

**Untersuchungen zum Einfluss der ATP-abhängigen
Protease ClpXP auf die Regulation und Expression
Virulenz-assoziiierter Gene des uropathogenen
E. coli Stammes 536**

Dissertation

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

vorgelegt von

Karin Lindner

aus Rothenburg ob der Tauber

Würzburg, 2005

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Erstgutachter: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Jörg Hacker

Zweitgutachter: PD Dr. Michael Kuhn

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

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

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

Des Weiteren erkläre ich, dass ich bisher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, den 10.11.05

Karin Lindner

Danke...

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Jörg Hacker für die Anregung zur vorliegenden Arbeit, für seine Unterstützung, sein Interesse sowie seine ständige Diskussionsbereitschaft bedanken. Herrn PD Dr. Michael Kuhn danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Dr. Susanne Engelmann und Dr. Dirk Albrecht vom Institut für Mikrobiologie in Greifswald möchte ich mich herzlich für die Hilfestellungen und Anregungen bei der Auswertung der 2-D Gele und die Durchführung der MALDI-TOF-MS Analysen bedanken. Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Michael Hecker bedanken, der mir im seinem Labor die Möglichkeit zur Auswertung meiner Gele gegeben hat. Prof. Levente Emödy, Dr. György Schneider und Dr. Gábor Nagy danke ich für die Durchführung der Tierexperimente in Pécs, Ungarn.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Ulrich Dobrindt und Dr. Bianca Hochhut, die während meiner Arbeit und bei der Erstellung des Manuskripts immer sehr regen Anteil genommen haben und stets einen guten Tipp oder einige aufmunternde Worte auf Lager hatten.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie sowie des Zentrums für Infektionsforschung bedanke ich mich für die vielen hilfreichen Anregungen und Diskussionen sowie die schöne Zeit in diesem Haus. Bei Dr. Salam Khan möchte ich mich für die Überlassung der Fimbrien-Antikörper bedanken. Mein besonderer Dank gilt Gudrun Balling und Sibylle Oswald, die mich in die Welt der Molekularbiologie eingeführt haben. Bei Barbara Middendorf und Artur Altenhöfer möchte ich mich ganz herzlich für die zahlreichen Hilfestellungen und Problemlösungen am Computer bedanken. Sabine, Mella, Gabi, Katja, Kai, Stefan, Claudia, Philippe und Caroline danke ich für die schöne Zeit im Labor und bei weiteren Unternehmungen.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und Geschwistern für ihre Unterstützung und Interesse während meines Studiums und der Promotion bedanken.

Inhaltsverzeichnis

I. Zusammenfassung.....	1
I. Summary.....	3
II. Einleitung	5
1. Regulation Virulenz-assoziiierter Gene.....	5
2. Molekulare Chaperone und Proteasen.....	5
2.1. Proteasen und Chaperone von <i>E. coli</i>	6
2.2. Funktionsweise von Chaperonen und Proteasen.....	7
2.3. Aufbau und Funktion von ClpXP	9
2.4. Adapterproteine.....	11
2.5. Funktion von ClpXP und ClpXP-verwandten Proteinen in anderen Organismen..	12
3. <i>Escherichia coli</i>	13
3.1. Uropathogene <i>E. coli</i> (UPEC) und Harnwegsinfektionen	14
3.2. Pathogenitätsinseln des uropathogenen <i>E. coli</i> Stammes 536	14
3.3. Virulenzfaktoren des uropathogenen Isolates <i>E. coli</i> 536.....	15
4. Zielsetzung der Arbeit.....	19
III. Material.....	20
1. Bakterienstämme und Plasmide.....	20
1.1. Bakterienstämme.....	20
1.2. Plasmide	21
2. Oligonukleotide.....	22
3. Chemikalien	25
4. Geräte und Zubehör.....	26
5. Medien und Nährböden	27
6. Antibiotikazusätze für Medien und Nährböden.....	29
7. Antikörper.....	29
8. Puffer und Lösungen.....	30
9. Größenmarker	30
9.1. Protein-Größenmarker.....	30
9.2. DNA-Größenmarker	31

IV. Methoden.....	32
1. DNA	32
1.1. Isolierung von DNA.....	32
1.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA.....	32
1.1.1.1. Schnellysat-Methode mit Diatomeen-Erde (Boom et al., 1990).....	32
1.1.1.2. Mini-Präparation mit Isopropanol.....	33
1.1.1.3. DNA Midi-Präparation (Qiagen)	34
1.1.1.4. Alkoholische Fällung von DNA.....	35
1.1.2. Isolierung chromosomaler DNA (Grimberg <i>et al.</i> , 1989).....	35
1.2. Horizontale Gelelektrophorese.....	36
1.3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)	36
1.4. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	37
1.5. Ligation von DNA-Fragmenten	37
1.6. Aufreinigung von Plasmid-DNA mittels QIAquick PCR Purification Kit.....	37
2. Herstellung kompetenter Bakterienzellen.....	38
2.1. Elektrokompetente <i>E. coli</i> -Zellen	38
2.2. CaCl ₂ -Methode.....	38
3. Transformation von Bakterienzellen.....	38
3.1. Elektroporation von <i>E. coli</i>	38
3.2. Hitzetransformation.....	39
4. Polymerase Kettenreaktion (PCR, Saiki <i>et al.</i>, 1988).....	39
5. Southern Blot-Analyse	40
5.1. Southern Blot mit dem VakuGene Blotter (Pharmacia)	40
5.2. Nicht-radioaktive DNA-Markierung und Hybridisierung von DNA (ECL-Kit, Amersham)	41
6. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	42
7. A/T-Klonierung von DNA-Fragmenten	42
8. DNA-Sequenzierung.....	43
9. Konstruktion von Deletionsmutanten durch chromosomalen Allelaustausch mit Hilfe von linearen DNA-Fragmenten (Datsenko und Wanner, 2000)	44
10. RNA	46
10.1. Isolierung von RNA	46

10.2. DNase-Verdau der RNA	47
10.3. Aufreinigung der RNA.....	47
10.4. Reverse Transkription	47
11. Real-Time Reverse Transkription (RT)-PCR (Real-Time PCR).....	48
12. Proteine.....	51
12.1. Präparation von Proteinen	51
12.1.1. Gesamtzellextrakt.....	51
12.1.2. Isolierung periplasmatischer Proteine	51
12.2. Hitzeextraktion von Fimbrien	52
12.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels Roti [®] Nanoquant.....	52
12.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE, Laemmli, 1970).....	53
12.5. Western Blot-Analyse	54
12.6. Antikörperreaktion	54
12.7. Coomassie-Blau-Färbung von eindimensionalen SDS-Polyacrylamidgelen.....	54
13. Die zweidimensionale Gelelektrophorese.....	55
13.1. Präparation zytoplasmatischer Proteine	56
13.2. Präparation extrazellulärer Proteine.....	56
13.3. Rehydratisierung	57
13.4. Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)	57
13.5. Äquilibration.....	58
13.6. Zweite Dimension: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	59
13.7. Proteinfärbungen in 2-D Gelen mit kolloidalem Coomassie.....	59
13.8. Auswertung von 2-D Gelen mittels Delta-2D [®] Software	60
13.9. Identifizierung von Proteinen aus 2-D Gelen mittels MALDI-TOF-MS.....	60
14. Analyse von Lipopolysacchariden (LPS)	61
14.1. Isolierung von Lipopolysacchariden.....	61
14.2. Silberfärbung von Lipopolysacchariden (Tsai und Frasch, 1982).....	62
15. Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen	62
16. Phänotypische Tests	63
16.1. Qualitative Agglutination.....	63
16.2. Motilitätsnachweis	63
16.3. Nachweis von Curli.....	63
16.4. Nachweis von Cellulose.....	64
16.5. Nachweis von α -Hämolyisin.....	64

16.6. Autoaggregationsassay.....	64
----------------------------------	----

V. Ergebnisse..... 65

1. Untersuchungen zum Einfluss der ATP-abhängigen Protease ClpXP auf den uropathogenen <i>E. coli</i> Stamm 536.....	65
1.1. Konstruktion und Überprüfung von <i>clpX</i> - und <i>clpP</i> -Deletionsmutanten im <i>E. coli</i> Stamm 536	65
1.2. Chromosomale Komplementation der Deletionsmutanten 536 $\Delta clpX$ und 536 $\Delta clpP$	67
1.3. Einfluss von ClpX und ClpP auf das Wachstumsverhalten des Stammes <i>E. coli</i> 536.....	69
2. Vergleichende Proteomanalyse des uropathogenen Stammes <i>E. coli</i> 536 und seiner isogenen Mutanten 536 $\Delta clpX$ und 536 $\Delta clpP$	72
2.1. Analyse der ClpX- und ClpP-abhängigen Änderungen des zytoplasmatischen Proteoms von <i>E. coli</i> Stamm 536 aus präparativen 2-D Gelen	72
2.1.1. Analyse von Gesamtzellextrakten aus der logarithmischen und stationären Wachstumsphase.....	72
2.1.2. Einfluss der <i>clpX</i> - und <i>clpP</i> -Deletion auf das Expressionsmuster zytoplasmatischer Proteine aus der logarithmischen Wachstumsphase	73
2.1.3. Einfluss der <i>clpX</i> - und <i>clpP</i> -Deletion auf das Expressionsmuster zytoplasmatischer Proteine aus der stationären Wachstumsphase des Stammes <i>E. coli</i> 536 ...	76
2.1.4. Erstellung eines Mastergels und Klassifizierung aller analysierten Proteine des Stammes 536 aus dem Zytoplasma.....	79
2.2. Analyse der ClpX- und ClpP-abhängigen Änderungen des extrazellulären Proteoms von <i>E. coli</i> Stamm 536 aus präparativen 2-D Gelen	81
2.2.1. Einfluss der <i>clpX</i> - und <i>clpP</i> -Deletion auf das Expressionsmuster der Überstandsproteine des Stammes 536 aus der logarithmischen Wachstumsphase	82
2.2.2. Einfluss der <i>clpX</i> - und <i>clpP</i> -Deletion auf das Expressionsmuster der Überstandsproteine des Stammes 536 aus der stationären Wachstumsphase.....	83
2.2.3. Erstellung eines Mastergels und Klassifizierung aller analysierten extrazellulären Proteine des Stammes 536 aus der stationären Wachstumsphase..	87
2.3. Quantitative Analyse der Überstandsproteine des <i>E. coli</i> Stammes 536 und seiner <i>clpX</i> - und <i>clpP</i> -Mutanten	90

2.4.	Untersuchungen zur reduzierten Expression von Prf- und S-Fimbrien der <i>clpX</i> - und <i>clpP</i> -negativen Mutanten von <i>E. coli</i> 536	91
3.	Untersuchungen zum Einfluss des ClpXP Proteasekomplexes auf die Virulenzeigenschaften des uropathogenen Stammes <i>E. coli</i> 536.....	94
3.1.	Einfluss von ClpX und ClpP auf die Expression verschiedener Fimbrienadhäsine	94
3.1.1.	Qualitative Agglutination	94
3.1.2.	Western Blot-Analyse von Gesamtzellextrakten.....	95
3.2.	Einfluss von ClpX und ClpP auf die Expression von Curli und Cellulose.....	96
3.3.	Einfluss von ClpX und ClpP auf die Flagellierung.....	97
3.3.1.	Motilitätsnachweis	98
3.3.2.	Nachweis der Flagellenexpression im Western Blot	98
3.4.	Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Fimbrien- und Flagellenexpression	99
3.5.	Einfluss von ClpX und ClpP auf die α -Hämolysinproduktion	100
3.6.	Einfluss von ClpX und ClpP auf die Produktion von Lipopolysacchariden (LPS) und Serumresistenz	101
3.7.	Einfluss von ClpX und ClpP auf die <i>in vivo</i> -Virulenz des Stammes <i>E. coli</i> 536 .	102
4.	Transkriptanalyse von exprimierten Virulenzfaktoren des uropathogenen Stammes <i>E. coli</i> 536 und seiner isogenen <i>clpX</i>- und <i>clpP</i>-Mutanten	104
4.1.	Transkriptanalyse der Hauptuntereinheiten verschiedener Fimbrienadhäsine in <i>E. coli</i> 536 und dessen <i>clpX</i> - und <i>clpP</i> -Mutanten.....	104
4.2.	Transkriptanalyse von Antigen 43 in <i>E. coli</i> 536 und dessen <i>clpX</i> - und <i>clpP</i> -Mutanten	106
4.3.	Transkriptanalyse von Genen verschiedener Operons innerhalb der Flagellen-Regulationskaskade in <i>E. coli</i> 536 und dessen <i>clpX</i> - und <i>clpP</i> -Mutanten	108
5.	Untersuchungen zum Einfluss von Antigen 43 und RfaH auf die Fähigkeit zur Autoaggregation des uropathogenen <i>E. coli</i> Stammes 536.....	111
5.1.	Konstruktion einer <i>rfaH</i> -Deletionsmutante im <i>E. coli</i> Stamm 536	111
5.2.	Konstruktion von Einzel-, und Doppelmutanten von ORF52 _{III} und ORF47 _V im <i>E. coli</i> Stamm 536 und seiner <i>rfaH</i> -Mutante.....	112
5.3.	Autoaggregationsassays der verschiedenen <i>rfaH</i> - und <i>agn43</i> -Mutanten des Stammes <i>E. coli</i> 536	114

VI. Diskussion	117
1. RpoS und ClpXP als zentrale Faktoren für die Regulation der Genexpression bei <i>Escherichia coli</i>	117
2. Einfluss von ClpXP und RpoS auf das Proteom von <i>E. coli</i> 536	118
3. Einfluss von RpoS und Crl auf die Expression von Curli und Cellulose	120
4. Regulatorische Wirkung von ClpXP und RpoS auf die Flagellenexpression	121
5. Regulatorische Wirkung von ClpXP, RpoS und Lrp auf die Expression von Adhäsinen	124
5.1. Regulationsmechanismen bekannter Fimbriendeterminanten	124
5.2. Die zentrale Rolle von Lrp bei der Fimbrienexpression des <i>E. coli</i> Stammes 536	125
5.3. Kreuzregulation von Fimbriendeterminanten	127
6. ClpXP und der Einfluss auf die <i>in vivo</i> -Virulenz des Stammes <i>E. coli</i> 536 im experimentellen Modell einer aufsteigenden Harnwegsinfektion in jungen Mäusen.....	130
7. ClpXP und das Sekretionsverhalten des uropathogenen <i>E. coli</i> Stammes 536	131
8. Zusammenfassung der regulatorischen Zusammenhänge und Ausblick	135
VII. Literaturverzeichnis	137
VIII. Anhang	150
1. Abkürzungsverzeichnis.....	150
2. Plasmidkarten.....	152
2.1. pKLR1.....	152
2.2. pKLR2.....	152
2.3. pKLR3.....	153
2.4. pKLR4.....	153
3. Clusters of Orthologous Groups of proteins (COGs)	154
4. Liste aller identifizierten Proteine der zytoplasmatischen Zellfraktion.....	155
5. Liste aller identifizierten Proteine des Überstandes	159
6. Publikationen und Tagungsbeiträge.....	164
7. Lebenslauf	165

I. Zusammenfassung

Die ATP-abhängige Serinprotease ClpXP ist für die Kontrolle und Verfügbarkeit einer großen Anzahl von Enzymen und regulatorischer Proteine sowie für den Abbau fehlgefalteter Proteine verantwortlich. Sie besteht aus zwei Komponenten, der Protease ClpP und der ATPase ClpX, welche für die Substratspezifität verantwortlich ist und zusätzlich als Chaperon wirken kann. Durch den gezielten Abbau globaler Regulatoren wie dem alternativen Sigmafaktor RpoS kommt die regulatorische Funktion der Protease auf post-translationaler Ebene zum Tragen. Um den Einfluss der Protease ClpXP auf die Virulenzeigenschaften uropathogener *Escherichia coli* zu studieren, wurde der uropathogene *E. coli* Stamm 536 als Modellorganismus verwendet. Uropathogene *E. coli* Stämme werden als häufigste Erreger von Harnwegsinfektionen des Menschen beschrieben. Der *E. coli* Stamm 536 (O6:K15:H31) unterscheidet sich von apathogenen Stämmen durch die Anwesenheit von bislang sechs charakterisierten Pathogenitätsinseln (PAIs), die für eine Reihe verschiedener Virulenzfaktoren wie Prf- und S-Fimbrien, α -Hämolyisin, dem Kapselantigen K15 und Eisenaufnahmesystemen kodieren. Zudem exprimiert der Stamm Curli-Fimbrien, eine Flagelle vom Serotyp H31 und ist aufgrund seines glatten Lipopolysaccharid Phänotyps (O6 Antigen) serumresistent.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der Protease ClpXP auf die Regulation und Expression Virulenz-assoziiierter Gene des *E. coli* Stammes 536 sowohl auf Protein-, als auch auf Transkriptebene näher zu charakterisieren.

Um den Einfluss der *clpX*- und *clpP*-Deletion auf die Proteinexpression des *E. coli* Stammes 536 zu untersuchen, wurde die Methode der zweidimensionalen (2-D) Gelelektrophorese angewendet. Es wurden zytoplasmatische und extrazelluläre Proteine der logarithmischen und stationären Wachstumsphase untersucht und in diesem Zusammenhang jeweils ein internes Mastergel aller 93 identifizierten zytoplasmatischen und aller 127 identifizierten Proteinen des extrazellulären Proteoms angefertigt. In der zytoplasmatischen Fraktion konnte für 13 Proteine aus der logarithmischen und für 25 Proteine aus der stationären Wachstumsphase eine unterschiedliche Expression festgestellt werden. Die 2-D Analyse der Proteine aus dem Kulturüberstand ergab ein erhöhtes Sekretionsvermögen der *clpX*- und *clpP*-negativen Stämme sowohl in der logarithmischen als auch in der stationären Wachstumsphase. Darüber hinaus konnte eine reduzierte Expression von Hauptstrukturuntereinheiten der Prf-, S-, CS12-ähnlichen und Typ 1-Fimbrien sowie des Autotransporters Ag43 in den

clpX- und *clpP*-Mutanten nachgewiesen werden. Zusätzlich wiesen diese Stämme eine verstärkte Expression des Flagellins FliC auf.

Durch Western Blot-Analysen und weitere phänotypische Tests konnten die Ergebnisse aus den Proteomstudien für Prf-, S- und Typ 1-Fimbrien sowie für die Flagellenexpression bestätigt werden. Zudem war eine stark verlangsamte Expression von Curli und Cellulose bei Temperaturen unter 37 °C, eine erhöhte Motilität und ein „hyperflagellierter“ Phänotyp der *clpX*- und *clpP*-negativen Stämme zu beobachten. Demgegenüber hatte ClpXP keinen Einfluss auf die α -Hämolyseproduktion, die Expression des Lipopolysaccharides, die Serumresistenz und *in vivo*-Virulenz dieses Stammes.

Bei anschließenden Transkriptionsanalysen (semiquantitative Real-Time Reverse Transkription (RT)-PCR) der Gene, welche für die Hauptstrukturuntereinheiten von Fimbrien kodieren, konnte eine reduzierte Transkription der Determinanten für Prf-, S-, und Curli-Fimbrien, aber eine erhöhte Transkription für Gencluster der Typ 1- und CS12-ähnlichen Fimbrien und keine Änderung der Transkriptmengen für Gene des Pix-Fimbrienoperons in den Mutantenstämmen nachgewiesen werden. Die Transkription der beiden Antigen 43 Varianten ORF52_{III} und ORF47_V war durch die Deletion von *clpX* und *clpP* gleichermaßen betroffen und deutlich reduziert. ClpXP hatte aber keinen Einfluss auf die Transkription des „Masterregulatorgens“ *flhC* der Flagellen-Regulationskaskade, beeinflusst jedoch die in der Hierarchie weiter unten liegender Operons positiv, da eine deutlich erhöhte Expression von *fliA* und *fliC* nachgewiesen werden konnte. Demzufolge hat ClpXP einen negativen regulatorischen Effekt auf die Flagellenexpression, der aber erst auf posttranskriptionaler oder posttranslationaler Ebene auftritt.

Viele der beobachteten Einflüsse, v.a. auf die Flagellen- und Fimbrienexpression, konnten auf die fehlende regulatorische Wirkung von RpoS zurückgeführt werden, welches ausschließlich durch ClpXP degradiert wird. Zudem lassen die Ergebnisse vermuten, dass der globale Regulator Lrp, welcher eine wichtige Rolle bei der Regulation der Fimbrienexpression spielt, direkt oder indirekt durch ClpXP beeinflusst wird, wodurch die regulatorischen Netzwerke zusätzlich gestört werden.

Wie schon für ClpXP beobachtet, beeinflusst auch der Transkriptionsantiterminator RfaH die Expression von Antigen 43. In diesem Zusammenhang wurde der Einfluss der beiden Antigen 43-Varianten ORF52_{III} und ORF47_V auf die Autoaggregation des *E. coli* Stammes 536 und einer *rfaH*-Mutante getestet. Dabei konnte eine verstärkte Autoaggregation im *rfaH*-negativen Stammhintergrund nachgewiesen werden, wobei die beiden Antigen 43-Varianten keinen Einfluss auf die verstärkte Autoaggregation der *rfaH*-negativen Mutante hatten.

I. Summary

ClpXP is an ATP-dependent serine protease that controls the level and availability of key metabolic enzymes or regulatory proteins and plays a role in breakdown of abnormal and misfolded proteins. ClpXP consists of two independent components. ClpP has proteolytic activity, whereas ClpX has ATPase activity, provides the substrate specificity and function as a molecular chaperone. The proteolysis of global regulators such as the alternative sigma factor RpoS contributes to its function as a regulator on posttranslational level. To analyse the impact of the protease ClpXP on the virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*, the uropathogenic *E. coli* strain 536 was chosen as a model organism. Uropathogenic *E. coli* are the most frequently isolated causative agents of infections of the urinary tract in humans. The *E. coli* isolate 536 (O6:K15:H31) carries six pathogenicity islands (PAIs) that encode its key virulence factors such as α -hemolysins, P-related and S-fimbriae, capsule and iron-uptake systems, that are absent from non-pathogenic isolates. In addition, the strain expresses curli, flagella of serotype H31 and is due to its smooth lipopolysaccharide resistant to human serum.

The aim of this study was to characterize the impact of the ATP-dependent protease ClpXP on the expression and regulation of virulence-associated genes of strain *E. coli* 536 and its *clpX*- and *clpP*-deficient mutants on the protein- as well as on the transcriptional level.

In order to study the impact of ClpXP on global protein expression of *E. coli* strain 536, the proteome pattern of total cell extracts as well as of secreted proteins (“secretome”) from the exponential and stationary phase of strain 536 and its isogenic *clpX* and *clpP* mutants were compared by two-dimensional (2-D) gel electrophoresis. Internal master gels were prepared for all identified 93 proteins from the cytoplasmic and 127 proteins from the extracellular fraction. Analysis of the cytoplasmic fraction revealed an altered expression of 13 proteins from the exponential and 25 proteins from the stationary phase. 2-D analysis of the secretome exhibited a highly increased secretion ability of the *clpX*- and *clpP*-deficient strains in both, exponential and stationary phase, compared to wild type strain 536. In contrast, both mutant strains showed a reduced abundance of the major subunits of S-, P-related, putative CS12-like and type 1-fimbriae as well as the autotransporter protein antigen 43. Additionally, the mutant strains showed a higher expression of flagellin FliC compared to the wild type strain.

Results from proteome studies concerning P-related, S- and type 1-fimbriae as well as flagella expression were confirmed by Western blot-analysis and further phenotypic assays. Additionally, a retarded expression of curli and cellulose at temperatures of 30 °C and below, as well as a “hyperflagellated” phenotype with higher motility could be detected upon *clpX*- and *clpP* deletion. In contrast, ClpXP had no influence on alpha-hemolysin- and lipopolysaccharide expression, serum resistance and *in vivo* virulence of strain 536.

Following transcriptional analysis (semi-quantitative real-time reverse transcription (RT)-PCR) of genes coding for major fimbrial subunits, a reduced transcription of the determinants coding for S- and P-related fimbriae and curli was observed in the *clpX*- and *clpP*-deficient variants. Besides, enhanced transcription of CS12-like and type 1-fimbrial determinants and no differences with respect to transcription of the *pix* fimbrial gene cluster were detected in the *clpX*- and *clpP* mutants relative to the wild type. Transcription of both antigen 43 gene variants, ORF52_{III} and ORF47_V, was negatively influenced upon *clpX*- and *clpP* deletion and the relative expression was reduced compared to the wild type. Furthermore, it has been shown, that ClpXP had no influence on the “master regulator gene” *flhC* of flagellar regulation cascade, but enhanced transcription of genes from operons downstream of *flhC*, like *fliA* and *fliC*. These results suggest that ClpXP plays a role as a negative regulator of flagella regulation at the post-transcriptional or post-translational level. Many of the observed effects, particularly on flagellar- and fimbrial gene expression, are due to malfunction of RpoS, which is degraded especially by ClpXP. Additionally, the obtained results indicate that Lrp, a global regulator that plays a dominant role in fimbrial gene expression, is influenced, directly or indirectly by ClpXP and that therefore the corresponding regulatory networks are disordered in *clpX* and *clpP* mutants.

Like ClpXP, the transcriptional antiterminator RfaH influences the expression of antigen 43. In this context, the influence of both antigen 43 variants, ORF52_{III} and ORF47_V, on the autoaggregation phenotype of *E. coli* 536 and its *rfaH*-negative mutant was analysed. There was enhanced autoaggregation in the *rfaH*-negative background, but no influence of ORF52_{III} and ORF47_V on this enhanced autoaggregation detectable.

II. Einleitung

1. Regulation Virulenz-assoziiierter Gene

Die meisten Virulenz-assoziierten Gene werden nicht ständig exprimiert, sondern durch das Eindringen in den Wirtsorganismus oder bestimmte Umweltsignalen, z.B. Temperatur, Osmolarität, Sauerstoffgehalt oder der Verfügbarkeit von Kohlenstoffquellen reguliert. Eine Zelle reagiert auf veränderte Lebensbedingungen mit einer koordinierten Expression ihrer Gene durch regulatorische Netzwerke, wobei die Regulation der Genexpression auf mehreren Ebenen stattfinden kann. Bei Prokaryoten erfolgt sie meist auf Ebene der Transkription durch spezifische Regulatorproteine, Aktivatoren und Repressoren. Zudem findet Regulation aber auch auf posttranslatorischer Ebene sowie durch kontrollierte Proteolyse regulatorischer Proteine statt (siehe II. 2.4.).

Ein entscheidendes Merkmal der regulatorischen Netzwerke ist, dass mehrere Regulatoren bei der Expression eines Gens oder einer Virulenzdeterminante zusammenwirken, sich gegenseitig verstärken oder hemmen können und dadurch eine Feinabstimmung bei der Expression erzielen.

Regulation kann andererseits auch in streng hierarchischer Ordnung ablaufen, wobei die Aktivierung eines Gens die in der Hierarchie tiefer stehenden Gene aktivieren kann. Ein Beispiel für diese Art der Regulation ist die Flagellen-Regulationskaskade (Macnab, 1992; Soutourina und Bertin, 2003).

Da Regulation auch durch kontrollierte Proteolyse stattfinden kann, soll der Einfluss der Protease ClpXP auf ausgewählte regulatorische Proteine und die Expression Virulenz-assoziiierter Gene untersucht werden.

2. Molekulare Chaperone und Proteasen

Die Polypeptidsequenz, als Grund- oder Primärstruktur von Proteinen, entsteht durch Transkription und anschließender Translation der DNA, welche den genetischen Code für die Aminosäureabfolge enthält. Um aber aus neusynthetisierten Polypeptidketten funktionsfähige Proteine mit stabiler dreidimensionaler Struktur zu bilden, bedarf es der Hilfe von

molekularen Chaperonen. Diese Proteine helfen beim korrekten Aufbau und der richtigen Faltung von Polypeptiden, wobei sie aber selbst an der entstehenden Struktur nicht beteiligt sind (Wawrzynow *et al.*, 1996). Demgegenüber sind Proteasen für den Abbau von beschädigten, fehlgefalteten oder nicht mehr benötigten Proteinen verantwortlich.

2.1. Proteasen und Chaperone von *E. coli*

Escherichia coli verfügt über eine Reihe von Chaperonen, welche teilweise auch Komponenten von Proteasekomplexen darstellen können. Da viele Chaperone durch Temperaturerhöhungen induziert werden, zählt man sie zu den Hitzeschockproteinen (Hsp). Durch Hitzeschock nimmt die Anzahl fehlgefalteter Proteine zu und damit kommt es zu einem erhöhten Bedarf an Chaperonen.

Generell unterscheidet man zwischen ATP-abhängigen und ATP-unabhängigen Chaperonen. DnaK (Hsp70), GroEL (Hsp60 oder Chaperonine) und Clp (Hsp100) sind Beispiele für ATP-abhängige Chaperone, die untereinander sehr ähnlich sind und in allen prokaryotischen und eukaryotischen Zellen vorkommen (Wickner *et al.*, 1999). *E. coli* verfügt außerdem über ATP-unabhängige Chaperone wie den Triggerfaktor Tig, eine Peptidyl-prolyl-Isomerase, und Disulfid-Isomerasen (Wong und Houry, 2004). Zusätzlich kommt noch das Chaperon HtpG (Hsp90) vor, das durch Hitzeschock sehr stark exprimiert wird und aus mehreren Komponenten besteht, aber nicht weiter charakterisiert ist (Bardwell und Craig, 1988).

Proteasen sind für den Abbau von Proteinen zu Peptiden verantwortlich, wobei man auch hier zwischen ATP-unabhängigen und ATP-abhängigen Proteasen unterscheiden kann. In *E. coli* sind drei ATP-abhängige Proteasen bekannt:

Die Protease Lon ist für die Degradation vieler fehlgefalteter und regulatorischer Proteine verantwortlich, wie z. B. den Zellteilungsregulator Sul oder RcsA, einem Regulator der Kapselbiosynthese (Gottesman, 1996). FtsH, eine membrangebundene Protease, die sowohl zytoplasmatische als auch Membranproteine degradiert (Herman *et al.*, 2003), ist die einzige essentielle ATP-abhängige Protease in *E. coli* (Gottesman, 1996).

Als drittes ist die große Familie der Clp Proteasen zu nennen. Im Gegensatz zu Lon und FtsH, bei welchen die ATPase- und Protease-Domänen auf einem einzigen Polypeptidstrang lokalisiert sind, bestehen die Clp Proteasen aus unabhängigen, räumlich getrennten Protease- und ATPase-Untereinheiten. Zu der Clp Familie zählt man die Proteasen ClpP und HslU (ClpY) sowie die ATPasen ClpA, ClpX und HslV (ClpQ), die wie oben erwähnt gleichzeitig

als Chaperone wirken können. Der Name Clp beruht auf der Fähigkeit dieser Proteasen, Kasein zu degradieren (caseinolytic proteases) (Schirmer *et al.*, 1996). Während die ATPase HslU nur mit der Threoninprotease HslV interagieren kann (Kessel *et al.*, 1995; Rohrwild *et al.*, 1996), hat die Serinprotease ClpP die Möglichkeit, mit ClpA oder ClpX als ATPase zu agieren (Gottesman *et al.*, 1993; Katayama *et al.*, 1988).

Die Clp ATPasen werden der AAA⁺ Superfamilie (ATPases associated with a variety of cellular activities) (Neuwald *et al.*, 1999) zugeordnet, da sie eine Vielzahl an unterschiedlichen und lebensnotwendigen Prozessen in der Bakterienzelle wie z.B. Zellteilung und Thermotoleranz kontrollieren. Eng definiert umfaßt diese Familie die Clp oder Hsp 100 Proteine. Neben ClpA, ClpX und HslV gehört aber auch ClpB und sein eukaryotisches Homolog Hsp 104 aus *Saccharomyces cerevisiae* zu dieser Gruppe, obwohl diese nicht mit einer Protease interagieren können.

Neben den ATP-abhängigen kommen bei *E. coli* zusätzlich zwei ATP-unabhängige Proteasen vor. DegP und HtrA zählen zu den Serinproteasen und sind bevorzugt in extrazytoplasmatischen Kompartimenten wie dem Periplasma lokalisiert (Hengge und Bukau, 2003), wobei DegP Chaperon- und Proteaseaktivität besitzt.

2.2. Funktionsweise von Chaperonen und Proteasen

Molekulare Chaperone katalysieren die Faltung neu entstandener Proteine und helfen so bei der Entstehung ihres nativen, funktionsfähigen Zustandes und schützen sie vor Aggregation. Proteolyse hingegen wird immer dann notwendig, wenn Proteine aufgrund von Mutationen, fehlerhafter Transkription oder Translation nicht korrekt gefaltet sind. Zusätzlich können Schäden durch Hitzeschock oder andere Stressfaktoren, wie oxidativer Stress oder pH-Verschiebung, entstehen. Durch die Proteolyse wird somit der geregelte Abbau nicht funktionaler Proteine gewährleistet und sie stellt eine Qualitätskontrolle für Proteine dar. Der Zelle werden durch die Proteolyse wieder Peptide für die Synthese neuer Proteine zur Verfügung gestellt. Dieses „Recycling“ hat besondere Bedeutung unter Mangelbedingungen. Ein anderer Aspekt der Proteolyse betrifft ihre regulatorische Funktion durch selektiven Abbau kurzlebiger Proteine. Da viele Proteine ihre regulatorische Funktion nur in einem sehr begrenzten Zeitraum ausüben, muss gewährleistet sein, dass das Protein zum richtigen Zeitpunkt wieder abgebaut wird.

Es stellt sich nun die Frage wie Chaperone oder die regulatorischen Untereinheiten der Proteasen Lon und Clp fehlgefaltete bzw. beschädigte von nativen Proteinen unterscheiden können. Schon bis zu 40 % der neu synthetisierte Proteine sind mit den Chaperonen GroEL und DnaK assoziiert (Deuerling *et al.*, 1999; Teter *et al.*, 1999). Diese erkennen und binden an hydrophobe Peptidsequenzen, welche von basischen Aminosäureresten flankiert sind (Bukau und Horwich, 1998; Smith *et al.*, 1999).

Die Funktion dieser hydrophoben Sequenzen ist es, zwischen nativen (richtig gefalteten, zusammengebauten und modifizierten) Proteinen und allen nicht-nativen (teilweise ungefalteten, fehlgefalteten oder aber nicht eingebauten Untereinheiten von Komplexen) zu unterscheiden. Sind diese nicht-nativen Proteine erkannt, ist die Zelle zunächst versucht, die Fehlfaltung mit Hilfe der Chaperone zu beseitigen. Gelingt dies, steht am Ende ein natives Protein das seine Funktion ausüben kann, da alle hydrophoben Sequenzen beseitigt wurden und es nicht mehr durch Chaperone erkannt wird. Verlässt ein Protein das Chaperon weiterhin fehlgefaltet, hat erneut ein Chaperon die Möglichkeit, den Fehler zu beheben. Wird das denaturierte Protein allerdings vorher von einer Protease erkannt, kommt es zur Degradation. Somit stehen Reparatur durch Chaperone und Abbau durch Proteasen in einem Gleichgewicht. Übersteigt die Anzahl fehlgefalteter Proteine die Kapazität der vorhandenen Chaperone und Proteasen, kann dies mit Hilfe der hydrophoben Peptidabschnitte zur Bildung von Aggregaten führen, welche sich in sogenannten „inclusion bodies“ ansammeln (Goldberg, 1992). Diese Aggregate können wieder durch die Wirkung der Chaperone abgebaut und neu gefaltet werden (Wickner *et al.*, 1999). Die Zusammenhänge sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

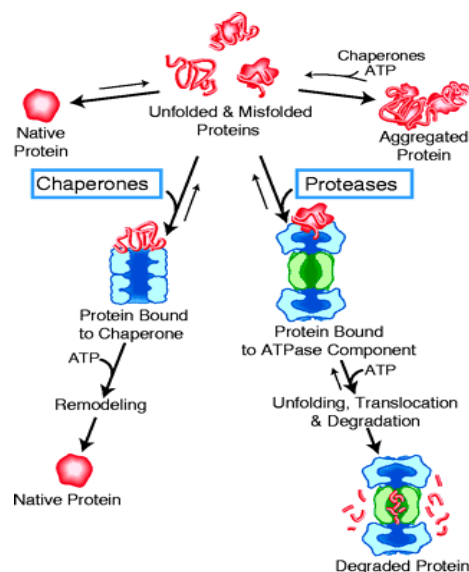


Abb. 1: Zusammenwirken von Chaperonen und Proteasen bei der Reaktion mit nicht-nativen Proteinen (aus: Wickner *et al.*, 1999; für weitere Erläuterungen siehe Text).

2.3. Aufbau und Funktion von ClpXP

Durch die Anwendung neuer Methoden wie Röntgenstrukturanalyse und NMR-Spektrometrie sowie durch elektronenmikroskopische Studien ist es heute möglich, die Struktur von Proteinen zu bestimmen. So wurde für die Protease ClpP ein Aufbau aus zwei Ringen, die aus jeweils sieben identischen Untereinheiten gebildet werden und gestapelt als tonnenförmiger Komplex vorliegen, ermittelt. Diese zwei Ringe bilden eine innere Kammer, welche die 14 reaktiven Zentren der einzelnen Untereinheiten umschließt (Wang *et al.*, 1997 und Abb. 2).

Die regulatorische ATPase ClpX, welche aus Ringen von jeweils sechs identischen Untereinheiten gebildet wird, sitzt den Öffnungen des Proteasekomplexes auf und gewährt den spezifischen Substraten Zugang zu den proteolytischen Einheiten (Grimaud *et al.*, 1998). Die einzelnen ClpX-Untereinheiten weisen spezifische Peptidsequenzen auf, welche als „IFG-loops“ bezeichnet werden. Diese erkennen ClpP als proteolytische Einheit und können mit ihr reagieren (Joshi *et al.*, 2004). Das Tripeptid IGF (Ile-Gly-Leu) ist auf jeden Fall essentiell für die Erkennung von ClpP, wobei jede AAA^+ ATPase, die mit ClpP homologen Proteasen reagiert, IGF-loop-ähnliche Peptidsequenzen besitzt (Kim *et al.*, 2001).

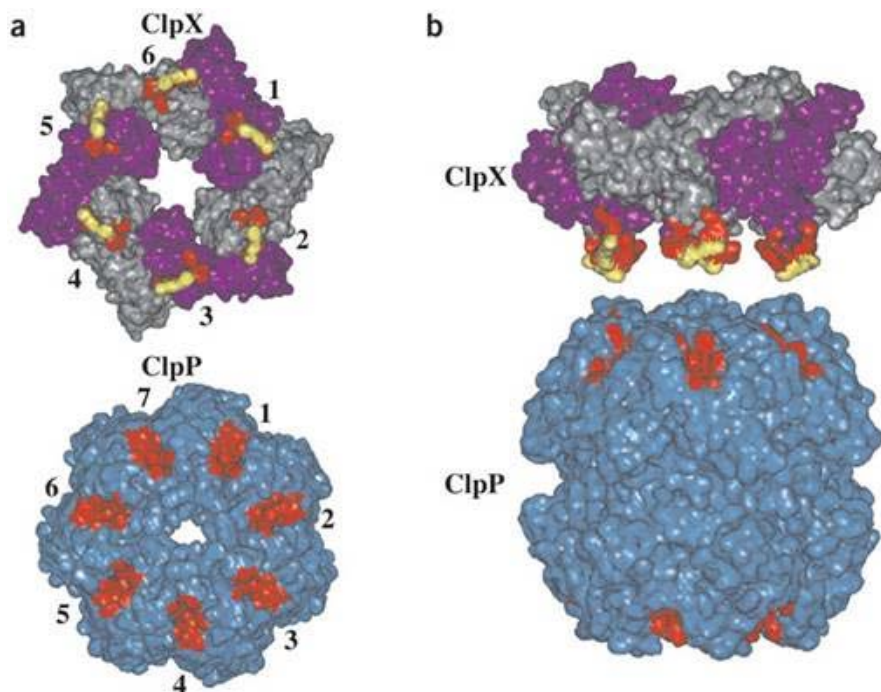


Abb. 2: Struktur von ClpXP: Aufsicht (a) und Seitenansicht (b). Die Untereinheiten von ClpX sind in lila und grau, von ClpP in blau dargestellt. Der Teil der IGF-loops, welcher die Bindung an ClpP vermittelt ist in rot dargestellt, das „signature tripeptide“ Erkennungstripeptid an der Spitze in gelb. Die reaktiven Zentren in ClpP sind gleichfalls in rot dargestellt (aus: Joshi *et al.*, 2004).

ClpA und ClpX sind ähnlich gebaut, unterscheiden sich aber durch ihre Anzahl ATP-bindender Domänen (nucleotide-binding domains, NBD). Während ClpA über zwei dieser NBD verfügt, besitzt ClpX, wie auch HslU, nur eine NBD.

ClpX bindet spezifisch an die zu degradierenden Proteine, entfaltet sie und transportiert das entfaltete Protein in die ClpP-Untereinheit (Abb. 3). Wie dies mechanistisch vonstatten geht, ist noch nicht genau geklärt, da ein Sechsring und ein Siebenring symmetrisch nicht miteinander reagieren können. Auch ist bisher unbekannt, wie viele IGF-loops von ClpX für eine effektive, funktionelle Interaktion mit ClpP benötigt werden (Joshi *et al.*, 2004). Es konnte jedoch bewiesen werden, dass die Bindung von ClpX die Peptidaseaktivität von ClpP aktiviert und umgekehrt die ATPase Aktivität von ClpX durch die Bindung an ClpP gehemmt wird (Kim *et al.*, 2001; Thompson und Maurizi, 1994). Die Affinität von ClpX zu ClpP wird zusätzlich durch die Bindung an ATP verstärkt. Die Bindung von ClpP an ClpX ist am stärksten, wenn die ATPase ein Proteinsubstrat denaturiert, weniger stark während der Translokation des Substrates in ClpP und am schwächsten, wenn kein Substrat vorhanden ist. ClpX kann zudem am Status der katalytischen Zentren von ClpP erkennen, ob sie mit dem Abbau eines Proteins beschäftigt sind (Joshi *et al.*, 2004).

In der ClpP-Untereinheit wird das ungefaltete Polypeptid relativ rasch in kurze Peptide gespalten. Während das Lösen der einzelnen Bindungen während der Entfaltung und der Transport in die ClpP-Untereinheit Energie in Form von ATP verbraucht, bedarf die Spaltung des Polypeptids in kurze Peptide keine weitere Energie mehr.

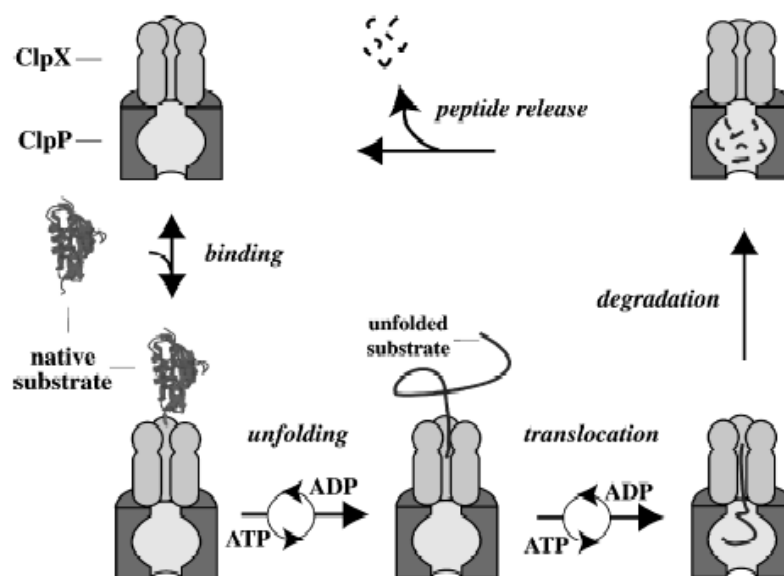


Abb.3: Schematische Darstellung der Funktionsweise von ClpXP (aus: Kenniston *et al.*, 2004).

Aufbau und Funktion des prokaryotischen ClpXP Systems finden ihre Entsprechung in dem eukaryotischen 26S-Proteasom (Wang *et al.*, 1998). Es baut, nach regulierter Modifikation mit Ubiquitin, den Großteil der eukaryotischer Proteine ab, wobei noch zusätzliche regulatorische Komponenten beteiligt sind.

2.4. Adapterproteine

Um neben dem Abbau fehlgefalteter Proteine auch eine regulatorische Funktion ausüben zu können, werden für die Proteolyse bestimmter Substrate zusätzlich noch Adapterproteine benötigt. Da manche Proteine nur zu sehr begrenzten Zeiträumen verfügbar sein sollen, z.B. während bestimmter Wachstumsphasen, muss ein schneller Abbau gewährleistet sein. Weil diese Proteine aber noch funktionstüchtig sind, müssen sie für den Abbau durch ClpXP markiert oder modifiziert werden, damit sie erkannt werden.

Adapterproteine sind meist kleinere Proteine, die entweder spezifisch die Chaperonaktivität oder aber die Bindungsspezifität von AAA⁺ Proteinen verändern (Dougan *et al.*, 2003; Levchenko *et al.*, 2003). ClpX ist in dieser Hinsicht einzigartig, da es beide Arten von Adapterproteinen verwendet.

Das Protein SspB ist direkt am Ribosom lokalisiert und verstärkt die ClpXP-abhängige Proteolyse von bestimmten markierten Proteinen, indem es direkt mit dem Substrat reagiert (Flynn *et al.*, 2004). Diese Proteine enthalten eine Sequenz von 11 Aminosäuren an ihrem C-terminalen Ende (AANDENYALAA), die auch als „ssrA-tag“ bezeichnet und von ClpX erkannt wird. Diese ssrA-Markierung wird an unfertige Peptide angehängt, die am Ribosom blockiert sind, weil ihnen das Stopcodon z.B. bei einer verkürzten mRNA fehlt (Gottesman *et al.*, 1998; Karzai *et al.*, 2000).

Ein weiteres Adapterprotein, RssB (Regulator of Sigma S) oder SprE (stationary phase regulator), verstärkt spezifisch die Aktivität von ClpXP. Es ist der Antwortregulator eines Zweikomponentensystems, der nach Aktivierung durch Phosphorylierung eine hohe Affinität zu RpoS (σ^S) hat. RssB ist essentiell für die Degradation des alternativen Sigmafaktors σ^S durch ClpXP (Zhou *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu anderen ClpXP Substraten wird RpoS allein nicht von ClpXP erkannt, erst in Komplex mit RssB erfolgt der Abbau (Hengge-Aronis, 2002b). Durch die Phosphorylierung von RssB werden die Bindung zu ClpXP und der Abbau verstärkt, ohne dass RssB selbst abgebaut wird. Es wird allerdings

nicht für die Degradation anderer ClpXP Substrate, z.B. des λ O Proteins, benötigt und ist deshalb RpoS-spezifisch (Dougan *et al.*, 2002).

ClpA kann ebenfalls mit einem Adapterprotein, ClpS, interagieren. Im Gegensatz zu dem am Ribosom lokalisierten Adapterproteins SspB, das *ssrA*-markierte Proteine dem ClpXP-System zuführt, blockiert ClpS die Bindung *ssrA*-markierter Substrate mit ClpA. Damit kann zwar ClpA auch *ssrA*-markierte Proteine abbauen, der Großteil dieser markierten Proteine wird allerdings von ClpXP abgebaut (Gottesman *et al.*, 1998). Der selektive Abbau von σ^S durch ClpXP wird auf diese Weise noch zusätzlich verstärkt. Inhibiert wird der Abbau von σ^S durch die Wirkung von DnaK.

2.5. Funktion von ClpXP und ClpXP-verwandten Proteinen in anderen Organismen

In vielen Bakterien wurde gezeigt, dass ClpXP bzw. ClpXP-ähnliche Proteine eine wichtige Rolle in der Regulation und Expression von Virulenz-assoziierten Funktionen hat. In *Salmonella enterica* serovar Typhimurium hat ClpXP Einfluss auf die Flagellenbiosynthese und agiert als negativer Regulator, indem die Expression von Genen der Flagellenkaskade der Klassen 2 und 3 hochreguliert wird, während die Expression des für den „master regulator“ FlhD/C kodierenden Operons relativ konstant bleibt (Tomoyasu *et al.*, 2002). Arbeiten von Tomoyasu und Mitarbeitern deuten darauf hin, dass FlhD/FlhC ein Substrat für die Degradierung durch ClpXP ist (Tomoyasu *et al.*, 2003). Die Deletion von *clpP* führt zusätzlich zu einer verminderten Virulenz von *Salmonella typhimurium* in Mäusen sowie in Makrophagen (Webb *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 2001).

ClpP reguliert in *Yersinia enterocolitica* die Transkription der *ail* Gene, welche für die Serumresistenz sowie Adhäsion und Invasion von Zellen und damit für die Virulenz dieser Bakterienart verantwortlich sind (Pederson *et al.*, 1997). Weiterhin wurde gezeigt, dass ClpP in *Pseudomonas fluorescens* in die Biofilmbildung involviert ist (O'Toole und Kolter, 1998).

In dem Gram-positiven Bodenbakterium *Bacillus subtilis* sind ClpXP oder ClpCP essentiell für die Regulation der Genexpression, der Zellteilung, Motilität, aber auch für die Entwicklung der Sporulation und Kompetenz (Turgay *et al.*, 1998). Die Deletion von *clpP* führt zu filamentösen, unbeweglichen Zellen (Msadek *et al.*, 1998), zudem ist das Wachstum in den Mutanten oder unter bestimmten Stressfaktoren, vor allem unter Hungerbedingungen

(Gerth *et al.*, 1998) und hohen Temperaturen (Msadek *et al.*, 1998) gestört. Es sind drei Clp ATPasen in *B. subtilis* bekannt, ClpA, ClpC und ClpE, welche mit ClpP agieren können. Auch in anderen Gram-positiven Organismen spielen die Clp Proteine eine wichtige Rolle. In *Lactococcus lactis* z.B. führt die Deletion von *clpP* zum Verlust der Lebensfähigkeit der Bakterien (Frees und Ingmer, 1999). Auch haben sie einen wichtigen Einfluss auf die Virulenz vieler Organismen z.B. ClpXP von *Staphylococcus aureus* (Frees *et al.*, 2003; Mei *et al.*, 1997), ClpE und ClpC von *Streptococcus pneumoniae* (Lau *et al.*, 2001) oder ClpC, ClpE und ClpP von *Listeria monocytogenes* (Gaillot *et al.*, 2000).

In dem Eubakterium *Caulobacter crescentus* ist ClpXP für die Degradation von regulatorischen Proteinen verantwortlich, welche den Zellzyklus steuern. Deletionsmutanten von *clpX/clpP* sind im Zellzyklus vor der Replikation der Chromosomen arretiert und gleichzeitig für die Zellteilung blockiert. Das ClpXP-System ist für den Abbau von CtrA verantwortlich, dem Responseregulator eines Zweikomponentensystems, welcher verschiedene Aufgaben bei der Regulation des Zellzyklus übernimmt (Jenal und Fuchs, 1998).

3. *Escherichia coli*

Die Proteolyse ist für die Kontrolle und Verfügbarkeit einer großen Anzahl von Enzymen und regulatorischer Proteine sowie für den Abbau fehlgefalteter Proteine verantwortlich und stellt somit eine wichtige Funktion für jeden Organismus, so auch für *Escherichia coli*, dar.

E. coli ist ein Gram-negatives, peritrich begeißeltes, fakultativ anaerobes Stäbchen, das als Kommensale 0,06 % der Flora des menschlichen Intestinaltraktes ausmacht und auch in vielen Tierarten vorkommt. *E. coli* kolonisiert den Darmtrakt Neugeborener innerhalb weniger Stunden. Neben diesen apathogenen, teils auch probiotischen Vertretern der Art gibt es jedoch auch zahlreiche pathogene Varianten. Diese Pathotypen können im Menschen und in verschiedenen Tierarten unterschiedliche Infektionskrankheiten hervorrufen, wobei man zwischen intestinalen und extraintestinalen Infektionen unterscheidet.

Die intestinalen *E. coli* Pathotypen untergliedern sich in (i) enterotoxische *E. coli* Stämme (ETEC), die ein der Cholera ähnliches Krankheitsbild hervorrufen, (ii) enteropathogene *E. coli* (EPEC), die Durchfallerkrankungen bei Säuglingen zur Folge haben, (iii) enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC), welche blutige Diarrhö verursachen und zu Nierenversagen mit Folgeschäden führen können. (iv) Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) lösen ein der Ruhr

ähneldes Krankheitsbild aus, und (v) enteroaggregative (EAEC) *E. coli* Stämme können zu persistierenden Durchfallerkrankungen führen (Hacker und Heesemann, 2000).

