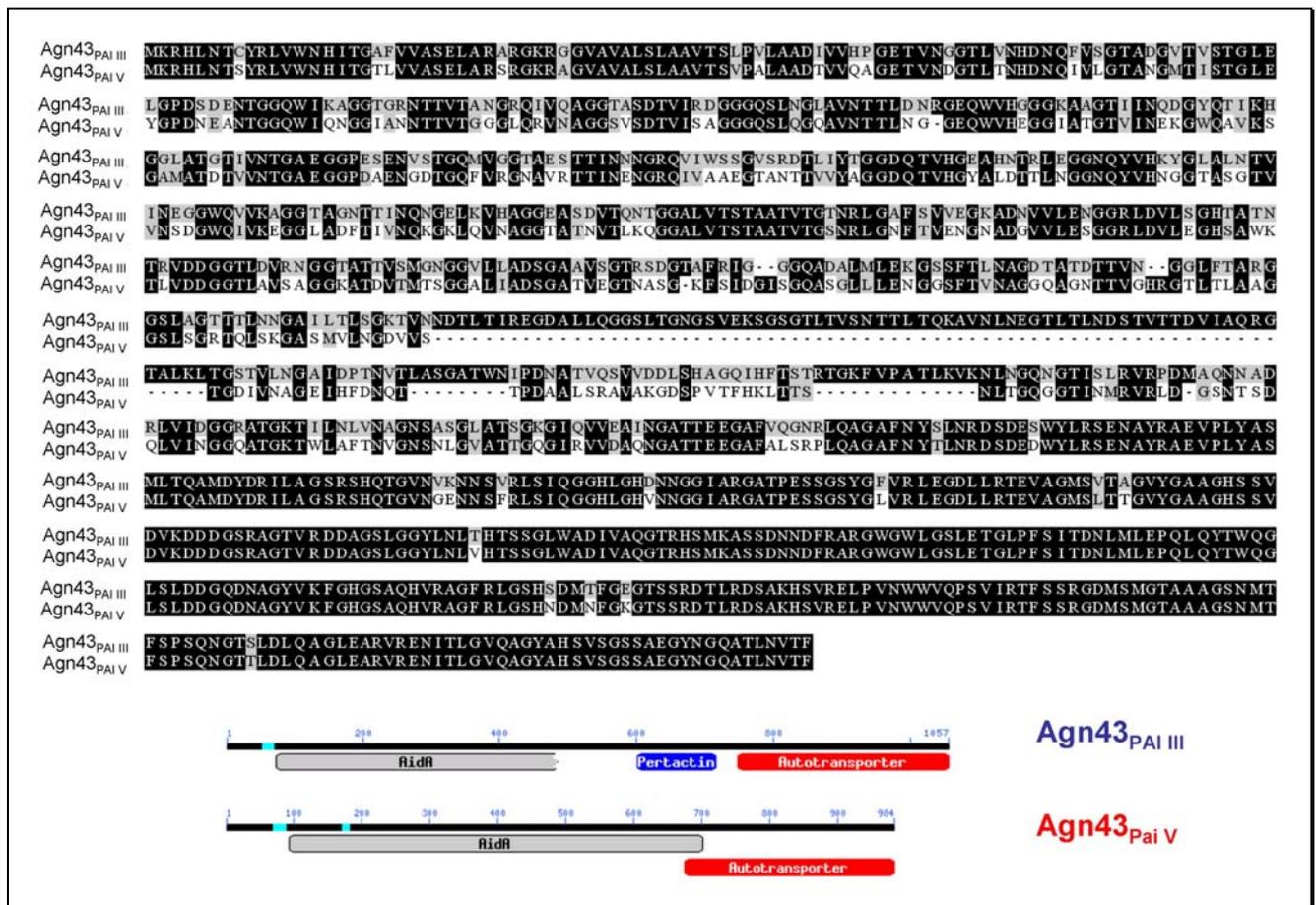


Abb. VI.30: Aminosäuresequenzvergleich der beiden Agn43 Varianten des Stammes *E. coli* 536. Die Sequenz des N-terminalen Bereichs („passenger“-Domäne) der beiden Proteine unterscheidet sich am deutlichsten. Agn43_{PAI V} besteht aus einer um 84 Aminosäuren kürzeren „passenger“-Domäne.

Deshalb wurde überprüft, ob beide Gene, *agn43*_{PAI III} und *agn43*_{PAI V}, gleichermaßen im Stamm 536 exprimiert werden und ob sie in gleicher Weise reguliert sind. Die Unterscheidung der Transkripte beider Varianten erfolgte durch Amplifikation mit spezifischen Primern. Da die Effizienz der Amplifikation von DNA-Fragmenten mitunter nicht gleichmäßig erfolgt und auch von den gewählten Primern beeinflusst ist, wurde die cDNA der Transkripte beider Varianten außerdem durch Restriktionsspolymorphismen mit Sequenz-spezifischen Endonukleasen unterschieden. Hierfür wurden die cDNA-Fragmente beider Gene mit identischen Primern im selben Reaktionsgefäß unter exakt gleichen Bedingungen amplifiziert. Aliquots des resultierenden PCR-Fragment-Gemisches wurden durch Restriktionsspaltung mit *Sac*II (spezifisch für *agn43*_{PAI III}) und mit *Bst*EII (spezifisch für *agn43*_{PAI V}) unterschieden.

Beide Paraloge wurden unter den getesteten Bedingungen transkribiert. Abhängig vom Zustand der Phasenvariation wird entweder *agn43*_{PAI III} oder *agn43*_{PAI V} dominant transkribiert. Es wurde bereits dargelegt, dass die Inaktivierung von *rfaH* eine erhöhte *agn43*-Transkription zur Folge hat. Diese Tatsache ist allerdings nicht auf die bevorzugte Expression eines der beiden *agn43* Varianten zurückzuführen, sondern beruht auf einer generell erhöhten Expression der jeweiligen Variante im „ON“-Zustand.

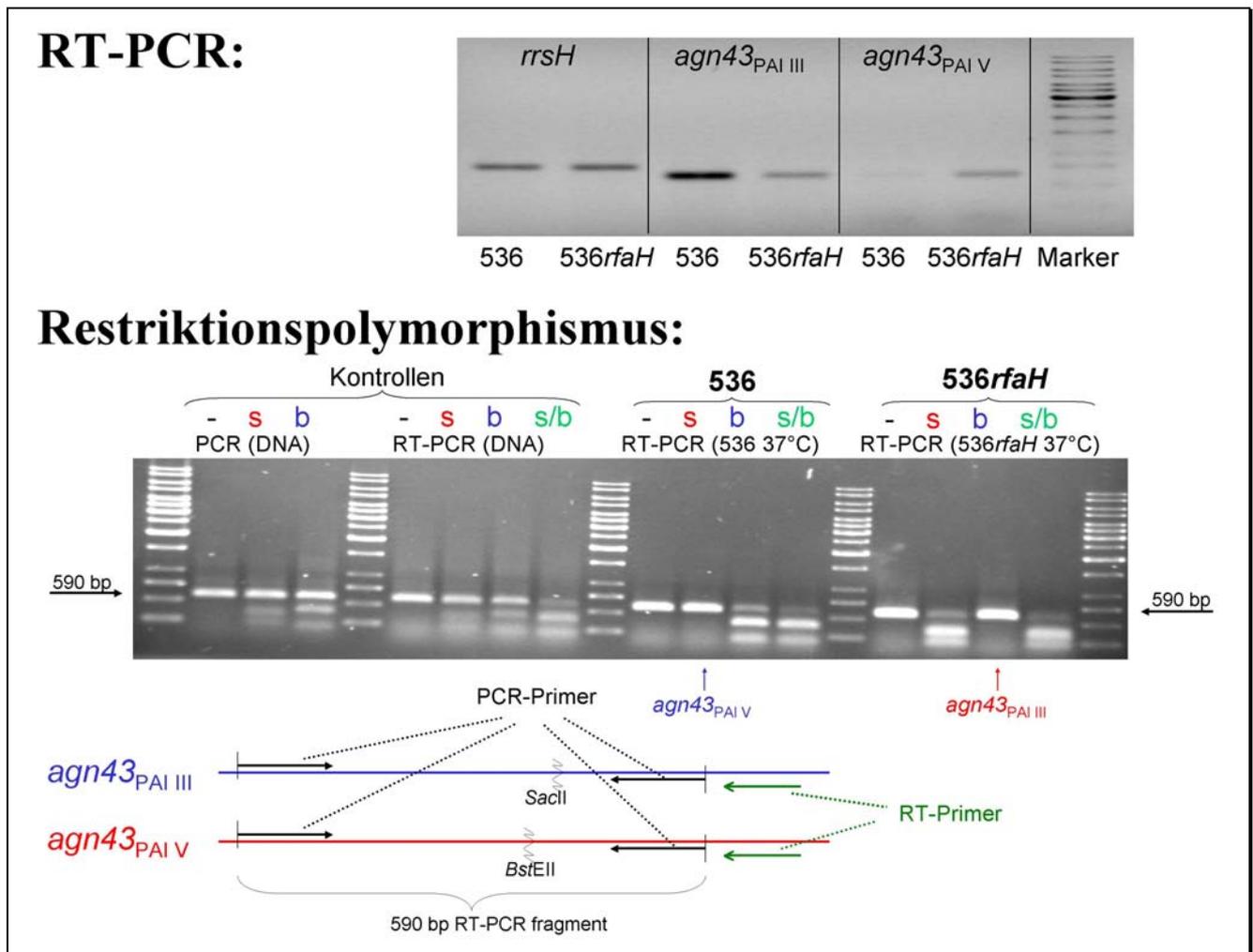


Abb. VI.31: Unterscheidung der Transkriptmengen der *agn43* Varianten im Stamm *E. coli* 536. Im oberen Teil wurden die cDNA-Fragmente beider *agn43* Varianten durch spezifische Primer amplifiziert. Im unteren Teil wurden beide Varianten durch Restriktionspolymorphismus (*SacII*/*BstEII*) unterschieden, nachdem cDNA-Synthese und PCR mit identischen Primern erfolgte. Die Ergebnisse stellen zwei unabhängige Experimente dar und zeigten, dass die Dominanz der jeweiligen Variante abhängig von der Phasenvariation war, jedoch nicht direkt von der *rfaH*-Inaktivierung beeinflusst wurde. s- *SacII*-Spaltung, b- *BstEII*-Spaltung, s/b- *SacII*/*BstEII*-Spaltung.

VI.2.4.4 Einfluss von Antigen 43 und weiterer Oberflächenfaktoren auf die Biofilmbildung

Um den Einfluss beider Agn43 Varianten auf die verstärkte Veranlagung zur Biofilmbildung zu testen, wurden Einzel- und Doppeldeletionen von beiden *agn43* Varianten im Stamm 536 und auch in *536rfaH* erzeugt und die resultierenden Stämme anschließend im Biofilm-Assay getestet.

Eine Deletion beider *agn43* Varianten hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Biofilmbildung. Nur die Inaktivierung von *rfaH* zeigte in allen Fällen eine signifikante Verstärkung des Biofilms. Es kann daraus geschlossen werden, dass die beobachtete Beeinflussung der Transkription von *agn43* durch RfaH im Stamm 536 nicht ursächlich für den beobachteten Biofilm-Phänotyp war.

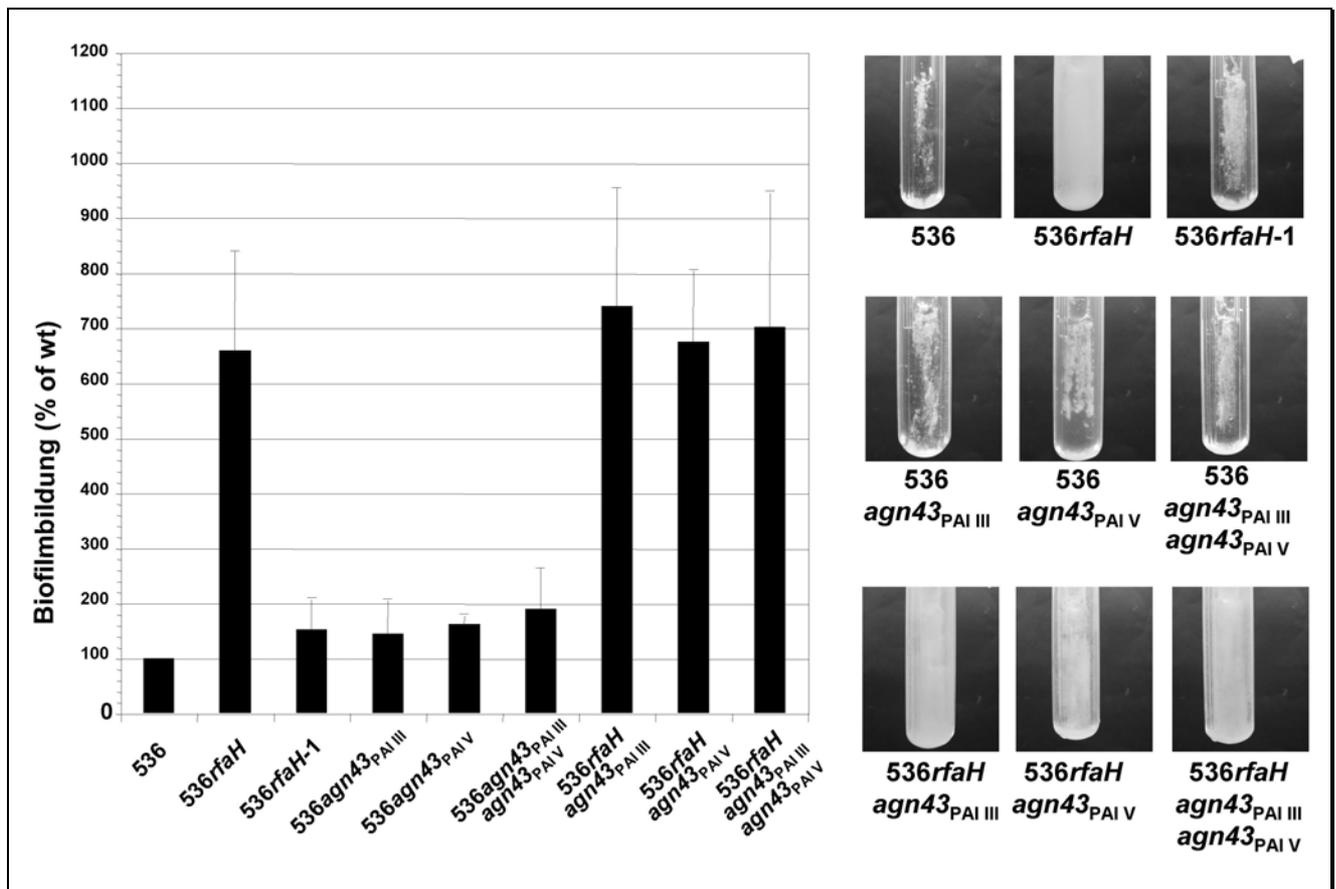


Abb. VI.32: Biofilmbildung verschiedener *agn43* Mutanten der Stämme 536 und 536*rfaH*. Die starke Biofilmbildung in 536*rfaH* ist abhängig vom Transkriptionsfaktor RfaH, aber unabhängig von der *agn43*-Expression. (© Jean-Marc Ghigo, Institut Pasteur, Paris)

In den *E. coli* Stämmen MG1655 und BD1428 ist bereits beschrieben worden, dass Agn43 maßgeblich zur Ausbildung von Biofilmen beiträgt (Danese, *et al.*, 2000b; Klemm, *et al.*, 2004). Durch die Inaktivierung von *agn43* im Stamm MG1655 und MG1655*rfaH*, konnte im Biofilm-Assay bestätigt werden, dass die erhöhte Expression von Antigen 43 in der *rfaH* Mutante die Ursache für die starke Biofilmbildung war. Verglichen mit dem Wildtyp, verstärkte die Inaktivierung von *rfaH* die Biofilmbildung. Eine Inaktivierung von *agn43* in MG1655*rfaH* hingegen bewirkte wiederum das gleiche biofilmbildende Potential wie beim Wildtyp. Somit konnte die erhöhte Expression von Antigen 43 maßgeblich für die starke Biofilmbildung von MG1655*rfaH* verantwortlich gemacht werden.

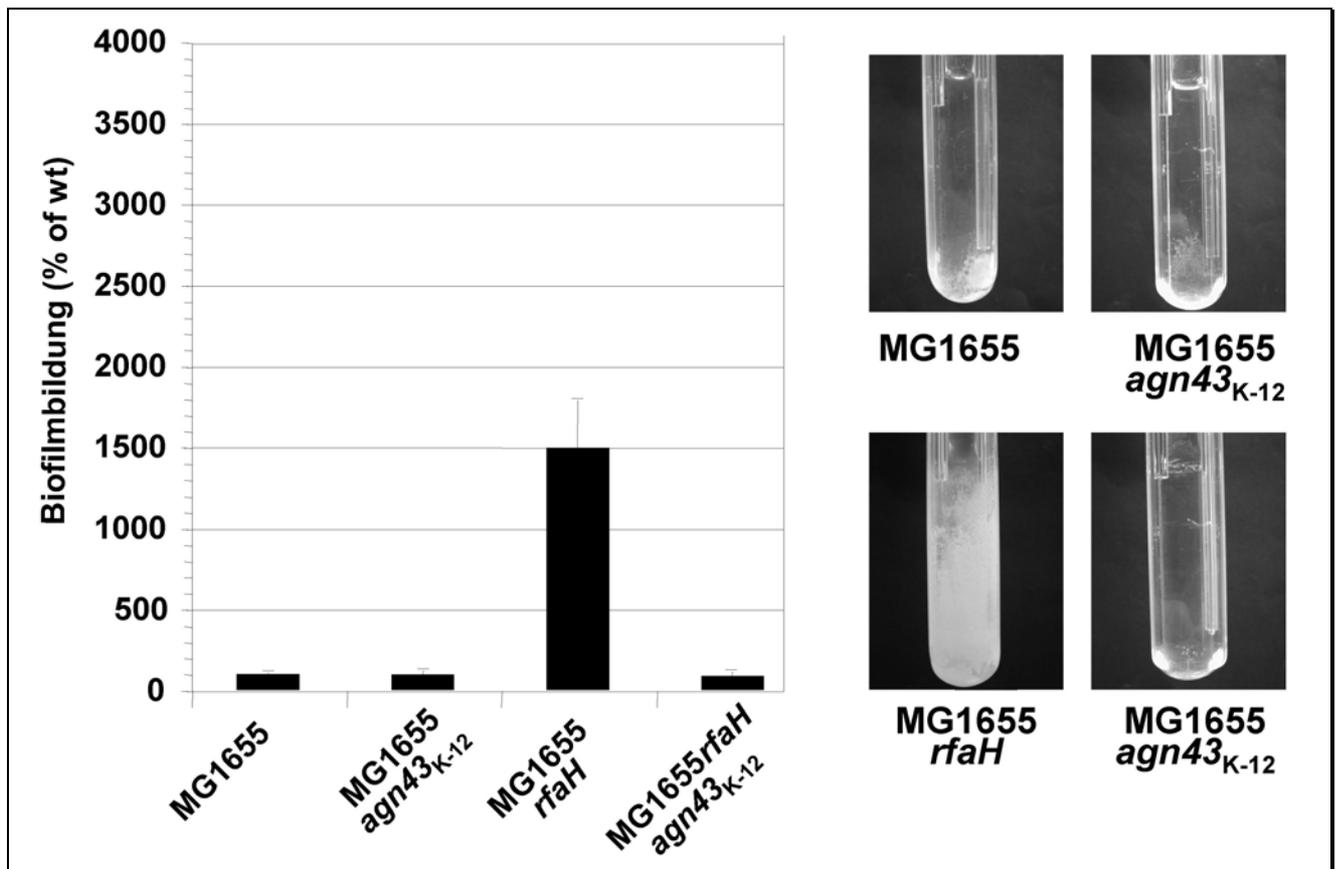


Abb. VI.33: Einfluss von Agn43 auf die Biofilmbildung im Stamm MG1655 und MG1655*rfaH*. Die starke Biofilmbildung in MG1655*rfaH* konnte auf eine erhöhte Expression von *agn43*_{K-12} zurückgeführt werden. (© Jean-Marc Ghigo, Institut Pasteur, Paris)

Die Ausbildung von Biofilmen vollzieht sich in mehreren Schritten. Neben der initialen Haftung an der Oberfläche ist für die nachfolgenden Schritte die interzelluläre Haftung insbesondere in den darüber liegenden Zellschichten von Bedeutung. Diese Haftung kann durch Autoaggregationstests simuliert werden. In der Literatur ist bereits vielfach beschrieben, dass die Expression von Antigen 43 eine starke Autoaggregation verursacht (Danese, *et al.*, 2000b; Klemm, *et al.*, 2004; Owen, *et al.*, 1996; Torres, *et al.*, 2002). Die Abbildung (VI.34) zeigt das Autoaggregationsverhalten von Derivaten des Stammes MG1655. Es war zu erkennen, dass die Inaktivierung von *rfaH* zu erhöhter Autoaggregation in diesem Stamm geführt hatte. Dies war allerdings nicht auf die erhöhte Expression von Agn43 in MG1655 zurückzuführen. Ein anderer RfaH-regulierter Faktor schien für diesen Phänotyp verantwortlich zu sein. Mutationen in *rfaH* und des *agn43*-Repressorgens *oxyR* wirkten sich synergistisch auf die Autoaggregation in MG1655 aus. Das Autoaggregationsverhalten von MG1655*rfaH**oxyR**agn43*_{K-12} legte die Betrachtung nahe, dass dieser Autoaggregationsfaktor zwar RfaH-abhängig, jedoch OxyR-unabhängig zu sein scheint.

Im Stamm 536 führte die Inaktivierung von *rfaH* ebenfalls zu erhöhter Autoaggregation. Bei längerem Stehen einer Schüttelkultur (4-6 Tage bei Raumtemperatur) bildete 536*rfaH* auf dem Boden eines Kolbens eine netzartige Struktur aus; hingegen sammelten sich die Zellen des Wildtyps in der Kavität des Kolbens (siehe Abbildung (VI.34)). Dieser Effekt war bei tieferen Temperaturen begünstigt und vollzog sich bei 4 °C innerhalb von zwei Tagen.

Wie im Stamm MG1655 *rfaH* war auch bei *536rfaH* die erhöhte Expression beider Antigen 43 Varianten oder die dominante Expression eines dieser Gene nicht die Ursache der besseren Autoaggregation. Die separate Inaktivierung jedes der vorhandenen *agn43*-Gene hatte keinen Einfluss auf das Autoaggregationsverhalten, weder im Stamm 536 noch im Stamm *536rfaH*. Hingegen führte die Inaktivierung beider *agn43* Varianten in *536rfaH* weiterhin zu stärkerer Autoaggregation (Lindner, 2005). Dies ist ein Hinweis auf einen zusätzlichen Faktor, der erst durch die Inaktivierung der *agn43* Varianten zur Geltung kommen könnte. Neben Haftfaktoren könnten andere Veränderungen der Zelloberfläche, wie Hydrophobizität und Ladung diesen Phänotyp verursachen.

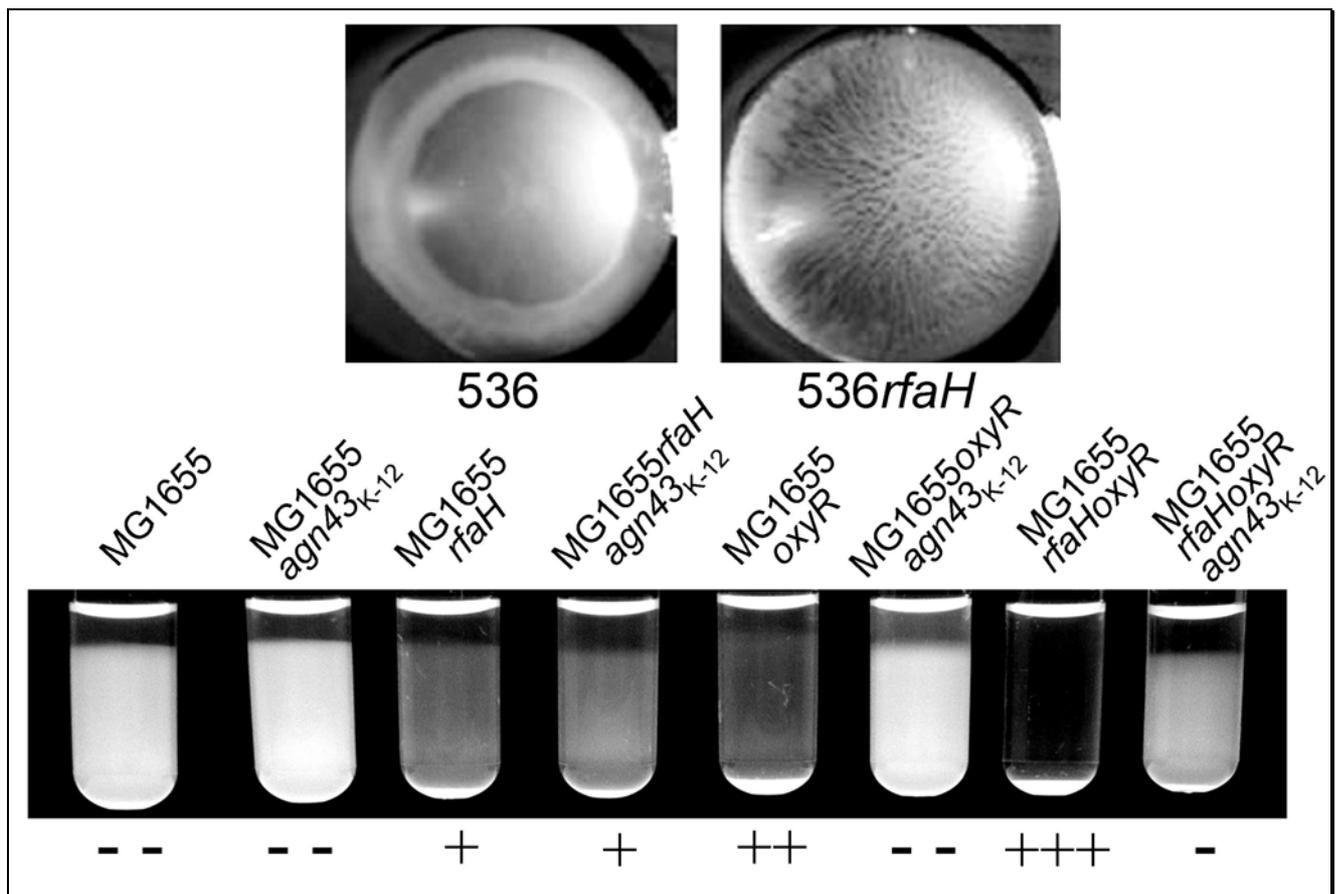


Abb. VI.34: Untersuchungen zur RfaH-abhängigen Autoaggregation. *E. coli* *536rfaH* bildete netzartige Strukturen auf dem Kolbenboden aus. Die Analyse des Autoaggregationsverhaltens von MG1655 Derivaten bestätigte die Abhängigkeit der Expression von *agn43* durch OxyR. Mutationen in *rfaH* und *oxyR* wirkten sich synergistisch auf die erhöhte Autoaggregation aus. Die etwas geringere Autoaggregation von MG1655 *rfaH* zeigte sich jedoch unabhängig von *agn43*. Die Autoaggregation im Stammhintergrund MG1655 wurde somit von einem weiteren RfaH-abhängigen, jedoch OxyR-unabhängigen Faktor beeinflusst.

Neben Agn43 sind noch weitere Faktoren für die Gestalt und Zusammensetzung der äußeren Zellhülle von Bedeutung. Der Stamm MG1655 besitzt durch eine Mutation der Ligase für die O-Seitenkette des LPS einen rauen Phänotyp (Hasman, *et al.*, 2000; Liu und Reeves, 1994). Eine Inaktivierung von *rfaH* führt im Stamm MG1655 zu einer verkürzten LPS-Kernregion und geringerer Colansäureproduktion (Marolda und Valvano, 1998; Nagy, *et al.*, 2005; Stout, 1996). Der Einfluss dieser Faktoren auf die

Ausbildung von Biofilmen wurde näher untersucht. Wie in der Abbildung (VI.35) zu erkennen ist, führte die Inaktivierung der LPS-Kernregion zu erhöhter Biofilmbildung. Dieser Phänotyp war abhängig von der Antigen 43-Expression und wurde von der Colansäureproduktion nicht beeinflusst.

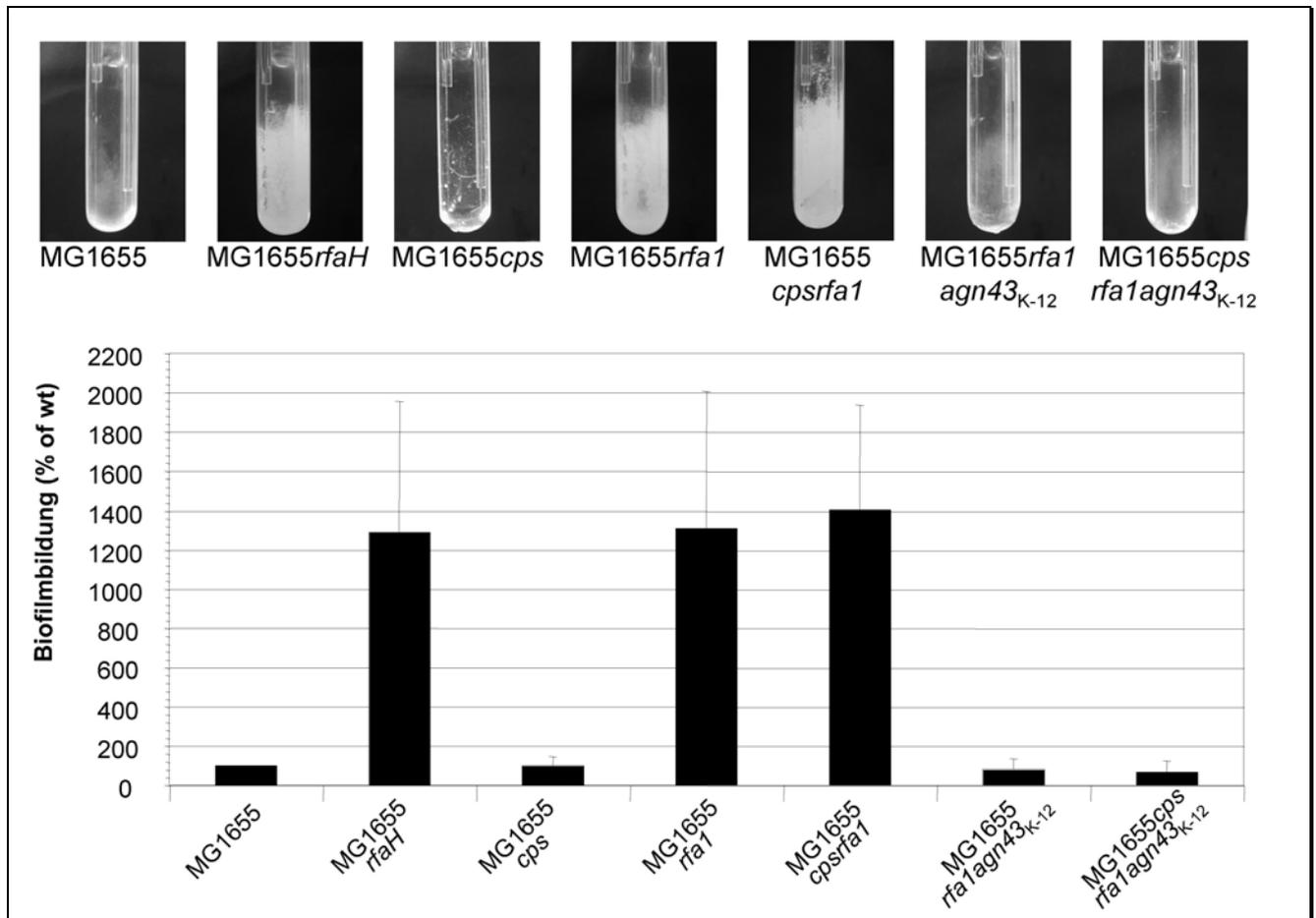


Abb. VI.35: Einfluss von LPS und Colansäure auf die Biofilmbildung des Stammes MG1655. Die Inaktivierung von *rfaH* hatte ein verkürztes LPS-Kernoligosaccharid zur Folge. Dieser regulatorische Einfluss von RfaH auf das LPS-Kernoligosaccharid führte zu erhöhter Biofilmbildung und war im Stamm MG1655 abhängig von *agn43*. Durch die *rfa1*-Mutation wurde das Derivat MG1655 Δ *rfaGPSBI* erzeugt. (© Jean-Marc Ghigo, Institut Pasteur, Paris)

Die Transkriptomanalyse planktonischer Zellen ergab, dass neben der erhöhten *agn43*-Transkription in 536*rfaH* weniger *cpsG*- bzw. *manB*-Transkript als im Wildtyp vorhanden war. Die beiden Gene *cpsG* und *manB* haben eine hohe Ähnlichkeit und konnten deshalb durch die Array-Hybridisierungen nicht unterschieden werden. Durch die Expression von *cpsG* bzw. *manB* wird die Synthese von Colansäure bzw. des O-Antigens des LPS beeinflusst. Deshalb wurden neben dem Einfluss von verminderter Kapselproduktion auch der Einfluss reduzierter Colansäurebildung und veränderter LPS-Strukturen auf die Biofilmbildung des Stammes 536 untersucht. In der Abbildung (VI.36) sind die Auswirkungen dieser Mutationen auf die Biofilmbildung dargestellt.

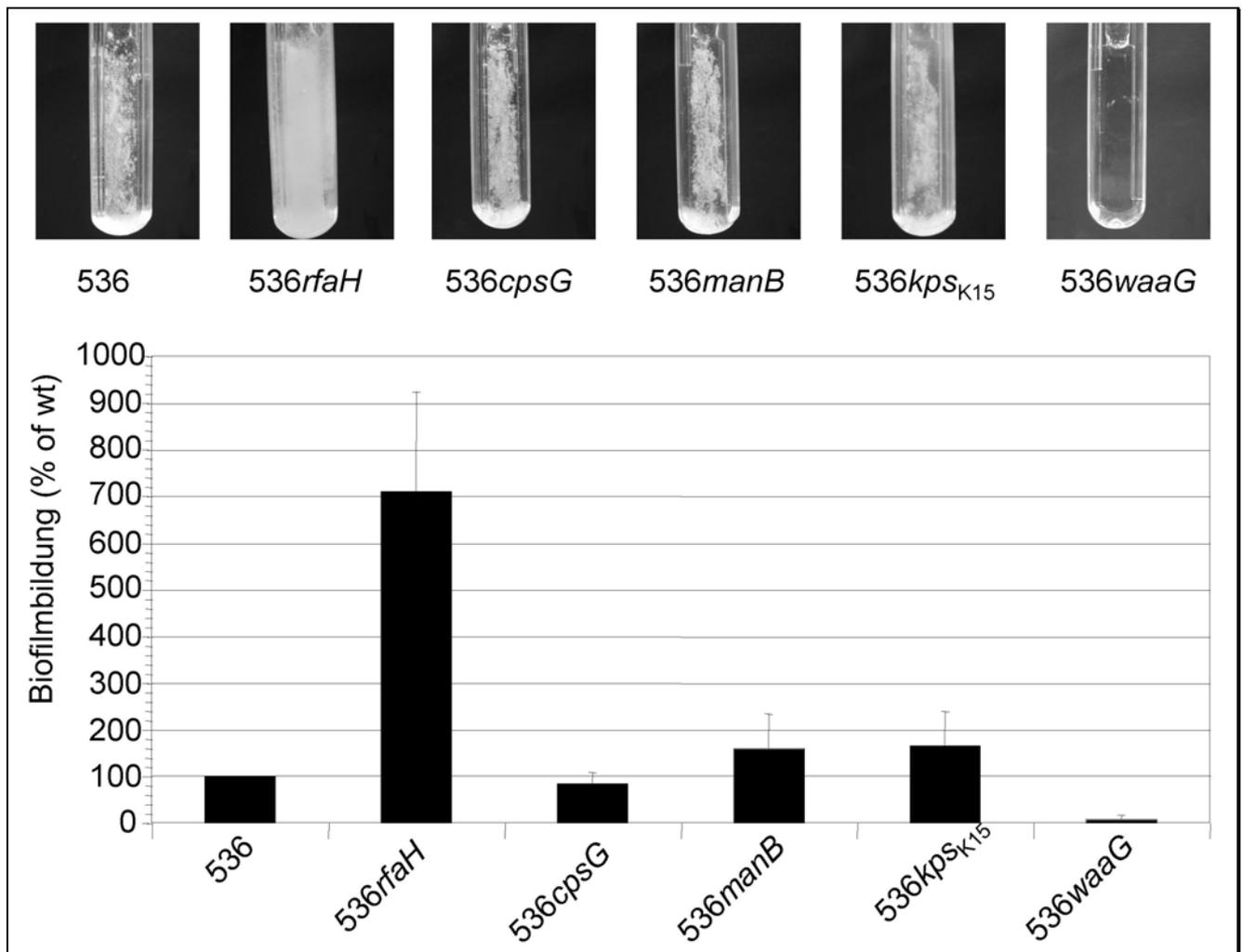


Abb. VI.36: Einfluss von LPS, Kapsel und Colansäure auf die Biofilmbildung in *E. coli* 536. Ein verkürztes LPS ohne Kernregion verhindert die Biofilmbildung signifikant. Colansäurebildung hat keinen Einfluss sowie LPS ohne O-Antigen als auch Inaktivierung der K15 Kapsel verstärken den Biofilm-Phänotyp leicht. (© Jean-Marc Ghigo, Institut Pasteur, Paris)

Wie bereits erwähnt, förderte die Inaktivierung von *rfaH* auch im Stamm 536 die Ausbildung von Biofilmen. Die Expression von Colansäure hatte keinen Einfluss auf den Biofilm-Phänotyp. Ein verkürztes LPS ohne O-Antigen und die Inaktivierung der Gene für die Kapselsynthese verbesserte die Adhärenz nur minimal. Mutanten, die neben dem O-Antigen auch defizient in der LPS-Kernregion waren, zeigten überhaupt keinen adhären Phänotyp mehr. Dies steht im Gegensatz zum beobachteten Phänotyp von MG1655 Δ *rfaGPSBI*. Hier führte eine Mutation der LPS-Kernregion zu deutlich verstärkter Biofilmbildung an Glasoberflächen.

Eine Mutation in der LPS-Kernregion hemmte die Biofilmbildung im Stamm 536 und war unabhängig von der *agn43*-Expression. Im Stamm MG1655 förderte diese Mutation die Biofilmbildung, wenn zudem auch Antigen 43 exprimiert wurde.

VI.2.4.5 Untersuchungen zur Expression und Regulation von *agn43* in Abhängigkeit von RfaH in *E. coli* 536 und MG1655

Die Gegenwart von RfaH erhöht die Transkription von bestimmten Genen, die stromabwärts von Terminatorstrukturen liegen (Transkriptionselongation) (Bailey, *et al.*, 1997). Eine erhöhte Expression von Antigen 43 in *rfaH*-negativen Stämmen muss demzufolge durch einen indirekten, RfaH-abhängigen Mechanismus erfolgen. Die Expression von *agn43* ist phasenvariabel und abhängig von OxyR (Repression) und Dam (Derepression) (Bailey, *et al.*, 1997; Haagmans und van der Woude, 2000; Owen, *et al.*, 1996; Waldron, *et al.*, 2002; Wallecha, *et al.*, 2002). Da sowohl die Repression als auch die Derepression irreversibel sind, kann nur durch neu synthetisierte DNA eine Änderung in der Phase („OFF“ zu „ON“ bzw. „ON“ zu „OFF“) erfolgen (Correnti, *et al.*, 2002; Schembri, *et al.*, 2003b; Wallecha, *et al.*, 2003; Wallecha, *et al.*, 2002).

Die Analyse von in der Genbank verfügbaren *agn43* Varianten ergab, dass die Methylierungsstellen und das OxyR-Bindemotiv in der Promotorregion konserviert sind. Dies wurde in der Abbildung (VI.37) dargestellt.