Zu den Auslösern extraintestinaler Infektionen zählen neben Sepsis auslösenden *E. coli* (SEPEC) auch Neugeborenen-Meningitis auslösende (MENEK) und uropathogene (UPEC) *E. coli* Stämme (Hacker und Heesemann, 2000).

3.1. Uropathogene *E. coli* (UPEC) und Harnwegsinfektionen

Uropathogene *E. coli* verursachen über 80 % unkomplizierter bakterieller Harnwegsinfektionen (HWIs) beim Menschen. Aufgrund der Anatomie des weiblichen Urogenitaltraktes sind weit mehr Frauen aller Altersstufen als Männer betroffen. Mehr als 50 % aller Frauen erleiden mindestens einmal in ihrem Leben eine Harnwegsinfektion (Barnett und Stephens, 1997).

HWIs stellen eine weltweit primäre Morbiditätsursache im ambulanten, stationären sowie im Pflege- und Rehabilitations-Bereich dar. In Deutschland geht man von jährlich etwa 2 Millionen Fällen aus, die ärztlich behandelt werden müssen (Hacker und Heesemann, 2000). HWIs sind meist aufsteigende Infektionen, bei denen die Erreger spontan oder durch Katheterisierung über die Harnröhre in die Harnblase gelangen können. Steigen sie weiter über den Harnleiter in das Nierenbecken auf, können sie dort eine schmerzhafte Nierenbeckenentzündung (Pyelonephritis) auslösen. In 95 % der Fälle handelt es sich jedoch um eine Infektion der Harnblase (Cystitis) (Meyrier, 1999).

3.2. Pathogenitätsinseln des uropathogenen *E. coli* Stammes 536

Genomische Inseln stellen neben Plasmiden, IS-Elementen und Transposons einen häufig auftretenden Typ genetischer Elemente innerhalb des flexiblen Genpools dar (Dobrindt *et al.*, 2002). Sind auf diesen genomischen Inseln Virulenzfaktoren lokalisiert, bezeichnet man sie als Pathogenitätsinseln (PAIs) (Hacker *et al.*, 1983). Bisher wurden bei dem uropathogenen *E. coli* Stamm 536 (O6:K15:H31) sechs Pathogenitätsinseln identifiziert, welche als PAI I₅₃₆ - PAI VI₅₃₆ bezeichnet werden (Dobrindt *et al.*, 2002; Schneider *et al.*, 2004 und Tab. 1). Diese PAIs haben eine Größe von über 10 kb, sind mit tRNA-Genen assoziiert, besitzen einen GC-Gehalt, der sich vom Rest des Genoms unterscheidet, haben flankierende Repeat-Strukturen (DR) und sind mit mindestens einer Virulenzdeterminante assoziiert (Hacker und Kaper, 2000).

Tab. 1: Übersicht über *E. coli* 536-spezifische PAIs und ihre Eigenschaften.

Name	Virulenzfaktoren	tRNA	Größe	DRs
PAI I ₅₃₆	α-Hämolyisin putative F17-Fimbrien putative CS12-ähnliche Fimbrien	<i>selC</i>	76,8 kb	16 bp
PAI II ₅₃₆	α-Hämolyisin Prf-Fimbrien	<i>leuX</i>	102,2 kb	18 bp
PAI III ₅₃₆	S-Fimbrien (SfaI) Salmochelin Antigen 43 _{III}	<i>thrW</i>	68,1 kb	48 bp
PAI IV ₅₃₆	Yersiniabaktin	<i>asnT</i>	30 kb	(17 bp)
PAI V ₅₃₆	Kapselbiosynthese Antigen 43 _V	<i>pheV</i>	79,6 kb	23 bp
PAI VI ₅₃₆	Polyketidsynthese	<i>asnW</i>	54,4 kb	16 bp

Neben PAI-kodierten Virulenzfaktoren verfügt *E. coli* 536 zusätzlich über weitere Virulenz-assoziierte Faktoren wie Typ 1-Fimbrien und Curli, die chromosomal kodiert werden. Neben dem flexiblen Genpool besteht das *E. coli* Genom aus konservierten Kerngenombereichen, die in der Regel nicht für Virulenzfaktoren kodieren.

3.3. Virulenzfaktoren des uropathogenen Isolates *E. coli* 536

Uropathogene *E. coli* Stämme unterscheiden sich von apathogenen *E. coli* durch die Expression von Virulenzfaktoren, die es ihnen ermöglichen den menschlichen Urogenitaltrakt zu kolonisieren, die Abwehrmechanismen des Wirtes zu umgehen und somit Krankheiten auszulösen. Im Folgenden werden relevante Virulenzfaktoren näher beschrieben.

Adhäsine ermöglichen den ersten Schritt einer Infektion, nämlich die Bindung der Bakterien an bestimmte Wirtszellen. Durch dieses Anhaften wird ein Ausschwemmen der Bakterien, z.B. durch Harnfluss verhindert.

E. coli 536 exprimiert eine Reihe unterschiedlicher Fimbrienadhäsine (siehe Tab. 1 und Abb. 4). Diese erkennen unterschiedliche Rezeptoren, besitzen aber eine ähnliche Grund-

struktur. So bestehen die Fimbriendeterminanten aus mehreren Genen, die für die Regulation der Expression, die Bildung der Hauptstruktureinheiten, sowie für den Transport und den Zusammenbau der einzelnen Komponenten verantwortlich sind. Das Adhäsion und einige der Nebenuntereinheiten sind für die spezifische Bindung an kohlehydrathaltige Strukturen der Oberflächen eukaryotischer Zellen verantwortlich. Die Synthese, der Export und der korrekte Aufbau der Fimbrien erfolgt nach streng geordneten Regeln (Smyth *et al.*, 1996).

Obwohl Typ 1-Fimbrien auch von apathogenen *E. coli* Isolaten exprimiert werden, sind sie die am häufigsten vorkommenden Adhäsine uropathogener *E. coli* Stämme. Sie bewirken die Bindung der Bakterien an mannosehaltige Glykoproteine, die auf zahlreichen Wirtszellen, z.B. Epithelzellen des unteren Harntraktes, Erythrozyten, Mastzellen und Makrophagen vorhanden sind (Mulvey, 2002; Mulvey *et al.*, 1998). Zusätzlich sind sie an der Internalisierung der Bakterien beteiligt (Hultgren *et al.*, 1985; Martinez und Hultgren, 2002; Martinez *et al.*, 2000).

Die Familie der S-Fimbrien (*sfa*, *foc*, *fac*, *sfr*) ist zur Bindung an eine Vielzahl von Zelltypen fähig. Neben ihrem Vorkommen in UPEC Stämmen spielen sie auch bei Sepsis- und Neugeborenen-Meningitis auslösenden Stämmen eine Rolle (Korhonen *et al.*, 1985). *E. coli* 536 exprimiert SfaI-Fimbrien. Diese binden an sialylsäurehaltige Rezeptoren, welche auf vielen Zellen im Harntrakt vorhanden sind. Etwa 20 % der UPEC produzieren S-Fimbrien, wohingegen fast 80 % der pathogenen *E. coli* Stämme P-Fimbrien produzieren (Donnenberg und Welch, 1996). Vor allem bei Pyelonephritis assoziierten UPEC Stämmen spielen P-Fimbrien eine wichtige Rolle (Wullt *et al.*, 2002). *E. coli* 536 exprimiert Prf- (P related fimbriae) Fimbrien, wobei es verschiedene Typen von P-Fimbrien (*pap*, *prf*, *prs*) gibt, die jedoch alle an α -D-Gal-(1,4)- β -D-Gal-haltige Glykolipidrezeptoren binden. Sie vermitteln die Bindung der Bakterien an Epithelzellen des Urogenitaltraktes und an das Gefäßendothel der Nieren. P-Fimbrien besitzen, genau wie S-Fimbrien, die Fähigkeit, Erythrozyten zu agglutinieren.

Die meisten uropathogenen *E. coli* Stämme exprimieren Curli-Fimbrien. Diese proteinösen flexiblen Filamente der extrazellulären Matrix sind im Gegensatz zu Fimbrienadhäsinen aus nur einer Art Untereinheit aufgebaut und können an eine Reihe von Humanproteinen, z.B. Fibrinogen, Plasminogen, Laminin und Fibronektin (Arnqvist *et al.*, 1992; Ben Nasr *et al.*, 1996; Olsen *et al.*, 1989; Sjobring *et al.*, 1994) binden. Es wird vermutet, dass Curli nur eine Rolle in dem Anfangsstadium einer Infektion spielen, da sie häufig bei 30 °C und

niedrigeren Temperaturen exprimiert werden (Olsen *et al.*, 1993). In den letzten Jahren wurden Isolate beschrieben, die eine Coexpression von Curli-Fimbrien und Cellulose (rdar Morphotyp) sowohl bei 30 °C als auch bei 37 °C aufweisen. Die Rolle dieser Fähigkeit für das Überleben und die Kolonisation des Wirtes ist allerdings noch unklar (Zogaj *et al.*, 2001). Die Gene für die Synthese von Curli-Fimbrien und Cellulose (*csg* bzw. *bcs*) sind auf dem Kernchromosom von *E. coli* lokalisiert.

Antigen 43 (Ag43) ist ein mögliches Adhäsion, das von den meisten *E. coli* Stämmen, v. a. von pathogenen Stämmen gebildet wird (Owen *et al.*, 1996). *E. coli* 536 besitzt zwei Ag43-kodierende ORFs, ORF52_{III} und ORF 47_V. Diese Proteine vermitteln die Aggregation Ag43 exprimierender Bakterien untereinander, was in einem Ausflocken und Absetzen der Bakterien sichtbar wird (Klemm *et al.*, 2004). Diese Autoaggregation ist an der Biofilmbildung beteiligt und verstärkt die Resistenz gegenüber antimikrobieller Substanzen. Zudem ist es für die Ausbildung einer rauhen Koloniemorphologie verantwortlich (Hasman *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu Prf-, S-, oder Typ 1-Fimbrien ist Ag43 ein Autotransporter, d.h. alle benötigten Informationen für das Passieren der äußeren Membran liegen in dem Protein selbst vor. Es besteht aus einer α - und einer β -Domäne. Während die α -Domäne an der Zelloberfläche lokalisiert ist, stellt die β -Domäne ein integrales Protein der äußeren Membran dar, welches der α -Domäne den Zugang zur Zelloberfläche ermöglicht (Henderson und Owen, 1999).

Der *E. coli* Stamm 536 ist zusätzlich in der Lage, das Toxin α -Hämolyysin zu produzieren (Mühdorfer und Hacker, 1994). α -Hämolyysin bewirkt die Ca^{2+} -abhängige Porenbildung in eukaryotischen Lipid-Doppelschichten und die Lyse von Erythrozyten, Leukozyten oder Epithelzellen. Es wird über das Typ 1-Sekretionssystem aus der Zelle sezerniert und ist unter UPEC weit verbreitet (Holland *et al.*, 1990).

Bei *E. coli* gibt es etwa 100 Kapseltypen (K-Antigene), wobei UPEC Stämme in der Regel 26 verschiedenen K-Antigenen zugeordnet werden können; die häufigsten Varianten stellen K1 (31 %) und K5 (35 %) dar (Johnson, 1991). Kapseln schützen die Mikroorganismen vor dem Angriff des Wirtsimmunsystems einerseits durch "molekulares Mimikry", andererseits indem sie die Opsonisierung der Bakterien durch das Komplementsystem des Wirtes

verhindern (Moxon und Kroll, 1990) und tragen somit zur Virulenz eines Stammes bei. *E. coli* 536 bildet eine Kapsel vom Typ K15 aus.

Aufgrund seines glatten Lipopolysaccharid (LPS) Phänotyps (O6 Antigen) ist *E. coli* 536 serumresistent. Das LPS Gram-negativer Bakterien ist der Hauptbestandteil der äußeren Membran, wobei das O-Antigen mit bis zu 190 verschiedene Varianten die variabelste Komponente des LPS ist (Ørskov und Ørskov, 1992). Die Länge der O-Antigen-Seitenketten hat einen Einfluss auf die Resistenz gegenüber dem Komplementsystem (Porat *et al.*, 1992) und den Schutz vor Phagozytose (Reeves, 1995). Neben Faktoren, die bislang als relevant für die Pathogenität von *E. coli* identifiziert wurden, exprimiert der Stamm 536 eine Flagelle vom Serotyp H31.

Der *E. coli* Stamm 536 verfügt über verschiedene Eisenaufnahmesysteme (siehe Tab.1 und Abb. 4), die es dem Bakterium ermöglichen mit dem Wirtsorganismus um das verfügbare Eisen zu konkurrieren. Eisen ist ein essentieller Wachstumsfaktor für fast alle Bakterien, da es als Cofaktor für viele Stoffwechselprozesse unerlässlich ist.

In der folgenden Abbildung sind alle relevanten Virulenzfaktoren des uropathogenen *E. coli* Stammes 536 dargestellt.

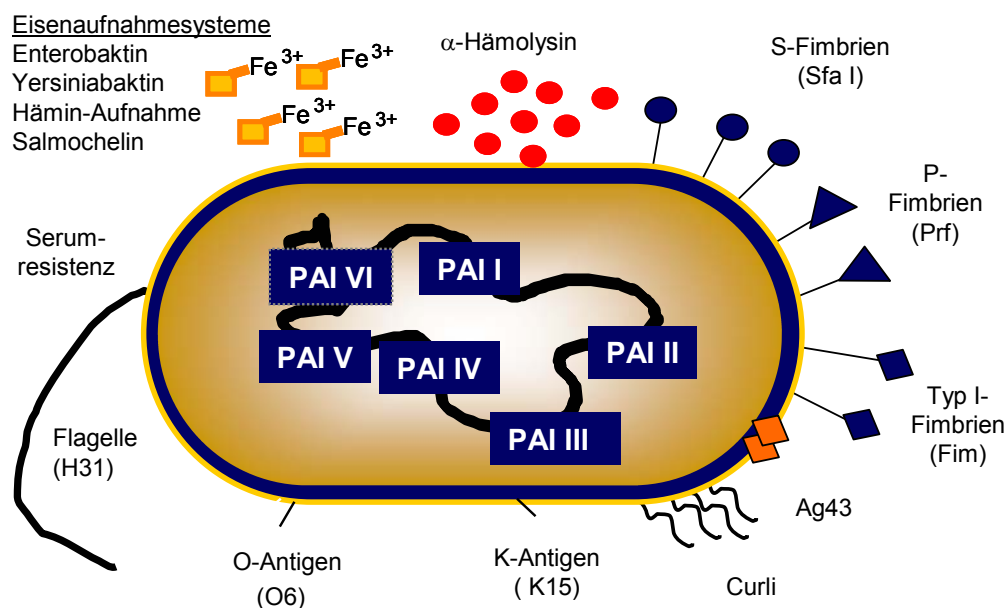


Abb. 4: Virulenzfaktoren des uropathogenen Stammes *E. coli* 536 (J. Hacker, modifiziert).

4. Zielsetzung der Arbeit

Die Regulation der Expression Virulenz-assoziiierter Gene bei *E. coli* ist komplex. Um ein besseres Verständnis von den beteiligten Faktoren und Mechanismen zu erhalten, sollte die Bedeutung ausgewählter regulatorischer Proteine für die (Virulenz-)Genexpression im uropathogenen *E. coli* Stamm 536 untersucht werden.

Die ATP-abhängige Protease ClpXP ist für die Kontrolle und Verfügbarkeit einer großen Anzahl regulatorischer Proteine sowie für den Abbau fehlgefalteter Proteine im apathogenen *E. coli* K-12 Stammhintergrund verantwortlich. Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Untersuchung des Einflusses dieser Protease auf die Regulation und Expression von Virulenzfaktoren des uropathogenen *E. coli* Stammes 536 auszuweiten. Zu diesem Zweck sollten im ersten Teil der Arbeit Deletionsmutanten von *clpX* und *clpP* hergestellt und im Anschluss chromosomal komplementiert werden. Die resultierenden Stämme sollten zunächst phänotypisch auf die Expression bekannter Virulenzfaktoren wie verschiedene Fimbrienadhäsine, Curli, α -Hämolyisin, Lipopolysaccharide, Flagellen und ihre Serumresistenz hin getestet werden. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte der Einfluss der Protease ClpXP auf das globale Proteinexpressionsmuster des Stammes 536 mit Hilfe der zweidimensionalen (2-D) Gelelektrophorese untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollten sowohl die zytoplasmatischen als auch die extrazellulären Proteine der logarithmischen und stationären Wachstumsphase untersucht werden. Im dritten Teil der Arbeit sollte die Expression von Virulenzdeterminanten, für die phänotypisch eine ClpX- oder ClpP-Abhängigkeit gezeigt werden konnte, auch auf Transkriptionsebene durch semiquantitative Real-Time Reverse Transkription (RT)-PCR (Real-Time PCR) untersucht werden.

Zuletzt sollte der Einfluss des regulatorischen Proteins RfaH, welches als Antiterminator der Transkription spezifischer Operons in *E. coli* und *Salmonella* fungiert, auf die Expression der beiden PAI-kodierten Antigen 43 Orthologe ORF52_{III} und ORF47_V untersucht werden. Die Rolle dieses phasenvariablen äußeren Membranproteins für die Fähigkeit zur Autoaggregation und Biofilmbildung wurde dabei näher überprüft. Zu diesem Zweck sollten Einzel- und Doppelmutanten der beiden Antigen 43 Orthologe im wildtypischen, sowie im *rfaH*-negativen Stammhintergrund hergestellt werden und ihre Fähigkeit zur Autoaggregation getestet werden.

III. Material

1. Bakterienstämme und Plasmide

1.1. Bakterienstämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in den Tabellen 2 und 3 aufgeführt.

Tab. 2: *E. coli* K-12 Stämme

<i>E. coli</i> Stamm	Eigenschaften	Referenz
DH5 α	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , (<i>r_k</i> ⁻ , <i>m_k</i> ⁻), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , Δ (<i>argF-lac</i>)U169, λ ⁻ , ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15	Bethesda Research Laboratories, 1969
HB101	F ⁻ , <i>ara-14</i> , <i>galK2</i> , <i>hsdS20</i> (<i>hsr</i> ⁻ , <i>hsm</i> ⁻), <i>recA13</i> , <i>supE44</i> , <i>lacZ4</i> , <i>leuB6</i> , <i>proA2</i> , <i>thi-1</i> , <i>rpsL20</i> (Sm ^R), <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , λ ⁻	Boyer and Roulland-Dussoix, 1969
AAEC189	YMC9, Δ <i>fim</i> operon, Δ <i>lac</i> , <i>recA</i> , <i>endA5</i>	Gally <i>et al.</i> , 1994
MG1655	F ⁻ , λ ⁻ , <i>ilvG</i> , <i>rfb-50</i> <i>rph-1</i>	Blattner <i>et al.</i> , 1997

Tab. 3: *E. coli* Wildtypstämme und Mutanten

<i>E. coli</i> Stamm	Eigenschaften	Referenz
536	O6:K15:H31, <i>hly</i> ⁺ , <i>fim</i> ⁺ , <i>sfa</i> ⁺ , <i>prf</i> ⁺ , <i>ent</i> ⁺ , <i>fla</i> ⁺ , serumresistent, Sm ^R	Berger <i>et al.</i> , 1982
536-21	aus 536, PAI I ⁻ , PAI II ⁻ , <i>hly</i> ⁻ , <i>fim</i> ⁺ , <i>sfa</i> ⁺ , <i>prf</i> , <i>ent</i> ⁺ , <i>fla</i> ⁺ , serumsensitiv, Sm ^R	Hacker <i>et al.</i> , 1983
536-114	aus 536, PAI I ⁺ , PAI II ⁻ , <i>hly</i> ^{+/-} , <i>fim</i> ⁺ , <i>sfa</i> ⁺ , <i>prf</i> ⁺ , <i>ent</i> ⁺ , <i>fla</i> ⁺ , serumsensitiv, Sm ^R	Hacker <i>et al.</i> , 1983
536-225	aus 536, PAI I ⁺ , PAI II ⁻ , <i>leuX</i> , <i>hly</i> ^{+/-} <i>fim</i> ⁺ , <i>sfa</i> ⁺ , <i>prf</i> , <i>ent</i> ⁺ , <i>fla</i> ⁺ , serumsensitiv, Sm ^R	Hacker <i>et al.</i> , 1983
536 Δ <i>clpX</i> :: <i>cat</i>	aus 536, Deletion von <i>clpX</i> , Insertion einer <i>cat</i> -Kassette, Sm ^R , Cm ^R	diese Arbeit
536 Δ <i>clpP</i> :: <i>cat</i>	aus 536, Deletion von <i>clpP</i> , Insertion einer <i>cat</i> -Kassette, Sm ^R , Cm ^R	diese Arbeit
536 Δ <i>clpX</i>	aus 536 <i>clpX</i> :: <i>cat</i> , Deletion von <i>cat</i> , Sm ^R	diese Arbeit

<i>E. coli</i> Stamm	Eigenschaften	Referenz
536 $\Delta clpP$	aus 536 <i>clpP::cat</i> , Deletion von <i>cat</i> , Sm ^R	diese Arbeit
536 $\Delta clpX$ <i>attB_λ::clpX</i>	aus 536 <i>clpX</i> , <i>attB::clpX</i> , Tet ^R , Sm ^R	diese Arbeit
536 $\Delta clpP$ <i>attB_λ::clpP</i>	aus 536 <i>clpP</i> , <i>attB::clpP</i> , Tet ^R , Sm ^R	diese Arbeit
536 $\Delta rfaH::cat$	aus 536, Deletion von <i>rfaH</i> , Insertion einer <i>cat</i> -Kassette, Sm ^R , Cm ^R	diese Arbeit
536 $\Delta rfaH$	aus 536 <i>rfaH::cat</i> , Deletion von <i>cat</i> , Sm ^R	diese Arbeit
536 $\Delta ORF52_{III}::cat$	aus 536, Deletion von ORF52 _{III} , Insertion einer <i>cat</i> -Kassette, Sm ^R , Cm ^R	diese Arbeit
536 $\Delta ORF52_{III}$	aus 536 ORF52 _{III} :: <i>cat</i> , Deletion von <i>cat</i> , Sm ^R	diese Arbeit
536 $\Delta ORF47_V::cat$	aus 536, Deletion von ORF47 _V , Insertion einer <i>cat</i> -Kassette, Sm ^R , Cm ^R	diese Arbeit
536 $\Delta ORF47_V$	aus 536 ORF47 _V :: <i>cat</i> , Deletion von <i>cat</i> , Sm ^R	diese Arbeit
536 $\Delta ORF52_{III}$ $\Delta ORF47_V::cat$	aus 536 ORF52 _{III} , Deletion von ORF47 _V , Insertion einer <i>cat</i> -Kassette, Sm ^R , Cm ^R	diese Arbeit
536 $\Delta ORF52_{III}$ $\Delta ORF47_V$	aus 536 ORF52 _{III} ORF47 _V :: <i>cat</i> , Deletion von <i>cat</i> , Sm ^R	diese Arbeit
536 $\Delta rfaH$ $\Delta ORF52_{III}::cat$	aus 536 <i>rfaH</i> , Deletion von ORF52 _{III} , Insertion einer <i>cat</i> -Kassette, Sm ^R , Cm ^R	diese Arbeit
536 $\Delta rfaH$ $\Delta ORF52_{III}$	aus 536 <i>rfaH</i> ORF52 _{III} :: <i>cat</i> , Deletion von <i>cat</i> , Sm ^R	diese Arbeit
536 $\Delta rfaH$ $\Delta ORF47_V::cat$	aus 536 <i>rfaH</i> , Deletion von ORF47 _V , Insertion einer <i>cat</i> -Kassette, Sm ^R , Cm ^R	diese Arbeit
536 $\Delta rfaH$ $\Delta ORF47_V$	aus 536 <i>rfaH</i> ORF47 _V :: <i>cat</i> , Deletion von <i>cat</i> , Sm ^R	diese Arbeit
536 $\Delta rfaH$ $\Delta ORF52_{III}$ $\Delta ORF47_V::cat$	aus 536 <i>rfaH</i> ORF52 _{III} , Deletion von ORF47 _V , Insertion einer <i>cat</i> -Kassette, Sm ^R , Cm ^R	diese Arbeit
536 $\Delta rfaH$ $\Delta ORF52_{III}$ $\Delta ORF47_V$	aus 536 <i>rfaH</i> ORF52 _{III} ORF47 _V :: <i>cat</i> , Deletion von <i>cat</i> , Sm ^R	diese Arbeit

1.2. Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tab. 4: Verwendete Plasmide

Plasmid	Vektor	Eigenschaften	Referenz
pGEM [®] -T easy		Ap ^R , lacZ, ori fl	Promega, 1997
pKD46		<i>AraC</i> , <i>bla</i> , <i>oriR101</i> , <i>repA101ts</i> , <i>lambda red (gam⁺ bet⁺ exo⁺)</i>	Datsenko und Wanner, 2000; AY048746
pCP20		FLP ⁺ , λ c1857, λp_R , <i>rep ts</i> , Cm ^R , Amp ^R	Datsenko und Wanner, 2000
pKD3		<i>cat</i> , flankiert von FRT sites, Template Plasmid, Cm ^R , Amp ^R	Datsenko und Wanner, 2000; AY048742
pKLR1	pGEM [®] -T easy	<i>clpX</i> mit Promotorregion	diese Arbeit, siehe VIII. 2.1.
pKLR2	pGEM [®] -T easy	<i>clpP</i> mit Promotorregion	diese Arbeit, siehe VIII. 2.2.
pKLR3	pGEM [®] -T easy	<i>clpX</i> , <i>tetA</i> , <i>tet_{p/o}</i>	diese Arbeit, siehe VIII. 2.3.
pKLR4	pGEM [®] -T easy	<i>clpP</i> , <i>tetA</i> , <i>tet_{p/o}</i>	diese Arbeit, siehe VIII. 2.3.
pKS- <i>tetA</i>	pBluescript II KS(-)	<i>bla</i> , <i>tetA</i> , Promotor tet ^{p/o}	Middendorf <i>et al.</i> , 2004

2. Oligonukleotide

Die für PCR-Reaktionen und Sequenzierungen verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG-Biotech und Sigma-ARK bezogen. Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tab. 5: Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Name	Länge	Sequenz (5'→3')	Referenz
clpX 1	79-mer	GAT AAA CGC AAA GAT GGC TCA GGC AAA TTG CTG TAT TGC TCT TTT TGC GGC AAA AGC CAG GTG TAG GCT GGA GCTG CTT	U00096, AY048742
clpX 2	86-mer	ACC AGA TGC CTG TTG CGC TTC CGG CTT GC CAT AAA TCA GCA ACG GTT TGC TTT GAC CAT CCA TAT GAA TAT CCT CCT TAG TTC CTA	U00096, AY048742
clpX 3_XbaI	30-mer	TGC TCT AGA CTG AGA ATG GCA TTT GCG TCG	U00096
clpX 4_HindIII	32-mer	CCC CAA GCT TCA TTC AAT GCC GAG AAT AGA GG	U00096

III. Material

Name	Länge	Sequenz (5'→3')	Referenz
clpX5_XbaI	30-mer	TGC TCT AGA AGC CTC TTT CGG TGT TAG CGT	U00096
clpX6_OH	43-mer	ACG GAT TAT CAG CTA GTC CCT GTG TTA TGG GTA CGG CAT CAC C	U00096
clpX7_OH	43-mer	CAG GGA CTA GCT GAT AAT CCG TCT GAG AAT GGC ATT TGC GTC G	U00096
clpP 1	64-mer	ATC GGT ACA GCA GGT TTT TTC AAT TTT ATC CAG GAG ACG GAA ATG GTG TAG GCT GGA GCT GCT T	U00096, AY048742
clpP 2	71-mer	GCC GCC CTG GAT AAG TAT AGC GGC ACA GTT GCG CCT CTG GCA TCA CAT ATG AAT ATC CTC CTT AGT TCC TA	U00096, AY048742
clpP 3	20-mer	GCC TCT TTC GGT GTT AGC GT	U00096
clpP 4	20-mer	TGC CTG AGC CAT CTT TGC GT	U00096
clpP 5	20-mer	GGC GAA CGA GAT AAC TTT GC	U00096
clpP 6	21-mer	CGC TCG GTA TCA CGT TCA ATC	U00096
clpP7_XbaI	29-mer	TGC TCT AGA GCC TCT TTC GGT GTT AGC GT	U00096
clpP8_HindIII	30-mer	CCC CAA GCT TTG CCT GAG CCA TCT TTG CGT	U00096
KL1_clpXP	90-mer	CCA ATG CCA GCG CCA GAC GGG AAA CTG AAA ATG TGT TCA CAG GTT GCT CCG GGC TAT GAA ATG GAA AAA TGC CTC TTT CGG TGT TAG CGT	U00096
KL2_tetA	90-mer	GGT TTA ACG TTC ATT TCC ACT CTC TGG CAA GCG CCT CGA TTA CTG CGA TGT TTA GTT AAT CAC TCT GCC AGA ATC CGT TAG CGA GGT GCC	U00096, Middendorf <i>et al.</i> , 2004
cat 1	21-mer	AAG TTG TCC ATA TTG GCC ACG	AY048742
cat 3	26-mer	CAT ATG AAT ATC CTC CTT AGT TCC TA	AY048742
cat 5	19-mer	GTG TAG GCT GGA GCT GCT T	AY048742
tet_p/o	20-mer	CCA TCG AAT GGC CAG ATG AT	Middendorf <i>et al.</i> , 2004
tet3	30-mer	GAG AAA AGT GAA ATG AAA TCT AAC AAT GCG	Middendorf <i>et al.</i> , 2004
tet4	30-mer	CGC ATT GTT AGA TTT CAT TTC ACT TTT CTC	Middendorf <i>et al.</i> , 2004
tetA_rev	20-mer	GGC ACC TCG CTA ACG GAT TC	Middendorf <i>et al.</i> , 2004
att 1	19-mer	GAG GTA CCA GCG CGG TTT GAT C	J01638
att 2	19-mer	CAG ATG GCG CAA TGC CAT CTG G	J01638
RT_rrsH_f	20-mer	CGA TCC CTA GCT GGT CTG AG	U00096
RT_rrsH_r	20-mer	GAT GCA GTT CCC AGG TTG AG	U00096
RT_prfA_f	18-mer	GAT GGG CAA ACC ACA CCT	AJ494981
RT_prfA_r	20-mer	ATT CGC AAC GGC TGA GAA GG	AJ494981
RT_pixA_f	20-mer	ACG ACG GTA TCT CAG TCA AG	AJ617685

III. Material

Name	Länge	Sequenz (5'→3')	Referenz
RT_pixA_r	20-mer	CTG CAG TGA AAT CGC CTT CT	AJ617685
RT_sfaA_f	18-mer	GGT TTT GCT GGG GCA AGT	X16664
RT_sfaA_r	20-mer	ACC AGG CGT TGA CTT ACC TG	X16664
RT_fimA_f	19-mer	TGT TCT GTC GGC TCT GTC C	U00096
RT_fimA_r	19-mer	CCA GGA TCT GCA CAC CAA C	U00096
RT_flhC_f	20-mer	TGC TGC CAT TCT CAA CCG AC	U00096
RT_flhC_r	20-mer	CGG TTG ACA TAA GCT GCA GG	U00096
RT_fliC_f	20-mer	TAA CAG CGC GAA GGA TGA CG	Dobrindt, unveröffentlicht
RT_fliC_r	20-mer	TAG TCT GGC CGT CAT TCG CA	Dobrindt, unveröffentlicht
RT_fliA_f	20-mer	TGA AGT GGC ACA GGC AAT AG	U00096
RT_fliA_r	20-mer	ACC GCA CCA ATC TCT TTG AG	U00096
RT_agn43 _{hom} _f	20-mer	TGA CAT TGT GGC CCA GGG AA	X16664
RT_agn43 _{hom} _r	20-mer	ACC AGT TCA CCG GCA GTT CA	X16664
RT_agn43 _{III} _f	20-mer	GAG CGG ACA CAC AGC CAC TA	X16664
RT_agn43 _{III} _r	20-mer	TTA TTC AGC GTG GTG GTG CC	X16664
RT_agn43 _v _f	20-mer	CCA ATG CCA GCG GTA AGT TC	AJ617685
RT_agn43 _v _r	20-mer	CGG TGA GGT TAC TGG TGG TC	AJ617685
RT_csgA_f	20-mer	GGT GGC GGT AAT AAT AGC GG	U00096
RT_csgA_r	20-mer	CCA AAG CCA ACC TGA GTC AC	U00096
RT_CS12_f	20-mer	GGT GTC CGT TCT GAT GAG CG	AJ488511
RT_CS12_r	20-mer	GCC ATC GTA TCC CCT GAC TG	AJ488511
rfaH_del1	79-mer	CAA TCC TGG TAT TTA CTG TAC TGC AAG CGC GGG CAA CTT CAA CGT GCC CAG GAA CAC CTC GTG TAG GCT GGA	U00096, AY048742
rfaH_del2	86-mer	GAG TTT GCG GAA CTC GGT ATT CTT CAC ACT GTG CTT AAT CTC TTT ATT AAT AAG ATT AAG CAT ATG AAT ATC	U00096, AY048742
Orf52_del1	79-mer	TGC CGG TAT CCA CAT CTG TGG ATA CCG GCT TTT TTA TTC ACC CTC ACT CTG ATT AAG GAA GTG TAG GCT GGA GCT GCT T	X16664, AY048742
Orf52_del2	86-mer	GGA TCG GGT AAT AAC CGG CCA GAC TGT GAT CTA TTC AGA TGC CAT TTG GCA GCA AAA GAG CAT ATG AAT ATC CTC CTT AGT TCC TA	X16664, AY048742
Orf47_del1	79-mer	TTC TCT GGC GGA TGA GAG AGG GGA AGC ATT TAT GTC CGG GAA AAA CCA CTT TAT CTG ACC GTG TAG GCT GGA GCT GCT T	AJ617685, AY048742
Orf47_del2	86-mer	TCA ATA AGC ACA TTA AGG TAA GCC GTT GTG ACG GCA AGA GCC TGG TTG CGTGAG AAA GGG CAT ATG AAT ATC CTC CTT AGT TCC TA	AJ617685, AY048742

Name	Länge	Sequenz (5'→3')	Referenz
Orf52_up	20-mer	ACA GCG GAG AGC GTC TGT AT	X16664
Orf52_down	20-mer	GAC TTC TCC CAG CGA CTG AC	X16664
Orf47_up	20-mer	TGT CCT TCC TGC CTC TGA GT	AJ617685
Orf47_down	20-mer	GTG TTC ACT GCG GGA GGT AT	AJ617685
BP64	19-mer	CAC GCA AAG TGC GGT CAG C	U00096
BP65	19-mer	CAA AGC CAT CAT CCC GGC G	U00096

3. Chemikalien

Die benötigten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

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

Die Enzyme stammten von den Firmen:

Amersham Biosciences, Freiburg; Eurogentec, Seraing, Belgien; Gibco BRL, Eggenstein; Invitrogen, Karlsruhe; New England Biolabs, Frankfurt am Main; Promega, Heidelberg; Roche Diagnostics, Mannheim; Qiagen, Hilden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Laborkits sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tab. 6: In dieser Arbeit verwendeten Laborkits

Laborkit	Bezugsquelle
pGEM [®] -T easy Ligationskit	Promega, Heidelberg
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Midi Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy	Qiagen, Hilden
ECL-Hybridisierungs-kit	Amersham Biosciences

Alle Kits wurden gemäß den Anleitungen der Hersteller verwendet.

4. Geräte und Zubehör

Analysenwaage	Chyo Balance Corp
Autoklav	Webeco
Bioanalyser	Agilent Technologies, 2100expert
Brutschränke	Memmert Tv40b Heraeus B5050E
Cleanbench	Nuaire A/B3
Eismaschine	Scotsman AF-20
Elektrophoresekammern	DNA Sub Cell BioRad
Elektroporator	Bio Rad, Gene Pulser transfection
Filme	Hyperfilm ECL Amersham Pharmacia
Filmentwicklungsgerät	Curix 60, Agfa
Glaskugelaufschlusseinheit	Fast Prep™ FP120 BIO101, Savant
Geltrockner	BioRad 1125 B
Gene Linker	BioRad Gene Linker GS
Grobwaagen	Chyo Electronic Balance MP-3000
2D-Elektrophorese Gelkammer	Ettan DALT six, Amersham Biosciences
Hybridisierungsofen	Hybaid Mini 10
IEF-Einheit	MultiPhor, Amersham, Biosciences
IPG-Streifen	Amersham Biosciences
Kamera	Olympus
Kryostaten	MultiTempIII, Amersham Biosciences
Kühlzentrifuge	J2-HC Centrifuge, JA10- und JA20-Festwinkelrotoren, Beckman Biofuge 13R, Heraeus, Megafuge1.0R, Heraeus
MALDI-TOF-MS	Proteome-Analyzer 4700, Applied Biosystems
Magnetrührer	Janke und Kunkel KMO 2
Mikropipetten	Gilson P20, P200 und P1000 Eppendorf Reference 0,5-10 µl und 100-1000 µl
Mikrowellenofen	AEG Micromat
Netzgeräte	BioRad Power Pac 300 Consort E455

	E835, Consort
	EPS 3500XL, Amersham Biosciences
Nylonmembran	Schleicher & Schuell
Ölvakuumpumpe	Univac Uniequipe
PCR-Thermocycler	Biometra Thermocycler T3
pH-Meter	WTW pH 523
Photometer	Pharmacia Ultrospec 3000
Real-time PCR Thermocycler	Bio Rad, MyiQ
Rehydratisierungsschale	Amersham Biosciences
Scanner	HP ScanJet IIcx
Schüttelinkubatoren	Innova TM 4300
	Bühler W55 swip
Sequenziergerät	ABI Prism 310 Genetic Analyzer
Speed Vac	Speed Vac SC110 Savant
Spotpicking-Workstation	Bio-Rad
Sterilfilter	Schleicher & Schuell, 0,2 µm
Tischinkubator	Eppendorf Thermostat 5320
Tischzentrifuge	Eppendorf 5415C
Vakuum-Blot-System	Pharmacia Biotech
Verdauroboter	Ettan Spot Handling Workstation, Amersham Biosciences
Verstärkerfolien	Dr. Goos Special 200
Videoprintanlage	Mitsubishi, Hitachi, Cybertech Cb 1
Vortexer	Vortex-Genie 2, Scientific Industries
Wasserbad	1083, GFL

5. Medien und Nährböden

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

Lösungen und Medienzusätze, die nicht autoklaviert werden konnten, wurden durch einen Filter mit 0,2 µm Porengröße (Sartorius, Göttingen) sterilfiltriert.

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

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Aqua dest.	ad 1000 ml, pH 7,5

M63-Minimalmedium

20 % (NH ₄) ₂ SO ₄	10 ml
KH ₂ PO ₄	13,6 g
10 % MgSO ₄	1 ml
1 % FeSO ₄	1 ml
(1g/l) Thiamin	2 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml, pH 7,0

Nach dem Autoklavieren wurden 20 ml Glukose-Lösung 20 % zugesetzt.

2% X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-glukosid)

X-Gal	1 ml
N-N-Dimethylformamid	49 ml

X-Gal-Agarplatten

LB-Agar	500 ml
2 % X-Gal	1,5 ml
100 mM IPTG	250 µl

Schwärmagarplatten

LB-Medium	
0,3 % Agar	

Kongorot-Agarplatten

Trypton	10 g
Kongorot (0,4 mg/ml)	1 ml
Coomassie Blau G-250 (0,2 mg/ml)	1 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml

Die Kongorot- und Coomassie-Stammlösungen werden sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren zugegeben.

Calcofluor-Agarplatten

Trypton	5 g
Hefeextrakt	2,5 g
Fluorescent Brightener 28	10 g
Aqua dest.	ad 500 ml

Fluorescent Brightener 28 wurde nach dem Autoklavieren direkt ohne Sterilfiltration zugegeben.

Blutagarplatten

LB-Agar
5% Schafsblut

6. Antibiotikazusätze für Medien und Nährböden

Von allen Antibiotika wurden 1000-fach konzentrierte Stammlösungen hergestellt und bei -20 °C gelagert. Diese wurden in entsprechenden Konzentrationen den autoklavierten Medien nach dem Abkühlen auf 45 °C zugesetzt. Alle verwendeten Antibiotika-Konzentrationen sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tab. 7: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika-Konzentrationen

Antibiotikum	Endkonzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Lösungsmittel
Ampicillin (Ap)	100 $\mu\text{g/ml}$	Aqua dest.
Streptomycin (Sm)	100 $\mu\text{g/ml}$	Aqua dest.
Chloramphenicol (Cm)	20 $\mu\text{g/ml}$	Ethanol 70 %
Tetracyclin (Tet)	10 $\mu\text{g/ml}$	Ethanol 70 %

7. Antikörper

In Tabelle 8 sind die für Western Blot-Analysen und Agglutinationstests verwendeten Antikörper aufgeführt.

Tab. 8: In dieser Arbeit verwendete Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Ziege-anti-Kaninchen	Dianova, Hamburg
Kaninchen-anti-P-Fimbrien (Prf)	S. Khan, IMI Würzburg
Kaninchen-anti-S-Fimbrien (Sfal)	S. Khan, IMI Würzburg
Kaninchen-anti-fp12 (AIDA-I)	I. Benz, Münster
Kaninchen-anti-H7-Flagellin	T.K. Korhonen, Helsinki
Kaninchen-anti-Typ 1 Fimbrien	K.A. Krogfelt, Kopenhagen

8. Puffer und Lösungen

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

9. Größenmarker

Für die Größenbestimmung von Nukleinsäurefragmenten und Proteinen wurden folgende Größenmarker eingesetzt.

9.1. Protein-Größenmarker

Rainbow Marker (Amersham)

Fragment	Größe (kDa)
Blau	250
Rot	160
Grün	105
Gelb	75
Lila	50
Blau	35
Orange	30
Grün	25
Blau	15
Rot	10

Prestained Protein marker, broad range (NEB)

Protein	Größe (kDa)
MBP- β -Galaktosidase	175
MBP-Paramyosin	83
Glutamin-Dehydrogenase	62
Aldolase	47
Triosephosphat-Isomerase	32,5
β -Laktoglobulin A	25
Lysozym	16,5
Aprotinin	6,5

9.2. DNA-Größenmarker

1 kb-Leiter

Fragment	Basenpaare
1	10000
2	8000
3	6000
4	5000
5	4000
6	3500
7	3000
8	2500
9	2000
10	1500
11	1000
12	750
13	500
14	250

IV. Methoden

1. DNA

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

1.1. Isolierung von DNA

1.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA

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

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

Puffer I	50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	10 mM	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), pH 8,0
	100 µg/ml	RNase A
Puffer II	200 mM	NaOH
	1%	Natriumdodecylsulfat (SDS)
Puffer III	3 M	K-Acetat, pH 5,5
L6	100 ml	0,1 M Tris-HCl, pH 6,4
	8,8 ml	0,5 M EDTA, pH 8,0
	13,2 ml	Aqua dest.
	2,6 ml	Triton X-100
	120 g	Guanidin (Thiocyanat-Salz, Sigma G-6639)
Waschlösung	10 ml	5 M NaCl
	5 ml	1 M Tris-HCl, pH 7,5
	2,5 ml	0,5 M EDTA, pH 8,0
	ad 250 ml	Aqua dest.
	250 ml	EtOH

Diatomeen-Erde-Suspension

10 g	Diatomeen-Erde
50 ml	Aqua dest.
500 µl	HCl konz.

1.1.1.2. Mini-Präparation mit Isopropanol

3 ml einer ÜN-Kultur werden in einem Reaktionsgefäß 2 min zentrifugiert und das Pellet in 150 µl Puffer I gelöst. Darauf werden 150 µl Puffer II gegeben und 5 min bei RT stehen gelassen. Anschließend versetzt man die Mischung mit 150 µl Puffer III, inkubiert 5 min auf Eis und zentrifugiert für 10 min. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 0,7 Volumen 100 % Isopropanol bei RT zugegeben, gut gemischt und 15 min zentrifugiert. Das Pellet wird in 500 µl 70 % EtOH gewaschen, erneut 10 min zentrifugiert, getrocknet und schließlich in 30 – 50 µl Aqua dest. aufgenommen. Die Proben können bei –20 °C eingefroren werden (verwendete Puffer siehe IV. 1.1.1.1).

1.1.1.3. DNA Midi-Präparation (Qiagen)

Das Plasmidisolierungskit von Qiagen wird für die Isolierung von High- und Low-copy-Plasmiden verwendet. Dazu werden 50 ml (bei high-copy-Plasmiden) bzw. 200 ml (bei low-copy-Plasmiden) Bakterienkultur unter entsprechendem Selektionsdruck ÜN angezogen und in JA20-Röhrchen bei 6000 Upm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 4 bzw. 8 ml Lösung P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4 bzw. 8 ml Lösung P2 wird die Suspension vorsichtig geschüttelt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden 4 bzw. 8 ml kalte Lösung P3 zugegeben, geschüttelt und 15 min auf Eis inkubiert. Zelltrümmer und chromosomale DNA werden durch 30 minütiges Zentrifugieren bei 15000 Upm und 4 °C entfernt. Der klare Überstand wird auf eine bereits mit 4 ml QBT-Puffer äquilibrierte Säule (Tip-100) gegeben. Nach der Passage des Überstandes, der die Plasmid-DNA enthält, wird die Säule zweimal mit jeweils 10 ml Puffer QC gewaschen. Die an das Säulenmaterial gebundene Plasmid-DNA wird anschließend durch Zugabe von 5 ml Elutionspuffer QF eluiert und mit 0,7 Volumen 100 % Isopropanol bei RT gefällt. Die Plasmid-DNA wird durch Zentrifugation für 30 min mit 13000 Upm bei 4 °C pelletiert, mit eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen, 5 min an der Luft getrocknet und in einem geeigneten Volumen Aqua dest. aufgenommen. Die Regeneration der Qiagen-Säule erfolgt durch Waschen mit 50 ml Lösung HS und 10 ml Puffer QPT. Die Säule kann anschließend in Puffer QPT mit 0,1 % Natrium-Azid im Kühlschrank gelagert werden.

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

QC (Waschpuffer)	1,0 M	NaCl
	50 mM	MOPS
	15 %	Ethanol, pH 7,0
QF (Elutionspuffer):	1,25 M	NaCl
	50 mM	Tris-HCl
	15 %	Ethanol, pH 8,5
HS (Waschlösung):	1,5 M	NaCl
	50 mM	MOPS
	20 %	Ethanol, pH 8,5
QPT (Äquilibrierungspuffer):	0,4 M	NaCl
	50 mM	MOPS, pH 7,0
	0,15 %	Triton X-100

1.1.1.4. Alkoholische Fällung von DNA

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

1.1.2. Isolierung chromosomaler DNA (Grimberg *et al.*, 1989)

1 ml einer ÜN-Kultur des jeweiligen Stammes wird für 4 min bei 13000 Upm abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wird mit 1 ml TNE-Lösung gewaschen und in 270 µl TNEX aufgenommen. Dem Ansatz werden 30 µl frisches Lysozym (5 mg/ml) hinzugefügt. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C erfolgt die Zugabe von 15 µl Proteinase K (20 mg/ml) und eine weitere Inkubation von 2 - 6 h bei 65 °C bis die Lösung klar ist. Die chromosomale DNA wird durch Zugabe von 1/20 Volumen 5 M NaCl (15 µl) und 500 µl Ethanol ausgefällt, danach in der Kühlzentrifuge mit 13000 Upm für 10 min zentrifugiert, zweimal mit 70 % EtOH gewaschen und luftgetrocknet. Das Pellet wird in 100 µl Aqua dest. aufgenommen.

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

TNEX	TNE	
	1 %	Triton X-100

1.2. Horizontale Gelelektrophorese

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

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

50 × Tris-Acetat (TAE)	242 g	Tris
	57,1 ml	99,7 % Essigsäure
	100 ml	0,5 M EDTA, pH 8,0
	ad 1000 ml	Aqua dest.

6 × Stop-Puffer	0,25 %	Bromphenolblau
	0,25 %	Xylen-Cyanol
	15 %	Ficoll Typ 400 in Aqua dest.

1.3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)

Die zu reinigenden Fragmente werden unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten, die Gelstückchen abgewogen und die dreifache Menge in µl Puffer QG zugegeben. Nach

10 min Inkubation bei 50 °C wird die gleiche Menge Isopropanol zugegeben und auf ein Säulchen aufgetragen. Nach anschließender Zentrifugation für 1 min wird der Durchfluss verworfen, 500 µl Puffer QG zugegeben und wieder 1 min zentrifugiert. Dieser Schritt wird mit 750 µl Puffer PE wiederholt. Das Säulchen wird auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt, 30 µl Puffer EB zugegeben, 1 min bei RT inkubiert und nochmals 1 min abzentrifugiert.

1.4. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

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

1.5. Ligation von DNA-Fragmenten

Vektor-, und Insert-DNA werden für die Ligation aufgereinigt. Der Ligationsansatz enthält Vektor- und Insert-DNA in einem Verhältnis von 1:3 in insgesamt 15 µl Aqua dest.. Dazu gibt man 4 µl 5 × Ligationspuffer und 1 µl T4 DNA Ligase (1 U für „sticky end“, 10 U für „blunt end“ Fragmente). Die Inkubation erfolgt ÜN bei 4 °C.

1.6. Aufreinigung von Plasmid-DNA mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)

Das isolierte Plasmid (30 µl) wird mit 5-fachem Volumen Lösung PB versetzt, gut gemischt und auf ein QIAquick Säulchen gegeben, welche in ein 2 ml Sammelgefäß gesteckt wird. Der Ansatz wird bei 13000 Upm 1 min zentrifugiert, die Flüssigkeit entfernt und danach 750 µl Lösung PE auf das Säulchen gegeben. Nach erneuter Zentrifugation (1 min, 13000 Upm) wird die Flüssigkeit aus dem Sammelgefäß entfernt und weitere 60 sec zentrifugiert. Anschließend steckt man das Säulchen auf ein neues steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß und gibt 50 µl Aqua dest. auf die Mitte des Filters. Zur Elution der DNA wird nochmals 1 min zentrifugiert.

2. Herstellung kompetenter Bakterienzellen

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

2.1. Elektrokompente *E. coli*-Zellen

200 ml LB-Medium werden mit 2 ml einer ÜN-Kultur angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 - 0,7 geschüttelt. Die Bakterienzellen werden 15 - 30 min auf Eis inkubiert, in sterile 50 ml Röhrchen überführt und für 10 min bei 4 °C und 5000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt, das Pellet in 200 ml eiskaltem sterilem Wasser resuspendiert und erneut 10 min zentrifugiert (4 °C, 5000 Upm). Waschvorgänge werden mit jeweils 100 ml eiskaltem sterilen Aqua dest. und 5 ml eiskaltem sterilen 10 % Glycerin wiederholt. Zum Schluss wird das Pellet in 500 µl eiskaltem sterilen 10 % Glycerin aufgenommen und in Aliquots von je 40 µl bei -80 °C eingefroren.

2.2. CaCl₂-Methode

100 ml LB-Medium werden mit 1 ml ÜN-Kultur angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 - 0,7 geschüttelt. Die Bakterienkultur wird 10 min auf Eis gestellt und anschließend 10 min bei 5000 Upm und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wird in 40 ml eiskalter, steriler 100 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen und 30 - 60 min auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation wird das Pellet in 5 ml kalter steriler 100 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen, mit 15 % Glycerin versetzt und in Aliquots von je 200 µl bei -80 °C eingefroren.

3. Transformation von Bakterienzellen

3.1. Elektroporation von *E. coli*

40 µl elektrokompente Zellen werden auf Eis aufgetaut, mit 1 µl Plasmid-DNA versetzt und die Mischung in eine sterile, vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Die Elektroporation erfolgt bei 600 Ω, 250 µFD und 2 kV. Danach wird die Bakteriensuspension sofort mit 1 ml LB-Medium aufgefüllt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen

werden bei 37 °C (bzw. 30 °C) für ca. 1,5 h inkubiert und anschließend auf einer entsprechenden antibiotikahaltigen Agarplatte ausplattiert.

3.2. Hitzetransformation

Die CaCl₂-kompetenten Zellen werden auf Eis aufgetaut, mit 1 µl Plasmid oder 15 µl Ligationsansatz gemischt und ca. 30 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA in die Zellen erfolgt durch einen Hitzeschritt von 90 sec bei 42 °C. Anschließend wird der Ansatz sofort für 3 min auf Eis abgekühlt. In das Reaktionsgefäß wird 1 ml LB-Medium zugegeben und für 1-2 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert. 100 µl werden direkt auf Agarplatten, welche das entsprechende Antibiotikum enthalten, ausplattiert. Der Rest wird kurz abzentrifugiert, der Überstand bis auf 100 µl verworfen und das Pellet im verbleibenden Überstand resuspendiert und ausplattiert. Die Platten werden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4. Polymerase Kettenreaktion (PCR, Saiki *et al.*, 1988)

Mit dieser Methode können Nukleotidsequenzen *in vitro* amplifiziert werden. Die DNA-Sequenz des PCR-Produktes kann dabei gezielt verändert werden oder es können gewünschte Restriktionsschnittstellen in das zu amplifizierende Fragment eingebaut werden. Dadurch wird die Klonierung des Fragmentes erleichtert. Für die PCR-Reaktionen werden abgestimmt auf die jeweiligen Ansätze MgCl₂, Primer, Template-DNA, dNTPs und Polymerase zusammenpipettiert.

Am Thermocycler wird der Ablauf der Reaktion programmiert. Zunächst erfolgt ein 2-minütiges Denaturieren bei 95 °C. Im Anschluss werden 30 bis 35 Amplifikationszyklen durchgeführt: die Denaturierung der DNA für 90 s bei 95 °C, gefolgt vom Annealing der Primer für 60 sec bei der errechneten Temperatur sowie der Elongation bei 72 °C (1 min je kb zu amplifizierender DNA). Zum Abschluss wird noch eine 5-minütige Amplifikation bei 72 °C durchgeführt. Diese dient dem Auffüllen noch nicht vollständig synthetisierter PCR-Produkte. Ein Teil des Ansatzes wird dann zur Überprüfung der Reaktion auf ein Agarosegel aufgetragen.

Formel zur Errechnung der Primer-Annealing-Temperatur:

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

5. Southern Blot-Analyse

5.1. Southern Blot mit dem VakuGene Blotter (Pharmacia)

10 µg chromosomale DNA werden mit einem geeigneten Restriktionsenzym gespalten und in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wird angefärbt und die DNA im Anschluss durch Vakuumbloten auf eine Nylonmembran transferiert. Die Membran wird auf Gelgröße zugeschnitten und nacheinander für 5 min in Aqua dest. und 20 × SSC geschwenkt. Die Membran wird nun auf die angefeuchtete poröse Trägerplatte der Blotkammer gelegt und mit einer Plastikmaske so abgedeckt, dass die Maske die Membran um etwa 2 - 4 mm überlappt. Das Agarosegel wird anschließend luftblasenfrei auf das Maskenfenster gelegt, die Kammer mit dem Rahmen verschlossen und anschließend das Vakuum angelegt (50 mbar). Die Geloberfläche wird jetzt nacheinander für jeweils 8 min mit Lösung I (Depurinierungslösung), Lösung II (Denaturierungslösung) und Lösung III (Neutralisierungslösung) vollständig bedeckt. Anschließend wird das Gel mit der eigentlichen Blotlösung (20 × SSC) für 40 - 50 min überschichtet. Nach dem Blotten wird das Gel für je 1 min mit 0,4 N NaOH und 0,2 M Tris-HCl pH 7,5 überschichtet. Zum Schluss wird die Nylonmembran auf Whatmanpapier getrocknet und die DNA in einem UV-Crosslinker kovalent an die Membran gebunden.

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

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

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

Nach dem Southern Blot (siehe IV. 5.1.) wird die Membran in ein Hybridisierungsröhrchen überführt und mit 12 ml 42 °C warmem Hybridmix bedeckt. Die Vorhybridisierung erfolgt unter Rotation im Hybridisierungssofen für 1 h bei 42 °C. Während dieser Zeit werden 15 µl gereinigte DNA 10 min bei 95 °C denaturiert und sofort 5 min auf Eis abgekühlt. Der Ansatz wird mit 15 µl DNA-Labeling-Reagenz, welches die Peroxidase enthält, versetzt, kurz gemischt und nach der Zugabe von 15 µl Glutaraldehyd für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die markierte Sonde wird zu der Vorhybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgt ÜN bei 42 °C im Hybridisierungssofen. Am nächsten Tag wird der Blot 1 × für 20 min und 2 × für 10 min in vorgewärmter Waschlösung I bei 42 °C und anschließend 2 × für 5 min in Waschlösung II bei RT gewaschen. Die Membran wird dann mit je 8 ml Detektionslösung 1 und 2 benetzt und unter Schwenken 1 min inkubiert. Dann wird der Filter in Folie eingeschlagen und ein Hyperfilm-ECL aufgelegt. Nach 3 - 5 min Exponierzeit wird der Film entwickelt.

Waschlösung I 6 M Harnstoff
 0,4 % SDS
 0,5 × SSC

Waschlösung II 2 × SSC

6. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgt mit Hilfe von Quarzküvetten (Schichtdicke 1 cm) im Photometer. Dazu wird eine 1:100 (DNA) oder 1:40 (RNA) Verdünnung der zu untersuchenden Probe in Aqua dest. hergestellt und die optische Dichte (OD) bei 260 nm sowie 280 nm bestimmt. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors ergibt sich die OD für 1 µl der Probe. Bei doppelsträngiger DNA entspricht eine OD-Einheit 50 µg DNA/ml, bei RNA 40 µg/ml und bei Oligonukleotiden 33 µg/ml. Durch Messung der Absorption bei 280 nm kann die Reinheit der Untersuchungsprobe bestimmt werden. Die Nukleinsäuren liegen in ausreichender Reinheit vor, wenn das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} zwischen 1,8 und 2,0 liegt.

7. A/T-Klonierung von DNA-Fragmenten

Das amplifizierte kurze DNA-Stück wird in den Vektor pGEM[®]-T easy ligiert und dieser rekombinierte Vektor in CaCl₂-kompetente Zellen transformiert. Zur Selektion der Zellen die ein Plasmid enthalten, besitzt dieser Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen, das eine Selektion ermöglicht. Zur Kontrolle einer erfolgreichen Insertion besitzt der Vektor innerhalb des β-Galaktosidasegens eine Insertionsstelle („multiple cloning site“). In Anwesenheit des Laktose-Analogons IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid) als Induktor und des β-Galaktosidase-Substrates X-Gal zeigen Kolonien ohne Insert eine blaue Färbung. Das farblose X-Gal wird durch die β-Galaktosidase gespalten und es entsteht 5-Brom-4-Chlor-Indigo, ein tiefblauer Farbstoff. Die Insertion eines DNA-Fragmentes in die „multiple cloning site“ zerstört das Leseraster des β-Galaktosidasegens. Die Zellen sind entsprechen ungefärbt. Die Ligation erfolgte nach dem Protokoll des pGEM[®]-T- easy Vector Systems.

Ligationsansatz	5 µl	2 × Rapid-Ligation Buffer
	1 µl	pGEM [®] -T easy Vektor (50 ng/µl)
	3 µl	PCR-Produkt
	1 µl	T4 DNA-Ligase (3 U/µl)

Der Reaktionsansatz wird gut durchmischt und über Nacht bei 4 °C im Wasserbad inkubiert. Die Transformation des rekombinanten Vektors in kompetente Zellen erfolgt mit der in

3.7.2. aufgeführten Hitzetransformation. 100 µl der transformierten Bakterienkolonie werden auf Agarplatten, die X-Gal, IPTG und Ampicillin enthalten, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Selektierte weiße Klone werden in ampicillinhaltigem LB-Medium über Nacht angezogen. Die Plasmidisolierung erfolgte durch die Isopropanol-Methode (siehe 3.1.1.2.). Nach anschließender Aufreinigung und Quantifizierung auf einem Agarosegel kann die Plasmid-DNA direkt zur Sequenzierung eingesetzt werden.

8. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung basiert auf der DNA-Kettenabbruch-Methode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Für die Sequenzier-PCR wird das „ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ verwendet. Ausgangspunkt für die enzymatische Synthese von DNA entlang der als Matrize dienenden, zu sequenzierenden DNA-Einzelstranges ist ein Oligonukleotid (Primer), das zu einem bestimmten Teil des Matrizenstranges komplementär ist und mit diesem hybridisiert. Die eingesetzte, hitzestabile AmpliTaq (TM) DNA Polymerase katalysiert in Gegenwart aller vier Desoxynukleosid-triphosphate (dNTPs) und der vier fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide (ddNTPs) die Synthese der zum Matrizenstrang komplementären Sequenz. Während der Synthesereaktion kommt es durch Einbau der ddNTPs zu statistisch verteilten Kettenabbrüchen und es findet eine Amplifikation der markierten DNA-Fragmente statt, da wie bei der PCR mehrere Reaktionszyklen durchlaufen werden. Da die vier ddNTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, kann die Sequenzierung in einem einzigen Reaktionsgefäß durchgeführt werden.

PCR-Ansatz

4 µl	Premix (enthält markierte Nukleotide, DNA-Polymerase, Puffer)
0,5 µg	DNA
1 µl	Primer (10 - 50 pmol)
ad 10 µl	Aqua dest.

PCR-Reaktion	Denaturierung	96 °C	2 min	} 25 Zyklen
	Denaturierung	96 °C	30 sec	
	Annealing	45 - 60 °C	15 sec	
	Elongation	60 °C	4 min	

Zur Abtrennung der während der Sequenzierreaktion nicht eingebauten fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide wird eine Ethanol-fällung der DNA-Fragmente durchgeführt. Hierzu wird der Sequenzier-Ansatz mit 90 µl sterilem Aqua dest., 10 µl 3 M Natriumacetatlösung, pH 4,6 und 250 µl 96 % EtOH versetzt und für 15 min bei 15000 Upm zentrifugiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 15000 Upm wird das Ethanol entfernt und das Pellet mindestens 5 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Der Ansatz wird in 25 µl TSR (Template Suppression reagent) aufgenommen und 2 min bei 90 °C denaturiert. Die Probe ist nun bereit zum Auftragen in den ABI-Sequenzierer. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe des Programms GeneScan Analysis Software (ABI Prism von PE Applied Biosystems).

9. Konstruktion von Deletionsmutanten durch chromosomalen Allelaustausch mit Hilfe von linearen DNA-Fragmenten (Datsenko und Wanner, 2000)

Zur Konstruktion von Deletionsmutanten wurde ein Rekombinationssystem adaptiert, das einen spezifischen chromosomalen Allelaustausch mit Hilfe von linearen DNA-Fragmenten (PCR-Produkten) ermöglicht (Datsenko und Wanner, 2000 und Abb. 5).

Zunächst wird die Chloramphenicol-Kassette (*cat*) des Plasmides pKD3 mit einer PCR-Reaktion amplifiziert. Die verwendeten Primer ermöglichen einerseits die Amplifikation des Resistenzgens, andererseits besteht ihr 5'-proximales Ende aus 60 - 70 Nukleotiden, welche homolog zu den angrenzenden Bereichen des zu inaktivierenden Gens sind. Anschließend wird in elektrokompente Zellen des *E. coli* Stammes 536 das Plasmid pKD46 transformiert. Dieses Plasmid trägt das Gen für die Red-Rekombinase des Bakteriophagen λ, welches unter der Kontrolle eines durch Arabinose induzierbaren Promotors steht. Das

gereinigte PCR-Fragment wird durch Elektroporation in den Stamm 536/pKD46 gebracht, der in arabinosehaltigem Medium angezogen wurde.

Die in Anwesenheit von Arabinose exprimierte Red-Rekombinase vermittelt die Integration des PCR-Fragments ins Genom durch homologe Rekombination über die flankierenden Sequenzabschnitte, wobei die Sequenz des zu inaktivierenden Gens deletiert wird. Klone, welche das PCR-Produkt ins Chromosom integriert haben, können auf chloramphenicolhaltigen Agarplatten selektioniert werden. Anschließend kann das *cat* Gen wieder deletiert werden, indem das Plasmid pCP20 in die elektrokompenten Zellen der *cat*-Insertionsmutanten transformiert wird. Dieses Plasmid trägt die FLP Rekombinase, welche das Ausschneiden der FRT (FLP Recognition Target) Erkennungssequenz, welche das *cat* Gen flankiert, vermittelt. Nach mehrmaligem Überimpfen der erhaltenen Klone bei 42 °C auf LB-Agarplatten wird der Verlust des Plasmids pCP20 und des *cat* Gens auf entsprechenden antibiotikahaltigen Agarplatten überprüft.

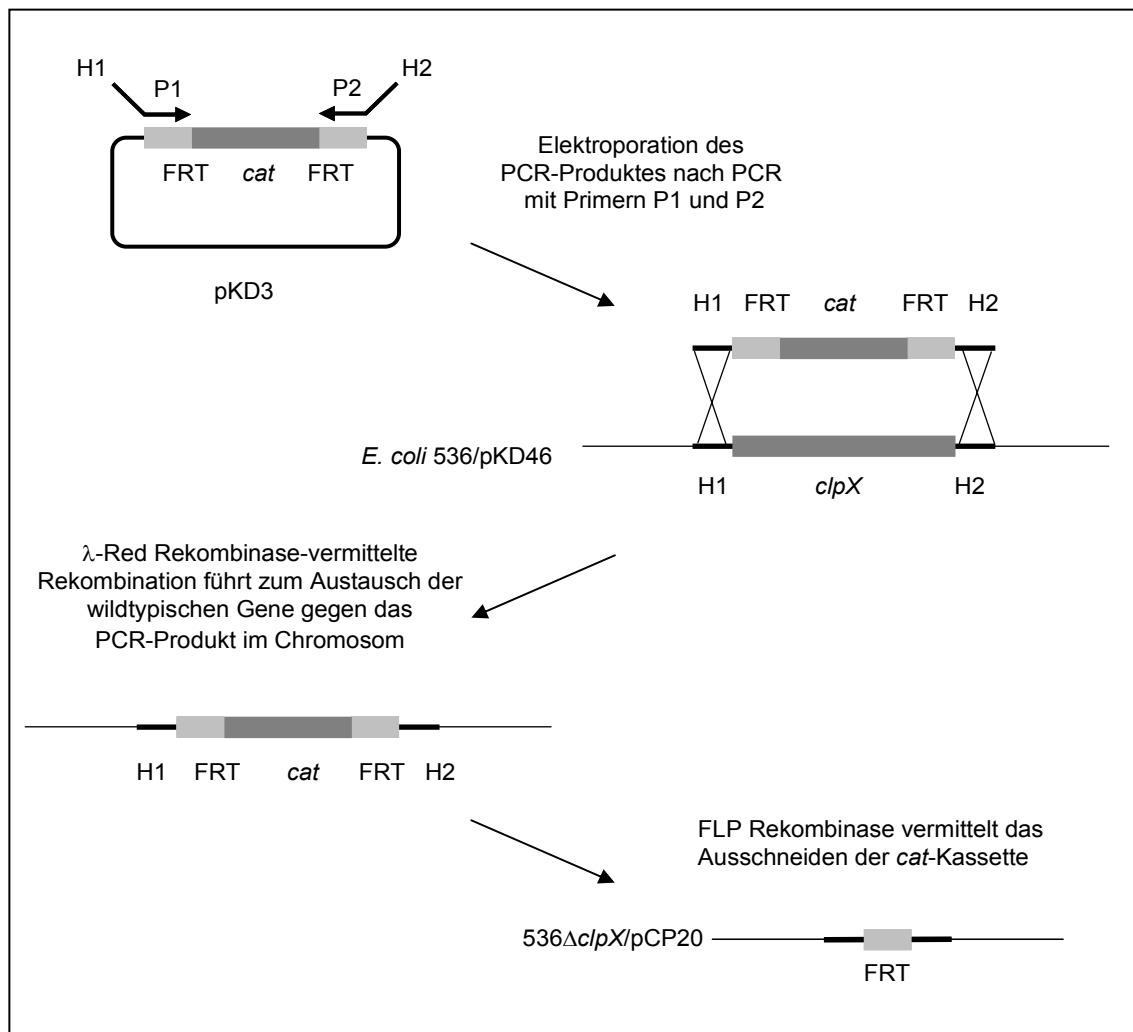


Abb. 5: Schematische Darstellung der Konstruktion einer *clpX*-Deletionsmutante des *E. coli* Stammes 536 durch Integration linearer DNA-Fragmente und homologe Rekombination (Datsenko und Wanner, 2000).

Die erfolgte Integration von *cat* und gleichzeitige Deletion der Zielgene sowie die anschließende Deletion von *cat* kann durch spezifische PCR-Reaktionen und Southern Blot-Analysen überprüft werden.

10. RNA

Beim Arbeiten mit RNA ist es wichtig, dass alle verwendeten Puffer und Verbrauchsmaterialien RNase-frei sind. Es sollte immer mit Handschuhen gearbeitet werden und alle Lösungen mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) Wasser angesetzt werden. Hierfür wird pro Liter Aqua dest. 1 ml DEPC zugefügt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird das Gemisch für 30 min autoklaviert.

10.1. Isolierung von RNA

Mindestens 7 ml einer Bakterienkultur OD₆₀₀ 0,7 - 0,8 werden mit der doppelten Menge RNA-protect (Qiagen) gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Isolierung von auf LB-Agarplatten gewachsenen Bakterien werden die Platten mit 5 ml TE-Puffer abgeschwemmt und 2 ml der Suspension weiterverwendet. Nach Zentrifugation für 10 min bei 5000 Upm wird das Pellet in 1 ml RLT-Puffer (mit 10 µl/ml β-Mercaptoethanol versetzt) aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgt mechanisch durch Glaskügelchen. Hierfür wird die Bakteriensuspension in „Fast Prep“ Röhrchen überführt und in dem dafür vorgesehenen Gerät zweimal für 30 sec bei 5,5 g geschüttelt. Nach kurzem Abkühlen auf Eis werden die Zelltrümmer für 10 min bei 13000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen 100 % Ethanol versetzt und auf eine RNeasy-Säule aufgetragen. Nach 15 sec Zentrifugation bei 10000 Upm werden die Proben mit 700 µl RW1-Puffer und zweimal mit je 500 µl RPE-Puffer gewaschen, der Durchfluss wird jeweils verworfen. Die RNA wird mit 30 µl Aqua dest. von den Säulen eluiert. Die Konzentration der RNA wird photometrisch bestimmt (siehe 3.11.) und bei -80 °C gelagert. Die genaue Zusammensetzung der Puffer ist dem Protokoll des Herstellers zu entnehmen.

10.2. DNase-Verdau der RNA

Um DNA aus dem Ansatz zu entfernen, wird ein DNase-Verdau durchgeführt. Dafür werden RNA, DNase I und der entsprechende Puffer gemischt und für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Reaktionsansatz	15 µl	RNA
	5 µl	DNase I
	10 µl	OPA (One-phor-all)-Puffer
	70 µl	Aqua dest.

Anschließend wird der DNase-Verdau kontrolliert, indem eine PCR-Reaktion durchgeführt wird. Als Template dient 1 µl des DNase-Verdau. War der Verdau erfolgreich, darf bei einer PCR-Reaktion kein Produkt entstehen. Als Positivkontrolle der PCR-Reaktion dient chromosomale DNA. Falls noch DNA in den RNA-Proben vorhanden war, muss der DNase-Verdau wiederholt werden. Für das weitere Arbeiten mit der RNA wird diese aufgereinigt.

10.3. Aufreinigung der RNA

100 µl DNase-Verdau, 250 µl Ethanol und 350 µl RLT-Puffer (mit 10 µl/ml β-Mercaptoethanol) werden gemischt und auf eine RNeasy-Säule gegeben. Nach kurzem Abzentrifugieren mit 10000 Upm wird der Ansatz zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Die Säulen werden für 2 min trocken zentrifugiert und die RNA mit 30 µl Aqua dest. von der Säule eluiert. Die genaue Zusammensetzung der Puffer ist dem Protokoll des Herstellers zu entnehmen.

10.4. Reverse Transkription

Um die gereinigte RNA in cDNA umzuschreiben, wird eine reverse Transkription durchgeführt. Hierfür werden 2 µg RNA mit Random Hexamer Primer und dNTPs gemischt und für 5 min bei 65 °C inkubiert.

2 µg	RNA
200 ng	Random Hexamer Primer
1 µl	dNTPs (10 mM je Nukleotid)
ad 13 µl	Aqua dest.

Nach kurzem Abkühlen auf Eis werden noch folgende Komponenten hinzugefügt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die reverse Transkription erfolgt im Heizblock bei 50 °C für 1 h. Die Reaktion wird anschließend bei 70 °C für 15 min inaktiviert.

4 µl	5 × First-Strand Buffer
1 µl	0,1 M Dithiothreitol (DTT)
1 µl	RNaseOUT
1 µl	SuperScript III RT

Die cDNA kann direkt als Template für anschließende PCR-Analysen verwendet werden.

11. Real-Time Reverse Transkription (RT)-PCR (Real-Time PCR)

Zur Detektion doppelsträngiger DNA mittels Real-Time PCR wird der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I (Bio Rad) verwendet, der sich spezifisch in doppelsträngige DNA einlagert. Die Zunahme an doppelsträngiger DNA während der PCR-Reaktion kann so direkt durch die Zunahme der Fluoreszenz verfolgt werden. Für die Auswertung der Real-Time PCR ist der PCR-Zyklus entscheidend, bei dem die Fluoreszenz zum ersten Mal deutlich über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Dieser Zyklus wird als CT-Wert (Cycle of Threshold) bezeichnet.

Um die Expression eines Gens in unterschiedlichen Bakterienstämmen vergleichen zu können, wurde für jede Probe der CT-Wert mit Gen-spezifischen Primern ermittelt. Die Differenz der CT-Werte der zu vergleichenden Proben ist die Grundlage zur mathematischen Bestimmung der relativen Expression. Zur Normalisierung der Proben wurde eine PCR-Reaktion mit einem Referenzgen durchgeführt, dessen Expression sich unter den entsprechenden Bedingungen nicht ändern sollte. Hierfür wurde das Gen *rrsH* gewählt, welches für die ribosomale 16S RNA kodiert und konstitutiv exprimiert wird. Die Differenz des CT-

Wertes für das Referenzgen sollte nahezu Null sein. Außerdem kann mit den *rrsH*-spezifischen Primern kontrolliert werden, ob in jedem PCR-Ansatz die gleiche Menge an cDNA vorhanden war. Leichte Unterschiede werden in der Gleichung zur relativen Quantifizierung berücksichtigt (Pfaffl, 2001):

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{CT}_{\text{target}}(\text{control-sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CT}_{\text{ref}}(\text{control-sample})}}$$

Die Ratio beschreibt die relative Expression eines Gens z.B. der *clpX*- oder *clpP*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp, wobei die Expression des Wildtyps gleich 1 gesetzt wird. E ist die PCR-Effizienz der jeweiligen spezifischen Primer für Ziel- und Referenzgen. Diese kann bei ähnlichen E-Werten mit 2 gleichgesetzt werden. Als signifikante Änderung der relativen Expression wurden Ratios $\leq 0,5$ und $\geq 2,0$ berücksichtigt, Werte zwischen 0,5 und 2,0 wurden als nicht signifikante, geringfügige Änderung betrachtet.

Zunächst wurde für jedes verwendete Primerpaar die optimale Annealing-Temperatur und Amplifizierungseffizienz ermittelt, bevor mit den eigentlichen RT-PCR-Experimenten begonnen werden konnte.

Als optimale Annealing-Temperatur wurde 60 °C ermittelt. Bei dieser Temperatur traten keine Primeraddukte und keine unspezifischen RT-PCR-Produkte auf. Für die Ermittlung der Amplifizierungseffizienz wurden die CT-Werte der einzelnen Verdünnungsstufen ermittelt und in einer Eichgeraden aufgetragen. Die c-DNA für das Referenzgen *rrsH* wurde im Bereich von 10^{-3} – 10^{-7} verdünnt. Für die restlichen Primerpaare wurde eine 10^{-1} -Verdünnung jeweils in vier weiteren Stufen 1:3 verdünnt.

Mit Hilfe der MyiQ-Software (Bio Rad) wurde diese Eichgerade gezeichnet und deren Steigung ermittelt. Anhand der Steigung kann die PCR-Effizienz nach folgender Gleichung ermittelt werden:

$$\text{PCR-Effizienz: } E = 10^{(-1/\text{Steigung})}$$

Die Effizienz der Primer sollte zwischen 85 % und 100 % liegen, um die Aussagekraft der Ergebnisse zu gewährleisten. Für die verwendeten Primerpaare wurden folgende Amplifizierungseffizienzen bestimmt:

Tab. 9: Amplifizierungseffizienz aller verwendeten Primerpaare für die Real-Time PCR

Primerpaar	PCR-Effizienz
<i>rrsH</i>	94,4%
<i>fimA</i>	98%
<i>sfaA</i>	99,7%
<i>prfA</i>	90,6%
<i>pixA</i>	94,9%
<i>CS12</i>	88,6%
<i>csgA</i>	89,5%
<i>agn43_{hom}</i>	99,6%
<i>agn43_{III}</i>	88,7%
<i>agn43_V</i>	94,9%
<i>flhC</i>	93,2%
<i>fliA</i>	95,1%
<i>fliC</i>	99,9%

Es wurde eine Verdünnungsstufe der cDNA für die weiteren Experimente festgelegt, bei der der CT-Wert zwischen 12 und 20 lag, da hier die Fluoreszenzzunahme im logarithmischen Bereich lag und am wenigsten Fehler auftraten. Die cDNA für das Referenzgen *rrsH* wurde als 1×10^{-5} Verdünnung eingesetzt, für die Zielgene wurde eine Verdünnung von $3,33 \times 10^{-2}$ verwendet.

Alle PCR Reaktionen wurden in 25 μ l Reaktionsvolumen und als Triplets durchgeführt, wobei das zu amplifizierende Fragment eine durchschnittliche Länge von 350 bp hatte.

Reaktionsansatz:	12,0 μ l	cDNA-Verdünnungsstufe
	12,5 μ l	SYBR Green Mix 2 \times
	0,25 μ l	Primer 1 (10 μ mol)
	0,25 μ l	Primer 2 (10 μ mol)

Für die Experimente wurde folgendes PCR-Protokoll verwendet:

3 min	95 °C	} 40 Zyklen
30 sec	95 °C	
30 sec	60 °C	
20 sec	72 °C	
30 sec	95 °C – 57 °C (Schmelzkurve)	

Nach jeder Real-Time PCR Amplifikation wird eine Schmelzpunkt-Analyse durchgeführt. Für jedes Primerpaar darf nur ein spezifisches Produkt mit einem spezifischen Schmelzpunkt nachweisbar sein. Da sich der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green auch in Primerdimere einlagert, muss gewährleistet sein, dass kein Fluoreszenzsignal von Primeraddukten herrührt. Um die Amplifikation unspezifischer Produkte auszuschließen, kann die PCR-Reaktion zusätzlich zur Schmelzpunkt-Analyse auf ein Agarosegel aufgetragen werden.

12. Proteine

12.1. Präparation von Proteinen

12.1.1. Gesamtzellextrakt

Zur Untersuchung der Expression verschiedener Proteine wird 1 ml einer Bakterienkultur entsprechender OD₆₀₀ pelletiert, in 100 µl TE-Puffer resuspendiert und mit 25 µl 5 x Laemmli-Puffer versetzt. Der Ansatz wird 10 min bei 100 °C aufgeköcht und anschließend 10 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Von diesem Extrakt werden 10 µl durch eine diskontinuierliche SDS-PAGE (siehe IV. 12.4.) aufgetrennt.

12.1.2. Isolierung periplasmatischer Proteine

mit Lysozym

20 ml Bakterienkultur werden bei 4500 Upm 5 min zentrifugiert und das Pellet in 180 µl eiskaltem Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 20 µl Lysozym (5 mg/ml in 0,1 M EDTA) wird 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden 4 µl 1M MgCl₂-Lösung zugegeben und nach kurzem Vortexen 1 h bei 13000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Im Überstand befindet sich der periplasmatische Extrakt.

mit Polymyxin B

20 ml Bakterienkultur werden bei 4500 Upm 5 min zentrifugiert und das Pellet in 200 µl eiskaltem Puffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA und 1 mg/ml⁻¹ Polymyxin B-sulfat) resuspendiert. Nach 2,5 h Inkubation auf dem Schüttler bei 4 °C wird für 1 h bei 13000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Im Überstand befindet sich der periplasmatische Extrakt.

12.2. Hitzeextraktion von Fimbrien

20 ml einer Bakterienkultur der entsprechenden OD₆₀₀ werden bei 5000 Upm abzentrifugiert und in 5 ml TE-Puffer aufgenommen. Anschließend wird die Suspension unter Schütteln für 30 min bei 62 °C im Wasserbad inkubiert und sofort danach im Eisbad abgekühlt. Die Suspension wird 5 × 10 sec gevortext und bei 5000 Upm 10 min zentrifugiert. Im Überstand befinden sich die von der Zelloberfläche abgescherten Fimbrien.

Um den Überstand einzuengen werden jeweils 2 ml auf ein Centricon 20 Filter gegeben und für 90 min bei 6000 Upm aufkonzentriert. Der Fimbrienextrakt wird auf 500 µl eingestellt und 10 µl für die SDS-PAGE eingesetzt.

12.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels Roti[®]Nanoquant (Roth)

Bei dieser Methode wird die Absorption einer Färbelösung bei 450 nm und 590 nm bestimmt. Zur Proteinbestimmung werden 800 µl Roti[®] Nanoquant Arbeitslösung (1:5 verdünnte Stocklösung) mit 200 µl verdünnter Proteinlösung gegen Aqua dest. im Photometer gemessen, wobei die Proteinprobe so verdünnt wird, dass der Quotient A_{590}/A_{450} 0,7 - 0,8 beträgt.

Formel:

Proteinmenge [µg/µl] = Verdünnungsfaktor × ((A_{590}/A_{450})-0,4475)/0,1132)

Der Verdünnungsfaktor ist der Quotient der reziproken Verdünnung und des eingesetzten Volumens [µl] der Verdünnung.

12.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE, Laemmli, 1970)

Ein SDS-Gel besteht aus einem Trenngel und einem Sammelgel. Zunächst wird das Trenngel zwischen zwei Glasplatten, die durch 0,75 mm breite Spacer voneinander getrennt werden, bis etwa 2 cm unter den oberen Rand gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Die Acrylamidkonzentration des Trenngels wird in Abhängigkeit von der Größe der Proteine, die aufgetrennt werden sollen, gewählt. Nach der Polymerisation des Gels wird das Isopropanol abgeschüttet, mit Wasser überschichtet und über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Am nächsten Tag wird das Sammelgel (5 %) auf das Trenngel gegossen. Für die Ausbildung von Auftragstaschen im Sammelgel wird hier ein Gelkamm zwischen die Glasplatten eingeschoben. Nach Polymerisation des Sammelgels wird es vertikal in der Gelelektrophoresekammer befestigt und die Gelkammer mit 1 x Elektrophoresepuffer gefüllt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt 1,5 h bei 60 mA.

TE-Puffer	10 mM 1 mM	Tris-HCl, pH 7,5 EDTA, pH 7,5
5 x Laemmli-Puffer	1,1 g 0,41 g 0,17 g 1,1 ml	SDS EDTA NaH ₂ PO ₄ × 2 H ₂ O β-Mercaptoethanol, pH 7,2
15 % Trenngel	9,2 ml 20 ml 10 ml 400 µl 400 µl 16 µl	Aqua dest. 30 % Acrylamid-Mix 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 10 % SDS 10 % APS (Ammoniumpersulfat) TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)
5 % Sammelgel	2,7 ml 830 µl 1,3 ml 50 µl 50 µl 5 µl	Aqua dest. 30 % Acrylamid Mix 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 10 % SDS 10 % APS TEMED
10 × Elektrophoresepuffer	30 g 144 g 100 ml ad 1000 ml	Tris Glycin 10 % SDS Aqua dest.

12.5. Western Blot-Analyse

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine durch PAGE werden diese im Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran geblottet.

Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgt horizontal in einer Blotapparatur mit Graphitplatten. Zuerst werden die Nitrozellulosemembran und 12 Whatmanpapierfilter auf Gelgröße zurechtgeschnitten. Die Membran wird 10 min in Anodenpuffer II inkubiert. Auf die mit Aqua dest. befeuchtete untere Graphitplatte legt man zunächst 6 Lagen mit Anodenpuffer I getränkte Whatmanpapiere, dann 3 Lagen mit Anodenpuffer II befeuchtete Papierfilter und auf diese die Nitrozellulosemembran. Darauf wird dann das Gel gelegt und mit 3 Lagen in Kathodenpuffer getränktem Whatmanpapier bedeckt. Im Aufbau vorhandene Luftblasen werden entfernt, bevor die obere Graphitplatte aufgelegt wird. Der Transfer erfolgt mit $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gelfläche für 1 h bei RT.

Anodenpuffer I	0,3 M 20 % ad 1000 ml	Tris Methanol Aqua dest.
Anodenpuffer II	25 mM 20 % ad 1000 ml	Tris Methanol Aqua dest.
Kathodenpuffer	25 mM 40 mM ad 1000 ml	Tris ϵ -amino-n-Caprinsäure Aqua dest.

12.6. Antikörperreaktion

Nach dem Elektroblothen werden zuerst die freien Proteinbindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran durch 1 h Inkubation in TBS-T mit 5 % (w/v) Magermilch bei RT abgesättigt. Anschließend wird der Blot 1 h bei RT oder ÜN bei 4 °C in der Primär-Antikörperlösung inkubiert. Die Verdünnung des Primär-Antikörpers ist abhängig vom jeweiligen Serum und erfolgt in $1 \times$ TBS-T mit 5 % (w/v) Magermilch. Die Primär-Antikörperlösung wird abgezogen (kann erneut verwendet werden), und es wird 3×5 min mit $1 \times$ TBS-T gewaschen. Im Anschluss erfolgt 1 h Inkubation mit einem peroxidasegekoppelten Sekundär-Antikörper. Anschließend wird 3×5 min mit $1 \times$ TBS-T gewaschen

und der Blot entwickelt. Als Substrat verwendet man die ECL-Entwicklungslösung (siehe IV. 5.2.).

1 × TBS-T	20 ml	1 M Tris-HCl, pH 7,5
	30 ml	5 M NaCl
	1 ml	TWEEN 20
	ad 1000 ml	Aqua dest.

12.7. Coomassie-Blau-Färbung von eindimensionalen SDS-Polyacrylamidgelen

Um zu überprüfen, ob für die Western-Hybridisierung die gleichen Proteinmengen eingesetzt wurden, wird nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine eine Coomassie-Blau-Färbung durchgeführt. Hierzu wird das Gel 20 min in Coomassie-Färbelösung gefärbt. Anschließend wird mindestens für 1 h mit Entfärber I entfärbt und das Gel über Nacht in Entfärber II inkubiert.

Coomassie-Färbelösung	1 g/l	Coomassie Brilliant Blau G-250
	30 % (v/v)	Ethanol
	10 % (v/v)	Essigsäure

Entfärbelösung I	10 % (v/v)	Essigsäure
	50 % (v/v)	Ethanol

Entfärbelösung II	7,5 % (v/v)	Essigsäure
	5% (v/v)	Ethanol

13. Die zweidimensionale Gelelektrophorese

Die eindimensionale Elektrophorese kann im günstigsten Fall nur ungefähr 50-100 Proteine auftrennen. Für die Analyse von vielen hunderten Proteinen, wie sie in ganzen Zellen vorkommen, ist dieses Auflösungsvermögen unzureichend. Für diesen Zweck entwickelte O'Farrell (O'Farrell, 1975) die zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2-D PAGE), welche die Proteine nach zwei unabhängigen Kriterien, nämlich Ladung (erste Dimension) und Molekulargewicht (zweite Dimension) trennt und damit die Untersuchung von mehreren hundert Genprodukten auf einem einzigen Gel ermöglicht.

13.1. Präparation zytoplasmatischer Proteine

Zur Präparation zytoplasmatischer Proteine aus *E. coli* wird eine mechanische Aufschlussmethode mit Hilfe von Glaskügelchen (siehe IV. 10.1.) durchgeführt. Die Bakterien werden in LB-Medium bei 37 °C und 220 Upm im Schüttelinkubator angezogen. 50ml einer Kultur der logarithmischen ($OD_{600}=1$) oder stationären ($OD_{600}=3$) Wachstumsphase werden bei 5000 Upm abzentrifugiert. Das Zellpellet kann bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden. Um die Zellen aufzuschließen wird das Pellet in 1 ml TE-Puffer resuspendiert und in ein „Fast Prep“ Röhrchen überführt. Der Aufschluss erfolgt in dem dafür vorgesehenen Gerät in 2 Durchgängen für 30 sec bei 5,5 g, zwischendurch werden die Proben für 2 min auf Eis gekühlt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 10 min bei 13000 Upm wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration bestimmt (siehe IV. 12.3.).

13.2. Präparation extrazellulärer Proteine

400 ml einer LB-Schüttelkultur der logarithmischen ($OD_{600}=1$) oder stationären ($OD_{600}=3$) Wachstumsphase werden bei 5000 Upm für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wird mit 40 ml Trichloressigsäure 100 % versetzt und zur Fällung der Proteine über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen werden die Proben für 1 h bei 10000 Upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wird mit 20 ml eiskaltem 100 % Ethanol abgelöst und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Es folgen mindestens sechs weitere Waschschriffe mit 100 % Ethanol bei 4 °C. Beim letzten Waschschriff wird 70 % Ethanol verwendet. Das Pellet wird bei Raumtemperatur für einige Stunden an der Luft getrocknet. Um die Proteine in Lösung zu bringen, wird das Pellet in 500 µl einer Harnstoff (8 M)/Thioharnstoff (1,5 M)-Lösung für mindestens 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Lösung wird dann zweimal für 15 min bei 13000 Upm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, um unlösliche Bestandteile aus der Probe zu entfernen. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe IV. 12.3.) können die Proben bei -20 °C gelagert werden.

Auftragen der Probenmenge „nach optischer Dichte“

Um die Vergleichbarkeit von extrazellulären Proteingelen zu erhöhen, wurde die Probenmenge „nach Volumen“ auf die IPG-Streifen aufgetragen. Diese Methode beruht auf der Annahme, dass nach einer Präparation von zwei unabhängigen Proteinproben des gleichen

Stammes unter den gleichen Bedingungen sowie einer identischen Präparation die gleiche Menge an Protein in den beiden Proben vorliegt. Auf dieser Basis lassen sich Veränderungen in der extrazellulären Proteinmenge z.B. im Vergleich von Wildtyp und Mutanten darstellen.

13.3. Rehydratisierung

Bei der Rehydratisierung wird die Proteinprobe in eine Gelmatrix gebracht, welche immobilisierte Ampholyte beinhaltet. Die Ampholyte bilden einen stabilen pH-Gradienten, in dem die Proteine in der ersten Dimension (siehe IV. 13.4.) aufgetrennt werden. Es wurden verschiedene Typen von immobilisierten pH-Gradienten (IPG)-Streifen verwendet (pH 4 - 7 und 5,5 - 6,7; jeweils 18 cm). Die Streifen werden mit 100 bis 500 µg Protein beladen. Proben, deren Volumen 40 µl übersteigt, werden in der Speed Vac bei mittlerer Hitze aufkonzentriert. Die Proteinprobe wird nun in 360 µl Rehydratisierungslösung aufgenommen und für 10 min geschüttelt. Anschließend wird die Probe für 15 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert und in die Vertiefung der Rehydratisierungsschale pipettiert. Die Rehydratisierung erfolgt nach dem „in-gel-rehydration“ Prinzip (Görg, 2000). Die IPG-Streifen werden mit der Gelseite nach unten auf die Proteinlösung gelegt damit die Lösung über die gesamte Länge des Streifens aufgenommen werden kann. Um ein Kristallisieren des Harnstoffs zu vermeiden, werden die IPG-Streifen gleichmäßig mit „cover fluid“ Öl überschichtet und bei Raumtemperatur für mindestens 20 Stunden äquilibriert.

Rehydratisierungslösung

2,4 g	8 M Harnstoff
0,76 g	1,5 M Thioharnstoff
50 mg	12,9 mM DTT
50 mg	1% 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS)
ad 26 µl	0,04% Pharmalyte 3-10
5 ml	Aqua dest.

13.4. Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)

In der ersten Dimension werden die Proteine in den IPG-Streifen nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt. Die rehydratisierten IPG-Streifen werden, mit dem positiven Ende zur Anode, auf die vortemperierte (20 °C) Keramikplatte der Multiphor-Kammer gelegt. An beiden Enden der IPG-Streifen werden die mit Aqua dest. getränkten Elektrodenstreifen

aufgelegt und darauf die Elektroden platziert. Die IPG-Streifen werden mit „cover fluid“ Öl überschichtet und der IEF-Lauf gestartet. Zur Verbesserung der Auftrennung werden die Elektrodenstreifen 3 - 4 × gewechselt.

Laufbedingungen:

1. Stufe	500 V	5 W/1 A max.	1 h
2. Stufe	1000V	5 W/1 A max.	1 h
3. Stufe	3500 V	5 W/1 A max.	22 h

13.5. Äquilibration

Die IPG-Streifen werden nach dem Lauf aus der Kammer entnommen und entweder sofort weiterverwendet oder bei -20 °C in Alufolie gelagert. Bevor die IPG-Streifen auf die Oberfläche eines SDS-Gels aufgelegt werden können, müssen die fokussierten Proteine noch mit SDS beladen werden, um einen optimalen Proteintransfer von der ersten zur zweiten Dimension zu gewährleisten. Weiterhin wird in diesem Schritt mittels DTT sichergestellt, dass alle Disulfidbrücken gespalten werden. Durch Iodacetamid werden die freien Sulfid-Gruppen alkyliert, um eine Wiederherstellung der Bindung während der Elektrophorese zu vermeiden.

Zur Äquilibration werden die Streifen für jeweils 20 - 30 min zunächst in Lösung A und anschließend in Lösung B geschüttelt. Das in Lösung B enthaltene Bromphenolblau dient später als Laufbande in der zweiten Dimension.

Äquilibrationlösung (A und B):

6 M Harnstoff	36 g
30 % Glycerin	30 ml
4 % SDS	4 g
50 mM Tris-HCl pH 8,8	3,3 ml (1,5 M Tris-HCl pH 8,8)
Aqua dest.	ad 100 ml

Lösung A 38,9 mM DTT 300 mg

Lösung B 24,3 mM Iodacetamid 2,25 g
 Bromphenolblau Spatelspitze

13.6. Zweite Dimension: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteine werden in der zweiten Dimension durch SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamid gel electrophoresis) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Es werden SDS-Gele mit einer Schichtdicke von 1 mm hergestellt. Das SDS- Polyacrylamidgel wird im Gelgießstand gegossen, welcher die durch Spacer getrennten Glasplatten enthält und mit Isopropanol überschichtet, um eine gerade Oberfläche zu erhalten. Die Acrylamidkonzentration des Gels wird in Abhängigkeit von der Größe der aufzutrennenden Proteine gewählt. Nach einer Polymerisationszeit von 1 h werden die Platten dem Gießstand entnommen und mit Aqua dest. gereinigt. Die äquilibrierten IPG-Streifen werden luftblasenfrei auf das Gel gelegt und mit einer auf 50 °C abgekühlten Agaroselösung überschichtet. Die Gelkassetten werden in die mit 1 × Elektrophoresepuffer gefüllte Gelkammer eingesetzt und die obere Kammer mit 2 × Elektrophoresepuffer überschichtet. Die Elektrophorese wird bei 6 bis 12 Watt (400 V, 300 mA) über Nacht durchgeführt.

10 × Elektrophoresepuffer:	Tris	30 g
	Glycin	144 g
	10 % SDS	100 ml
	Aqua dest.	ad 1000 ml

SDS- Polyacrylamidgel (400 ml):	12,5 %	15 %
Aqua dest.	66 ml	14,8 ml
Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	100 ml	100 ml
Acrylamid 30 %	162 ml	200 ml
Bisacrylamid 2 %	68 ml	80 ml
SDS 10 %	4 ml	4 ml
APS 10 %	1 ml	1 ml
TEMED	200 µl	200 µl

Agaroselösung	Agarose	0,25 g
	Aqua dest.	40 ml
	10 × Elektrophoresepuffer	10 ml

13.7. Proteinfärbungen in 2-D Gelen mit kolloidalem Coomassie

Diese Färbemethode ist sensitiv und ermöglicht eine massenspektrometrische Analyse der Proteine. Es sind 300 bis 400 µg Protein für eine ausreichend starke Färbung nötig.

Die Gele werden für eine Stunde fixiert. Es folgten zwei Waschschrte mit Aqua dest. für jeweils 10 min. Zur Färbung werden die Gele zwei Tage mit der Coomassie-Färbelösung

inkubiert. Zum Entfärben werden die Gele mehrere Stunden in Aqua dest. geschüttelt, wobei das Wasser mehrmals gewechselt wird.

Fixierer

400 ml	Ethanol 100 %
100 ml	Essigsäure 100 %
ad 1000 ml	Aqua dest.

Stammlösung Coomassie Brilliant Blau (CBB)

5 g	Coomassie-Brilliant Blau G-250
ad 100 ml	Aqua dest.

Kolloidale Coomassie-Färbelösung

20 ml	CBB
100 g	Ammoniumsulfat
12 ml	Phosphorsäure 85%
ad 1000 ml	Aqua dest.
250 ml	EtOH 100 %

13.8. Auswertung von 2-D Gelen mittels Delta-2D[®] Software (Decodon)

Die vergleichende Analyse der Proteingele wird mit der Software Delta-2D[®] von Decodon durchgeführt. Hierfür werden die Gele als Graustufenbild eingescannt und als TIFF-Datei gespeichert. Die zu vergleichenden Gele werden in das Programm geladen, es werden Falschfarbenbilder der Gele erzeugt und gleiche Proteinspots durch „warping“ zur Deckung gebracht. Anschließend wird die Farbintensität der zwei Gelbilder angeglichen, Unterschiede in den Proteinmengen der einzelnen Spots werden durch Farbverschiebungen dargestellt. Die Proteinspots werden beschriftet und das Zweikanalbild nach Powerpoint[™] exportiert, wo es als PPT-Datei gespeichert werden kann.

13.9. Identifizierung von Proteinen aus 2-D Gelen mittels MALDI-TOF-MS

Das Ausstechen der Proteine aus dem Gel wird halbautomatisch mit Hilfe eines „Spot-picking“ Roboters durchgeführt. Zuvor muss das Gel für mindestens 1 h gewässert werden. Anschließend wird es in den Roboter gelegt und fixiert. Über eine Kamera wird ein Bild des Gels auf einen Monitor übertragen, anhand dessen die auszuschneidenden Proteinspots per „Mausklick“ angesteuert und ausgestanzt werden können. Die Proteinspots werden in eine

96-well Mikrotiterplatte platziert. Der anschließende Verdau erfolgt automatisch in der Ettan Spot Handling Workstation von Amersham Biosciences. Dabei findet ein „In-Gel-Verdau“ statt. Als verdauendes Enzym wird Trypsin verwendet, das spezifisch Peptidbindungen am C-Terminus von Lysin (K) und Arginin (R) spaltet. Dabei entsteht ein für das jeweilige Protein spezifisches Fragmentmuster. Jedes einzelne Fragment hat eine spezifische Masse und kann später im MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization - Time Of Flight Mass Spectrometer) nachgewiesen werden. Die Gesamtheit aller Massen der Fragmente des Proteins ergibt letztlich den „Peptidmass-Fingerprint“. Durch den Vergleich des Peptidmassen-Datensatzes eines Proteins mit einer Datenbank kann das Protein identifiziert werden. Je mehr einzelne Fragmentmassen zwischen Protein und Datenbank übereinstimmen, desto höher ist die Zuverlässigkeit der Identifikation.

Im Verdauroboter wird zunächst das Coomassie aus dem Gel gewaschen. Nach dem Trypsinverdau wird das Gel durch Waschen mit Acetonitril entfernt. Das verdaute Protein wird vom Roboter direkt auf die Messplatte getropft. Die beladene Platte wurde mit einem MALDI-TOF-MS analysiert, wobei die Massen der Peptidfragmente bestimmt werden, die man in Form von Massenspektren erhält. Die MALDI-TOF-MS Analysen wurden von Dirk Albrecht (Greifswald) durchgeführt. Die gemessenen Massenspektren werden vorgeeicht, so dass eine unmittelbare Auswertung der Daten mit GPMW 4.10 (lighthouse data) möglich ist. Als Standard wird eine maximale Massenabweichung von 50 ppm und als Proteinmodifikation Carbamidomethylierung bei Cystein, sowie Sulfoxidierung bei Methionin eingestellt. Als Datenbank wird die Sequenz von *E. coli* K-12 MG1655 (Blattner *et al.*, 1997) und *E. coli* 536 (unveröffentlicht) verwendet.

14. Analyse von Lipopolysacchariden (LPS)

14.1. Isolierung von Lipopolysacchariden

Bakterien, die über Nacht auf LB-Agarplatten bei 37 °C gewachsen sind, werden in ein tariertes Reaktionsgefäß eingewogen und auf 1 mg/15 µl mit TE-Puffer eingestellt. Zu 15 µl der Bakteriensuspension werden die gleiche Menge an 2 × Laemmli-Puffer gegeben und 10 min bei 100 °C gekocht. Dem Ansatz werden 30 µl 1 × Laemmli-Puffer und 5 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugefügt und für 1 h bei 65 °C inkubiert. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt werden 30 µl für eine SDS-PAGE verwendet.

14.2. Silberfärbung von Lipopolysacchariden (Tsai und Frasch, 1982)

Nach der Elektrophorese erfolgt eine Färbung der Proteine und LPS durch Silbernitrat. Hierfür müssen alle verwendeten Geräte mit 70 % Ethanol gereinigt werden. Das Gel wird für mindestens 4 h in Fixierlösung inkubiert. Anschließend wird der Fixierer durch Periodatlösung ersetzt und für weitere 5 min inkubiert. Nach 3 Waschschritten für jeweils 30 min mit Aqua dest. wird das Gel für 10 min in Silbernitratlösung sensitiviert. Nach drei weiteren Waschschritten für jeweils 10 min erfolgt die Entwicklung des Gels. Hierfür wird die auf 60 °C vorgewärmte Entwicklerlösung zugegeben. Wenn eine ausreichende Farbintensität der Banden erreicht ist, wird die Entwicklung durch Waschen mit 50 mM EDTA-Lösung gestoppt. Nach 10 min kann die Lösung durch Wasser ersetzt werden.

2 × Fixierlösung	250 ml 70 ml ad 500 ml	Isopropanol 100 % Essigsäure 100 % Aqua dest.
Periodatlösung	0.87 g 100 ml	Natriumperiodat (NaIO ₄) 1 × Fixierlösung
Silbernitratlösung	1,4 ml 1 ml 70 ml 1.25 ml	1 M NaOH NH ₃ (33 %) Aqua dest. AgNO ₃ 20 %
Entwicklerlösung	100 ml 27 µl	NaCO ₃ (2,5%) Formaldehyd (37 %)

15. Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen

Für diese Untersuchungen werden die Stämme über Nacht auf LB-Agarplatten inkubiert. Für die Transmissionselektronenmikroskopie werden 20 µl 0,9 % NaCl-Lösung auf ein mit Formvar[®] beschichtetes Kupferdrahtnetz gegeben und mit einer Pipettenspitze ein wenig Bakterien in den Tropfen durch leichtes Bewegen eingebracht. Nach 30 - 60 sec Inkubation, während der sich die Bakterien auf das Trägernetz absetzen können, wird der Tropfen mit einem Filterpapier beseitigt. Anschließend wird das Netz 30 - 60 sec mit 20 µl 0,2 % Uranylacetat-Lösung inkubiert und mit einem Filterpapier sorgfältig getrocknet. Die Trägernetze werden bis zur elektronenmikroskopischen Untersuchung in einer „grid box“ aufbewahrt.

Die Untersuchung erfolgt mit dem Zeiss 10 A Transmissionselektronenmikroskop bei einer Spannung von 60 kV.

16. Phänotypische Tests

16.1. Qualitative Agglutination

Antikörperagglutinationstest

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

Hefeagglutinationstest (Ørskov und Ørskov, 1985)

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

16.2. Motilitätsnachweis

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

16.3. Nachweis von Curli

Die Bakterien werden mit einem Zahnstocher auf eine Kongorot-Agarplatte aufgebracht und für 48 - 72 h bei Raumtemperatur, 30 °C und 37 °C inkubiert. Curli-positive Stämme zeichnen sich durch eine rauhe, trockene Oberfläche und tiefrote Farbe der Kolonien aus. Curli-negative Stämme bilden eher glatte, glänzende Kolonien mit weißlicher Farbe.