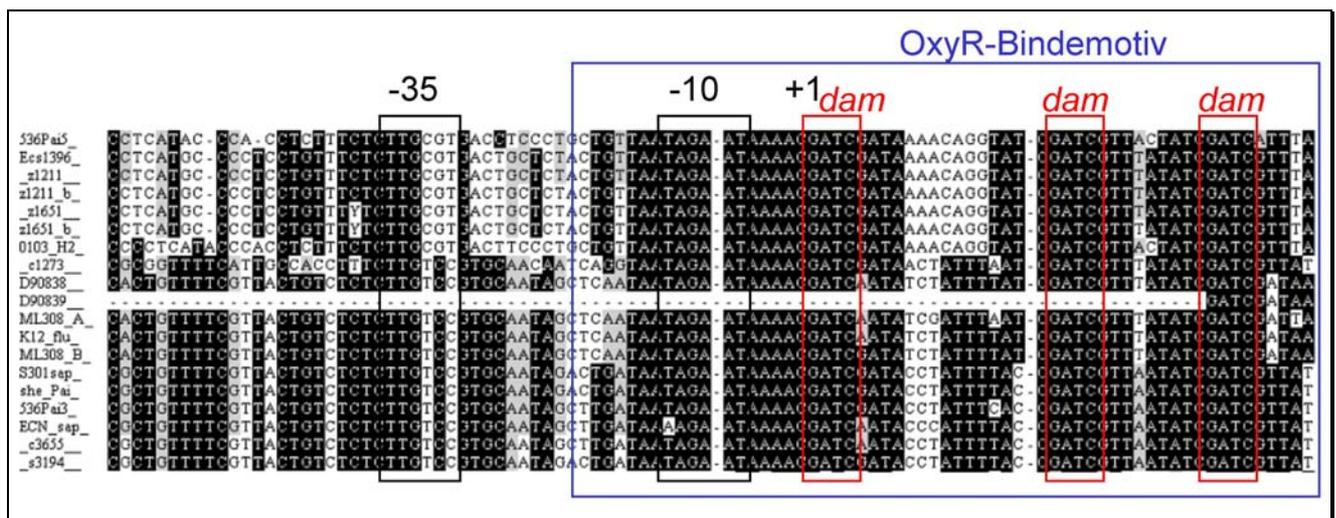


Abb. VI.37: Sequenzanalyse der Promotorregion verschiedener *agn43* Varianten aus *E. coli* und *Shigella*. Die Methylierungsstellen für die Dam-Methylase und das Bindemotiv für den Repressor OxyR waren bei allen untersuchten *agn43* Varianten konserviert.

Eine veränderte Expression von OxyR und Dam in den *rfaH* Mutanten könnte ursächlich für die erhöhte Antigen 43-Expression sein. Deshalb wurden Transkriptmengen von *dam*, *oxyR*, *rfaH* und *agn43* in Zellen aus der logarithmischen und stationären Wachstumsphase sowie aus Biofilmen von *E. coli* 536, 536*rfaH*, MG1655 und MG1655*rfaH* mit Hilfe von RT-PCR-Analysen untersucht und miteinander verglichen. Aus der Abbildung (VI.38) geht hervor, dass keine signifikanten Unterschiede in der Transkription von *oxyR* und *dam* zwischen Wildtyp und *rfaH* Mutanten erkennbar waren. Lediglich in der stationären Wachstumsphase konnte eine reduzierte Expression von *dam*, *oxyR*, *rfaH* und *agn43* beobachtet werden.

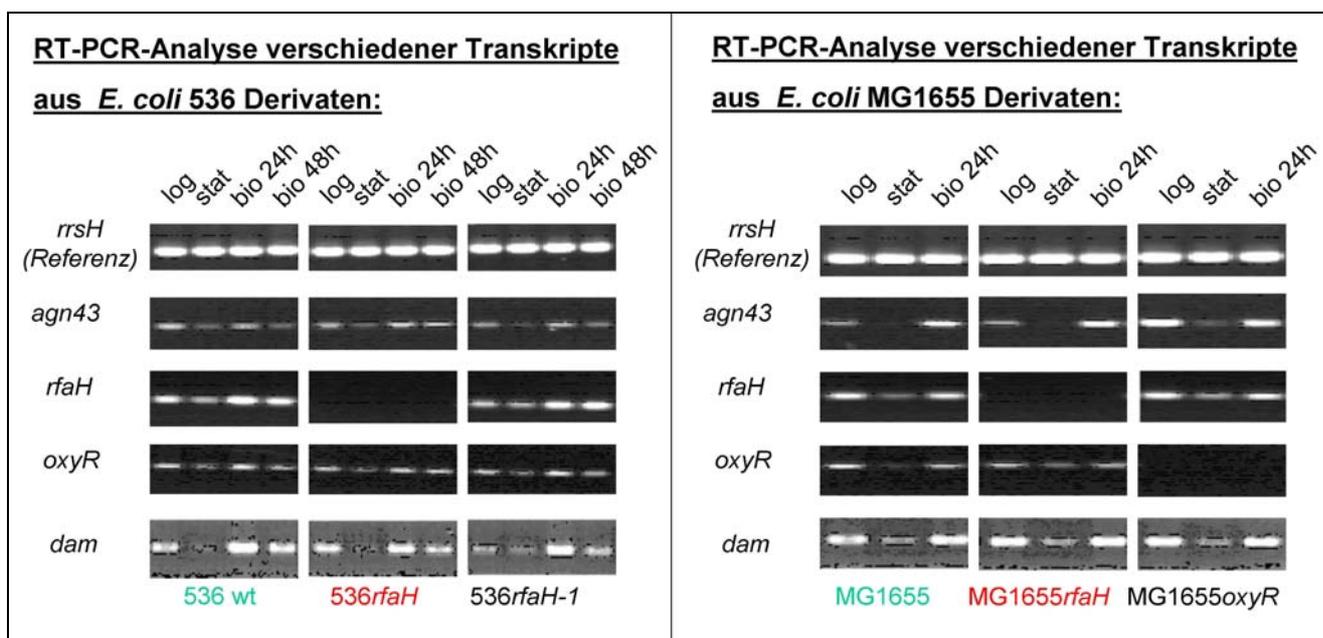


Abb. VI.38: Vergleich der Transkriptmengen von *agn43*, *oxyR*, *dam* und *rfaH* von 536- und MG1655 Derivaten aus Schüttelkulturen (logarithmische, stationäre Wachstumsphase) und Biofilmen. Ein Einfluss von RfaH auf die Transkription von *oxyR* und *dam* welche die Phasenvariation von *agn43* regulieren, konnte nicht beobachtet werden. log- logarithmische Wachstumsphase, stat- stationäre Wachstumsphase, bio 24h- Biofilmzellen nach 24 Stunden, bio 48h- Biofilmzellen nach 48 Stunden.

VI.2.4.6 Reportergenfusionen der *agn43* Varianten in *E. coli* 536 und MG1655

Um Einflüsse verschiedener Faktoren auf die Expression von Antigen 43 untersuchen zu können, wurden insgesamt sechs verschiedene chromosomale Transkriptionsfusionen mit den *agn43* Varianten der Stämme *E. coli* 536, MG1655 und der jeweiligen *rfaH* Mutante hergestellt. Als Reportergen wurde *lacZ* gewählt und mit einer eigenen Ribosomenbindestelle ca. 1000 bp nach dem Startkodon der jeweiligen *agn43* Variante in das Chromosom von 536, *536rfaH*, MG1655 und *MG1655rfaH* durch homologe Rekombination eingefügt. Ausgehend von *lacZ*-negativen Derivaten von 536 und MG1655 wurden die Stämme *536lacZagn43_{PAI III}::lacZ*, *536lacZrfaHagn43_{PAI III}::lacZ*, *536lacZagn43_{PAI V}::lacZ*, *536lacZrfaHagn43_{PAI V}::lacZ*, *MG1655lacZagn43::lacZ* und *MG1655lacZrfaHagn43::lacZ* erzeugt. Die Strategie zur Erzeugung der zuvor benannten Transkriptionsfusionen ist in der Abbildung (VI.39) dargestellt.

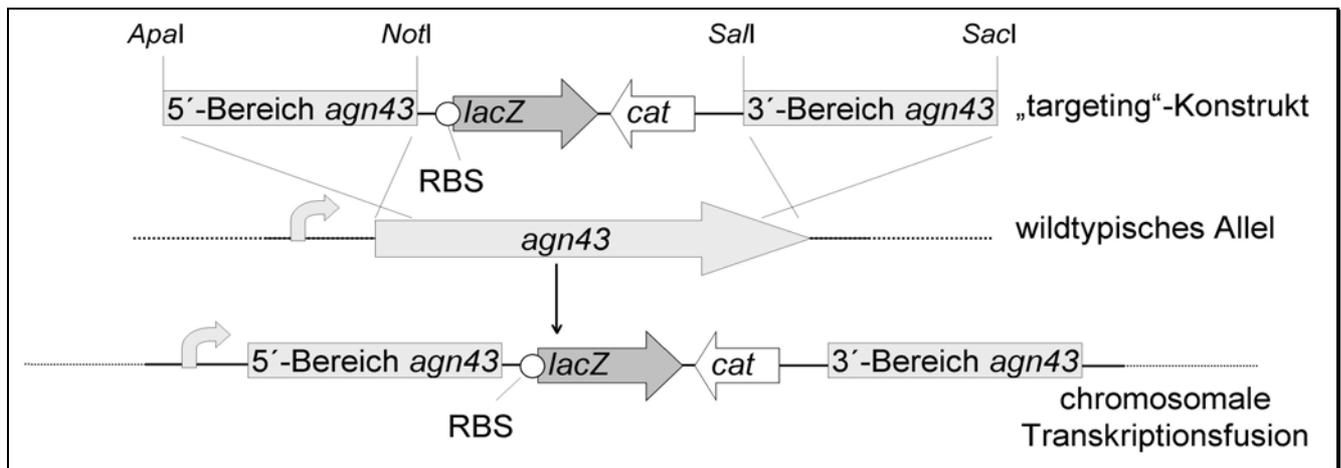


Abb. VI.39: Strategie zur Erzeugung der Transkriptionsfusionen für die *agn43* Varianten von *E. coli* 536 und MG1655 mit dem Reportergen *lacZ*. RBS- Ribosomenbindestelle.

VI.2.4.6.1 Deletion des *rfaH* Gens im Stamm *E. coli* 536*lacZ*

Zunächst wurde der *rfaH*-Lokus im Stamm 536*lacZ* deletiert. In der Abbildung (VI.40) ist die Deletionsstrategie und der Nachweis der erhaltenen Mutanten dargestellt. Die genaue Vorgehensweise zur Erzeugung dieser Deletion wurde im Kapitel Methoden (V.) beschrieben.

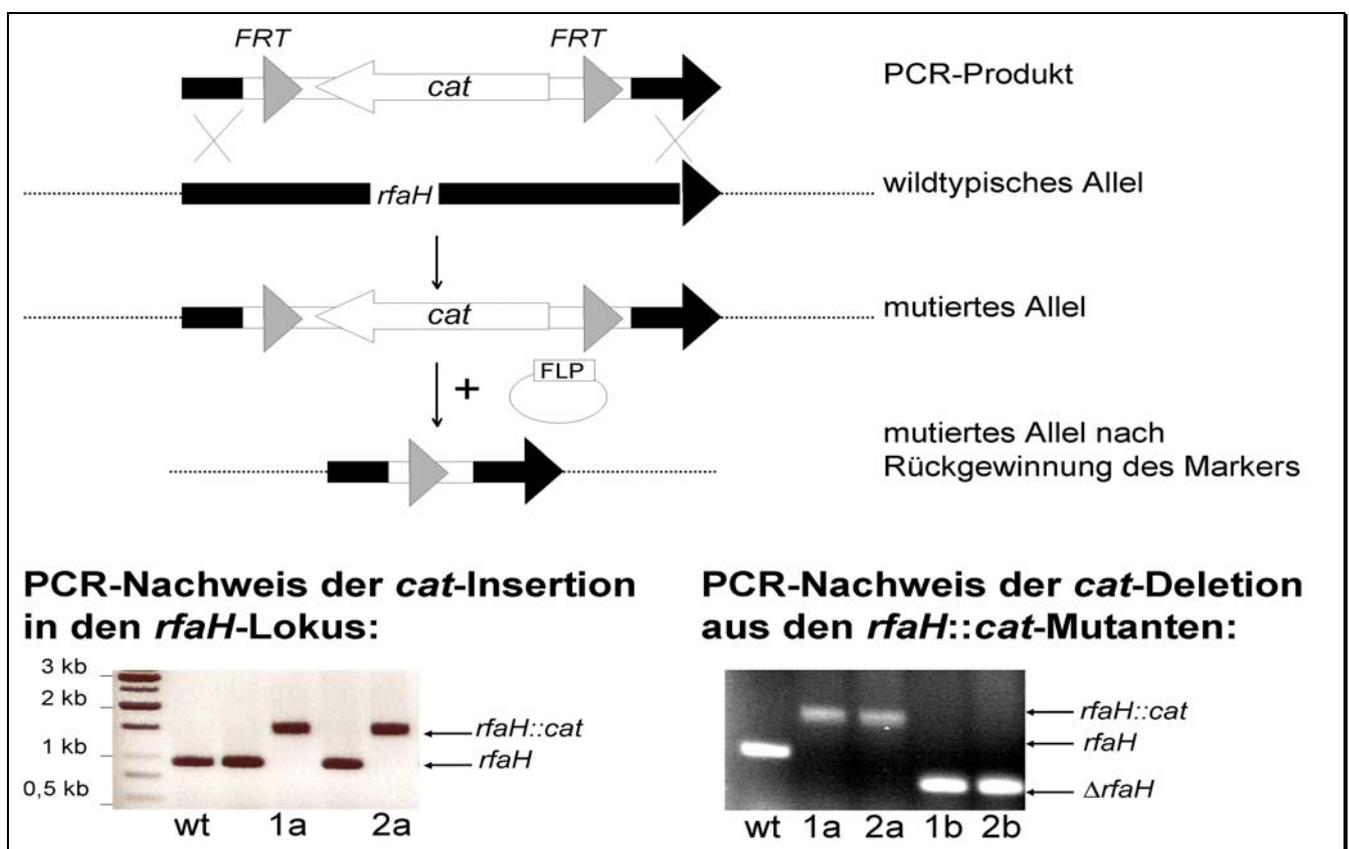


Abb. VI.40: Strategie und Nachweis der Inaktivierung von *rfaH* im Stamm 536*lacZ*. In den *rfaH*-Lokus wurde zunächst eine Chloramphenicolkassette eingefügt (Klon 1a, 2a). Diese Resistenzkassette wurde anschließend entfernt (Klon 1b, 2b). Es verblieb ein defekter *rfaH*-Lokus im Chromosom des Stammes 536*lacZ*.

VI.2.4.6.2 Konstruktion der chromosomal integrierten Reporterfusionen *agn43::lacZ* in sechs verschiedenen *E. coli* Stämmen

Eine detaillierte Beschreibung der Konstruktion der chromosomal integrierten Reporterfusionen *agn43::lacZ* in den sechs Stämmen ist im Methodenteil nachzulesen. Im Folgenden wird nur eine Kurzdarstellung für den Nachweis der Transkriptionsfusionsmutanten gegeben.

a) Nachweis der Transkriptionsfusion *agn43_{PAI III}::lacZ*:

Potentielle Mutanten mit der Transkriptionsfusion *agn43_{PAI III}::lacZ* in den Stammhintergründen *536lacZ* und *536lacZrfaH* wurden durch PCR-Screening bestimmt und durch Southernblotanalyse bestätigt.

Es konnten für beide Stämme jeweils drei unabhängige Transkriptionsfusionsmutanten erzeugt werden.

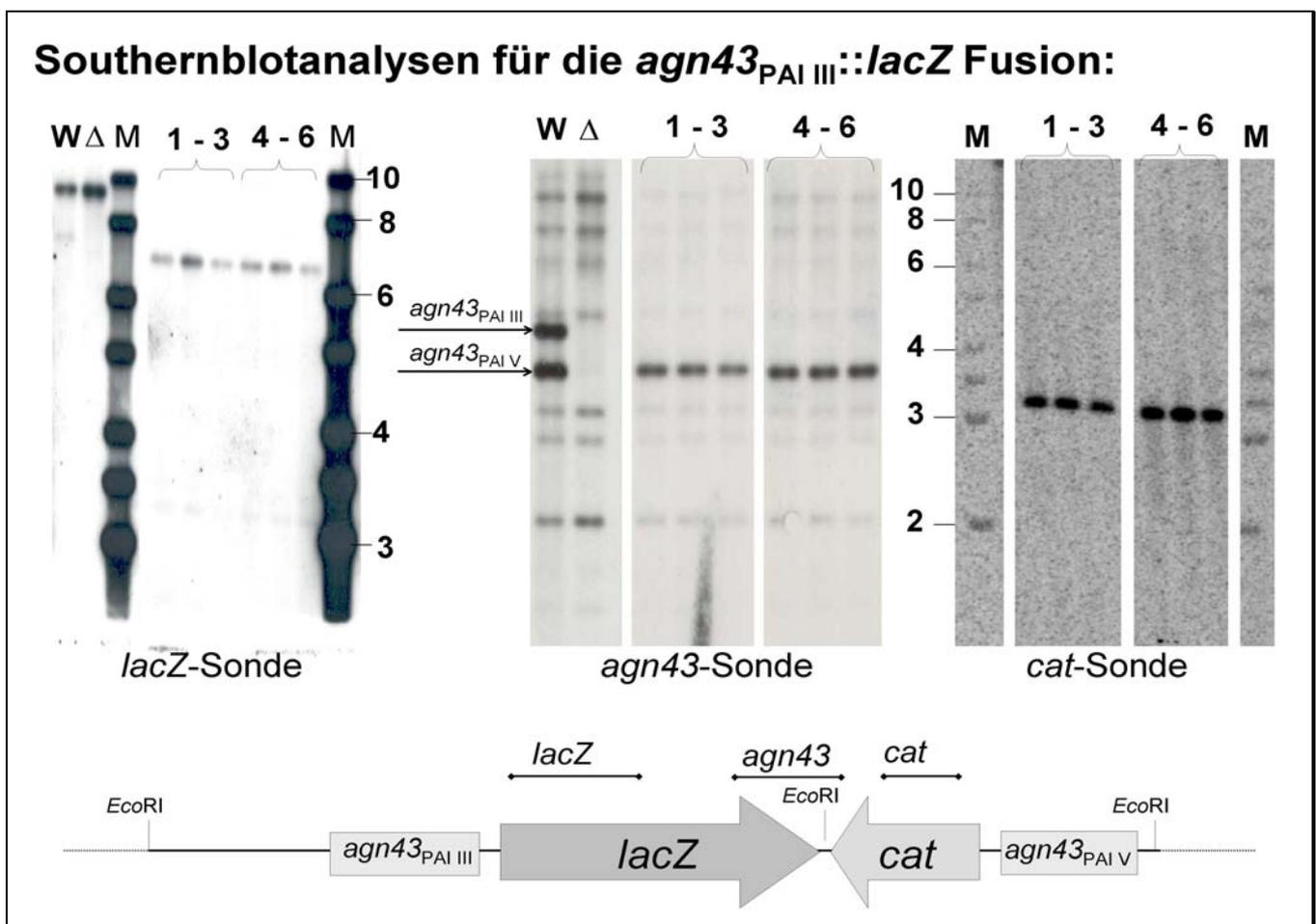


Abb. VI.41: Southernblotanalysen für die Transkriptionsfusionen *536lacZagn43_{PAI III}::lacZ* sowie *536lacZrfaHagn43_{PAI III}::lacZ* mit 536 (W) und *536agn43_{PAI III}agn43_{PAI V}* (Δ) als Negativkontrollen. Die chromosomale DNA wurde mit Hilfe von *EcoRI* gespalten. Die Bindestellen der Sonden *lacZ*, *agn43* und *cat* sind dargestellt. Die *agn43*-Sonde erzeugte Hintergrundbanden, da die β -Domäne mit anderen Autotransportergenen hybridisierte. Es wurden insgesamt drei voneinander unabhängige Transkriptionsfusionen *536lacZagn43_{PAI III}::lacZ* (Spur 1-3) und *536lacZrfaHagn43_{PAI III}::lacZ* (Spur 4-6) erzeugt. W- 536 Wildtyp, Δ - *536agn43_{PAI III}agn43_{PAI V}*, M- Größenmarker.

b) Nachweis der Transkriptionsfusion *agn43_{P_{AI}V}::lacZ*:

Auch die Mutanten der Stammhintergründe *536lacZ* und *536lacZrfaH* mit der Transkriptionsfusion *agn43_{P_{AI}V}::lacZ* wurden durch PCR-Screening bestimmt und konnten durch Southernblotanalyse bestätigt werden. Es wurden ebenfalls für beide Stämme jeweils drei unabhängige Transkriptionsfusionsmutanten erzeugt.

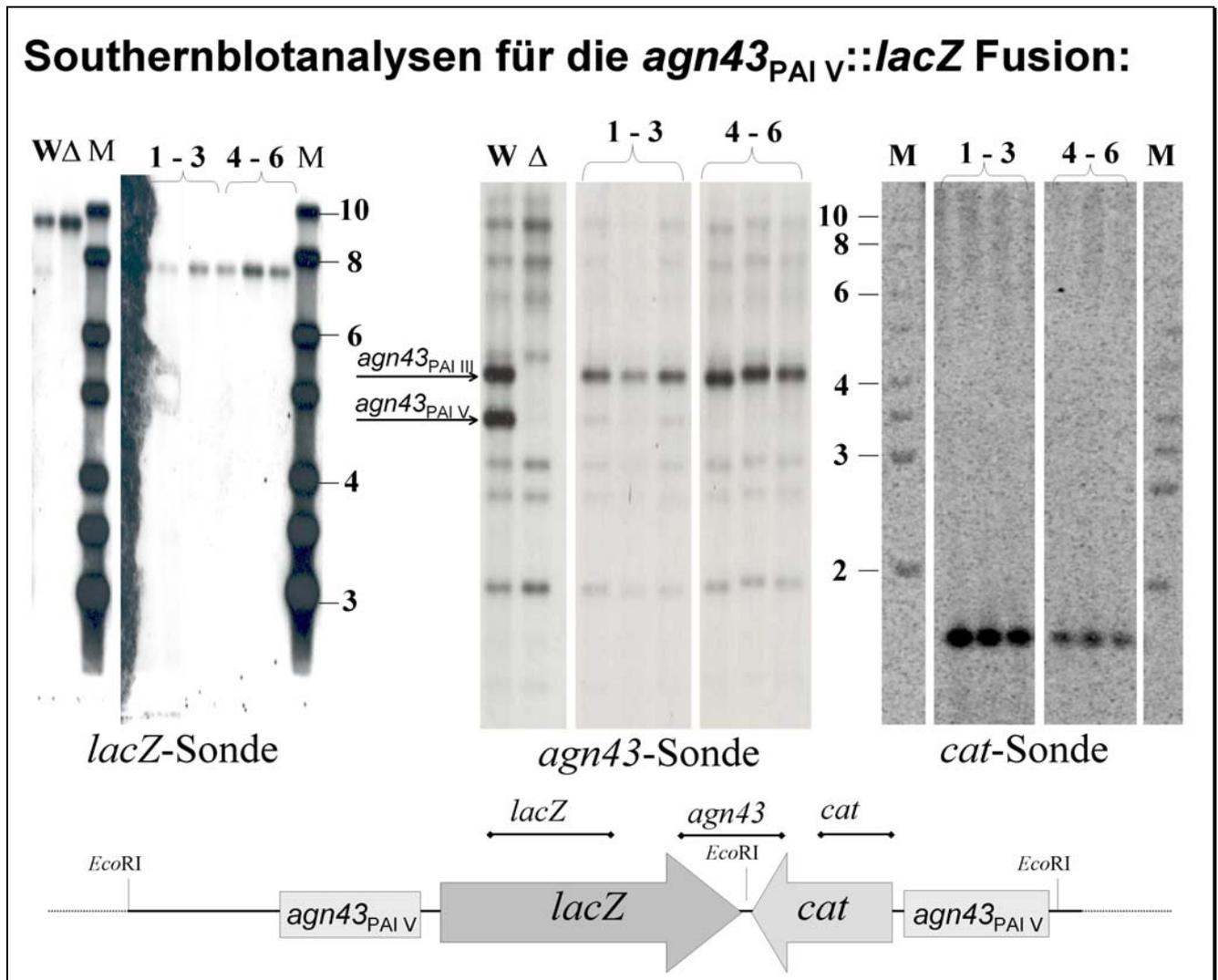


Abb. VI.42: Southernblotanalysen für die Transkriptionsfusionen *536lacZagn43_{P_{AI}V}::lacZ* sowie *536lacZrfaHagn43_{P_{AI}V}::lacZ* mit *536* (W) und *536agn43_{P_{AI}III}agn43_{P_{AI}V}* (Δ) als Negativkontrollen. Die chromosomale DNA wurde mit Hilfe von *EcoRI* gespalten. Die Bindestellen der Sonden *lacZ*, *agn43* und *cat* sind dargestellt. Die *agn43*-Sonde erzeugte Hintergrundbanden, da die β -Domäne mit anderen Autotransportergenen hybridisierte. Es wurden jeweils drei voneinander unabhängige Transkriptionsfusionen *536lacZagn43_{P_{AI}V}::lacZ* (Spur 1-3) und *536lacZrfaHagn43_{P_{AI}V}::lacZ* (Spur 4-6) hergestellt. W- *536* Wildtyp, Δ - *536agn43_{P_{AI}III}agn43_{P_{AI}V}*, M- Größenmarker.

c) Nachweis der Transkriptionsfusion *agn43_{K-12}::lacZ*:

Für die Erzeugung einer Transkriptionsfusion *agn43_{K-12}::lacZ* konnte das gleiche „targeting“-Konstrukt verwendet werden, wie bei der *agn43_{P_{AI} III}::lacZ*-Fusion, da beide Gene eine große Identität aufwiesen. (Die verwendeten Ausgangsstämme MG1655*lacZ* und MG1655*lacZrfaH* stammten aus verschiedenen Laboren und waren streng genommen nicht isogen.) Die potentiellen Mutanten mit den *agn43_{K-12}::lacZ*-Fusionen wurden durch PCR-Screening analysiert und durch Southernblotanalyse bestätigt. Insgesamt konnten sieben Klone im MG1655 Stammhintergrund und drei Klone im MG1655*rfaH* Stammhintergrund erzeugt werden.

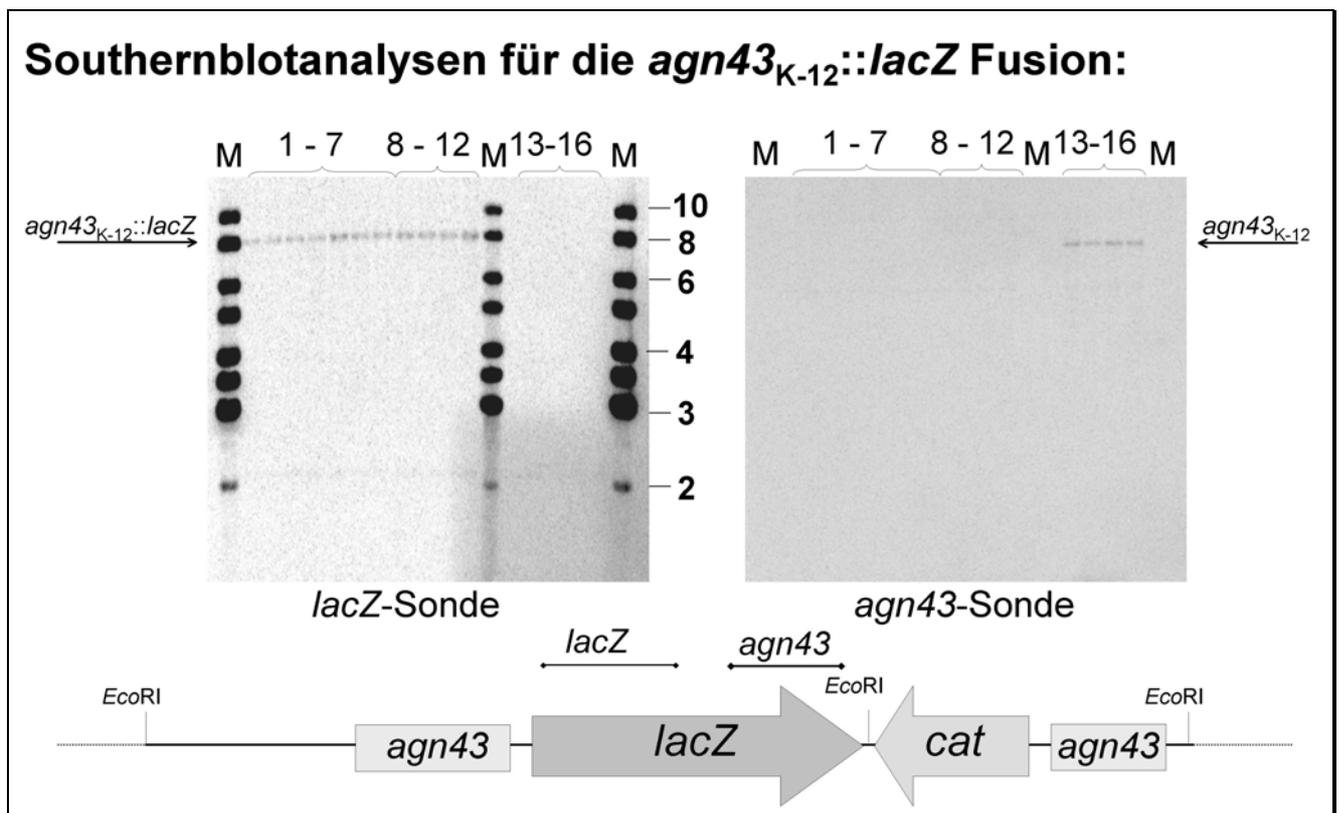


Abb. VI.43: Southernblotanalysen für die Transkriptionsfusionen MG1655*lacZagn43_{K-12}::lacZ* sowie MG1655*lacZrfaHagn43_{K-12}::lacZ* mit MG1655*lacZ* (Spur 13, 14) und MG1655*lacZrfaH* (Spur 15, 16) als Negativkontrolle. Die chromosomale DNA wurde mit Hilfe von *EcoRI* gespalten. Die Bindestellen der Sonden *lacZ*, *agn43* und *cat* sind dargestellt. Spur 1-7 zeigt die Fusionsmutanten MG1655*lacZagn43_{K-12}::lacZ* und in Spur 8-12 sind die MG1655*lacZrfaHagn43_{K-12}::lacZ* Transkriptionsfusionen zu finden. M- Größenmarker.

VI.2.4.7 Vergleich der Promotoraktivitäten der *agn43* Varianten unter Verwendung der chromosomalen *agn43::lacZ*-Transkriptionsfusionen

VI.2.4.7.1 Bestimmung der Promotoraktivität von *agn43* in M63-Minimalmedium bei 37 °C

Um den Einfluss der Wachstumsphase auf die Promotoraktivität der verschiedenen *agn43* Varianten in Gegenwart und Abwesenheit von RfaH zu untersuchen, wurden von den konstruierten Reporterstämmen an fünf Zeitpunkten ($OD_{600}=0,35$, frühe log-Phase; $OD_{600}=1,0$, mittlere log-Phase; $OD_{600}=1,7$, späte log-Phase; $OD_{600}=2,5$ stationäre Phase; $OD_{600}=2,4$ Absterbe-Phase) Proben aus den Schüttelkulturen entnommen und die β -Galaktosidaseaktivität bestimmt. Von jedem Reporterstamm wurden zwei verschiedene Klone verwendet und von diesen je eine Phase „ON“ bzw. Phase „OFF“-Kolonie zum Beimpfen der Vorkultur verwendet. Insgesamt wurden somit für jeden Reporterstamm vier verschiedene Kulturen untersucht.

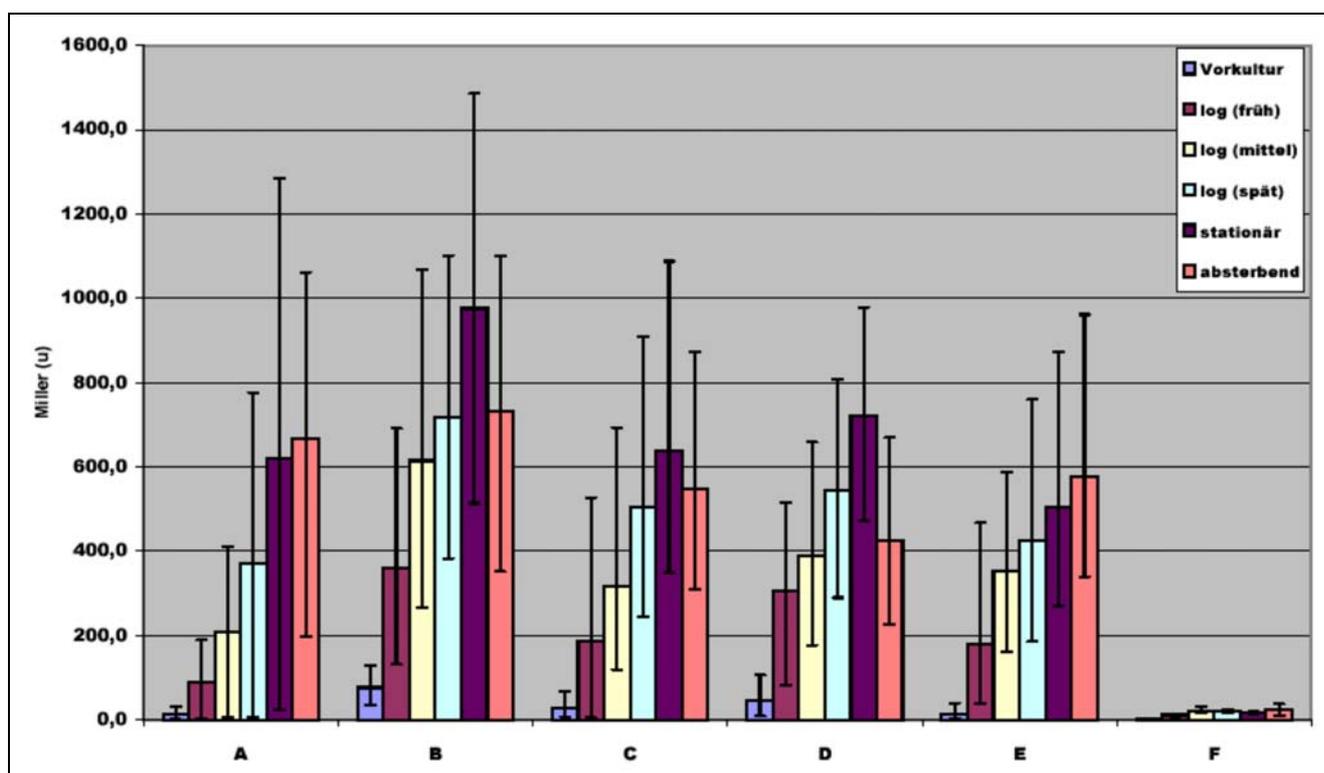


Abb. VI.44: β -Galaktosidaseaktivitäten der sechs chromosomalen Transkriptionsfusionen (A- $536lacZagn43_{PAI\ III}::lacZ$, B- $536lacZrfaHagn43_{PAI\ III}::lacZ$, C- $536lacZagn43_{PAI\ V}::lacZ$, D- $536lacZrfaHagn43_{PAI\ V}::lacZ$, E- $MG1655lacZagn43_{K-12}::lacZ$, F- $MG1655lacZrfaHagn43_{K-12}::lacZ$) in M63-Minimalmedium bei 37 °C innerhalb der Wachstumsphase. (frühe log-Phase: $OD_{600}=0,35$; mittlere log-Phase: $OD_{600}=1,0$; späte log-Phase: $OD_{600}=1,7$; stationäre Phase: $OD_{600}=2,5$; Absterbe-Phase: $OD_{600}=2,4$). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Minima/Maxima-Schwankungen der einzelnen Messungen.

Aus der Abbildung (VI.44) geht hervor, dass die bestimmten Werte der β -Galaktosidaseaktivität innerhalb der Wachstumskurve zunehmen und ein Maximum in der stationären Phase erreichen.

Demzufolge sollten die Promotoraktivitäten der einzelnen *agn43* Varianten in der stationären Phase am stärksten sein, (vorausgesetzt die Halbwertszeit von LacZ ist so gering, dass das Protein nicht in der Zelle akkumuliert wird). Bei den Reporterstämmen von *E. coli* 536 war zu beobachten, dass, im Einklang mit den Resultaten der cDNA-Analysen (vergl. Abbildung VI.31), insbesondere für die *agn43*_{PAI III} Variante in Abwesenheit von RfaH eine erhöhte Promotoraktivität feststellbar ist. Der Unterschied der Promotoraktivität der *agn43*_{PAI III} Variante zwischen Wildtyp und *rfaH* Derivat schwankte in Abhängigkeit zur Wachstumsphase zwischen Faktor 1,6 und 4,2. Die Promotoraktivitäten der *agn43*_{PAI V} Variante im Stamm 536 bzw. 536*rfaH* sowie der *agn43*_{PAI III} Variante im wildtypischen Stammhintergrund waren auf einem vergleichbaren Niveau. Die bestimmten Werte für MG1655*lacZrfaHagn43*_{K-12}::*lacZ* waren im Vergleich zum MG1655-Wildtyp so gering, dass Konstruktionsfehler bei diesem Reporterstamm nicht ausgeschlossen werden können.

VI.2.4.7.2 Bestimmung der Promotoraktivität von *agn43* in M63-Minimalmedium bei 42 °C

Alle sechs Reporterstämme wurden ebenfalls bei 42 °C in M63-Minimalmedium untersucht. An drei verschiedenen Zeitpunkten (OD₆₀₀=0,5, log-Phase; OD₆₀₀=1,4, stationäre Phase; OD₆₀₀=1,2 Absterbe-Phase) wurden Proben aus den Schüttelkulturen entnommen und die β -Galaktosidaseaktivitäten bestimmt.

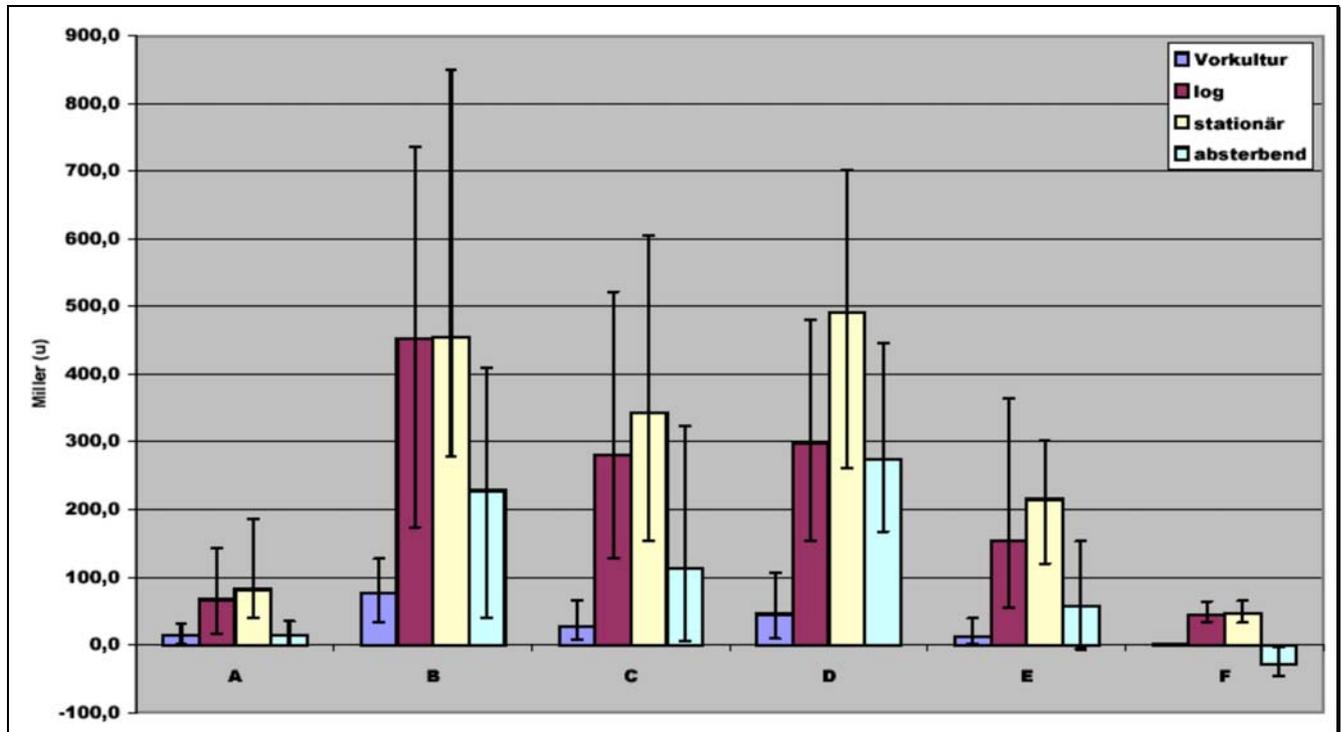


Abb. VI.45: β -Galaktosidaseaktivitäten der sechs chromosomalen Transkriptionsfusionen (A- 536*lacZagn43*_{PAI III}::*lacZ*, B- 536*lacZrfaHagn43*_{PAI III}::*lacZ*, C- 536*lacZagn43*_{PAI V}::*lacZ*, D- 536*lacZrfaHagn43*_{PAI V}::*lacZ*, E- MG1655*lacZagn43*_{K-12}::*lacZ*, F- MG1655*lacZrfaHagn43*_{K-12}::*lacZ*) in M63-Minimalmedium bei 42 °C innerhalb der Wachstumsphase. (log-Phase: OD₆₀₀=0,5; stationäre Phase: OD₆₀₀=1,4; Absterbe-Phase: OD₆₀₀=1,2). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Minima/Maxima-Schwankungen der einzelnen Messungen.