16.4. Nachweis von Cellulose

Um die Bildung von Cellulose in der extrazellulären Matrix von Bakterien zu testen, werden mit einem Zahnstocher Kolonien auf eine Calcofluor-Agarplatte aufgebracht und für 48 - 72 h bei Raumtemperatur, 30 °C und 37 °C inkubiert. Die Celluloseproduktion wird direkt nach der Inkubation unter UV-Licht bei 254 nm detektiert. Cellulose-produzierende Stämme zeichnen sich durch weiße Fluoreszenz aus, Cellulose-negative Stämme bleiben dunkel.

16.5. Nachweis von α -Hämolyisin

Die zu testenden Stämme werden durch einen Zahnstocher auf Blutagarplatten aufgebracht und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Produktion von α -Hämolyisin wird durch Bildung von klaren Lysishöfen angezeigt.

16.6. Autoaggregationsassay

Die Stämme werden 8 - 10 h als Schüttelkultur bei 37 °C in LB-Medium angezogen. Von diesen Kulturen werden Übernackulturen in 5 ml M63 Medium angesetzt und bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag werden die Kulturen auf $OD_{600}=3$ eingestellt und erschütterungsfrei bei Raumtemperatur (20 °C) stehen gelassen. Zu bestimmten Zeitpunkten werden 100 μ l Aliquots aus dem oberen cm der Kultur entnommen und die OD_{600} bestimmt.

V. Ergebnisse

1. Untersuchungen zum Einfluss der ATP-abhängigen Protease ClpXP auf den uropathogenen *E. coli* Stamm 536

1.1. Konstruktion und Überprüfung von *clpX*- und *clpP*-Deletionsmutanten im *E. coli* Stamm 536

Um den Einfluss der ATP-abhängigen Serinprotease ClpXP auf die Expression von insbesondere Virulenzfaktoren des uropathogenen *E. coli* Stammes 536 zu untersuchen, wurden die Gene *clpX* bzw. *clpP* inaktiviert. Zur Konstruktion dieser Deletionsmutanten wurde ein Rekombinationssystem adaptiert, das einen spezifischen chromosomalen Allelaustausch mit Hilfe von linearen DNA-Fragmenten (PCR-Produkten) ermöglicht (Datsenko und Wanner, 2000 und IV. 9.).

Die erfolgte Integration von *cat* und gleichzeitige Deletion von *clpX* oder *clpP* resultierte in den Stämmen 536 $\Delta clpX::cat$ und 536 $\Delta clpP::cat$. Durch die anschließende Deletion von *cat* mit Hilfe der FLP-Rekombinase erhielt man die Deletionsmutanten 536 $\Delta clpX$ und 536 $\Delta clpP$. Die korrekte Integration der *cat*-Kassette sowie die Deletion von *clpX* und *clpP* wurden mit Hilfe von PCR- und Southern Blot-Analysen überprüft.

Für die PCR-Analyse wurden zunächst Primer gewählt, die außerhalb des deletierten Bereiches im Chromosom binden. Mit den *clpX*-spezifischen Primern (*clpX3*, *clpX4*) wurde wie erwartet vom Wildtyp ein Fragment von 1418 bp amplifiziert, während die *clpX::cat*-Mutante ein verändertes Produkt von 1321 bp ergab. Von der *clpX*-Mutante, die nicht mehr die *cat*-Kassette trägt, wurde ein verkürztes Produkt von 360 bp erhalten (Abb. 6A). Entsprechende Ergebnisse wurden mit den *clpP*-Mutanten erhalten (Abb. 6B). Außerdem wurde mit *cat*-spezifischen Primern (*cat1*, *cat3*) die Integration der Resistenzkassette bzw. die erfolgreiche Deletion durch die FLP-Rekombinase bestätigt (Abb. 6C).

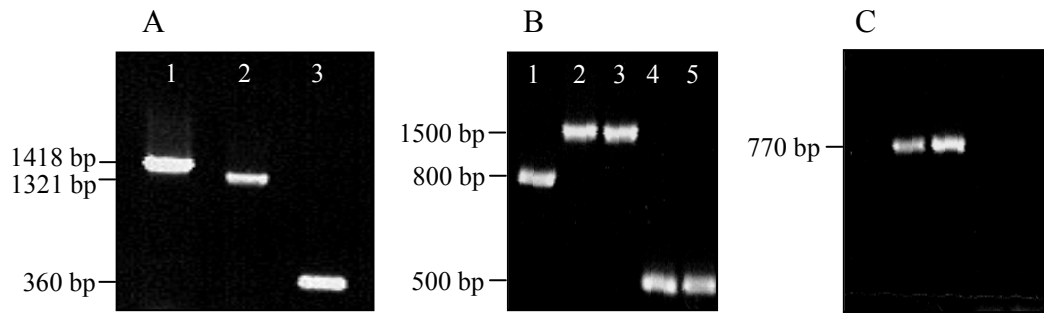


Abb. 6: Überprüfung der *cat*- und Deletionsmutanten durch PCR. A) Überprüfung der Integration von *cat* und Deletion von *clpX* mit *clpX*-spezifischen Primern. Spur 1: 536, Spur 2: 536 Δ *clpX*::*cat*, Spur 3: 536 Δ *clpX*. B)+C) Überprüfung der Integration von *cat* und Deletion von *clpP* durch *clpP*-spezifische (B) und *cat*-spezifische (C) Primer. Spur 1: 536, Spur 2,3: 536 Δ *clpP*::*cat*, Spur 4,5: 536 Δ *clpP*.

Für die Southern Blot-Analyse der *clpX*-Mutanten wurde die chromosomale DNA mit *Pst*I verdaut und die Membran entsprechend mit *clpX*- und *cat*-spezifischen Sonden hybridisiert. Durch die Integration der *cat*-Kassette änderte sich die Fragmentgröße nicht signifikant, so dass die korrekte Integration zusätzlich mit einer *cat*-spezifischen Sonde bestätigt wurde. Durch die erfolgreiche Deletion von *cat* änderte sich die Fragmentgröße deutlich. Man erhielt Signale in den erwarteten Größen und konnte dadurch die korrekte Deletion des Gens *clpX* bestätigen.

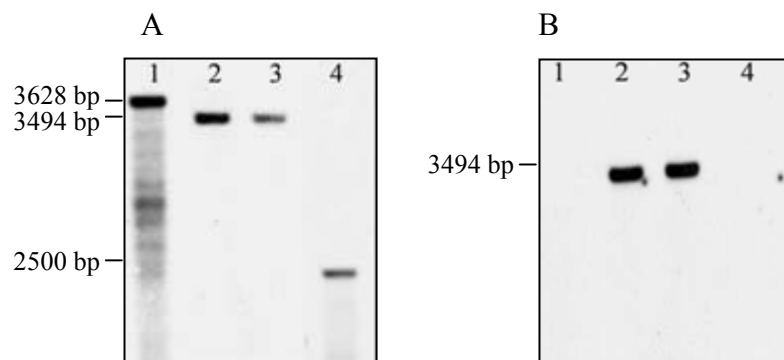


Abb. 7: Southern Blot-Analyse zur Verifizierung der *clpX*-Mutanten. Die chromosomale DNA der verschiedenen Stämme wurde mit *Pst*I geschnitten und die Membran mit *clpX*-spezifischen (A) und *cat*-spezifischen (B) Sonden hybridisiert. Spur 1: 536, Spur 2,3: 536 Δ *clpX*::*cat*, Spur 4: 536 Δ *clpX*.

Für die Southern Blot-Analyse der *clpP*-Mutanten wurde die chromosomale DNA mit *Eco*RI verdaut und die Membran mit *cat*- und *clpP*-spezifischen Sonden hybridisiert. Signale der erwarteten Größe wurden erhalten und bestätigen die korrekte Integration der *cat*-Kassette sowie die Deletion des Gens *clpP*.

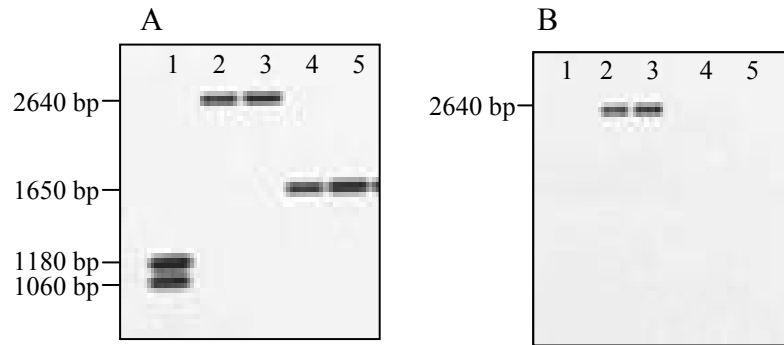


Abb. 8: Southern Blot-Analyse zur Verifizierung der *clpP*-Mutanten. Die chromosomale DNA der verschiedenen Stämme wurde mit *EcoRI* geschnitten und die Membran mit *clpP*-spezifischen (A) und *cat*-spezifischen (B) Sonden hybridisiert. Spur 1: 536, Spur 2,3: 536 Δ *clpP*::*cat*, Spur 4,5: 536 Δ *clpP*.

1.2. Chromosomale Komplementation der Deletionsmutanten 536 Δ *clpX* und 536 Δ *clpP*

Um sicherzustellen, dass alle beobachteten Veränderungen hinsichtlich der Virulenzeigenschaften des Stammes *E. coli* 536 auf die Deletion von *clpX* bzw. *clpP* zurückzuführen sind, wurde eine chromosomale Komplementation dieser Gene in die „ λ attachment site“ *attB λ* der Deletionsmutanten durchgeführt. Hierfür wurden zuerst Plasmide hergestellt, die anschließend als Template für die homologe Rekombination mit PCR-Produkten (Datsenko und Wanner, 2000) eingesetzt wurden.

Für die Klonierung von *clpP* wurde die kodierende Sequenz zusammen mit der Promotorregion durch die Primer *clpP3* und *clpP4* vom Chromosom des Stammes 536 amplifiziert. Die Primer enthielten an ihrem 5'-Ende die Schnittstellen *XbaI* bzw. *HindIII*, über welche das 944 bp große PCR-Produkt in den Klonierungsvektor pGEM[®]-T easy kloniert wurde, woraus Plasmid pKLR2 (siehe VIII. 2.2.) resultierte.

Für die Klonierung von *clpX* mussten zuerst die Promotorregion und kodierende Sequenz einzeln amplifiziert werden, um anschließend mit einer rekombinanten PCR (Higuchi, 1990) zusammengefügt zu werden. Die kodierende Sequenz wurde mit den Primern *clpX7* und *clpX4* amplifiziert, wobei *clpX4* zusätzlich noch eine *HindIII*-Schnittstelle am 5'-Ende enthielt. Die Promotorregion wurde mit den Primern *clpX5* und *clpX6* amplifiziert, wobei *clpX5* wieder eine *XbaI*-Schnittstelle enthielt.

Die Primer *clpX5* und *clpX7* enthielten jeweils an ihrem 3'-Ende einen homologen Überhang von 22 Nukleotiden, durch den die Rekombination der beiden Fragmente bei der PCR

ermöglicht wurde. Das resultierende 1,5 kb PCR-Fragment wurde über die Schnittstellen in pGEM[®]-T easy kloniert (Plasmid pKLR1, siehe VIII. 2.1.).

Als Selektionsmarker wurde *tetA* mit dem Promotor *tet^{p/o}* verwendet. Dieser wurde mit Hilfe der Primer *tet_p/o* und *tetA_rev* von dem Plasmid pKS-*tetA* amplifiziert. Die Plasmide pKLR1 und pKLR2 wurden nun mit *Hind*III linearisiert, die 5'-überhängenden Enden aufgefüllt und die Tetrazyklin-Kassette „blunt-end“ eingefügt. In den resultierenden Plasmiden pKLR3 und pKLR4 (siehe VIII. 2.3. und 2.4.) erfolgte die Insertion jeweils mit der gleichen Orientierung auf dem „Plus-Strang“.

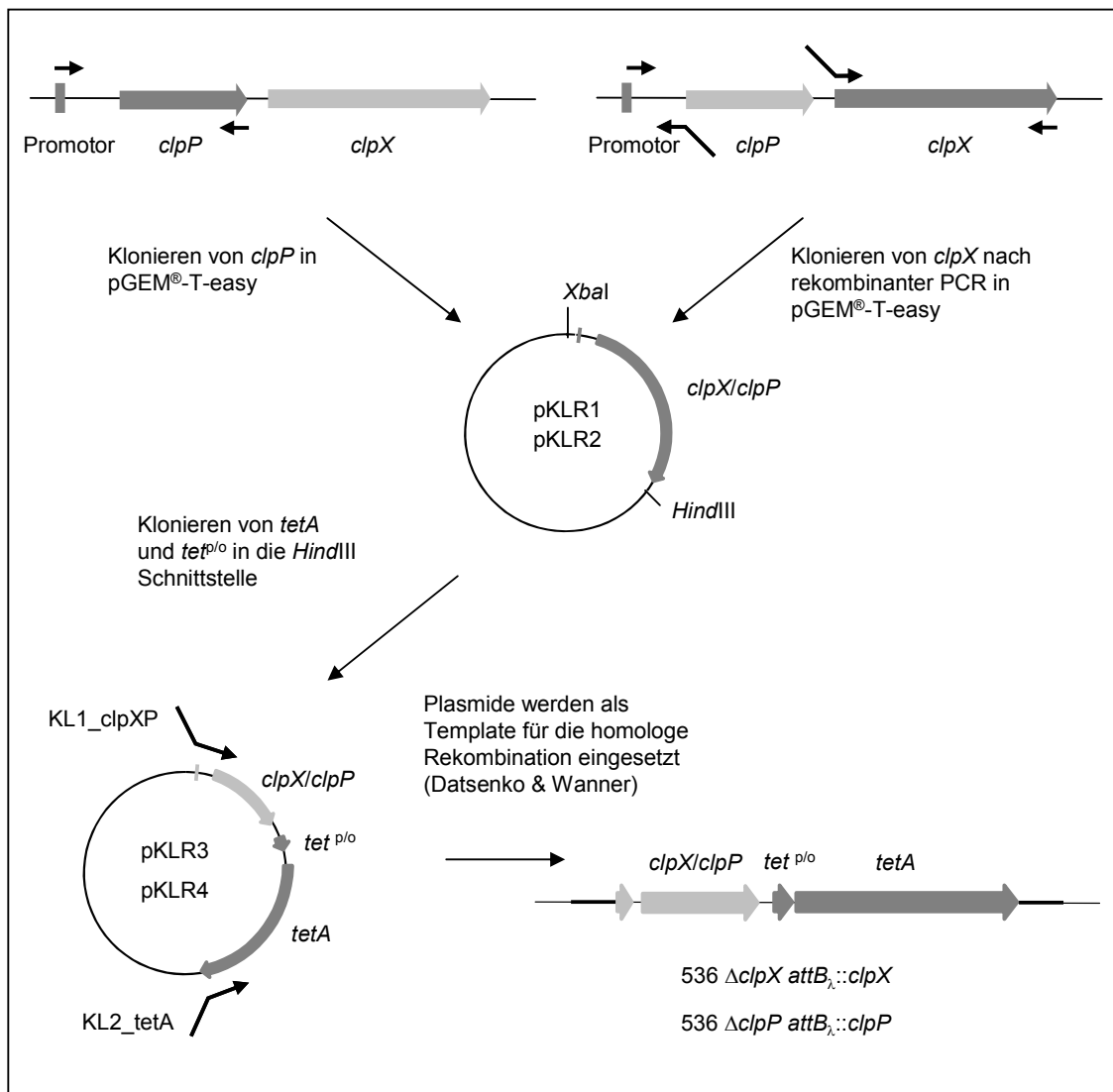


Abb. 9: Schematische Darstellung der chromosomalen Komplementation in die „λ attachment site“ *attB_λ*.

Bei anschließenden PCR-Reaktionen mit den Primern KL1_clpXP und KL2_tetA wurden die Plasmide pKLR3 und pKLR4 als Template verwendet. Dadurch entstanden ein 2,8 kb

und 2,2 kb großes PCR-Produkt, welche *clpX* und *clpP* zusammen mit *tetA* enthielten und homologe Überhänge zu *attB_λ* hatten. Die Integration erfolgte nach der Methode von Datsenko und Wanner (2000), wie unter IV. 9. beschrieben. Es wurde auf Tetrazyklin-resistente Klone selektiert, welche anschließend durch PCR und Southern Blot analysiert wurden.

Für die Überprüfung der Integration in *attB_λ* wurden PCR-Reaktionen mit *attB_λ*-spezifischen Primern sowie mit Primern für *clpP*, *clpX* und *tetA* durchgeführt. Für die Southern Blot-Analyse wurden die chromosomale DNA der *clpX*-Mutanten mit *EcoRV* und die chromosomale DNA der *clpP*-Mutanten mit *EcoRI* verdaut. Für die Detektion von *clpX* und *clpP* wurden Sonden mit den Primern clpX3, clpX4 und clpP3, clpP4 durch PCR-Reaktionen hergestellt. Um die Integration in *attB_λ* zu detektieren wurde eine *attB_λ*-spezifische Sonde verwendet. Die erhaltenen Signale bestätigten die korrekte Insertion von *clpX* bzw. *clpP* in *attB_λ*.

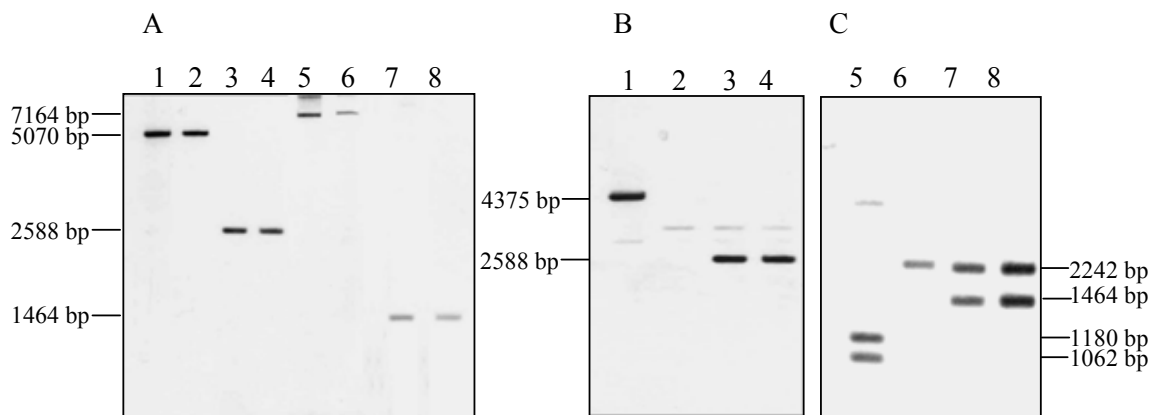


Abb. 10: Southern Blot-Analyse zur Verifizierung der korrekten Integration von *clpX* oder *clpP* in *attB_λ*. Die chromosomale DNA der verschiedenen Stämme wurde mit *EcoRI* für *clpX* und mit *EcoRV* für *clpP* geschnitten. Die Membran wurde mit *attB*-spezifischen (A), *clpX*-spezifischen (B) und *clpP*-spezifischen (C) Sonden hybridisiert. Spur 1,5: 536, Spur 2: 536 $\Delta clpX$, Spur 3,4: 536 $\Delta clpX attB::clpX$; Spur 6: 536 $\Delta clpP$, Spur 7,8: 536 $\Delta clpP attB::clpP$.

1.3. Einfluss von ClpX und ClpP auf das Wachstumsverhalten des Stammes *E. coli* 536

Um zu untersuchen, ob sich die Wachstumseigenschaften der *clpX*- und *clpP*-negativen Mutanten von denen des Wildtyps unterscheiden, wurden Wachstumskurven bei 37 °C in LB-Medium erstellt.

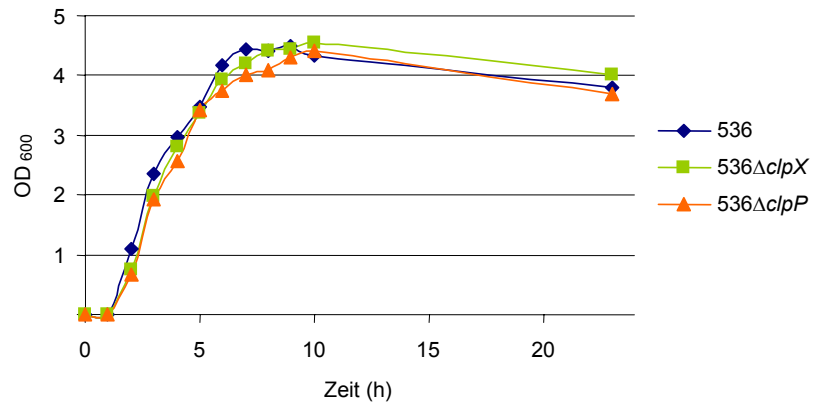


Abb. 11: Repräsentative Wachstumskurve des *E. coli* Wildtypstammes 536 und seiner isogenen *clpX*- und *clpP*-negativen Mutanten bei 37 °C in LB-Medium bei 220 Upm.

Wie in Abbildung 11 gezeigt, hat die Deletion von *clpX* oder *clpP* keinerlei Einfluss auf das Wachstumsverhalten des uropathogenen Stammes *E. coli* 536 bei 37 °C.

Zusammenfassung Abschnitt 1

- Es wurden Deletionsmutanten der Gene *clpX* und *clpP* im uropathogenen *E. coli* Stamm 536 konstruiert und die Deletion mittels PCR-Reaktionen und Southern Blot-Analysen verifiziert.
- Die *clpX*- und *clpP*-Deletionsmutanten wurden anschließend durch Integration der entsprechenden Gene in die „ λ attachment site“ *attB λ* komplementiert.
- Für beide Konstruktionen wurde ein Rekombinationssystem adaptiert, das einen spezifischen chromosomalen Allelaustausch mit Hilfe von linearen DNA-Fragmenten (PCR-Produkten) ermöglicht (Datsenko und Wanner, 2000).
- Die Deletion der Gene *clpX* oder *clpP* hatte keinerlei Einfluss auf das Wachstumsverhalten des Stammes *E. coli* 536 in LB-Medium bei 37 °C.

2. Vergleichende Proteomanalyse des uropathogenen Stammes *E. coli* 536 und seiner isogenen Mutanten 536 $\Delta clpX$ und 536 $\Delta clpP$

Der uropathogene Stamm *E. coli* 536 exprimiert eine Reihe von Virulenzfaktoren, die entweder auf Pathogenitätsinseln oder aber auf dem Kernchromosom lokalisiert sind. Für die Untersuchung des Einflusses der ATP-abhängigen Protease ClpXP auf die Proteinexpression wurde zweidimensionale Gelelektrophorese mit immobilisiertem pH-Gradienten vom *E. coli* Stamm 536 und seinen isogenen *clpX*- und *clpP*-Mutanten durchgeführt. Es wurden sowohl zytoplasmatische als auch extrazelluläre Proteine der logarithmischen und stationären Wachstumsphase analysiert.

2.1. Analyse der ClpX- und ClpP-abhängigen Änderungen des zytoplasmatischen Proteoms von *E. coli* Stamm 536 aus präparativen 2-D Gelen

2.1.1. Analyse von Gesamtzellextrakten aus der logarithmischen und stationären Wachstumsphase

Um Überblick über einen Großteil der exprimierten Proteine zu erlangen, wurden die Gesamtzellextrakte in einem breiten pH-Bereich aufgetrennt, um möglichst viele Proteine auf den 2-D Gelen darzustellen.

Abbildung 12A zeigt ein repräsentatives 2-D Gel, welches vom zytoplasmatischen Gesamtzellextrakt des Wildtyps 536 erstellt und im pH-Bereich 4 - 7 aufgetrennt wurde. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Proteine mit den gewählten Bedingungen in der zweiten Dimension relativ gut aufgetrennt wurden. Die Proteinspots sind als runde Punkte ohne vertikale Streifen zu erkennen. Allerdings wurden die eher neutralen Proteine in dem pH-Bereich 5,5 – 7 in der ersten Dimension nicht richtig aufgetrennt, was zu horizontalen Streifen führte. Dadurch wurde die Auswertung dieser Gele mit Delta-2D[®] deutlich erschwert. Aus diesem Grund wurden zusätzliche Gele angefertigt, die den schmalen pH-Bereich von 5,5 – 6,7 auf der gleichen Gelbreite auftrennen wie die Übersichtsgele (Abb. 12B).

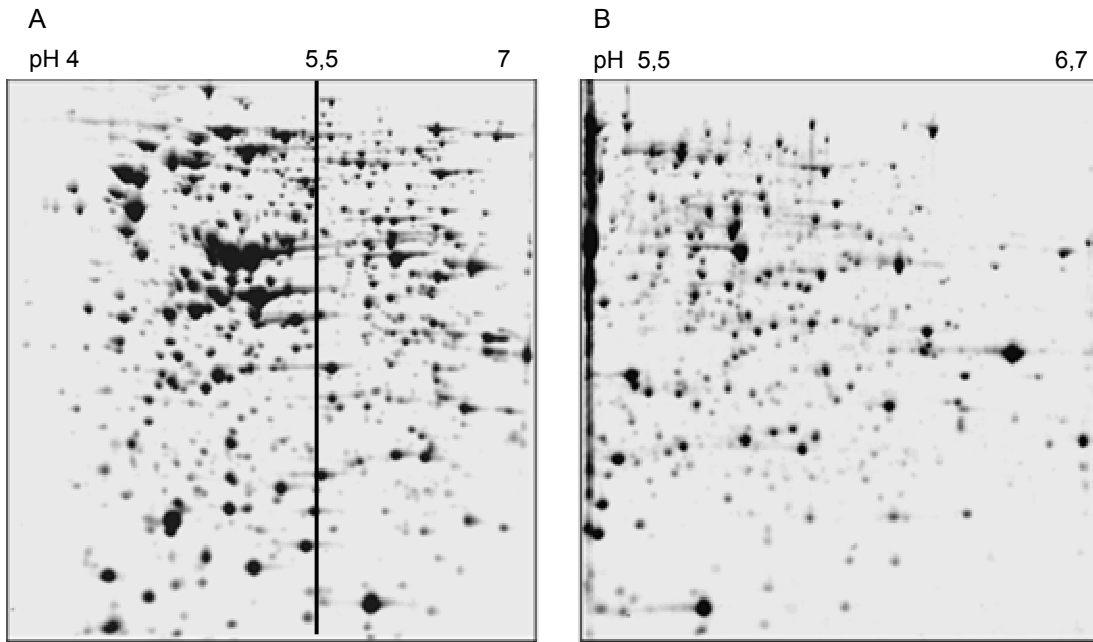


Abb. 12: Zytoplasmatisches Proteom aus der stationären Wachstumsphase von *E. coli* 536, pH 4 – 7 (A) und pH 5,5 – 6,7 (B). 350 µg Protein wurden jeweils in dem entsprechenden pH-Bereich und 12,5 % SDS-PAGE aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie gefärbt.

Wie in Abbildung 12B deutlich zu erkennen, wurden nun auch die Proteine aus dem neutralen Bereich ausreichend aufgetrennt um die Gele mit Delta-2D[®] auswerten zu können. Da bei gleicher Proteinmenge nur Proteine mit einem pI von 5,5 – 6,7 aufgetrennt wurden, sind nur relativ wenig Proteinspots auf dem Gel dargestellt, der Großteil des Proteinextrakts befindet sich am linken, sauren Bereich und wurde nicht weiter aufgetrennt.

2.1.2. Einfluss der *clpX*- und *clpP*-Deletion auf das Expressionsmuster zytoplasmatischer Proteine aus der logarithmischen Wachstumsphase

Die ATP-abhängige Protease ClpXP ist für den Abbau von nicht mehr benötigten oder falsch gefalteten Proteinen verantwortlich. Durch den gezielten Abbau von nur kurzzeitig benötigten Proteinen kommt ihre regulatorische Funktion zum Tragen. Die Inaktivierung der beiden Komponenten der Protease sollte den regulatorischen Effekt und die proteolytische Aktivität stören.

Für die logarithmische Phase wurden Übersichtsgel (pH 4 – 7) und Detailgel (pH 5,5 – 6,7) des Wildtypstammes und der *clpX*-negativen Mutante erstellt. Da bei der Analyse zytoplasmatischer Zellextrakte aus der stationären Phase kein großer Unterschied zwischen der

clpX- und *clpP*-Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp feststellbar war, wurde hier auf die detaillierte Analyse der zytoplasmatischen Zellextrakte der *clpP*-Mutante verzichtet (siehe V. 2.1.3.).

Bei der Analyse der 2-D Gele aus der logarithmischen Phase wurden 13 Proteine identifiziert, die auf allen untersuchten Gelen eine veränderte Expression im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen. Neun Proteine wurden stärker und vier Proteine wurden schwächer exprimiert als die entsprechenden Proteine im Wildtyp.

Die Ergebnisse der MALDI-TOF-MS Analyse sind in Tabelle 10 aufgelistet. Proteine sind mit ihren Namen, Funktionen, theoretischen pI, Molekulargewicht (in kDa) und Referenz in der NCBI Datenbank angegeben.

Tab. 10: Zytoplasmatische Proteine der logarithmischen Phase, die eine veränderte Expression in der *clpX*-Deletionsmutante des Stammes 536 aufwiesen.

Protein	Funktion	NCBI	Mw/pI	Expression
RpoS	RNA-Polymerase Sigmafaktor S (38)	16130648	37,97 / 4,72	↑
YcaC	putatives Enzym mit Cystein-Hydrolase-Domäne	16128864	23,10 / 5,08	↑
PoxB	Pyruvatoxidase	16128839	62,00 / 5,84	↑
Dps	globaler Regulator unter Mangelbedingungen	16128780	18,70 / 5,67	↑
TalA	Transaldolase	16130389	35,65 / 5,86	↑
WrbA	Trp-Repressor-bindendes Protein	16128970	20,85 / 5,53	↑
YahK	putative Oxidoreduktase	16128310	37,97 / 5,78	↑
51	nicht identifiziert	n. b.	n. b.	↑
53	nicht identifiziert	n. b.	n. b.	↑
OppA	Oligopeptid-Transportprotein	16129204	60,90 / 6,04	↓
TnaA	Tryptophanase	33347785	52,77 / 5,83	↓
YhaP	putative L-Serin-Dehydratase	16131004	29,30 / 6,33	↓
Ag43 ^{III}	äußeres Membranprotein, Adhäsion-ähnlich, PAI III ₅₃₆	28316255	107,21 / 5,69	↓

↑ stärkere Expression, ↓ schwächere Expression im Vergleich zum Wildtyp 536, n. b.: nicht bestimmt.

Es wurden Proteine mit bekannter Funktion wie der Sigmafaktor RpoS, die Transaldolase TalA oder die Pyruvatoxidase PoxB identifiziert, welche auf den 2-D Gelen der *clpX*-Mutante verstärkt auftraten, verglichen mit dem Wildtypstamm *E. coli* 536. Daneben wurden die zwei Proteinspots Nr. 51 und Nr. 53 als von ClpX beeinflusst identifiziert, deren Analyse

keine eindeutige Zuordnung ergab. Die vier Proteine, welche in verminderter Menge auf den 2-D Gelen der *clpX*-Mutante auftraten, konnten als das Oligopeptid-Transportprotein OppA, die Tryptophanase TnaA, eine putative L-Serin-Dehydratase YhaP sowie das *E. coli* 536-spezifische Antigen 43 identifiziert werden. Dies ist ein Autotransporterprotein, das in die Biofilmbildung und Fähigkeit zur Autoaggregation involviert ist. Es existieren zwei Orthologe auf den Pathogenitätsinseln PAI III₅₃₆ und PAI V₅₃₆, wobei anhand der MALDI-TOF-MS Daten nur das Ortholog von PAI III₅₃₆ identifiziert werden konnte (siehe auch V. 2.2., 4. und 5.).

Die Positionen und Beschriftungen der einzelnen Proteine, welche einen Unterschied in der Expression gegenüber dem Wildtyp 536 aufwiesen, sind in Abbildung 13 dargestellt.

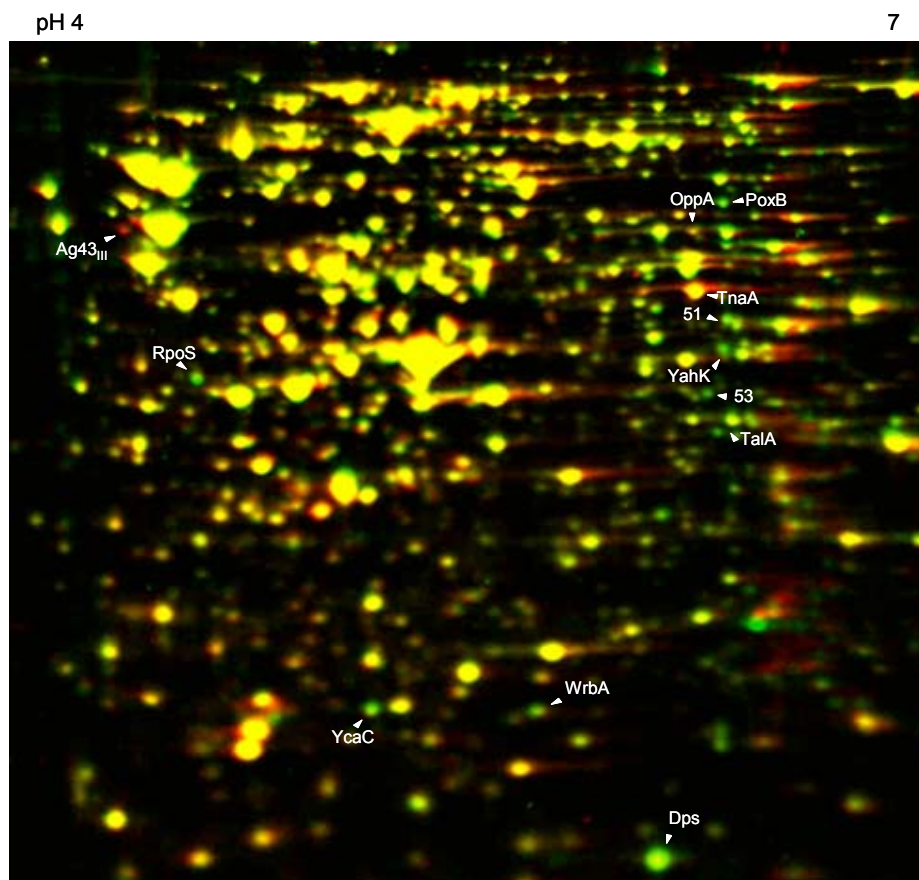


Abb. 13: Zweikanalbild zweier zytoplasmatischer 2-D Gele aus der logarithmischen Wachstumsphase. Wildtypstamm *E. coli* 536 (roter Kanal) und seine isogene *clpX*-Mutante (grüner Kanal). Jeweils 500 µg Protein wurden mit der 2-D PAGE aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Proteine, die in beiden Stämmen in vergleichbaren Mengen produziert werden, sind in gelb dargestellt.

2.1.3. Einfluss der *clpX*- und *clpP*-Deletion auf das Expressionsmuster zytoplasmatischer Proteine aus der stationären Wachstumsphase des Stammes *E. coli* 536

Die Analyse der 2-D Gele aus der stationären Wachstumsphase ergab, dass hier mehr Proteine durch ClpXP beeinflusst waren, verglichen mit der logarithmischen Wachstumsphase. Viele Effekte, die in der stationären Phase zu beobachten waren, traten in der logarithmischen Phase noch nicht auf, da die Expression der entsprechenden Proteine noch zu schwach war.

Bei der Analyse der Gele aus der stationären Phase mit Delta-2D[®] wurden 25 Proteine gefunden, die Unterschiede in der Expression der *clpX*- und *clpP*-negativen Stämme im Vergleich zu ihrem Wildtyp aufwiesen. 19 Proteine wurden in den *clpX*- und *clpP*-negativen Stämmen stärker und sechs Proteine wurden schwächer exprimiert. Die Ergebnisse der anschließenden MALDI-TOF-MS Analyse sind in Tabelle 11 aufgelistet. Die Proteine sind mit ihren Namen, Funktionen, theoretischen pI, Molekulargewicht (in kDa) und Referenz in der NCBI Datenbank angegeben.

Tab. 11: Zytoplasmatische Proteine der stationären Phase, deren Expression durch die *clpX*- oder *clpP*-Deletion bei *E. coli* 536 beeinflusst wurden.

Protein	Funktion	NCBI	Mw/pI	Expression
KatE	Hydroperoxidase HPII	16129686	84,16 / 5,48	↑
AdhP	Alkohol-Dehydrogenase	33347557	35,37 / 5,94	↑
CsiD	konserviertes Protein mit Clavaminat-Synthase-ähnlicher Domäne	33347689	37,36 / 5,74	↑
RpoS	RNA-Polymerase Sigmafaktor S (38)	16130648	37,97 / 4,72	↑
YciF	unbekannte Funktion	16129219	18,60 / 5,38	↑
YhbO	putative intrazelluläre Proteinase	16131045	20,32 / 5,54	↑
DksA	DnaK Suppressor-Protein	16128138	17,52 / 4,92	↑
YciE	konserviertes Protein mit Ferritin-ähnlicher Domäne	16129218	18,96 / 4,80	↑
Orf22 ₁	hypothetisches Protein, PAI I ₅₃₆	24528005	20,38 / 5,77	↑
OmpA	äußeres Membranprotein 3a	16128924	37,20 / 5,98	↑
RibB	Riboflavin-Biosynthese	16130937	23,34 / 4,90	↑
SufC	putative ATP-bindende Komponente eines Transportsystems	16129638	27,57 / 4,84	↑

Protein	Funktion	NCBI	Mw/pI	Expression
OtsA	Trehalose-6-phosphat-Synthetase	16129848	53,61 / 6,4	↑
TrmE	GTP-bindendes Protein der Thiophen- und Furanoxidation	16131574	49,20 / 4,89	↑
TalA	Transaldolase	16130389	35,65 / 5,86	↑
AdhE	CoA-gebundene Acetaldehyd-Dehydrogenase	16129202	96,12 / 6,33	↑
51	nicht identifiziert	n. b.	n. b.	↑
53	nicht identifiziert	n. b.	n. b.	↑
55	nicht identifiziert	n. b.	n. b.	↑
TnaA	Tryptophanase	33347785	52,77 / 5,83	↓
OppA	Oligopeptid-Transportprotein	16129204	60,90 / 6,04	↓
Mdh	Malat-Dehydrogenase	16131126	32,32 / 5,61	↓
HisD	Histidinal-Dehydrogenase/Histidinol-Dehydrogenase	16129961	46,08 / 5,06	↓
HisC	Histidin-phosphat-Aminotransferase	16129962	39,34 / 5,01	↓
Ag43 ^{III}	äußeres Membranprotein, Adhäsion-ähnlich, PAI III ₅₃₆	28316255	107,21 / 5,69	↓

↑ stärkere Expression, ↓ schwächere Expression im Vergleich zum Wildtypstamm *E. coli* 536, n. b.: nicht bestimmt.

Für 22 der analysierten Spots konnte ein Protein zugeordnet werden. Die Analyse der Spots 51, 53 und 55 ergab kein zuverlässiges Ergebnis, da die MALDI-TOF-MS Analysen keine eindeutigen Ergebnisse ergaben.

Es wurden Proteine identifiziert, die schon in der logarithmischen Phase als von ClpXP beeinflusst identifiziert werden konnten. Hierzu zählten der alternative Sigmafaktor RpoS, die Transaldolase TalA, sowie die Proteinspots 51 und 53, welche in den *clpX*-negativen Stämmen stärker vorhanden waren. Auch das Oligopeptid-Transportprotein OppA, die Tryptophanase TnaA sowie Antigen 43 wurden schon in der logarithmischen Phase als verstärkt im Wildtyp exprimiert gefunden. Zusätzlich wurden Proteine als reguliert entdeckt, die in der logarithmischen Phase keinerlei Regulation durch ClpXP aufwiesen. Dazu zählen das äußere Membranprotein OmpA, die Alkoholdehydrogenase AdhP, die Malat-Dehydrogenase Mdh, zwei Proteine der Histidin-Biosynthese, HisC und HisD, sowie die Acetaldehyd-Dehydrogenase AdhE.

Daneben wurden aber auch einige Proteine identifiziert, deren Funktion nicht bekannt ist, wie z.B. YciF, oder aber nur Strukturvorhersagen und mögliche Funktionen bekannt sind, z.B. YhbO, YciE und SufC. Die meisten Proteine konnten durch Sequenzvergleich mit dem apathogenen *E. coli* K-12 Stamm MG1655 identifiziert werden. Zwei Proteine konnten nur

durch *E. coli* 536-spezifische Sequenzen identifiziert werden. Es handelt sich hierbei um Proteine, welche von auf Pathogenitätsinseln lokalisierten Genen kodiert werden. ORF22_I der PAI I₅₃₆ kodiert für ein hypothetisches Protein und ist nicht näher charakterisiert, das zweite *E. coli* 536-spezifische Protein wurde als Antigen 43 identifiziert.

Die Positionen und Beschriftung der einzelnen Proteine, welche einen Unterschied in der Expression gegenüber dem Wildtypstamm *E. coli* 536 aufwiesen, sind in Abb. 14 dargestellt.

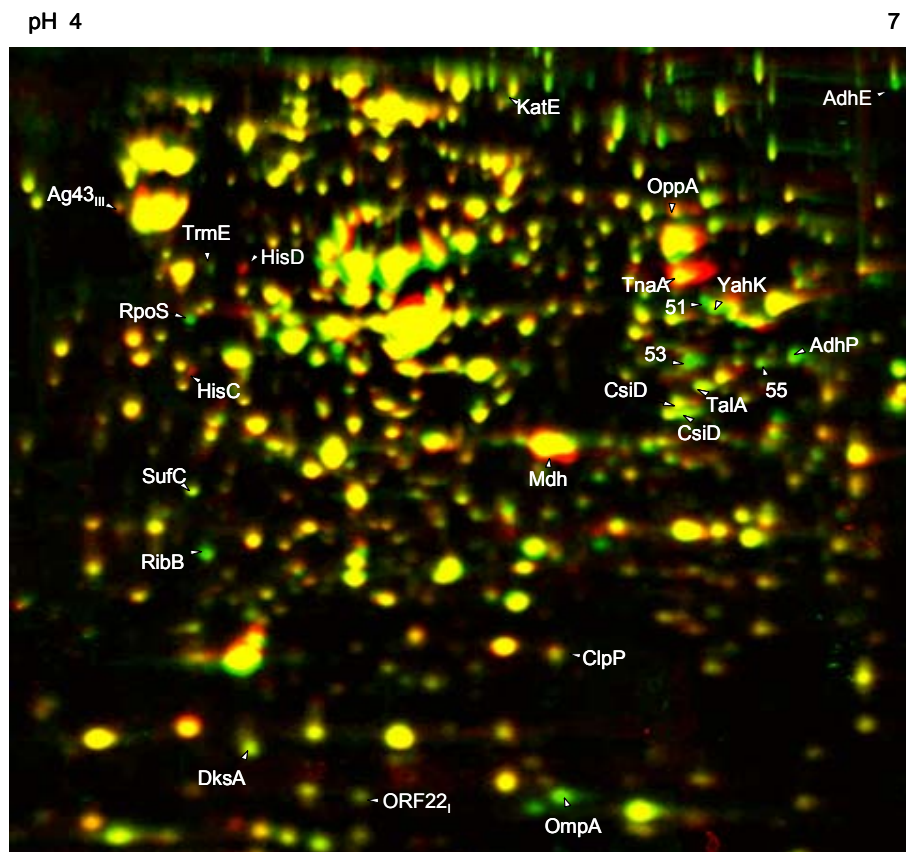


Abb. 14: Zweikanalbild zweier zytoplasmatischer 2-D Gele aus der stationären Wachstumsphase. Wildtypstamm *E. coli* 536 (roter Kanal) und die isogene *clpX*-Mutante (grüner Kanal). Jeweils 350 µg Protein wurden mit der 2-D PAGE aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Proteine, die in beiden Stämmen in vergleichbaren Mengen produziert werden, sind in gelb dargestellt.

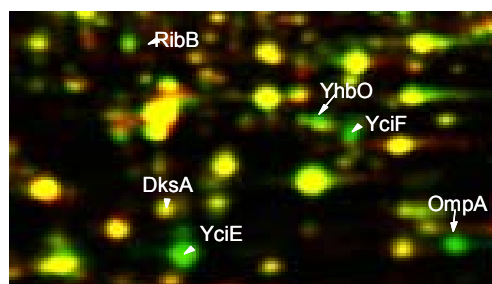


Abb. 14a: Teilausschnitt aus dem Zweikanalbild zweier zytoplasmatischer 2-D Gele aus der stationären Wachstumsphase. Wildtypstamm *E. coli* 536 (roter Kanal) und die isogene *clpX*-Mutante (grüner Kanal). Jeweils 350 µg Protein wurden mit der 2-D PAGE aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie gefärbt.

Bei der Analyse der 2-D Gele *clpX*- und *clpP*-negativer Stämme untereinander wurde nur ein Proteinspot gefunden, der bei der *clpP*-Mutante nicht exprimiert wurde. Die Identifikation dieses Proteins ergab, dass es sich hierbei um ClpP selbst handelte. Umgekehrt konnte allerdings kein ClpX Protein auf den Gelen identifiziert werden. Gleichzeitig traten drei Spots nur auf Gelen der *clpX*-negativen Mutante auf. Ein Proteinspot wurde als Dps identifiziert, ein DNA-bindendes Protein, welches regulatorische Funktionen unter Stress und Nährstoffmangel aufweist. Die beiden anderen Proteine konnten nicht identifiziert werden.

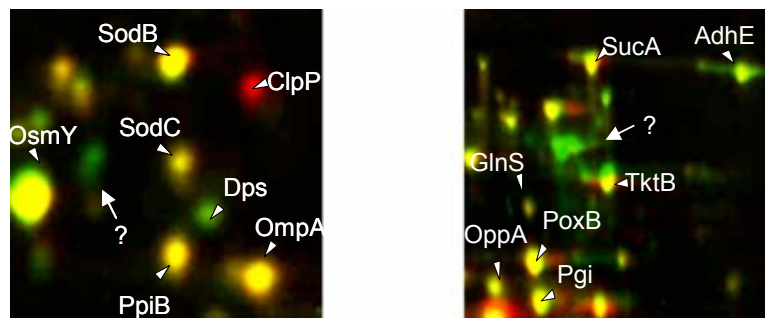


Abb. 15: Zweikanalbild zweier zytoplasmatischer 2-D Gele aus der stationären Wachstumsphase. *E. coli* 536 $\Delta clpX$ (roter Kanal) und *E. coli* 536 $\Delta clpP$ (grüner Kanal). Jeweils 350 μ g Protein wurden mit der 2-D PAGE aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Proteine, die in beiden Stämmen in vergleichbaren Mengen produziert werden, sind in gelb dargestellt.

2.1.4. Erstellung eines Mastergels und Klassifizierung aller analysierten Proteine des Stammes 536 aus dem Zytoplasma

In der vorangegangenen zytoplasmatischen Proteomanalyse der logarithmischen und stationären Wachstumsphase des *E. coli* Stammes 536 und seiner *clpX*- und *clpP*-Mutanten konnte eine große Anzahl an Proteinen mittels MALDI-TOF-MS identifiziert werden. Da neben den Proteinen, welche eine unterschiedliche Expression in Mutanten und Wildtyp aufwiesen, auch eine Anzahl stark exprimierter Proteine identifiziert wurde, die sowohl der Orientierung auf den Gelen als auch der Kontrolle dienen, sollte nun ein internes Mastergel erstellt werden, welches die höchstmögliche Anzahl identifizierter Spots aufweist und als Orientierungshilfe für zukünftige Experimente mit dem Stamm *E. coli* 536 dienen kann.

Es wurden sämtliche analysierten und identifizierten Proteinspots der zytoplasmatischen Fraktion auf ein Mastergel übertragen und die Proteine nach ihren Funktionen in COGs (Clusters of Orthologous Groups of proteins) zusammengefasst. In der nachfolgenden

Tabelle sind alle analysierten Proteine mit ihren kodierenden Genen nach funktionellen Gruppen aufgelistet.

Tab. 12: Einteilung aller analysierten Proteine des zytoplasmatischen Proteoms von *E. coli* 536 nach COGs.

Informationsspeicherung und Prozessierung	
Translation, ribosomale Struktur und Biogenese	EF-P, EF-Tu (<i>tufA</i>), EF-Tu (<i>tufB</i>), GlnS, LysU, RpsA, SerS, Tpx
Transkription	RpoA, RpoS
DNA Replikation, Rekombination and Reparatur	Dps
Zellprozesse	
Posttranslationale Modifikation, “protein turnover”, Chaperone	AhpC, ClpP, DnaK, GroEL, GroES, HslU, PpiB, SspA
Biogenese der Zellhülle, äußere Membran	Ag43 _{III} , OmpA
Transport und Metabolismus von anorganischen Ionen	Bfr, Gpm, KatE, SodA, SodB, SodC
Signaltransduktion	ArcA, DksA
Metabolismus	
Energiegewinnung und -umwandlung	AcnA, AdhE, AtpA, GlpK, LpdA, Mdh, NfnB, PflB, Ppa, SucA, SucD, TdcE, YbdK
Transport und Metabolismus von Kohlenhydraten	Crr, FbaA, FbaB, GapA, GpmA, MglB, OtsA, Pgi, Pgi, PgsI, PykA, TalA, TktB, TpiA
Transport und Metabolismus von Aminosäuren	GadA, GadB, GlyA, HisC, HisD, OppA, PoxB, TnaA, YhaP
Transport und Metabolismus von Nukleotiden	DeoD, GuaB, Hpt, PurA, Udp, Upp
Metabolismus von Coenzymen	RibB
Biosynthese, Transport und Katabolismus von sekundären Metaboliten	YcaC
Schlecht charakterisiert	
nur Funktionsvorhersage möglich	AdhP, H-NS, OsmY, WrbA, YhbO, YahK
Funktion unbekannt	YciE, YciF
Funktion nicht verfügbar	CsiD, DkgA, ORF22 _i , SufC, TrmE, YbeL, YghA
nicht identifiziert	Spot Nr. 8, 13, 51, 53, 55, 56

In der nachfolgenden Abbildung ist das Mastergel mit allen Proteinen, die mit einem pI von 4 – 7 aufzutrennen waren, dargestellt. Die Funktion, pI und das Molekulargewicht der einzelnen Proteine sowie die Referenz in der NCBI Datenbank sind der Tabelle 19 im Anhang zu entnehmen.

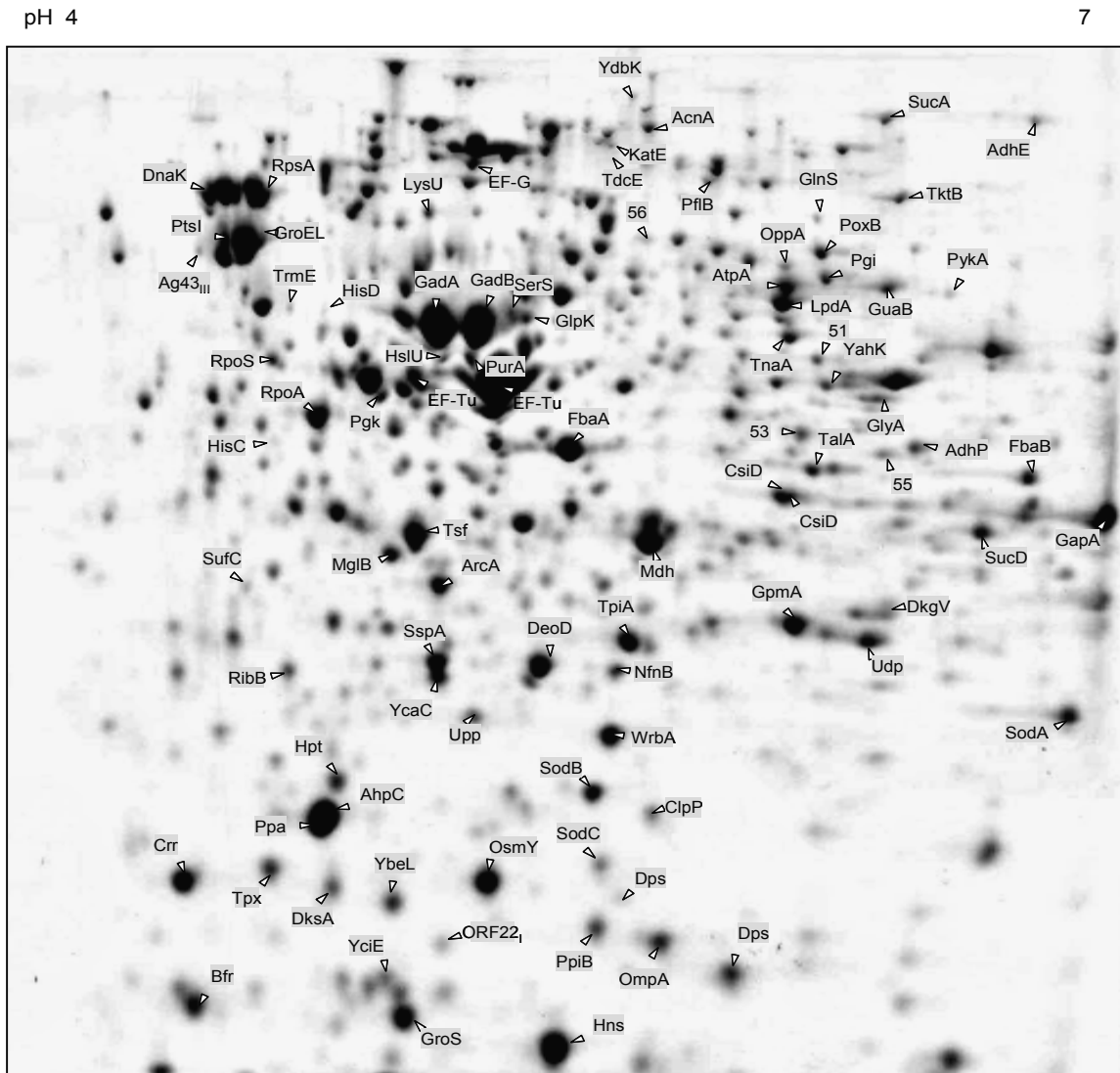


Abb. 16: Mastergel des zytoplasmatischen Proteoms aus der stationären Wachstumsphase des *E. coli* Stammes 536. 350 µg Protein wurden mit der 2-D PAGE aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie gefärbt.

2.2. Analyse der ClpX- und ClpP-abhängigen Änderungen des extrazellulären Proteoms von *E. coli* Stamm 536 aus präparativen 2-D Gelen

Um die Einflüsse der *clpX*- und *clpP*-Deletion auf das Proteinmuster des uropathogenen *E. coli* Stammes 536 näher charakterisieren zu können, wurden zusätzlich zu den zytoplas-

matischen Proteomstudien auch das Sekretom, d. h. die Proteine des Kulturüberstandes, näher untersucht.

Nach den ersten Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass sowohl die Kulturüberstände der *clpX*- als auch die der *clpP*-Mutante eine erheblich höhere Proteinkonzentration aufwies. Um dieser Beobachtung bei der Anfertigung der 2-D Gele gerecht zu werden, wurde die Proteinmenge, welche sich im gleichen Volumen des Kulturüberstandes befunden hat, unabhängig von ihrer Konzentration auf die Gele aufgetragen. Auf diese Weise konnten die quantitativen Unterschiede im Sekretom von Wildtyp und Mutanten besser dargestellt werden.

2.2.1. Einfluss der *clpX*- und *clpP*-Deletion auf das Expressionsmuster der Überstandsproteine des Stammes 536 aus der logarithmischen Wachstumsphase

Bei der Analyse der Überstandsproteine aus der logarithmischen Wachstumsphase zeigte sich, dass nur relativ wenige Proteine in den Überstand sezerniert wurden. Zwei Proteine, die in hohen Konzentrationen auftraten, konnten als Flagellin (FliC) und als α -Hämolysin (HlyA) identifiziert werden. Viele der weiteren identifizierten Proteine, z.B. GadB, RbsB, OsmY, Crr, UgpB, WrbA und YdcS wurden in größeren Mengen von den Mutantenstämmen sezerniert. Es wurden aber auch Proteine identifiziert, die in gleichen Mengen im Überstand von Wildtyp und Mutanten zu finden waren, wie z.B. die Elongationsfaktoren EF-Tu (*tufA*) und EF-G (*fusA*), das Hitzeschockprotein Hsp70 (*dnaK*) und OmpC. Neben den Proteinen, die ihrer Funktion nach im Überstand (HlyA) oder auf der Zelloberfläche (FliC) zu finden sind, wurden auch Proteine identifiziert, die ihrer Funktion nach normalerweise im Zytoplasma zu finden sein sollten (EF-Tu, GadB, Hsp70). Zusätzlich konnte ein Protein identifiziert werden, welches nur im Überstand des *E. coli* 536 Wildtyps zu finden war. Es handelte sich hierbei um das schon im Zytoplasma identifizierte Autotransporterprotein Antigen 43, welches von *E. coli* 536-spezifischen Genen der PAI III₅₃₆ und PAI V₅₃₆ kodiert wird. Abbildung 17 zeigt ein Zweikanalbild des Wildtyps und der *clpX*-Mutante.

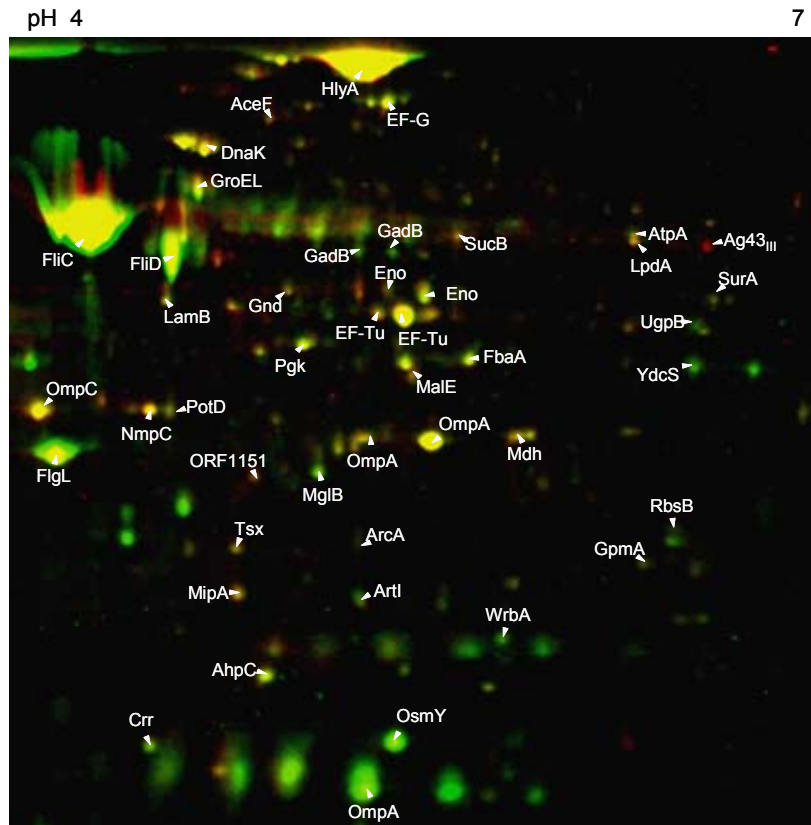


Abb. 17: Zweikanalbild zweier 2-D Gele aus dem extrazellulären Proteom der logarithmischen Wachstumsphase. Wildtypstamm *E. coli* 536 (roter Kanal) und seine isogene *clpX*-Mutante (grüner Kanal). 300 µg Protein des Wildtypstammes und das entsprechende Volumen des Mutantenstammes wurden mit der 2-D PAGE aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Proteine, die in beiden Stämmen in vergleichbaren Mengen produziert werden, sind in gelb dargestellt.

2.2.2. Einfluss der *clpX*- und *clpP*-Deletion auf das Expressionsmuster der Überstandproteine des Stammes 536 aus der stationären Wachstumsphase

Analog zu der Proteomanalyse des Zytoplasmas sollte nun auch der Überstand aus der stationären Wachstumsphase untersucht werden. Verglichen mit 2-D Gelen des Sekretoms aus der logarithmischen Wachstumsphase, konnten im Sekretom aus der stationären Wachstumsphase deutlich mehr Proteine nachgewiesen werden. Dieses lag zum einen an der zunehmenden Lyse der Bakterien, wodurch vermehrt zytoplasmatische Proteine in den Überstand gelangen konnten. Zum anderen konnten in der längeren Wachstumsperiode mehr Proteine in den Überstand sezerniert werden. Bei der digitalen Auswertung der Gele konnten einige dominante Unterschiede zwischen dem Sekretom der *clpX*- und *clpP*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden.

Der größte Unterschied war schon bei der visuellen Auswertung der Gele deutlich zu erkennen: So sezernierten die *clpX*- und *clpP*-negativen Stämme deutlich mehr Proteine in den Überstand als der Wildtyp. Dementsprechend waren bei der digitalen Auswertung mit Delta-2D[®] die meisten Proteinspots in der Farbe der Mutanten (grün) dargestellt, da die entsprechenden Proteine des Wildtyps (rot) fehlten. Eine repräsentative Darstellung des Vergleichs der beiden Mutanten zum Wildtyp ist in Abbildung 18 gezeigt.

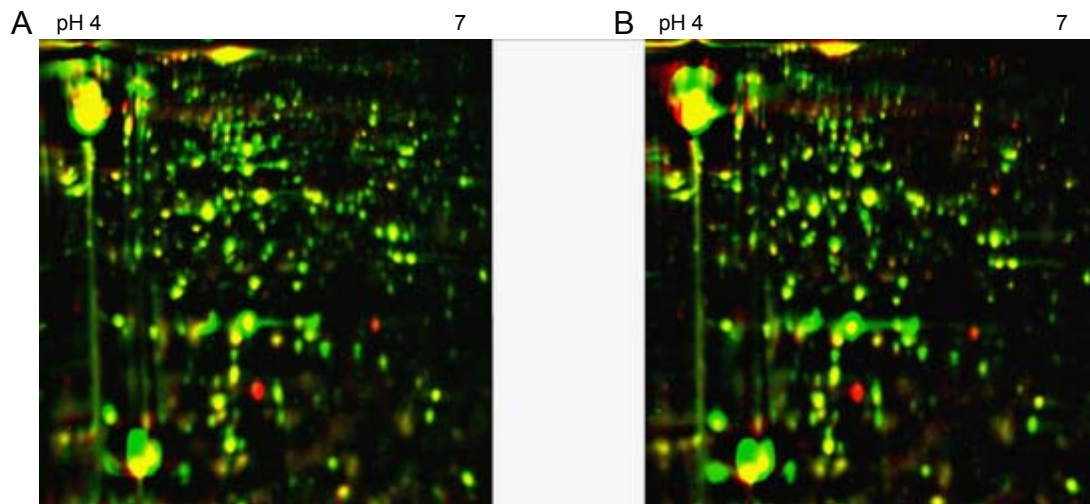


Abb. 18: Zweikanalbild von je zwei 2-D Gele aus dem extrazellulärem Proteom der stationären Wachstumsphase. A) *E. coli* 536 (roter Kanal) und *clpX*-Mutante (grüner Kanal), B) *E. coli* 536 (roter Kanal) und *clpP*-Mutante (grüner Kanal). 300 µg Protein des Wildtypstammes und das entsprechende Volumen des Mutantenstammes wurden mit der 2-D-PAGE aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Proteine, die in beiden Stämmen in vergleichbaren Mengen vorlagen, sind in gelb dargestellt.

Obwohl die Mutantenstämme eine stärkere Sekretion aufwiesen, konnten fünf Proteine gefunden werden, die schwächer oder gar nicht in den Mutanten vorhanden waren. Die Analyse der Proteinspots mit MALDI-TOF-MS und anschließendem Vergleich mit *E. coli* K-12 und 536-spezifischen Sequenzen ergab, dass es sich hierbei um Fimbrienadhäsine handelte. Es konnte FimA identifiziert werden, die Hauptstrukturuntereinheit der Typ 1-Fimbrien. Das kodierende Gen *fimA* ist auf dem Kernchromosom lokalisiert. Die Analyse der anderen vier Proteine ergab, dass es sich hierbei um *E. coli* 536-spezifische Proteine handelte, die von PAI-lokalisierten Genen kodiert werden. So konnten PrfA und SfaA, die Hauptstrukturuntereinheiten der Prf-, und S-Fimbrien, identifiziert werden, welche von Genen kodiert werden, die auf PAI II₅₃₆ und PAI III₅₃₆ lokalisiert sind. Weiterhin wurde Antigen 43 identifiziert, das schon im Sekretom der logarithmischen Wachstumsphase und im Zytoplasma eine verminderte Expression in den Mutanten aufwies. *E. coli* 536 besitzt zwei verschiedene Orthologe des Antigen 43, welche auf PAI III₅₃₆ und PAI V₅₃₆ lokalisiert

sind. Die zwei Orthologe weisen Homologie auf Proteinebene auf. Die Unterscheidung war anhand der Peptidmassen aber trotzdem möglich. Es handelte sich auch hier um das PAI III₅₃₆-kodierte Protein. Des Weiteren konnte die Hauptstrukturuntereinheit von putativen CS12-ähnlichen Fimbrien identifiziert werden, welche von ORF36_I auf PAI I₅₃₆ kodiert wird. Die entsprechenden Ausschnitte aus den 2-D Gelen sind in Abbildung 19 dargestellt.

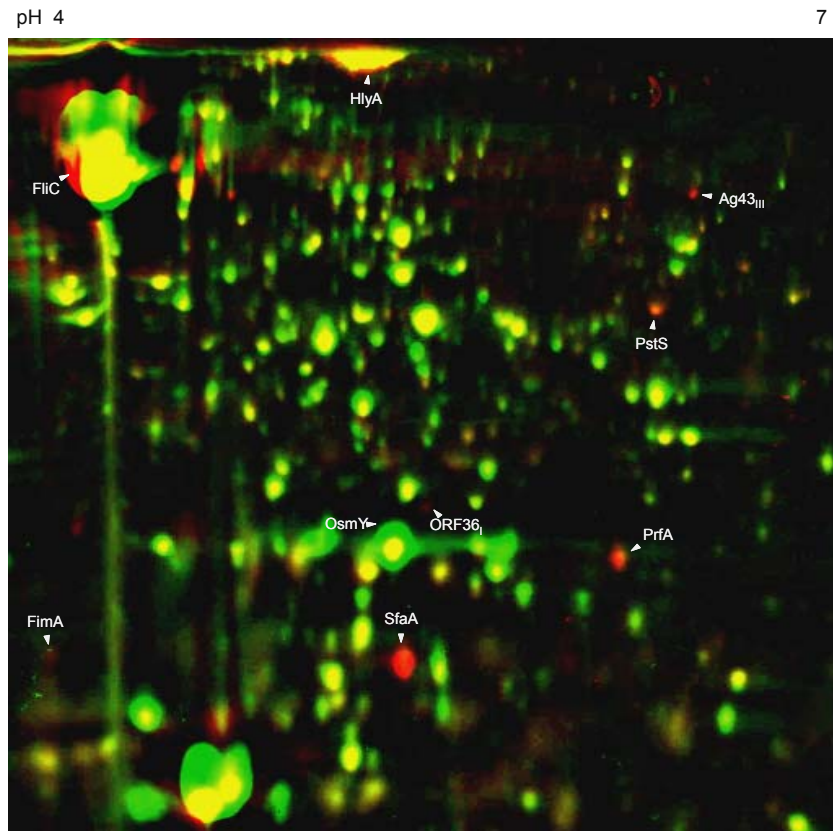


Abb. 19: Zweikanalbild zweier 2-D Gele aus dem extrazellulären Proteom der stationären Wachstumsphase. Wildtypstamm *E. coli* 536 (roter Kanal) und seine isogene *clpP*-Mutante (grüner Kanal). 300 µg Protein des Wildtypstammes und das entsprechende Volumen des Mutantenstammes wurden mit der 2-D PAGE aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Proteine, die in beiden Stämmen in vergleichbaren Mengen vorlagen, sind in gelb dargestellt.

In nachfolgender Tabelle sind die identifizierten Adhäsine mit Namen, Funktion, pI, molekularer Massen (in kDa) und Referenz in der NCBI Datenbank aufgelistet.

Tab. 13: Liste der identifizierten Adhäsine des *E. coli* Stammes 536, welche in den *clpX*- und *clpP*-Mutanten vermindert exprimiert wurden.

Protein	Funktion	NCBI	Mw	pI
PrfA	PrfA Protein, Hauptstrukturuntereinheit der Prf-Fimbrien, PAI II ₅₃₆	23954219	19,73	6,2
SfaA	SfaA Protein, Hauptstrukturuntereinheit der S-Fimbrien, PAI III ₅₃₆	28316230	18,49	6,0
Ag43 _{III}	Ortholog des Autotransporterproteins, PAI III ₅₃₆	28316255	100,34	5,5
ORF36 _I	Hauptstrukturuntereinheit des putativen CS12-ähnlichen Fimbriengenclusters, PAI I ₅₃₆	24528018	20,38	4,9
FimA	FimA Protein, Hauptstrukturuntereinheit der Typ 1-Fimbrien	1790769	18,26	4,8

Die vergleichende Proteomanalyse der *clpX*- und *clpP*-Mutanten untereinander ergab, dass sich die beiden Stämme nur hinsichtlich eines Proteinspots deutlich unterschieden. Dieses Protein wurde von der *clpP*-Mutante schwächer oder gar nicht in den Überstand sezerniert. Es konnte als periplasmatisches Phosphat-bindendes Protein PstS identifiziert werden, das an der Aufnahme von anorganischem Phosphat vom Periplasma in das Zytoplasma beteiligt ist (siehe Abb. 19).

Bei dem Vergleich der FliC-Expression in Wildtyp und Mutanten konnte eine Zunahme an FliC im Verlauf der Wachstumskurve festgestellt werden, wobei die Menge an FliC in den Mutanten jeweils deutlich gegenüber dem Wildtyp *E. coli* 536 erhöht war.

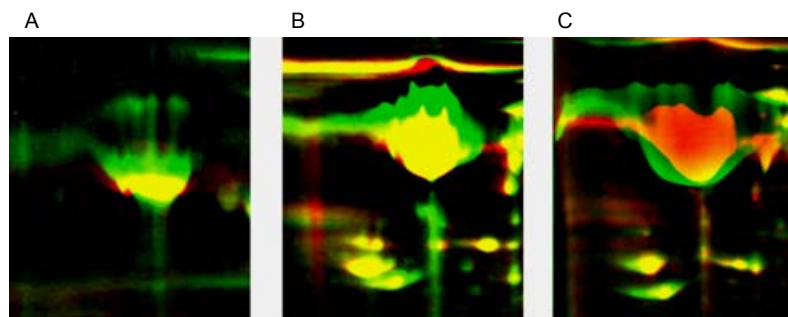


Abb. 20: Ausschnitt aus dem Zweikanalbild zweier 2-D Gele. Zunahme der Menge an FliC im Verlauf der Wachstumskurve von *E. coli* 536 (roter Kanal) und 536 $\Delta clpX$ (grüner Kanal). A: logarithmische Wachstumsphase, B: stationäre Wachstumsphase, nach ca. 4 h Anzucht, C: stationäre Wachstumsphase, nach ca. 7 h Anzucht.

Wie aus Abbildung 20 ersichtlich, war in der logarithmischen Wachstumsphase die Expression von FliC noch relativ gering. Dennoch kann man deutlich die verstärkte Expression zum jeweiligen Zeitpunkt in der *clpX*-Mutante erkennen. Dieser Unterschied in der FliC-Expression verstärkte sich während des weiteren Wachstums. Nach sieben Stunden Wachstum in Schüttelkultur war so viel FliC-Protein in der *clpX*-Mutante vorhanden, dass eine klare Fokussierung in der ersten Dimension nicht mehr möglich war. Das Protein nahm eine relativ große Fläche auf dem 2-D Gel ein und konnte nicht mehr als definierter Spot dargestellt werden.

2.2.3. Erstellung eines Mastergels und Klassifizierung aller analysierten extrazellulären Proteine des Stammes 536 aus der stationären Wachstumsphase

Um einen Einblick in die Gesamtheit aller Proteine zu erhalten, die sich in der stationären Wachstumsphase im Überstand befanden, wurde ein internes Mastergel erstellt. Dieses sollte sowohl alle identifizierten dominanten Spots des Stammes 536 als auch sämtliche Spots, die Unterschiede in der Expression verglichen mit den *clpX*- und *clpP*-Deletionsmutanten aufwiesen, enthalten. Die Proteinspots wurden nach der MALDI-TOF-MS Analyse identifiziert und nach ihren Funktionen in COGs (Clusters of Orthologous Groups of proteins) zusammengefasst.

Es wurden insgesamt 127 Proteinspots der MALDI-TOF-MS Analyse unterzogen. 52 Proteine konnten als Enzyme des Zytoplasmas identifiziert werden, die in den Transport und Metabolismus von Kohlehydraten, Nukleotiden, Aminosäuren und anorganischer Ionen oder in die Umwandlung und Gewinnung von Energie involviert sind. Zusätzlich konnten noch 23 periplasmatische und 10 Membranproteine identifiziert werden. Für 14 Proteine ist nur die generell Funktion vorhersagbar oder noch unbekannt und 13 Proteine konnten nicht zugeordnet werden. Die genaue Auflistung der Funktionen aller identifizierten Proteine ist der Tabelle 14 zu entnehmen.

Tab. 14: Einteilung aller analysierten Proteine des extrazellulären Proteoms von *E. coli* 536 nach COGs.

Informationsspeicherung und Prozessierung	
Translation, ribosomale Struktur und Biogenese	AsnS, EF-G, EF-P, EF-Tu (<i>tufA</i>), RplI, YfiA
Transkription	CspC, RpoA
DNA Replikation, Rekombination and Reparatur	Dps
Zellprozesse	
Posttranslatorische Modifikation, Protein turnover, Chaperone	AhpC, AhpF, DnaK, GroEL, GroES, HtpG, OsmC, Tig, Tpx, SurA
Biogenese der Zellhülle, äußere Membran	Ag43 _{III} , NmpC, OmpA, OmpC, OmpX, Tsx, YehZ
Transport und Metabolismus von anorganischen Ionen	ModA, ORF47 _I , PstS, SodA, SodB, SodC, YcdO
Zellmotilität und Sekretion	FimA, FliC, FlgL, FlgM, ORF36 _I , PrfA, SfaA, TolB
Signaltransduktion	ArcA, DksA
Metabolismus	
Energiegewinnung und -umwandlung	AceF, AtpA, AtpD, IcdA, LpdA, Mdh, PckA, SucB, SucC, SucD
Transport und Metabolismus von Kohlenhydrate	Crr, Eno, FbaA, GapA, Gnd, GpmA, LamB, MalE, MglB, Pkg, PtsH, RbsB, TalB, TpiA, UgpB, YtfQ
Transport und Metabolismus von Aminosäuren	ArtI, ArgT, CysK, GadB, GlyA, HisJ, OppA, PotD, PotF, YdcS
Transport und Metabolismus von Nukleotiden	Apt, CpdB, DeoD, PurA, Udp, UshA,
Metabolismus von Lipiden	FadL
Biosynthese, Transport und Katabolismus von sekundären Metaboliten	HlyA, YcaC
Schlecht charakterisiert	
nur Funktionsvorhersage	Eco, OsmY, WrbA, YhdH, YjjK
Funktion unbekannt	YbiS, YggE, YgiW, YifE
Funktion nicht verfügbar	HdeA, HdeB, MalM, ORF22 _I , ORF1151
nicht identifiziert	Spot Nr. 42, 49, 51, 56, 69, 71, 73, 86, 108, 124 - 127

Der Großteil der Proteine konnte durch den Sequenzvergleich mit dem apathogenen *E. coli* K-12 Stamm MG1655 identifiziert werden. Zusätzlich wurden acht Proteine gefunden, die nicht von dem apathogenen Stamm exprimiert wurden. Es handelte sich hierbei um die oben

beschriebenen Proteine SfaA, PrfA, Orf36_I und Ag43_{III}. Darüber hinaus wurden Proteine identifiziert, die von ORF22_I und ORF47_I der PAI I₅₃₆ kodiert werden. Für Orf22_I war keine Funktion verfügbar und bei dem Produkt von ORF47_I handelt es sich um ein putatives periplasmatisches Bindeprotein. Auch konnte das Zytotoxin α -Hämolyisin (HlyA) durch Vergleich mit *E. coli* 536-spezifischen Sequenzen identifiziert werden. ORF1151 kodiert für ein Protein, welches hohe Ähnlichkeit zu einer strukturellen Komponente eines putativen Prophagen des uropathogenen *E. coli* Stammes CFT073 aufweist.

Ein weiteres auffallendes Merkmal bei der Analyse des Sekretoms war, dass für mehrere Proteine zwei oder auch mehrer Modifikationen nachgewiesen wurden. So konnten für die Glutamat-Decarboxylase GadB, die Enolase Eno, den Elongationsfaktor Tu (*tufA*), das Maltose-bindende periplasmatische Protein MaleE, das Galaktose-bindende Transportprotein MglB und das D-Ribose-bindende periplasmatische Protein RbsB jeweils zwei Proteinspots identifiziert werden, die sich nur durch ihren pI, aber nicht durch ihr Molekulargewicht unterscheiden. Für das „hyperosmotically inducible periplasmic protein“ OsmY konnten sogar drei Modifikationen identifiziert werden. Bis zu sieben Isoformen sind für das äußere Membranprotein OmpA bekannt (Molloy *et al.*, 2000), bei dieser Arbeit konnten allerdings nur fünf unterschiedliche Spots von OmpA identifiziert werden.

Die Lage aller identifizierten Proteine des Sekretoms ist in Abbildung 21 dargestellt. Die Liste aller identifizierten Proteine mit Gennamen, pI, molekularer Masse, Referenz in der NCBI Datenbank und Funktion ist in Tabelle 20 im Anhang angegeben.

pH 4

7

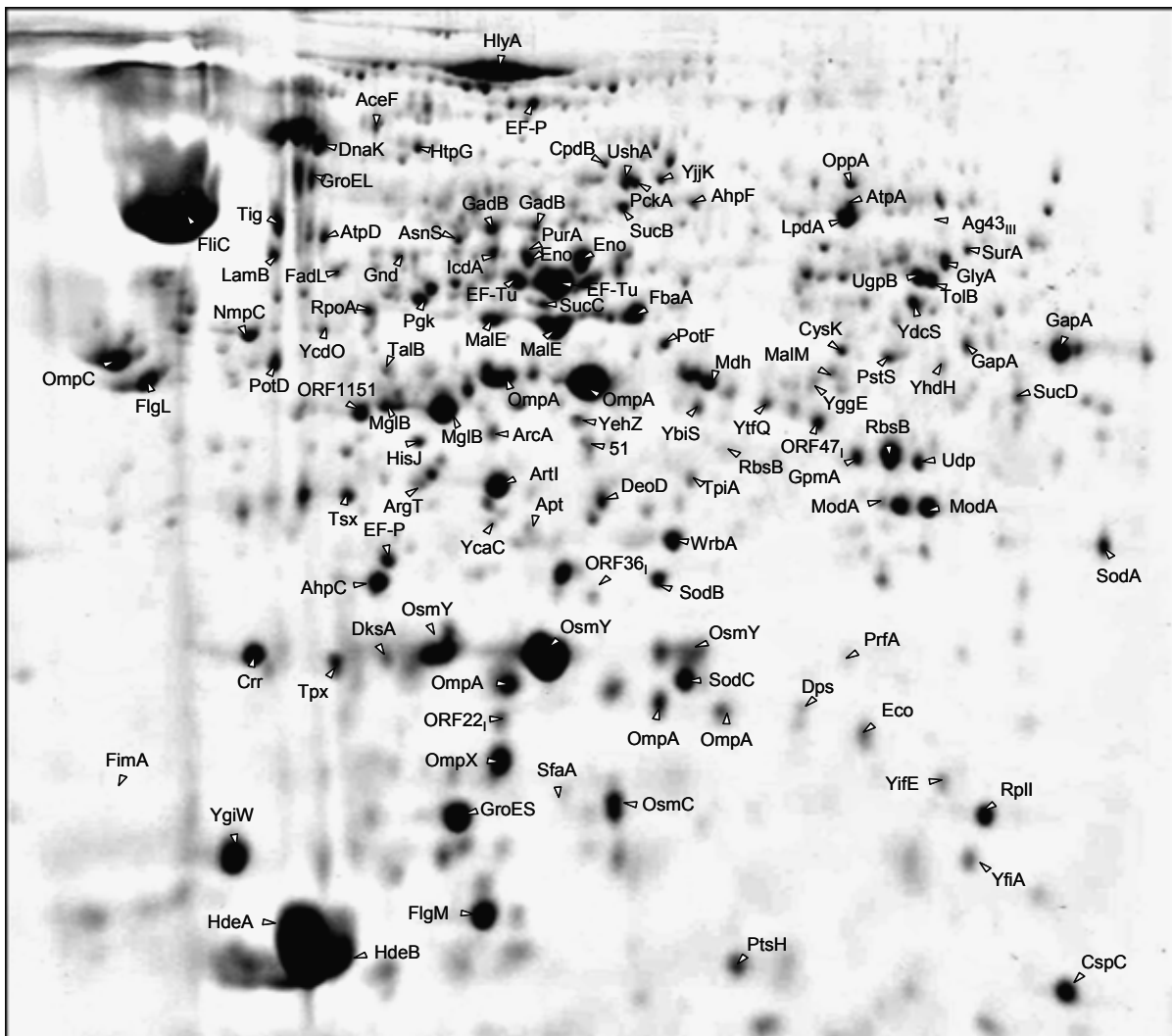


Abb. 21: Mastergel des extrazellulären Proteoms aus der stationären Wachstumsphase des *E. coli* Stammes 536. 350 μ g Protein wurden mit der 2-D PAGE aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie gefärbt.

2.3. Quantitative Analyse der Überstandsproteine des *E. coli* Stammes 536 und seiner *clpX*- und *clpP*-Mutanten

Bei der Analyse extrazellulärer 2-D Gele konnte gezeigt werden, dass *clpX*- und *clpP*-negative Mutanten deutlich mehr Proteine in den Überstand sezernieren als der Wildtypstamm *E. coli* 536. Um diese Beobachtung zu verifizieren, wurde die Proteinkonzentration des Überstandes von Schüttelkulturen, die bei 37 °C inkubiert wurden, entlang der Wachstumskurve bestimmt (siehe IV. 12.3.). Es wurden Kulturen von *E. coli* 536, seinen *clpX*- und *clpP*-Deletionsmutanten sowie der komplementierten Mutanten zum Zeitpunkt 0 h, 2 h, 4 h, 8 h und 24 h nach Inokulation der Kultur untersucht. Diese Experimente waren nur möglich,

da reines LB-Medium eine relativ niedrige Proteinkonzentration im Vergleich zu BHI (brain heart infusion) oder anderen Komplexmedien aufweist, welche die Messung beeinträchtigen würde.

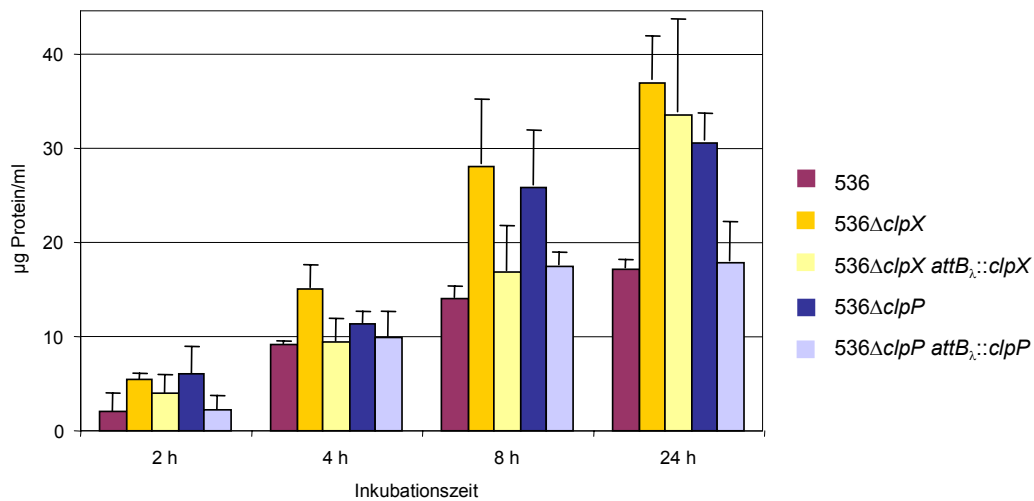


Abb. 22: Einfluss der *clpX*- und *clpP*-Deletion auf die Proteinkonzentration in Überständen von Schüttelkulturen des Stammes 536. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus 5 unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung ist als Abweichung vom Mittelwert dargestellt.

Wie in Abbildung 22 zu erkennen, wiesen die *clpX*- und *clpP*-Deletionsmutanten, verglichen mit dem Wildtyp, eine deutlich höhere Proteinkonzentration im Überstand auf. Dieser Effekt wurde umso auffälliger, je länger die Kulturen inkubiert wurden. Für alle gemessenen Zeitpunkte war ein größerer Effekt bei der *clpX*-Mutante zu beobachten. Die verstärkte Sekretion der *clpX*- und *clpP*-Deletionsmutanten konnte größtenteils durch die Komplementation mit *clpX* oder *clpP* rückgängig gemacht werden.

2.4. Untersuchungen zur reduzierten Expression von Prf- und S-Fimbrien der *clpX*- und *clpP*-negativen Mutanten von *E. coli* 536

Die Proteomanalyse der Überstandsproteine hat gezeigt, dass die Menge an Hauptstrukturuntereinheiten der Prf-, S-, CS12-ähnlichen und Typ 1-Fimbrien, in den *clpX*- und *clpP*-negativen Stämmen, trotz deutlich erhöhter Sekretion in den Mutantenstämmen, im Vergleich zum Wildtyp reduziert war. In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob das verminderte Vorhandensein der oben genannten Fimbrien auf der Zelloberfläche der Mutantenstämmen auf eine Störung im Zusammenbau der Fimbrien zurückzuführen ist. Dieses könnte zum Beispiel auf einer Anhäufung der verschiedenen Fimbrien-

strukturuntereinheiten im Periplasma aufgrund verstärkter SecA-Aktivität infolge der *clpX*- oder *clpP*-Deletion beruhen.

Hierfür wurden Fimbrienextrakt, Peri- und Zytoplasma durch SDS-PAGE aufgetrennt und eine Western Blot-Analyse mit Prf- und SfaI-spezifischen Antikörpern durchgeführt.

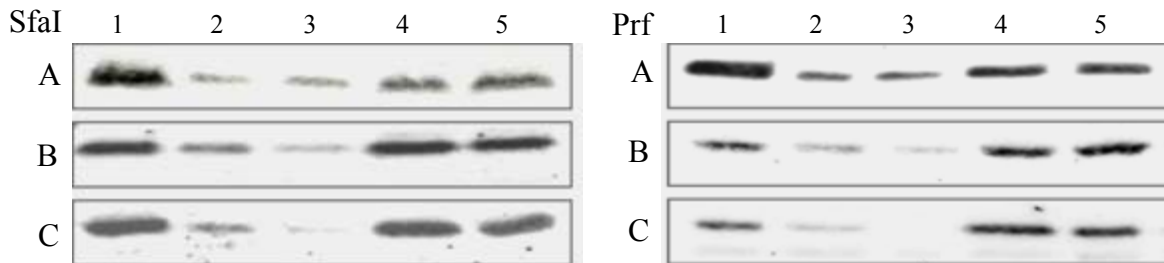


Abb. 23: Einfluss der *clpX*- und *clpP*-Deletion auf die Menge an S- und Prf-Fimbrien in verschiedenen Zellkompartimenten des Stammes 536. Die Western Blot-Analyse verschiedener Zellfraktionen wurde mit Prf- und SfaI-spezifischen Antikörpern durchgeführt. A: hitzeextrahierte Fimbrien, B: Periplasma, C: Zytoplasma. 1: 536, 2: 536 $\Delta clpX$, 3: 536 $\Delta clpP$, 4: 536 $\Delta clpX attB::clpX$, 5: 536 $\Delta clpP attB::clpP$.

Es ist deutlich zu erkennen, dass in allen Zellfraktionen der *clpX*- und *clpP*-negativen Stämme eine reduzierte Menge an S- und Prf-Fimbrien vorhanden war. Die Komplementation der Mutanten resultierte in einer Fimbrienexpression, die wildtypischem Niveau entsprach. Es ist auch eindeutig aus den Western Blots sichtbar, dass keinerlei Anhäufung von SfaA- und PrfA-Strukturuntereinheiten im Periplasma der *clpX*- und *clpP*-negativen Stämme vorhanden war.

Um sicherzustellen, dass durch die Fimbrienextraktion die äußere Membran nicht beschädigt wurde und das Periplasma intakt blieb, wurden zusätzliche Experimente durchgeführt: Zum einen wurden nach der Fimbrienextraktion das zurückbleibende Pellet bestehend aus Zyto- und Periplasma einer Western Blot-Analyse mit Prf- und SfaI-spezifischen Antikörpern unterzogen. Zum anderen wurde nur das Periplasma ohne vorangehende Fimbrienextraktion untersucht. Das Periplasma wurde zudem mit zwei verschiedenen Methoden isoliert. Es wurden Methoden mit Lysozym/Sucrose und mit Polymyxin B getestet, wobei kein Unterschied im Ergebnis feststellbar war. Bei allen Experimenten konnte eine reduzierte S- und Prf-Fimbrienexpression in allen untersuchten Zellkompartimenten der *clpX*- und *clpP*-Mutanten nachgewiesen werden.

Zusammenfassung Abschnitt 2

- Um den Einfluss der *clpX*- und *clpP*-Deletion auf die Proteinexpression des Stammes *E. coli* 536 zu untersuchen, wurde die Methode der zweidimensionalen Gelelektrophorese mit immobilisiertem pH-Gradienten etabliert. Es wurden zytoplasmatische und extrazelluläre Proteine der logarithmischen und stationären Phase untersucht.
- Das zytoplasmatische Proteom der logarithmischen Wachstumsphase wies Unterschiede in der Expression von 13 Proteinen auf. Hier wurden in den *clpX*- und *clpP*-Mutanten neun Proteine stärker und vier Proteine schwächer exprimiert als im Wildtyp.
- Das zytoplasmatische Proteom der stationären Wachstumsphase wies 25 Proteine mit unterschiedlicher Expression auf. Im Vergleich zum Wildtyp *E. coli* 536 wurden 19 Proteine stärker und sechs Proteine schwächer in den *clpX*- und *clpP*-Mutanten exprimiert.
- Es wurde ein internes Mastergel mit 93 identifizierten Proteinen des Zytoplasmas erstellt.
- Die 2-D Analyse des extrazellulären Proteoms ergab ein erhöhtes Sekretionsvermögen der *clpX*- und *clpP*-negativen Stämme sowohl in der logarithmischen als auch in der stationären Wachstumsphase. Bei der Bestimmung der Proteinkonzentration im Überstand konnte eine bis zu zweifach erhöhte Proteinmenge im Überstand der *clpX*- und *clpP*-Mutanten gemessen werden. Durch Komplementation mit *clpX* oder *clpP* konnte das wildtypische Sekretionsvermögen wiederhergestellt werden.
- Im extrazellulären Proteom konnte eine reduzierte Expression von Prf-, S-, CS12-ähnlichen und Typ 1-Fimbrien, sowie des Autotransporters Ag 43 in den *clpX*- und *clpP*-Mutanten nachgewiesen werden. Zusätzlich wiesen diese Stämme eine verstärkte Expression des Flagellins FliC auf.
- Es wurde ein Mastergel aller 127 identifizierten Proteine des Sekretoms erstellt.
- In Western Blot-Analysen konnte nachgewiesen werden, dass die reduzierte Expression von Prf- und S-Fimbrien im Überstand nicht durch gestörten Zusammenbau der Fimbrienuntereinheiten aufgrund einer Akkumulation der Untereinheiten im Periplasma zustande kam, sondern schon im Periplasma und im Zytoplasma der *clpX*- und *clpP*-Mutanten auftrat.

3. Untersuchungen zum Einfluss des ClpXP Proteasekomplexes auf die Virulenzeigenschaften des uropathogenen Stammes *E. coli* 536

Bei den Proteomstudien konnten eine Reihe von Einflüssen der Protease ClpXP auf die Expression von Virulenzdeterminanten beobachtet werden. Um diese Unterschiede näher zu charakterisieren und den Einfluss auf weitere Virulenz-assoziierte Faktoren zu untersuchen wurden zusätzliche Untersuchungen mit den *clpX*- und *clpP*-Deletionsmutanten sowie den komplementierten Stämmen unternommen.

3.1. Einfluss von ClpX und ClpP auf die Expression verschiedener Fimbrienadhäsine

Der uropathogene *E. coli* Stamm 536 exprimiert eine Reihe unterschiedlicher Fimbrienadhäsine. Wie schon bei den Proteomstudien beobachtet, hat die Protease ClpXP Einfluss auf die Expression von Fimbriendeterminanten. Im Folgenden sollen nun die Ergebnisse aus den vorangegangenen Proteomstudien durch weitere Untersuchungen im Hinblick auf die Expression einiger dominanter Fimbrien bestätigt werden.

3.1.1. Qualitative Agglutination

Zum Nachweis der Fimbrienproduktion wurden phänotypische Agglutinationstests für Prf-, S- und Typ 1-Fimbrien durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *clpX* und *clpP* immer zu einer reduzierten oder ausbleibenden Agglutinationsreaktion führte. Dieses weist auf reduzierte Prf-, S- und Typ 1-Fimbrienexpression der *clpX*- und *clpP*-Mutanten hin. Die Agglutinationsfähigkeit dieser Mutanten konnte durch die Komplementation mit *clpX* und *clpP* wiederhergestellt werden.

Tab. 15: Nachweis der Typ 1-, S- und Prf-Fimbrienexpression bei *clpX*- und *clpP*-Mutanten des Stammes 536 durch Agglutination.

<i>E. coli</i> Stamm	Typ 1-Fimbrien	S-Fimbrien	Prf-Fimbrien
536	+++	+++	+++
536 $\Delta clpX$	+	–	–
536 $\Delta clpP$	+	–	–
536 $\Delta clpX attB::clpX$	+++	+++	+++
536 $\Delta clpP attB::clpP$	+++	+++	+++
AAEC189	–	–	–
MG1655	+++	–	–

+ Agglutination, – keine Agglutination. Kontrollen: *E. coli* Stamm AAEC189, *fim*[–], *pap/prf*, *sfa*[–]; *E. coli* Stamm MG1655, *fim*⁺, *pap/prf*, *sfa*[–].

3.1.2. Western Blot-Analyse von Gesamtzellextrakten

Zusätzlich wurde die Produktion der S- und Prf-Fimbrienproteine, vor allem der Hauptstrukturuntereinheiten SfaA und PrfA, mittels Western Blot-Analyse untersucht. Hierfür wurden Gesamtzellextrakte der Übernachtskulturen mit der diskontinuierlichen SDS-PAGE aufgetrennt. S-Fimbrien wurden mit einem polyklonalen Anti-SfaI-Antikörper und Prf-Fimbrien mit einem polyklonalen Anti-Prf-Antikörper nachgewiesen. Es wurde auch ein monoklonaler Anti-FimA-Antikörper für Typ 1-Fimbrien eingesetzt, der allerdings nicht mit Typ 1-Fimbrien des Stammes *E. coli* 536 reagierte.

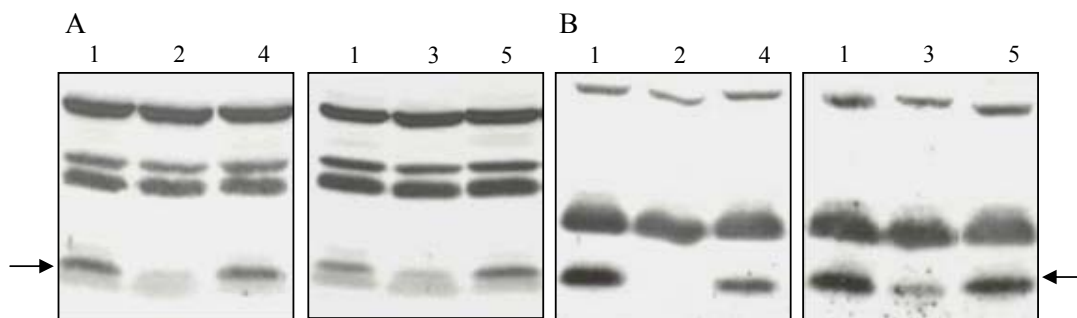


Abb. 24: Western Blot-Analyse zum Nachweis von Prf-Fimbrien (A) und S-Fimbrien (B). 1: 536, 2: 536 $\Delta clpX$, 3: 536 $\Delta clpP$, 4: 536 $\Delta clpX attB::clpX$, 5: 536 $\Delta clpP attB::clpP$. Pfeile markieren die relevanten Banden der PrfA- bzw. SfaA-Hauptstrukturuntereinheiten bei 20 kDa. Die weiteren Signale resultieren aus unspezifischen Hybridisierungsreaktionen, die in allen Stämmen gleich stark vorhanden waren.

Die *clpX*-Deletionsmutante bildete keine und die *clpP*-Deletionsmutante stark verminderte Prf- und S-Fimbrien aus (Abb. 24). Durch die Komplementation von *clpX* und *clpP* konnte die Fimbrienexpression des Wildtypstammes wiederhergestellt werden.

3.2. Einfluss von ClpX und ClpP auf die Expression von Curli und Cellulose

E. coli 536 exprimiert Curli-Fimbrien und Cellulose bei Temperaturen unter 30 °C. Diese beiden Faktoren tragen maßgeblich zur Ausbildung des sogenannten rdar Morphotyps (red dry and rough) bei.

Um den Einfluss der Protease ClpXP auf die Expression des rdar Morphotyps zu untersuchen, wurden der Phänotyp des *E. coli* 536 Wildtypstammes sowie der *clpX*- und *clpP*-Deletionsmutanten und der komplementierten Stämme auf Kongorot-Agarplatten bei verschiedenen Temperaturen bestimmt (Abb. 25).

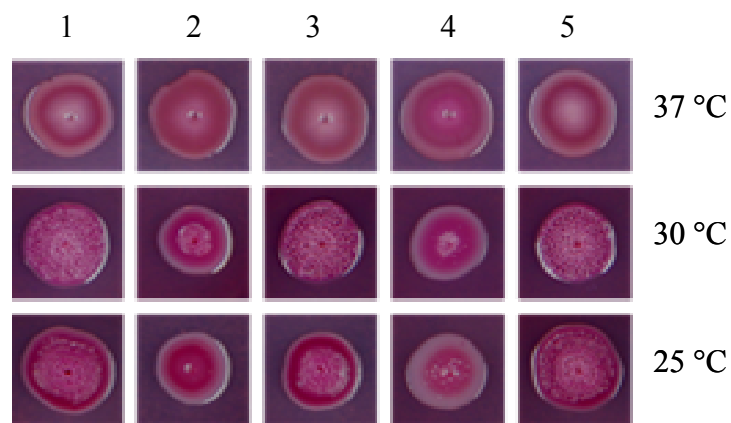


Abb. 25: Rdar Morphotyp des Stammes 536 und seiner *clpX*- und *clpP*-Mutanten auf Kongorot-Agarplatten bei verschiedenen Temperaturen. 1: 536, 2: 536 $\Delta clpX$, 3: 536 $\Delta clpX$ *attB::clpX*, 4: 536 $\Delta clpP$, 5: 536 $\Delta clpP$ *attB::clpP*.

Bei 37 °C wurde der rdar Morphotyp von keinem der getesteten Stämme ausgebildet. Die Kolonien erschienen glatt, glänzend und hell. Wildtypische Kolonien, welche bei 30 °C und 25 °C inkubiert wurden, zeigten dagegen eine rauhe, trockene Oberfläche und waren dunkelrot. Die Deletion von *clpX* und *clpP* führte zu einer schwächeren, verzögerten Expression des rdar Morphotyps. Die äußeren Bereiche der Kolonien sind auch bei Inkubation bei niedrigeren Temperaturen eher hell, glatt und glänzend. Die komplementierten Mutanten entsprachen in ihrem Phänotyp dem rdar Morphotyp des Wildtypstammes.

Die Expression von Cellulose wurde zusätzlich auf Calcofluor-Agarplatten getestet und ist durch weißes Fluoreszieren der Kolonien gekennzeichnet (Abb. 26).

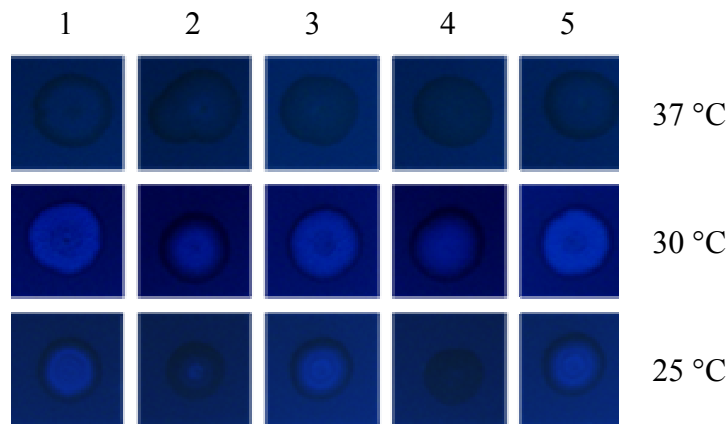


Abb. 26: Nachweis der Celluloseexpression verschiedener Derivate des Stammes 536 durch Calcofluorbindung. 1: 536, 2: 536 $\Delta clpX$, 3: 536 $\Delta clpX attB::clpX$, 4: 536 $\Delta clpP$, 5: 536 $\Delta clpP attB::clpP$.

Wie schon für die Curliexpression beobachtet, wurde bei 37 °C keine Cellulose gebildet. Bei 30 °C war eine Reduktion und bei 25 °C ein Fehlen der Celluloseexpression bei den Mutantenstämmen zu erkennen. Auch hier konnte die wildtypische Cellulosebildung durch Komplementation der Mutanten mit *clpX* oder *clpP* wiederhergestellt werden.

Anhand dieser phänotypischen Tests konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *clpX* und *clpP* starken Einfluss auf die Expression des rdar Morphotyps hat, wobei der Effekt bei 25 °C am deutlichsten war. Dieses lässt auf eine verminderte Expression von Curli und Cellulose schließen. Die verminderte Expression dieser Faktoren konnte durch Komplementation mit *clpX* und *clpP* wieder rückgängig gemacht werden.

3.3. Einfluss von ClpX und ClpP auf die Flagellierung

Der Wildtypstamm *E. coli* 536 unterscheidet sich nicht nur hinsichtlich der Expression von Prf-, S-, und Typ 1-Fimbrien von seinen isogenen *clpX*- und *clpP*-Mutanten, sondern auch hinsichtlich seiner Fähigkeit zur Flagellenbildung. Im Folgenden soll nun der Einfluss der Protease ClpXP im Hinblick auf die Motilität und die Flagellierung untersucht werden.

3.3.1. Motilitätsnachweis

Der Motilitätsnachweis stellt einen einfachen und schnellen Test zur Überprüfung der Beweglichkeit der Bakterienstämme dar. Hierfür werden Bakterien auf Schwärmagarplatten über Nacht inkubiert und die Beweglichkeit anhand der Schwärmhöfe abgeschätzt.



Abb. 27: Einfluss der *clpX*- und *clpP*-Deletion auf die Motilität des Stammes 536. 1: 536, 2: 536 $\Delta clpX$, 3: 536 $\Delta clpP$, 4: 536 $\Delta clpX attB::clpX$, 5: 536 $\Delta clpP attB::clpP$.

Die getesteten Stämme waren alle beweglich, wobei die *clpX*- und *clpP*-Deletionsmutanten ein erhöhtes Schwärmvermögen im Vergleich zum Wildtypstamm *E. coli* 536 aufwiesen. Die Komplementation war hinsichtlich der Flagellenexpression nur teilweise erfolgreich, da die Stämme trotzdem ein erhöhtes Schwärmvermögen aufwiesen.

3.3.2. Nachweis der Flagellenexpression im Western Blot

Zusätzlich zu dem beschriebenen Motilitätsnachweis wurden von den in Abbildung 27 getesteten Stämmen Flagellen isoliert und diese in einer Western Blot-Analyse mit einem Anti-Flagellin-Antikörper nachgewiesen.