Wie bei den Messungen zuvor (M63-Minimalmedium, 37 °C) konnte die höchste Promotoraktivität in der stationären Phase festgestellt werden. Generell erfolgte auch hier in Abwesenheit von RfaH eine verstärkte Promotoraktivität für die *agn43*_{PAI III} Variante und in geringem Maße auch für die *agn43*_{PAI V} Variante. Der Unterschied der Promotoraktivität der *agn43*_{PAI III} Variante zwischen Wildtyp und *rfaH* Derivat lag ca. bei Faktor 5,6. Allerdings war eine im Vergleich zu 37 °C insgesamt geringere Promotoraktivität bei allen *agn43* Varianten feststellbar.

VI.2.4.7.3 Bestimmung der Promotoraktivität von *agn43* in M63-Minimalmedium bei 25 °C

In M63-Minimalmedium war bei Raumtemperatur (25 °C) eine generell geringere Promotoraktivität der *agn43* Varianten als bei 37 °C zu beobachten, jedoch war diese stärker als bei 42 °C. Der Vergleich der einzelnen Reporterstämme untereinander bei 25 °C wies die gleichen Tendenzen auf wie bei 37 °C. In der *rfaH* Mutanten war hier ebenfalls eine etwas verstärkte Promotoraktivität der *agn43*_{PAI III} Variante feststellbar.

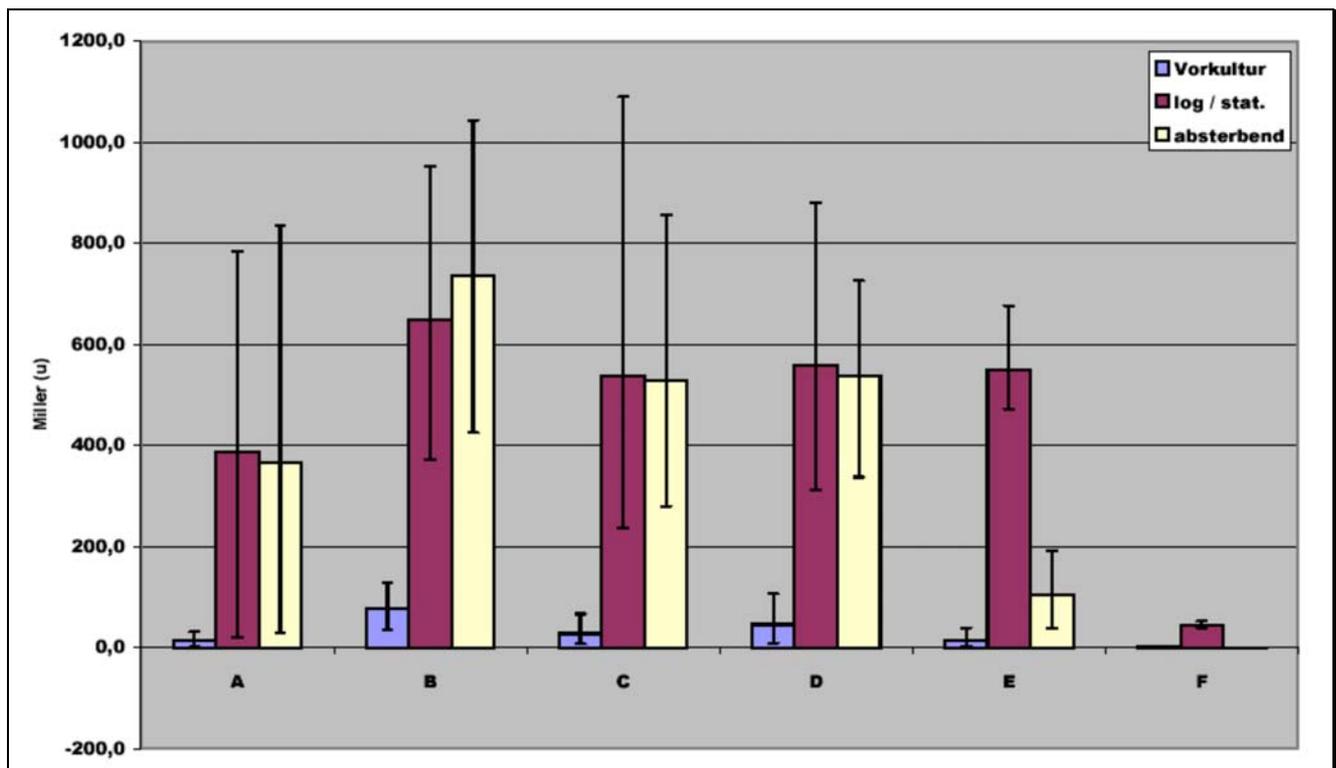


Abb. VI.46: β -Galaktosidaseaktivitäten der sechs chromosomalen Transkriptionsfusionen (A- 536lacZagn43_{PAI III}::lacZ, B- 536lacZrfaHagn43_{PAI III}::lacZ, C- 536lacZagn43_{PAI V}::lacZ, D- 536lacZrfaHagn43_{PAI V}::lacZ, E- MG1655lacZagn43_{K-12}::lacZ, F- MG1655lacZrfaHagn43_{K-12}::lacZ) in M63-Minimalmedium bei Raumtemperatur. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Minima/Maxima-Schwankungen der einzelnen Messungen.

VI.2.4.7.4 Bestimmung der Promotoraktivität von *agn43* in LB-Medium bei 37 °C

Werden die Promotoraktivitäten der *agn43* Varianten in LB-Medium verglichen mit den Daten, die für M63-Minimalmedium bestimmt worden sind, ist zu erkennen, dass die gemessenen Werte für die Promotoraktivität der *agn43*-Transkriptionsfusionen in LB-Medium geringer ausfielen als in M63-Minimalmedium. Diese Tatsache wurde für den Stamm MG1655 schon in der Literatur beschrieben und bestätigt diese Tendenz auch für die beiden *agn43* Varianten im Stamm 536 (Danese, *et al.*, 2000b). Wie bei den anderen Messungen hatte der Promotor der *agn43*_{PAI III} Variante im *rfaH* Derivat die größte Aktivität. Auffallend war, dass in der Absterbephase die Promotoraktivität sehr viel deutlicher absank als es in M63-Minimalmedium beobachtet wurde.

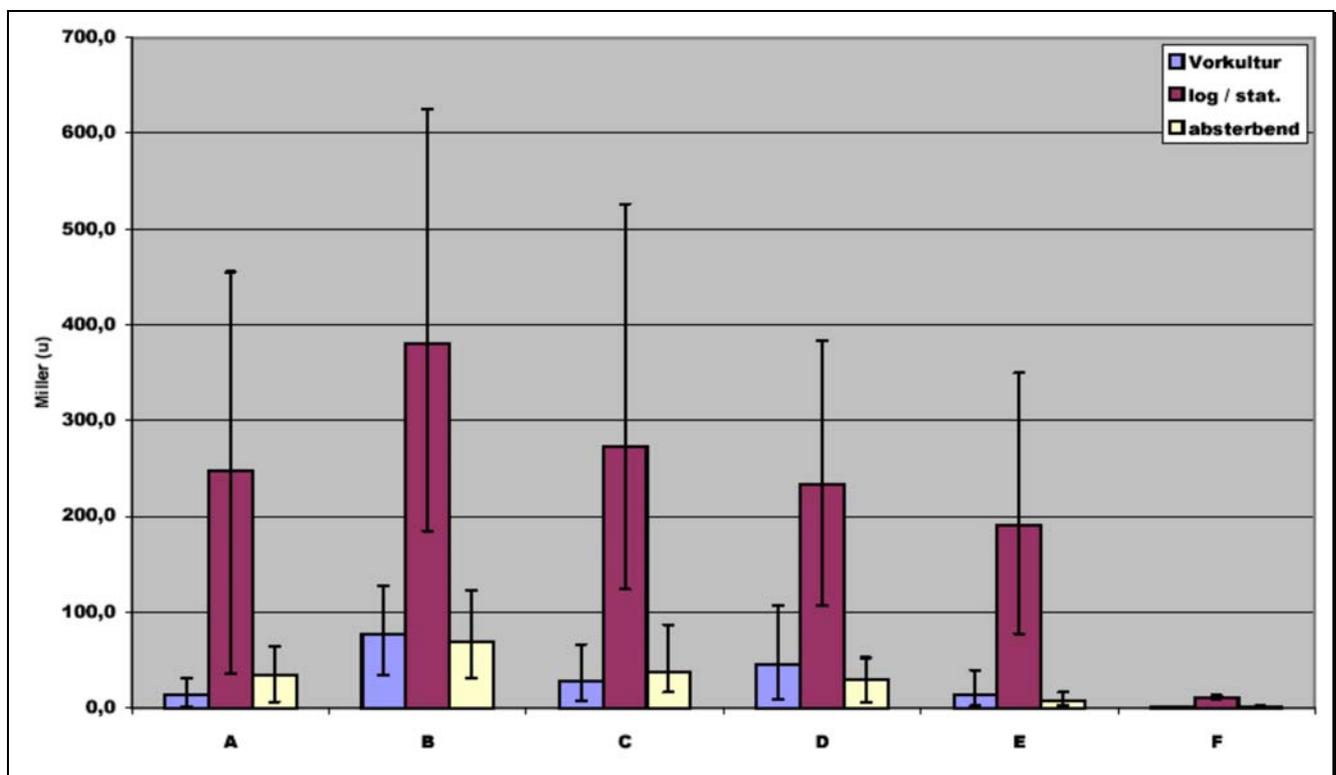


Abb. VI.47: β -Galaktosidaseaktivitäten der sechs chromosomalen Transkriptionsfusionen (A- *536lacZagn43*_{PAI III}::*lacZ*, B- *536lacZrfaHagn43*_{PAI III}::*lacZ*, C- *536lacZagn43*_{PAI V}::*lacZ*, D- *536lacZrfaHagn43*_{PAI V}::*lacZ*, E- *MG1655lacZagn43*_{K-12}::*lacZ*, F- *MG1655lacZrfaHagn43*_{K-12}::*lacZ*) in LB-Medium bei 37 °C. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Minima/Maxima-Schwankungen der einzelnen Messungen.

VI.2.4.8 Einfluss einer putativen Methyltransferase auf die Transkription beider *agn43* Varianten im Stamm 536

Durch den Vergleich der Transkriptome von 536 und *536rfaH* erwies sich, dass die putative Methyltransferase *ORF35*_{PAI II} („Pathoarray“-Bezeichnung „PAI2 ORF01“) im Wildtypstamm verstärkt transkribiert wurde. Um zu überprüfen, ob diese putative Methyltransferase neben OxyR und

Der Einfluss auf die Transkription der beiden *agn43* Varianten im Stamm 536 haben könnte, wurden die Transkriptmengen beider *agn43* Varianten im Stamm $536\Delta ORF35_{PAI II}$ untersucht und mit jenen aus 536 und $536rfaH$ verglichen. Die Unterscheidung der mRNA beider *agn43* Varianten des Stammes *E. coli* 536 erfolgte wie zuvor (vergl. Abbildung VI.31) über den Restriktionspolymorphismus der resultierenden cDNAs von *agn43*_{PAI III} und *agn43*_{PAI V} mittels der Endonukleasen *SacII* und *BstEII*, welche das jeweilige cDNA-Fragment spezifisch schneiden. Das cDNA-Muster im *E. coli* 536-Wildtyp zeigte eine dominante Expression der *agn43*_{PAI V} Variante. Auch das cDNA-Muster von $536\Delta ORF35_{PAI II}$ bestätigte eine dominante Expression der *agn43*_{PAI V} Variante, jedoch konnten hier zudem geringe Mengen an *agn43*_{PAI III}-Transkript nachgewiesen werden. Auch im Stamm $536rfaH$ wurde hauptsächlich *agn43*_{PAI V}-Transkript nachgewiesen. Allerdings war hier die Menge an *agn43*_{PAI III}-Transkript höher als dies für 536 und $536\Delta ORF35_{PAI II}$ beobachtet wurde. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass neben der Dam-Methyltransferase auch die putative Methyltransferase *ORF35*_{PAI II} den Methylierungsstatus der DNA beeinflussen könnte und die beobachteten Änderungen in der Transkription der *agn43* Varianten hierdurch zumindest teilweise verursacht werden können.

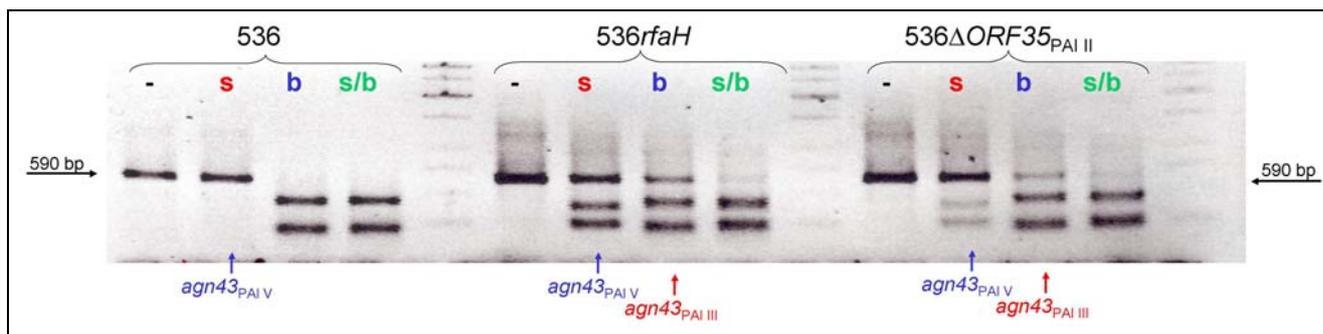


Abb. VI.48: Untersuchung des Einflusses einer putativen Methyltransferase *ORF35*_{PAI II} („Pathoarray“-Bezeichnung „PAI2 ORF01“) auf die *agn43*-Transkription. Die Unterscheidung der Transkriptmengen der beiden *agn43* Varianten in den Stämmen 536, $536rfaH$ und $536\Delta ORF35_{PAI II}$ erfolgte über den Restriktionspolymorphismus der cDNA. s- *SacII*-Spaltung, b-*BstEII*-Spaltung, s/b-*SacII/BstEII*-Spaltung.

VI.2.4.9 Einfluss von RfaH auf die Phasenvariation beider *agn43* Varianten im Stamm 536

Zur Untersuchung des Einflusses von RfaH auf die Phasenvariation der beiden *agn43* Varianten im Stamm 536 wurde auf X-Gal-Indikatorplatten der prozentuale Anteil an Kolonien bestimmt, bei denen nach 150 min. Zwischenkultivierung ein Phasen-„switch“ erfolgt war. Bei ca. 7 % (*agn43*_{PAI III}) bzw. ca. 10 % (*agn43*_{PAI V}) der Zellen erfolgte eine Änderung der Orientierung des *agn43*-Promotors von „ON“ nach „OFF“ bzw. „OFF“ nach „ON“. Die „switch“-Rate der *agn43*_{PAI V} Variante war etwas größer als die der *agn43*_{PAI III} Variante. Unter Berücksichtigung der experimentellen Schwankung der durchgeführten Messungen ist diese Beobachtung jedoch nicht signifikant. Eine Beeinflussung der

Phasenvariation durch RfaH bei den jeweiligen *agn43* Varianten des Stammes 536 konnte nicht beobachtet werden.

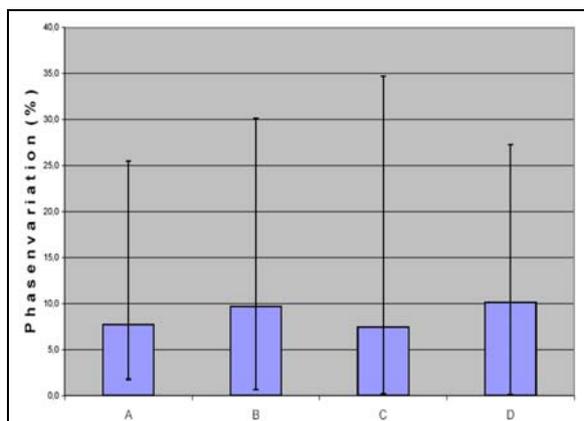


Abb. VI.49: „Switch“-Rate der chromosomalen Transkriptionsfusionen beider *agn43* Varianten im Stamm 536 und *536rfaH* auf LB-Agar bei 37 °C. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Minima/Maxima-Schwankungen der einzelnen Messungen von jeweils acht Bestimmungen.

(A- *536lacZagn43_{PAI III}::lacZ*,
 B- *536lacZagn43_{PAI V}::lacZ*,
 C- *536lacZrfaHagn43_{PAI III}::lacZ*,
 D- *536lacZrfaHagn43_{PAI V}::lacZ*).

VI.2.5 Zusammenfassung des Abschnitts „Antigen 43 und Biofilmbildung“

Die Untersuchungen zum Autotransporterprotein Antigen 43 haben gezeigt, dass die Expression dieses Gens in *rfaH*-defizienten Stämmen verstärkt wurde. Diese Beobachtung, ursprünglich durch DNA-Arrays festgestellt, konnte sowohl für den Stamm *E. coli* 536 als auch für den Stamm MG1655 durch verschiedene Methoden bestätigt werden. Im Stamm 536 ergab sich zudem, dass zwei *agn43* Varianten kodiert sind. Beide Varianten liegen auf Pathogenitätsinseln (PAI III₅₃₆ und PAI V₅₃₆). Im Stamm MG1655 wird Antigen 43 vom ORF b2000 kodiert. Diese *agn43_{K-12}* Variante konnte im Stamm 536 nicht detektiert werden und ist vermutlich aus diesem Abschnitt des Chromosoms deletiert worden. Für die beiden *agn43* Varianten (*agn43_{PAI III}* und *agn43_{PAI V}*) des Stammes 536 wurde überprüft, ob eines der beiden Gene dominant exprimiert wird. In Abhängigkeit des Phasen-„switches“ wurde jeweils eines der beiden Gene stärker exprimiert, jedoch konnte keine prinzipiell stärkere Expression einer Variante im Stamm *E. coli* 536 bzw. *536rfaH* beobachtet werden. Die beobachteten Schwankungen waren vielmehr abhängig vom jeweiligen Experiment (vergl. Transkriptanalysen der mRNA in Abb. VI.31 und Abb. VI.48) sowie die Messungen der β -Galaktosidaseaktivitäten von den Transkriptionsfusionen). In der Tendenz hatte der 536 Wildtyp eine etwas erhöhte Expression des *agn43_{PAI V}*-Gens und weniger *agn43_{PAI III}*-Transkript. Die verbesserte Transkription von *agn43_{PAI III}* in *536rfaH* könnte durch eine Änderung des Methylierungsstatus infolge der verminderten Expression einer putativen Methyltransferase *ORF35_{PAI II}* („Pathoarray“-Bezeichnung „PAI2 ORF01“) verursacht sein.

Im Stamm MG1655 konnte belegt werden, dass die Biofilmbildung von der Antigen 43-Expression abhängig ist und zudem ein verkürztes LPS-Kernoligosaccharid notwendig für die Antigen 43-vermittelte Biofilmbildung war. Vermutlich unterstützt die Demaskierung von Agn43 durch das verkürzte LPS die Oberflächenpräsentation und damit die Biofilmbildung.

Die verstärkte Biofilmbildung des Stammes 536*rfaH* wurde als Agn43-unabhängig identifiziert. Die molekularen Ursachen dieses Phänotyps wurden noch nicht bestimmt.

Die verstärkte Autoaggregation von *rfaH* Mutanten erwies sich nur teilweise Agn43-abhängig. Weitere RfaH-abhängig regulierte Faktoren, die noch nicht identifiziert sind, verursachen wahrscheinlich diesen Phänotyp.

Faktoren, die die erhöhte Transkription von *agn43* in Abhängigkeit von RfaH verursachen, wurden nicht identifiziert. Vielmehr konnte belegt werden, dass die mRNA-Levels der bekannten Regulatoren von *agn43*, OxyR und Dam-Methylase, durch RfaH nicht verändert waren. Eine Beeinflussung der Phasenvariationsfrequenz durch RfaH wurde nicht beobachtet.

VI.2.6 Untersuchungen zu weiteren RfaH-abhängig regulierten Faktoren

VI.2.6.1 Einfluss von RfaH auf die Expression von Yersiniabaktin

Durch die Transkriptomanalysen von 536 und *536rfaH* wurde versucht, das RfaH-Regulon näher zu charakterisieren. Bei diesen Experimenten wurde festgestellt, dass Gene des Yersiniabaktin-Operons (*irp1*, *irp2*, *irp3*, *irp5*, *ybtQ*, *ybtP*) bei 37 °C in *536rfaH* verstärkt exprimiert wurden. Diese Beobachtungen konnten auch bei 30 °C gemacht werden. Die, durch Transkriptomanalyse bestimmte, Änderung der Genexpression von Genen dieses Operons im Vergleich von 536 und *536rfaH* war relativ klein (<1,35). Eine erhöhte Expression von *irp1*, *irp2* und *psn* wurde durch RT-PCR überprüft und konnte bestätigt werden.

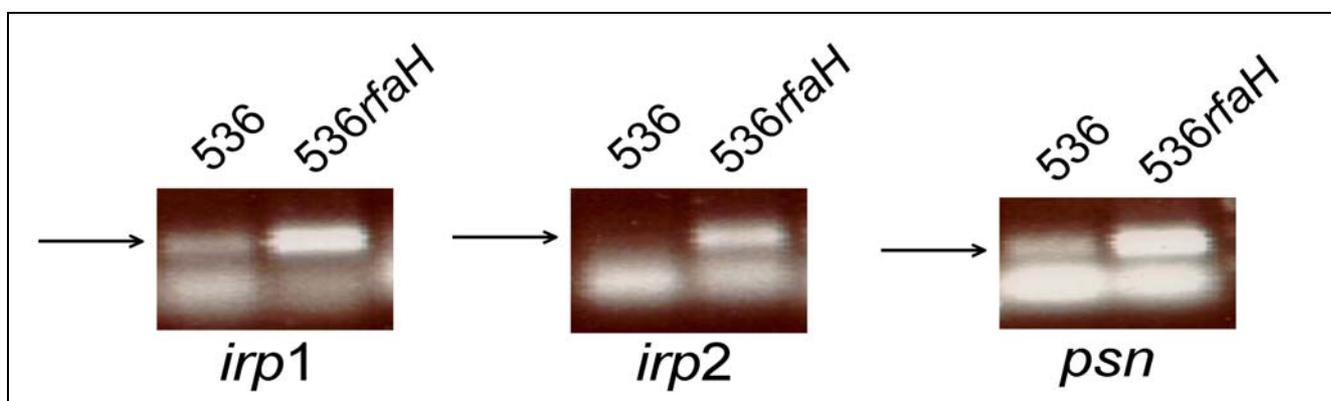


Abb. VI.50: Vergleich der Transkriptmengen von Genen des Yersiniabaktin-Operons durch RT-PCR in den Stämmen 536 und *536rfaH* bei 37 °C in M63-Minimalmedium. Die Deletion von *rfaH* erhöht die Transkription von Genen des Yersiniabaktin-Operons. Die Daten bestätigten die Beobachtungen der Transkriptomanalyse.

VI.2.6.2 Einfluss von RfaH auf die Expression von Curli-Fimbrien und extrazellulärer Matrix

Durch den Vergleich der Transkriptomanalyse konnte eine signifikant erhöhte Expression von Genen des Curli-Fimbrien-Operons in Biofilmzellen von *E. coli* 536 und *536rfaH* im Vergleich zu Zellen aus Schüttelkulturen ermittelt werden. Jedoch konnten keine Unterschiede zwischen Wildtyp und *rfaH* Mutante für planktonisches Wachstum festgestellt werden. Im Biofilm waren Gene des Curli-Operons in beiden Stämmen induziert, allerdings war dieser Effekt in der *rfaH* Mutante etwas stärker. Der Einfluss von RfaH auf die Expression von Curli-Fimbrien nach Wachstum auf festem Medium wurde näher analysiert. Im Vergleich von Stamm 536 und *rfaH* Mutante ergab sich bei 37 °C auf Kongorot-Agar kein veränderter Phänotyp. Bei 30 °C wurden jedoch unterschiedliche Kolonieförmigkeiten beobachtet. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei MG1655 gemacht. Hier zeigte das Koloniewachstum bei 30 °C ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen MG1655-Wildtyp und

MG1655*rfaH*. Allerdings konnten hier auch bei 37 °C Unterschiede im Koloniewachstum beobachtet werden, welche jedoch nicht so deutlich wie bei der tieferen Temperatur waren. Diese Beobachtungen sind ein Hinweis darauf, dass RfaH auch die Expression von Curli-Fimbrien und Bestandteilen der extrazellulären Matrix beeinflusst. Dieser Einfluss scheint sowohl abhängig von den Wachstumsbedingungen als auch Stamm-abhängig zu sein.

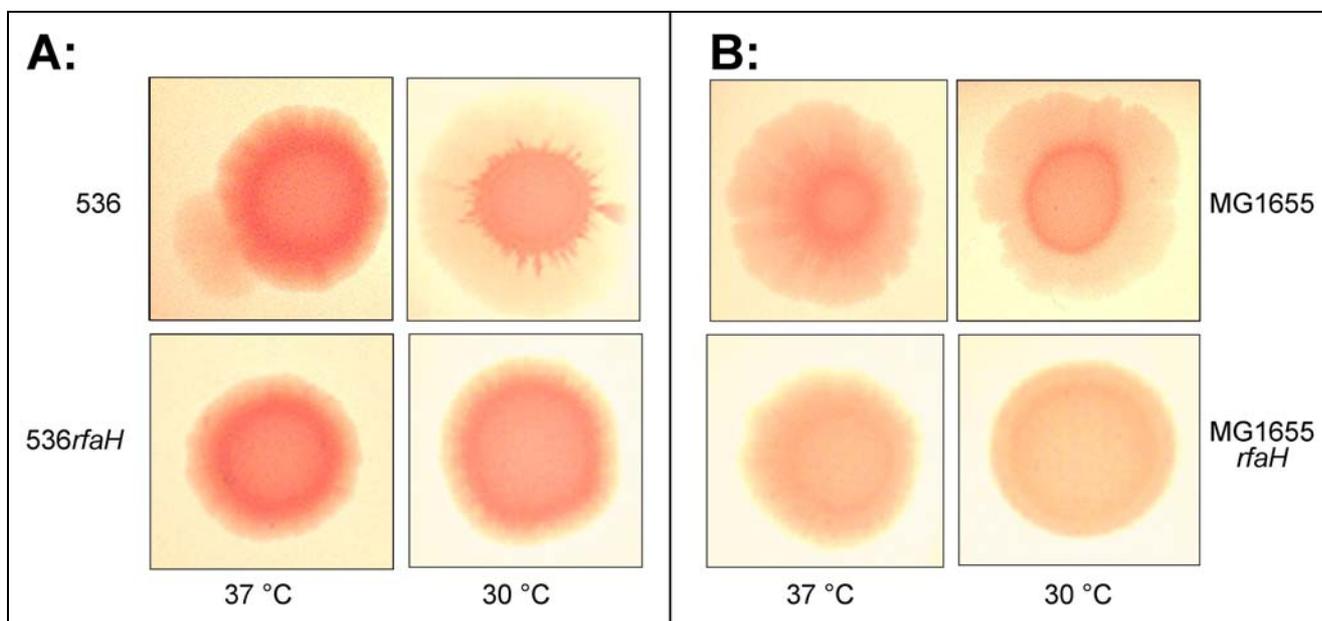


Abb. VI.51: Vergleich des Koloniewachstums von *E. coli* 536 und *536rfaH* sowie von MG1655 und MG1655*rfaH* auf Kongorot-Agar bei 37 °C und 30 °C. Unterschiede ergaben sich zwischen 536 und *536rfaH* bei 30 °C und zwischen MG1655 und MG1655*rfaH* bei beiden Temperaturen.

VI.2.6.3 Einfluss von RfaH auf die Flagellen-Expression

Die Schnittmengenanalysen der Transkriptome von Zellen aus Schüttelkulturen im Vergleich zu Zellen aus Biofilmen gaben Hinweise darauf, dass einige Gene des Flagellen-Operons durch RfaH beeinflusst sein könnten. Zur Überprüfung des Einflusses von RfaH auf die Flagellen-Expression wurde das Schwärmverhalten von *E. coli* 536 und *536rfaH* sowie von MG1655 und MG1655*rfaH* bei 37 °C und 30 °C untersucht. Im Stammhintergrund von *E. coli* 536 erwies sich das Schwärmverhalten unbeeinflusst von der Temperatur und die Deletion von *rfaH* veränderte diesen Phänotyp nur geringfügig (etwas schlechteres Schwärmverhalten). Im Stammhintergrund von *E. coli* MG1655 war dieser Phänotyp jedoch abhängig von Temperatur und *rfaH*-Mutation. Bei 37 °C waren MG1655-Zellen motiler als bei 30 °C. Zudem verbesserte die Deletion von *rfaH* in MG1655 das Schwärmverhalten bei beiden Temperaturen signifikant. Diese Beobachtungen belegen, dass bestimmte Oberflächenfaktoren nicht in allen Stämmen gleichermaßen von RfaH reguliert werden.

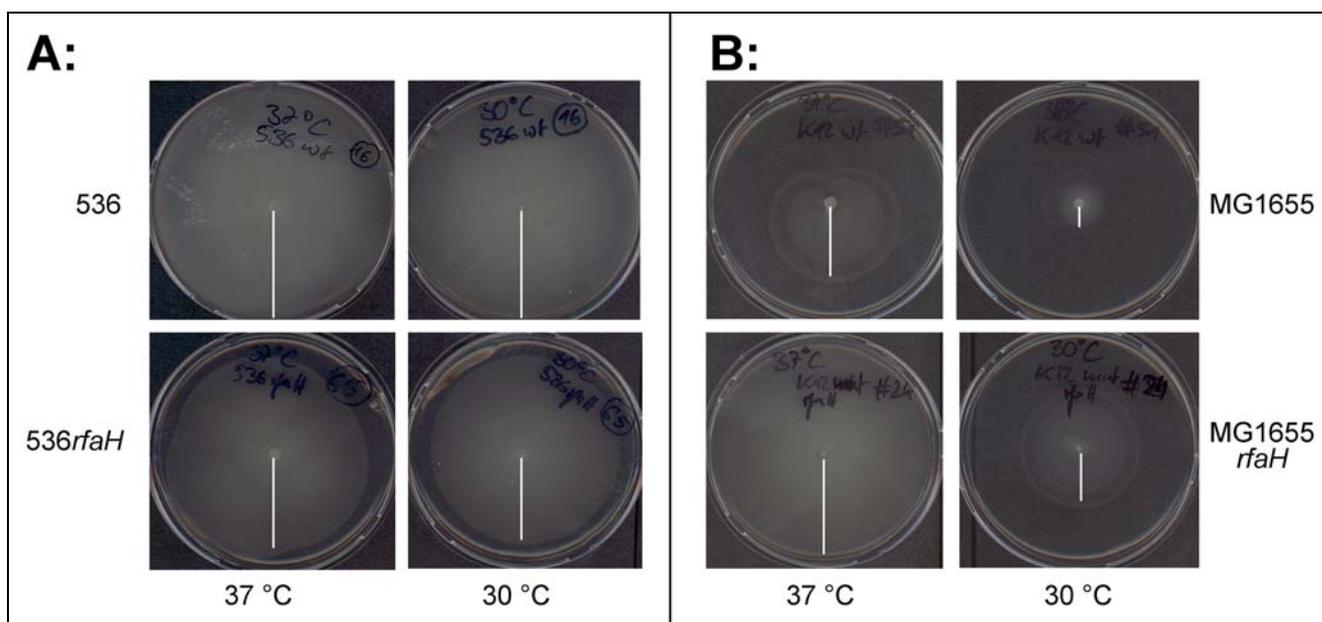


Abb. VI.52: Vergleich des Schwärmverhaltens von *E. coli* 536 und 536*rfaH* sowie von MG1655 und MG1655*rfaH* auf Schwärm-Agar bei 37 °C und 30 °C. Der Radius des jeweiligen Schwärmhofs wurde markiert.

VI.2.6.4 Bestimmung von potentiellen *ops*-Elementen im Genom von *E. coli* 536

Um weitere Gene zu identifizieren, die RfaH-abhängig reguliert sein könnten, wurde versucht potentielle *ops*-Elemente durch *in silico* Analyse zu bestimmen.

Der Antiterminationsmechanismus von RfaH ist abhängig von *ops*-Elementen, die sich auf dem kodierenden DNA-Strang befinden und beruht auf folgendem Mechanismus: an *ops*-Elementen können sich RfaH/RNA-Polymerase-Komplexe bilden. Infolge einer Konformationsänderung der RNA-Polymerase innerhalb dieses Komplexes wird die Dissoziation der RNA-Polymerase vom Matrizenstrangs an Terminationsschleifen verhindert. Da sich die *rfaH* Varianten von verschiedenen *Enterobacteriaceae* untereinander substituieren lassen, sollte die Funktion des Transkriptionsantiterminators RfaH bei diesen Bakterien ebenfalls von ähnlichen *ops*-Elementen abhängig sein (Carter, *et al.*, 2004). Deshalb könnte ein globaler Vergleich der *ops*-Elemente und der jeweiligen Genfunktionen stromabwärts dieser DNA-Motive weiteren Aufschluss über das RfaH-Regulon geben. Durch einen Interspeziesvergleich von *ops*-Elementen und den stromabwärts kodierten Genen ließen sich Genfunktionen ermitteln, die RfaH-abhängig reguliert sein könnten und bei verschiedenen *Enterobacteriaceae* vorhanden sind. Zu diesem Zweck wurde eine bioinformatische Analyse des RfaH-Regulons durchgeführt.

Für die *in silico* Analyse des RfaH-Regulons wurde zunächst ein Konsensusmotiv bestimmt. Hierfür wurden die in der Literatur beschriebenen *ops*-Elemente, welche RfaH-abhängig die verstärkte Expression von stromabwärts kodierten Genen bewirkten, verwendet. Das Sequenzmotiv der *ops*-Elemente besteht aus zwölf Nukleotiden die unterschiedlich stark konserviert sind (Artsimovitch und Landick, 2000; Artsimovitch und Landick, 2002; Santangelo und Roberts, 2002). Zur genaueren

Bestimmung von potentiellen *ops*-Elementen wurde deshalb eine vom Konservierungsgrad abhängige, gewichtete Konsensusmatrix eingeführt, um eine globale Analyse durchführen zu können und möglichst viele, aber auch „sinnvolle“ *ops*-Elemente zu identifizieren.



Abb. VI.53: Konsensusmotiv von bekannten *ops*-Elementen die in der Literatur beschrieben wurden.

Für die Analyse und den Vergleich wurden zunächst im Genom von *E. coli* 536 jene 500 *ops*-Elemente mit der größten Übereinstimmung zur Konsensusmatrix bestimmt und mit einem „score“ versehen, welcher den Übereinstimmungsgrad widerspiegelt. Diese Analyse beschränkte sich auf die 500 „besten“ *ops*-Elemente um möglichst viele „sinnvolle“ *ops*-Elemente im Stamm 536 zu identifizieren. Die nähere Betrachtung der Sequenz dieser 500 „besten“ *ops*-Elemente ergab, dass diese Auswahl ausreichend war alle „sinnvollen“ *ops*-Motive zu berücksichtigen. Aber auch schwächere Übereinstimmungen zum Konsensusmotiv wurden auf diesem Wege berücksichtigt. Daran anschließend wurden für jedes einzelne *ops*-Element homologe Genabschnitte durch „blast“-Analysen in anderen *E. coli* Genomen bestimmt. Es wurde dann überprüft, ob in diesen Stämmen gleichermaßen ein *ops*-Element in diesem Bereich auffindbar ist. Zusätzlich wurde diese Analyse auch mit *Salmonella*- und *Yersinia*-Genomen durchgeführt. Durch diese Analyse war es möglich das (*ops*-abhängige) RfaH-Regulon von *E. coli* 536 mit dem anderer Spezies zu vergleichen und Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu bestimmen.

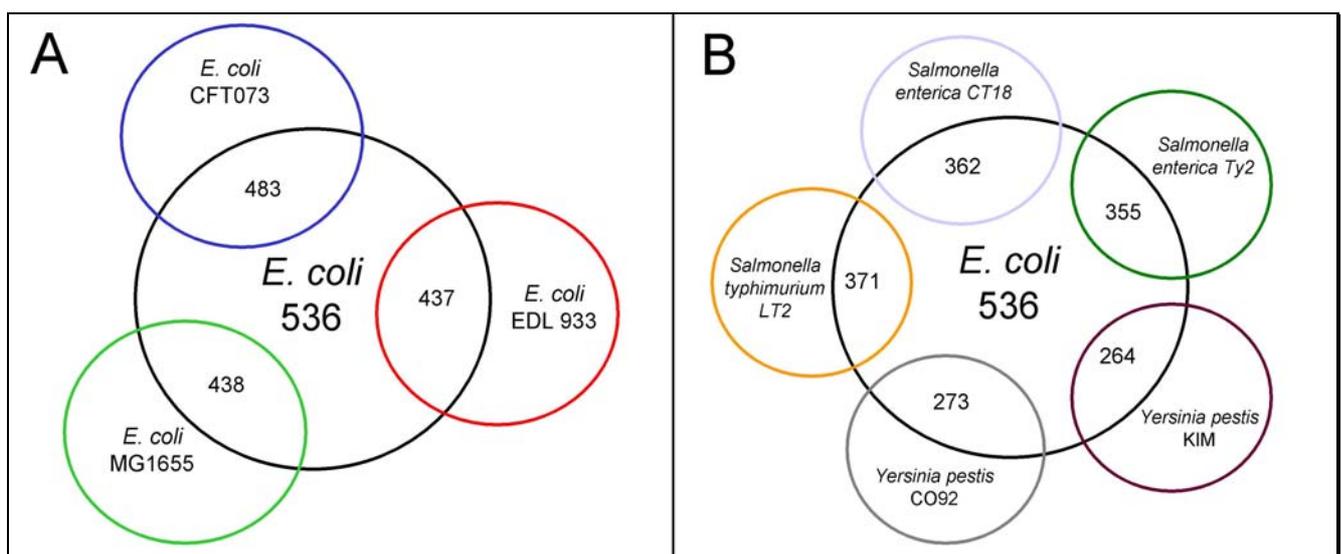


Abb. VI.54: Vergleich der Sequenzbereiche mit den 500 „besten“ *ops*-Elementen des Stammes *E. coli* 536 mit Übereinstimmungen zu anderen *E. coli* Genomen sowie mit *Salmonella* und *Yersinia*. Die größten Übereinstimmungen zeigten sich innerhalb der untersuchten *E. coli* Stämme, weniger Übereinstimmungen wurden im Vergleich zu *Salmonella* beobachtet und die größten Unterschiede waren im Vergleich zu *Yersinia* zu finden.