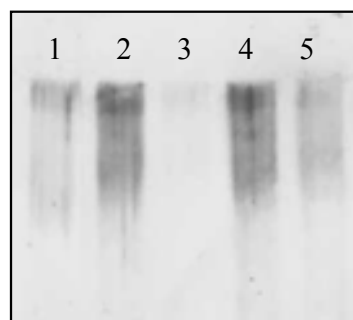


Abb. 28: Western Blot-Analyse der Flagellenexpression des Stammes 536 in Abhängigkeit der *clpX*- und *clpP*-Deletion mit einem Anti-Flagellin-Antikörper. 1: 536 $\Delta clpP attB::clpP$, 2: 536 $\Delta clpP$, 3: 536, 4: 536 $\Delta clpX$, 5: 536 $\Delta clpX attB::clpX$. Der Western Blot wurde mit einem polyklonalen Serum durchgeführt, welches gegen das H7-Antigen von *E. coli* Stamm IHE3034 gerichtet war. Die Proben für die Western Blot-Analyse wurden so stark verdünnt, dass der Wildtyp nur noch ein sehr schwaches Signal gab. Auf diese Weise konnten die Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutanten besser dargestellt werden.

Die Ergebnisse der Western Blot-Analyse bestätigten das Resultat des Motilitätsnachweises. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die *clpX*- und *clpP*-negativen Mutanten eine verstärkte Flagellenexpression aufwiesen. Die Komplementation der Stämme konnte die wild-typische Flagellenexpression nur teilweise wiederherstellen.

3.4. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Fimbrien- und Flagellenexpression

Da die *clpX*- und *clpP*-Deletionsmutanten starke Veränderungen der Zellwand-assoziierten Strukturen aufwiesen, sollten diese zusätzlich noch transmissionselektronenmikroskopisch untersucht werden. Die Bakterien wurden ohne Fixierung nur durch Negativkontrastierung mit wässriger Uranylacetat-Lösung im Elektronenmikroskop betrachtet.

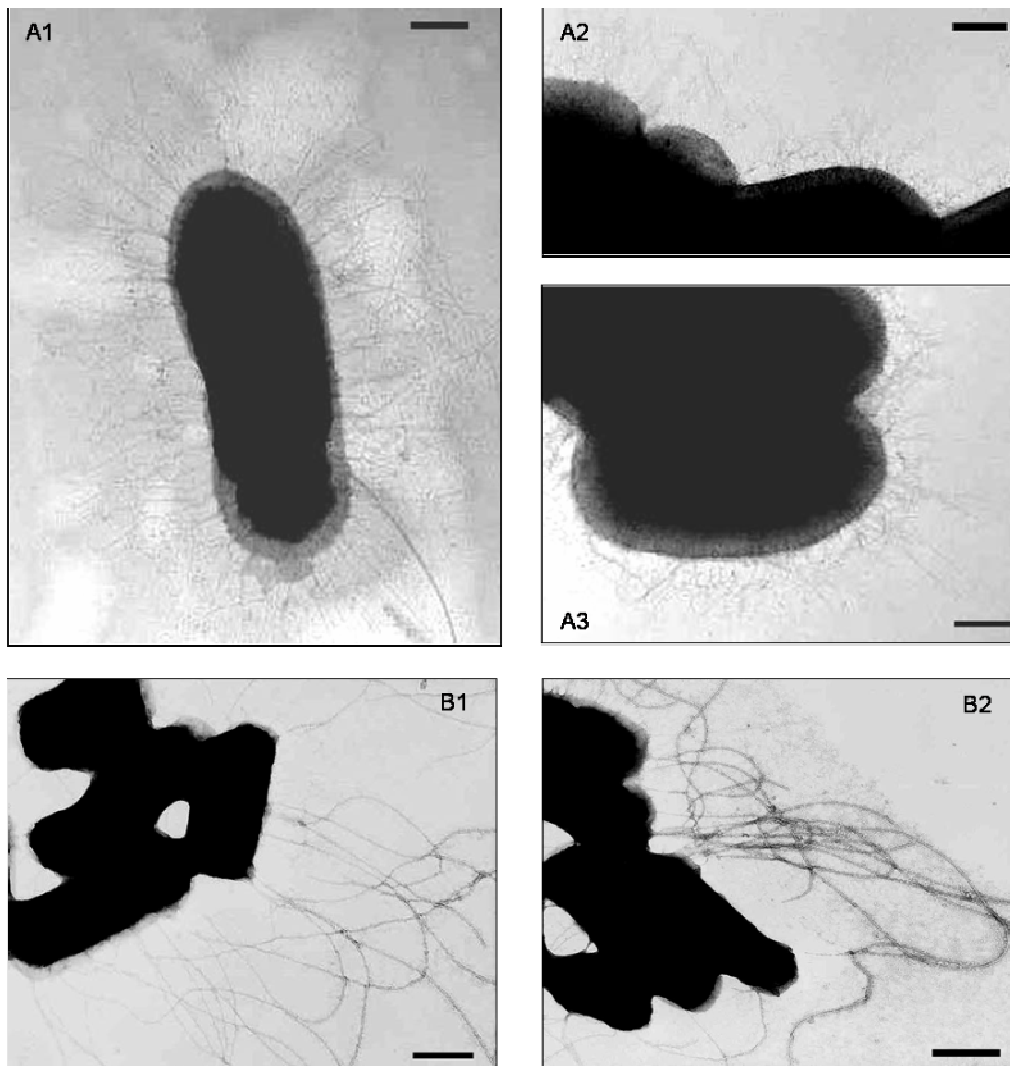


Abb. 29: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der Stämme *E. coli* 536 (A) und 536 $\Delta clpX$ (B). Die Proben wurden mit 0,5 % Uranylacetat negativ kontrastiert und bei 20000 \times Vergrößerung betrachtet. Der Eichbalken entspricht bei A 0,5 μm , bei B 1 μm .

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen des *E. coli* Wildtypstammes 536 zeigten deutlich die Ausbildung von Fimbrien, welche als dunkel gefärbte Fasern zu erkennen sind. Abbildung A1 zeigt ein einzelnes Wildtyp-Bakterium mit ausgebildeter Flagelle, in A2 und A3 sind Ausschnitte von elektronenmikroskopischen Aufnahmen dargestellt, welche im Detail die Fimbrienexpression des Wildtyps zeigen.

Demgegenüber zeigten Aufnahmen von 536 $\Delta clpX$ (Abb. 29: B1 und B2) eine verstärkte Expression von Flagellen. Es konnten auch in stärkeren Vergrößerungen kaum Expression von Fimbrien beobachtet werden.

ClpX und ClpP spielen also eine Rolle für die Expression von Zellwand-assoziierten Faktoren des Stammes 536 wie Typ 1-, Prf- und S- Fimbrien, Curli, Cellulose und Flagelle.

3.5. Einfluss von ClpX und ClpP auf die α -Hämolyseproduktion

Der *E. coli* Stamm 536 besitzt zwei Kopien des Hämolysegenclusters (*hlyI* und *hlyII*), welche auf PAI I₅₃₆ und PAI II₅₃₆ lokalisiert sind. α -Hämolyse bewirkt die Porenbildung in eukaryotischen Erythrozyten. Diese Eigenschaft kann man sich zunutze machen, indem man Bakterienkolonien auf Blutagarplatten animpft. Wird α -Hämolyse produziert, werden die Erythrozyten um die Bakterienkolonie lysiert und es bildet sich ein heller Lysishof.

Es wurden der Wildtyp *E. coli* 536, seine isogenen *clpX*- und *clpP*-Deletionsmutanten sowie die komplementierten Stämme getestet. Als Kontrollstämme wurde der ahämolytische *E. coli* K-12 Stamm MG1655 sowie PAI I₅₃₆ und PAI II₅₃₆ negative Derivate des Stammes 536 verwendet.

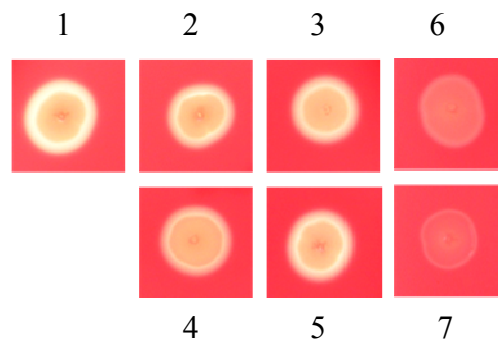


Abb. 30: Einfluss der *clpX*- und der *clpP*-Deletion auf die α -Hämolyseproduktion des Stammes 536. 1: 536, 2: 536 $\Delta clpX$, 3: 536 $\Delta clpX attB::clpX$, 4: 536 $\Delta clpP$, 5: 536 $\Delta clpP attB::clpP$, 6: 536-114, 7: 536-225. Die Bakterien wurden auf LB-Agarplatten mit 5 % Schafblut inkubiert.

Es konnte kein deutlicher Unterschied der α -Hämolysinproduktion in den *clpX*- und *clpP*-negativen Stämmen, verglichen mit dem Wildtyp *E. coli* 536, festgestellt werden. Dementsprechend war auch kein Unterschied zu den komplementierten Stämmen nachweisbar. Die *E. coli* 536-Derivate, welchen jeweils eine Kopie des *hly* Genclusters fehlte, zeigten nur eine schwache α -Hämolysinproduktion. ClpX und ClpP spielen also keine Rolle für die Expression der beiden α -Hämolysindeterminanten.

3.6. Einfluss von ClpX und ClpP auf die Produktion von Lipopolysacchariden (LPS) und Serumresistenz

Um den Einfluss des ClpXP Proteasekomplexes auf die LPS-Expression zu untersuchen, wurden LPS-Präparationen des Wildtyps und verschiedener Derivate nach SDS-PAGE miteinander verglichen.

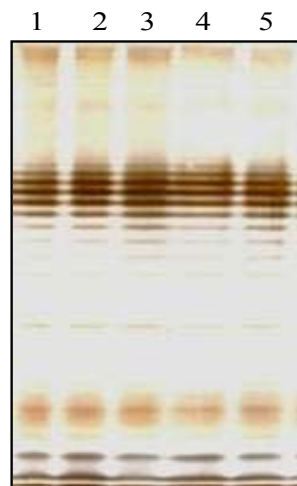


Abb. 31: Einfluss der *clpX*- und der *clpP*-Deletion auf die LPS-Expression des Stammes 536. 1: 536 $\Delta clpP$ *attB::clpP*, 2: 536 $\Delta clpP$, 3: 536, 4: 536 $\Delta clpX$, 5: 536 $\Delta clpX$ *attB::clpX*.

Die Analyse der LPS-Produktion zeigte keinen Unterschied zwischen dem Wildtyp *E. coli* 536 und den Mutanten 536 $\Delta clpX$ bzw. 536 $\Delta clpP$. Wie aus dieser Beobachtung zu erwarten war, hatte auch die Komplementation keinen Einfluss auf das Bandenmuster des LPS-Gels.

Die Ausbildung von Lipopolysacchariden hat eine wichtige Funktion bei dem Schutz der Bakterien vor dem Angriff des Komplementsystems. Da aber noch weitere Faktoren wie z.B. die Ausbildung einer Kapsel eine Rolle spielen, sollten die Mutanten noch in einem Serumresistenzassay mit 50 % humanem Serum getestet werden. Es konnte auch hier kein

Unterschied zwischen den *clpX*- und *clpP*-Mutanten, verglichen mit dem Wildtypstamm festgestellt werden.

3.7. Einfluss von ClpX und ClpP auf die *in vivo*-Virulenz des Stammes *E. coli* 536

Da nachgewiesen werden konnte, dass ClpX und ClpP starken Einfluss auf die Expression von Virulenzfaktoren wie Flagellen, Fimbrien und Curli nimmt, sollte nun im weiteren Verlauf die *in vivo*-Virulenz der Deletionsmutanten im Mausmodell getestet werden. Dazu wurde in Zusammenarbeit mit dem Labor von Prof. L. Emödy in Pécs jeweils mindestens sieben säugenden Mäusen ein Inoculum von $2,5 \times 10^5$ Bakterien in die Blase gespritzt und die Sterberate der Tiere nach vier Tagen ermittelt (Tab. 16).

Tab. 16: Einfluss der *clpX*- und der *clpP*-Deletion auf die Sterberate von Mäusen nach intravesikaler Infektion mit dem *E. coli* Stamm 536 und seiner *clpX*- und *clpP*-Deletionsmutanten.

Stamm	Konzentration des Inokulums (ml ⁻¹)	Anzahl der Mäuse	Sterberate (%)
536	10 ⁵	13	73
	10 ⁴	27	66
536 $\Delta clpX$	10 ⁵	55	50
	10 ⁴	17	12
536 $\Delta fim \Delta prf \Delta sfa$	10 ⁵	8	63

Als Kontrolle wurde dieser Versuch ebenfalls mit einer Fimbrienmutante des Stammes 536 durchgeführt, die keine Typ 1-, Prf- und S-Fimbrien exprimiert.

In dem verwendeten Mausmodell hatte die Deletion von *clpX* und *clpP* keinen signifikanten Einfluss auf die *in vivo*-Virulenz des *E. coli* Stammes 536. Nur bei einer Infektion mit geringer Zellzahl (10⁴ Bakterien pro ml) konnte für die *clpX*-Mutante eine deutlichere Reduktion der Sterberate festgestellt werden. Da in den Mutanten das Zytotoxin α -Hämolysin noch unverändert produziert wird, überlagert dieser den möglichen Effekt einer verringerten Fimbrien- und Flagellenexpression, wodurch die *clpX*- und *clpP*-Mutanten noch genauso virulent wie der Wildtypstamm waren. Zusätzlich wurde als Kontrolle noch ein Stamm getestet, in welchem die Gencluster für Prf-, S- und Typ 1-Fimbrien, also den Fimbrien, deren Expression ClpXP-abhängig ist, deletiert wurden. Auch hier war nur eine leichte Reduktion der Virulenz im Mausmodell zu beobachten.

Zusammenfassung Abschnitt 3

- Es konnte eine reduzierte Expression von Prf-, S- und Typ 1-Fimbrien in den *clpX*- und *clpP*-Deletionsmutanten nachgewiesen werden.
- Die *clpX*- und *clpP*-Mutanten wiesen eine stark verlangsamte Expression von Curli und Cellulose bei Temperaturen unter 30 °C auf.
- Die *clpX*- und *clpP*-Deletion bewirkte eine erhöhte Motilität auf Schwärmagarplatten. Durch transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen konnte ein „hyperflagellierter“ Phänotyp festgestellt werden.
- Es konnte kein Einfluss der *clpX*- oder *clpP*-Deletion sowohl auf die Expression von α -Hämolysin und Lipopolysacchariden als auch auf die Serumresistenz dieser Mutanten nachgewiesen werden. Die *in vivo*-Virulenz der Mutantenstämme war nur geringfügig reduziert.
- Durch chromosomale Komplementation mit *clpX* oder *clpP* konnte die Expression aller betroffenen Faktoren wieder rekonstruiert werden.

4. Transkriptanalyse von exprimierten Virulenzfaktoren des uropathogenen Stammes *E. coli* 536 und seiner isogenen *clpX*- und *clpP*-Mutanten

Um zu untersuchen, ob die auf Proteinebene und bei den weiteren Untersuchungen beobachteten Einflüsse der Protease ClpXP auf die Virulenzdeterminanten des *E. coli* Stammes 536 bereits auf Transkriptionsebene oder erst auf posttranskriptionaler Ebene begründet liegen, wurde die Methode der semiquantitativen „Real-Time Reverse Transkription (RT)-PCR“ (Real-Time PCR) angewendet.

4.1. Transkriptanalyse der Hauptuntereinheiten verschiedener Fimbrienadhäsine in *E. coli* 536 und dessen *clpX*- und *clpP*-Mutanten

Für Prf-, S-, CS12-ähnliche-, und Typ 1-Fimbrien wurde auf Proteinebene jeweils eine reduzierte Expression in den *clpX*- und *clpP*-negativen Stämmen gegenüber dem Wildtyp festgestellt. In die vergleichende Transkriptanalyse dieser verschiedenen Fimbriendeterminanten wurde zusätzlich das Fimbriengencluster *pix* (pilus involved in *E. coli* X2194 adhesion), welches auf PAI V₅₃₆ lokalisiert ist, einbezogen, dessen Expression anhand der Hauptstrukturuntereinheit-kodierenden Gens *pixA* untersucht werden sollte.

Da auf Proteinebene kein Unterschied zwischen *E. coli* 536 und seinen *clpX*- und *clpP*-negativen Mutanten hinsichtlich der Expression von Pix-Fimbrien festgestellt werden konnte, sollte nun anhand der *pixA* Transkriptmengen untersucht werden, ob die Expression dieses Fimbriengenclusters unter anderen Kultivierungsbedingungen (z.B. als Standkultur) stattfindet und ob eine Beeinflussung der Transkription durch ClpXP erfolgt.

Für die Expression von CsgA, der Hauptuntereinheit des Curlins, konnte bei den Proteomstudien unter den gewählten Bedingungen (37 °C, Schüttelkultur) keine Expression bzw. kein Unterschied zwischen Wildtyp und den *clpX*- und *clpP*-Mutanten nachgewiesen werden. Allerdings war eine unterschiedliche Expression bei niedrigeren Temperaturen auf Kongorot-Agarplatten feststellbar (siehe Abb. 25). Dementsprechend wurden die Real-Time PCR-Experimente mit Bakterienzellen durchgeführt, die über Nacht auf LB-Agarplatten bei

30 °C gewachsen waren. Bei den gleichen Untersuchungen aus Schüttel- und Standkulturen bei 37 °C war keinerlei *csgA* Expression nachzuweisen.

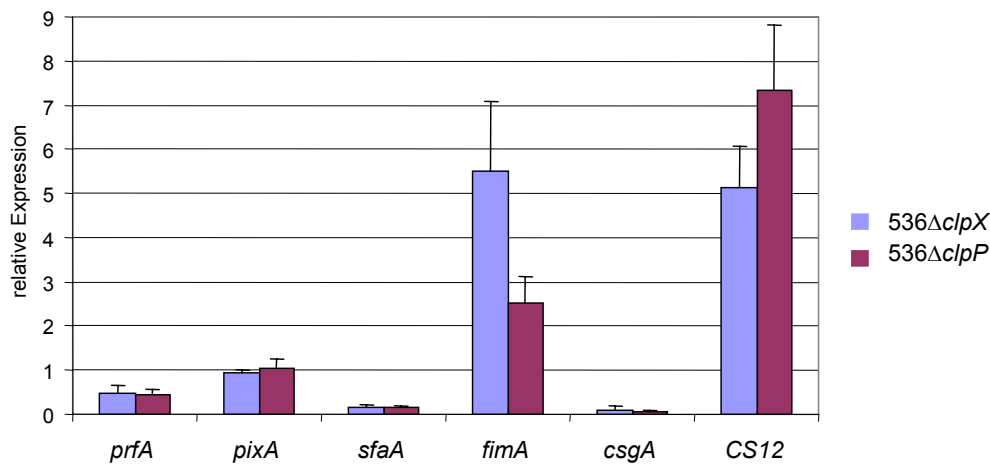


Abb. 32: Relative Expression der Gene für Fimbrienstrukturuntereinheiten in den *clpX*- und *clpP*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp *E. coli* 536. Die relative Expression dieser Gene im Wildtyp wurde mit 1 festgelegt. Die Werte wurden aus mindestens 4 unabhängigen Experimenten gemittelt. Die Standardabweichung vom Mittelwert ist angegeben. Für die Untersuchung der *pixA* Transkriptmenge wurde RNA aus Schüttel-, und Standkulturen der logarithmischen Wachstumsphase OD_{600} 0,6 - 0,8 bei 37 °C isoliert. Für die Untersuchungen zur Expression von CS12-ähnlichen Fimbrien wurden zusätzlich auf LB-Agarplatten bei 30 °C inkubierte Bakterienzellen verwendet.

Die relative Expression von *prfA* wurde in den *clpX*- und *clpP*-negativen Stämmen im Vergleich zum Wildtyp auf 0,49 bzw. 0,43 reduziert. Für *sfaA* konnte sogar eine Reduktion der relativen Expression auf 0,16 bzw. 0,14 nachgewiesen werden. Im Gegenzug wies die relative Expression von *fimA* eine Erhöhung um den Faktor 5,2 bzw. 2,5 auf. Eine Änderung der Expression von CS12-ähnlichen Fimbrien (ORF36_I PAI I₅₃₆) konnte nur auf LB-Agarplatten bei 30 °C inkubierten Bakterien nachgewiesen werden, nicht aber in Standkulturen bei 37 °C. Hier war die relative Expression durch die Deletion von *clpX* und *clpP* um 5,1 bzw. 7,4 erhöht. Die Ergebnisse für *fimA* und ORF36_I (CS12-ähnliche Fimbrien) stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen aus der Proteomanalyse. Hier wiesen die Mutantenstämme gleichfalls eine reduzierte Menge an FimA und ORF36_I auf. Für *pixA* konnte keine Änderung der relativen Expression nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse wurden, außer für CS12-ähnliche Fimbrien, aus der Untersuchung von Standkulturen erzielt, für die gleichen Untersuchungen der Schüttelkulturen konnte keine deutliche Änderung der Expression festgestellt werden. Da die Transkriptanalysen aus Standkulturen der frühen logarithmischen Wachstumsphase, die Proteomstudien aber aus Schüttelkulturen der späten

logarithmischen oder stationären Wachstumsphase durchgeführt wurden, sind die erzielten Ergebnisse nicht komplett vergleichbar.

csgA, die Haupteinheit des Curlins, wies in den *clpX*- und *clpP*-negativen Mutanten eine relative Expression von 0,11 bzw. 0,6 auf. Dies entspricht einer deutlichen Reduktion der Expression in den *clpX*- und *clpP*-Mutanten und bestätigt damit die Ergebnisse der Inkubation auf Kongorot-Agarplatten (siehe Abb. 25).

4.2. Transkriptanalyse von Antigen 43 in *E. coli* 536 und dessen *clpX*- und *clpP*-Mutanten

Auf Proteinebene konnte eine reduzierte Expression des Autotransporters Antigen 43 in den *clpX*- und *clpP*-negativen Mutanten nachgewiesen werden. Es war das einzige Adhäsin, für das, zusätzlich zum Sekretom, schon im Zytoplasma der logarithmischen Wachstumsphase eine deutliche Reduktion nachzuweisen war (siehe V. 2.1.2.). Der *E. coli* Stamm 536 besitzt zwei Orthologe des Antigens 43, ORF52_{III} und ORF47_V. Diese weisen auf DNA-Ebene eine hohe Ähnlichkeit auf, wobei die α - oder Passengerdomäne nicht so stark konserviert ist wie die β - oder Autotransporterdomäne (siehe Abb. 33). Der Einfachheit halber werden die beiden Orthologe in diesem Abschnitt als *agn43*_{III} und *agn43*_V bezeichnet. Auf Proteinebene wurde eine Homologie der beiden Allele über das komplette Protein von 66 % festgestellt.

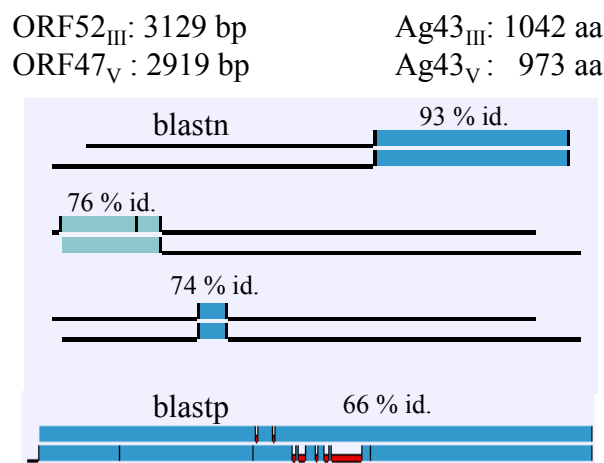


Abb. 33: Homologievergleich der zwei Antigen 43 Orthologe ORF52_{III} und ORF47_V des *E. coli* Stammes 536. Der Vergleich wurde auf DNA- und Protein-Ebene mit Hilfe der entsprechenden Programme *blastn* und *blastp* von dem National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt.

Es sollte nun untersucht werden, ob die verminderte Expression auf Proteinebene nur für ein Ortholog zutrifft oder ob beide Orthologe betroffen waren. Hierfür wurden Primer ausgewählt, die entweder *agn43_{III}*- oder *agn43_V*-spezifische Sequenzen amplifizieren. Zusätzlich wurden noch Primer aus dem konservierten, hinteren Bereich der Gene ausgewählt.

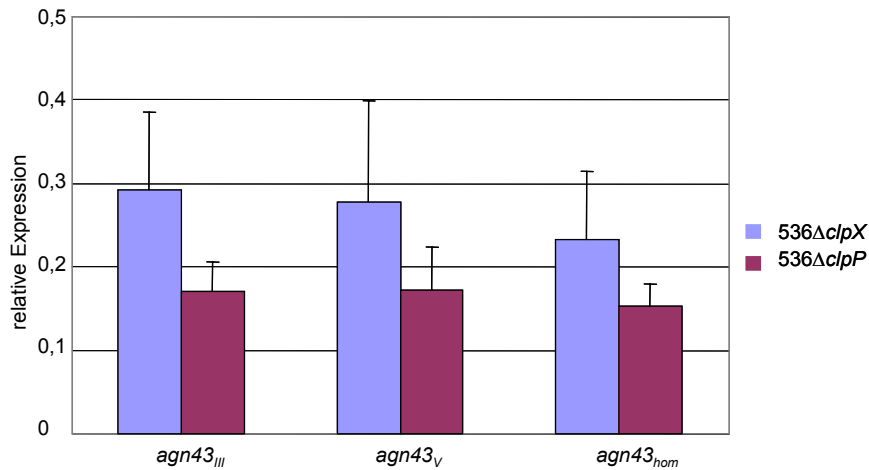


Abb. 34: Relative Expression der zwei Antigen 43 Orthologe in den *clpX*- und *clpP*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp *E. coli* 536. Die Werte wurden aus mindestens 4 unabhängigen Experimenten gemittelt. Die Standardabweichung vom Mittelwert ist angegeben. Für diese Experimente wurde RNA aus Schüttelkulturen der logarithmischen Wachstumsphase bei 37 °C isoliert. Mit den Primern *agn43_{hom}* wurde der homologe Bereich und mit *agn43_{III}* und *agn43_V* wurden spezifische Bereiche der beiden Orthologe untersucht.

Nachdem die Transkriptanalyse für den konservierten Bereich der beiden *agn43* Orthologe insgesamt eine Reduktion der *agn43* Transkriptmenge in den *clpX*- und *clpP*-Mutanten ergab, sollte zusätzlich zwischen den beiden PAI III₅₃₆- und PAI V₅₃₆-kodierte Orthologen unterschieden werden. Die entsprechenden Real-Time PCR-Untersuchungen zeigten, dass sich die Transkriptmengen von *agn43_{III}* und *agn43_V* gleich verhielten. Für die *clpX*-Mutante konnte für den homologen und den *agn43_{III}*- und *agn43_V*-spezifischen Bereich eine Reduktion der Transkriptmenge von 0,23 – 0,29 ermittelt werden. Die relative Expression war in der *clpP*-Mutante auf 0,15 – 0,17 reduziert. Diese Expressionsstudien zeigten, dass auf Transkriptebene beide *agn43* Orthologe durch die Deletion von *clpX* und *clpP* betroffen sind, wobei der Effekt in der *clpP*-Mutante stärker als in der *clpX*-Mutante auftrat.

4.3. Transkriptanalyse von Genen verschiedener Operons innerhalb der Flagellen-Regulationskaskade in *E. coli* 536 und dessen *clpX*- und *clpP*-Mutanten

In Motilitätsassays konnte nachgewiesen werden, dass die Deletion von *clpX* oder *clpP* zu einer erhöhten Schwärmfähigkeit führte. Die Regulation der Flagellenexpression ist streng hierarchisch gegliedert. Um nun zu untersuchen, auf welcher Ebene der Flagellen-Regulationskaskade ClpXP Einfluss nimmt, wurde die relative Expression der Gene *fliA*, *fliC* sowie *flhC* untersucht, welche verschiedenen regulatorischen Hierarchien des Flagellenoperons angehören.

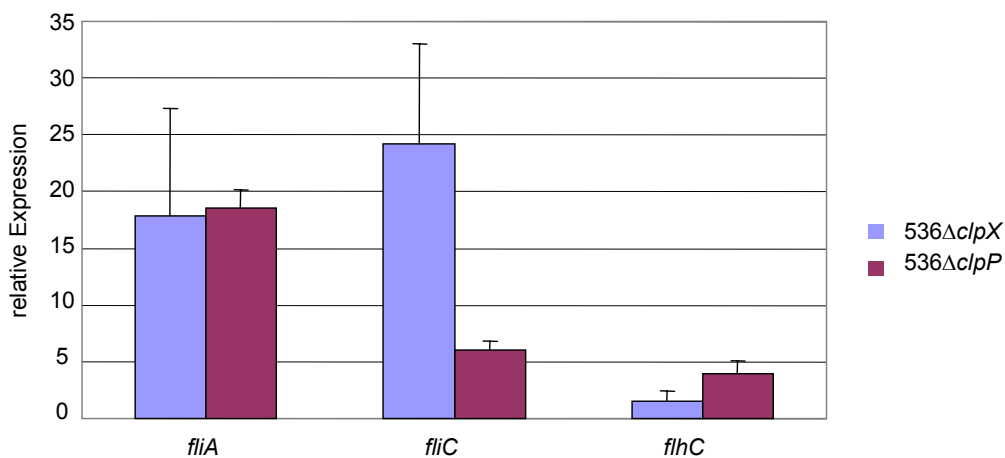


Abb. 35: Relative Expression von Genen des Flagellenregulons der *clpX*- und *clpP*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp *E. coli* 536. Die Werte wurden aus mindestens 4 unabhängigen Experimenten gemittelt. Die Standardabweichung vom Mittelwert ist angegeben. Für die Real-Time PCR-Experimente wurde RNA von Bakterienzellen isoliert, die bei 30 °C auf LB-Agarplatten inkubiert wurden oder aus Schüttelkulturen der logarithmischen Wachstumsphase bei 37 °C.

Für *fliC* konnte eine erhöhte relative Expression in den *clpX*- und *clpP*-negativen Mutanten um den Faktor 24,2 bzw. 6,0 ermittelt werden. Die Expression des Sigmafaktors FliA war um den Faktor 17,8 bzw. 18,2 gegenüber dem Wildtyp *E. coli* 536 erhöht. Für *flhC* war gegenüber dem Wildtyp in der *clpX*-Mutante keine signifikante Erhöhung (1,5) und in der *clpP*-Mutante eine Zunahme der relativen Expression um 4,0 feststellbar.

Für die gleichen Untersuchungen, die mit RNA aus Schüttelkulturen bei 37 °C durchgeführt wurden, konnte für keine der drei untersuchten Gene eine signifikante Erhöhung der relativen Expression gegenüber dem Wildtyp festgestellt werden.

Versuche, RNA aus Kulturen der späten logarithmischen oder stationären Phase zu isolieren, schlugen fehl. Dies war entweder auf die geringe Ausbeute an RNA zurückzuführen, oder

die Qualität der RNA war sehr schlecht und ließ damit keine Untersuchung mittels Real-Time PCR zu.

Die Transkriptionsstudien ergaben für die Prf, S- und Curli-Fimbrien sowie für Antigen 43 eine reduzierte Transkription in den *clpX*- und *clpP*-negativen Mutanten des uropathogenen *E. coli* Stammes 536. Gleichzeitig war die Transkription der CS12-ähnlichen und Typ 1-Fimbrien in den Mutantenstämmen erhöht. Dieses lässt auf eine direkte oder indirekte regulatorische Wirkung der Protease ClpXP schon auf Transkriptionsebene schließen.

Bei den Untersuchungen zur Flagellenregulation konnte eine deutlich erhöhte Transkriptmenge für die Klasse 2 und 3 Gene *fliC* und *fliA* in den Mutantenstämmen festgestellt werden. Die Transkription des Regulatorprotein FlhC kodierenden Gens *flhC* war demgegenüber in den Mutantenstämmen nur schwach erhöht. Dieses spricht für einen posttranskriptionalen Einfluss der Protease ClpXP auf den „master regulator“ FlhC/FlhD.

Zusammenfassung Abschnitt 4

- Um den Einfluss der *clpX*- und *clpP*-Deletion auf die Transkription verschiedener Virulenzdeterminanten des *E. coli* Stammes 536 zu untersuchen, wurde die Methode der semiquantitativen Real-Time Reverse Transkription (RT)-PCR (Real-Time PCR) etabliert.
- Eine *clpX*- oder *clpP*-Mutation bewirkte eine reduzierte Transkription der Gene, die für die Hauptstrukturuntereinheiten von Prf-, S-, und von Curli-Fimbrien kodieren. Gleichzeitig war die Transkription der Gene für die Hauptstrukturuntereinheiten von Typ 1- und CS12-ähnlichen Fimbrien in den Mutanten deutlich erhöht. Es wurde kein Unterschied bei der Transkription von *pixA*, dem Gen für die Hauptstrukturuntereinheit der Pix-Fimbrien, nachgewiesen.
- Die Transkription der beiden Antigen 43 Varianten ORF52_{III} und ORF47_V war durch die Deletion von *clpX* und *clpP* gleichermaßen betroffen. Es konnte eine deutliche Reduktion der Transkriptmengen beider Gene nachgewiesen werden, wobei die Deletion von *clpP* einen stärkeren Einfluss hatte.
- ClpXP hat keinen Einfluss auf die Transkription der „Masterregulatorgene“ *flhD/C*, beeinflusst jedoch die Transkriptmenge von Genen in der Hierarchie weiter unten liegender Operons positiv. So konnte eine deutlich erhöhte Expression sowohl von *fliA*, als auch von *fliC* nachgewiesen werden. Demzufolge hat ClpXP einen negativen regulatorischen Effekt auf die Flagellenexpression, der aber erst auf posttranskriptionaler oder posttranslationaler Ebene auftritt.

5. Untersuchungen zum Einfluss von Antigen 43 und RfaH auf die Fähigkeit zur Autoaggregation des uropathogenen *E. coli* Stammes 536

Da schon für die Protease ClpXP ein Einfluss auf die Expression der zwei Antigen 43 Orthologe feststellbar war, sollte nun mit RfaH ein weiterer Faktor untersucht werden, welcher die Expression von Antigen 43 beeinflusst.

Für das Protein RfaH, welches als Antiterminator bei der Transkription spezifischer Operons in *E. coli* und *Salmonella* fungiert (Bailey *et al.*, 1997), konnte eine Beteiligung an der Biofilmbildung nachgewiesen werden. Die Deletion von *rfaH* resultierte sowohl in dem apathogenen *E. coli* K-12 Stamm MG1655 als auch in *E. coli* 536 in einer verstärkten Biofilmbildung. DNA Array-Analysen mit dem Stamm MG1655 ergaben, dass in der *rfaH*-Mutante das Gen *b2000* verstärkt exprimiert wird. *b2000*, auch als *flu* bezeichnet, kodiert für das phasenvariable äußere Membranprotein Antigen 43, welches an Biofilmbildung und Autoaggregation beteiligt ist (Beloin *et al.*, 2005).

DNA Array-Analysen mit *E. coli* 536 zeigten, dass in dem *rfaH*-negativen Stamm zwei ORFs hochreguliert waren, ORF52_{III} und ORF47_V. Diese zwei ORFs kodierten für Orthologe des Antigen 43, welche auf PAI III₅₃₆ und PAI V₅₃₆ lokalisiert sind (siehe auch V. 4.2.).

Um die Rolle von Antigen 43 und RfaH in der Biofilmbildung und Autoaggregation näher zu charakterisieren, wurde eine *rfaH*-Deletionsmutante von *E. coli* 536 konstruiert. Darauf aufbauend wurden zusätzlich Einzel- und Doppelmutanten der zwei Antigen 43 Allele im Wildtyp und seiner *rfaH*-Mutante hergestellt. Zusätzlich sollte *b2000* in Wildtyp und *rfaH*-Mutante deletiert werden. Die resultierenden Stämme wurden dann hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Autoaggregation überprüft.

5.1. Konstruktion einer *rfaH*-Deletionsmutante im *E. coli* Stamm 536

Zur Konstruktion der *rfaH*-Deletionsmutante wurde die Methode nach Datsenko und Wanner (2000) angewendet (siehe V. 1.1. bzw. IV. 9.).

Das Gen *rfaH* wurde durch Deletion von 343 bp aus dem kodierenden Bereich und Insertion einer *cat*-Kassette inaktiviert, was in dem Stamm 536 $\Delta rfaH::cat$ resultierte. Nach Überprüfung der richtigen Integration der *cat*-Kassette wurde diese wieder mit Hilfe der FLP-Rekombinase entfernt. Diese Deletionsmutante wurde als 536 $\Delta rfaH$ bezeichnet. Die richtige Integration der *cat*-Kassette sowie die Deletion von *rfaH* wurden durch spezifische PCR-

Reaktionen mit den Primern BP64 und BP65 sowie *cat1* und *cat3* überprüft. Zusätzlich wurden die Mutanten mit einer Southern Hybridisierung untersucht (Abb. 36).

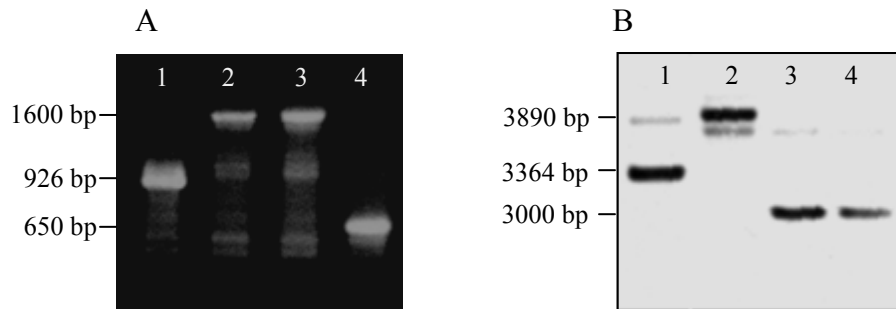


Abb. 36: PCR zur Überprüfung der *rfaH*-Deletion in *E. coli* Stamm 536 A) durch PCR mit *rfaH*-spezifischen Primern (1: 536, 2,3: 536 $\Delta rfaH::cat$, 4: 536 $\Delta rfaH$) B) durch Southern Blot-Analyse mit einer *rfaH*-spezifischen Sonde (1: 536, 2: 536 $\Delta rfaH::cat$, 3,4: 536 $\Delta rfaH$).

Für die Southern Blot-Analyse wurde die chromosomale DNA der Stämme mit *EcoRV* verdaut und die Membran mit *cat*- und *rfaH*-spezifischen Sonden hybridisiert. Sowohl bei den PCR-Reaktionen wie auch bei der Southern Blot-Analyse erhielt man durch die Integration der *cat*-Kassette ein vergrößertes Produkt bzw. hybridisierte ein größeres DNA-Fragment. Entsprechend waren diese Fragmente nach Entfernung der *cat*-Kassette verkürzt.

5.2. Konstruktion von Einzel-, und Doppelmutanten von ORF52_{III} und ORF47_V im *E. coli* Stamm 536 und seiner *rfaH*-Mutante

Um zu untersuchen, ob die verstärkte Autoaggregation durch die erhöhte Aktivität von ORF52_{III} und ORF47_V hervorgerufen wird, sollten nun Einzel- und Doppelmutanten der beiden Gene in dem Wildtypstamm *E. coli* 536 und seiner *rfaH*-Mutante hergestellt werden.

Es wurden jeweils die Primer ORF52_{del1}, ORF52_{del2} und ORF47_{del1}, ORF47_{del2} für die Inaktivierung der Gene nach der Methode von Datsenko und Wanner (2000) verwendet. Die richtige Insertion der *cat*-Kassette sowie deren Exzision wurden durch spezifische PCR-Reaktionen mit den Primern ORF52_{up}, ORF52_{down} für ORF52_{III}, ORF47_{up}, ORF47_{down} für ORF47_V, sowie mit *cat1* und *cat3* überprüft.

Alle Mutanten wurden zusätzlich noch mit einer Southern Hybridisierung überprüft (Abb. 37).

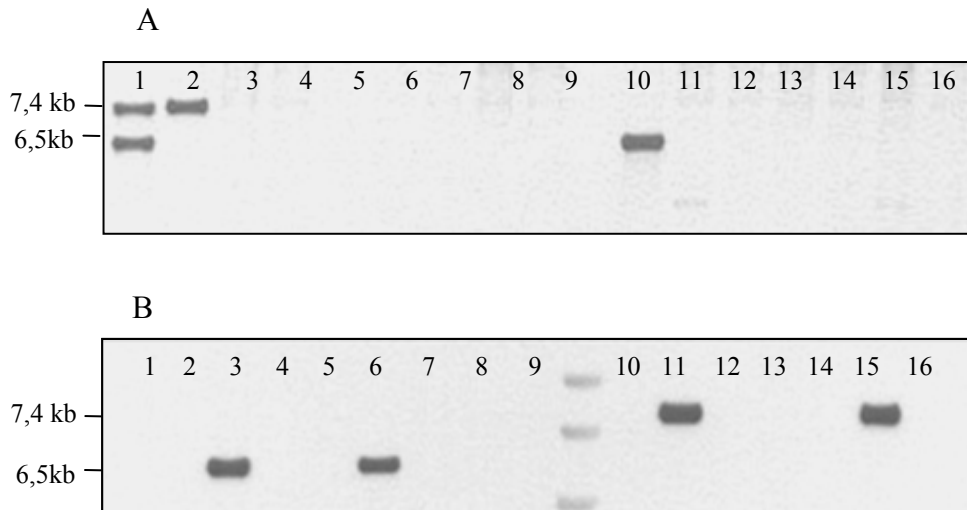


Abb. 37: Southern Blot-Analyse der ORF52_{III}- und ORF47_V- Einzel- und Doppelmutanten im *E. coli* Stamm 536 und seiner *rfaH*-Mutante. Die chromosomale DNA der Stämme wurde mit *EcoRI* geschnitten und mit *rfaH*-spezifischen (A) und *cat*-spezifischen (B) Sonden hybridisiert.

1	536	10	536 Δ ORF52 _{III}
2	536 Δ ORF47 _V	11	536 Δ ORF47 _V Δ ORF52 _{III} :: <i>cat</i>
3	536 Δ ORF52 _{III} Δ ORF47 _V :: <i>cat</i>	12-14	536 Δ ORF47 _V Δ ORF52 _{III}
4, 5	536 Δ ORF52 _{III} Δ ORF47 _V	15	536 Δ <i>rfaH</i> Δ ORF47 _V Δ ORF52 _{III} :: <i>cat</i>
6	536 Δ <i>rfaH</i> Δ ORF52 _{III} Δ ORF47 _V :: <i>cat</i>	16	536 Δ <i>rfaH</i> Δ ORF47 _V Δ ORF52 _{III}
7-9	536 Δ <i>rfaH</i> Δ ORF52 _{III} Δ ORF47 _V		

Hierfür wurde die chromosomale DNA der Stämme mit *EcoRI* verdaut und die Membran mit *cat*- und *agn43*-spezifischen Sonden hybridisiert. Die *agn43*-spezifische Sonde bestand aus 600 bp aus dem homologen Sequenzbereich der Orthologe. Man erhielt für ORF52_{III} bei 7,4 kb und für ORF47_V bei 6,5 kb ein Signal. Die *cat*-Sonde ergab für die entsprechenden Stämme ein Signal bei 6,5 kb oder 7,4 kb. Alle Stämme wiesen das erwartete Fragmentmuster auf.

Alle Bemühungen, das in *E. coli* K-12 beschriebene Gen *b2000* in *E. coli* 536 bzw. 536 Δ *rfaH* zu deletieren, schlugen fehl. Es wurden drei verschiedene Sequenzabschnitte für die Deletion mit der Methode nach Datsenko und Wanner getestet. Anschließend wurde festgestellt, dass das Gen *b2000* sowie der K-12-spezifische Sequenzkontext im uropathogenen *E. coli* Stamm 536 nicht vorliegt (U. Dobrindt, mündliche Mitteilung). Ein zusätzlicher Beweis hierfür zeigte sich bei der Southern Blot-Analyse. Wäre *b2000* intakt, würde man bei der Hybridisierung mit einer *agn43*-spezifischen Sonde ein weiteres Signal für den Wildtypstamm *E. coli* 536 erwarten.

Zusätzlich zu den durchgeführten PCR-Reaktionen und Southern Blot-Analysen sollten die Deletionen auch durch Western Blot-Analysen bestätigt werden. Hierfür wurde ein Antikörper verwendet, welcher gegen AIDA-I (adhesin-involved-in-diffuse-adherence) aus dem klinischen Isolat *E. coli* 2787 gerichtet ist (Benz und Schmidt, 1992). AIDA ist, ähnlich wie Antigen 43, ein Autotransporter Adhäsın, welches aber eine zu geringe Homologie zu den Orthologen in *E. coli* 536 aufwies. Demzufolge konnte der Antikörper nicht an die *E. coli* 536-spezifischen Ag43 Orthologen binden und es wurde kein Signal detektiert (Daten nicht gezeigt).

5.3. Autoaggregationsassays der verschiedenen *rfaH*- und *agn43*-Mutanten des Stammes *E. coli* 536

Um die Fähigkeit zur Autoaggregation in Minimalmedium zu quantifizieren, wurden Autoaggregationsassays durchgeführt. Die Fähigkeit zur Aggregation ist durch Zusammenklumpen und Absinken der Bakterienzellen gekennzeichnet und führt zur Abnahme der OD₆₀₀. Die Bakteriensuspension klart auf. In der folgenden Abbildung 38 ist das Ergebnis eines repräsentativen Autoaggregationsassays dargestellt.

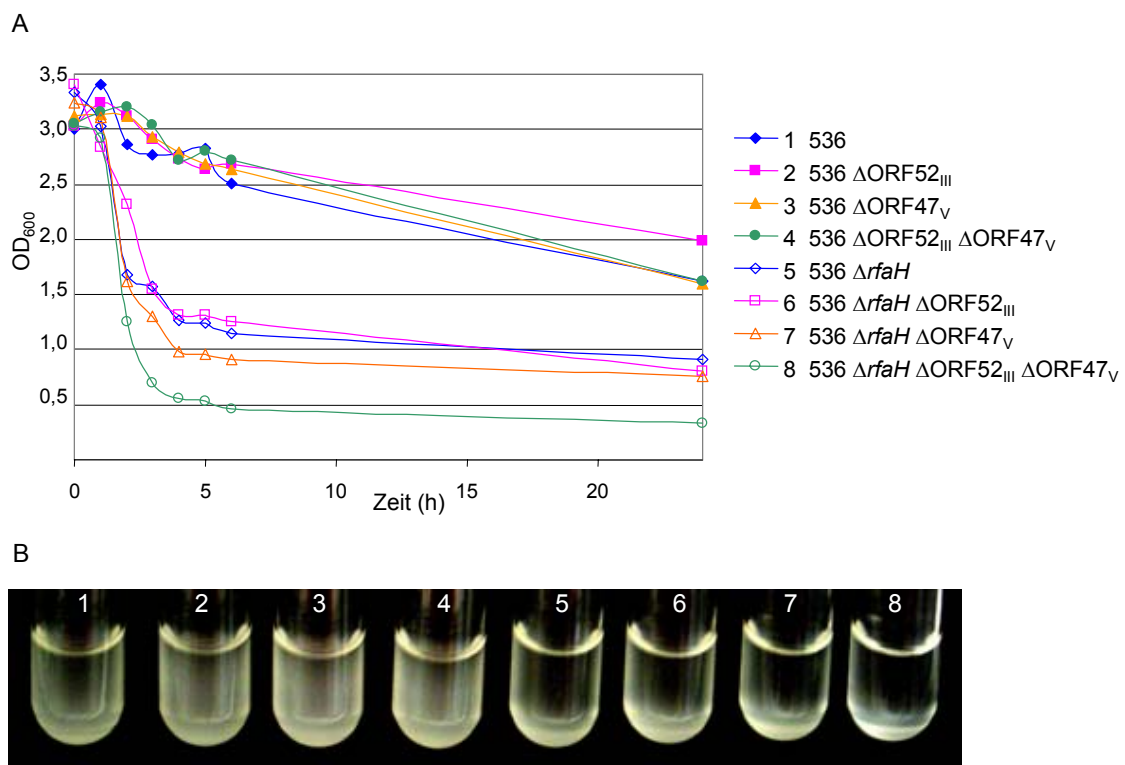


Abb. 38: Autoaggregationsassay der verschiedenen *agn43*- und *rfaH*-Mutanten des Stammes *E. coli* 536. A) Bestimmung der OD₆₀₀ der Kulturflüssigkeit innerhalb des obersten Zentimeters unterhalb der Flüssigkeitsoberfläche. B) Autoaggregationsverhalten der Kulturen nach 24 Stunden bei Raumtemperatur ohne Erschütterung. Die Nummerierung entspricht der unter A angegebenen.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Deletion von ORF52_{III} und ORF47_V keinen signifikanten Einfluss auf das Autoaggregationsverhalten des *E. coli* Stammes 536 hatte. Auch die ORF52_{III} ORF47_V-Doppelmutante verhielt sich hinsichtlich der Autoaggregation wie der Wildtyp. Demgegenüber wies die *rfaH*-Mutante eine starke Autoaggregation auf. Die Deletion von ORF52_{III} und ORF47_V hatte weiterhin keinen Einfluss auf das Autoaggregationsverhalten der *rfaH*-Mutante. Nur die Dreifachmutante (536 $\Delta rfaH \Delta ORF52_{III} \Delta ORF47_V$) wies eine etwas stärkeren Autoaggregation auf. In Abbildung 38B wird deutlich das Absinken der Bakterien und Aufklaren des Überstandes in den *rfaH*-Mutanten sichtbar. Es bildet sich ein Bodensatz aus aggregierten Bakterien. Diese Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass, im Gegensatz zum *E. coli* K-12 Stamm MG1655, die beiden Antigen 43 Orthologe ORF52_{III} und ORF47_V keine Rolle bei der Autoaggregation spielen.

Zusammenfassung Abschnitt 5

- Um die Autoaggregation des uropathogenen *E. coli* Stammes 536 zu untersuchen wurde in diesem Stammhintergrund eine *rfaH*-Deletionsmutante konstruiert.
- Darauf aufbauend wurden in der *rfaH*-Mutante und im Wildtyp Einzel- und Doppelmutanten der beiden Antigen 43 Varianten ORF52_{III} und ORF47_V konstruiert.
- Es konnte eine verstärkte Autoaggregation im *rfaH*-negativen Stammhintergrund nachgewiesen werden. Gleichzeitig war kein Einfluss der beiden Antigen 43 Varianten des Stammes 536 auf die verstärkte Autoaggregation der *rfaH*-Deletionsmutante feststellbar.

VI. Diskussion

1. RpoS und ClpXP als zentrale Faktoren für die Regulation der Genexpression bei *Escherichia coli*

Bakterien müssen sehr schnell auf sich verändernde Umweltbedingungen reagieren und sich anpassen können, um zu überleben. Diese veränderten Umweltbedingungen können z.B. durch UV-Strahlung, Hitzeschock, niedrige Temperaturen, oxidativen Stress, niedrigen pH, Ethanol oder durch Eintritt in die stationäre Phase ausgelöst werden (Hengge-Aronis, 2002b; Jenal und Hengge-Aronis, 2003). Unter diesen Umständen wird RpoS (σ^S oder σ^{38}), eine Sigma-Untereinheit der RNA-Polymerase in *E. coli* induziert. Sie ersetzt unter vielen Stressbedingungen den vegetativen Sigmafaktor RpoD (σ^{70}), wodurch die Transkription vieler RpoS-abhängiger Gene verstärkt wird. RpoS wird mittlerweile als Hauptregulator der generellen Stressantwort angesehen, da er die Expression von über 80 Genen kontrolliert, die benötigt werden um die Zelle vor verschiedenen Stressfaktoren zu schützen (Weber *et al.*, 2005).

Unter Stressbedingungen kann die intrazelluläre Konzentration an RpoS sehr schnell ansteigen. Dieser Anstieg kann entweder durch Stimulation der Transkription und Translation oder aber durch Inhibierung der Proteolyse von RpoS erreicht werden. Während RpoS in der logarithmischen Phase nur schwach exprimiert und innerhalb kürzester Zeit (2-4 min) durch ClpXP abgebaut wird, hat es in der stationären Phase Halbwertszeiten von bis zu über 30 min (Hengge-Aronis, 2002b). Das Eindringen der Bakterien in den Wirtsorganismus stellt auch einen Stressfaktor dar, der die RpoS-abhängige Expression vieler Virulenzfaktoren auslösen kann (Hengge-Aronis, 2002b).

Die Proteolyse von RpoS erfolgt ausschließlich durch die ATP-abhängige Protease ClpXP unter Mithilfe von RssB als Adapterprotein (siehe II. 2.4.). Durch diesen geregelten Abbau wird die regulatorische Wirkung von RpoS auf posttranslationaler Ebene gesteuert. Wird die Proteolyse durch Deletion von *clpX/P* unterbunden, akkumuliert RpoS, wobei es zum Verlust der regulatorischen Wirkung kommen kann. Da RpoS die Expression von 10 % des

Genoms von *E. coli* beeinflusst, ist es offensichtlich, dass die Deletion von *clpX/P* Einfluss auf die Expression vieler Gene und Virulenzdeterminanten nimmt.

2. Einfluss von ClpXP und RpoS auf das Proteom von *E. coli* 536

Bei den durchgeführten Proteomstudien von *E. coli* 536 und seinen *clpX*- und *clpP*-negativen Mutanten wurde der Einfluss der Protease ClpXP auf die Expression von Proteinen der logarithmischen und stationären Wachstumsphase untersucht.

Für einige der zytoplasmatischen Proteine der logarithmischen und stationären Phase, die eine veränderte Expression in den Mutantenstämmen aufwiesen, konnte ein direkter Zusammenhang zum Fehlen von ClpXP aufgezeigt werden (Flynn *et al.*, 2003). Für KatE, RpoS, DksA, OmpA, RibB, Dps und TnaA konnte bereits der spezifische Abbau durch ClpXP nachgewiesen werden, wobei OmpA und TnaA auch gleichzeitig durch ClpAP abgebaut werden können (Flynn *et al.*, 2003). Die Untersuchungen von Flynn und Mitarbeitern konnten die Proteine als Substrate für ClpXP nachweisen. Zusätzlich besteht aber die Möglichkeit, dass weitere Proteasen für den Abbau dieser Proteine zur Verfügung stehen. Im Gegensatz zu anderen identifizierten zytoplasmatischen Proteinen, die eine abweichende Expression aufwiesen, ist OmpA normalerweise in der äußeren Membran lokalisiert. Hier wird vermutet, dass eine Überlastung des Sec-abhängigen Sekretionsweges zur Ansammlung von OmpA im Zytoplasma führt und ClpXP durch den Abbau dieser fehlgefalteten Proteine zur Qualitätskontrolle beiträgt (Flynn *et al.*, 2003).

Zusätzlich zu den Unterschieden, die aufgrund der fehlenden spezifischen Proteolyse durch ClpXP auftraten, ist für einige der identifizierten Proteine eine Abhängigkeit von RpoS in der Literatur beschrieben. So kann es durch die Akkumulation von RpoS in den ClpXP-Mutantenstämmen zu einer verstärkten Induktion RpoS-abhängiger Proteine kommen. Dies könnte für 11 Proteine, die unterschiedliche Expressionsmuster im Wildtyp und den Mutanten aufwiesen, zutreffen, da für diese schon früher eine RpoS-Abhängigkeit beschrieben wurde (Ishihama, 2000; Lacour und Landini, 2004; Patten *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2005). Die Proteine, die in den verschiedenen Wachstumsphasen unterschiedliche Expressionsmuster in Abhängigkeit von RpoS und ClpXP aufwiesen, sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Tab. 17: Zytoplasmatische Proteine des *E. coli* Stammes 536 mit RpoS- oder ClpXP-abhängigem Expressionsmuster.

Protein	ClpXP Substrat	RpoS- abhängig	kein Einfluss	log. Phase	stationäre Phase
RpoS	×	×		×	×
TnaA	×	×		×	×
Kat E	×	×			×
DksA	×	×			×
OmpA	×	×			×
RibB	×	×			×
Dps	×	×		×	
AdhP		×			×
PoxB		×		×	
WrbA		×		×	
YcaC		×		×	
TalA		×		×	×
CsiD		×			×
SufC		×			×
OtsA		×			×
YciF		×			×
YhbO		×			×
Mdh		×			×
TrmE			×		×
AdhE			×		×
ORF22 _I			×		×
YciE			×		×
OppA			×	×	×
HisC			×		×
HisD			×		×
Ag43 _{III}			×	×	×
Spot 51			×	×	×
Spot 53			×	×	×
Spot 55			×		×
YahK			×	×	
YhaP			×	×	

Wie aus dieser Tabelle zu ersehen ist, sind alle Proteine, die als Substrate von ClpXP identifiziert wurden, auch durch RpoS beeinflusst. Da RpoS selbst Substrat für ClpXP ist (Hengge-Aronis, 2002a), kann man davon ausgehen, dass viele der beobachteten Effekte durch den Verlust der regulatorischen Wirkung von RpoS zustande kommen. Die Proteine, für welche bislang kein Einfluss von ClpXP oder RpoS beschrieben ist, konnten teilweise

nicht identifiziert werden, haben unbekannte Funktionen, sind noch nicht näher charakterisiert oder aber *E. coli* 536-spezifisch.

Bei den Proteomstudien hat sich weiterhin gezeigt, dass in den Mutantenstämmen meist eine höhere Proteinmenge der von ClpXP oder RpoS beeinflussten Gene vorlag. Dies kann auf den reduzierten oder nicht erfolgten Abbau der Proteine zurückgeführt werden. Im Gegensatz dazu konnte in den Mutantenstämmen eine verminderte Proteinmenge der Tryptophanase TnaA beobachtet werden. Diese baut mit Eintritt in die stationäre Phase Tryptophan zu Indol, Pyruvat und Ammoniak ab, wobei der Abbau durch RpoS verstärkt wird (Lacour und Landini, 2004). Ein Verlust der regulatorischen Wirkung von RpoS in den ClpXP-negativen Stämmen könnte diese verstärkende Wirkung verhindern, was zu einer verminderten Menge an Tryptophanase führen kann (Patten *et al.*, 2004).

Es darf nicht außer Acht gelassen werden, dass RpoS, neben dem direkten Einfluss auf bestimmte Gene, auch die Transkription von Repressoren oder anderen globalen Regulatoren verstärken und beeinflussen kann, wodurch weitere, sekundäre Effekte zustande kommen können.

Der Vergleich der *clpX*- und *clpP*-negativen Mutanten untereinander ergab ein unterschiedliches Expressionsmuster für drei Proteinspots, welche in der *clpP*-Mutante fehlten (siehe Abb. 15). Ein Proteinspot konnte als Dps identifiziert werden, ein DNA-bindendes Protein, welches regulatorische Funktionen unter Stress und Nährstoffmangel aufweist. Die zwei anderen Proteine wurden nicht identifiziert. Für alle drei Proteine kann man neben ClpXP eine gleichzeitige Degradation durch ClpAP vermuten, da die Proteine in den *clpX*-negativen Stämmen nicht vorhanden waren, in den *clpP*-negativen Stämmen aber akkumuliert vorlagen.

3. Einfluss von RpoS und Crl auf die Expression von Curli und Cellulose

Viele *E. coli* und *Salmonella* Stämme sind in der Lage, Curli-Fimbrien und Cellulose zu exprimieren (Bian *et al.*, 2000; Römling *et al.*, 2003). Die Coexpression der zwei Komponenten der extrazellulären Matrix, auch als rdar Morphotyp bezeichnet, ist eng verknüpft mit der Fähigkeit zur Biofilmbildung und anderem multizellulären Verhalten (Römling *et al.*, 1998; Solano *et al.*, 2002).

Während dieser Untersuchungen konnte eine stark verzögerte Ausbildung des *rdar* Morphotyps bei den *clpX*- und *clpP*-Deletionsmutanten auf Kongorot-Agarplatten beobachtet werden (siehe Abb. 25), die durch Komplementation mit den entsprechenden Genen wieder aufgehoben werden konnte. Diese Ergebnisse konnten auf Transkriptionsebene durch Real-Time PCR-Experimente mit dem Gen, das für die Strukturuntereinheit der Curli-Fimbrien kodiert, *csgA*, bestätigt werden (siehe Abb. 32), da hier in den *clpX*- und *clpP*-Deletionsmutanten eine deutlich verringerte Transkriptmenge im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden konnte.

Die Transkription der Curligene *csgBA* in der stationären Phase ist RpoS-abhängig und wird zudem durch das kleine Regulatorprotein Crl positiv verstärkt (Bougdour *et al.*, 2004; Olsen *et al.*, 1993; Pratt und Silhavy, 1998). Es konnte eine direkte Bindung von Crl an RpoS nachgewiesen werden, wodurch die Bindung an den Promotor von *csgBA* vermittelt wird (Bougdour *et al.*, 2004). Die Expression von Crl erfolgt verstärkt beim Übergang von der logarithmischen zur stationären Phase. Das Protein Crl akkumuliert bei niedrigen Temperaturen, nicht aber bei 37 °C, in der stationären Phase, wo es das gesamte RpoS-Regulon beeinflusst (Bougdour *et al.*, 2004; Pratt und Silhavy, 1998). Neben dieser direkten Abhängigkeit der Curli Expression von Crl und RpoS stellt Crl zudem ein Substrat für den Abbau durch ClpXP dar (Flynn *et al.*, 2003). So kann es in der stationären Phase zum Verlust der positiven regulatorischen Wirkung von Crl auf die Curli Expression kommen, wodurch die stark verzögerte Expression in den *clpX*- und *clpP*-negativen Stämmen zu erklären wäre.

4. Regulatorische Wirkung von ClpXP und RpoS auf die Flagellenexpression

Die Synthese der Flagelle von *E. coli* erfordert die Expression von mehr als 50 Genen, welche in 15 Operons zusammengefasst und streng hierarchisch in einer Flagellen-Regulationskaskade gegliedert sind (Komeda, 1986; Macnab, 1992; Soutourina und Bertin, 2003).

Die Regulation der Genexpression erfolgt auf mehreren Ebenen, wobei die Operons in drei Klassen unterteilt sind (Abb. 39): die Gene der Klasse 1 werden von dem „master operon“ *flhC/flhD* gebildet, welches für den Transkriptionsaktivator FlhD₂C₂ kodiert. Die Gene des

Klasse 2 Operons kodieren für Proteine, welche für die Biosynthese des Basalkörpers und des Flagellenexportapparates benötigt werden. Sie kodieren außerdem für zwei regulatorische Proteine, FlgM und FliA (σ^{28}). Das Gen *fliA* kodiert für den alternativen Sigmafaktor σ^{28} , welcher die Transkription der Klasse 3 Gene verstärkt, wohingegen FlgM an σ^{28} bindet und dadurch die Transkription der Klasse 3 Gene verhindert. Diese kodieren für das Flagellin FliC und Proteine, die in den Zusammenbau des Flagellenmotors und der Chemotaxis involviert sind (Komeda, 1986; Soutourina und Bertin, 2003).

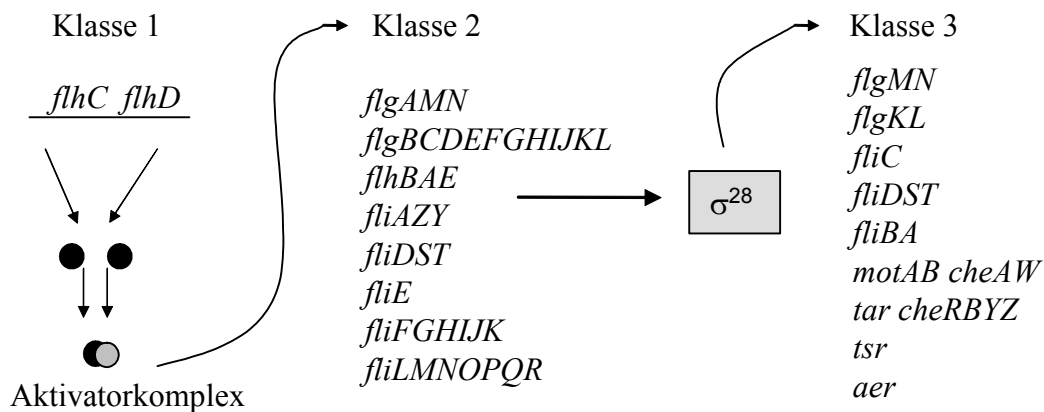


Abb. 39: Schematische Darstellung der an der Flagellenproduktion beteiligten Gene und der zeitliche Ablauf ihrer Expression (aus: Chilcott und Hughes, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zum Einfluss der Protease ClpXP auf die Flagellenexpression und Motilität des Stammes *E. coli* 536 durchgeführt. Es konnte sowohl eine erhöhte Motilität der *clpX*- und *clpP*-negativen Stämme auf Schwärmagarplatten als auch eine erhöhte Flagellenexpression durch Western Blot-Analysen nachgewiesen werden (siehe Abb. 27 und 28). In beiden Fällen konnte der wildtypische Phänotyp durch Komplementation der Gene in die *attB_λ* wieder rückgängig gemacht werden.

Bei den Proteomstudien konnte eine erhöhte Menge an FliC im Überstand der Mutantensämme nachgewiesen werden. Der Unterschied war umso deutlicher, je länger sich die Kulturen in der stationären Wachstumsphase befanden (siehe Abb. 20).

Bei den durchgeführten Transkriptionsanalysen von *fliA*, *fliC* und *flhC* an Kolonien, welche bei 30 °C über Nacht auf LB-Agarplatten gewachsen waren, konnte gezeigt werden, dass die Transkriptmengen von *fliA* und *fliC* in den *clpX*- und *clpP*-negativen Stämmen im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht waren. Die Transkription des „master regulator“ *flhC* wies demgegenüber keine signifikante Änderung auf (siehe Abb. 35). Bei Untersuchungen,

welche mit Proben aus Flüssigkulturen der frühen logarithmischen Wachstumsphase durchgeführt wurden, konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression nachgewiesen werden.

Ähnlich wie für *E. coli*, ist die Flagellenexpression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium von dem „master regulator“ FlhDC abhängig. Hier konnte in ClpXP negativen Stämmen eine verstärkte Transkription von Genen der Klasse 2 und 3 aber eine nahezu konstante Transkriptmenge von *flhD/C* nachgewiesen werden, wobei FlhD und FlhC in den Mutantenstämmen akkumuliert wurde (Tomoyasu *et al.*, 2002). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass andere ATP-abhängige Proteasen keinen Einfluss auf die Degradation von FlhDC haben. Daraus wurde geschlossen, dass in *S. enterica* die Konzentration des Flagellenregulators FlhDC in der Zelle auf posttranslationaler Ebene spezifisch durch ClpXP reguliert wird, und somit der ClpXP-Komplex auf posttranslationaler Ebene als Suppressor der Flagellenexpression wirkt (Tomoyasu *et al.*, 2003).

Dieser Regulationsmechanismus könnte auch für den uropathogenen *E. coli* Stamm 536 vorliegen, da die Flagellenregulation von *E. coli* und *S. enterica* sehr ähnlich ist (Chilcott und Hughes, 2000). Auch konnte in der vorliegenden Arbeit der „hyperflagellierte“ Phänotyp, wie er für *S. enterica* beschrieben wurde (Tomoyasu *et al.*, 2002), anhand von transmissionselektronenmikroskopischen Bildern nachgewiesen werden.

Für den apathogenen *E. coli* K-12 Stamm MG1655 konnte zudem in Mikroarray-Analysen ein negativer Einfluss von RpoS auf fast alle Gene des Flagellenregulons nachgewiesen werden (Patten *et al.*, 2004). Während die Anzahl der Flagellen im Wildtypstamm mit zunehmender Zelldichte zu und in der späten stationären Phase wieder abnahm (Makinoshima *et al.*, 2003), konnte in RpoS-negativen Zellen keine Abnahme der Flagellen nachgewiesen werden (Patten *et al.*, 2004).

Dies lässt auf einen direkten, negativen Einfluss von RpoS auf den „master regulator“ FlhDC der Flagellen-Regulationskaskade schließen, welcher in der späten Wachstumsphase für ein Abschalten der Flagellenexpression sorgt. Die fehlende Regulation und der Abbau von RpoS in den ClpXP-negativen Stämmen kann somit zu einer verstärkten Flagellenexpression führen, während sie im Wildtyp reduziert wird. Damit kann auch der fehlende Unterschied bei den Transkriptionsanalysen aus der frühen logarithmischen Phase erklärt werden, da die regulatorische Wirkung von RpoS erst in der stationären Phase voll zum Tragen kommt.

5. Regulatorische Wirkung von ClpXP, RpoS und Lrp auf die Expression von Adhäsinen

5.1. Regulationsmechanismen bekannter Fimbriendeterminanten

Die Expression von Fimbrien erfolgt durch unterschiedliche Mechanismen und ist von weiteren äußeren Faktoren sowie durch das Zusammenwirken verschiedener Regulatoren koordiniert.

Bei der Regulation der P-Fimbrienexpression durch Phasenvariation spielt das globale Regulatorprotein Lrp (leucine-responsive regulatory protein) sowie die Dam (deoxyadenosine methylase)-Methylase eine Rolle. Der Wechsel („Phasenvariation“) zwischen fimbrierter („ON“) und nicht-fimbrierter („OFF“) Phase erfolgt durch differentielle Methylierung zweier GATC-Stellen (GATC-I und GATC-II) durch die Dam-Methylase, wobei noch zwei weitere lokale Regulatoren (PapI und PapB) benötigt werden. Lrp kann an beide GATC-Regionen binden und dadurch die Methylierung dieser Stellen durch die Dam-Methylase verhindern. Bindet Lrp an die GATC-II-Region, welche mit dem Promotor pBA überlappt, kommt es zur Inhibierung der *pap*-Transkription. Das Aktivatorprotein PapI, welches nach Aktivierung durch den Crp-cAMP-Komplex gebildet wird, bindet Lrp und erhöht dessen Affinität für hemimethyliertes GATC-I. Die freie GATC-II-Region kann dann durch die Dam-Methylase methyliert werden, wodurch eine erneute Bindung von Lrp verhindert und die Transkription der Fimbriengene ermöglicht wird. Lrp und Dam-Methylase konkurrieren um die Bindung an GATC-I, dessen Methylierungsgrad für die Beibehaltung des „OFF“ Zustandes wichtig ist (van der Woude und Bäuml, 2004). Für die Phasenregulation der S-Fimbrien liegt ein ähnlicher Mechanismus vor, welcher auch auf dem Zusammenspiel der Regulatoren Lrp und Dam-Methylase beruht (van der Woude und Low, 1994).

Auch Typ 1-Fimbrien unterliegen der Phasenvariation, obwohl hier die Expression durch die Orientierung eines 314 bp großen invertierbaren Elementes (*fim* switch) reguliert wird, welches den Promotor für die Strukturuntereinheiten enthält und von „inverted repeats“ flankiert wird. Die Inversion des DNA-Stückes erfolgt durch die Rekombinasen FimB und FimE, deren Gene vor dem *fim*-Operon liegen und von ihren eigenen Promotoren abgelesen werden. FimE bewirkt den Wechsel zum nicht-fimbrierten Zustand, wobei FimB die Rekombination in beide Zustände katalysiert (van der Woude und Bäuml, 2004). Als

Angriffspunkt dienen beiden Rekombinasen die „inverted repeats“ an den Seiten des invertierbaren Elementes. Die Expression der Typ 1-Fimbrien ist also abhängig von der Expression der *fimB* und *fimE* Gene, die von weiteren Umweltsignalen kontrolliert werden.

Mit dem Autotransporter Antigen 43 unterliegt ein weiteres Oberflächenprotein von *E. coli* 536 der Phasenvariation. Es kommt in zwei Varianten, deren Gene auf verschiedenen Pathogenitätsinseln liegen, vor und wird durch die Dam-Methylase positiv und durch den Regulator OxyR negativ reguliert, wobei hier im Gegensatz zu den P-Fimbrien drei und nicht zwei Methylierungsstellen bei der Regulation beteiligt sind (Haagmans und van der Woude, 2000; Hasman *et al.*, 1999; Henderson und Owen, 1999).

5.2. Die zentrale Rolle von Lrp bei der Fimbrienexpression des *E. coli* Stammes 536

Während dieser Untersuchung hat sich gezeigt, dass ClpXP Einfluss auf den globalen Regulator Lrp nimmt, welcher eine zentrale Rolle v.a. beim Übergang von der logarithmischen zur stationären Wachstumsphase spielt (Tani *et al.*, 2002). Zudem reguliert Lrp die Expression verschiedener Fimbrientypen auf unterschiedliche Weise. Während die Expression von P- und S-Fimbrien durch Lrp aktiviert wird (Calvo und Matthews, 1994), ist eine hemmende Wirkung auf die Phasenvariation von Typ 1-Fimbrien bekannt. Hier konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von Lrp zwar nicht die Menge an FimB und FimE ändert, die Phasenvariation aber um das 100-fache reduziert wird (Blomfield *et al.*, 1993; Gally *et al.*, 1994). Lrp ist ein DNA-biegendes Protein, und somit wird durch die topologische Veränderung der DNA die Expression der Typ 1-Fimbrien beeinflusst (Blomfield *et al.*, 1993; van der Woude und Bäumlner, 2004). Zusätzlich wirkt der alternative Sigmafaktor RpoS negativ auf die Expression von Typ 1-Fimbrien (Dove *et al.*, 1997; Patten *et al.*, 2004).

Diese Zusammenhänge deuten auf eine gestörte Regulation der Fimbrienexpression in den ClpXP-negativen Mutanten des *E. coli* Stammes 536 hin, welche auf dem Verlust der regulatorischen Wirkung von Lrp und RpoS beruhen. Diese Hinweise stehen im Einklang mit den Ergebnissen dieser Untersuchung, bei der in *clpX*- und *clpP*-negativen Stämmen eine reduzierte Expression von *prfA* und *sfaA*, den Genen für die Hauptstrukturuntereinheiten der Prf- und S-Fimbrien nachgewiesen werden konnte. Gleichzeitig war eine stark erhöhte

Transkription von *fimA*, dem Gen für die Hauptstrukturuntereinheit der Typ 1-Fimbrien in den Mutantenstämmen zu beobachten (siehe Abb. 32).

Weitere Hinweise auf einen gestörten, Lrp-abhängigen Regulationsmechanismus ergeben sich aus der Transkriptanalyse eines weiteren Fimbriengenclusters. Für Pix- (pilus involved in *E. coli* X2194 adhesion) Fimbrien, welche von Genen der PAI V₅₃₆ kodiert werden, konnte bislang keine Expression nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu einer früheren Publikation (Schneider *et al.*, 2004), in der das *pix*-Fimbriengencluster als unter Standard-Laborbedingungen nicht exprimiert beschrieben wurde, konnte in dieser Untersuchung eine Transkription der Hauptstrukturuntereinheit *pixA* nachgewiesen werden. Es war das einzige der untersuchten Fimbriengencluster, das weder auf Protein- noch auf Transkriptebene Unterschiede in den ClpXP-negativen Stämmen im Vergleich zum Wildtyp aufwies. Pix-Fimbrien haben eine hohe genetische und strukturelle Ähnlichkeit zu P-Fimbrien. Es konnte allerdings kein dem PapI entsprechender Regulator nachgewiesen werden, welcher die Affinität von PapI an GATC-Stellen für Lrp und somit die Fimbrienexpression erhöhen könnte (Lügering *et al.*, 2003). Zusätzlich konnten keine GATC-Stellen gefunden werden, welche für die DNA-Methylierung durch die Dam-Methylase erforderlich sind (Lügering *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse lassen auf eine Lrp- und Dam-unabhängige Regulation des *pix*-Operons schließen.

Für die putative CS12-ähnliche Fimbriendeterminante, welche auf PAI I₅₃₆ lokalisiert ist, konnte ebenfalls bislang noch keine Expression nachgewiesen werden. Das Gencluster weist eine hohe Homologie zu dem CS12-Fimbriengencluster von enterotoxischen *E. coli* Isolaten (ETEC) auf, wo es als CS12 (coli surface antigen) zu den Kolonisierungsfaktoren gezählt wird (Pichel *et al.*, 2000). Für die Hauptstrukturuntereinheit der CS12-ähnlichen Fimbrien, welche durch ORF36_I kodiert wird, konnte eine deutlich erhöhte Transkriptmenge in den *clpX*- und *clpP*-negativen Mutanten von *E. coli* 536 nachgewiesen werden. Demgegenüber war auf Proteinebene nur eine verminderte Menge der Hauptstrukturuntereinheit in den Kulturüberständen der Mutanten vorhanden. Bislang konnte keine Homologie von CS12-Fimbrien zu anderen Fimbrientypen nachgewiesen werden (Gaastra und Svennerholm, 1996), weshalb man bei diesem Fimbrientyp über eine RpoS- oder Lrp-abhängige Regulation nur spekulieren kann. Allerdings konnte für CS31A-Fimbrien, kodiert durch das *clp*-Operon, eine negative Regulation durch Lrp nachgewiesen werden (Berthiaume *et al.*, 2004; Martin, 1996). Dieser Fimbrientyp gehört zur Familie der P-Fimbrien und unterliegt

der Phasenvariation, wobei die Regulation durch Lrp genau umgekehrt ist. So könnte auch für die CS12-ähnlichen Fimbrien des *E. coli* Stammes 536 ein negativer Einfluss von Lrp auf die Fimbrienexpression möglich sein.

Auf Proteinebene konnten allerdings keine abweichenden Expressionsmuster in den ClpXP-negativen Stämmen hinsichtlich des Regulatorproteins Lrp und der Dam-Methylase festgestellt werden. Dies macht einen direkten Einfluss von ClpXP auf Lrp unwahrscheinlich, da sonst eine Anreicherung durch unterbundene Proteolyse oder aber ein Mangel an Lrp sichtbar wäre. Andererseits könnte es sein, dass aufgrund der gewählten Bedingungen bei der Versuchsdurchführung Änderungen in der Expression nicht dargestellt werden konnten, z.B. aufgrund der gewählten Temperatur, den Wachstumsbedingungen oder dem Zeitpunkt der Probenentnahme. Andererseits wäre auch eine Überlagerung der Proteinspots durch Proteine mit gleichem Molekulargewicht und isoelektrischen Punkt möglich.

Es ist eher zu vermuten, dass sich die zwei globalen Regulatoren Lrp und RpoS gegenseitig beeinflussen. Für Lrp wurde bereits beschrieben, dass es die Selektivität von RpoS für bestimmte Promotoren erhöhen kann (Weber *et al.*, 2005). Ähnlich wie für RpoS ist für Lrp eine Beeinflussung von 10 % des Genoms von *E. coli* K-12 in der stationären Phase bekannt, wobei die Beeinflussung auch hier positiver als auch negativer Art sein kann (Tani *et al.*, 2002). Diese Beeinflussung einer großen Anzahl von Genen und Operons, sowohl von RpoS als auch von Lrp, machen es wahrscheinlich, dass beide Regulatoren, direkt oder indirekt, Einfluss aufeinander nehmen.

5.3. Kreuzregulation von Fimbriendeterminanten

Bakterien sind in der Lage, mehrere verschiedene Fimbriendeterminanten zu exprimieren. So weist der uropathogene Stamm *E. coli* 536 acht bislang näher beschriebene unterschiedliche Adhäsion-kodierende Gene oder Gencluster auf. Es ist bekannt, dass ein Fimbrientyp die Expression eines anderen beeinflussen kann, was als „cross-talk“ bezeichnet wird. So ist für *E. coli* 536 eine positive Beeinflussung der S-Fimbrien (PAI III₅₃₆) durch Prf-Fimbrien (PAI II₅₃₆) bekannt. Dies ist auf die hohe Homologie der Regulatoren PrfI und PrfB zu den entsprechenden Regulatoren SfaB und SfaC des S-Fimbriengencluster zurückzuführen, wobei die Hauptstrukturuntereinheiten PrfA und SfaA eine geringere Homologie aufweisen (Schmoll *et al.*, 1990). Die Deletion des Prf-Fimbriengenclusters führte hier zu einer Reduktion der S-Fimbrienexpression, wobei die Deletion der Regulatoren SfaC und SfaB

durch Komplementation mit den Regulatoren PrfI und PrfB den Effekt wieder rückgängig machen konnten (Morschhäuser *et al.*, 1994).

Neben der positiven kann auch eine negative Kreuzregulation vorherrschen. Dies ist für die Expression von Typ 1-Fimbrien beschrieben. Hier wirken die Regulatoren PapB und SfaB der P- und S-Fimbriendeterminanten auf die Rekombinase FimB, wodurch das Umschalten des „*fim* switch“ der Typ 1-Fimbriendeterminante in den „ON“ Zustand unterbunden wird (Holden *et al.*, 2001; van der Woude und Bäumler, 2004; Xia *et al.*, 2000). Das heißt, wenn P- und S-Fimbrien im „ON“ Zustand sind, verhindern SfaB und PapB die Expression der Typ 1-Fimbrien. Gleichzeitig konnte nachgewiesen werden, dass PapB die Expression von FimE verstärkt, was für das Abschalten der Typ 1-Fimbrienexpression verantwortlich ist (Xia *et al.*, 2000).

In den durchgeführten Proteomstudien der Proteine aus den Kulturüberständen konnte eine deutlich größere Menge der Hauptstrukturuntereinheiten PrfA und SfaA als FimA auf den wildtypischen Gelen nachgewiesen werden, was auf die oben beschriebene, negative Kreuzregulation zurückzuführen sein könnte (siehe Abb. 19). Gleichzeitig konnte auf den 2-D Gelen der ClpXP-negativen Mutanten eine deutliche Reduktion an PrfA und SfaA beobachtet werden, wohingegen die Unterschiede für FimA weniger auffällig waren. Dieses könnte man auf die fehlende negative Kreuzregulation von Prf- und S-Fimbrien aufgrund deren verringerten Expression auf Typ 1-Fimbrien zurückführen. Auch könnte der fehlende positive Einfluss von PrfB und PrfI auf die S-Fimbrienexpression in den ClpXP-negativen Stämmen zu einer stärkeren Reduktion, verglichen mit der von Typ 1-Fimbrien, führen.

Gleichzeitig könnte damit die deutlich erhöhte Transkriptmenge bei den Real-Time PCR-Analysen von *fimA* in den *clpX*- und *clpP*-negativen Stämmen erklärt werden (siehe Abb. 32). Durch die fehlende Kreuzregulation durch PrfB und PrfI könnten wieder mehr Zellen in den „ON“ Zustand der Fimbrienexpression wechseln, wodurch die schon durch mangelnde RpoS-Regulation verstärkte Typ 1-Expression noch zusätzlich unterstützt werden würde.

Die verminderte Expression von Typ 1- und CS12-ähnlichen Fimbrien auf der Zelloberfläche, trotz verstärkter Transkription, kann auf Degradation der Fimbrienuntereinheiten im Periplasma zurückzuführen sein. Die erhöhte Sekretionsfähigkeit der Mutantenstämme auf-

grund fehlender Degradation von SecA (siehe Abb. 22) könnte zu einer Anhäufung der Untereinheiten von Typ 1- und CS12-ähnlichen Fimbrien im Periplasma führen. Auf diese Stresssituation reagiert das Zweikomponenten-System CpxA/CpxR, welches die Proteasen DegP/HtrA, die Disulfid-Isomerase DsbA und die Peptidyl-prolyl-Isomerasen PpiA und PpiD aktiviert, wodurch diese Untereinheiten neu gefaltet oder aber abgebaut werden (Danese und Silhavy, 1997; Danese *et al.*, 1995; Dartigalongue und Raina, 1998; Pogliano *et al.*, 1997). Der Einfluss von CpxA/R und DegP auf den Aufbau und die Biogenese von P-Fimbrien ist bereits bekannt (Hung *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 1997). Somit könnte diese Art von Einfluss auch für andere Fimbriotypen vorstellbar sein.

Auch für das Oberflächenprotein Antigen 43 ist eine Kreuzregulation mit Typ 1-Fimbrien bekannt. Früher hat man angenommen, dass die Expression von Antigen 43 und Typ 1-Fimbrien ausschließlich ist, da Typ 1-Fimbrien die Autoaggregation durch Ag43 blockiert (Hasman *et al.*, 1999). Dies ist allerdings nur ein räumliches Problem, da durch die Expression der längeren Typ 1-Fimbrien die kürzeren Antigen 43 Proteine nicht miteinander in Kontakt treten können. Es wurde aber später für *E. coli* K-12 nachgewiesen, dass in *fim*-negativen Zellen die Menge an Ag43-kodierender *flu* mRNA 20-fach erhöht war und umgekehrt die Transkription von *flu* durch Überexpression von Typ 1-Fimbrien reduziert wurde (Schembri und Klemm, 2001). Auch wird eine durch P-Fimbrien verminderte *agn43*-Expression beschrieben (Schembri *et al.*, 2004), wobei diese Art der Regulation hier nicht beobachtet werden konnte.

Antigen 43 war das einzige Adhäsın, das schon auf zytoplasmatischen 2-D Gelen Unterschiede in der Expression aufwies. Dies mag in der Tatsache begründet liegen, dass Antigen 43 mit einer Stückzahl von bis zu 50000 auf der Zelloberfläche vorhanden ist. Demgegenüber treten Fimbrien, z.B. Typ 1-Fimbrien nur mit 200 - 500 Stück auf (Schembri *et al.*, 2004). Durch diese große Anzahl ist es wahrscheinlicher, dieses Protein überhaupt zu detektieren und so einen Unterschied in der Expression von Ag43 festzustellen.

Die Deletion von *clpP* hatte im Vergleich zu *clpX* einen größeren Einfluss auf die Expression von Ag43, v.a. auf 2-D Gelen, welche von Proteinen der Kulturüberstände angefertigt wurden. Dies lässt darauf schließen, dass Ag43 neben ClpXP auch durch ClpAP abgebaut werden kann. Bei der Spotidentifikation mittels MALDI-TOF-MS und anschließendem Vergleich mit den *E. coli* 536-spezifischen Sequenzen konnte nur das Ortholog der PAI III₅₃₆

identifiziert werden, wobei das Ortholog der PAI V₅₃₆ auch nicht mit niedrigerem Score in Erscheinung trat.

Die anschließenden Real-Time PCR-Analysen haben gezeigt, dass beide Orthologe in den Mutantenstämmen vermindert exprimiert werden, wobei auch hier der Effekt aufgrund der Deletion von *clpP* stärker auftrat (siehe Abb. 34). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass ClpXP gleichermaßen Einfluss auf die Transkription der zwei *agn43* Orthologe nimmt, gleichzeitig aber eine unterschiedliche Regulation auf posttranskriptionaler oder posttranslationaler Ebene stattfindet. Ein weiterer Hinweis auf eine unterschiedliche Regulation dieser zwei Orthologe ist der Nachweis, dass die Deletion des Transkriptionsantiterminators RfaH unterschiedlichen Einfluss auf die Transkriptmenge der beiden *agn43* Orthologe hatte (Beloin *et al.*, 2005).

6. ClpXP und der Einfluss auf die *in vivo*-Virulenz des Stammes *E. coli* 536 im experimentellen Modell einer aufsteigenden Harnwegsinfektion in jungen Mäusen

Im experimentellen Tiermodell einer aufsteigenden Harnwegsinfektion bei drei Tage alten Mäusen konnte kein signifikanter Einfluss von ClpX oder ClpP auf die *in vivo*-Virulenz nachgewiesen werden. Zwar nimmt ClpXP, wie bereits beschrieben, Einfluss auf die Expression verschiedener Virulenzdeterminanten, doch konnte dieser Einfluss allein nicht die Virulenz des *E. coli* Stammes 536 in diesem Tiermodell reduzieren. Dies mag in der Tatsache begründet liegen, dass die Deletion von ClpXP keinen Einfluss auf die Sekretion von α -Hämolysin, der Produktion von Lipopolysacchariden oder der Kapsel hat. Da vor allem das α -Hämolysin im verwendeten Tiermodell der am stärksten wirkende Virulenzfaktor ist, der die Bedeutung vieler anderer Virulenzfaktoren überlagert, hat die reduzierte Expression von Fimbrien und Curli der ClpXP-Mutanten in diesem Modell scheinbar nur eine untergeordnete Funktion (Grozdanov *et al.*, 2002; Schneider *et al.*, 2004). Zudem konnte gezeigt werden, dass auch RpoS keinerlei Einfluss auf die *in vivo*-Virulenz des *E. coli* Stammes 536 in diesem Tiermodell hatte (U. Dobrindt, mündliche Mitteilung).

Demgegenüber konnte durchaus ein Einfluss von ClpXP auf die Virulenz anderer Organismen nachgewiesen werden. So führte die Deletion von *clpP* in *S. typhimurium* in Mäusen sowie in Makrophagen zur verminderten Virulenz (Webb *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*,

2001). Auch in *Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pestis* konnte ein Einfluss auf die Virulenz nachgewiesen werden (Jackson *et al.*, 2004; Pederson *et al.*, 1997).

7. ClpXP und das Sekretionsverhalten des uropathogenen *E. coli* Stammes

536

Die meisten Bakterien sind in der Lage, Proteine in die extrazelluläre Umgebung abzugeben. Meist handelt es sich hierbei um Exoenzyme und Toxine, so dass die Sekretion für pathogene Bakterien eine wichtige Rolle übernimmt. In Gram-negativen Bakterien müssen diese Proteine durch zwei Membranen hindurch transportiert werden. Diese Aufgabe wird von verschiedenen Sekretionssystemen mit unterschiedlichen Funktionen und Aufbau wahrgenommen, wobei allen Systemen die Substratspezifität und die Fähigkeit der Translokation, ohne die Barrierefunktion der Membranen zu beeinträchtigen, gemeinsam ist (Koster *et al.*, 2000). Man kann zwischen Sec-abhängigen Zwei-Stufen-Systemen und Sec-unabhängigen Systemen unterscheiden, bei denen die Sekretion in einem Schritt erfolgt.

Das Typ I- oder ABC-Sekretionssystem vermittelt die Sekretion z.B. des *E. coli* α -Hämolysins HlyA in einem Schritt ohne weitere Komponenten aus dem Periplasma zu benötigen. Während die meisten Sekretionssysteme auch von apathogenen Bakterien verwendet werden, dient das Typ III-Sekretionssystem (TTSS) ausschließlich dem Transport von Virulenzfaktoren wie der Yop (*Yersinia* outer proteins) Proteine von *Yersinia* ssp. (Cornelis, 2000) oder Esp Proteinen von enterohämorrhagischen *E. coli* (Iyoda und Watanabe, 2005). Es wird durch den Kontakt der Bakterien zu den Wirtszellen aktiviert und kann Anti-Wirts-Faktoren direkt in das Zytoplasma übertragen. Ein Typ III-homologes Sekretionssystem wird auch für den Aufbau der Flagellen genutzt (Lee und Schneewind, 2001). Beide Systeme sind Sec-unabhängige Ein-Stufen-Systeme.

Über den „general secretion pathway“ (GSP) oder Typ II-Sekretionssystem werden anteilmäßig die meisten Proteine sekretiert. Es ist ein Sec-abhängiges Zwei-Stufen-System, das in fast allen pathogenen und apathogenen Gram-negativen Bakterien vorkommt, sogar in *E. coli* K-12 Stämmen, für welche eine Sekretion von Proteinen noch unbekannt war (Pugsley *et al.*, 1997). Der Transport durch die innere Membran erfolgt durch die Sec-Translokase und ist ein ATP-abhängiger Prozess, wobei die zu transportierenden Proteine

durch N-terminale Signalpeptide gekennzeichnet sind (Manting und Driessen, 2000; Mori und Ito, 2001; Stathopoulos *et al.*, 2000). Für die anschließende Translokation durch das Periplasma und die äußere Membran werden weitere Proteine benötigt. Ein bekanntes Beispiel für Typ II-Sekretionssysteme katalysiert den Export der α -Amylase Pullulanase von *Klebsiella oxytoca* (Köhler *et al.*, 2004) oder den des Cholera-toxins von *Vibrio cholerae* (Lee und Schneewind, 2001).

Autotransporter oder Typ V-Sekretionssysteme bestehen neben der Signalsequenz aus einer integralen Membrandomäne (β -Domäne) und einer Passengedomäne (α -Domäne), welche an der Zelloberfläche präsentiert wird (Autotransporter). Sie benötigen keine weiteren Proteine für die Translokation. Ein Beispiel hierfür ist das *E. coli* Antigen 43 (Klemm *et al.*, 2004) oder die IgA1 Protease von *Neisserie gonorrhoeae* (Pohlner *et al.*, 1987).

Demgegenüber benötigt der Zusammenbau von Fimbrien über den „chaperon/usher pathway“ weitere periplasmatische Chaperone und Disulfid-Isomerasen, welche die richtige Faltung der Proteine und den Schutz der für den Zusammenbau der Untereinheiten benötigten funktionalen Bereiche bewerkstelligen. Die Untereinheiten werden dann durch die Chaperone, zu dem „Usher“ transportiert, welcher eine Pore in der äußeren Membran bildet, und den Transport nach außen sowie den Zusammenbau der Fimbrie von der Basis her vermittelt. Ein Beispiel hierfür sind die P-, S- und Typ 1-Fimbrien von *E. coli*.

Curli werden über den „nucleation-precipitation pathway“ an der Zelloberfläche exprimiert. Sie bestehen aus dem Nukleatorprotein CsgB und der Hauptstrukturuntereinheit CsgA, welche im Gegensatz zu Fimbrien nicht nur von der Basis sondern gleichzeitig auch von der Spitze her synthetisiert werden können (Bian und Normark, 1997). Typ IV-Sekretionssysteme sind z.B. für die Sekretion des Pertussis-Toxin von *Bordetella pertussis* (Christie und Vogel, 2000) oder bei der Etablierung von *Legionella pneumophila* in Makrophagen (Swanson und Isberg, 1996) verantwortlich, wobei die Sekretion direkt in einem Schritt erfolgt.

Bei der 2-D Analyse des Sekretoms von *E. coli* 536 und seinen *clpX*- und *clpP*-negativen Mutantenstämme konnte gezeigt werden, dass die Mutanten, im Vergleich zum Wildtyp, eine erhöhte Sekretion aufwiesen. Bei der quantitativen Analyse der Überstandsproteine konnte in den Mutantenstämmen eine bis zu zweifach erhöhte Konzentration an Proteinen im Überstand nachgewiesen werden, welche durch Komplementation mit *clpX* oder *clpP* wieder rückgängig gemacht werden konnte (siehe Abb. 22).

Da in der Regel die meisten Proteine über den GSP sezerniert werden, liegt die Vermutung nahe, dass die Deletion von *clpX* und *clpP* Einfluss auf Komponenten dieses Sekretionsystems nimmt. Ein Hinweis darauf ergibt sich aus der Tatsache, dass SecA, eine ATPase und zentrale Komponente der Sec-Translokase, ein bekanntes Substrat für die Proteolyse durch ClpXP ist (Flynn *et al.*, 2003). SecA kann entweder ungebunden im Zytoplasma vorliegen, als peripheres Membranprotein locker an die innere Membran gebunden oder aber im Komplex mit SecEGY in der zytoplasmatischen Membran integriert vorliegen (Danese und Silhavy, 1998). Da Flynn und Mitarbeiter nachweisen konnten, dass SecA spezifisch über ClpXP und nicht auch über ClpAP abgebaut wird, könnte die Anreicherung von SecA zu einer verstärkten Proteinsekretion in das Periplasma führen. Von dort aus könnten diese dann über weitere Sekretionssysteme in den Überstand gelangen. Auf Proteinebene konnte keine abweichende SecA Expression in den ClpXP-negativen Stämmen nachgewiesen werden. Dies mag in der Tatsache begründet liegen, dass SecA teilweise mit der inneren Membran verankert vorliegt und somit auf den zytoplasmatischen 2-D Gelen nicht dargestellt werden konnte. Allerdings konnte in neueren Untersuchungen eine vermehrte Bildung von „outer membrane vesicles“ in den *clpX*- und *clpP*-negativen Stämmen im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden (mündliche Mitteilung B. E. Uhlin, Umeå, Schweden).

Erste Hinweise auf den Zusammenhang zwischen der Protease ClpXP und dem Sekretionsverhalten lieferten Pummi und Mitarbeiter für *Bacillus subtilis*. Sie konnten eine verstärkte Expression von Signalpeptidasen in *clpX*- und *clpP*-negativen Stämmen nachweisen. Dieser Effekt war auf ClpXP zurückzuführen, da die Deletion von *clpC*, einer ATPase die alternativ mit ClpP interagieren kann, den wildtypischen Phänotyp nicht veränderte (Pummi *et al.*, 2002). Signalpeptide werden an die im Zytoplasma synthetisierten Vorläuferproteine angehängt, welche somit als Exportprotein erkannt und an die entsprechenden Exportstellen an der Membran, z.B. die Sec-Translokase, herangeführt werden. Pummi folgerte daraus, dass die Transkription von Signalpeptidasen über einen ClpXP-abhängigen Regulator kontrolliert wird.

Auch in *Staphylococcus aureus* konnte durch die Deletion von ClpXP ein verändertes Sekretom nachgewiesen werden (Frees *et al.*, 2003). Während in der logarithmischen Phase noch kein Unterschied detektierbar war, konnte in der stationären Phase eine veränderte Zusammensetzung des Sekretoms festgestellt werden. Während die zwei am stärksten sezernierten Proteine, α - und β -Hämolyisin, von den Mutanten in kleineren Mengen

sezerniert wurden, war die Proteinmenge im Überstand aber deutlich erhöht. Es wird aber auch hier ein ClpXP-abhängiger Regulationsmechanismus vermutet.

Obwohl diese zwei Beispiele von Gram-positiven Bakterien stammen, welche einen anderen Sekretionsmechanismus verwenden, haben doch Gram-positive und -negative Bakterien ein sehr ähnliches Sec-Sekretionssystem. Einen weiteren Hinweis, dass bei dem Gram-negativen *E. coli* Isolat 536 der Sec-abhängige Sekretionsmechanismus über ClpXP reguliert wird, liefert die Sekretion des Zytotoxins α -Hämolyisin. Dieses wird in Gram-negativen Stämmen über ein Sec-unabhängiges Typ I-Sekretionssystem exportiert (Aldridge und Hughes, 2001). Dementsprechend gaben die Proteomstudien keinen Hinweis auf eine veränderte Sekretion von HlyA in den ClpXP-negativen Mutanten (siehe Abb. 19). Auch der Hämolysetest auf Blutagarplatten (siehe Abb. 30) zeigte keine Veränderung in der Fähigkeit, Erythrozyten zu lysieren.

In Gram-negativen Bakterien ist bis jetzt nur der Einfluss von ClpXP auf das TTSS bekannt. Bei *Yersinia pestis* führt die Deletion von ClpXP oder Lon zu einem nicht mehr funktionsfähigen TTSS, d.h. Yop Proteine können nicht mehr sezerniert werden. Grund hierfür ist die Ansammlung des Histon-ähnlichen Proteins YmoA im Zytoplasma, wo es normalerweise von den Proteasen abgebaut wird, und für die Repression des TTSS verantwortlich ist (Jackson *et al.*, 2004).

Erst kürzlich konnte der Einfluss von ClpXP auf die Expression des TTSS enterohämorrhagischer *E. coli* nachgewiesen werden (Iyoda und Watanabe, 2005). In diesen Stämmen hat ClpXP positiven Einfluss auf die Expression LEE-kodierter Esp Proteine. Der fehlende Abbau von RpoS in einer ClpXP-negativen Mutante führte zu einer reduzierten Expression der Esp Proteine, da RpoS eine negative Wirkung auf die Expression LEE-kodierter Gene aufweist.

Einen weiteren Hinweis auf den Einfluss von ClpXP auf das Sec-System könnte die Expression des Oligopeptid-bindenden Proteins OppA liefern. Es gehört zu den Oligopeptid-Permeasen, bindet Peptide, die aus bis zu fünf Aminosäuren bestehen und ist normalerweise im Periplasma lokalisiert. Es konnte aber auf den 2-D Gelen mit Zytoplasma-Präparationen von Proteinen der logarithmischen und stationären Phase eine geringere Menge an OppA in den ClpXP-negativen Stämmen beobachtet werden. Dies könnte auf einen verstärkten Sec-abhängigen Transport in den ClpXP-negativen Stämmen zurückzuführen sein. Gleichzeitig wird das *oppABCD*F-Operon unter anderem über Lrp reguliert (Andrews *et al.*, 1986;

Andrews und Short, 1986; Calvo und Matthews, 1994), welches schon großen Einfluss auf die Regulation und Expression von Fimbriendeterminanten hat.

8. Zusammenfassung der regulatorischen Zusammenhänge und Ausblick

Es konnte ein großer Einfluss der ATP-abhängigen Protease ClpXP auf eine Reihe von Genen und Virulenzdeterminanten des uropathogenen *E. coli* Isolates 536 sowohl auf Transkriptions-, als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Da der alternative Sigmafaktor RpoS ausschließlich durch ClpXP degradiert wird, sind einige der beobachteten Einflüsse, v.a. auf die Flagellen- und Fimbrienexpression, durch die fehlende regulatorische Wirkung dieses globalen Regulators erklärbar. Die Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchungen lassen zudem vermuten, dass ClpXP direkt oder indirekt Einfluss auf den globalen Regulator Lrp ausübt, welcher eine wichtige Rolle bei der Regulation der Fimbrienexpression spielt.

Im nachfolgenden Schema sind die regulatorischen Zusammenhänge graphisch dargestellt.

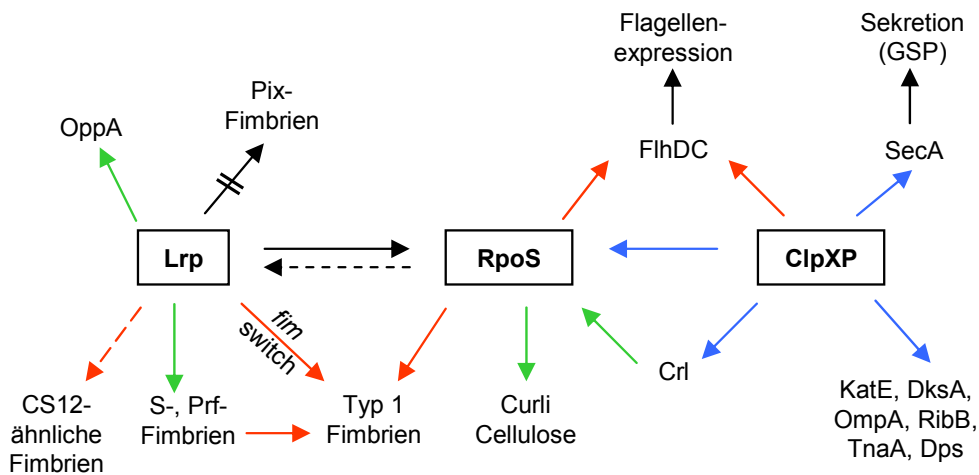


Abb. 42: Schematische Zusammenhänge von bislang bekannten Regulationsmechanismen der Protease ClpXP und der globalen Regulatoren RpoS und Lrp auf die Expression von Proteinen und Virulenzdeterminanten. Grüne Pfeile weisen auf positive, rote Pfeile auf eine negative Regulation hin. Blaue Pfeile markieren den Abbau der Proteine durch ClpXP. In unterbrochenen Linien sind unbekannte Regulationsmechanismen dargestellt. Schwarze Pfeile markieren weiterführende Einflüsse.

Um in Zukunft die Zusammenhänge zwischen der Protease ClpXP und den Regulatoren Lrp und RpoS in Bezug auf die Expression von Virulenzfaktoren zu untersuchen, könnte man die

Proteomstudien auf RpoS- und Lrp-negative Stämme ausweiten. Dies wäre vor allem für die nähere Charakterisierung der Regulationsmechanismen der Pix- und CS12-ähnlichen Fimbriendeterminanten von Vorteil. Gleichzeitig wäre es interessant, die Expression der Pix-Fimbrien näher zu charakterisieren, da die Entdeckung dieses Fimbrientyps in dem Stamm *E. coli* 536 noch nicht sehr weit zurückliegt.

Eine weitere interessante Aufgabe könnte die detaillierte Erforschung der Regulation der Antigen 43 Expression im Stamm 536 sein, da diesem, im Gegensatz zu *E. coli* K-12, ein unterschiedlicher Regulationsmechanismus zugrunde liegt.

Die Methode der 2-D Gelelektrophorese wäre in beiden Themengebieten angebracht, da hier eine große Anzahl an Einflüssen auf Proteinebene dargestellt werden können. Um detaillierte Ergebnisse zu einzelnen Genen zu erhalten, hat sich die Transkriptanalyse mit Hilfe der Real-Time PCR bewährt.

VII. Literaturverzeichnis

Aldridge, P., and Hughes, K.T. (2001) How and when are substrates selected for type III secretion? *Trends Microbiol* **9**: 209-214.

Andrews, J.C., Blevins, T.C., and Short, S.A. (1986) Regulation of peptide transport in *Escherichia coli*: induction of the *trp*-linked operon encoding the oligopeptide permease. *J Bacteriol* **165**: 428-433.