Bei der *in silico* Analyse des RfaH-Regulons wurde neben dem *ops*-Motiv, dem „score“ mit dem Übereinstimmungsgrad, dem nächstfolgendem Gen, dem Abstand zwischen *ops*-Element und Startkodon des nächsten Gens, der absoluten Position innerhalb des Genoms auch zwischen kodierendem und nichtkodierendem Strang unterschieden und überprüft, ob sich das *ops*-Element innerhalb eines Gens bzw. in nicht kodierenden Bereichen befindet. Alle Kriterien zusammen lassen eine flexible Suche mit selbstbestimmten Auswahlkriterien zu, um entsprechende DNA-Abschnitte und Gene zu identifizieren, die in verschiedenen Stämmen durch RfaH reguliert sein könnten. Mit dieser *in silico* Analyse sollte es eventuell möglich sein durch den Vergleich von Phänotypen (z.B. Biofilmbildung) von verschiedenen *rfaH* Mutanten anderer komplett sequenzierter *Enterobacteriaceae* und logischen Ausschluss- bzw. Einschlusskriterien, solche DNA-Bereiche und Gene zu identifizieren, deren Expression in einem Stamm den beobachteten Phänotyp verursacht bzw. in einem anderen Stamm ggf. nicht verursacht (weil dort z.B. kein *ops*-Element vorhanden ist). Dies bedingt natürlich, dass ein beobachteter Phänotyp bei allen untersuchten Stämmen auch von den gleichen Faktoren verursacht sein muss!

Durch solche Analysen könnten vielleicht auch jene Faktoren identifiziert werden, die im Stamm 536 *rfaH* zu der verstärkten Biofilmbildung und Autoaggregation führen. Jedenfalls könnte über den Vergleich mit anderen *Enterobacteriaceae* die Anzahl an Zielgenen, welche den Biofilm-Phänotyp verursachen, erheblich eingeschränkt werden.

Eine Auswahl von verschiedenen *ops*-Motiven und dazugehörenden putativen Genfunktionen stromabwärts-kodierter Faktoren des Stammes *E. coli* 536 wurde in nachfolgender Tabelle (Tab. VI.4) beschrieben.

Tab. VI.4: Auswahl von putativen RfaH-abhängigen Faktoren im Stamm *E. coli* 536.

<i>ops</i> -Motiv	Position	vermutliche Genfunktion
GGCGGTAGTATC	155692	Hypothetisches Fimbrien-Protein
GGAGGTAGcGTA	314215	S-Fimbrien
GGCGGTATTCTg	315330	S-Fimbrien
GGCGGTACcGTg	324675	Siderophor-Sytem (<i>iro</i>)
GGCGGTGGcCTg	590349	Kapsel-Verankerungsprotein
GGCGGTAGTCTg	637151	Bakteriophage N4 Adsorbition
GGCGGTGcGTg	1073998	Siderophor-Sytem
GGCGGTAGcAGg	1074614	Siderophor-Sytem
GGCGGCAGTATA	1106690	Lipid A Biosynthese
GGCGGCAGcGTC	1117754	Flagelle
GGCGGTAGcAGA	1121577	Flagelle
CGCGGTAGcGTg	1132220	Flagelle
GGCGGTATTATg	1149584	Hämin-Rezeptor
GGCGGCAGcGTg	1860575	Flagelle
GGCGATAGcGTA	1932986	Colansäure-Kapsel

GGCGATAGcCTg	1984593	Yersiniabaktin
AGCGGTAGcCTg	1987188	Yersiniabaktin
GGCGGCAGcCTA	2054605	Polyketidbiosynthese
GGCGATAGTCTg	2054928	Polyketidbiosynthese
AGCGGTAGcGTg	2057453	Polyketidbiosynthese
GGCGGTAGcATA	2059342	Polyketidbiosynthese
GGTGGTAGcGTC	2059531	Polyketidbiosynthese
GGCGGTAGcGTg	2150608	LPS O-Antigen
GGCGGTAGcGTg	2175272	LPS O-Antigen
CGCGGTAGcGTg	2439971	Regulator der Flagellen-Expression
GGCGGTAGcGAA	2798071	“quorum sensing”
GGCGGTAGTGTg	3061279	Hämolysin
GGCGGCAGTATg	3061714	Hämolysin
GGCGGTAGcGTg	3134939	Pix-Fimbrien
GGCGGCAGcATg	3136712	Pix-Fimbrien
GGCGGTAGTCGg	3142758	Pix-Fimbrien
GGCGGTATTGTg	3164113	Hämolysin „expression modulating protein”
GGCGGTACcCTg	3169855	K15 Kapsel
GGCGGTAGcGTA	3196312	K15 Kapsel
GGCGGTGGcGTA	3290566	Siderophor-Sytem (<i>ent</i>)
GGCGGTAGcGAA	3681014	Fimbrien
GGCGGTAGcCTg	3886580	Hämagglutinin
GGCGGTAGcGTg	3912613	LPS-Kernoligosaccharid
GGCGGTAGcATg	4767829	Hämolysin
GGCGGTAGcGTg	4780363	DNA-Methylase
GGCGGTGGcGTg	4785065	Hämagglutinin
GGCGGTAAcCTg	4786571	Hämagglutinin
GGCGGTAGcCTA	4786982	Hämagglutinin
GGCTGTAGTGTg	4853042	Typ 1-Fimbrien

Durch Analyse von *ops*-Elementen im Stamm *E. coli* 536 wurden zahlreiche Faktoren identifiziert, die mit der äußeren Membran assoziiert sind und RfaH-abhängig exprimiert sein könnten. Von einigen Faktoren ist bekannt, dass diese durch RfaH reguliert werden, aber auch zahlreiche neue Faktoren konnten identifiziert werden. Viele der in Tabelle VI.4 aufgeführten Faktoren lassen sich als Virulenzfaktoren klassifizieren. Neben diesen konnten noch anderen Faktoren mit Homologie zu Lipoproteinen und äußeren Membranproteinen *ops*-Elemente zugeordnet werden. Durch die genaue Annotation der Genomsequenz von 536 lassen sich diesen Faktoren Genfunktionen zuordnen und dann möglicherweise auch jene Faktoren identifizieren, die die erhöhte Biofilmbildung und Autoaggregation von 536 *rfaH* bedingen könnten.

VI.2.7 Zusammenfassung des Abschnitts „RfaH-abhängige Faktoren“

Durch RT-PCR konnte die, durch „expression profiling“ bestimmte, RfaH-abhängige Regulation von Genen des Yersiniabaktin-Operons im Stamm 536 bestätigt werden. Ein Einfluss von RfaH auf die Flagellen-Expression wurde im Stamm MG1655, jedoch nicht im Stamm 536 beobachtet. Des Weiteren zeigte sich sowohl im Stamm 536 als auch im Stamm MG1655 eine RfaH-abhängige Expression von Curli-Fimbrien und extrazellulären Matrixproteinen.

Durch die *in silico* Analyse konnten zahlreiche Faktoren bestimmt werden, die im Stamm 536 RfaH-abhängig reguliert sein könnten. Zudem wurden die globale Analyse der *ops*-Elemente von 536 mit anderen *E. coli* sowie *Yersinia* und *Salmonella* Stämmen verglichen. Es erwies sich, dass die größten Übereinstimmungen innerhalb der *E. coli* Stämme vorlagen und zu *Yersinia* die meisten Unterschiede festgestellt werden konnten.

VII Diskussion

Die Biofilmbildung pathogener Bakterien verursacht zahlreiche Probleme bei der Behandlung und Versorgung von Patienten in medizinischen Einrichtungen. In Biofilmen lebende Mikroorganismen, die Implantate, Katheter und Schläuche besiedelt haben, widerstehen gezielten Antibiotikatherapien und etablieren somit Infektionen, die sich schwer behandeln lassen (Costerton, *et al.*, 1999; Ketyi, 1994; Kierek-Pearson und Karatan, 2005). Außerdem können diese aggregierten Kolonien im Patienten auch ein Reservoir für chronische Infektionen bilden, bei denen selbst effektive Wirtsabwehrmechanismen der zellulären und humoralen Immunabwehr versagen können (Anderson, *et al.*, 2004a; Young *et al.*, 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Biofilmbildung von *Escherichia coli* am Beispiel des uropathogenen Stammes 536 untersucht. Die Biofilmbildung verschiedener Derivate dieses Stammes mit Deletionen von kompletten Pathogenitätsinseln und in Genen, die regulatorische Proteine kodieren, wurde untersucht. Der Vergleich der Biofilmbildung dieser Derivate ergab, dass insbesondere die Inaktivierung von *rfaH* einen starken Einfluss auf den Biofilm-Phänotyp hat. Die Ursachen dieses Phänotyps im Stamm *E. coli* 536*rfaH* wurden näher untersucht, um weitere Erkenntnisse über biofilmbildende Faktoren und Mechanismen zu erhalten.

Die Etablierung eines Biofilms ist generell ein mehrstufiger Prozess, der in den ersten Phasen vor allem durch die Expression verschiedener Haftfaktoren und Oberflächenstrukturen auf der bakteriellen Zelloberfläche gekennzeichnet ist (Ghigo, 2003; Van Houdt und Michiels, 2005; Watnick und Kolter, 2000). Neben Flagellen und verschiedenen Fimbrienarten haben auch andere Adhäsine wie Curli und Agn43 großen Einfluss auf diese initiale Adhärenz von *E. coli* (Kuchma und O'Toole, 2000; Lazazzera, 2005; Prigent-Combaret, *et al.*, 2000; Schembri, *et al.*, 2002a; Van Houdt und Michiels, 2005).

Vom Transkriptionselongationsfaktor RfaH ist bereits bekannt, dass dieser die Expression von vielen Oberflächenstrukturen und extrazellulären Komponenten, insbesondere Virulenzfaktoren bei verschiedenen *Enterobacteriaceae*, beeinflussen kann (Bailey, *et al.*, 1997; Nagy, *et al.*, 2005). Es war daher naheliegend, auch die durch RfaH regulierten Gene im Hinblick auf die Biofilmbildung genauer zu analysieren. Um einen globalen Überblick über das durch RfaH beeinflusste Regulon zu bekommen, wurde der Ansatz des „expression profilings“ durch Hybridisierung von DNA-Arrays gewählt. Es wurden hierfür die Transkriptome von Zellen aus Schüttelkulturen des Wildtypstammes 536 und der isogenen *rfaH* Mutante bei 37 °C bzw. 30 °C sowie aus Biofilmen bestimmt und untereinander verglichen.

VII.1 Einfluss von RfaH auf die Expression von *agn43*

Durch die Transkriptomanalysen konnte das Oberflächenprotein Antigen 43 als Faktor identifiziert werden, der bei 37 °C in 536*rfaH* im Vergleich zum Wildtyp am stärksten induziert wurde. Dieses

Resultat konnte ebenfalls durch andere experimentelle Ansätze (semiquantitative RT-PCR, Northernblot-Hybridisierungen, *agn43::lacZ*-Transkriptionsfusionen sowie Immunoblotanalysen) bestätigt werden. Von diesem Oberflächenprotein ist bereits berichtet worden, dass es maßgeblich die Autoaggregation und Biofilmbildung von *E. coli* fördert (Danese, *et al.*, 2000b; Kjaergaard, *et al.*, 2000; Klemm, *et al.*, 2004).

Die Ursache für die erhöhte Expression von Antigen 43 in MG1655*rfaH* und 536*rfaH* ist jedoch noch unklar. Die bislang bekannte Wirkungsweise und Funktion von RfaH als Transkriptionsantiterminator lässt auf einen *indirekten* Effekt für die erhöhte *agn43*-Expression durch einen anderen Faktor schließen: auf einen Faktor, der einerseits von RfaH positiv reguliert sein müsste und andererseits die Genexpression von *agn43* hemmen sollte. Dieser Vermutung liegen folgende Beobachtungen zu Grunde: stromaufwärts der kodierenden Bereiche der *agn43* Varianten sind keine *ops*-Elemente zu finden, die dann allerdings auch nur in Gegenwart von RfaH zu einer erhöhten Transkription von *agn43* führen müssten. Die erhöhte Transkription von *agn43* wurde jedoch in Abwesenheit von RfaH beobachtet und kann deshalb kein Resultat der Transkriptionselongation durch RfaH sein.

Vom Stamm MG1655 war bekannt, dass die Transkription von *agn43* durch zwei Faktoren reguliert wird (Henderson, *et al.*, 1997b; van der Woude und Baumler, 2004). Einerseits verhindert eine Bindung von OxyR im Promotorbereich von *agn43* die Transkription durch die RNA-Polymerase (Repression). Sind jedoch andererseits die drei konservierten GATC-Stellen im Promotorbereich von *agn43* durch die Methyltransferase Dam methyliert worden, ist eine Bindung des Repressors OxyR nicht mehr möglich und der Promotor zugänglich für eine Transkription durch die RNA-Polymerase (Derepression). Beide Prozesse, sowohl die Methylierung als auch die Bindung von OxyR sind irreversibel (Correnti, *et al.*, 2002; Wallecha, *et al.*, 2003). Einzig durch einen neuen Replikationszyklus während der Zellteilung kann dieser irreversible Zustand verändert werden und bedingt die Phasenvariation von *agn43*. Insofern ist die Phasenvariation des *agn43*-Promotors abhängig vom konkurrierenden Zusammenspiel der Dam-Methyltransferase und OxyR.

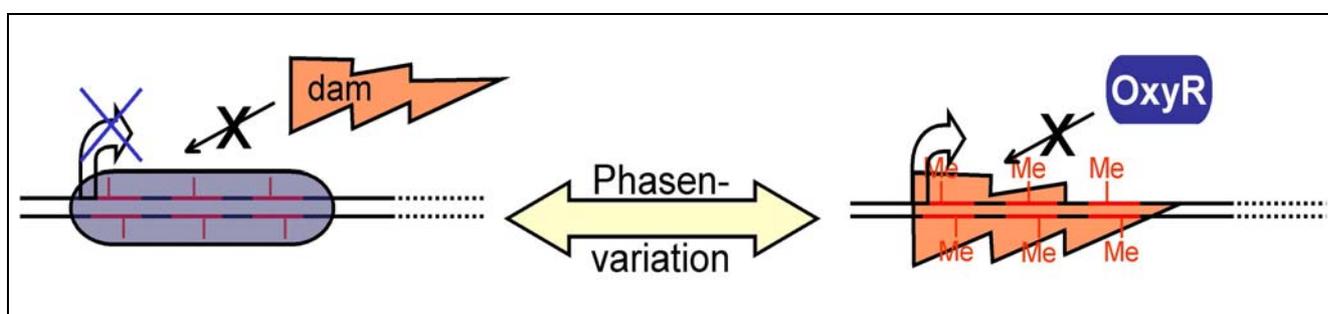


Abb. VII.1: Schematische Darstellung der Phasenvariation des *agn43*-Promotors durch Dam und OxyR.

Durch RT-PCR Experimente wurde deshalb überprüft, ob RfaH die Transkription der beiden bislang bekannten Regulationsfaktoren von *agn43* beeinflusst. Bei den Stammpaaren MG1655 und MG1655*rfaH* bzw. 536 und 536*rfaH* konnten in diesen Experimenten jedoch keine Unterschiede in

den Transkriptmengen von *oxyR* bzw. *dam* festgestellt werden. Dies deutet daraufhin, dass noch andere Mechanismen an der Genexpression von *agn43* beteiligt sein müssten.

Eine geringere *agn43*-Transkriptmenge konnte sowohl im Wildtyp als auch in den *rfaH*-defizienten Stämmen während der stationären Phase und in reiferen Biofilmen beobachtet werden. Somit wird in langsam bzw. nicht wachsenden Zellen die Expression von *agn43* vermindert.

Die Transkription von *agn43* wird in *E. coli* K-12 durch den Sigmafaktor σ^{70} initiiert (Wallecha, *et al.*, 2002). In der stationären Phase und in Biofilmen können bestimmte Gene durch einen alternativen Sigmafaktor σ^S , welcher von *rpoS* kodiert wird, reguliert sein. Solche Änderungen könnten auch direkt oder indirekt die Expression von Antigen 43 betreffen. Bei *Salmonella* konnte eine RpoS-abhängige Expression von *rfaH* durch ein *rfaH::lacZ* Reporterkonstrukt nachgewiesen werden (Bittner *et al.*, 2004). Insbesondere in der stationären Phase wurde dort eine deutlich stärkere Expression von *rfaH* beobachtet. Da in Gegenwart von RfaH die Expression von *agn43* reduziert ist, könnte die erhöhte Expression von *rfaH* in der stationären Phase zumindest die verminderte Expression von *agn43* in dieser Phase und in Biofilmen der Wildtypstämme MG1655 und 536 erklären. Jedoch waren auch die Transkriptmengen von *agn43* aus stationärer Phase und Biofilmen in den *rfaH*-defizienten Stämmen reduziert. Die Ergebnisse der RT-PCR Experimente mit den Stämmen MG1655 und 536 ergaben eine reduzierte Transkription von *rfaH* in der stationären Phase, jedoch nicht in Biofilmen. Aber bei beiden Wachstumsbedingungen wurde eine reduzierte Transkription von *agn43* beobachtet. Dies deutet daraufhin, dass der indirekte Einfluss von RfaH auf die *agn43*-Transkription in anderen Wachstumsphasen nicht in gleichem Maße wie in der logarithmischen Wachstumsphase zutreffend ist.

Der Stamm 536 kodiert neben *dam* noch eine weitere putative DNA-Methyltransferase auf der PAI II₅₃₆. Es lässt sich vermuten, dass auch dieses Protein Einfluss auf die Regulation von *agn43* haben könnte. Es wurde gezeigt, dass sich die putative DNA-Methyltransferase *ORF35*_{PAI II} („Pathoarray“-Bezeichnung „PAI2 ORF01“) im Stamm 536 auf die Transkription von *agn43* auswirkte und zu einer leichten Verschiebung der Transkription zu Gunsten der *agn43*_{PAI III}-Variante führte. Eine erhöhte Expression dieser putativen DNA-Methyltransferase wurde im wildtypischen Stammhintergrund von *E. coli* 536 beobachtet. So könnte ein Methylierungsstatus abweichend von *536rfaH* somit auch eine Ursache der verstärkten Expression von Antigen 43 in diesem Stammhintergrund sein. Jedoch lässt sich durch diesen Mechanismus nicht die erhöhte Expression von Antigen 43 im Stamm MG1655 erklären, da dieser jene Methyltransferase nicht kodiert.

Eine weitere mögliche Erklärung wäre ein verstärkter Abbau der Methyltransferase Dam durch Proteasen. Es ist bekannt, dass Dam durch die Lon-Protease degradiert wird (Calmann und Marinus, 2003). Die Transkriptomanalysen ergaben aber keinen Hinweis auf eine erhöhte Expression der Lon-Protease durch RfaH.

Ein Grund für die generell erhöhte Expression von *agn43* in *rfaH*-defizienten Stämmen könnte auch in der Stabilität der mRNA Moleküle begründet sein. Außerdem könnten auch andere, bislang nicht identifizierte Effektormoleküle die erhöhte Transkription von *agn43* bewirken. In Abhängigkeit von

RfaH transkribierte regulatorische RNA-Moleküle wie z.B. Antisense-RNAs, die an die DNA binden könnten oder einen Abbau durch Nukleasen ermöglichen würden, sind als Ursache der erhöhten *agn43*-Transkription nicht sehr wahrscheinlich, da sich dafür *ops*-Elemente stromabwärts der verschiedenen *agn43* Varianten befinden sollten, um eine erhöhte Transkription des Antisense-Strangs durch RfaH zu bewirken. Der trotz unterschiedlicher genomischer Umgebung allgemein beobachtbare Effekt der erhöhten Antigen 43-Expression sowohl im pathogenen Stamm 536 als auch im apathogenen Stamm MG1655 lässt vermuten, dass dieser Mechanismus von auf dem Kerngenom kodierten Faktoren verursacht wird.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Regulation von *agn43*, welcher allerdings in der Literatur kontrovers diskutiert wird, ist der Redox-Zustand der Zelle (Schembri, *et al.*, 2003b; Waldron, *et al.*, 2002; Wallecha, *et al.*, 2003). In der Arbeitsgruppe von P. Klemm wurde beobachtet, dass infolge der Expression von Oberflächenfaktoren mit Disulfidbrücken in der Proteinstruktur, wie beispielsweise bei verschiedenen Fimbrienarten vorzufinden, der Thiol-Disulfid-Status und mit diesem der Redox-Status in der Zelle verändert wird (Schembri, *et al.*, 2002a; Schembri und Klemm, 2001; Schembri, *et al.*, 2002b). Die Änderung des Redox-Status' infolge der Expression von Fimbrien führt beim Regulator OxyR zu einer Konformationsänderung von der oxidierten in die reduzierte Form. Dies ermöglicht der Zelle die koordinierte Expression bestimmter Oberflächenfaktoren. Durch die Reduktion von OxyR wird die Expression von Antigen 43 zu Gunsten der Expression von Fimbrien vermindert. Dabei ist eine Expression von P-Fimbrien dominant gegenüber der Expression von Typ 1-Fimbrien und diese ist dominant gegenüber der Expression von Antigen 43. Es wurde postuliert, dass OxyR in der oxidierten Form die Transkription von *agn43* infolge einer Konformationsänderung nicht mehr blockieren kann. Dies konnte sowohl phänotypisch als auch mit Hilfe von Immunoblotanalysen bestätigt werden (Schembri, *et al.*, 2003b). Somit könnte eine durch RfaH verstärkte Fimbrien-Expression eine verminderte Expression von Antigen 43 erklären. Bei den Transkriptomanalysen mit dem Stamm 536*rfaH* wurde dies jedoch nicht beobachtet. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass der Redox-Zustand auch von anderen Faktoren beeinflusst wird und damit indirekt die verminderte Transkription von *agn43* bewirkt. Durch *in vitro* Versuche ist allerdings auch belegt worden, dass der Oxidationsstatus von OxyR für die Bindung dieses Proteins am *agn43*-Promotor und damit auch für die Blockade der Transkription unerheblich ist (Wallecha, *et al.*, 2003). Der Grund dieser widersprüchlichen Beobachtungen zum Einfluss des Redox-Zustands vom Regulator OxyR ist nicht klar.

VII.2 Einfluss von RfaH-abhängig exprimierten Oberflächenfaktoren auf die Biofilmbildung

Oftmals liegen mehrere Kopien von *agn43*-Determinanten innerhalb eines Genoms vor (Roche *et al.*, 2001). Von diesen Kopien ist bekannt, dass sie die Biofilmbildung in unterschiedlichem Maße beeinflussen können (Klemm, *et al.*, 2004). Neben Varianten, die zu starker Biofilmbildung oder

Autoaggregation befähigt sind, wurden auch Varianten beschrieben, die wenig autoaggregieren oder schwächere Biofilmbildner sind.

Experimentelle Untersuchungen ergaben, dass im Gegensatz zum apathogenen Stamm MG1655 im Genom des Stammes 536 verschiedene *agn43*-Kopien vorliegen, die auf den Pathogenitätsinseln PAI III₅₃₆ und PAI V₅₃₆ kodiert sind. Diese Varianten könnten sich auch in ihrem Vermögen, die Biofilmbildung zu fördern, unterscheiden.

Um den Einfluss dieser Antigen 43 Varianten auf die verstärkte Biofilmbildung zu untersuchen, wurden verschiedene *agn43*-defiziente Derivate sowohl vom uropathogenen Stamm 536 als auch vom apathogenen K-12 Stamm MG1655 generiert. Untersuchungen zur Biofilmbildung dieser Derivate belegten, dass die *agn43*-Einzel- und Doppelmutanten von *536rfaH* weiterhin gute Biofilmbildner waren und demzufolge nicht zur Biofilmbildung beitrugen. Beim Stamm MG1655 *rfaHagn43* wurde dieser Phänotyp jedoch nicht mehr beobachtet. Somit wurde dieses Oberflächen-assoziierte Protein zumindest im Stamm MG1655 als maßgeblicher Faktor für die verstärkte Biofilmbildung identifiziert, der den RfaH-abhängigen Biofilm-Phänotyp bewirkte.

Das unterschiedliche Verhalten beider Stämme in Bezug auf die Biofilmbildung könnte auf die signifikanten Unterschiede in ihren Genomgehalten zurückzuführen sein. Neben dem unterschiedlichen genomischen Kontext, in dem die *agn43* Varianten in beiden Stämmen kodiert sind, ist das Kerngenom von 536 zusätzlich um Pathogenitätsinseln erweitert (Dobrindt, *et al.*, 2002; Janke *et al.*, 2001). Auf diesen DNA-Bereichen könnten verschiedene weitere Faktoren kodiert sein, die Einfluss auf die Biofilmbildung dieses Stammes haben können. Zudem beruht die RfaH-abhängige Transkriptionselongation auf relativ kurzen Sequenzmotiven, den *ops*-Elementen, welche im Verlauf der Evolution beider Stämmen durch mutagene Einflüsse unterschiedlichen Veränderungen unterliegen konnten und deshalb auch in beiden Stämmen nicht konserviert sein müssen. Außerdem ist die Biofilmbildung ein mehrstufiger Prozess, der nicht ausschließlich auf einen einzelnen Faktor zurückzuführen sein muss, sondern auch von mehreren Faktoren abhängen könnte, die sich entweder synergistisch beeinflussen, oder auch unabhängig voneinander wirken können. Deshalb wurde nach weiteren RfaH-abhängigen Faktoren gesucht, die für diesen Phänotyp verantwortlich sein könnten. Beide Stämme, *E. coli* 536 und MG1655, zeigten verglichen mit ihren isogenen *rfaH* Derivaten eine stark verminderte Biofilmbildung. Aus den Transkriptomanalysen für den Stamm 536 im Vergleich zu *536rfaH* ergab sich neben der verminderten Expression von Antigen 43 eine signifikant induzierte Expression von *cpsG* bzw. *manB*, der Phosphomannomutasegene des Colansäure-Operons bzw. LPS-Operons für den Wildtyp.

Aus der Literatur geht bereits hervor, dass die Funktion von kürzeren Adhäsinen (wie z.B. Agn43), die zum Teil durch verschiedene Strukturen der bakteriellen Oberfläche (Kapsel, Colansäure, LPS) bedeckt werden, maskiert sein kann (Schembri *et al.*, 2004). Außerdem können diese strukturellen Komponenten der Zelloberfläche auch selbst die Ausbildung von Biofilmen positiv beeinflussen. Zudem werden einige dieser Faktoren oftmals noch RfaH-abhängig reguliert (Bailey, *et al.*, 1997; Nagy, *et al.*, 2002).

Um diese Einflüsse näher zu untersuchen, wurden verschiedene Derivate der Stämme 536 und MG1655 konstruiert, die defizient für die K15 Kapsel, Colansäure-Kapsel oder das LPS-Kern- bzw. O-Antigen-Oligosaccharid waren. Auch hier ergaben sich starke phänotypische Unterschiede im Vergleich der beiden Stämme, die entweder auf bestimmte Faktoren der signifikant unterschiedlichen Genome oder auf eine generell verschiedene Zusammensetzung der äußeren Membranproteine und Polysaccharid-Membranstrukturen (EPS, LPS) zurückzuführen sein sollten. Im Stamm 536 beeinflussten Polysaccharid-Oberflächenstrukturen die Biofilmbildung in unterschiedlicher Weise: ein mutiertes Colansäure-Operon ließ keinen Einfluss auf den Biofilm-Phänotyp erkennen. Durch die Inaktivierung von K15 Kapselgenen bzw. von Genen der O-Antigen Verknüpfung wurden Mutanten erzeugt, die nur etwas besser Biofilme bilden konnten. Eine Verkürzung der LPS-Kernregion im Stamm 536 verhinderte hingegen die Biofilmbildung komplett. Diese Beobachtung steht allerdings im Gegensatz zu den Resultaten, die für den Stamm MG1655 erhalten wurden. Dort war die Biofilmbildung zwar auch abhängig von einer Verkürzung des LPS-Kernoligosaccharids, jedoch wurde hier die Biofilmbildung von einem verkürzten LPS unterstützt. Durch Phagentransduktion wurde die Mutation $\Delta rfaI$ in MG1655 erzeugt, bei welcher die Gene *rfaGPSBI* deletiert wurden. Dieses stark verkürzte LPS ermöglichte vermutlich die Demaskierung von Agn43 auf der Oberfläche und verursachte einen starken Biofilm-Phänotyp in diesem Stamm. Eine Abhängigkeit der Biofilmbildung von beiden Faktoren, dem veränderten LPS-Kernoligosaccharid und zudem von der verstärkten Antigen 43-Expression, konnte hier beobachtet werden. Die Synthese eines verkürzten LPS-Kernoligosaccharids ist in beiden *E. coli* Stämmen RfaH-abhängig reguliert, hat allerdings nur im Falle von MG1655 einen positiven Einfluss auf die Biofilmbildung. Somit müssen noch andere Faktoren prägend für den Phänotyp im Stamm 536 sein. Die Inaktivierung der Gene für die Colansäuresynthese hatte auch bei MG1655 keinen Einfluss auf die Biofilmbildung.

Der Stamm MG1655 ist durch ein IS5 Element im *rfb*-Gencluster defizient für die O-Antigen-Verkettung an das LPS-Kernoligosaccharid und besitzt außer der Colansäure-Kapsel keine andere Kapsel (Blattner, *et al.*, 1997; Liu und Reeves, 1994). Im Gegensatz zu *E. coli* 536, der durch glatte Kolonien charakterisiert ist („smooth“ Phänotyp), bildet MG1655 durch die gestörte O-Antigen-Verknüpfung raue Kolonien (Grozdanov *et al.*, 2002; Hasman, *et al.*, 2000). Dieses zeigt, dass sich beide Stämme, MG1655 und 536, maßgeblich in ihren Oberflächenstrukturen unterscheiden und deshalb auch diese unterschiedlichen Phänotypen ausprägen können.

Die äußere Membran Gram-negativer Bakterien ist aus zahlreichen Komponenten (verschiedene Phospholipide, Glykolipide und Proteine) aufgebaut. Das LPS bildet die äußere Begrenzung und Phospholipide bilden die Grenze zum Periplasma. Zusätzlich sind in dieser Membran noch zahlreiche Membranproteine (verschiedene Lipoproteine und „ β -barrel“-Proteine) verankert. Der schematische Aufbau der Zellhülle Gram-negativer Bakterien wurde in der Abbildung (VII.2) dargestellt.

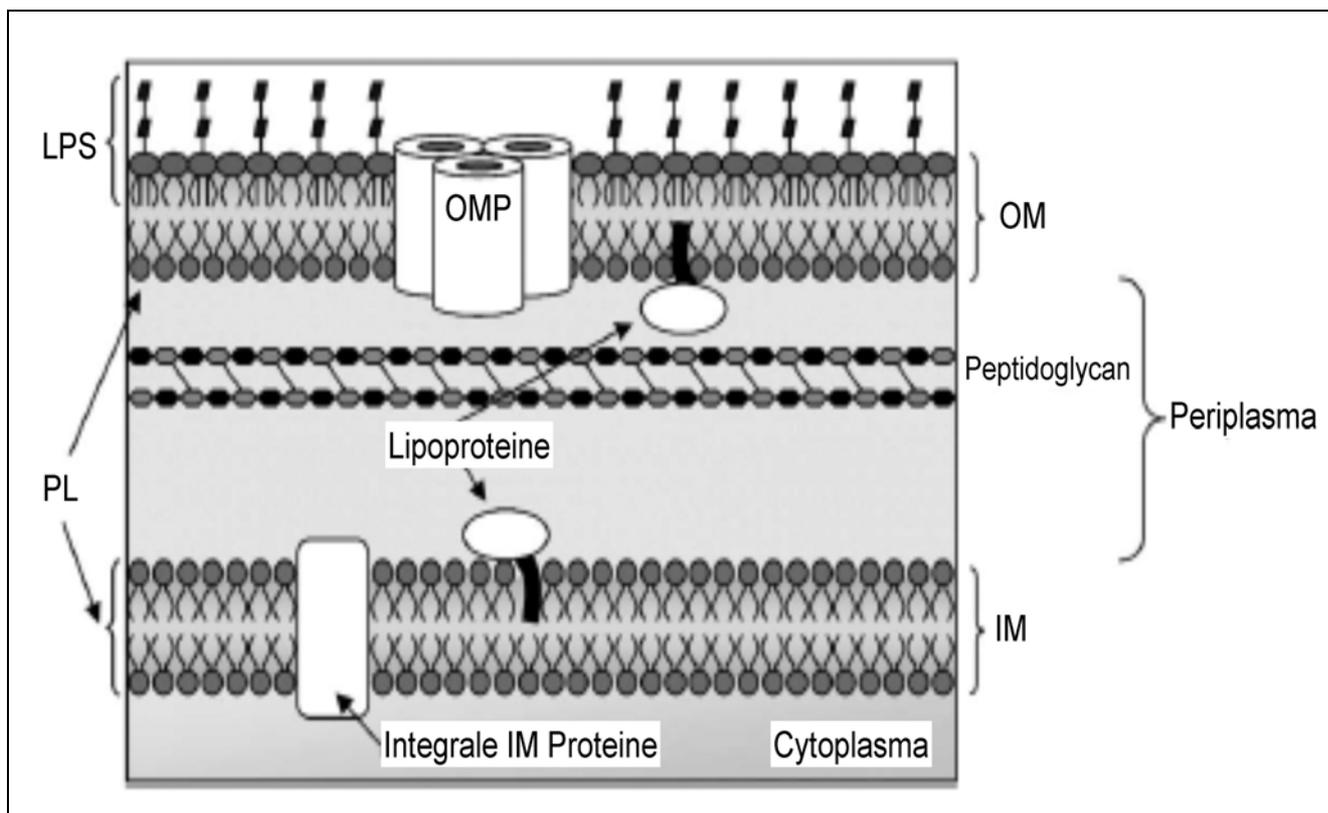


Abb. VII.2: Aufbau der Zellhülle Gram-negativer Bakterien nach (Wu *et al.*, 2005). OM- äußere Membran, IM- innere Membran, OMP- „β-barrel“-Proteine, PL- Phospholipide.

Der Zusammenbau und das Zusammenspiel dieser Multiproteinkomplexe ist bislang wenig verstanden (Wu, *et al.*, 2005). Auch wechselseitige Beeinflussungen beim Zusammenbau der Zellhülle durch einzelne Bestandteile sind beschrieben worden (Braun und Silhavy, 2002; Otto und Hermansson, 2004; Werner und Misra, 2005). Selbst das im Periplasma lokalisierte Peptidoglycan und die Zusammensetzung der inneren Membran kann sich auf den Aufbau der äußeren Membran auswirken (Cabeen und Jacobs-Wagner, 2005).

So kann sich ein gestörter Zusammenbau des LPS auf die Expression weiterer Oberflächenfaktoren sowie von anderen Bestandteilen der äußeren Membran auswirken. Dieser häufig pleiotrope Effekt wurde bei stark rauen Phänotypen beobachtet, bei welchen eine erhöhte Expression von Phospholipiden und eine verminderte Expression von äußeren Membranproteinen beobachtet wurde (Yethon *et al.*, 2000; Yethon und Whitfield, 2001). Des Weiteren zeigten andere LPS-Mutanten eine erhöhte EPS-Synthese und waren zudem defizient in der Fimbrien- und Flagellen-Expression (Parker *et al.*, 1992). Durch den Einfluss von RfaH auf die LPS-Bildung und Struktur können folglich andere Faktoren der Zellhülle indirekt beeinflusst werden, welche die Biofilmbildung fördern. Für den Stamm 536 konnten die Faktoren der RfaH-abhängigen Biofilmbildung noch nicht identifiziert werden. Die in den *rfaH* Mutanten beobachtete erhöhte Expression von Antigen 43 könnte eventuell indirekt durch die Beeinflussung der Fimbrien-Expression infolge eines veränderten LPS verursacht werden. Aber auch andere Oberflächenfaktoren könnten die erhöhte Biofilmbildung der *rfaH* Mutanten bewirken.

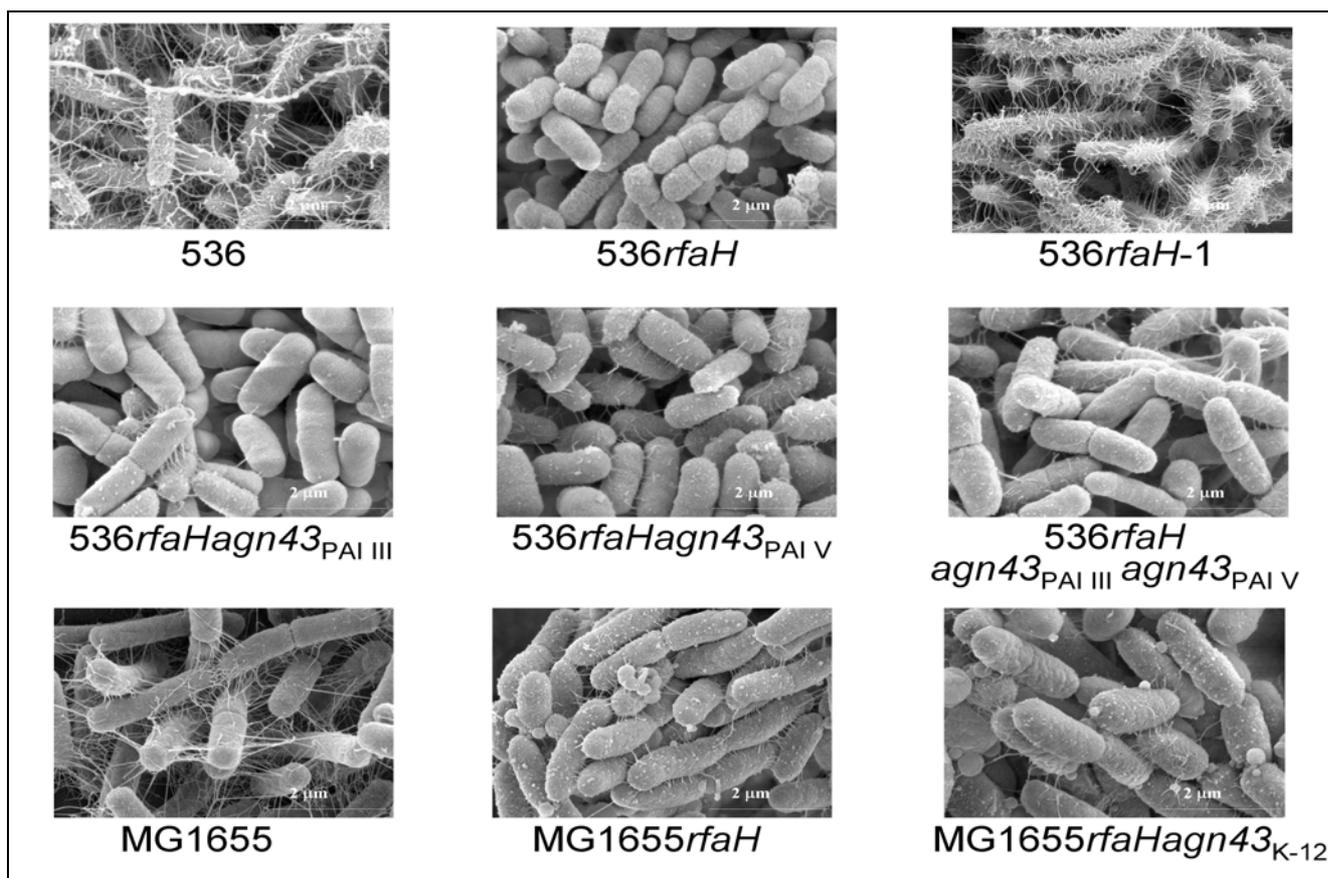


Abb. VII.3: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Biofilmen verschiedener 536- und MG1655 Derivate mit Deletionen in *rfaH* und *agn43*. (© Jean-Marc Ghigo, Institut Pasteur, Paris)

Neben den Strukturen der bakteriellen Oberfläche könnte die Assoziation in Biofilmen ebenso durch die Hydrophobizität und Ladungseigenschaften der Zellmembran beeinflusst sein. Es konnte durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bestimmt werden, dass die Zellen der *rfaH* Derivate beider Stämme in Biofilmen dicht gepackt sind, eine sehr nackte, glatte Struktur besitzen und außerdem nicht durch filamentöse Strukturen vernetzt sind, wie sie in den Wildtypstämmen beobachtet wurden (vergl. Abbildung VII.3).

Das Autoaggregationsverhalten der *rfaH* Derivate ließe sich eventuell auf diese Strukturen zurückführen. Es war im Stamm 536*rfaH* jedoch komplett unabhängig von der Antigen 43-Expression, dem bislang bekanntesten Protein das diesen Phänotyp vermittelt. Im Stamm MG1655 ließ sich dieses Verhalten nur teilweise durch die Antigen 43-Expression begründen. Hier erwies sich, dass die Autoaggregation von MG1655*rfaH* so gut wie nicht durch eine Deletion von *agn43* verändert wird. Hingegen erwies sich die Autoaggregation von MG1655*oxyR* abhängig von der Antigen 43-Expression. Im Stamm MG1655*rfaHoxyR* konnten zudem synergistische Effekte bezüglich der Autoaggregation beobachtet werden.

Diese Ergebnisse sind ein weiterer Hinweis auf noch nicht identifizierte Faktoren, die bedingt durch eine Deletion von *rfaH* Einfluss auf die Autoaggregation haben und außerdem auch den mehrstufigen Prozess der Biofilmbildung maßgeblich beeinflussen könnten. Die zellulären Mechanismen und

Ursachen zur besseren Charakterisierung von Autoaggregation und Biofilmbildung infolge einer Deletion von RfaH müssen demnach noch weiter untersucht werden.

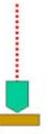
Stamm:	MG1655 wt	MG1655 <i>rfaH</i>	MG1655 $\Delta rfaGPSBI$	MG1655 <i>cps-5:Tn</i>	536 wt	536 <i>rfaH</i>	536 $\Delta waaG$	536 $\Delta manB$	536 $\Delta cpsG$	536 $\Delta kps15$
LPS- Struktur:										
K15-Kapsel:	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-
Colansäure:	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
Antigen 43:	+	++	n.b.	n.b.	+	++	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Phänotyp:	rau	rau	rau	rau	glatt	rauh	rau	rau	glatt	glatt
Biofilm:	++	++++	++++	++	+	+++++	-	++	+	++
Autoaggregation:	+	+++	n.d.	n.d.	+	++++	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Abb. VII.4: Gegenüberstellung und Zusammenfassung der beobachteten Phänotypen für die untersuchten *E. coli* Derivate. (n.d.: nicht durchgeführt, n.b.: nicht bekannt). Die LPS-Strukturen sind schematisch dargestellt (Lipid A- rechteckig, Kernoligosaccharid- fünfeckig, O-Antigen- gestrichelte Linie).

In der Abbildung (VII.4) wurden die beobachteten Phänotypen der 536- und MG1655 Derivate zusammengefasst. Die *rfaH* Derivate der Stämme 536 und MG1655 verstärkten sowohl Biofilmbildung als auch Autoaggregation. Beide Phänotypen zeigten sich abhängig von mehreren Faktoren. Die erhöhte Autoaggregation war nur teilweise abhängig von der Antigen 43-Expression und wurde vermutlich von weiteren Faktoren beeinflusst. Die Biofilmbildung war im Stamm MG1655 abhängig von der LPS-Struktur und Antigen 43-Expression, jedoch nicht im Stamm 536. Die untersuchten Oberflächenfaktoren konnten den beobachteten Phänotyp für diesen Stamm nicht erklären.

VII.3 Transkriptomanalysen zur Bestimmung des RfaH-Regulons

Durch die Transkriptomanalysen ergaben sich einige Hinweise auf Faktoren, die in Abhängigkeit der Deletion von *rfaH* zu einer verstärkten Biofilmbildung führen könnten.

RfaH ist als Regulator für verschiedene Gene beschrieben worden, die für die Synthese, den Zusammenbau und Transport von Zelloberflächenmolekülen sowie extrazellulären Komponenten von Bedeutung sind (Bailey, *et al.*, 1997). Viele dieser Faktoren sind als Virulenzfaktoren klassifiziert. Der zugrundeliegende Mechanismus basiert auf der Transkriptionselongation von bestimmten Transkripten mit Rho-abhängigen Terminationsstrukturen infolge eines gebildeten RfaH / RNA-Polymerase-Komplexes. Bislang bekannt ist der Einfluss von RfaH auf den F-Faktor (*tra*), O-Antigen

(*rfb*), LPS-Kernoligosaccharid (*rfa*), Colansäure-Kapsel (*cps*), Typ 2 und Typ 3-Kapseln (*kps*), α -Hämolyisin (*hly*), Hämin-Rezeptor (*chuA*) sowie den Cytotoxisch-nekrotisierenden Faktor (*cnf*). Um weitere Faktoren zu identifizieren und das RfaH-Regulon näher zu charakterisieren, wurde das Transkriptom von *E. coli* 536 mit dem isogenen Stamm 536*rfaH* verglichen.

Die Transkriptome beider Stämme unterschieden sich unter den gewählten Bedingungen nur unwesentlich. Es zeigte sich, dass neben bereits bekannten Faktoren drei weitere identifiziert wurden, Antigen 43, eine putative DNA-Methyltransferase (*ORF35_{PAI II}*) sowie Yersiniabaktin, deren Expression durch RfaH beeinflusst wurde.

Das überraschende Resultat mit nur geringen Unterschieden im Transkriptom deutet darauf hin, dass RfaH kein globaler Regulator ist und lediglich die Transkription weniger Gene verstärkend unterstützt. Von globalen Regulatoren wäre zu erwarten, dass diese, um der Zelle eine Anpassung an bestimmte Bedingungen zu ermöglichen, die Genexpression von sehr vielen Genen steuern sollten und zudem nicht konstitutiv exprimiert werden. Bei *Salmonella* ist allerdings eine stärkere Expression von *rfaH* mit zunehmender Zellzahl entlang der Wachstumskurve beobachtet worden (Bittner, *et al.*, 2004). Hingegen wurde für den Stamm *E. coli* 536 nachgewiesen, dass die Expression von *rfaH* entlang der Wachstumskurve leicht abnimmt (Dobrindt, 1999). Ein Absinken der Expression von *rfaH* in der stationären Phase bei den Stämmen *E. coli* 536 und MG1655 konnte auch im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Allerdings ergab eine Auswertung von verschiedenen Transkriptionsprofilen aus öffentlich zugänglichen Datenbanken bei *Salmonella typhimurium*, dass *rfaH* in diesen Fällen eher konstitutiv exprimiert wurde (G. Nagy, persönliche Mitteilung). Somit sollte RfaH als Transkriptionsfaktor, aber nicht als globaler Regulator anzusehen sein. Die durch Transkriptomanalysen detektierten Gene, welche RfaH-abhängig reguliert wurden, sind größtenteils auf flexiblen Teilen des Genoms kodiert und fast ausschließlich auf den PAIs von *E. coli* 536 lokalisiert; ein weiterer Hinweis dafür, dass RfaH in erster Linie ein wichtiger Transkriptionsantiterminator für durch horizontalen Gentransfer erworbene Faktoren zu sein scheint.

Die beobachteten unerwartet geringen Änderungen im Vergleich der Transkriptome 536 mit 536*rfaH* könnten auch durch die experimentellen Ausführung der Messung bedingt sein; in der Tat wiesen die Hybridisierungen mit dem nicht kommerziellen „Pathoarray“ schwächere Signale auf, als dies für die kommerzielle K-12 Membran der Fall war. Jedoch konnten mit dem gleichen experimentellen Ansatz bei den Vergleichen von Zellen aus Biofilmen mit planktonischen Zellen und bei Untersuchungen zum Einfluss der Temperatur auf das Transkriptom -wie zu erwarten- signifikante Unterschiede bestimmt werden. Des Weiteren belegte auch eine Transkriptomanalyse zum Einfluss von RfaH auf die Genexpression von *S. typhimurium*, dass RfaH nur die Expression einiger weniger Gene beeinflusst (G. Nagy, persönliche Mitteilung). Somit bestätigen diese Beobachtungen die hier durchgeführten Transkriptomanalysen tendenziell. Zudem wurden fast alle Gene identifiziert, bei welchen bereits ein Einfluss von RfaH beschrieben ist. Einzig der bekannte Einfluss von RfaH auf die Expression des LPS-Kernoligosaccharids konnte mittels der Transkriptomanalyse nicht detektiert werden.

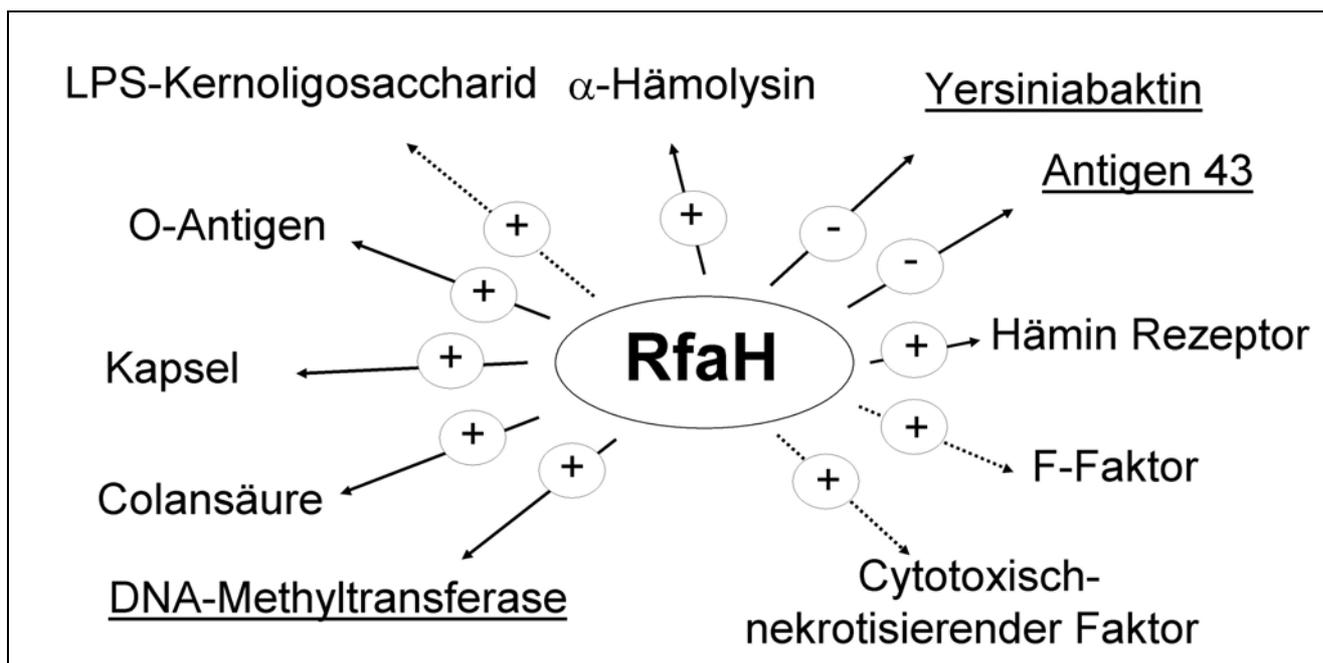


Abb. VII.5: Schematische Darstellung des Einflusses von RfaH auf die Genexpression von *E. coli*. Die gestrichelten Pfeile verweisen darauf, dass dieser Einfluss in der Transkriptomanalyse nicht beobachtet wurde. (+) und (-) beschreiben, ob diese Faktoren positiv oder negativ durch RfaH reguliert wurden. Die unterstrichen dargestellten Faktoren verweisen auf bislang nicht beschriebene Einflüsse.

Bei einem so drastischen Phänotyp, wie für die Biofilmbildung von 536*rfaH* beobachtet, stellt sich die Frage, warum dieser nur mit kleineren Änderungen im Transkriptom korreliert. Von Agn43 ist bekannt, dass dieses Protein in sehr hoher Zahl auf der Zelloberfläche (ca. 50000 Moleküle pro Zelle) exprimiert wird (Schembri, *et al.*, 2002a). Der Anteil von mRNA-Transkripten für dieses Protein ist jedoch, bezogen auf die gesamte mRNA-Population relativ gering. Dieses Resultat wurde durch vergleichende Hybridisierung von cDNA mit gDNA erhalten und trifft ebenfalls für die Menge der LPS-Transkripte zu. Eine RfaH-abhängige Transkription von Genen für den LPS-Kernoligosaccharid-Zusammenbau konnte allerdings mit den DNA-Arrays nicht detektiert werden, obwohl in diesem Gencluster *ops*-Elemente zu finden sind und zudem auch ein verkürztes LPS-Kernoligosaccharid durch Proteingel-Analysen bestimmt werden konnte. Es ist nicht auszuschließen, dass die Transkripte der LPS-Operons (*wa** und *wb**) sowie von *agn43* sehr instabil sind und von endogenen RNasen innerhalb des sehr kleinen Zeitfensters zwischen Zellernte und Zellaufschluss degradiert wurden. Allerdings ist dies nicht sehr wahrscheinlich; zudem zeigte die isolierte Gesamt-RNA in keinem Fall Spuren von Degradation. Vermutlich sind diese Transkripte sogar sehr stabil und müssen deshalb nur in geringer Menge synthetisiert werden, um die resultierenden Proteine trotzdem in ausreichender Zahl bilden zu können. Die relative Stabilität dieser mRNAs könnte durch Zeitreihen-Experimente untersucht werden, jedoch würde damit die Ursache des biofilmbildenden Phänotyps nicht aufgeklärt werden. Vielmehr sollten durch Experimente auf Proteinebene -wie 2D-Gelelektrophorese- neue Erkenntnisse gewinnbar sein, um diesen Phänotyp weiter zu charakterisieren. Auch durch

bioinformatische Analysen von potentiellen *ops*-Elementen lassen sich möglicherweise weitere Gene und Operons identifizieren, die durch RfaH verstärkt exprimiert werden können, wodurch das RfaH-Regulon erweitert würde und zudem auch den Biofilm-Phänotyp erklären könnte.

VII.4 Transkriptomanalysen von *E. coli* Biofilmen

In dieser Arbeit wurde auch die Genexpression von Zellen des Stammes *E. coli* 536 aus Biofilmen untersucht und Unterschiede zum Expressionsprofil von planktonischen Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt.

Die Bildung eines Biofilms ist ein dynamischer, mehrstufiger Prozess, der sich -abhängig von den vorherrschenden Bedingungen- über einen längeren Zeitraum von mehreren Tagen erstrecken kann (Ghigo, 2003; Van Houdt und Michiels, 2005). Dieser Prozess wurde auch von anderen Arbeitsgruppen bei verschiedenen Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien durch DNA-Arrays sowie 2D-Gelelektrophorese untersucht. Ein Vergleich dieser Daten zeigte bereits, dass, abhängig von den Versuchsbedingungen, qualitativ und quantitativ unterschiedliche Beobachtungen gemacht worden sind (Beloin und Ghigo, 2005; Lazazzera, 2005; Sauer, 2003).

Die differentielle Genexpression variierte bei diesen Untersuchungen zwischen 1 % und 38 % in Bezug auf das jeweilige Genom. Die geringsten Unterschiede wurden bei *Pseudomonas aeruginosa*, dem Erreger der cystischen Fibrose, beobachtet. Hier wurden in vier Tage alten Biofilmen im Vergleich zu planktonisch wachsenden Zellen lediglich 1 % aller Gene differentiell exprimiert (Whiteley *et al.*, 2001).

Auch die Genexpression in Biofilmen unterschiedlicher *E. coli* Isolate wurde durch Transkriptomanalyse näher untersucht. In nach 40 Stunden geernteten Biofilmen des *E. coli* Stammes MG1655 waren 206 Gene (4,8 % des Genoms) induziert und nur 27 Gene (0,63 % des Genoms) wurden signifikant schwächer exprimiert als in planktonischen Zellen (Schembri, *et al.*, 2003a). Aus acht Tage alten Biofilmen des Stammes *E. coli* TG1 konnten 250 Gene (5,8 % des Genoms) identifiziert werden, die im Vergleich zu planktonischen Zellen stärker exprimiert wurden sowie 188 Gene (4,4 % des Genoms) die unter diesen Bedingungen weniger stark exprimiert waren (Beloin, *et al.*, 2004).

Ähnliche Ergebnisse zeigten die hier beschriebenen Expressionsanalysen des Stammes 536 mit Zellen aus Biofilmen im Vergleich zu solchen, die in der exponentiellen Wachstumsphase aus Schüttelkulturen geerntet wurden. In Biofilmen des 536 Wildtyps wurden 3,4 % aller Gene mehr als zweifach stärker exprimiert und 6,2 % aller Gene wurden um mindestens Faktor zwei schwächer exprimiert. In Biofilmen von 536*rfaH* waren dies 3,9 % (induziert) und 4,5% (reprimiert). Diese Resultate lassen erkennen, dass trotz unterschiedlicher Versuchsbedingungen und verschiedener Isolate quantitativ ähnliche Änderungen im Expressionsprofil von *E. coli* 536 beobachtet wurden, wie bei den *E. coli* Stämmen TG1 bzw. MG1655.

Ein Vergleich der Genexpression in Biofilmen von 536 mit o.g. Expressionsstudien anderer *E. coli* Stämme ergab auch bei Betrachtung der einzelnen Gene übereinstimmende Beobachtungen.

VII.4.1 Vergleich der Expressionsstudien von Biofilmen der Stämme *E. coli* 536 und MG1655

Es ist bekannt, dass in Biofilmen lebende Bakterien bestimmten Stressfaktoren wie z.B. Mangel an Nährstoffen, Übergang in die stationäre Wachstumsphase und osmotischem Stress unterliegen. Die zelluläre Anpassung an diese Bedingungen wird bei *E. coli* durch das *rpoS*-Regulon kontrolliert. *RpoS*-defiziente Mutanten von *E. coli* 536 bzw. MG1655 hatten nur noch eine stark verminderte Befähigung, Biofilme zu bilden (Adams und McLean, 1999).

Die Expression von Genen dieses Regulons in Biofilmen wurde für den Stamm MG1655 bereits näher bestimmt. In Analogie zu diesen Daten konnten auch für den Stamm 536 Gene dieses Regulons identifiziert werden, welche in Biofilmen verstärkt exprimiert wurden. Zu diesen gehören *cfa*, *hdeAB*, *osmE*, *otsA*, *hyaB*, *csiE*, *cpbA*, *appC*, *glnA* und *fimA*. Im Gegensatz zu den Daten für MG1655 wurde jedoch das ebenfalls *rpoS*-abhängige *himA* (kodiert die α -Untereinheit von IHF) ausschließlich in planktonischen Zellen von *E. coli* 536 verstärkt exprimiert.

Auch die Expression von Oberflächenproteinen und Proteinen für die Zellstruktur können die Biofilmbildung beeinflussen. In Biofilmen von MG1655 wurden *fimA*, *agn43*, *lpxC* sowie *ompC* verstärkt exprimiert und *ompT* sowie *nlpB* schwächer exprimiert. Für *E. coli* 536 ergab sich, dass *lpxB* und neben *fimA* auch *fimG* und *fimI* in Biofilmen stärker exprimiert werden und *ompT*, *ompC*, *nlpD* sowie *agn43* bevorzugt in planktonischen Schüttelkulturen exprimiert werden. Die verstärkte Expression von *agn43* in planktonischen Zellen steht im Gegensatz zu den Beobachtungen von P. Klemm und Mitarbeitern, wurde aber für 536 neben der Transkriptomanalyse auch durch andere Methoden bestätigt. Prinzipiell ist Antigen 43 in sehr großer Zahl (50000 Kopien pro Zelle) an der Zelloberfläche vorhanden, wird allerdings nur sehr schwach exprimiert. Dies könnte in relativ langen Halbwertszeiten der mRNA begründet sein. Innerhalb von reifen Biofilmen besteht außerdem keine Notwendigkeit zur weiteren Zellaggregation durch dieses Protein, so dass eine verstärkte Expression in dieser Phase der Biofilmbildung nicht zwingend erforderlich ist. Zudem sind viele Gene während der Biofilmbildung Zeit- und Phasen-abhängig exprimiert, was ebenfalls Unterschiede bedingen könnte. Für *Bacillus subtilis* waren mehr als 55 % der identifizierten Gene nur bei einem Zeitpunkt während des mehrstufigen Reifungsprozess des Biofilms differentiell exprimiert (Stanley *et al.*, 2003). Somit könnten auch verschiedene Zeitpunkte der Probenentnahme Ursache für unterschiedliche Expressionsprofile sein.

Außer den *rpoS*-abhängigen Genen und Genen, die für Zellhüllenbestandteile kodieren, wurden noch weitere Gene und Operons identifiziert, die in den Biofilmen beider Stämme verstärkt exprimiert wurden (wie *sodA*, *hns* / *stpA*, *treR*, *hdeAB*, *ydeF*, *gadB*, *hycADEF*, *appC*, *adiY*, *yfiADGK*, *clpB*, *ydeF*, *yehM*, *malEG*, *yehJ*, *oppA*, *pflB*, *ndh*, *hypA*, *hybCG* und *hyaB*). Diese Gene kodieren hauptsächlich

Faktoren für Stoffwechsel, Energieumwandlung und Transportprozesse, putative Enzyme oder sind bislang nicht charakterisiert.

VII.4.2 Vergleich der Expressionsstudien von Biofilmen der Stämme *E. coli* 536 und TG1

Auch mit der publizierten Expressionsstudie von deutlich älteren Biofilmen des *E. coli* Stammes TG1 sind einige Gemeinsamkeiten in der Genexpression feststellbar (Beloin, *et al.*, 2004). In Analogie zu dieser Studie wurden in Biofilmen von *E. coli* 536 *recA*, *pspA*, *fimA*, *fimI*, *yebA*, *yhhX*, *ybeD*, *yjbH* und *yiaT* überexprimiert. Diese Gene kodieren Proteine für DNA-Reparatursysteme, die Zellhülle und bislang unbekannte Faktoren. Das DNA-Reparaturprotein *recA* wird bei zellulärem Stress verstärkt exprimiert und ist Bestandteil des „SOS-response“-Regulons. Für den Stamm TG1 wurde ermittelt, dass eine Mutante defizient in *recA* keine reifen Biofilme mehr bilden kann.

Im Gegensatz zu den Daten von *E. coli* TG1 stimmten die Daten dieser Arbeit insgesamt mit den Daten für MG1655 besser überein. Dies kann, abgesehen von den unterschiedlichen Organismen, darin begründet sein, dass die Biofilme von TG1 über einen sehr viel längeren Zeitraum gereift sind, als bei den Biofilmstudien der Stämme MG1655 bzw. 536.

VII.4.3 Analyse der in Biofilmen von *E. coli* 536 induzierten und reprimierten Gene

In dieser Arbeit wurden die Transkriptome von planktonischen Zellen aus Schüttelkulturen (37 °C, 30 °C) und die Transkriptome von Zellen aus 48 Stunden alten Biofilmen von *E. coli* 536 und *536rfaH* analysiert. Aus einer Schnittmengenanalyse unter Berücksichtigung der jeweils 100 am stärksten überexprimierten sowie der 100 am stärksten reprimierten Gene ergab sich, dass in vier von vier Vergleichen 23 Gene prinzipiell in Biofilmen überexprimiert und dass 25 Gene prinzipiell unter planktonischen Bedingungen verstärkt exprimiert wurden. Unter Berücksichtigung der Schnittmengen, die in mindestens drei von vier Fällen spezifisch für Zellen in Biofilmen bzw. für planktonische Zellen gefunden wurden, erweitert sich die Anzahl auf 59 Gene, welche speziell in Biofilmen verstärkt exprimiert wurden bzw. auf 55 Gene, die speziell in planktonischen Zellen exprimiert wurden. Auch hier zeigt die detaillierte Analyse dieser Gengruppen Übereinstimmungen mit bereits bekannten Fakten aus anderen Studien.

Biofilme sind heterogene Systeme, die infolge ihrer mehrschichtigen Struktur durch eine z.T. anaerobe Umgebung (Sauerstoff-Gradient), die Ausbildung von Stoffgradienten (Nährstoffe und Abbauprodukte), einen veränderten Metabolismus und Stofftransport sowie durch verschiedene andere Stressfaktoren charakterisiert sind (Costerton, *et al.*, 1995; Lazazzera, 2005). Somit unterscheiden sich insbesondere zelluläre Stoffkreisläufe und Funktionen in Biofilmen deutlich von solchen aus Schüttelkulturen.

Die besonderen Umweltbedingungen in Biofilmen zwingen die Zellen zur Umstellung verschiedener zellulärer Prozesse. Ausgebildete Stoffgradienten bedingen andere Transportprozesse innerhalb des Biofilms. Die Ressourcenknappheit führt zu verringerter Produktion von Aminosäuren. Der Energiestoffwechsel ist auf anaerobe Konditionen (Gärung) umgestellt. Diese Umstellungen bedingen die Synthese anderer Kofaktoren, Energiespeicher und Elektronenüberträger als in der planktonischen Wachstumsphase. Auch die erhöhte Expression verschiedener Proteine durch Stressfaktoren wurde in Biofilmen beobachtet (Lazazzera, 2005; Ram *et al.*, 2005; Van Houdt und Michiels, 2005). Insbesondere Proteine für DNA-Modifikation, -Restriktion und -Reparatur, aber auch Bakteriophagengene werden in Biofilmen oftmals induziert exprimiert. Solche Genfunktionen konnten auch jenen Genen zugeordnet werden, die durch die Schnittmengenanalyse für den Stamm 536 herausgefiltert worden sind.

Die erhöhte Expression von Typ 1-Fimbrien und Curli-Fimbrien unterstützte die Biofilmbildung (Kikuchi *et al.*, 2005; Lazazzera, 2005; Van Houdt und Michiels, 2005). Auch die verstärkte Expression von bestimmten Membranproteinen ist für Biofilmzellen beschrieben worden (Otto und Hermansson, 2004; Otto, *et al.*, 2001; Werner und Misra, 2005). Im Gegensatz zu den Biofilmstudien von *P. aeruginosa* wurde das Membranprotein TolA jedoch im Fall von *E. coli* 536 hauptsächlich in Schüttelkulturen exprimiert (Whiteley, *et al.*, 2001). Auch Antigen 43 wurde in Biofilmen von *E. coli* MG1655 und TG1 im Gegensatz zu 536 stärker exprimiert als in Schüttelkulturen. Das Membranprotein OmpT wurde sowohl in MG1655 als auch in *E. coli* 536 hauptsächlich während der exponentiellen Wachstumsphase in Schüttelkulturen exprimiert, aber hatte beim Stamm TG1 in keiner der beiden Wachstumsphasen eine stärkere Expression (Beloin, *et al.*, 2004). Bei MG1655 wurde zudem eine Wachstumsphasen-abhängige Expression dieses Membranproteins ermittelt. Diese gegensätzlichen, aber nicht zwingend widersprüchlichen Ergebnisse belegen, dass Biofilme durch unterschiedliche Faktoren geprägt sein können und nicht ausschließlich von einzelnen Faktoren abhängen. Vielmehr hängt dieser Phänotyp vom Zusammenspiel dieser Faktoren ab. Diese qualitativen Unterschiede lassen sich auch makroskopisch durch elektronenmikroskopische Aufnahmen von Biofilmen verschiedener Stämme und Mutanten beobachten. Von den differenziell exprimierten Genen waren die meisten auf dem Kerngenom des Stammes 536 lokalisiert. Es wurden aber auch einige Gene identifiziert, die zum flexiblen Genpool gehören. Dies unterstreicht, dass die Biofilmbildung auch von anderen Faktoren als jenen auf dem Kerngenom unterstützt werden kann und die Zelle Genprodukte von horizontal erworbenen Genclustern benutzt werden, um sich an bestimmte Umweltbedingungen anzupassen. Im Hinblick auf diese Ergebnisse wäre es interessant, den Biofilm-Phänotyp von einer PAI-defizienten Mutante zu charakterisieren und zu untersuchen, ob diese sich von den Biofilmen des Ursprungsstammes unterscheidet. Durch die Untersuchungen von Deletionsmutanten der PAI I₅₃₆ bzw. der PAI II₅₃₆ waren allerdings keine Veränderungen der Biofilmbildung im Vergleich zum Wildtyp feststellbar.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die beobachteten qualitativen und quantitativen Unterschiede von Biofilmen durch zahlreiche Faktoren geprägt werden, die zudem innerhalb dieses

mehrstufigen Prozesses nicht permanent exprimiert sein müssen und somit vom Zeitpunkt der Probennahme, den Versuchsbedingungen als auch vom Stamm abhängen (Lazazzera, 2005; Van Houdt und Michiels, 2005). Die Biofilmbildung ist ein heterogenes Phänomen, bei dem prinzipiell kein allgemeiner Phänotyp existiert. Vielmehr ist dieser Phänotyp abhängig von verschiedenen Bedingungen und ist des Weiteren durch mikro- und makroskopische Unterschiede gekennzeichnet (Beloin und Ghigo, 2005).

VII.5 Analyse des *E. coli* Genomgehaltes mit DNA-Arrays

Die Genome von *E. coli* Isolaten unterscheiden sich in ihrer Größe und in der Präsenz spezieller Faktoren, die für die Besiedlung verschiedener Nischen hilfreich sind (Dobrindt *et al.*, 2002). In Folge evolutionärer Anpassungen können die Genome unterschiedlichen Veränderungen unterliegen. Der Erwerb und die Deletion von DNA-Bereichen ist ein grundlegender Mechanismus für solche evolutionären Anpassungen und Grund für die beobachtete Diversität dieser Isolate. Die Spezies *E. coli* ist gekennzeichnet durch das Auftreten von einerseits pathogenen und andererseits apathogenen, kommensalen Varianten. Die pathogenen Varianten lassen sich wiederum in verschiedene Pathotypen gliedern, welche unterschiedliche Symptome hervorrufen und verschiedene Virulenzfaktoren kodieren (Kaper, *et al.*, 2004). Allen Stämmen gemein ist ein Kerngenom, welches Gene für generelle biologische Funktionen dieser Organismen umfasst. Durch den Erwerb von zusätzlichen Eigenschaften können sich diese Organismen an bestimmte ökologische Nischen anpassen. Solche zusätzlichen Eigenschaften sind oftmals auf mobilen Elementen kodiert und unterschiedlich verbreitet (Dobrindt, *et al.*, 2004; Hacker, *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit wurde die DNA-Array-Technologie benutzt, um die Genomplastizität von *E. coli* Isolaten zu untersuchen. Neben einer DNA-Membran mit spezifischen Sonden gegen Gene des Kerngenoms wurde ein speziell entwickelter DNA-Array verwendet, um insbesondere die Verbreitung von Virulenzgenen zu studieren, welche auf PAIs kodiert sind.

Ein Vergleich von Isolaten unterschiedlicher Pathotypen ergab, dass sich diese Isolate hauptsächlich durch ihre Virulenzfaktoren unterscheiden. Hingegen war das Kerngenom dieser Stämme sehr konserviert.

Zudem wurden verschiedene Derivate mit PAI-Deletionen mit den jeweiligen Ursprungsstämmen verglichen. Die Integration von PAIs in ein Genom erfolgt über einen speziellen Mechanismus in der Regel in einen tRNA-Lokus (Hacker und Kaper, 2000). Die Integration, aber auch die Deletion von PAIs wird von speziellen Enzymen wie Bakteriophagenintegrasen vermittelt (Dobrindt, *et al.*, 2004; Hochhut, *et al.*, 2005). Es wurde beobachtet, dass die untersuchten Deletionsmutanten abgesehen von wenigen Bakteriophagenen ein zu den Ursprungsstämmen identisches Kerngenom besaßen und offensichtlich Gene von PAIs spezifisch deletiert hatten. Dies bestätigt, dass insbesondere die Deletion, aber auch der Erwerb von PAIs speziellen Mechanismen unterliegen, bei welchen das Kerngenom unverändert bleibt. Die Mechanismen der PAI-Deletion wurden für den Stamm 536 näher

untersucht (Middendorf, *et al.*, 2001; Middendorf, *et al.*, 2004). Die DNA-Array Studien bekräftigten diese Untersuchungen und belegten die präzise Excision von PAIs auch bei anderen Stämmen.

Mit Hilfe der DNA-Arrays lassen sich somit prinzipiell evolutionäre Anpassungen von *E. coli* Isolaten und insbesondere die Verbreitung von PAIs sowie anderen Genomischen Inseln studieren. Zudem ermöglicht diese Methodik, Virulenzgene unbekannter Isolate zu diagnostizieren und erlaubt die genetische Charakterisierung sowie Zuordnung zu bestimmten Pathotypen.

Die vergleichende Genomanalyse mit DNA-Arrays ist eine nützliche Ergänzung zu anderen Klassifizierungsmethoden wie „multi locus sequence typing“ (MLST), Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) und „suppression subtractive hybridisation“ (SSH) (Arshad *et al.*, 1993; Lisitsyn und Wigler, 1993; Urwin und Maiden, 2003). Von Vorteil ist insbesondere, dass eine schnelle, globale Analyse aller kodierten Gene möglich ist, ohne eine aufwendige Sequenzierung durchführen zu müssen. Durch Kreuzhybridisierungen von ähnlichen DNA-Fragmenten lassen sich jedoch auch Fehlinterpretationen nicht ausschließen. Der gewonnene Überblick über das jeweilige Genom ist somit weniger genau als die Kompletsequenzierung, mit der sich sehr genaue, detaillierte Aussagen über die Zusammensetzung des Chromsoms treffen lassen.

Ergänzend zu den hier begonnen Untersuchungen von verschiedenen *E. coli* Isolaten werden z.Z. noch weitere Stämme durch DNA-Arrays charakterisiert, um zusätzliche Informationen zur Genomplastizität von *E. coli* zu erwerben.

VII.6 Ausblick und abschließende Bemerkungen

Die Gründe zur verstärkten Biofilmbildung *rfaH*-defizienter *E. coli* Stämme konnten nur im Fall von MG1655 näher bestimmt werden. Für 536*rfaH* sind die molekularen Ursachen dieses Phänotyps noch unklar. Zudem konnte weder für MG1655*rfaH* noch für 536*rfaH* geklärt werden, weshalb diese Stämme verstärkt autoaggregieren. Die beobachtete erhöhte Expression von Antigen 43 war nicht hinreichend, um dieses verstärkte Autoaggregationsverhalten zu beschreiben. Zudem zeigte sich, dass das RfaH-Regulon offensichtlich nur aus wenigen Genen besteht. Das RfaH-Regulon konnte zwar um bislang unbekannte Faktoren erweitert werden, jedoch ist unklar, ob dieser Transkriptionsantiterminator die Genexpression von weiteren Faktoren, welche durch die hier beschriebenen Transkriptomanalysen nicht detektiert worden sind, regulieren kann. Solche Faktoren könnten z.B. nur unter Bedingungen exprimiert sein, die hier nicht untersucht worden sind. Um diese RfaH-abhängigen Faktoren bestimmen zu können, müssten weitere Untersuchungen erfolgen.

Der folgende Ansatz könnte zur Identifizierung weiterer RfaH-abhängiger Gene beitragen:

Da gereinigtes RfaH nur in Gegenwart von Transkriptionselongationskomplexen an *ops*-Elemente bindet, sind *in vitro* Studien zur Bindung von RfaH an DNA nur schwer durchführbar (Bailey *et al.*, 2000). Allerdings sollten mit Hilfe von DNA-Bibliotheken und adäquaten Reportergenen alle im Genom kodierten *ops*-Elemente identifizierbar sein und Aufschluss über das RfaH-Regulon geben können. Hierfür ließe sich das (auch in Bezug auf RfaH) gut charakterisierte

α -Hämolysin-Operon verwenden (Bailey, *et al.*, 1996; Bailey *et al.*, 1992; Cross *et al.*, 1990; Koronakis, *et al.*, 1988; Koronakis *et al.*, 1989; Landraud, *et al.*, 2003; Leeds und Welch, 1996; Leeds und Welch, 1997; Nieto, *et al.*, 1996). Dieses Operon umfasst die Gene *hlyCABD*. Zwischen *hlyA* und *hlyB* befindet sich eine Terminationsstruktur, die in Gegenwart von RfaH von der RNA-Polymerase „überlesen“ wird. Innerhalb des *hlyC* Gens ist das *ops*-Element kodiert, das die RfaH-abhängige Transkriptionselongation zu Gunsten von *hlyBD* bewirkt. Somit sollten sich mit einer Plasmid-kodierten DNA-Bibliothek basierend auf dem α -Hämolysin-Operon und klonierten Genomfragmenten, die anstelle des *ops*-Elements innerhalb des *hlyC* Gens eingesetzt werden, jene Fragmente identifizieren lassen, welche in Abhängigkeit von RfaH zum „Überlesen“ der Terminationsstruktur des *hly*-Operons führen (siehe Abb. VII.6). Die Sequenzbestimmung dieser Fragmente würde dann ermöglichen die Genbereiche zu identifizieren, die durch RfaH-abhängige Transkriptionsantitermination verstärkt exprimiert werden. Zudem würden diese *in vitro* Daten eine genauere Bestimmung der *ops*-Konsensussequenz ermöglichen. Als Reportergen für diese Studien lässt sich eine Resistenzkassette (zum Screening) oder ein Reportergen wie *lacZ* (zum Quantifizieren) verwenden. Der Promotor stromaufwärts von *hlyC* ist bei 37 °C in Schüttelkulturen aktiv; somit lassen sich mit diesem System auch Gene mit *ops*-Elementen bestimmen, die unter Labor-Standardbedingungen normalerweise nicht transkribiert werden. Zusätzlich bestünde die Möglichkeit diesem System zur genaueren Quantifizierung noch einen induzierbaren Promotor beizufügen, mit dem die Menge an RfaH gesteuert werden könnte.

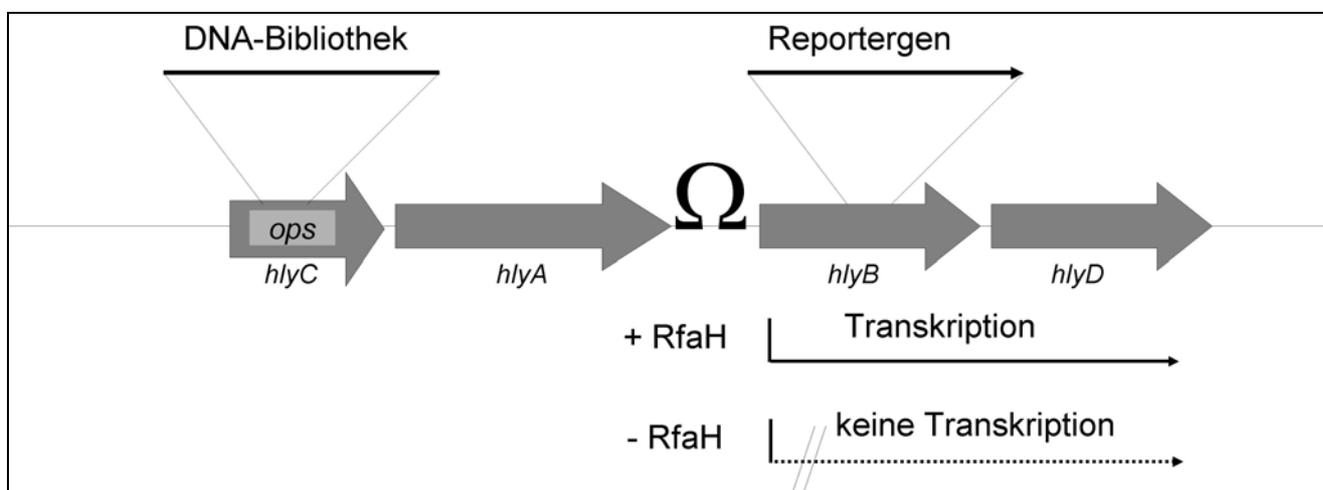


Abb. VII.6: Schematische Darstellung eines Systems zur Bestimmung aller *ops*-Elemente, die eine RfaH-abhängige Genregulation bedingen. Im Austausch gegen das *ops*-Element innerhalb von *hlyC* werden die DNA-Fragmente kloniert. Mit entsprechenden Reportergenen könnten RfaH-abhängig transkribierte DNA-Fragmente selektiert bzw. auch quantifiziert werden.

Diese Untersuchungen sind nicht nur interessant, um die Gene zu identifizieren, die Einfluss auf den Biofilm-Phänotyp haben könnten, sondern lassen auch eine Bestimmung jener Genprodukte zu, die neben der verminderten Expression von α -Hämolysin, einem verkürzten LPS und einer reduzierten Kapselexpression das deutlich verminderte Virulenzpotential von *rfaH* Mutanten bewirken.

Eine weitere Möglichkeit, um Gene zu identifizieren, die den RfaH-abhängigen Biofilm verursachen, sind Mutantenbibliotheken. In Analogie zu Selektionssystemen (wie z.B. „phage display“), die sich das Binden an festen Oberflächen zu Nutze machen, sollten auch in Biofilmen bestimmte Mutanten auf diesem Wege anzureichern sein. Das Grundprinzip eines solchen Selektionsverfahren würde auf folgenden Faktoren basieren: a) genotypische Diversität (Mutantenbibliothek), b) Verbindung von Genotyp und Phänotyp (Biofilmbildung), c) Selektion (Haftungseigenschaften), d) Amplifizierung (gesteuerte RfaH-Expression mit wechselnder Haftung / Nichthaftung).

Würde eine Mutantenbibliothek mit einer Expressionsbibliothek komplementiert, sollten sich durch mehrere Selektionsrunden mit induzierter bzw. nicht induzierter RfaH-Expression im Wechsel zwischen planktonischen Zellen und Biofilmzellen dann jene Mutanten anreichern lassen, die RfaH-abhängige Biofilme bilden.

Der „Pathoarray“ lieferte eine wichtige Grundlage, um die Genomplastizitäten von *E. coli* zu untersuchen. Weiterführende Experimente mit diesem DNA-Array werden die hier gewonnenen Erkenntnisse vervollständigen.

Neue Aspekte der Biofilmbildung von *E. coli* wurden analysiert. Bislang ungeklärte Aspekte und Mechanismen dieses komplexen Phänotyps sollten sich durch zusätzliche Studien beantworten lassen, für die in dieser Arbeit bereits wichtige Grundlagen gelegt wurden.

VIII Literaturverzeichnis

Adams, J. L. und McLean, R. J. (1999). Impact of rpoS deletion on Escherichia coli biofilms. *Appl Environ Microbiol* **65**, 4285-7.

Ahmer, B. M. (2004). Cell-to-cell signalling in Escherichia coli and Salmonella enterica. *Mol Microbiol* **52**, 933-45.

Al-Hasani, K., Henderson, I. R., Sakellaris, H., Rajakumar, K., Grant, T., Nataro, J. P., Robins-Browne, R. und Adler, B. (2000). The sigA gene which is borne on the she pathogenicity island of Shigella flexneri 2a encodes an exported cytopathic protease involved in intestinal fluid accumulation. *Infect Immun* **68**, 2457-63.

Anderson, G. G., Dodson, K. W., Hooton, T. M. und Hultgren, S. J. (2004a). Intracellular bacterial communities of uropathogenic Escherichia coli in urinary tract pathogenesis. *Trends Microbiol* **12**, 424-30.

Anderson, G. G., Martin, S. M. und Hultgren, S. J. (2004b). Host subversion by formation of intracellular bacterial communities in the urinary tract. *Microbes Infect* **6**, 1094-101.

Anderson, G. G., Palermo, J. J., Schilling, J. D., Roth, R., Heuser, J. und Hultgren, S. J. (2003). Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science* **301**, 105-7.

Arshad, M. F., Dunn, F. J., Vega, R., Valvano, J. W. und Serwer, P. (1993). Progress in developing improved programs for pulsed field agarose gel electrophoresis of DNA. *Electrophoresis* **14**, 344-8.

Artsimovitch, I. und Landick, R. (2000). Pausing by bacterial RNA polymerase is mediated by mechanistically distinct classes of signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7090-5.

Artsimovitch, I. und Landick, R. (2002). The transcriptional regulator RfaH stimulates RNA chain synthesis after recruitment to elongation complexes by the exposed nontemplate DNA strand. *Cell* **109**, 193-203.

Bader, G. D. und Hogue, C. W. (2002). Analyzing yeast protein-protein interaction data obtained from different sources. *Nat Biotechnol* **20**, 991-7.

Bailey, M. J., Hughes, C. und Koronakis, V. (1996). Increased distal gene transcription by the elongation factor RfaH, a specialized homologue of NusG. *Mol Microbiol* **22**, 729-37.

Bailey, M. J., Hughes, C. und Koronakis, V. (1997). RfaH and the ops element, components of a novel system controlling bacterial transcription elongation. *Mol Microbiol* **26**, 845-51.

Bailey, M. J., Hughes, C. und Koronakis, V. (2000). In vitro recruitment of the RfaH regulatory protein into a specialised transcription complex, directed by the nucleic acid ops element. *Mol Gen Genet* **262**, 1052-9.

Bailey, M. J., Koronakis, V., Schmoll, T. und Hughes, C. (1992). Escherichia coli HlyT protein, a transcriptional activator of haemolysin synthesis and secretion, is encoded by the rfaH (sfrB) locus required for expression of sex factor and lipopolysaccharide genes. *Mol Microbiol* **6**, 1003-12.

Beech, I. B. und Sunner, J. (2004). Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. *Curr Opin Biotechnol* **15**, 181-6.

Beloin, C. und Ghigo, J. M. (2005). Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms. *Trends Microbiol* **13**, 16-9.

Beloin, C., Michaelis, K., Lindner, K., Landini, P., Hacker, J., Ghigo, J. M. und Dobrindt, U. (2005). The transcriptional regulator RfaH represses biofilm formation in Escherichia coli. *J Bacteriol* **in revision**.

- Beloin, C., Valle, J., Latour-Lambert, P., Faure, P., Kzreminski, M., Balestrino, D., Haagenen, J. A., Molin, S., Prensier, G., Arbeille, B. und Ghigo, J. M. (2004).** Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol Microbiol* **51**, 659-74.
- Benz, I. und Schmidt, M. A. (2001).** Glycosylation with heptose residues mediated by the aah gene product is essential for adherence of the AIDA-I adhesin. *Mol Microbiol* **40**, 1403-13.
- Berger, H., Hacker, J., Juarez, A., Hughes, C. und Goebel, W. (1982).** Cloning of the chromosomal determinants encoding hemolysin production and mannose-resistant hemagglutination in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **152**, 1241-7.
- Beutin, L. und Achtman, M. (1979).** Two *Escherichia coli* chromosomal cistrons, *sfrA* and *sfrB*, which are needed for expression of F factor *tra* functions. *J Bacteriol* **139**, 730-7.
- Bittner, M., Saldias, S., Altamirano, F., Valvano, M. A. und Contreras, I. (2004).** RpoS and RpoN are involved in the growth-dependent regulation of *rfaH* transcription and O antigen expression in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Microb Pathog* **36**, 19-24.
- Blanco, M., Blanco, J. E., Alonso, M. P. und Blanco, J. (1994).** Virulence factors and O groups of *Escherichia coli* strains isolated from cultures of blood specimens from urosepsis and non-urosepsis patients. *Microbiologia* **10**, 249-256.
- Blattner, F. R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, 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. und Shao, Y. (1997).** The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**, 1453-74.
- Blum, G., Ott, M., Lischewski, A., Ritter, A., Imrich, H., Tschape, H. und 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**, 606-14.
- Boyer, H. W. und Roulland-Dussoix (1969).** A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *E. coli*. *J Mol Biol* **41**, 459-472.
- Branda, S. S., Vik, S., Friedman, L. und Kolter, R. (2005).** Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* **13**, 20-6.
- Braun, M. und Silhavy, T. J. (2002).** Imp/OstA is required for cell envelope biogenesis in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **45**, 1289-302.
- Braun, V. (2003).** Iron uptake by *Escherichia coli*. *Front Biosci* **8**, s1409-21.
- Braun, V. und Braun, M. (2002).** Iron transport and signaling in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **529**, 78-85.
- Burns, S. M. und 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**, 4244-53.
- Burns, S. M. und Hull, S. I. (1999).** Loss of resistance to ingestion and phagocytic killing by O(-) and K(-) mutants of a uropathogenic *Escherichia coli* O75:K5 strain. *Infect Immun* **67**, 3757-62.
- Cabeen, M. T. und Jacobs-Wagner, C. (2005).** Bacterial cell shape. *Nat Rev Microbiol* **3**, 601-10.
- Calmann, M. A. und Marinus, M. G. (2003).** Regulated expression of the *Escherichia coli* *dam* gene. *J Bacteriol* **185**, 5012-4.
- Campos, L. C., Franzolin, M. R. und Trabulsi, L. R. (2004).** Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* serogroups - a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **99**, 545-552.

- Carniel, E. (1999).** The Yersinia high-pathogenicity island. *Int Microbiol* **2**, 161-7.
- Carniel, E. (2001).** The Yersinia high-pathogenicity island: an iron-uptake island. *Microbes Infect* **3**, 561-9.
- Carter, H. D., Svetlov, V. und Artsimovitch, I. (2004).** Highly divergent RfaH orthologs from pathogenic proteobacteria can substitute for Escherichia coli RfaH both in vivo and in vitro. *J Bacteriol* **186**, 2829-40.
- Chuang, S. E., Daniels, D. L. und Blattner, F. R. (1993).** Global regulation of gene expression in Escherichia coli. *J Bacteriol* **175**, 2026-36.
- Correnti, J., Munster, V., Chan, T. und Woude, M. (2002).** Dam-dependent phase variation of Ag43 in Escherichia coli is altered in a seqA mutant. *Mol Microbiol* **44**, 521-32.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. und Lappin-Scott, H. M. (1995).** Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49**, 711-45.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. und Greenberg, E. P. (1999).** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318-22.
- Cross, M. A., Koronakis, V., Stanley, P. L. und Hughes, C. (1990).** HlyB-dependent secretion of hemolysin by uropathogenic Escherichia coli requires conserved sequences flanking the chromosomal hly determinant. *J Bacteriol* **172**, 1217-24.
- Danese, P. N. (2002).** Antibiofilm Approaches: Prevention of Catheter Colonization. *Chemistry & Biology* **9**, 873-880.
- Danese, P. N., Pratt, L. A., Dove, S. L. und Kolter, R. (2000b).** The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within Escherichia coli biofilms. *Mol Microbiol* **37**, 424-32.
- Danese, P. N., Pratt, L. A. und Kolter, R. (2000a).** Exopolysaccharide production is required for development of Escherichia coli K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol* **182**, 3593-6.
- Datsenko, K. A. und Wanner, B. L. (2000).** One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6640-5.
- Davies, D. (2003).** Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* **2**, 114-22.
- De Graaf, F. K. und Mooi, F. R. (1986).** The fimbrial adhesins of Escherichia coli. *Adv Microb Physiol* **28**, 65-143.
- Desvaux, M., Parham, N. J. und Henderson, I. R. (2004).** The autotransporter secretion system. *Res Microbiol* **155**, 53-60.
- Dobrindt, U. (1999).** *Ph.D. thesis, Universität Würzburg, Germany* .
- Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Nagy, G., Schneider, G., Johann, A., Gottschalk, G. und Hacker, J. (2002).** Genetic structure and distribution of four pathogenicity islands (PAI I(536) to PAI IV(536)) of uropathogenic Escherichia coli strain 536. *Infect Immun* **70**, 6365-72.
- Dobrindt, U., Brueggemann, H., Blum-Oehler, G., Emody, L., Gottschalk, G. und Hacker, J. (2005).** The genome sequence of E. coli 536. *in preparation* .
- Dobrindt, U., Cohen, P. S., Utley, M., Muhldorfer, I. und Hacker, J. (1998).** The leuX-encoded tRNA⁵(Leu) but not the pathogenicity islands I and II influence the survival of the uropathogenic Escherichia coli strain 536 in CD-1 mouse bladder mucus in the stationary phase. *FEMS Microbiol Lett* **162**, 135-41.
- Dobrindt, U., Hentschel, U., Kaper, J. B. und Hacker, J. (2002).** Genome plasticity in pathogenic and nonpathogenic enterobacteria. *Curr Top Microbiol Immunol* **264**, 157-75.

- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U. und Hacker, J. (2004).** Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **2**, 414-24.
- Dong, Y. H. und Zhang, L. H. (2005).** Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *J Microbiol* **43**, 101-9.
- Dorel, C., Vidal, O., Prigent-Combaret, C., Vallet, I. und Lejeune, P. (1999).** Involvement of the Cpx signal transduction pathway of *E. coli* in biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett* **178**, 169-75.
- Drenkard, E. (2003).** Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect* **5**, 1213-9.
- Elliott, S. J., Sperandio, V., Giron, J. A., Shin, S., Mellies, J. L., Wainwright, L., Hutcheson, S. W., McDaniel, T. K. und Kaper, J. B. (2000).** The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **68**, 6115-26.
- Emsley, P., Charles, I. G., Fairweather, N. F. und Isaacs, N. W. (1996).** Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin. *Nature* **381**, 90-2.
- Evans, D. J. J. und Evans, D. G. (1983).** Classification of pathogenic *Escherichia coli* according to serotype and the production of virulence factors, with special reference to colonization-factor antigens. *Rev Infect Dis* **5**, 692-701.
- Ferrieres, L. und Clarke, D. J. (2003).** The RcsC sensor kinase is required for normal biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 and controls the expression of a regulon in response to growth on a solid surface. *Mol Microbiol* **50**, 1665-82.
- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J. F., Dougherty, B. A., Merrick, J. M. und et al. (1995).** Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**, 496-512.
- Flemming, H. C. und Wingender, J. (2001).** Biofilme - die bevorzugte Lebensform der Bakterien. *Biologie in unserer Zeit* **31**, 169-180.
- Fux, C. A., Costerton, J. W., Stewart, P. S. und Stoodley, P. (2005).** Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* **13**, 34-40.
- Gabig, M., Herman-Antosiewicz, A., Kwiatkowska, M., Los, M., Thomas, M. S. und Wegrzyn, G. (2002).** The cell surface protein Ag43 facilitates phage infection of *Escherichia coli* in the presence of bile salts and carbohydrates. *Microbiology* **148**, 1533-42.
- Gallant, C. V., Daniels, C., Leung, J. M., Ghosh, A. S., Young, K. D., Kotra, L. P. und Burrows, L. L. (2005).** Common beta-lactamases inhibit bacterial biofilm formation. *Mol Microbiol* **58**, 1012-24.
- Ghigo, J. M. (2001).** Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* **412**, 442-5.
- Ghigo, J. M. (2003).** Are there biofilm-specific physiological pathways beyond a reasonable doubt? *Res Microbiol* **154**, 1-8.
- Gorg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R. und Weiss, W. (2000).** The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **21**, 1037-53.
- Gottesman, S. (2004).** The small RNA regulators of *Escherichia coli*: roles and mechanisms*. *Annu Rev Microbiol* **58**, 303-28.

- Gottesman, S. (2005).** Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. *Trends Genet* **21**, 399-404.
- Grimberg, J., Maguire, S. und Belluscio, L. (1989).** A simple method for the preparation of plasmid and chromosomal E. coli DNA. *Nucleic Acids Res* **17**, 8893.
- Gross, R., Hacker, J. und Goebel, W. (2003).** The Leopoldina international symposium on parasitism, commensalism and symbiosis--common themes, different outcome. *Mol Microbiol* **47**, 1749-58.
- Grozdánov, L., Zähringer, U., Blum-Oehler, G., Brade, L., Henne, A., Knirel, Y. A., Schombel, U., Schulze, J., Sonnenborn, U., Gottschalk, G., Hacker, J., Rietschel, E. T. und Dobrindt, U. (2002).** A single nucleotide exchange in the wzy gene is responsible for the semirough O6 lipopolysaccharide phenotype and serum sensitivity of Escherichia coli strain Nissle 1917. *J Bacteriol* **184**, 5912-25.
- Haagmans, W. und van der Woude, M. (2000).** Phase variation of Ag43 in Escherichia coli: Dam-dependent methylation abrogates OxyR binding and OxyR-mediated repression of transcription. *Mol Microbiol* **35**, 877-87.
- Hacker, J. und Carniel, E. (2001).** Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep* **2**, 376-81.
- Hacker, J., Hentschel, U. und Dobrindt, U. (2003).** Prokaryotic chromosomes and disease. *Science* **301**, 790-3.
- Hacker, J., Hochhut, B., Middendorf, B., Schneider, G., Buchrieser, C., Gottschalk, G. und Dobrindt, U. (2004).** Pathogenomics of mobile genetic elements of toxigenic bacteria. *Int J Med Microbiol* **293**, 453-61.
- Hacker, J., Hof, H., Emody, L. und Goebel, W. (1986).** Influence of cloned Escherichia coli hemolysin genes, S-fimbriae and serum resistance on pathogenicity in different animal models. *Microb Pathog* **1**, 533-47.
- Hacker, J. und Kaper, J. B. (2000).** Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* **54**, 641-79.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. und Stoodley, P. (2004).** Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* **2**, 95-108.
- Hammer, B. K. und Bassler, B. L. (2003).** Quorum sensing controls biofilm formation in Vibrio cholerae. *Mol Microbiol* **50**, 101-4.
- Hasman, H., Chakraborty, T. und Klemm, P. (1999).** Antigen-43-mediated autoaggregation of Escherichia coli is blocked by fimbriation. *J Bacteriol* **181**, 4834-41.
- Hasman, H., Schembri, M. A. und Klemm, P. (2000).** Antigen 43 and type 1 fimbriae determine colony morphology of Escherichia coli K-12. *J Bacteriol* **182**, 1089-95.
- Hecker, M. und Engelmann, S. (2000).** Proteomics, DNA arrays and the analysis of still unknown regulons and unknown proteins of Bacillus subtilis and pathogenic gram-positive bacteria. *Int J Med Microbiol* **290**, 123-34.
- Henderson, I. R., Meehan, M. und Owen, P. (1997a).** Antigen 43, a phase-variable bipartite outer membrane protein, determines colony morphology and autoaggregation in Escherichia coli K-12. *FEMS Microbiol Lett* **149**, 115-20.
- Henderson, I. R., Meehan, M. und Owen, P. (1997b).** A novel regulatory mechanism for a novel phase-variable outer membrane protein of Escherichia coli. *Adv Exp Med Biol* **412**, 349-55.
- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C. und Ala'Aldeen, D. (2004).** Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 692-744.

- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F. und Nataro, J. P. (1998).** The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol* **6**, 370-8.
- Henderson, I. R. und Owen, P. (1999).** The major phase-variable outer membrane protein of *Escherichia coli* structurally resembles the immunoglobulin A1 protease class of exported protein and is regulated by a novel mechanism involving Dam and oxyR. *J Bacteriol* **181**, 2132-41.
- Hentschel, U. und Hacker, J. (2001).** Pathogenicity islands: the tip of the iceberg. *Microbes Infect* **3**, 545-8.
- Hochhut, B., Dobrindt, U. und Hacker, J. (2005).** Pathogenicity islands and their role in bacterial virulence and survival. *Contrib Microbiol* **12**, 234-54.
- Hoffman, L. R., D'Argenio, D. A., MacCoss, M. J., Zhang, Z., Jones, R. A. und Miller, S. I. (2005).** Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* **436**, 1171-5.
- Humphery-Smith, I., Cordwell, S. J. und Blackstock, W. P. (1997).** Proteome research: complementarity and limitations with respect to the RNA and DNA worlds. *Electrophoresis* **18**, 1217-42.
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M. und Sakaki, Y. (2001).** A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4569-74. Epub 2001 Mar 13.
- Jacob-Dubuisson, F., Fernandez, R. und Coutte, L. (2004).** Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways. *Biochim Biophys Acta* **1694**, 235-57.
- Janke, B., Dobrindt, U., Hacker, J. und Blum-Oehler, G. (2001).** A subtractive hybridisation analysis of genomic differences between the uropathogenic *E. coli* strain 536 and the *E. coli* K-12 strain MG1655. *FEMS Microbiol Lett* **199**, 61-6.
- Jasiecki, J. und Wegrzyn, G. (2003).** Growth-rate dependent RNA polyadenylation in *Escherichia coli*. *EMBO Rep* **4**, 172-7.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P. und Mobley, H. L. (2004).** Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**, 123-40.
- Ketyi, I. (1994).** Effectiveness of antibiotics on the autochthonous *Escherichia coli* of mice in the intestinal biofilm versus its planktonic phase. *Acta Microbiol Immunol Hung* **41**, 189-95.
- Kierek-Pearson, K. und Karatan, E. (2005).** Biofilm development in bacteria. *Adv Appl Microbiol* **57**, 79-111.
- Kikuchi, T., Mizunoe, Y., Takade, A., Naito, S. und Yoshida, S. (2005).** Curli Fibers Are Required for Development of Biofilm Architecture in *Escherichia coli* K-12 and Enhance Bacterial Adherence to Human Uroepithelial Cells. *Microbiol Immunol* **49**, 875-84.
- Kjaergaard, K., Schembri, M. A., Hasman, H. und Klemm, P. (2000).** Antigen 43 from *Escherichia coli* induces inter- and intraspecies cell aggregation and changes in colony morphology of *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* **182**, 4789-96.
- Klemm, P. (1982).** Fimbrial adherence factors from pathogenic *Escherichia coli* strains. *Tokai J Exp Clin Med* **7**, 185-92.
- Klemm, P. (1985).** Fimbrial adhesions of *Escherichia coli*. *Rev Infect Dis* **7**, 321-40.
- Klemm, P., Hjerrild, L., Gjermansen, M. und Schembri, M. A. (2004).** Structure-function analysis of the self-recognizing Antigen 43 autotransporter protein from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **51**, 283-96.

- Klemm, P. und Schembri, M. A. (2000).** Bacterial adhesins: function and structure. *Int J Med Microbiol* **290**, 27-35.
- Knapp, S., Hacker, J., Jarchau, T. und Goebel, W. (1986).** Large, unstable inserts in the chromosome affect virulence properties of uropathogenic *Escherichia coli* O6 strain 536. *J Bacteriol* **168**, 22-30.
- Koronakis, V., Cross, M. und Hughes, C. (1988).** Expression of the *E. coli* hemolysin secretion gene *hlyB* involves transcript anti-termination within the *hly* operon. *Nucleic Acids Res* **16**, 4789-800.
- Koronakis, V., Cross, M. und Hughes, C. (1989).** Transcription antitermination in an *Escherichia coli* haemolysin operon is directed progressively by cis-acting DNA sequences upstream of the promoter region. *Mol Microbiol* **3**, 1397-404.
- Kuchma, S. L. und O'Toole, G. A. (2000).** Surface-induced and biofilm-induced changes in gene expression. *Curr Opin Biotechnol* **11**, 429-33.
- Laarmann, S. und Schmidt, M. A. (2003).** The *Escherichia coli* AIDA autotransporter adhesin recognizes an integral membrane glycoprotein as receptor. *Microbiology* **149**, 1871-82.
- Landraud, L., Gibert, M., Popoff, M. R., Boquet, P. und Gauthier, M. (2003).** Expression of *cnf1* by *Escherichia coli* J96 involves a large upstream DNA region including the *hlyCABD* operon, and is regulated by the RfaH protein. *Mol Microbiol* **47**, 1653-67.
- Lathem, W. W., Bergsbaken, T. und Welch, R. A. (2004).** Potentiation of C1 esterase inhibitor by StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7. *J Exp Med* **199**, 1077-87.
- Lathem, W. W., Gryns, T. E., Witowski, S. E., Torres, A. G., Kaper, J. B., Tarr, P. I. und Welch, R. A. (2002).** StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7, specifically cleaves C1 esterase inhibitor. *Mol Microbiol* **45**, 277-88.
- Lauriano, C. M., Ghosh, C., Correa, N. E. und Klose, K. E. (2004).** The sodium-driven flagellar motor controls exopolysaccharide expression in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **186**, 4864-74.
- Lazazzera, B. A. (2005).** Lessons from DNA microarray analysis: the gene expression profile of biofilms. *Curr Opin Microbiol* **8**, 222-7.
- Leeds, J. A. und Welch, R. A. (1996).** RfaH enhances elongation of *Escherichia coli* *hlyCABD* mRNA. *J Bacteriol* **178**, 1850-7.
- Leeds, J. A. und Welch, R. A. (1997).** Enhancing transcription through the *Escherichia coli* hemolysin operon, *hlyCABD*: RfaH and upstream JUMPStart DNA sequences function together via a postinitiation mechanism. *J Bacteriol* **179**, 3519-27.
- Levine, M. M. (1987).** *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis* **155**, 377-389.
- Lindenthal, C. und Elsinghorst, E. A. (1999).** Identification of a glycoprotein produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **67**, 4084-91.
- Lindner, K. (2005).** *Ph.D. thesis, Universität Würzburg, Germany* .
- Lisitsyn, N. und Wigler, M. (1993).** Cloning the differences between two complex genomes. *Science* **259**, 946-51.
- Litwin, C. M. und Calderwood, S. B. (1993).** Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin Microbiol Rev* **6**, 137-49.
- Liu, D. und Reeves, P. R. (1994).** *Escherichia coli* K-12 regains its O-antigen. *Microbiology* **140**, 49-57.

- Lynch, M. und Conergy, J. S. (2000).** The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* **290**, 1151-1155.
- Lynch, M. und Force, A. (2000).** The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* **151**, 1531-1545.
- MacFie, J., O'Boyle, C., Mitchell, C. J., Buckley, P. M., Johnstone, D. und Sudworth, P. (1999).** Gut origin of sepsis: a prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity. *Gut* **45**, 223-8.
- Madrid, C., Nieto, J. M., Paytubi, S., Falconi, M., Gualerzi, C. O. und Juarez, A. (2002).** Temperature- and H-NS-dependent regulation of a plasmid-encoded virulence operon expressing *Escherichia coli* hemolysin. *J Bacteriol* **184**, 5058-66.
- Majdalani, N., Vanderpool, C. K. und Gottesman, S. (2005).** Bacterial small RNA regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **40**, 93-113.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., Berka, J., Braverman, M. S., Chen, Y. J., Chen, Z., Dewell, S. B., Du, L., Fierro, J. M., Gomes, X. V., Godwin, B. C., He, W., Helgesen, S., Ho, C. H., Irzyk, G. P., Jando, S. C., Alenquer, M. L., Jarvie, T. P., Jirage, K. B., Kim, J. B., Knight, J. R., Lanza, J. R., Leamon, J. H., Lefkowitz, S. M., Lei, M., Li, J., Lohman, K. L., Lu, H., Makhijani, V. B., McDade, K. E., McKenna, M. P., Myers, E. W., Nickerson, E., Nobile, J. R., Plant, R., Puc, B. P., Ronan, M. T., Roth, G. T., Sarkis, G. J., Simons, J. F., Simpson, J. W., Srinivasan, M., Tartaro, K. R., Tomasz, A., Vogt, K. A., Volkmer, G. A., Wang, S. H., Wang, Y., Weiner, M. P., Yu, P., Begley, R. F. und Rothberg, J. M. (2005).** Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437**, 376-80. Epub 2005 Jul 31.
- Marolda, C. L. und Valvano, M. A. (1998).** Promoter region of the *Escherichia coli* O7-specific lipopolysaccharide gene cluster: structural and functional characterization of an upstream untranslated mRNA sequence. *J Bacteriol* **180**, 3070-9.
- Marre, R., Hacker, J., Henkel, W. und Goebel, W. (1986).** Contribution of cloned virulence factors from uropathogenic *Escherichia coli* strains to nephropathogenicity in an experimental rat pyelonephritis model. *Infect Immun* **54**, 761-7.
- Maurelli, A. T., Fernandez, R. E., Bloch, C. A., Rode, C. K. und Fasano, A. (1998).** "Black holes" and bacterial pathogenicity: a large genomic deletion that enhances the virulence of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 3943-8.
- Middendorf, B., Blum-Oehler, G., Dobrindt, U., Muhldorfer, I., Salge, S. und Hacker, J. (2001).** The pathogenicity islands (PAIs) of the uropathogenic *Escherichia coli* strain 536: island probing of PAI II536. *J Infect Dis* **183**, S17-20.
- Middendorf, B., Hochhut, B., Leipold, K., Dobrindt, U., Blum-Oehler, G. und Hacker, J. (2004).** Instability of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* 536. *J Bacteriol* **186**, 3086-96.
- Miller, J. H. (1972).** Experiments in molecular genetics. , Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N.Y.
- Miller, V. L. und Mekalanos, J. J. (1988).** A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J Bacteriol* **170**, 2575-2583.
- Mobley, H. L., Jarvis, K. G., Elwood, J. P., Whittle, D. I., Lockett, C. V., Russell, R. G., Johnson, D. E., Donnenberg, M. S. und Warren, J. W. (1993).** Isogenic P-fimbrial deletion mutants of pyelonephritogenic *Escherichia coli*: the role of alpha Gal(1-4) beta Gal binding in virulence of a wild-type strain. *Mol Microbiol* **10**, 143-55.

- Muller-Hill, B. (1998).** Some repressors of bacterial transcription. *Curr Opin Microbiol* **1**, 145-51.
- Nagy, G., Dobrindt, U., Grozdanov, L., Hacker, J. und Emody, L. (2005).** Transcriptional regulation through RfaH contributes to intestinal colonization by *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **244**, 173-80.
- Nagy, G., Dobrindt, U., Hacker, J. und Emody, L. (2004).** Oral immunization with an rfaH mutant elicits protection against salmonellosis in mice. *Infect Immun* **72**, 4297-301.
- Nagy, G., Dobrindt, U., Kupfer, M., Emody, L., Karch, H. und Hacker, J. (2001).** Expression of hemin receptor molecule ChuA is influenced by RfaH in uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect Immun* **69**, 1924-8.
- Nagy, G., Dobrindt, U., Schneider, G., Khan, A. S., Hacker, J. und Emody, L. (2002).** Loss of regulatory protein RfaH attenuates virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **70**, 4406-13.
- Nataro, J. P. und Kaper, J. B. (1998).** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**, 142-201.
- Newman, C. L. und Stathopoulos, C. (2004).** Autotransporter and two-partner secretion: delivery of large-size virulence factors by gram-negative bacterial pathogens. *Crit Rev Microbiol* **30**, 275-86.
- Nicolle, L. E. (2005).** Catheter-related urinary tract infection. *Drugs Aging* **22**, 627-39.
- Nieto, J. M., Bailey, M. J., Hughes, C. und Koronakis, V. (1996).** Suppression of transcription polarity in the *Escherichia coli* haemolysin operon by a short upstream element shared by polysaccharide and DNA transfer determinants. *Mol Microbiol* **19**, 705-13.
- Nieto, J. M., Madrid, C., Prenafeta, A., Miquelay, E., Balsalobre, C., Carrascal, M. und Juarez, A. (2000).** Expression of the hemolysin operon in *Escherichia coli* is modulated by a nucleoid-protein complex that includes the proteins Hha and H-NS. *Mol Gen Genet* **263**, 349-58.
- O'Hara, P. J., Gilbert, T. L., Haldeman, B. A., Houamed, K. M., Kuijper, J. L., Hagen, F. S., Almers, W. und Mulvihill, E. (1993).** Different sites of polyadenylation in mRNAs encoding a rat metabotropic glutamate receptor. *DNA Seq* **4**, 53-7.
- Olsen, P. B. und Klemm, P. (1994).** Localization of promoters in the fim gene cluster and the effect of H-NS on the transcription of fimB and fimE. *FEMS Microbiol Lett* **116**, 95-100.
- Oomen, C. J., van Ulsen, P., van Gelder, P., Feijen, M., Tommassen, J. und Gros, P. (2004).** Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter. *Embo J* **23**, 1257-66. Epub 2004 Mar 11.
- Orskov, F. und Orskov, I. (1992).** *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can J Microbiol* **38**, 699-704.
- Orskov, I., Orskov, F., Jann, B. und Jann, K. (1977).** Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. *Bacteriol Rev* **41**, 667-710.
- Otto, K. und Hermansson, M. (2004).** Inactivation of ompX causes increased interactions of type 1 fimbriated *Escherichia coli* with abiotic surfaces. *J Bacteriol* **186**, 226-34.
- Otto, K., Norbeck, J., Larsson, T., Karlsson, K. A. und Hermansson, M. (2001).** Adhesion of type 1-fimbriated *Escherichia coli* to abiotic surfaces leads to altered composition of outer membrane proteins. *J Bacteriol* **183**, 2445-53.
- Owen, P., Meehan, M., de Loughry-Doherty, H. und Henderson, I. (1996).** Phase-variable outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **16**, 63-76.

- Parker, C. T., Kloser, A. W., Schnaitman, C. A., Stein, M. A., Gottesman, S. und Gibson, B. W. (1992).** Role of the rfaG and rfaP genes in determining the lipopolysaccharide core structure and cell surface properties of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **174**, 2525-38.
- Prigent-Combaret, C., Prensier, G., Le Thi, T. T., Vidal, O., Lejeune, P. und Dorel, C. (2000).** Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environ Microbiol* **2**, 450-64.
- Prince, V. E. und Pickett, F. B. (2002).** Splitting pairs: the diverging fates of duplicated genes. *Nat Rev Genet* **3**, 827-37.
- Raes, J. und Van de Peer, Y. (2003).** Gene duplication, the evolution of novel gene functions, and detecting functional divergence of duplicates in silico. *Appl Bioinformatics* **2**, 91-101.
- Raffa, R. B., Iannuzzo, J. R., Levine, D. R., Saeid, K. K., Schwartz, R. C., Sucic, N. T., Terleckyj, O. D. und Young, J. M. (2005).** Bacterial communication ("quorum sensing") via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* **312**, 417-23. Epub 2004 Nov 4.
- Ram, R. J., Verberkmoes, N. C., Thelen, M. P., Tyson, G. W., Baker, B. J., Blake, R. C., 2nd, Shah, M., Hettich, R. L. und Banfield, J. F. (2005).** Community proteomics of a natural microbial biofilm. *Science* **308**, 1915-20. Epub 2005 May 5.
- Ramarathnam, R. und Subramaniam, S. (2000).** A novel microarray strategy for detecting genes and pathways in microbes with unsequenced genomes. *Microb Comp Genomics* **5**, 153-61.
- Redford, P. und Welch, R. A. (2002).** Extraintestinal *Escherichia coli* as a model system for the study of pathogenicity islands. *Curr Top Microbiol Immunol* **264**, 15-30.
- Reznikoff, W. S. (1992).** The lactose operon-controlling elements: a complex paradigm. *Mol Microbiol* **6**, 2419-22.
- Richardson, L. V. und Richardson, J. P. (2005).** Identification of a structural element that is essential for two functions of transcription factor NusG. *Biochim Biophys Acta* **1729**, 135-40. Epub 2005 Apr 25.
- Roberts, J. W. (1993).** RNA and protein elements of *E. coli* and lambda transcription antitermination complexes. *Cell* **72**, 653-5.
- Roberts, J. W., Yarnell, W., Bartlett, E., Guo, J., Marr, M., Ko, D. C., Sun, H. und Roberts, C. W. (1998).** Antitermination by bacteriophage lambda Q protein. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **63**, 319-25.
- Robins-Browne, R. M. und Hartland, E. L. (2002).** *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. *J Gastroenterol Hepatol* **17**, 467-75.
- Roche, A., McFadden, J. und Owen, P. (2001).** Antigen 43, the major phase-variable protein of the *Escherichia coli* outer membrane, can exist as a family of proteins encoded by multiple alleles. *Microbiology* **147**, 161-9.
- Roux, A., Beloin, C. und Ghigo, J. M. (2005).** Combined inactivation and expression strategy to study gene function under physiological conditions: application to identification of new *Escherichia coli* adhesins. *J Bacteriol* **187**, 1001-13.
- Russell, A. D. (2003).** Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *Lancet Infect Dis* **3**, 794-803.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual. , 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N.Y.

- Sanderson, K. E. und Stocker, B. A. (1981).** Gene *rfaH*, which affects lipopolysaccharide core structure in *Salmonella typhimurium*, is required also for expression of F-factor functions. *J Bacteriol* **146**, 535-41.
- Santangelo, T. J. und Roberts, J. W. (2002).** RfaH, a bacterial transcription antiterminator. *Mol Cell* **9**, 698-700.
- Sauer, K. (2003).** The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biol* **4**, 219. Epub 2003 May 27.
- Schachter, B. (2003).** Slimy business - the biotechnology of biofilms. *Nat biotechnol* **21**, 361-365.
- Schaible, U. E. und Kaufmann, S. H. (2004).** Iron and microbial infection. *Nat Rev Microbiol* **2**, 946-53.
- Schaible, U. E. und Kaufmann, S. H. (2005).** A nutritive view on the host-pathogen interplay. *Trends Microbiol* **13**, 373-80.
- Schembri, M. A., Dalsgaard, D. und Klemm, P. (2004).** Capsule shields the function of short bacterial adhesins. *J Bacteriol* **186**, 1249-57.
- Schembri, M. A., Givskov, M. und Klemm, P. (2002a).** An attractive surface: gram-negative bacterial biofilms. *Sci STKE* **2002**, RE6.
- Schembri, M. A., Hjerrild, L., Gjermansen, M. und Klemm, P. (2003b).** Differential expression of the *Escherichia coli* autoaggregation factor antigen 43. *J Bacteriol* **185**, 2236-42.
- Schembri, M. A., Kjaergaard, K. und Klemm, P. (2003a).** Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol* **48**, 253-67.
- Schembri, M. A. und Klemm, P. (2001).** Coordinate gene regulation by fimbriae-induced signal transduction. *Embo J* **20**, 3074-81.
- Schembri, M. A., Olsen, P. B. und Klemm, P. (1998).** Orientation-dependent enhancement by H-NS of the activity of the type 1 fimbrial phase switch promoter in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **259**, 336-44.
- Schembri, M. A., Ussery, D. W., Workman, C., Hasman, H. und Klemm, P. (2002b).** DNA microarray analysis of *fim* mutations in *Escherichia coli*. *Mol Genet Genomics* **267**, 721-9. Epub 2002 Jun 21.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. und Brown, P. O. (1995).** Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467-70.
- Schneider, G., Dobrindt, U., Bruggemann, H., Nagy, G., Janke, B., Blum-Oehler, G., Buchrieser, C., Gottschalk, G., Emody, L. und Hacker, J. (2004).** The pathogenicity island-associated K15 capsule determinant exhibits a novel genetic structure and correlates with virulence in uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect Immun* **72**, 5993-6001.
- Schubert, S., Rakin, A. und Heesemann, J. (2004).** The *Yersinia* high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects. *Int J Med Microbiol* **294**, 83-94.
- Schubert, S., Rakin, A., Karch, H., Carniel, E. und Heesemann, J. (1998).** Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infect Immun* **66**, 480-5.
- Shapiro, J. A. (1998).** Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu Rev Microbiol* **52**, 81-104.
- Southern, E. M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-17.

- Sperandio, V., Kaper, J. B., Bortolini, M. R., Neves, B. C., Keller, R. und Trabulsi, L. R. (1998).** Characterization of the locus of enterocyte effacement (LEE) in different enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) serotypes. *FEMS Microbiol Lett* **164**, 133-9.
- Sperandio, V., Li, C. C. und Kaper, J. B. (2002).** Quorum-sensing *Escherichia coli* regulator A: a regulator of the LysR family involved in the regulation of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island in enterohemorrhagic *E. coli*. *Infect Immun* **70**, 3085-93.
- Sperandio, V., Mellies, J. L., Nguyen, W., Shin, S. und 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**, 15196-201.
- Sperandio, V., Torres, A. G., Jarvis, B., Nataro, J. P. und Kaper, J. B. (2003).** Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8951-6. Epub 2003 Jul 7.
- Stanley, N. R., Britton, R. A., Grossman, A. D. und Lazazzera, B. A. (2003).** Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarrays. *J Bacteriol* **185**, 1951-7.
- Steiner, T., Kaiser, J. T., Marinkovic, S., Huber, R. und Wahl, M. C. (2002).** Crystal structures of transcription factor NusG in light of its nucleic acid- and protein-binding activities. *Embo J* **21**, 4641-53.
- Stevens, M. P., Hanfling, P., Jann, B., Jann, K. und Roberts, I. S. (1994).** Regulation of *Escherichia coli* K5 capsular polysaccharide expression: evidence for involvement of RfaH in the expression of group II capsules. *FEMS Microbiol Lett* **124**, 93-8.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G. und Costerton, J. W. (2002).** Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* **56**, 187-209. Epub 2002 Jan 30.
- Stout, V. (1996).** Identification of the promoter region for the colanic acid polysaccharide biosynthetic genes in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **178**, 4273-80.
- Szalewska-Palasz, A., Wrobel, B. und Wegrzyn, G. (1998).** Rapid degradation of polyadenylated oop RNA. *FEBS Lett* **432**, 70-2.
- Tjaden, B., Saxena, R. M., Stolyar, S., Haynor, D. R., Kolker, E. und Rosenow, C. (2002).** Transcriptome analysis of *Escherichia coli* using high-density oligonucleotide probe arrays. *Nucleic Acids Res* **30**, 3732-8.
- Tong, A. H., Drees, B., Nardelli, G., Bader, G. D., Brannetti, B., Castagnoli, L., Evangelista, M., Ferracuti, S., Nelson, B., Paoluzi, S., Quondam, M., Zucconi, A., Hogue, C. W., Fields, S., Boone, C. und Cesareni, G. (2002).** A combined experimental and computational strategy to define protein interaction networks for peptide recognition modules. *Science* **295**, 321-4. Epub 2001 Dec 13.
- Torres, A. G., Perna, N. T., Burland, V., Ruknudin, A., Blattner, F. R. und Kaper, J. B. (2002).** Characterization of Cah, a calcium-binding and heat-extractable autotransporter protein of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **45**, 951-66.
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T. A., Judson, R. S., Knight, J. R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S. und Rothberg, J. M. (2000).** A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **403**, 623-7.
- Urwin, R. und Maiden, M. C. (2003).** Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol* **11**, 479-87.
- Valentin-Hansen, P., Sogaard-Andersen, L. und Pedersen, H. (1996).** A flexible partnership: the CytR anti-activator and the cAMP-CRP activator protein, comrades in transcription control. *Mol Microbiol* **20**, 461-6.

- van der Woude, M., Braaten, B. und Low, D. (1996).** Epigenetic phase variation of the pap operon in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol* **4**, 5-9.
- van der Woude, M. W. und Baumler, A. J. (2004).** Phase and antigenic variation in bacteria. *Clin Microbiol Rev* **17**, 581-611, table of contents.
- van der Woude, M. W., Braaten, B. A. und Low, D. A. (1992).** Evidence for global regulatory control of pilus expression in *Escherichia coli* by Lrp and DNA methylation: model building based on analysis of pap. *Mol Microbiol* **6**, 2429-35.
- Van Houdt, R. und Michiels, C. W. (2005).** Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res Microbiol* **156**, 626-33. Epub 2005 Mar 22.
- Videla, H. A. und Herrera, L. K. (2005).** Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. *Int Microbiol* **8**, 169-80.
- von Hippel, P. H. (1998).** An integrated model of the transcription complex in elongation, termination, and editing. *Science* **281**, 660-5.
- Waldron, D. E., Owen, P. und Dorman, C. J. (2002).** Competitive interaction of the OxyR DNA-binding protein and the Dam methylase at the antigen 43 gene regulatory region in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **44**, 509-20.
- Wallecha, A., Correnti, J., Munster, V. und van der Woude, M. (2003).** Phase variation of Ag43 is independent of the oxidation state of OxyR. *J Bacteriol* **185**, 2203-9.
- Wallecha, A., Munster, V., Correnti, J., Chan, T. und van der Woude, M. (2002).** Dam- and OxyR-dependent phase variation of agn43: essential elements and evidence for a new role of DNA methylation. *J Bacteriol* **184**, 3338-47.
- Wang, L., Jensen, S., Hallman, R. und Reeves, P. R. (1998).** Expression of the O antigen gene cluster is regulated by RfaH through the JUMPstart sequence. *FEMS Microbiol Lett* **165**, 201-6.
- Wassarman, K. M., Repoila, F., Rosenow, C., Storz, G. und Gottesman, S. (2001).** Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays. *Genes Dev* **15**, 1637-1651.
- Watnick, P. und Kolter, R. (2000).** Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* **182**, 2675-9.
- Wegrzyn, G. (2005).** RNA polyadenylation in bacteria: regulation and importance in cell physiology and biotechnology. *Bio Tech International* **17**, 18-21.
- Wegrzyn, G. und Thomas, M. S. (2002).** Modulation of the susceptibility of intestinal bacteria to bacteriophages in response to Ag43 phase variation -- a hypothesis. *Med Sci Monit* **8**, HY15-8.
- Weilbacher, T., Suzuki, K., Dubey, A. K., Wang, X., Gudapaty, S., Morozov, I., Baker, C. S., Georgellis, D., Babitzke, P. und Romeo, T. (2003).** A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **48**, 657-70.
- Welch, R. A., Burland, V., Plunkett, G., Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., Buckles, E. L., Liou, S. R., Boutin, A., Hackett, J., Stroud, D., Mayhew, G. F., Rose, D. J., Zhou, S., Schwartz, D. C., Perna, N. T., Mobley, H. L. T., Sonnenberg, M. S., Blattner, F. R., Welch, R. A., V. Burland, G. D. III Plunkett, P. Redford, P. Roesch, D.A. Rasko, E. L. Buckles, S.-R. L., A. Boutin, J. Hackett, D. Stroud, G. F. Mayhew, D. J., Rose, S. Z., D. C. Schwartz, N. T. Perna, H.L.T. Mobley, M. S. Sonnenberg, complete, a. F. R. B. E. m. s. r. b. t. und USA., g. s. o. u. E. c. P. N. A. S. (2002).** Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 17020-17024.
- Werner, J. und Misra, R. (2005).** YaeT (Omp85) affects the assembly of lipid-dependent and lipid-independent outer membrane proteins of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **57**, 1450-9.

- Whiteley, M., Bangera, M. G., Bumgarner, R. E., Parsek, M. R., Teitzel, G. M., Lory, S. und Greenberg, E. P. (2001).** Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* **413**, 860-4.
- White-Ziegler, C. A., Villapakkam, A., Ronaszeki, K. und Young, S. (2000).** H-NS controls pap and daa fimbrial transcription in *Escherichia coli* in response to multiple environmental cues. *J Bacteriol* **182**, 6391-400.
- Wrobel, B., Herman-Antosiewicz, A., Szalewska-Palasz, S. und Wegrzyn, G. (1998).** Polyadenylation of oop RNA in the regulation of bacteriophage lambda development. *Gene* **212**, 57-65.
- Wu, T., Malinverni, J., Ruiz, N., Kim, S., Silhavy, T. J. und Kahne, D. (2005).** Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*. *Cell* **121**, 235-45.
- Yethon, J. A., Vinogradov, E., Perry, M. B. und Whitfield, C. (2000).** Mutation of the lipopolysaccharide core glycosyltransferase encoded by waaG destabilizes the outer membrane of *Escherichia coli* by interfering with core phosphorylation. *J Bacteriol* **182**, 5620-3.
- Yethon, J. A. und Whitfield, C. (2001).** Purification and characterization of WaaP from *Escherichia coli*, a lipopolysaccharide kinase essential for outer membrane stability. *J Biol Chem* **276**, 5498-504. Epub 2000 Nov 7.
- Young, D., Hussell, T. und Dougan, G. (2002).** Chronic bacterial infections: living with unwanted guests. *Nat Immunol* **3**, 1026-1031.
- Zhang, A., Wassarman, K. M., Rosenow, C., Tjaden, B. C., Storz, G. und Gottesman, S. (2003).** Global analysis of small RNA and mRNA targets of Hfq. *Mol Microbiol* **50**, 1111-1124.
- Zhang, L. H. und Dong, Y. H. (2004).** Quorum sensing and signal interference: diverse implications. *Mol Microbiol* **53**, 1563-71.
- Zhu, J. und Mekalanos, J. J. (2003).** Quorum sensing-dependent biofilms enhance colonization in *Vibrio cholerae*. *Dev Cell* **5**, 647-56.
- Zingler, G., Blum, G., Falkenhagen, U., Orskov, I., Orskov, F., Hacker, J. und Ott, M. (1993).** Clonal differentiation of uropathogenic *Escherichia coli* isolates of serotype O6:K5 by fimbrial antigen typing and DNA long-range mapping techniques. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **182**, 13-24.
- Zingler, G., Ott, M., Blum, G., Falkenhagen, U., Naumann, G., Sokolowska-Kohler, W. und Hacker, J. (1992).** Clonal analysis of *Escherichia coli* serotype O6 strains from urinary tract infections. *Microb Pathog* **12**, 299-310.

IX Anhang

Abkürzungsverzeichnis:

°C	Grad Celsius
A	Adenin/Adenosin
aa	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AIDA-I	„adhesin involved in diffuse adherence“
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
A ...	Adsorption bei ... nm
bp	Basenpaare
BSA	„bovine serum albumine“
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin/Cytidin
c-	Zenti-
ca.	zirka
cat	„chloramphenicol acetyl transferase“
cDNA	komplementäre DNA
Cm	Chloramphenicol
cm	Zentimeter
CNF	„cytotoxic necrotising factor“
C-terminal	Carboxyterminal
d. h.	das heißt
DAEC	diffus-adhärenente <i>E. coli</i>
dATP	2`-Desoxyadenosin-5`-triphosphat
dCTP	2`-Desoxycytidin-5`-triphosphat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
dGTP	2`-Desoxyguanosin-5`-triphosphat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2`-Desoxynukleosid-5`-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2`-Desoxythymidin-5`-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	enteroaggregative <i>E. coli</i>
ECL	„enhanced chemiluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EIEC	enteroinvasive <i>E. coli</i>
EPEC	enteropathogene <i>E. coli</i>
EPS	Exopolysaccharid
et al.	et altera (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
ETEC	enterotoxische <i>E. coli</i>
EtOH	Ethanol
ExPEC	extraintestinal pathogene <i>E. coli</i>
F-Faktor	Fertilitätsfaktor
g	Gramm

G	Guanin/Guanosin
Gal	Galactose
gDNA	(genomische) chromosomale DNA
GEI	Genomische Insel
h	Stunde
H ₂ O _{bidest.}	zweifach destilliertes Wasser
H ₂ O _{dest.}	destilliertes Wasser
HCl	Salzsäure
HPI	„high pathogenicity island“
IPEC	intestinal pathogene <i>E. coli</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
IS	Insertionssequenz
JUMP-start	„just upstream of many polysaccharide genes“
k-	Kilo-
kb	Kilobasenpaare
Km	Kanamycin
KOAc	Kaliumacetat
KOW-Motiv	DNA-Motiv (Akronym nach N.C. <u>K</u> yrpides, C.A. <u>O</u> uzounis und C.R. <u>W</u> oese)
kV	Kilovolt
l	Liter
LB-	Luria-Bertani-
LEE	„locus of enterocyte effacement“
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
m	Meter
M	Molar
m-	Milli-
mA	Milliampere
max.	maximal
Mb	Megabasenpaare
MENEC	Meningitis-auslösende <i>E. coli</i>
mg	Milligramm
min	Minute
min.	minimal
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MOPS-	N-Morpholino-3-propansulfonsäure
mRNA	messenger (Boten)-RNA
MW	Molekulargewicht
n-	Nano-
μ-	Mikro-
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
NaCl	Natriumchlorid
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
N-terminal	Aminoterminal
OD	Optische Dichte
ONPG	ortho-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid
ops	operon polarity suppressor
ORF	Offener Leserahmen („open reading frame“)
p-	Piko-
PAI	Pathogenitätsinsel
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

Ph.D.	„Philosophiae Doctor“
pM	picomolar
RBS	Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoprotein
rNTP	Ribonukleosid-5'-triphosphat
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription PCR
s	Sekunden
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec.	Sekunden
SEPEC	Sepsis-auslösende <i>E. coli</i>
siRNA	small interfering RNA
smRNA	small RNA
srRNA	small regulatory RNA
SSC	„Standard Saline Citrate“
SSH	„suppression subtractive hybridisation“
T	Thymin/Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Tricarbonsäure
TE-	Tris-EDTA-
Tris	Trishydroxylmethylaminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	„unit“ (Enzym-Einheiten)
u. a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
ÜN	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
UPEC	uropathogene <i>E. coli</i>
UTI	Urogenitaltraktinfektion
UV	ultraviolett
V	Volt
v. a.	vor allem
v/v	„volume per volume“
vergl.	vergleiche
Vol.	Volumen
W	Watt
w/v	„weight per volume“
Wt	Wildtyp
x g	x-fache Erdbeschleunigung ($g=9,81 \text{ m/s}^2$)
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-D-Galaktopyranosid
z.B.	zum Beispiel
z.Z.	zur Zeit

Matrix des „Pathoarrays“:

(Teil 1)

"Pathoarray"-Matrix		Teil 1: Spalte 1-10									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	1
2	K12; 40 ng	K12; 40 ng	K12; 40 ng	K12; 40 ng	K12; 20 ng	K12; 20 ng	K12; 20 ng	K12; 20 ng	K12; 10 ng	K12; 10 ng	2
3	K12; 40 ng	K12; 40 ng	K12; 40 ng	K12; 40 ng	K12; 20 ng	K12; 20 ng	K12; 20 ng	K12; 20 ng	K12; 10 ng	K12; 10 ng	3
4	K12; 40 ng	K12; 40 ng	K12; 40 ng	K12; 40 ng	K12; 20 ng	K12; 20 ng	K12; 20 ng	K12; 20 ng	K12; 10 ng	K12; 10 ng	4
5	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	5
6	ipaA	ipaA	int sfx	int sfx	ipaD	ipaD	xis sfx	xis sfx	ipaC	ipaC	6
7	ohne	ohne	stx1a	stx1a	ohne	ohne	stx1b	stx1b	ohne	ohne	7
8	Pai2 int B	Pai2 int B	Pai1 ORF1	Pai1 ORF1	Pai2 yjHr	Pai2 yjHr	Pai1 ORF4	Pai1 ORF4	Pai2 yjHw	Pai2 yjHw	8
9	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	9
10	shiA	shiA	Pai3 ORF7	Pai3 ORF7	shiB	shiB	Pai3 ORF8	Pai3 ORF8	shiC	shiC	10
11	int P4	int P4	escC	escC	ybtS	ybtS	escN	escN	ybtX	ybtX	11
12	prsD	prsD	Pai1 ORF19a	Pai1 ORF19a	papC	papC	Pai1 ORF21	Pai1 ORF21	prsH	prsH	12
13	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	13
14	cnf 1	cnf 1	iroN	iroN	cnf 2	cnf 2	iroN (2)	iroN (2)	cdtA	cdtA	14
15	shiA	shiA	Z4196	Z4196	shiB	shiB	Z1542	Z1542	shiC	shiC	15
16	HecA	HecA	Pai1 ORF33	Pai1 ORF33	dsdA	dsdA	Pai1 ORF35	Pai1 ORF35	dsdX	dsdX	16
17	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	17
18	afa D	afa D	Pai3 ORF14	Pai3 ORF14	afa E	afa E	Pai3 ORF15	Pai3 ORF15	afa E2	afa E2	18
19	intA	intA	tir	tir	KM int	KM int	eae	eae	ipaA	ipaA	19
20	Pai2 Orf_B	Pai2 Orf_B	Pai1 ORF53	Pai1 ORF53	Pai2 TnpE	Pai2 TnpE	Pai1 ORF54	Pai1 ORF54	patB	patB	20
21	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	21
22	chuA	chuA	Pai3 ORF26	Pai3 ORF26	iucA	iucA	Pai3 ORF27	Pai3 ORF27	iucB	iucB	22
23	virG	virG	espl	espl	senA	senA	espP	espP	pic	pic	23
24	L0009	L0009	Pai1 ORF67	Pai1 ORF67	NaI/H- anti	NaI/H- anti	Pai1 ORF68	Pai1 ORF68	o273	o273	24
25	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	25
26	malX	malX	ORF 3.1.	ORF 3.1.	r1	r1	3-Häm.prot.	3-Häm.prot.	cloachinDF13	cloachinDF13	26
27	Tsh Mix	Tsh Mix	cotA	cotA	Tsh 933	Tsh 933	CS3	CS3	Tsh EB1	Tsh EB1	27
28	Pai5 kps F	Pai5 kps F	Pai1 Δ int a	Pai1 Δ int a	Pai5 kps E	Pai5 kps E	Pai1 Δ int b	Pai1 Δ int b	Pai5 kps D	Pai5 kps D	28
29	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	29
30	kpsX	kpsX	papI	papI	neuD	neuD	papB	papB	neuB	neuB	30
31	K12; 40 ng	K12; 40 ng	Ing A	Ing A	K12; 20 ng	K12; 20 ng	leoA	leoA	K12; 10 ng	K12; 10 ng	31
32	pcdA	pcdA	int P	int P	pcdB	pcdB	ybtS	ybtS	sfa	sfa	32
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

Matrix des „Pathoarrays“:

(Teil 2)

"Pathoarray"-Matrix		Teil 2: Spalte 11-20										
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
1	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	1	
2	K12; 10 ng	K12; 10 ng	C.a.; 40 ng	C.a.; 40 ng	C.a.; 40 ng	C.a.; 40 ng	C.a.; 20 ng	C.a.; 20 ng	C.a.; 20 ng	C.a.; 20 ng	2	
3	K12; 10 ng	K12; 10 ng	C.a.; 40 ng	C.a.; 40 ng	C.a.; 40 ng	C.a.; 40 ng	C.a.; 20 ng	C.a.; 20 ng	C.a.; 20 ng	C.a.; 20 ng	3	
4	K12; 10 ng	K12; 10 ng	C.a.; 40 ng	C.a.; 40 ng	C.a.; 40 ng	C.a.; 40 ng	C.a.; 20 ng	C.a.; 20 ng	C.a.; 20 ng	C.a.; 20 ng	4	
5	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	5	
6	y1093	y1093	ipaB	ipaB	y1094	y1094	mxIA	mxIA	3-ORF1 PifA	3-ORF1 PifA	6	
7	stx2a	stx2a	fimB	fimB	stx2b	stx2b	fimE	fimE	EHEC hlyA	EHEC hlyA	7	
8	Pai1 ORF6	Pai1 ORF6	Pai2 yjhX	Pai2 yjhX	Pai1 ORF7	Pai1 ORF7	Pai2 yjhY	Pai2 yjhY	Pai1 ORF8	Pai1 ORF8	8	
9	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	9	
10	sfaC	sfaC	shID	shID	sfaB	sfaB	shiE	shiE	sfaA	sfaA	10	
11	tir	tir	ybtQ	ybtQ	eae	eae	ybtP	ybtP	espA	espA	11	
12	Pai1 ORF23	Pai1 ORF23	prfA	prfA	Pai1 ORF24	Pai1 ORF24	prfB	prfB	Pai1 ORF25	Pai1 ORF25	12	
13	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	13	
14	iroE	iroE	cdtB	cdtB	iroD	iroD	cdtC	cdtC	iroC	iroC	14	
15	RTx exo	RTx exo	shID	shID	Z0250	Z0250	shiE	shiE	Z4852	Z4852	15	
16	Pai1 ORF36	Pai1 ORF36	dsdC	dsdC	Pai1 ORF37	Pai1 ORF37	hyp.Prot.2.1	hyp.Prot.2.1	hlyC	hlyC	16	
17	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	17	
18	Pai3 ORF16	Pai3 ORF16	afa E3	afa E3	Pai3 ORF17	Pai3 ORF17	afa E5	afa E5	Pai3 ORF18	Pai3 ORF18	18	
19	espA	espA	ipaD	ipaD	espD	espD	ipaC	ipaC	espB	espB	19	
20	y1094	y1094	y1093	y1093	y1093	y1093	y1094	y1094	Pai1 ORF57	Pai1 ORF57	20	
21	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	21	
22	Pai3 ORF28	Pai3 ORF28	iucC	iucC	Pai3 ORF29	Pai3 ORF29	iucD	iucD	Pai3 ORF30	Pai3 ORF30	22	
23	btuB	btuB	ohne	ohne	dafaD	dafaD	sap	sap	tia	tia	23	
24	Pai1 ORF69	Pai1 ORF69	yeeS	yeeS	yeeT	yeeT	yeeU	yeeU	L0007	L0007	24	
25	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	25	
26	3-Δ prsX	3-Δ prsX	intA	intA	3-Δ AJ278144	3-Δ AJ278144	kpsM	kpsM	3-Δ int S.dys	3-Δ int S.dys	26	
27	ohne	ohne	Ser.prot. Mix	Ser.prot. Mix	cofA	cofA	Ser.prot. 933	Ser.prot. 933	ohne	ohne	27	
28	ohne	ohne	Pai5 kps U	Pai5 kps U	fimB	fimB	Pai5 kps C	Pai5 kps C	fimE	fimE	28	
29	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	29	
30	papA	papA	neuA2	neuA2	papH	papH	neuA	neuA	papC	papC	30	
31	F17a A	F17a A	C.a.; 40 ng	C.a.; 40 ng	ohne	ohne	C.a.; 20 ng	C.a.; 20 ng	pic	pic	31	
32	ybtX	ybtX	eaeH	eaeH	ybtQ	ybtQ	rpoS	rpoS	ybtP	ybtP	32	
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		

Oligonukleotide:**Primer für die RT-PCR-Analysen:**

Name	Sequenz	"target"-Gen	PCR-Produktgröße	Applikation
KM rrsH f	CAG AAG AAG CAC CGG CTA AC	<i>rrsH</i>	797 bp	mRNA-Quantifizierung
KM rrsH r	TTA TGA GGT CCG CTT GCT CT			(Kontrolle)
KM rfaH f	CCA GGA ACA CCT CGA AAG AC	<i>rfaH</i>	429 bp	mRNA-Quantifizierung
KM rfaH r	CGG AAC TCG GTG TTC TTC AC			
KM oxyR f	CTG CGT GAG GTG AAA GTC CT	<i>oxyR</i>	614 bp	mRNA-Quantifizierung
KM oxyR r	GAG CCA GGA CGA TAA ACC AG			
KM-dam-f	GCA AGT ATC CCC TGC TTG AT	<i>dam</i>	631 bp	mRNA-Quantifizierung
KM-dam-r	ACT GGA ATA TGG CGC TCA AC			
KM-Ag43 fwd	GCT GAC ACA GGC AAT GGA C	<i>agn43</i>	590 bp	mRNA-Quantifizierung
KM-Ag43 rev	TGC CCG AAC TTC ACA TAA CC			
KM-Ag43 RT	ACG CAC ATG TTG TGC ACT G	<i>agn43</i> Varianten	-	cDNA-Synthese

Primer für die Erzeugung der *rfaH*-Derivate nach (Datsenko und Wanner, 2000):(fett-gedruckt ist die Homologie zur *cat*-Kassette)

Name	Sequenz	"target"-Gen	PCR-Produktgröße	Applikation
rfaH_k.o._f	ATG CAA TCC TGG TAT TTA CTG TAC TGC AAA CGC GGG CAA CTT CAG CGT GCT CAG GAA CAC CTC GTG TAG GCT GGA GCT GCT T	<i>rfaH</i>	ca. 0,9 kb	<i>rfaH</i> -Mutation
rfaH_k.o._r	TTG CGA AAA CCG GTG TTT TTT ACG CTC TGC TTC ACT TCT TTA TTG AGT AAA TTA AGC ATA TGA ATA TCC TCC TTA GTT CCT A			

Primer für die Erzeugung der „targeting“-Plasmide für die *agn43::lacZ*-Reporterfusionen:

Name	Sequenz	"target"-Gen	PCR-Produktgröße	Applikation
apa_sap3_5'f	AAC GGG CCC GCG CAC GGG GTA AAC GT	<i>agn43</i> _{PAI III}	997 bp	N-terminaler Bereich
not_sap3_5'r	GTG CCG CCG CTC AGC ACA TCC AGA CGT			für Plasmid pKM03-1-A/N
sal_sap3+5_3'f	AGG GTC GAC TGG AAG CCC GTG TCC	<i>agn43</i> _{PAI III}	1337 bp	C-terminaler Bereich
sac_sap3_3'r	TGA GCT CAA GAA TGC CTG GGG ACT GAT			für Plasmid pKM03-3-S/S
apa_sap5_5'f	AAC GGG CCC GCT CAC GGG GAA AAC GC	<i>agn43</i> _{PAI V}	994 bp	N-terminaler Bereich
not_sap5_5'r	GAG CCG CCG CCC AGT ACA TCC AGG CGA			für Plasmid pKM03-2-A/N
sal_sap3+5_3'f	AGG GTC GAC TGG AAG CCC GTG TCC	<i>agn43</i> _{PAI V}	1407 bp	C-terminaler Bereich
sac_sap5_3'r	TGA GCT CAA GAA TGT CCG GAG GCA GGG			für Plasmid pKM03-4-S/S
not_pJB20_f	AGG CCG CCG CAT TAC ACG TCT TGA GCG	<i>lacZ-cat</i>	4178 bp	Reporter-gen-Kassette
sal_pJB20_r	ACG GTC GAC ATG GGA ATT AGC CAT GG			für Plasmid pKM03-5-N/S

Die Primer für die Sonden des „Pathoarrays“:sind im Internet unter <http://www.uni-wuerzburg.de/infektionsbiologie> zu finden.

Referenz: Dobrindt, U., Agerer, F., Michaelis, K., Janka, A., Buchrieser, C., Samuelson, M., Svanborg, C., Gottschalk, G., Karch, H. & Hacker, J. (2003). Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays. *J Bacteriol* **185**, 1831-40.

Vergleich von 536 mit 536-21 (Genlisten)

Auflistung der 221 Sonden, die spezifisch für 536 waren:

Nr.	Sonde	Signal	Nr.	Sonde	Signal	Nr.	Sonde	Signal	Nr.	Sonde	Signal
1	hlyB (1)	27382	65	papD (1)	10393	129	Pai1 ORF16 (2)	8498	193	papK (1)	6528
2	hlyB (4)	27052	66	IS1203 B1 (1)	10329	130	Pai1 ORF57 (1)	8454	194	Pai2 12.7 kD (2)	6450
3	hlyB (2)	26997	67	yeeU (1)	10299	131	L0007 (2)	8425	195	dsdA (2)	6448
4	hlyB (3)	26351	68	IS1203 B1 (2)	10295	132	HecB (2)	8343	196	Pai1 CH3 trans2 (6446
5	KM-L0015 (1)	22041	69	Pai2 yjhW (1)	10271	133	papB (1)	8338	197	hyp.Prot.2.1 (1)	6291
6	KM-L0015 (2)	21782	70	Pai1 ORF28 (2)	10218	134	Pai2 ORF01 (1)	8276	198	eaeH (2)	6230
7	KM-L0015 (4)	21524	71	Pai1 CH3 trans1 (10207	135	Pai1 ORF S.t. (2)	8266	199	papK (2)	6225
8	hlyD (2) (2)	20412	72	yeeT (2)	10162	136	Pai1 ORF57 (2)	8245	200	hyp.Prot.2.1 (2)	6073
9	KM-L0015 (3)	20070	73	Pai2 yjhW (2)	10130	137	papH (2)	8224	201	Pai2 Orf_B (2)	6057
10	Pai1 ORF19a (2)	19723	74	Pai1 ORF27 (2)	10021	138	papB (2)	8219	202	dsdC (1)	6006
11	hlyD (2) (1)	19479	75	papD (2)	10003	139	Pai1 D int a (1)	8186	203	Pai1 ORF7 (1)	5917
12	Pai1 ORF19a (1)	19323	76	hlyA (2)	9939	140	Pai3 ORF6 (2)	8167	204	Pai1 ORF7 (2)	5859
13	Pai1 ORF31 (2)	18878	77	Pai1 ORF26 (2)	9938	141	HecB (1)	8164	205	irp5 (4)	5810
14	Pai1 ORF31 (1)	18770	78	Pai1 ORF26 (1)	9927	142	L0007 (4)	8079	206	eaeH (1)	5801
15	hlyA (1)	17450	79	Pai1 ORF4 (2)	9920	143	papH (1)	8038	207	hra (1)	5782
16	ORF 3.1. (2)	16551	80	Pai1 ORF53 (1)	9919	144	Pai2 yjhY (1)	8009	208	PfiC (1)	5779
17	hlyD (6)	16399	81	prfA (2)	9914	145	dsdX (2)	7961	209	ybtX (4)	5640
18	ORF 3.1. (1)	16103	82	Pai2 yjhR (2)	9883	146	Pai2 ORF02 (1)	7956	210	Pai1 SapB (2)	5560
19	hlyD (5)	15902	83	Pai1 ORF28 (1)	9820	147	Pai2 ORF02 (2)	7947	211	IS1203 A1 (2)	5460
20	Pai1 ORF64 (2)	15608	84	hlyC (3)	9812	148	hlyA (4)	7889	212	Pai1 SapB (1)	5433
21	Pai1 ORF12 (1)	15279	85	Pai1 ORF48 (1)	9771	149	papJ (2)	7873	213	PfiC (2)	5402
22	Pai1 ORF12 (2)	15141	86	prfA (1)	9736	150	Pai1 ORF S.t. (1)	7865	214	L0014 (2)	5369
23	Pai1 ORF65 (1)	15007	87	Pai1 ORF53 (2)	9694	151	ybtQ (4)	7821	215	L0014 (1)	5340
24	Pai1 ORF29 (1)	14697	88	Pai1 ORF4 (1)	9645	152	hyp.Prot.3.1. (2)	7701	216	dsdC (2)	5329
25	Pai1 ORF62 (1)	14544	89	Pai1 ORF16 (1)	9613	153	dsdX (1)	7597	217	KM sapB (1)	5278
26	Pai1 ORF18a (1)	14472	90	Pai1 ORF27 (1)	9605	154	Pai2 Orf_B (1)	7584	218	KM sapB (2)	5174
27	Pai1 ORF64 (1)	14425	91	prsJ (1)	9581	155	Pai1 ORF30 (1)	7581	219	IS1203 A1 (1)	5164
28	Pai1 ORF65 (2)	14151	92	Pai1 ORF48 (2)	9565	156	prsE (2)	7543	220	ybtX (3)	4775
29	Pai1 ORF62 (2)	13929	93	Pai1 ORF3 (2)	9536	157	Pai2 yjhY (2)	7534	221	Pai1 CH3 trans1 (4748
30	Pai1 ORF14 (1)	13773	94	Pai2 yjhX (2)	9531	158	Häm.prot.Mix (2)	7521			
31	Pai1 ORF43 (1)	13716	95	prsF (1)	9498	159	PfiD (2)	7509			
32	Pai1 ORF18a (2)	13632	96	Pai1 ORF35 (1)	9481	160	Pai1 ORF25 (1)	7486			
33	Pai1 ORF21 (1)	13526	97	hlyC (4)	9481	161	Pai1 ORF32 (2)	7424			
34	Pai1 ORF6 (2)	13499	98	Pai1 ORF3 (1)	9426	162	3- D int S.dys. (1)	7409			
35	Pai1 ORF14 (2)	13474	99	prsF (2)	9426	163	Pai1 ORF5 (1)	7403			
36	hlyD (1)	13423	100	prsJ (2)	9379	164	PfiD (1)	7379			
37	Pai1 ORF29 (2)	13126	101	Pai2 yjhX (1)	9376	165	Häm.prot.Mix (1)	7356			
38	Pai1 ORF63 (1)	13011	102	yeeT (1)	9316	166	Pai1 ORF30 (2)	7346			
39	hlyD (3)	12976	103	Pai1 ORF32 (1)	9243	167	Häm.prot.536 (1)	7338			
40	hlyD (2)	12926	104	Pai1 ORF35 (2)	9215	168	Häm.prot.536 (2)	7304			
41	Pai1 ORF21 (2)	12885	105	hlyA (3)	9204	169	Pai2 TnpE (1)	7300			
42	Pai1 ORF6 (1)	12667	106	shiB (3)	9184	170	patB (1)	7297			
43	papC (1)	12590	107	prsG (1)	9165	171	patB (2)	7280			
44	papC (2)	12500	108	prfB (2)	9093	172	Pai3 ORF13 (2)	7199			
45	Pai1 ORF43 (2)	12253	109	Pai1 ORF24 (1)	9085	173	prsE (1)	7190			
46	Pai1 ORF2 (2)	11767	110	papJ (1)	9076	174	shiB (2)	7158			
47	Pai1 ORF36 (1)	11720	111	yfiR (1)	9062	175	Pai2 IS2A (1)	7125			
48	Pai1 ORF63 (2)	11672	112	yfiR (2)	9009	176	prsK (1)	7122			
49	hlyC (1)	11632	113	papC (3)	8969	177	Pai2 TnpE (2)	7064			
50	Pai1 ORF11 (1)	11613	114	shiB (4)	8936	178	Pai1 ORF25 (2)	7014			
51	hlyD (4)	11575	115	Pai2 ORF03 (1)	8933	179	prsH (2)	7002			
52	Pai1 ORF36 (2)	11539	116	Pai2 ORF03 (2)	8933	180	prsK (2)	6941			
53	Pai1 ORF11 (2)	11404	117	Pai2 ORF01 (2)	8915	181	3- D int S.dys. (2)	6940			
54	Pai1 ORF59 (1)	11151	118	Pai1 ORF37 (2)	8914	182	Pai2 IS2A (2)	6915			
55	yeeU (2)	11027	119	prsG (2)	8895	183	papF (1)	6875			
56	Pai3 17kDa (2)	11013	120	Pai1 ORF37 (1)	8810	184	ybtQ (3)	6868			
57	Pai1 ORF2 (1)	10980	121	Pai1 D int a (2)	8706	185	Pai1 ORF5 (2)	6842			
58	o289 (1)	10903	122	Pai3 ORF13 (1)	8678	186	dsdA (1)	6838			
59	Pai1 ORF59 (2)	10848	123	L0007 (1)	8673	187	shiB (1)	6820			
60	Na/H- anti (2)	10746	124	Pai1 D int b (2)	8638	188	Pai2 12.7 kD (1)	6721			
61	o289 (2)	10729	125	Pai1 ORF24 (2)	8617	189	hra (2)	6664			
62	Pai2 yjhR (1)	10518	126	papC (4)	8612	190	Pai1 CH3 trans2 (6633			
63	hlyC (2)	10471	127	prfB (1)	8534	191	papF (2)	6581			
64	Na/H- anti (1)	10425	128	Pai1 D int b (1)	8525	192	prsH (1)	6558			

Vergleich von 536 mit 536-21 (Genlisten)

Auflistung der 244 Sonden, die spezifisch für beide Stämme waren:

Nr.	Sonde	Signal	Nr.	Sonde	Signal	Nr.	Sonde	Signal	Nr.	Sonde	Signal
1	Pai3 ORF16	32588	65	Pai3 ORF31 (2)	12719	129	yeeT (4)	8386	193	ybtP (2)	7058
2	Pai3ORF16	32414	66	L0008 (1)	12675	130	rfaH (1)	8376	194	yc73 (2)	6976
3	Pai3 ORF15	32306	67	Pai3 ORF28 (1)	12590	131	sap (1)	8342	195	irp4 (1)	6934
4	Pai3ORF15	31958	68	y1093 (3)	12588	132	Pai3ORF14	8308	196	cvaB (2)	6906
5	Pai1 ORF68 (1)	27632	69	AIDA (1)	12552	133	sfaD (1)	8234	197	modD (1)	6889
6	Pai1 ORF68 (2)	27472	70	Pai3ORF19	12448	134	irp3 (2)	8170	198	Pai3 ORF26 (1)	6871
7	y1093 (2)	27180	71	AIDA (2)	12392	135	colicV (1)	8154	199	Pai3 ORF9 (2)	6855
8	Pai1 ORF45 (1)	25599	72	Pai3 ORF19	12388	136	prfl (1)	8151	200	modD (2)	6833
9	Pai1 ORF45 (2)	25262	73	Pai3 ORF28 (2)	12318	137	3- D AJ278144 (2)	8126	201	Pai5 ORF02 (2)	6787
10	y1093 (1)	25015	74	Pai3 17kDa (1)	11630	138	Pai3 ORF27 (2)	8115	202	Pai3 ORF9 (1)	6756
11	Pai3ORF29 (1)	23114	75	Pai3- D yi41 (2)	11472	139	irp3 (1)	8080	203	fepC (2)	6732
12	Pai3 ORF29 (2)	22776	76	y1093 (5)	11432	140	colicV (2)	8017	204	3-ORF5 yprB (1)	6712
13	y1094 (1)	21144	77	Pai3- D yi41 (1)	11399	141	L0007 (3)	8005	205	xis sfx (2)	6686
14	y1094 (5)	20892	78	y1093 (6)	11392	142	psn (2)	7986	206	psn (4)	6644
15	y1094 (2)	20858	79	iroN (2)	10934	143	wzy 536 (1)	7919	207	3-ORF5 yprB (2)	6631
16	y1094 (6)	20616	80	Pai3 ORF11 (1)	10817	144	wzy 536 (2)	7916	208	cvaB (1)	6527
17	Pai1 ORF33 (2)	20562	81	Pai3 ORF17	10777	145	Pai5 ORF05 (2)	7904	209	Pai3 ORF10 (2)	6432
18	Pai1 ORF33 (1)	20433	82	sfaF (1)	10719	146	Pai3 ORF25	7897	210	yc73 (1)	6422
19	Pai1 ORF76 (2)	20403	83	iroN (1)	10610	147	prpA (2)	7854	211	fepC (1)	6359
20	Pai1 ORF76 (1)	20362	84	Pai3 ORF8 (1)	10595	148	int sfx (1)	7842	212	pcdB (2)	6324
21	y1094 (3)	20156	85	sfaB (2)	10578	149	3- D AJ278144 (1)	7811	213	kpsD (1)	6310
22	y1094 (4)	19565	86	sfaF (2)	10571	150	pcdA (1)	7781	214	kpsD (2)	6221
23	Pai1 ORF67 (1)	19280	87	Pai3 ORF11 (2)	10497	151	Pai5 kpsSK5 (1)	7768	215	Pai5 ORF03 (1)	6189
24	Pai1 ORF67 (2)	19230	88	Pai3ORF17	10496	152	Pai3 ORF23	7757	216	usp (1)	6039
25	Pai1 ORF69 (1)	18706	89	3-ORF1 PifA (1)	10424	153	sfaA (1)	7711	217	Pai3 ORF18	5922
26	Pai3 ORF30 (2)	18639	90	sfaG (2)	10272	154	r3 (2)	7709	218	iroE (2)	5909
27	Pai1 ORF1 (2)	18573	91	y1093 (4)	10218	155	papI (1)	7708	219	Pai3ORF18	5881
28	Pai3 ORF30 (1)	17922	92	irp1 (1)	10172	156	prpA (1)	7705	220	Pai3 ORF10 (1)	5878
29	Pai1 ORF1 (1)	17842	93	irp1 (2)	10107	157	dahP (2)	7690	221	iroE (1)	5871
30	Loo08 (2)	17468	94	3-ORF1 PifA (2)	10047	158	Pai3ORF21	7669	222	microV (2)	5861
31	Pai1 ORF23 (2)	17156	95	sfaG (1)	9960	159	sfaA (2)	7658	223	Pai5 ORF04 (1)	5763
32	Loo08 (1)	17018	96	sfaB (1)	9915	160	iroN (2) (1)	7602	224	kpsE (2)	5763
33	17 kDa (1)	16645	97	ybtA (1)	9866	161	Pai5 kpsSK5 (2)	7581	225	Pai5 ORF03 (2)	5755
34	Pai1 ORF69 (2)	16593	98	ybtA (2)	9792	162	Pai3ORF23	7575	226	Pai5 ORF04 (2)	5698
35	17 kDa (2)	16480	99	sfaH (1)	9787	163	r3 (1)	7556	227	r1 (1)	5661
36	o273 (1)	16021	100	Pai3 ORF8 (2)	9773	164	Pai5 kps D (1)	7545	228	usp (2)	5641
37	o273 (2)	15904	101	L0008 (4)	9701	165	Pai3 ORF21	7530	229	r1 (2)	5640
38	Pai1 ORF44 (1)	15329	102	LPS R1 (2)	9672	166	Pai5 ORF05 (1)	7506	230	microV (1)	5580
39	o152 (2)	15309	103	LPS R1 (1)	9632	167	pcdA (2)	7503	231	Pai5 ORF01 (1)	5524
40	yeeS (1)	15095	104	L0008 (3)	9627	168	ybtX (1)	7489	232	Pai5 kps U (2)	5419
41	Pai1 ORF44 (2)	15061	105	Pai5 kpsSK10 (2)	9253	169	Pai3 ORF33 (1)	7472	233	Pai5 kps U (1)	5391
42	o152 (1)	14990	106	sfaC (2)	9247	170	int sfx (2)	7467	234	Pai3 ORF6 (1)	5385
43	yeeS (2)	14798	107	sfaH (2)	9161	171	papI (2)	7465	235	kpsE (1)	5355
44	Pai3 ORF32 (1)	14708	108	ybtQ (2)	9132	172	ybtX (2)	7451	236	iroC (1)	5348
45	Pai3 ORF32 (2)	14569	109	ybtQ (1)	9114	173	dahP (1)	7386	237	pcdB (1)	5338
46	wzy DSM (2)	14441	110	TnpA (2)	9086	174	irp5 (2)	7377	238	iroD (1)	5250
47	Pai3 ORF24	14356	111	Pai3ORF25	9063	175	iroN (2) (2)	7374	239	iroC (2)	5222
48	Pai3 ORF7 (2)	14345	112	Pai5 kpsSK10 (1)	9029	176	Pai5 ORF02 (1)	7366	240	kpsU (2)	4968
49	Pai3 ORF12 (2)	14338	113	sfaD (2)	9016	177	Pai3 ORF33 (2)	7357	241	kpsU (1)	4918
50	Pai3 ORF12 (1)	14286	114	Pai3 ORF14	8977	178	ybtP (1)	7341	242	irp2 (4)	4876
51	Loo07 (1)	14250	115	kpsM (1)	8954	179	irp2 (1)	7337	243	iroD (2)	4774
52	Pai3 ORF7 (1)	14207	116	TnpA (1)	8915	180	Pai3 ORF26 (2)	7319	244	3- D prsX (1)	4658
53	Pai1 ORF54 (1)	13908	117	kpsM (2)	8867	181	sfaE (1)	7266			
54	Pai1 ORF54 (2)	13882	118	sap (2)	8865	182	Pai3- iroB (1)	7214			
55	Pai3ORF24	13604	119	sfaC (1)	8730	183	psn (1)	7195			
56	Loo07 (2)	13556	120	sfaS (2)	8668	184	psn (3)	7181			
57	Pai3 ORF34	13473	121	kpsT (2)	8632	185	Pai5 kps D (2)	7152			
58	wzy DSM (1)	13355	122	Pai3 ORF27 (1)	8616	186	irp2 (2)	7142			
59	Pai1 ORF23 (1)	13273	123	ybtS (2)	8574	187	Pai3- iroB (2)	7141			
60	3-Loo1o (2)	12890	124	yeeT (3)	8569	188	irp5 (1)	7122			
61	3-Loo1o (1)	12885	125	prfl (2)	8548	189	sfaE (2)	7085			
62	Pai3ORF34	12880	126	sfaS (1)	8534	190	irp4 (2)	7061			
63	L0008 (2)	12856	127	kpsT (1)	8476	191	rfaH (2)	7060			
64	Pai3 ORF31 (1)	12843	128	ybtS (1)	8472	192	xis sfx (1)	7059			

Vergleich von 536 mit 536-21

Auflistung der 29 Sonden, die spezifisch für 536-21 waren:

Nr.	Sonde	Signal
1	chuA (1)	9469
2	ybtA (4)	7824
3	ybtA (3)	7488
4	malX (1)	6941
5	chuA (2)	6592
6	lacZ (1)	6351
7	Pai5 kps F (1)	6059
8	sap (3)	5897
9	Pai5 kps F (2)	5836
10	int P4 (2)	5635
11	ybtS (4)	5517
12	ybtS (3)	5351
13	int P4 (1)	5110
14	sap (4)	4744
15	irp2 (3)	4439
16	malX (2)	3903
17	ybtP (4)	3890
18	Pai5 kps C (2)	3717
19	Pai5 ORF01 (2)	3630
20	Pai5 kps E (2)	3558
21	sfa (1)	3537
22	Pai5 kps E (1)	3431
23	kpsF (1)	3266
24	Pai5 kps C (1)	3217
25	lacZ (2)	3099
26	3- D prsX (2)	3092
27	kpsF (2)	3059
28	L0009 (1)	3031
29	irp1 (4)	2894

Vergleich von 536, EDL 933 und MG1655Auflistung der 334 Sonden, die nur spezifisch für 536 waren:

Nr.	Sonde	Signal	Nr.	Sonde	Signal	Nr.	Sonde	Signal	Nr.	Sonde	Signal
1	yeeT (2)	10162	65	psn (1)	7195	129	Pai3ORF24	13604	193	Pai1 ORF35 (1)	9481
2	yeeT (1)	9316	66	prsK (2)	6941	130	Pai3ORF23	7575	194	Pai1 ORF33 (2)	20562
3	ybtX (4)	5640	67	prsK (1)	7122	131	Pai3ORF21	7669	195	Pai1 ORF33 (1)	20433
4	ybtX (3)	4775	68	prsJ (2)	9379	132	Pai3ORF17	10496	196	Pai1 ORF32 (2)	7424
5	ybtX (2)	7451	69	prsJ (1)	9581	133	Pai3ORF16	32414	197	Pai1 ORF32 (1)	9243
6	ybtX (1)	7489	70	prsH (2)	7002	134	Pai3ORF15	31958	198	Pai1 ORF31 (2)	18878
7	ybtS (2)	8574	71	prsH (1)	6558	135	Pai3 ORF9 (2)	6855	199	Pai1 ORF31 (1)	18770
8	ybtS (1)	8472	72	prsG (2)	8895	136	Pai3 ORF9 (1)	6756	200	Pai1 ORF30 (2)	7346
9	ybtQ (4)	7821	73	prsG (1)	9165	137	Pai3 ORF31 (1)	12843	201	Pai1 ORF30 (1)	7581
10	ybtQ (3)	6868	74	prsF (2)	9426	138	Pai3 ORF25	7897	202	Pai1 ORF3 (2)	9536
11	ybtQ (2)	9132	75	prsF (1)	9498	139	Pai3 ORF23	7757	203	Pai1 ORF3 (1)	9426
12	ybtQ (1)	9114	76	prsE (2)	7543	140	Pai3 ORF21	7530	204	Pai1 ORF29 (2)	13126
13	ybtP (2)	7058	77	prsE (1)	7190	141	Pai3 ORF17	10777	205	Pai1 ORF29 (1)	14697
14	ybtP (1)	7341	78	prfI (2)	8548	142	Pai3 ORF16	32588	206	Pai1 ORF28 (2)	10218
15	ybtA (2)	9792	79	prfI (1)	8151	143	Pai3 ORF15	32306	207	Pai1 ORF28 (1)	9820
16	ybtA (1)	9866	80	prfB (2)	9093	144	Pai3 ORF14	8977	208	Pai1 ORF27 (2)	10021
17	y1094 (5)	20892	81	prfB (1)	8534	145	Pai3 ORF13 (2)	7199	209	Pai1 ORF27 (1)	9605
18	y1094 (4)	19565	82	prfA (2)	9914	146	Pai3 ORF13 (1)	8678	210	Pai1 ORF26 (2)	9938
19	y1094 (3)	20156	83	prfA (1)	9736	147	Pai3 ORF12 (2)	14338	211	Pai1 ORF26 (1)	9927
20	y1094 (2)	20858	84	PfiD (2)	7509	148	Pai3 ORF12 (1)	14286	212	Pai1 ORF25 (2)	7014
21	y1094 (1)	21144	85	PfiD (1)	7379	149	Pai3- iroB (2)	7141	213	Pai1 ORF25 (1)	7486
22	y1093 (6)	11392	86	PfiC (2)	5402	150	Pai3- iroB (1)	7214	214	Pai1 ORF24 (2)	8617
23	y1093 (5)	11432	87	PfiC (1)	5779	151	Pai3 17kDa (2)	11013	215	Pai1 ORF24 (1)	9085
24	y1093 (4)	10218	88	pcdB (2)	6324	152	Pai3 17kDa (1)	11630	216	Pai1 ORF21 (2)	12885
25	y1093 (3)	12588	89	pcdB (1)	5338	153	Pai2 yjhY (2)	7534	217	Pai1 ORF21 (1)	13526
26	y1093 (2)	27180	90	pcdA (2)	7503	154	Pai2 yjhY (1)	8009	218	Pai1 ORF2 (2)	11767
27	y1093 (1)	25015	91	pcdA (1)	7781	155	Pai2 yjhR (2)	9883	219	Pai1 ORF2 (1)	10980
28	xis sfx (2)	6686	92	patB (2)	7280	156	Pai2 yjhR (1)	10518	220	Pai1 ORF19a (2)	19723
29	xis sfx (1)	7059	93	patB (1)	7297	157	Pai2 ORF03 (2)	8933	221	Pai1 ORF19a (1)	19323
30	wzy DSM (2)	14441	94	papK (2)	6225	158	Pai2 ORF03 (1)	8933	222	Pai1 ORF18a (2)	13632
31	wzy DSM (1)	13355	95	papK (1)	6528	159	Pai2 ORF02 (2)	7947	223	Pai1 ORF18a (1)	14472
32	wzy 536 (2)	7916	96	papJ (2)	7873	160	Pai2 ORF02 (1)	7956	224	Pai1 ORF16 (2)	8498
33	wzy 536 (1)	7919	97	papJ (1)	9076	161	Pai2 ORF01 (2)	8915	225	Pai1 ORF16 (1)	9613
34	usp (2)	5641	98	papI (2)	7465	162	Pai2 ORF01 (1)	8276	226	Pai1 ORF14 (2)	13474
35	usp (1)	6039	99	papI (1)	7708	163	Pai2 12.7 kD (2)	6450	227	Pai1 ORF14 (1)	13773
36	shiB (4)	8936	100	papH (2)	8224	164	Pai2 12.7 kD (1)	6721	228	Pai1 ORF12 (2)	15141
37	shiB (3)	9184	101	papH (1)	8038	165	Pai1 SapB (2)	5560	229	Pai1 ORF12 (1)	15279
38	shiB (2)	7158	102	papF (2)	6581	166	Pai1 SapB (1)	5433	230	Pai1 ORF11 (2)	11404
39	shiB (1)	6820	103	papF (1)	6875	167	Pai1 ORF7 (2)	5859	231	Pai1 ORF11 (1)	11613
40	sfaS (2)	8668	104	papD (2)	10003	168	Pai1 ORF7 (1)	5917	232	Pai1 ORF1 (2)	18573
41	sfaS (1)	8534	105	papD (1)	10393	169	Pai1 ORF65 (2)	14151	233	Pai1 ORF1 (1)	17842
42	sfaH (2)	9161	106	papC (4)	8612	170	Pai1 ORF65 (1)	15007	234	Pai1 ORF S.t. (2)	8266
43	sfaH (1)	9787	107	papC (3)	8969	171	Pai1 ORF64 (1)	14425	235	Pai1 ORF S.t. (1)	7865
44	sfaG (2)	10272	108	papC (2)	12500	172	Pai1 ORF63 (2)	11672	236	Pai1 CH3 trans2 (6633
45	sfaG (1)	9960	109	papC (1)	12590	173	Pai1 ORF63 (1)	13011	237	Pai1 CH3 trans2 (6446
46	sfaF (2)	10571	110	papB (2)	8219	174	Pai1 ORF62 (2)	13929	238	Pai1 CH3 trans1 (10207
47	sfaF (1)	10719	111	papB (1)	8338	175	Pai1 ORF62 (1)	14544	239	Pai1 CH3 trans1 (4748
48	sfaE (2)	7085	112	Pai5 ORF05 (2)	7904	176	Pai1 ORF6 (2)	13499	240	ORF 3.1. (2)	16551
49	sfaE (1)	7266	113	Pai5 ORF05 (1)	7506	177	Pai1 ORF6 (1)	12667	241	ORF 3.1. (1)	16103
50	sfaD (2)	9016	114	Pai5 ORF04 (2)	5698	178	Pai1 ORF54 (2)	13882	242	o289 (2)	10729
51	sfaD (1)	8234	115	Pai5 ORF04 (1)	5763	179	Pai1 ORF54 (1)	13908	243	o289 (1)	10903
52	sfaC (2)	9247	116	Pai5 ORF03 (2)	5755	180	Pai1 ORF5 (2)	6842	244	Na/H- anti (2)	10746
53	sfaC (1)	8730	117	Pai5 ORF03 (1)	6189	181	Pai1 ORF5 (1)	7403	245	Na/H- anti (1)	10425
54	sfaB (2)	10578	118	Pai5 ORF02 (2)	6787	182	Pai1 ORF48 (2)	9565	246	microV (2)	5861
55	sfaB (1)	9915	119	Pai5 ORF02 (1)	7366	183	Pai1 ORF48 (1)	9771	247	microV (1)	5580
56	sfaA (2)	7658	120	Pai5 ORF01 (1)	5524	184	Pai1 ORF43 (2)	12253	248	LPS R1 (2)	9672
57	sfaA (1)	7711	121	Pai5 kpsSK5 (2)	7581	185	Pai1 ORF43 (1)	13716	249	LPS R1 (1)	9632
58	r3 (2)	7709	122	Pai5 kpsSK5 (1)	7768	186	Pai1 ORF4 (2)	9920	250	kpsU (2)	4968
59	r3 (1)	7556	123	Pai5 kpsSK10 (2)	9253	187	Pai1 ORF4 (1)	9645	251	kpsU (1)	4918
60	r1 (2)	5640	124	Pai5 kpsSK10 (1)	9029	188	Pai1 ORF37 (2)	8914	252	kpsT (2)	8632
61	r1 (1)	5661	125	Pai5 kps U (2)	5419	189	Pai1 ORF37 (1)	8810	253	kpsT (1)	8476
62	psn (4)	6644	126	Pai5 kps U (1)	5391	190	Pai1 ORF36 (2)	11539	254	kpsM (2)	8867
63	psn (3)	7181	127	Pai5 kps D (2)	7152	191	Pai1 ORF36 (1)	11720	255	kpsM (1)	8954
64	psn (2)	7986	128	Pai5 kps D (1)	7545	192	Pai1 ORF35 (2)	9215	256	kpsE (2)	5763

Nr.	Sonde	Signal	Nr.	Sonde	Signal
257	kpsE (1)	5355	321	cvaB (1)	6527
258	kpsD (2)	6221	322	colicV (2)	8017
259	kpsD (1)	6310	323	colicV (1)	8154
260	KM sapB (2)	5174	324	3-ORF5 yprB (2)	6631
261	KM sapB (1)	5278	325	3-ORF5 yprB (1)	6712
262	irp5 (4)	5810	326	3-ORF1 PifA (2)	10047
263	irp5 (2)	7377	327	3-ORF1 PifA (1)	10424
264	irp5 (1)	7122	328	3- D prsX (1)	4658
265	irp4 (2)	7061	329	3- D int S.dys. (2)	6940
266	irp4 (1)	6934	330	3- D int S.dys. (1)	7409
267	irp3 (2)	8170	331	3- D AJ278144 (2)	8126
268	irp3 (1)	8080	332	3- D AJ278144 (1)	7811
269	irp2 (4)	4876	333	17 kDa (2)	16480
270	irp2 (2)	7142	334	17 kDa (1)	16645
271	irp2 (1)	7337			
272	irp1 (2)	10107			
273	irp1 (1)	10172			
274	iroN (2) (2)	7374			
275	iroN (2) (1)	7602			
276	iroN (2)	10934			
277	iroN (1)	10610			
278	iroE (2)	5909			
279	iroE (1)	5871			
280	iroD (2)	4774			
281	iroD (1)	5250			
282	iroC (2)	5222			
283	iroC (1)	5348			
284	int sfx (2)	7467			
285	int sfx (1)	7842			
286	hyp.Prot.3.1. (2)	7701			
287	hyp.Prot.2.1 (2)	6073			
288	hyp.Prot.2.1 (1)	6291			
289	hra (2)	6664			
290	hra (1)	5782			
291	hlyD (6)	16399			
292	hlyD (5)	15902			
293	hlyD (4)	11575			
294	hlyD (3)	12976			
295	hlyD (2) (2)	20412			
296	hlyD (2)	12926			
297	hlyD (1)	13423			
298	hlyC (4)	9481			
299	hlyC (3)	9812			
300	hlyC (2)	10471			
301	hlyC (1)	11632			
302	hlyB (4)	27052			
303	hlyB (3)	26351			
304	hlyB (2)	26997			
305	hlyB (1)	27382			
306	hlyA (4)	7889			
307	hlyA (3)	9204			
308	hlyA (2)	9939			
309	hlyA (1)	17450			
310	HecB (2)	8343			
311	HecB (1)	8164			
312	Häm.prot.Mix (2)	7521			
313	Häm.prot.Mix (1)	7356			
314	Häm.prot.536 (2)	7304			
315	Häm.prot.536 (1)	7338			
316	dsdC (2)	5329			
317	dsdC (1)	6006			
318	dahP (2)	7690			
319	dahP (1)	7386			
320	cvaB (2)	6906			

Vergleich von 536, EDL 933 und MG1655

Auflistung der 115 Sonden, die nur spezifisch für 536 und EDL 933 waren:

Nr.	Sonde	Signal	Nr.	Sonde	Signal
1	yfiR (2)	9009	65	Pai1 ORF57 (2)	8245
2	yfiR (1)	9062	66	Pai1 ORF57 (1)	8454
3	yeeU (2)	11027	67	Pai1 ORF53 (2)	9694
4	yeeU (1)	10299	68	Pai1 ORF53 (1)	9919
5	yeeT (4)	8386	69	Pai1 ORF45 (2)	25262
6	yeeT (3)	8569	70	Pai1 ORF45 (1)	25599
7	yeeS (2)	14798	71	Pai1 ORF44 (2)	15061
8	yeeS (1)	15095	72	Pai1 ORF44 (1)	15329
9	yc73 (2)	6976	73	Pai1 ORF23 (2)	17156
10	yc73 (1)	6422	74	Pai1 ORF23 (1)	13273
11	y1094 (6)	20616	75	Pai1 D int b (2)	8638
12	sap (2)	8865	76	Pai1 D int b (1)	8525
13	sap (1)	8342	77	Pai1 D int a (2)	8706
14	prpA (2)	7854	78	Pai1 D int a (1)	8186
15	prpA (1)	7705	79	o273 (2)	15904
16	Pai3ORF34	12880	80	o273 (1)	16021
17	Pai3ORF25	9063	81	o152 (2)	15309
18	Pai3ORF19	12448	82	o152 (1)	14990
19	Pai3ORF18	5881	83	modD (2)	6833
20	Pai3ORF14	8308	84	modD (1)	6889
21	Pai3 ORF8 (2)	9773	85	Loo08 (2)	17468
22	Pai3 ORF8 (1)	10595	86	Loo08 (1)	17018
23	Pai3 ORF7 (2)	14345	87	Loo07 (2)	13556
24	Pai3 ORF7 (1)	14207	88	Loo07 (1)	14250
25	Pai3 ORF6 (2)	8167	89	L0014 (2)	5369
26	Pai3 ORF6 (1)	5385	90	L0014 (1)	5340
27	Pai3 ORF34	13473	91	L0008 (4)	9701
28	Pai3 ORF33 (2)	7357	92	L0008 (3)	9627
29	Pai3 ORF33 (1)	7472	93	L0008 (2)	12856
30	Pai3 ORF32 (2)	14569	94	L0008 (1)	12675
31	Pai3 ORF32 (1)	14708	95	L0007 (4)	8079
32	Pai3 ORF31 (2)	12719	96	L0007 (3)	8005
33	Pai3 ORF30 (2)	18639	97	L0007 (2)	8425
34	Pai3 ORF30 (1)	17922	98	L0007 (1)	8673
35	Pai3 ORF29 (2)	22776	99	KM-L0015 (4)	21524
36	Pai3 ORF29 (1)	23114	100	KM-L0015 (3)	20070
37	Pai3 ORF28 (2)	12318	101	KM-L0015 (2)	21782
38	Pai3 ORF28 (1)	12590	102	KM-L0015 (1)	22041
39	Pai3 ORF27 (2)	8115	103	IS1203 B1 (2)	10295
40	Pai3 ORF27 (1)	8616	104	IS1203 B1 (1)	10329
41	Pai3 ORF26 (2)	7319	105	IS1203 A1 (2)	5460
42	Pai3 ORF26 (1)	6871	106	IS1203 A1 (1)	5164
43	Pai3 ORF24	14356	107	hlyD (2) (1)	19479
44	Pai3 ORF19	12388	108	fepC (2)	6732
45	Pai3 ORF18	5922	109	fepC (1)	6359
46	Pai3 ORF11 (2)	10497	110	dsdA (2)	6448
47	Pai3 ORF11 (1)	10817	111	dsdA (1)	6838
48	Pai3 ORF10 (2)	6432	112	AIDA (2)	12392
49	Pai3 ORF10 (1)	5878	113	AIDA (1)	12552
50	Pai2 TnpE (2)	7064	114	3-Loo1o (2)	12890
51	Pai2 TnpE (1)	7300	115	3-Loo1o (1)	12885
52	Pai2 Orf_B (2)	6057			
53	Pai2 Orf_B (1)	7584			
54	Pai1 ORF76 (2)	20403			
55	Pai1 ORF76 (1)	20362			
56	Pai1 ORF69 (2)	16593			
57	Pai1 ORF69 (1)	18706			
58	Pai1 ORF68 (2)	27472			
59	Pai1 ORF68 (1)	27632			
60	Pai1 ORF67 (2)	19230			
61	Pai1 ORF67 (1)	19280			
62	Pai1 ORF64 (2)	15608			
63	Pai1 ORF59 (2)	10848			
64	Pai1 ORF59 (1)	11151			

Vergleich von 536, EDL 933 und MG1655Auflistung der 121 Sonden, die nur spezifisch für EDL 933 waren:

Nr.	Sonde	Signal	Nr.	Sonde	Signal
1	Z4852 (2)	4763	65	KM int (1)	7654
2	Z4852 (1)	5029	66	katP (2)	9757
3	Z4326 (2)	4081	67	katP (1)	9578
4	Z4326 (1)	4515	68	iutA (2)	7013
5	Z4321 (2)	9287	69	iutA (1)	7693
6	Z4321 (1)	8286	70	iucC (4)	1948
7	Z4196 (2)	4784	71	iucC (3)	2063
8	Z4196 (1)	4920	72	Ing A (2)	1841
9	Z1542 (2)	6870	73	Ing A (1)	2384
10	Z1542 (1)	7514	74	iha (2)	10426
11	Z1142 (2)	6604	75	iha (1)	9634
12	Z1142 (1)	5480	76	fanC (2)	2016
13	Z0250 (2)	4440	77	espP (2)	7612
14	Z0250 (1)	4018	78	espP (1)	7440
15	virA (6)	1419	79	espl (2)	7582
16	Tsh EB1 (2)	2379	80	espl (1)	7715
17	Tsh EB1 (1)	2029	81	espD (4)	5708
18	Tsh 933 (1)	2080	82	espD (3)	6074
19	tlrC (2)	4101	83	espD (2)	5379
20	tlrC (1)	4399	84	espD (1)	5103
21	tlrB (2)	4775	85	espB (4)	5742
22	tlrB (1)	5630	86	espB (3)	5980
23	tlrA (2)	6425	87	espB (2)	2497
24	tlrA (1)	6256	88	espB (1)	3057
25	tlpD (2)	4904	89	espA (2)	4839
26	tlpD (1)	4775	90	espA (1)	4335
27	tir (4)	5965	91	escS (6)	5327
28	tir (3)	5518	92	escS (5)	4927
29	tir (2)	5007	93	escS (4)	4932
30	tir (1)	4666	94	escS (3)	5066
31	tag (2)	2203	95	escS (2)	3728
32	tag (1)	2239	96	escS (1)	3653
33	stx2b (2)	3165	97	escN (4)	7367
34	stx2b (1)	3085	98	escN (3)	8005
35	stx2a (2)	4601	99	escN (2)	6937
36	stx2a (1)	4260	100	escN (1)	8768
37	stx1b (2)	2858	101	escC (4)	3021
38	stx1b (1)	2900	102	escC (3)	2488
39	stx1a (2)	3434	103	escC (2)	5612
40	stx1a (1)	4123	104	escC (1)	5505
41	st (1)	1660	105	EHEC hlyA (2)	5198
42	shi-O ORF5 (2)	1695	106	EHEC hlyA (1)	5419
43	shiD (4)	8205	107	eae (4)	3257
44	shiD (3)	8050	108	eae (3)	2821
45	shiD (2)	4460	109	eae (2)	3482
46	shiD (1)	4361	110	eae (1)	3773
47	sfa (2)	1937	111	cjrC (2)	2261
48	Ser.prot. Mix (2)	7872	112	cjrC (1)	1749
49	Ser.prot. Mix (1)	8407	113	chuA (2)	5278
50	Ser.prot. EB1 (2)	1953	114	chuA (1)	6013
51	Ser.prot. 933 (2)	9175	115	astA (1)	2837
52	Ser.prot. 933 (1)	9256	116	afaB (2)	2829
53	RTx exo (2)	6388	117	afaB (1)	2621
54	RTx exo (1)	6561	118	afa E (2)	1537
55	perD (2)	1989	119	afa E (1)	1632
56	perD (1)	2186	120	afa D (2)	3243
57	perB (2)	1732	121	afa D (1)	3509
58	perB (1)	1942			
59	lt (2)	1926			
60	L0013 (2)	8451			
61	L0013 (1)	8369			
62	L0009 (2)	2267			
63	L0009 (1)	4324			
64	KM int (2)	7744			

Vergleich von 536, EDL 933 und MG1655

Auflistung der 12 Sonden, die nur spezifisch für 536 und MG1655 waren:

Nr.	Sonde	Signal	Nr.	Sonde	Signal	Nr.	Sonde	Signal	Nr.	Sonde	Signal
1	TnpA (2)	5454	4	rfaH (1)	6576	7	Pai2 yjhX (2)	5363	10	Pai2 yjhW (1)	6563
2	TnpA (1)	6114	5	Pai3- D yi41 (2)	11427	8	Pai2 yjhX (1)	5222	11	dsdX (2)	7472
3	rfaH (2)	5449	6	Pai3- D yi41 (1)	11570	9	Pai2 yjhW (2)	6679	12	dsdX (1)	7731

Auflistung der 7 Sonden, die nur spezifisch für MG1655 waren:

Nr.	Sonde	Signal	Nr.	Sonde	Signal	Nr.	Sonde	Signal	Nr.	Sonde	Signal
1	Pai2 int B (2)	5780	3	neuE (1)	5400	5	LPS R2 (1)	5405	7	LPS K12 (1)	9179
2	Pai2 int B (1)	7094	4	LPS R2 (2)	5331	6	LPS K12 (2)	8938			

Auflistung der 1 Sonde, die nur spezifisch für EDL 933 und MG1655 war:

Nr.	Sonde	Signal
1	astA (2)	5019

Auflistung der 4 Sonden, die spezifisch für alle drei Stämme waren:

Nr.	Sonde	Signal	Nr.	Sonde	Signal	Nr.	Sonde	Signal	Nr.	Sonde	Signal
1	Pai2 IS2A (1)	9506	2	Pai2 IS2A (2)	9412	3	eehH (2)	6912	4	eehH (1)	6421

Auflistung der 324 Sonden, die weder mit 536, noch EDL 933 oder MG1655 hybridisierten:

Nr.	Sonde	Signal	Nr.	Sonde	Signal	Nr.	Sonde	Signal	Nr.	Sonde	Signal
1	3- D int S,dys. (1)		33	cdtA (2)		65	cssA (2)		97	int P (2)	
2	3- D int S,dys. (2)		34	cdtB (1)		66	daaE (1)		98	int P4 (1)	
3	3- D prsX (2)		35	cdtB (2)		67	daaE (2)		99	int P4 (2)	
4	3-Häm,prot. (1)		36	cdtC (1)		68	dafaD (1)		100	ipaA (1)	
5	3-Häm,prot. (2)		37	cdtC (2)		69	dafaD (2)		101	ipaA (2)	
6	3-Häm.prot. (1)		38	cdtIII A (1)		70	dra / afa (1)		102	ipaA (3)	
7	3-Häm.prot. (2)		39	cdtIII A (2)		71	dra / afa (2)		103	ipaA (4)	
8	AdhE (1)		40	cdtIII B (1)		72	draE (1)		104	ipaB (1)	
9	AdhE (2)		41	cdtIII B (2)		73	draE (2)		105	ipaB (2)	
10	afa 7 (1)		42	cdtIII C (1)		74	escC (5)		106	ipaB (3)	
11	afa 7 (2)		43	cdtIII C (2)		75	escC (6)		107	ipaB (4)	
12	afa 8 (1)		44	cjrA (1)		76	espA (3)		108	ipaC (1)	
13	afa 8 (2)		45	cjrA (2)		77	espA (4)		109	ipaC (2)	
14	afa E2 (1)		46	cjrB (1)		78	F17a A (1)		110	ipaC (3)	
15	afa E2 (2)		47	cjrB (2)		79	F17a A (2)		111	ipaC (4)	
16	afa E3 (1)		48	cloacinDF13 (1)		80	faeG (1)		112	ipaD (1)	
17	afa E3 (2)		49	cloacinDF13 (2)		81	faeG (2)		113	ipaD (2)	
18	afa E5 (1)		50	cloacinDF13 (3)		82	fanC (1)		114	ipaD (3)	
19	afa E5 (2)		51	cloacinDF13 (4)		83	Häm,prot,536 (1)		115	ipaD (4)	
20	afaA (1)		52	cnf 1 (1)		84	Häm,prot,536 (2)		116	ireA (1)	
21	afaA (2)		53	cnf 1 (2)		85	Häm,prot,Mix (1)		117	ireA (2)	
22	afaC (1)		54	cnf 2 (1)		86	Häm,prot,Mix (2)		118	irp1 (3)	
23	afaC (2)		55	cnf 2 (2)		87	HecA (1)		119	irp1 (4)	
24	afaF (1)		56	cofA (1)		88	HecA (2)		120	irp2 (3)	
25	afaF (2)		57	cofA (2)		89	hyp,Prot,2,1 (1)		121	irp3 (3)	
26	aggR (1)		58	cooA (1)		90	hyp,Prot,2,1 (2)		122	irp3 (4)	
27	aggR (2)		59	cooA (2)		91	hyp,Prot,3,1, (1)		123	irp4 (3)	
28	bfpA (1)		60	cotA (1)		92	hyp,Prot,3,1, (2)		124	irp4 (4)	
29	bfpA (2)		61	cotA (2)		93	hyp,Prot.3.1. (1)		125	irp5 (3)	
30	btuB (1)		62	CS3 (1)		94	ibeA (1)		126	iucA (1)	
31	btuB (2)		63	CS3 (2)		95	ibeA (2)		127	iucA (2)	
32	cdtA (1)		64	cssA (1)		96	int P (1)		128	iucA (3)	

Nr.	Sonde	Signal	Nr.	Sonde	Signal	Nr.	Sonde	Signal	Nr.	Sonde	Signal
129	iucA (4)		193	neuB (1)		257	Ser.prot. Mix (1)		321	ybtP (3)	
130	iucA (5)		194	neuB (2)		258	Ser.prot. Mix (2)		322	ybtP (4)	
131	iucA (6)		195	neuC (1)		259	Ser.prot. EB1 (1)		323	ybtS (3)	
132	iucB (1)		196	neuC (2)		260	set 1A (1)		324	ybtS (4)	
133	iucB (2)		197	neuD (1)		261	set 1A (2)				
134	iucB (3)		198	neuD (2)		262	set 1B (1)				
135	iucB (4)		199	neuE (2)		263	set 1B (2)				
136	iucB (5)		200	neuS (1)		264	sfa (1)				
137	iucB (6)		201	neuS (2)		265	shiA (1)				
138	iucC (1)		202	ORF 3,1, (1)		266	shiA (2)				
139	iucC (2)		203	ORF 3,1, (2)		267	shiA (3)				
140	iucC (5)		204	Pai1 ORF S,t, (1)		268	shiA (4)				
141	iucC (6)		205	Pai1 ORF S,t, (2)		269	shiC (1)				
142	iucD (1)		206	Pai2 12,7 kD (1)		270	shiC (2)				
143	iucD (2)		207	Pai2 12,7 kD (2)		271	shiC (3)				
144	iucD (3)		208	Pai3 ORF20		272	shiC (4)				
145	iucD (4)		209	Pai3 ORF22		273	shiE (1)				
146	iucD (5)		210	Pai3ORF20		274	shiE (2)				
147	iucD (6)		211	Pai3ORF22		275	shiE (3)				
148	iutA (3)		212	Pai5 kps C (1)		276	shiE (4)				
149	iutA (4)		213	Pai5 kps C (2)		277	shiF (1)				
150	kpsC (1)		214	Pai5 kps E (1)		278	shiF (2)				
151	kpsC (2)		215	Pai5 kps E (2)		279	shiF (3)				
152	kpsC IHE/RS218 (1)		216	Pai5 kps F (1)		280	shiF (4)				
153	kpsC IHE/RS218 (2)		217	Pai5 kps F (2)		281	shiG (1)				
154	kpsC Mix (1)		218	Pai5 ORF01 (2)		282	shiG (2)				
155	kpsC Mix (2)		219	pap ORF 17kD (1)		283	shiG (3)				
156	kpsF (1)		220	pap ORF 17kD (2)		284	shiG (4)				
157	kpsF (2)		221	papA (1)		285	shi-O ORF4 (1)				
158	kpsM (3)		222	papA (2)		286	shi-O ORF4 (2)				
159	kpsM (4)		223	papG (1)		287	shi-O ORF5 (1)				
160	kpsS (1)		224	papG (2)		288	sopA (1)				
161	kpsS (2)		225	papl (3)		289	sopA (2)				
162	kpsS IHE/RS218 (1)		226	papl (4)		290	spa32 (1)				
163	kpsS IHE/RS218 (2)		227	perA (1)		291	spa32 (2)				
164	kpsS Mix (1)		228	perA (2)		292	spa32 (3)				
165	kpsS Mix (2)		229	perC (1)		293	spa32 (4)				
166	kpsT (3)		230	perC (2)		294	st (2)				
167	kpsT (4)		231	pic (1)		295	tia (1)				
168	kpsX (1)		232	pic (2)		296	tia (2)				
169	kpsX (2)		233	pic (3)		297	tia (3)				
170	kpsX IHE/RS218 (1)		234	pic (4)		298	tiaA				
171	kpsX IHE/RS218 (2)		235	prsD (1)		299	tibA (1)				
172	kpsX Mix (1)		236	prsD (2)		300	tibA (2)				
173	kpsX Mix (2)		237	rpoS (1)		301	Tsh 933 (2)				
174	lacZ (1)		238	rpoS (2)		302	Tsh Mix (1)				
175	lacZ (2)		239	sap (3)		303	Tsh Mix (2)				
176	leoA (1)		240	sap (4)		304	ureD (1)				
177	leoA (2)		241	sat (1)		305	ureD (2)				
178	LPS R3 (1)		242	sat (2)		306	virA (1)				
179	LPS R3 (2)		243	senA (1)		307	virA (2)				
180	LPS R4 (1)		244	senA (2)		308	virA (3)				
181	LPS R4 (2)		245	senA (3)		309	virA (4)				
182	lt (1)		246	senA (4)		310	virA (5)				
183	malX (1)		247	senB (1)		311	virG (1)				
184	malX (2)		248	senB (2)		312	virG (2)				
185	mxiA (1)		249	sepA (1)		313	virG (3)				
186	mxiA (2)		250	sepA (2)		314	virG (4)				
187	mxiA (3)		251	sepA (3)		315	WZY (1)				
188	mxiA (4)		252	sepA (4)		316	WZY (2)				
189	neuA (1)		253	Ser.prot, 933 (1)		317	wzy Mix (1)				
190	neuA (2)		254	Ser.prot, 933 (2)		318	wzy Mix (2)				
191	neuA2 (1)		255	Ser.prot, EB1 (1)		319	ybtA (3)				
192	neuA2 (2)		256	Ser.prot, EB1 (2)		320	ybtA (4)				

Tagungsbeiträge:

U. Dobrindt, K. Michaelis, C. Buchrieser und J. Hacker (2001) Use of DNA array technology for the analysis of genome content and gene regulation of pathogenic *Escherichia coli*. 2nd. International symposium on „Genomics in infectious diseases” 2001 in Würzburg.

U. Dobrindt, G. Blum-Oehler, K. Michaelis, C. Buchrieser, G. Gottschalk und J. Hacker (2002) Analysis of the genome structure of pathogenic *Escherichia coli*: Contribution of DNA acquisition and deletion events. DEHEMA-Tagung „Gegenwart und Zukunft der bakteriellen Genomforschung in Deutschland“ 2002 in Bielefeld.

U. Dobrindt, G. Nagy, K. Michaelis, C. Buchrieser, L. Emödy und J. Hacker (2002) Global analysis of gene expression and virulence in pathogenic *Escherichia coli*: The Role of the regulatory protein RfaH. Louis Pasteur Conference on Infectious Diseases: „Integrative Approaches in Microbial Pathogenesis” in Paris.

C. Beolin, K. Michaelis, J.M. Ghigo, C. Müller, J. Hacker und U. Dobrindt (2003) Analysis of biofilm formation in pathogenic and non-pathogenic *Escherichia coli*: Role of the regulatory protein RfaH. ASM-Tagung „Biofilms 2003“ in Victoria, Kanada.

K. Michaelis, U. Dobrindt, G. Nagy, C. Buchrieser, C. Beolin, J.M. Ghigo, L. Emödy und J. Hacker (2003) Global analysis of gene expression and virulence in pathogenic *Escherichia coli*: The Role of the regulatory protein RfaH. DGHM-Jahrestagung 2003 in Dresden.

K. Michaelis, U. Dobrindt, C. Beolin, J.M. Ghigo und J. Hacker (2004) Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* 536: Role of antigen 43 and influence of regulatory protein RfaH. VAAM-Jahrestagung 2004 in Braunschweig.

Publikationen:

Hess, P., Daryab, N., Michaelis, K., Reisenauer, A. & Oelschlaeger, T. A. (2000). Type 1 pili of *Citrobacter freundii* mediate invasion into host cells. *Adv Exp Med Biol* **485**, 225-35.

Dobrindt, U., Agerer, F., Michaelis, K., Janka, A., Buchrieser, C., Samuelson, M., Svanborg, C., Gottschalk, G., Karch, H. & Hacker, J. (2003). Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays. *J Bacteriol* **185**, 1831-40.

Townson, S. M., Dobrzycka, K. M., Lee, A. V., Air, M., Deng, W., Kang, K., Jiang, S., Kioka, N., Michaelis, K. & Oesterreich, S. (2003). SAFB2, a new scaffold attachment factor homolog and estrogen receptor corepressor. *J Biol Chem* **278**, 20059-68. Epub 2003 Mar 26.

Ivanova, M., Dobrzycka, K. M., Jiang, S., Michaelis, K., Meyer, R., Kang, K., Adkins, B., Barski, O. A., Zubairy, S., Divisova, J., Lee, A. V. & Oesterreich, S. (2005). Scaffold attachment factor B1 functions in development, growth, and reproduction. *Mol Cell Biol* **25**, 2995-3006.

Blumer, C., Kleefeld, A., Lehnen, D., Heintz, M., Dobrindt, U., Nagy, G., Michaelis, K., Emody, L., Polen, T., Rachel, R., Wendisch, V. F. & Unden, G. (2005). Regulation of type 1 fimbriae synthesis and biofilm formation by the transcriptional regulator LrhA of *Escherichia coli*. *Microbiology* **151**, 3287-98.

Beloin, C.*, Michaelis, K.*, Lindner, K., Landini, P., Hacker, J., Ghigo, J. M. and Dobrindt, U. (2005). The transcriptional regulator RfaH represses biofilm formation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* (in revision).

* Diese Autoren sind gleichberechtigt

Lebenslauf:Persönliche Daten:

Name: Kai Michaelis
 Geburtsdatum: 08.02.1972
 Geburtsort: Oschatz

Schulbildung:

1979-1988: Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule, Berlin-Köpenick
 1988-1990: Spezialklassen für Chemie der Technischen Hochschule Leuna-Merseburg
 (Abschluss: Abitur)

Wehrdienst:

1990-1991: Wehrrersatzdienst im „Ulmenhof“, einer diakonischen Einrichtung der Stephanus-Stiftung Berlin

Studium:

1991-1994: Studiengang Chemie (Diplom) an der Eberhardt-Karls Universität Tübingen (Vordiplom)
 1994-1995: Studiengang Chemie (Diplom) an der Martin-Luther Universität Halle/Saale
 1995-1998: Studiengang Chemie (Diplom) der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg. (Abschluss: Diplom-Chemiker)
 1998-1999: Diplomarbeit am Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg bei Dr. T. Ölschläger mit dem Thema:
 „Biochemische und molekularbiologische Charakterisierung einer Fimbriendeterminante aus *Citrobacter freundii*“

Wissenschaftliche Anstellungen:

1992-1995: Wiss. Hilfskraft an der Eberhardt-Karls Universität Tübingen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Hagenmaier
 Thematik: Dioxin- und Umweltanalytik
 1999-2000: 1999-2000 Austauschstudent am Baylor Breast Center des Baylor College of Medicine in Houston, Texas in der Arbeitsgruppe von Dr. S. Österreich
 Thematik: Brustkrebsforschung, Maus-Modell für SAFB1
 seit 2001: Dissertation am Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg bei Prof. Dr. J. Hacker und Dr. U. Dobrindt mit dem Thema:
 „Untersuchungen zur Genomstruktur und Biofilmbildung von pathogenen *Escherichia coli* Isolat“