Andrews, J.C., and Short, S.A. (1986) *opp-lac* Operon fusions and transcriptional regulation of the *Escherichia coli trp*-linked oligopeptide permease. *J Bacteriol* **165**: 434-442.

Arnqvist, A., Olsen, A., Pfeifer, J., Russell, D.G. and Normark, S. (1992) The Crl protein activates cryptic genes for curli formation and fibronectin binding in *Escherichia coli* Hb101. *Mol Microbiol* **6**: 2443-2452.

Bardwell, J.C. and Craig, E.A. (1988) Ancient heat shock gene is dispensable. *J Bacteriol* **170**: 2977-2983.

Barnett, B.J. and Stephens, D.S. (1997) Urinary tract infection: an overview. *Am J Med Sci* **314**: 245-249.

Bailey, M.J., Hughes, C. and Koronakis, V. (1997) RfaH and the ops element, components of a novel system controlling bacterial transcription elongation. *Mol Microbiol* **26**: 845-851.

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

Ben Nasr, A., Olsen, A., Sjobring, U., Müller-Esterl, W. and Bjorck, L. (1996) Assembly of human contact phase proteins and release of bradykinin at the surface of curli-expressing *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **20**: 927-935.

Benz, I. and Schmidt, M.A. (1992) Aida-I, the adhesin involved in diffuse adherence of the diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule. *Mol Microbiol* **6**: 1539-1546.

Berger, H., J. Hacker, A. Juarez, C. Hughes and Goebel, W. (1982) Cloning of the chromosomal determinants encoding haemolysin production and mannose-resistant hemagglutinin in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **152**: 1241-1247.

Bian, Z., and Normark, S. (1997) Nucleator function of CsgB for the assembly of adhesive surface organelles in *Escherichia coli*. *Embo J* **16**: 5827-5836.

- Bian, Z., Brauner, A., Li, Y., and Normark, S.** (2000) Expression of and cytokine activation by *Escherichia coli* curli fibers in human sepsis. *J Infect Dis* **181**: 602-612.
- Blattner, F.R., Plunkett, G., III, 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. and Shao, Y.** (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-1462.
- Blomfield, I.C., Calie, P.J., Eberhardt, K.J., McClain, M.S., and Eisenstein, B.I.** (1993) Lrp stimulates phase variation of type 1 fimbriation in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **175**: 27-36.
- Boom, R., Sol, C.J., M., S.M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M.E., and van der Noordaa, J.** (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 495-503.
- Bougdour, A., Lelong, C., and Geiselmann, J.** (2004) Crl, a low temperature-induced protein in *Escherichia coli* that binds directly to the stationary phase sigma subunit of RNA polymerase. *J Biol Chem* **279**: 19540-19550.
- Bukau, B. and Horwich, A.L.** (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**: 351-366.
- Calvo, J.M., and Matthews, R.G.** (1994) The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **58**: 466-490.
- Chilcott, G.S., and Hughes, K.T.** (2000) Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 694-708.
- Christie, P.J., and Vogel, J.P.** (2000) Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol* **8**: 354-360.
- Cornelis, G.R.** (2000) Type III secretion: a bacterial device for close combat with cells of their eukaryotic host. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**: 681-693.
- Crost, C., Harel, J., Berthiaume, F., Garrivier, A., Tessier, M.C., Rakotoarivonina, H., and Martin, C.** (2004) Influence of environmental cues on transcriptional regulation of *foo* and *clp* coding for F165(1) and CS31A adhesins in *Escherichia coli*. *Res Microbiol* **155**: 475-482.
- Danese, P.N., Snyder, W.B., Cosma, C.L., Davis, L.J., and Silhavy, T.J.** (1995) The Cpx two-component signal transduction pathway of *Escherichia coli* regulates transcription of the gene specifying the stress-inducible periplasmic protease, DegP. *Genes Dev* **9**: 387-398.
- Danese, P.N., and Silhavy, T.J.** (1997) The sigma(E) and the Cpx signal transduction systems control the synthesis of periplasmic protein-folding enzymes in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **11**: 1183-1193.

- Danese, P.N., and Silhavy, T.J.** (1998) Targeting and assembly of periplasmic and outer-membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annual Review of Genetics* **32**: 59-94.
- Dartigalongue, C., and Raina, S.** (1998) A new heat-shock gene, *ppiD*, encodes a peptidyl-prolyl isomerase required for folding of outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *Embo J* **17**: 3968-3980.
- Datsenko, K.A. and 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**: 6640-6645.
- Deuerling, E., Schulze-Specking, A., Tomoyasu, T., Mogk, A. and Bukau, B.** (1999) Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins. *Nature* **400**: 693-696.
- Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Nagy, G., Schneider, G., Johann, A., Gottschalk, G. and Hacker, J.** (2002) Genetic structure and distribution of four Pathogenicity Islands (PAI I₅₃₆ to PAI IV₅₃₆) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect. Immun.* **70**: 6365-6372.
- Donnenberg, M.S. and Welch, R.A.** (1996) Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. in: Urinary tract infections: Molecular Pathogenesis and clinical management: 29-66.
- Dougan, D.A., Mogk, A., Zeth, K., Turgay, K. and Bukau, B.** (2002) AAA⁺ proteins and substrate recognition, it all depends on their partner in crime. *FEBS Lett* **529**: 6-10.
- Dougan, D.A., Weber-Ban, E. and Bukau, B.** (2003) Targeted delivery of an *ssrA*-tagged substrate by the adaptor protein SspB to its cognate AAA⁺ protein ClpX. *Mol Cell* **12**: 373-380.
- Dove, S.L., Smith, S.G.J., and Dorman, C.J.** (1997) Control of *Escherichia coli* type 1 fimbrial gene expression in stationary phase: a negative role for RpoS. *Molecular and General Genetics MGG* **254**: 13-20.
- Flynn, J.M., Neher, S.B., Kim, Y.I., Sauer, R.T., and Baker, T.A.** (2003) Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals. *Mol Cell* **11**: 671-683.
- Flynn, J.M., Levchenko, I., Sauer, R.T. and Baker, T.A.** (2004) Modulating substrate choice: the SspB adaptor delivers a regulator of the extracytoplasmic-stress response to the AAA⁺ protease ClpXP for degradation. *Genes Dev* **18**: 2292-2301.
- Frees, D. and Ingmer, H.** (1999) ClpP participates in the degradation of misfolded protein in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol* **31**: 79-87.
- Frees, D., Qazi, S.N., Hill, P.J., and Ingmer, H.** (2003) Alternative roles of ClpX and ClpP in *Staphylococcus aureus* stress tolerance and virulence. *Mol Microbiol* **48**: 1565-1578.
- Gaastra, W., and Svennerholm, A.M.** (1996) Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Trends Microbiol* **4**: 444-452.

- Gaillot, O., Pellegrini, E., Bregenholt, S., Nair, S. and Berche, P.** (2000) The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **35**: 1286-1294.
- Gally, D.L., Rucker, T.J., and Blomfield, I.C.** (1994) The leucine-responsive regulatory protein binds to the *fim* switch to control phase variation of type 1 fimbrial expression in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **176**: 5665-5672.
- Gerth, U., Krüger, E., Derré, I., Msadek, T. and Hecker, M.** (1998) Stress induction of the *Bacillus subtilis clpP* gene encoding a homologue of the proteolytic component of the Clp protease and the involvement of ClpP and ClpX in stress tolerance. *Mol Microbiol* **28**: 787-802.
- Görg, A.** (2000) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **21**: 1037-1053.
- Goldberg, A.L.** (1992) The mechanism and functions of ATP-dependent proteases in bacterial and animal cells. *Eur J Biochem* **203**: 9-23.
- Gottesman, S., Clark, W.P., de Crécy-Lagard, V. and Maurizi, M.R.** (1993) ClpX, an alternative subunit for the ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. Sequence and in vivo activities. *J Biol Chem* **268**: 22618-22626.
- Gottesman, S.** (1996) Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* **30**: 465-506.
- Gottesman, S., Roche, E., Zhou, Y. and Sauer, R.T.** (1998) The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes Dev.* **12**: 1338-1347.
- Grimaud, R., Kessel, M., Beuron, F., Steven, A.C. and Maurizi, M.R.** (1998) Enzymatic and structural similarities between the *Escherichia coli* ATP-dependent proteases, ClpXP and ClpAP. *J. Biol. Chem.* **273**: 12476-12481.
- Grimberg, J., Maguire, S., and Belluscio, L.** (1989) A simple method for the preparation of plasmid and chromosomal *E. coli* DNA. *Nucleic Acids Res* **17**: 8893.
- Grozdanov, 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., and 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**: 5912-5925.
- Haagmans, W., and 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**: 877-887.
- Hacker, J., Knapp, S. and Goebel, W.** (1983) Spontaneous deletions and flanking regions of the chromosomally inherited hemolysin determinant of an *Escherichia coli* O6 strain. *J Bacteriol* **154**: 1145-1152.

- Hacker, J. and Heesemann, J.** (2000) *Molekulare Infektionsbiologie*. Berlin: Spektrum, Akad. Verlag.
- Hacker, J. and Kaper, J.B.** (2000) Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* **54**: 641-679.
- Hasman, H., Chakraborty, T., and Klemm, P.** (1999) Antigen-43-mediated autoaggregation of *Escherichia coli* is blocked by fimbriation. *J. Bacteriol.* **181**: 4834-4841.
- Hasman, H., Schembri, M.A. and Klemm, P.** (2000) Antigen 43 and type 1 fimbriae determine colony morphology of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **182**: 1089-1095.
- Henderson, I.R., and 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**: 2132-2141.
- Hengge-Aronis, R.** (2002a) Recent insights into the general stress response regulatory network in *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**: 341-346.
- Hengge-Aronis, R.** (2002b) Signal Transduction and Regulatory Mechanisms Involved in Control of the σ^S (RpoS) Subunit of RNA Polymerase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 373-395.
- Hengge, R. and Bukau, B.** (2003) Proteolysis in prokaryotes: protein quality control and regulatory principles. *Mol Microbiol* **49**: 1451-1462.
- Herman, C., Prakash, S., Lu, C.Z., Matouschek, A. and Gross, C.A.** (2003) Lack of a robust unfoldase activity confers a unique level of substrate specificity to the universal AAA⁺ protease FtsH. *Mol Cell* **11**: 659-669.
- Higuchi, R.** (1990) Recombinant PCR. In PCR Protocols: A guide to methods and applications, pp. 177-183. Edited by M.A. Innis, D.H.Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White, Academic Press, San Diego.
- Holden, N.J., Uhlin, B.E., and Gally, D.L.** (2001) PapB paralogues and their effect on the phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **42**: 319-330.
- Holland, I.B., Blight, M.A. and Kenny, B.** (1990) The mechanism of secretion of hemolysin and other polypeptides from gram-negative bacteria. *J Bioenerg Biomembr* **22**: 473-491.
- Hultgren, S.J., Porter, T.N., Schaeffer, A.J. and Duncan, J.L.** (1985) Role of type 1 pili and effects of phase variation on lower urinary tract infections produced by *Escherichia coli*. *Infect Immun* **50**: 370-377.
- Hung, D.L., Raivio, T.L., Jones, C.H., Silhavy, T.J., and Hultgren, S.J.** (2001) Cpx signaling pathway monitors biogenesis and affects assembly and expression of P pili. *Embo J* **20**: 1508-1518.

- Ishihama, A.** (2000) Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annu Rev Microbiol* **54**: 499-518.
- Iyoda, S., and Watanabe, H.** (2005) ClpXP protease controls expression of the type III protein secretion system through regulation of RpoS and GrlR levels in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**: 4086-4094.
- Jackson, M.W., Silva-Herzog, E., and Plano, G.V.** (2004) The ATP-dependent ClpXP and Lon proteases regulate expression of the *Yersinia pestis* type III secretion system via regulated proteolysis of YmoA, a small histone-like protein. *Molecular Microbiology* **54**: 1364-1378.
- Jenal, U. and Fuchs, T.** (1998) An essential protease involved in bacterial cell-cycle control. *EMBO J.* **17**: 5658-5669.
- Jenal, U. and Hengge-Aronis, R.** (2003) Regulation by proteolysis in bacterial cells. *Curr Opin Microbiol* **6**: 163-172.
- Johnson, J.R.** (1991) Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev* **4**: 80-128.
- Jones, C.H., Danese, P.N., Pinkner, J.S., Silhavy, T.J., and Hultgren, S.J.** (1997) The chaperone-assisted membrane release and folding pathway is sensed by two signal transduction systems. *Embo J* **16**: 6394-6406.
- Joshi, S.A., Hersch, G.L., Baker, T.A. and Sauer, R.T.** (2004) Communication between ClpX and ClpP during substrate processing and degradation. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 404-411.
- Karzai, A.W., Roche, E.D. and Sauer, R.T.** (2000) The SsrA-SmpB system for protein tagging, directed degradation and ribosome rescue. *Nat Struct Biol* **7**: 449-455.
- Katayama, Y., Gottesman, S., Pumphrey, J., Rudikoff, S., Clark, W. and Maurizi, M.** (1988) The two-component, ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. Purification, cloning, and mutational analysis of the ATP-binding component. *J. Biol. Chem.* **263**: 15226-15236.
- Kessel, M., Maurizi, M.R., Kim, B., Kocsis, E., Trus, B.L., Singh, S.K. and Steven, A.C.** (1995) Homology in structural organization between *E. coli* ClpAP protease and the eukaryotic 26 S proteasome. *J Mol Biol* **250**: 587-594.
- Kim, Y.I., Levchenko, I., Fraczkowska, K., Woodruff, R.V., Sauer, R.T. and Baker, T.A.** (2001) Molecular determinants of complex formation between Clp/Hsp100 ATPases and the ClpP peptidase. *Nat Struct Biol* **8**: 230-233.
- Klemm, P., Hjerrild, L., Gjermansen, M. and Schembri, M.A.** (2004) Structure-function analysis of the self-recognizing Antigen 43 autotransporter protein from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **51**: 283-296.

Köhler, R., Schäfer, K., Müller, S., Vignon, G., Diederichs, K., Philippsen, A., Ringler, P., Pugsley, A.P., Engel, A., and Welte, W. (2004) Structure and assembly of the pseudopilin PulG. *Molecular Microbiology* **54**: 647-664.

Komeda, Y. (1986) Transcriptional control of flagellar genes in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **168**: 1315-1318.

Korhonen, T.K., Valtonen, M.V., Parkkinen, J., Väisänen-Rhen, V., Finne, J., Ørskov, F., Ørskov, I., Svenson, S.B. and Mäkelä, P.H. (1985) Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis. *Infect Immun* **48**: 486-491.

Koster, M., Bitter, W., and Tommassen, J. (2000) Protein secretion mechanisms in Gram-negative bacteria. *Int J Med Microbiol* **290**: 325-331.

Lacour, S., and Landini, P. (2004) SigmaS-dependent gene expression at the onset of stationary phase in *Escherichia coli*: function of sigmaS-dependent genes and identification of their promoter sequences. *J Bacteriol* **186**: 7186-7195.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lau, G.W., Haataja, S., Lonetto, M., Kensit, S.E., Marra, A., Bryant, A.P., McDevitt, D., Morrison, D.A. and Holden, D.W. (2001) A functional genomic analysis of type 3 *Streptococcus pneumoniae* virulence. *Mol Microbiol* **40**: 555-571.

Lee, V.T., and Schneewind, O. (2001) Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. *Genes Dev.* **15**: 1725-1752.

Levchenko, I., Grant, R.A., Wah, D.A., Sauer, R.T. and Baker, T.A. (2003) Structure of a delivery protein for an AAA⁺ protease in complex with a peptide degradation tag. *Mol Cell* **12**: 365-372.

Lügering, A., Benz, I., Knochenhauer, S., Ruffing, M., and Schmidt, M.A. (2003) The Pix pilus adhesin of the uropathogenic *Escherichia coli* strain X2194 (O2 : K- : H6) is related to Pap pili but exhibits a truncated regulatory region. *Microbiology* **149**: 1387-1397.

Macnab, R.M. (1992) Genetics and biogenesis of bacterial flagella. *Annu Rev Genet* **26**: 131-158.

Makinoshima, H., Aizawa, S.-I., Hayashi, H., Miki, T., Nishimura, A., and Ishihama, A. (2003) Growth phase-coupled alterations in cell structure and function of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **185**: 1338-1345.

Manting, E.H., and Driessen, A.J. (2000) *Escherichia coli* translocase: the unravelling of a molecular machine. *Mol Microbiol* **37**: 226-238.

Martin, C. (1996) The *clp* (CS31A) operon is negatively controlled by Lrp, ClpB, and L-alanine at the transcriptional level. *Mol Microbiol* **21**: 281-292.

- Martinez, J.J., Mulvey, M.A., Schilling, J.D., Pinkner, J.S. and Hultgren, S.J.** (2000) Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *Embo J* **19**: 2803-2812.
- Martinez, J.J. and Hultgren, S.J.** (2002) Requirement of Rho-family GTPases in the invasion of Type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **4**: 19-28.
- Mei, J.M., Nourbakhsh, F., Ford, C.W. and Holden, D.W.** (1997) Identification of *Staphylococcus aureus* virulence genes in a murine model of bacteraemia using signature-tagged mutagenesis. *Mol Microbiol* **26**: 399-407.
- Meyrier, A.** (1999) Urinary tract infection. In: Atlas of diseases of the kidney. Vol. 2 Chapter 7. Cohen, A.H., Glassock, R.J., Grunfeld, J.P. and Schrier, R.W. (eds): Blackwell Science Inc.
- Middendorf, B., Hochhut, B., Leipold, K., Dobrindt, U., Blum-Oehler, G. and Hacker, J.** (2004) Instability of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* 536. *J. Bacteriol.* **186**: 3086-3096.
- Molloy, M.P., Herbert, B.R., Slade, M.B., Rabilloud, T., Nouwens, A.S., Williams, K.L. and Gooley, A.A.** (2000) Proteomic analysis of the *Escherichia coli* outer membrane. *Eur J Biochem* **267**: 2871-2881.
- Mori, H., and Ito, K.** (2001) The Sec protein-translocation pathway. *Trends Microbiol* **9**: 494-500.
- Morschhäuser, J., Vetter, V., Emödy, L., and Hacker, J.** (1994) Adhesin regulatory genes within large, unstable DNA regions of pathogenic *Escherichia coli*: cross-talk between different adhesin gene clusters. *Mol Microbiol* **11**: 555-566.
- Moxon, E.R. and Kroll, J.S.** (1990) The role of bacterial polysaccharide capsules as virulence factors. *Curr Top Microbiol Immunol* **150**: 65-85.
- Msadek, T., Dartois, V., Kunst, F., Herbaud, M.L., Denizot, F. and Rapoport, G.** (1998) ClpP of *Bacillus subtilis* is required for competence development, motility, degradative enzyme synthesis, growth at high temperature and sporulation. *Mol Microbiol* **27**: 899-914.
- Mühdorfer, I. and Hacker, J.** (1994) Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. *Microbial Pathogenesis* **16**: 171-181.
- Mulvey, M.A., Lopez-Boado, Y.S., Wilson, C.L., Roth, R., Parks, W.C., Heuser, J. and Hultgren, S.J.** (1998) Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **282**: 1494-1497.
- Mulvey, M.A.** (2002) Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **4**: 257-271.
- Neuwald, A.F., Aravind, L., Spouge, J.L. and Koonin, E.V.** (1999) AAA⁺: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res* **9**: 27-43.

- O'Farrell, P.H.** (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**: 4007-4021.
- Olsen, A., Jonsson, A. and Normark, S.** (1989) Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature* **338**: 652-655.
- Olsen, A., Arnqvist, A., Hammar, M. and Normark, S.** (1993) Environmental regulation of curli production in *Escherichia coli*. *Infect Agents Dis* **2**: 272-274.
- Ørskov, I., and Ørskov, F.** (1985) *Escherichia coli* in extra-intestinal infections. *J Hyg (Lond)* **95**: 551-575.
- Ørskov, F. and Ørskov, I.** (1992) *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can J Microbiol* **38**: 699-704.
- O'Toole, G.A. and Kolter, R.** (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* **28**: 449-461.
- Owen, P., Meehan, M., de Loughry-Doherty, H. and Henderson, I.** (1996) Phase-variable outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **16**: 63-76.
- Patten, C.L., Kirchhof, M.G., Schertzberg, M.R., Morton, R.A., and Schellhorn, H.E.** (2004) Microarray analysis of RpoS-mediated gene expression in *Escherichia coli* K-12. *Mol Genet Genomics* **272**: 580-591.
- Pederson, K.J., Carlson, S. and Pierson, D.E.** (1997) The ClpP protein, a subunit of the Clp protease, modulates *ail* gene expression in *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **26**: 99-107.
- Pfaffl, M.W.** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl. Acids Res.* **29**: e45-.
- Pichel, M., Binsztein, N., and Viboud, G.** (2000) CS22, a novel human enterotoxigenic *Escherichia coli* adhesin, is related to CS15. *Infect. Immun.* **68**: 3280-3285.
- Pogliano, J., Lynch, A.S., Belin, D., Lin, E.C., and Beckwith, J.** (1997) Regulation of *Escherichia coli* cell envelope proteins involved in protein folding and degradation by the Cpx two-component system. *Genes Dev* **11**: 1169-1182.
- Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K., and Meyer, T.F.** (1987) Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* **325**: 458-462.
- Porat, R., Mosseri, R., Kaplan, E., Johns, M.A. and Shibolet, S.** (1992) Distribution of polysaccharide side chains of lipopolysaccharide determine resistance of *Escherichia coli* to the bactericidal activity of serum. *J Infect Dis* **165**: 953-956.
- Pratt, L.A., and Silhavy, T.J.** (1998) Crl stimulates RpoS activity during stationary phase. *Mol Microbiol* **29**: 1225-1236.

- Pugsley, A.P., Francetic, O., Possot, O.M., Sauvonnet, N., and Hardie, K.R.** (1997) Recent progress and future directions in studies of the main terminal branch of the general secretory pathway in Gram-negative bacteria--a review. *Gene* **192**: 13-19.
- Pummi, T., Leskelä, S., Wahlström, E., Gerth, U., Tjalsma, H., Hecker, M., Sarvas, M., and Kontinen, V.P.** (2002) ClpXP protease regulates the signal peptide cleavage of secretory preproteins in *Bacillus subtilis* with a mechanism distinct from that of the Ecs ABC transporter. *J Bacteriol* **184**: 1010-1018.
- Reeves, P.** (1995) Role of O-antigen variation in the immune response. *Trends Microbiol* **3**: 381-386.
- Römling, U., Sierralta, W.D., Eriksson, K., and Normark, S.** (1998) Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Mol Microbiol* **28**: 249-264.
- Römling, U., Bokranz, W., Rabsch, W., Zogaj, X., Nimtz, M., and Tschäpe, H.** (2003) Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in *Salmonella serovars* important in human disease. *Int J Med Microbiol* **293**: 273-285.
- Rohrwild, M., Coux, O., Huang, H.C., Moerschell, R.P., Yoo, S.J., Seol, J.H., Chung, C.H. and Goldberg, A.L.** (1996) Hslv-Hslu: A novel ATP-dependent protease complex in *Escherichia coli* related to the eukaryotic proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 5808-5813.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A.** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA-polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Sambrook, S., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor, New York*.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Schembri, M.A., and Klemm, P.** (2001) Coordinate gene regulation by fimbriae-induced signal transduction. *Embo J* **20**: 3074-3081.
- Schembri, M.A., Dalsgaard, D., and Klemm, P.** (2004) Capsule shields the function of short bacterial adhesins. *J. Bacteriol.* **186**: 1249-1257.
- Schirmer, E.C., Glover, J.R., Singer, M.A. and Lindquist, S.** (1996) HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem Sci* **21**: 289-296.
- Schmoll, T., Morschhäuser, J., Ott, M., Ludwig, B., van Die, I., and Hacker, J.** (1990) Complete genetic organization and functional aspects of the *Escherichia coli* S fimbrial adhesion determinant: nucleotide sequence of the genes *sfa B, C, D, E, F*. *Microb Pathog* **9**: 331-343.

- Schneider, G., Dobrindt, U., Brüggemann, H., Nagy, G., Janke, B., Blum-Oehler, G., Buchrieser, C., Gottschalk, G., Emödy, L., and 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.
- Sjobring, U., Pohl, G. and Olsen, A.** (1994) Plasminogen, absorbed by *Escherichia coli* expressing curli or by *Salmonella enteritidis* expressing thin aggregative fimbriae, can be activated by simultaneously captured tissue-type plasminogen activator (T-Pa). *Mol Microbiol* **14**: 443-452.
- Smith, C.K., Baker, T.A. and Sauer, R.T.** (1999) Lon and Clp family proteases and chaperones share homologous substrate-recognition domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6678-6682.
- Smyth, C.J., Marron, M.B., Twohig, J.M. and Smith, S.G.** (1996) Fimbrial adhesins: similarities and variations in structure and biogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* **16**: 127-139.
- Solano, C., Garcia, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J.M., Gamazo, C., and Lasa, I.** (2002) Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol Microbiol* **43**: 793-808.
- Soutourina, O.A., and Bertin, P.N.** (2003) Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 505-523.
- Stathopoulos, C., Hendrixson, D.R., Thanassi, D.G., Hultgren, S.J., St Geme, J.W., 3rd, and Curtiss, R., 3rd** (2000) Secretion of virulence determinants by the general secretory pathway in gram-negative pathogens: an evolving story. *Microbes Infect* **2**: 1061-1072.
- Swanson, M.S., and Isberg, R.R.** (1996) Analysis of the intracellular fate of *Legionella pneumophila* mutants. *Ann N Y Acad Sci* **797**: 8-18.
- Tani, T.H., Khodursky, A., Blumenthal, R.M., Brown, P.O., and Matthews, R.G.** (2002) Adaptation to famine: A family of stationary-phase genes revealed by microarray analysis. *PNAS* **99**: 13471-13476.
- Teter, S.A., Houry, W.A., Ang, D., Tradler, T., Rockabrand, D., Fischer, G., Blum, P., Georgopoulos, C. and Hartl, F.U.** (1999) Polypeptide flux through bacterial Hsp70: DnaK cooperates with trigger factor in chaperoning nascent chains. *Cell* **97**: 755-765.
- Thompson, M.W. and Maurizi, M.R.** (1994) Activity and specificity of *Escherichia coli* ClpAP protease in cleaving model peptide substrates. *J Biol Chem* **269**: 18201-18208.
- Tomoyasu, T., Ohkishi, T., Ukyo, Y., Tokumitsu, A., Takaya, A., Suzuki, M., Sekiya, K., Matsui, H., Kutsukake, K., and Yamamoto, T.** (2002) The ClpXP ATP-dependent protease regulates flagellum synthesis in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol* **184**: 645-653.

- Tomoyasu, T., Takaya, A., Isogai, E., and Yamamoto, T.** (2003) Turnover of FlhD and FlhC, master regulator proteins for *Salmonella* flagellum biogenesis, by the ATP-dependent ClpXP protease. *Mol Microbiol* **48**: 443-452.
- Tsai, C., and Frasch, C.** (1982) A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **119**: 115-119.
- Turgay, K., Hahn, J., Burghoorn, J. and Dubnau, D.** (1998) Competence in *Bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor. *Embo J* **17**: 6730-6738.
- van der Woude, M.W., and Low, D.A.** (1994) Leucine-responsive regulatory protein and deoxyadenosine methylase control the phase variation and expression of the *sfa* and *daa* pili operons in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **11**: 605-618.
- van der Woude, M.W. and Bäumlner, A.J.** (2004) Phase and Antigenic Variation in Bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**: 581-611.
- Wang, J., Hartling, J.A. and Flanagan, J.M.** (1997) The structure of ClpP at 2.3 Å resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis. *Cell* **91**: 447-456.
- Wang, J., Hartling, J.A. and Flanagan, J.M.** (1998) Crystal structure determination of *Escherichia coli* ClpP starting from an EM-derived mask. *J Struct Biol* **124**: 151-163.
- Wawrzynow, A., Banecki, B. and Zylicz, M.** (1996) The Clp ATPases define a novel class of molecular chaperones. *Mol Microbiol* **21**: 895-899.
- Webb, C., Moreno, M., Wilmes-Riesenberg, M., Curtiss Iii, R. and Foster, J.W.** (1999) Effects of DksA and ClpP protease on sigma S production and virulence in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **34**: 112-123.
- Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V.F., and Hengge, R.** (2005) Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: σ^S -dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J. Bacteriol.* **187**: 1591-1603.
- Wickner, S., Maurizi, M.R. and Gottesman, S.** (1999) Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* **286**: 1888-1893.
- Wong, P. and Houry, W.A.** (2004) Chaperone networks in bacteria: analysis of protein homeostasis in minimal cells. *Journal of Structural Biology* **146**: 79-89.
- Wullt, B., Bergsten, G., Samuelsson, M. and Svanborg, C.** (2002) The role of P fimbriae for *Escherichia coli* establishment and mucosal inflammation in the human urinary tract. *Int J Antimicrob Agents* **19**: 522-538.
- Xia, Y., Gally, D., Forsman-Semb, K., and Uhlin, B.E.** (2000) Regulatory cross-talk between adhesin operons in *Escherichia coli*: inhibition of type 1 fimbriae expression by the PapB protein. *EMBO J.* **19**: 1450-1457.

Yamamoto, T., Sashinami, H., Takaya, A., Tomoyasu, T., Matsui, H., Kikuchi, Y., Hanawa, T., Kamiya, S., and Nakane, A. (2001) Disruption of the genes for ClpXP protease in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium results in persistent infection in mice, and development of persistence requires endogenous gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun* **69**: 3164-3174.

Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W. and Römling, U. (2001) The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol* **39**: 1452-1463.

Zhou, Y., Gottesman, S., Hoskins, J.R., Maurizi, M.R. and Wickner, S. (2001) The RssB response regulator directly targets sigma(S) for degradation by ClpXP. *Genes Dev* **15**: 627-637.

VIII. Anhang

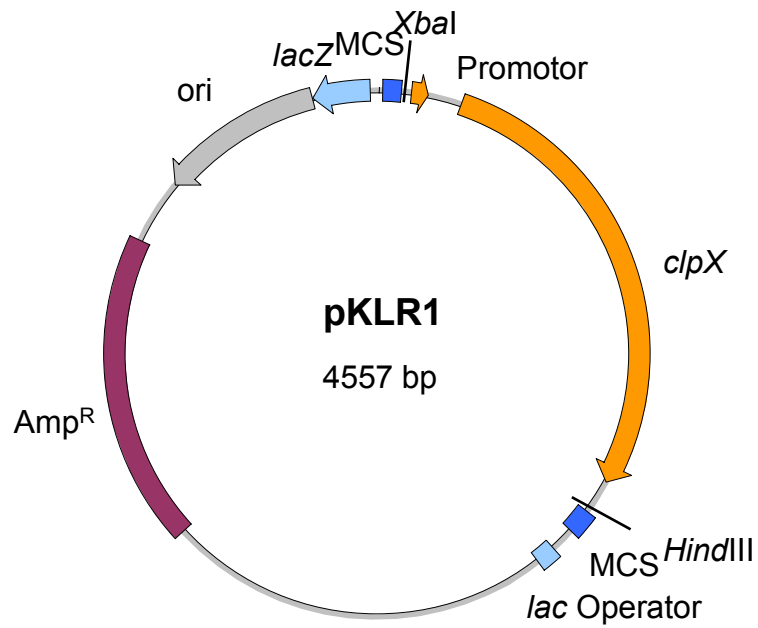
1. Abkürzungsverzeichnis

2-D PAGE	Zweidimensionale Gelelektrophorese
A	Ampere
aa	Aminosäuren (amino acid)
Abb.	Abbildung
Amp/Amp ^R	Ampicillin/Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
<i>cat</i>	Chloramphenicol-acetyl-transferase
Cm/Cm ^R	Chloramphenicol/Chloramphenicolresistenz
dATP	Desoxyadenosin-5`-Triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-5`-Triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5`-Triphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5`-Triphosphat
dNTP	Desoxynukleotid-5`-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	et alii (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Gramm
h	Stunde
IEF	isoelektrische Fokussierung
IPG	immobilisierter pH Gradient
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
Km/Km ^R	Kanamycin/Kanamycinresistenz
l	Liter
LB	Luria Bertani Broth
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MALDI	Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
min	Minuten

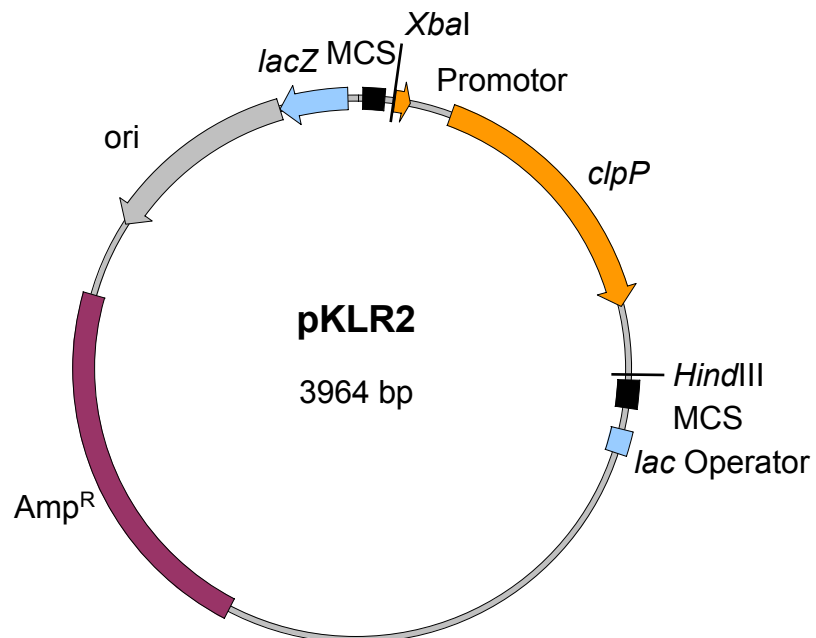
MCS	Multiple cloning site
MOPS	3-Morpholinpropansulfonat
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
OD _{nm}	optische Dichte bei einer Wellenlänge von λ nm
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
PAGE	Polyacrylamid Gel Electrophoresis
PAI	Pathogenitätsinsel
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	pH-Wert
pI	isoelektrischer Punkt
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
sec	Sekunde
Sm/Sm ^R	Streptomycin/Streptomycinresistenz
SSC	Standard-Saline-Citrat
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tet/Tet ^R	Tetrazyclin/Tetrazylinresistenz
TOF	Time-of-Flight
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer RNA
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
U	Enzym-Einheit (1 U=1 µmol Substrat × min ⁻¹)
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-glukosid
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent

2. Plasmidkarten

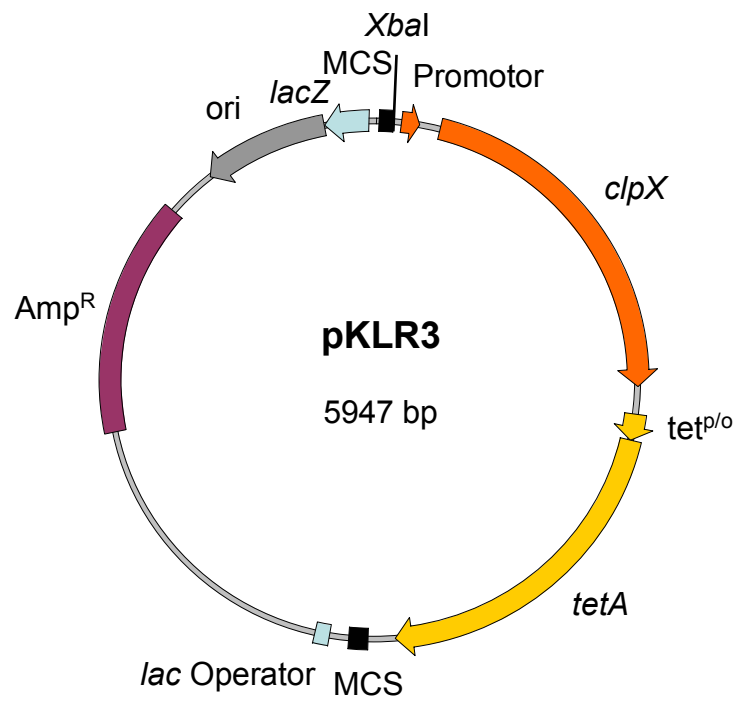
2.1. pKLR1



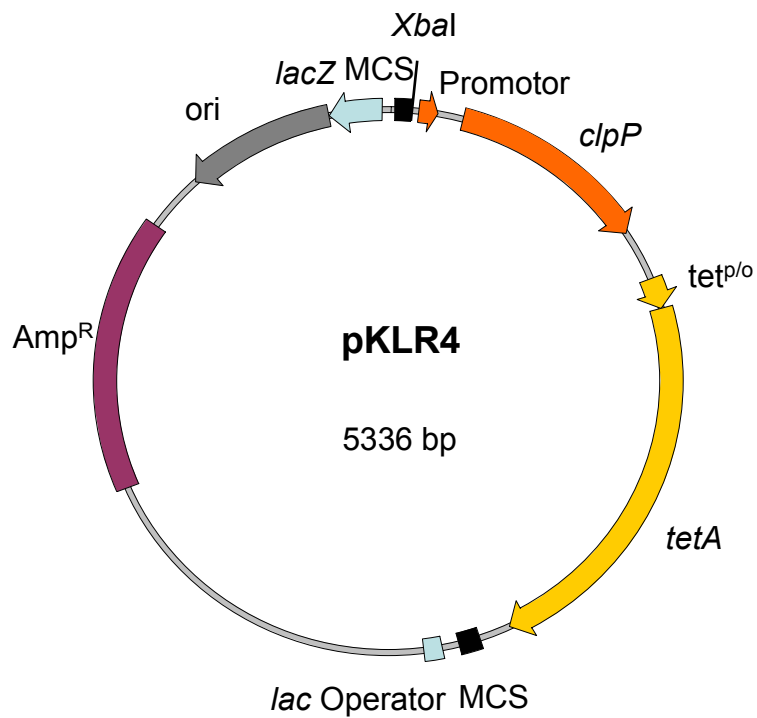
2.2. pKLR2



2.3. pKLR3



2.4. pKLR4



3. Clusters of Orthologous Groups of proteins (COGs)

In nachfolgender Tabelle sind die bei der Klassifizierung der identifizierten Proteine nach COGs verwendeten Bezeichnungen erklärt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Tab. 18: Liste der verwendeten Abkürzungen bei der Klassifizierung von Proteinen nach COGs.

Informationsspeicherung und Prozessierung	
J	Translation, ribosomale Struktur und Biogenese
K	Transkription
L	DNA Replikation, Rekombination and Reparatur
Zellprozesse	
D	Zellteilung und Chromosomenteilung
O	Posttranslationale Modifikation, "protein turnover", Chaperone
M	Biogenese der Zellhülle, äußere Membran
N	Zellbewegung und Sekretion
P	Transport und Metabolismus von anorganischen Ionen
T	Signaltransduktion
Metabolismus	
C	Energiegewinnung und -umwandlung
G	Transport und Metabolismus von Kohlenhydrate
E	Transport und Metabolismus von Aminosäuren
F	Transport und Metabolismus von Nukleotiden
H	Metabolismus von Coenzymen
I	Metabolismus von Fetten
Q	Biosynthese, Transport und Katabolismus von sekundären Metaboliten
schlecht charakterisiert	
R	nur Funktionsvorhersage
S	Funktion unbekannt
n. f.	Funktion nicht verfügbar

4. Liste aller identifizierten Proteine der zytoplasmatischen Zellfraktion

Tab. 19: Liste aller identifizierten zytoplasmatischen Proteine

COG	Protein	Funktion	OD1	OD 3	Accession NCBI	Mw (Da)	pI
C	AdhE	CoA-gebundene Acetaldehyd-Dehydrogenase		↑	16129202	96118,35	6,33
R	AdhP	Alkohol-Dehydrogenase		↑	33347557	35370,60	5,94
M	Ag43 _{III}	äußeres Membranprotein, Autotransporter, ähnlich Adhäsion, PAI III ₅₃₆	↓	↓	28316255	107209,21	5,69
O	AhpC	Alkylhydroperoxid-Reduktase, C22-Untereinheit			16128588	20759,46	4,89
T	ArcA	negativer Antwortregulator für Gene des aeroben Stoffwechsels			1790863	n. b.	n. b.
C	AtpA	membrangebundene ATP-Synthase, F1-Sektor, α -Untereinheit			16131602	55187,75	5,80
P	Bfr	Bakterioferrin			16131215	18495,07	4,54
n. f.	CbpA	DNA-bindendes Protein			16128966	34455,04	6,36
O	ClpP	ATP-abhängige proteolytische Untereinheit der ClpAP Serinprotease			16128422	23171,62	5,52
G	Crr	PTS-System, Glukose-spezifische IIA-Komponente			16130343	18251,09	4,58
n. f.	CsiD	konserviertes Protein mit Clavaminat-Synthase-ähnlicher Domäne		↑	33347689	37359,47	5,74
F	DeoD	Purin-Nukleosid-Phosphorylase			16132201	25945,97	5,30
n. f.	DkgA	2,5-Diketo-D-Glukonat-Reduktase A			33347720	31108,66	6,00
T	DksA	<i>dnaK</i> Suppressorprotein		↑	16128138	17523,77	4,92
O	DnaK	Hitzeschockprotein Hsp70, Chaperon			16128008	69114,04	4,68
L	Dps	globaler Regulator unter Mangelbedingungen			16128780	18695,33	5,67
J	EF-Tu	Elongationsfaktor Tu (<i>tufB</i>)			16131810	43280,61	5,18
J	EF-Tu	Elongationsfaktor Tu (<i>tufA</i>)			16131218	43280,61	5,18
G	FbaA	Fruktose-bisphosphat-Aldolase Klasse II			16130826	39143,30	5,47
G	FbaB	Fruktose-bisphosphat-Aldolase Klasse I			33347620	38105,24	6,28

VIII.Anhang

Tab. 19: Liste aller identifizierten zytoplasmatischen Proteine (Fortsetzung)

COG	Protein	Funktion	OD1	OD 3	Accession NCBI	Mw (Da)	pI
J	FusA	Elongationsfaktor G, GTP-bindendes Protein			16131219	77578,44	5,11
E	GadA	Glutamat-Decarboxylase-Isozyme A			16131389	52675,23	5,10
E	GadB	Glutamat-Decarboxylase-Isozyme B			16129452	52658,20	5,17
G	GapA	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase A			16129733	35529,53	6,74
J	GlnS	Glutamin-tRNA-Synthase			16128656	63467,94	5,85
C	GlpK	Glycerolkinase			16131764	56225,84	5,24
E	GlyA	Serin-Hydroxymethyltransferase			16130476	45313,66	6,03
G	GpmA	Phosphoglycerolmutase 1			16128723	28556,42	5,80
O	GroL	GroEL, Hitzeschockprotein Hsp60, Chaperon			16131968	57325,98	4,69
O	GroS	GroES, 10 Kd Chaperon, bindet an Hsp60			16131967	10380,58	5,15
F	GuaB	IMP-Dehydrogenase			16130433	52017,52	6,00
E	HisC	Histidinol-phosphat-Aminotransferase		↓	16129962	39335,30	5,01
E	HisD	Histidinal-Dehydrogenase, Histidinol-Dehydrogenase		↓	16129961	46081,63	5,06
R	H-NS	DNA-bindendes Protein HLP-II (HU, BH2, HD, NS)			16129198	15530,03	5,43
F	Hpt	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase			16128118	20603,64	5,10
O	HslU	Hitzeschockprotein HslVU, ATPase-Untereinheit			16131769	49591,88	5,11
P	KatE	Katalase, Hydroperoxidase HPII(III)		↑	16129686	84194,70	5,48
C	LpdA	Lipoamid-Dehydrogenase (NADH)			16128109	50683,54	5,75
J	LysU	Lysin-tRNA-Synthase			16131955	57825,68	4,97
C	Mdh	Malat-Dehydrogenase		↓	16131126	32317,21	5,61
G	MglB	Galaktose-bindendes Transportprotein			16130088	35712,63	5,61
C	NfnB	Sauerstoff-unempfindliche NAD(P)H Nitroreduktase			16128561	23890,22	5,80
M	OmpA	äußeres Membranprotein 3a		↑	16128924	37198,79	5,98
E	OppA	periplasmatisches Oligopeptid-Transportprotein	↓	↓	16129204	60896,99	6,04
n. f.	ORF22 ₁	hypothetisches Protein, PAI I ₅₃₆		↑	24528005	20381,00	5,77

VIII.Anhang

Tab. 19: Liste aller identifizierten zytoplasmatischen Proteine (Fortsetzung)

COG	Protein	Funktion	OD1	OD 3	Accession NCBI	Mw (Da)	pI
R	OsmY	„hyperosmotically inducible periplasmic protein“			16132194	21073,74	6,39
G	OtsA	Trehalose-6-phosphat-Synthase		↑	16129848	53608,21	6,40
C	PflB	Formiat-Acetyltransferase I			16128870	83725,18	5,39
G	Pgi	Glukose-phosphat-Isomerase			16131851	61527,84	5,84
G	Pgk	Phosphoglyceratkinase			16130827	41115,25	4,94
E	PoxB	Pyruvatoxidase			16128839	62001,48	5,84
C	Ppa	anorganische Pyrophosphatase			16132048	19701,58	4,89
O	PpiB	Peptidyl-prolyl-cis-trans-Isomerase B			16128509	18151,50	5,42
G	PtsI	PEP-Phosphotransferase-System Enzyme I			16130342	63557,94	4,63
F	PurA	Adenylsuccinat-Synthase			16131999	47341,00	5,19
G	PykA	Pyruvatkinase II			16129807	51353,26	6,24
H	RibB	3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase		↑	16130937	23338,00	4,90
K	RpoA	RNA-Polymerase, α -Untereinheit			16131174	36507,75	4,83
K	RpoS	Sigmafaktor S (38)	↑	↑	16130648	37971,89	4,72
J	RpsA	30S ribosomale Untereinheit S1			16128878	61156,10	4,74
J	SerS	Serin-tRNA-Synthase			16128860	48409,10	5,23
P	SodA	Superoxid-Dismutase, Mangan			33347807	23342,42	6,51
P	SodB	Superoxid-Dismutase, Eisen			16129614	21264,78	5,54
P	SodC	Superoxid-Dismutase Kupfer-Zink			16129604	17669,98	5,95
O	SspA	„stringent starvation protein A“			16131119	24303,95	5,09
C	SucA	2-Oxoglutarat-Dehydrogenase			16128701	105051,85	6,03
C	SucD	Succinyl-CoA-Synthase, α -Untereinheit			16128704	29772,51	6,36
n. f.	SufC	putative ATP-bindende Komponente eines Transportsystems		↑	16129638	27565,13	4,84
G	TalA	Transaldolase A	↑	↑	16130389	35654,82	5,86
E	TdcB	katabolische Threonin-Dehydratase			16131010	35226,45	5,70

VIII.Anhang

Tab. 19: Liste aller identifizierten zytoplasmatischen Proteine (Fortsetzung)

COG	Protein	Funktion	OD1	OD 3	Accession NCBI	Mw (Da)	pI
C	TdcE	putative Formiat-Acetyltransferase 3			16131007	83725,18	5,39
G	TktB	Transketolase-2-Isozyme			16130390	73038,81	5,85
E	TnaA	Tryptophanase	↓	↓	33347785	52766,54	5,83
G	TpiA	Triosephosphat-Isomerase			16131757	26968,85	5,59
O	Tpx	Thiolperoxidase			16129285	17824,22	4,75
n. f.	TrmE	GTP-bindendes Protein der Thiophen- und Furanoxidation		↑	16131574	49200,64	4,89
J	Tsf	Elongationfaktor Ts			16128163	30421,03	5,08
F	Udp	Uridin-Phosphorylase			16131680	27156,13	5,79
F	Upp	Uracil-Phosphoribosyltransferase			16130423	23544,54	5,87
R	WrbA	Trp-Repressor-bindendes Protein	↑		16128970	20845,60	5,53
R	YahK	putative Oxidoreduktase	↑		16128310	37968,43	5,78
n. f.	YbeL	putatives α -helikales Protein			16128626	18793,21	4,98
Q	YcaC	putatives Enzyme mit Cystein-Hydrolase-Domäne			16128864	23098,33	5,08
S	YciE	konserviertes Protein mit Ferritin-ähnlicher Domäne		↑	16129218	18960,49	4,80
S	YciF	putatives Strukturprotein		↑	16129219	18596,19	5,38
C	YdbK	putative Oxidoreduktase, Fe-S-Untereinheit			16129339	128805,56	5,44
S	YggE	putatives Aktin			16130823	26635,30	6,12
n. f.	YghA	putative Oxidoreduktase			16130901	31484,99	6,36
E	YhaP	putative L-Serin-Dehydratase	↓		16131004	15043,38	6,33
R	YhbO	putative intrazelluläre Proteinase mit Katalase-Domäne		↑	16131045	20323,08	5,54
G	Zwf	Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase			16129805	55698,50	5,44
n. f.		Spot 51	↑	↑	n. b.	n. b.	n. b.
n. f.		Spot 53	↑	↑	n. b.	n. b.	n. b.
n. f.		Spot 55		↑	n. b.	n. b.	n. b.

↑ stärkere Expression, ↓ schwächere Expression der *clpX*- und *clpP*-negativen Stämme im Vergleich zum Wildtyp, n. b.: nicht bestimmt.

5. Liste aller identifizierten Proteine des Überstandes

Tab. 20: Liste aller identifizierten Proteine des Überstandes

COG	Protein	Funktion	Accession NCBI	Kompartiment	Mw (Da)	pI
C	AceF	Pyruvat-Dehydrogenase (Komponente der Dihydrolipoyltrans-acetylase)	16128108	Zytoplasma	n. b.	n. b.
M	Ag43 _{III}	äußeres Membranprotein, Autotransporter, ähnlich zu Adhäsinen, PAI III ₅₃₆	28316255	Fimbrien	n. b.	n. b.
O	AhpC	Alkylhydroperoxid-Reduktase, C22-Untereinheit	16128588	Zytoplasma	20759,46	4,89
O	AhpF	Alkylhydroperoxid-Reduktase, F52a-Untereinheit	16128589	Zytoplasma	57365,64	5,48
F	Apt	Adenin-Phosphoribosyltransferase	16128453	Zytoplasma	n. b.	n. b.
T	ArcA	negativer Antwortregulator für Gene des aeroben Stoffwechsels	16132218	Zytoplasma	n. b.	n. b.
E	ArgT	Lysin-, Arginin-, Ornithin-bindendes periplasmatisches Protein	16130245	Periplasma	n. b.	n. b.
E	ArtI	Arginin-Transportsystem, periplasmatisches Bindeprotein	16128831	Periplasma	n. b.	n. b.
J	AsnS	Asparagin-tRNA-Synthase	16128897	Zytoplasma	n. b.	n. b.
C	AtpA	membrangebundene ATP-Synthase, F1-Sektor, α -Untereinheit	16131602	Membran	n. b.	n. b.
C	AtpD	membrangebundene ATP-Synthase, F1-Sektor, β -Untereinheit	16131600	Membran	n. b.	n. b.
F	CpdB	2'-Phosphodiesterase 2':3'-zyklischer Nukleotide	16132035	Zytoplasma	n. b.	n. b.
G	Crr	PTS-System, Glukose-spezifische IIA-Komponente	16130343	Zytoplasma	n. b.	n. b.
K	CspC	Kälteschockprotein	16129777	Zytoplasma	7397,76	6,54
E	CysK	Cystein-Synthase A, O-Acetylserin-Sulphydrolase A	16130340	Zytoplasma	34468,30	5,83
F	DeoD	Purin-Nukleosid-Phosphorylase	16132201	Zytoplasma	25945,97	5,30
T	DksA	<i>dnaK</i> Suppressorprotein	16128138	Zytoplasma	17523,77	4,92
O	DnaK	Hitzeschockprotein Hsp70, Chaperon	16128008	Zytoplasma	69114,04	4,68
L	Dps	globaler Regulator unter Mangelbedingungen	16128780	Zytoplasma	18695,33	5,67
R	Eco	Ecotin, ein Serinprotease-Inhibitor	16130146	Periplasma	18180,40	6,60
J	EF-P	Elongationsfaktor P	16131972	Zytoplasma	n. b.	n. b.

VIII.Anhang

Tab. 20: Liste aller identifizierten Proteine des Überstandes (Fortsetzung)

COG	Protein	Funktion	Accession NCBI	Kompartiment	Mw (Da)	pI
G	Eno	Enolase	16130686	Zytoplasma	45654,02	5,20
I	FadL	Transport von langkettigen Fettsäuren	16130277	Membran	n. b.	n. b.
G	FbaA	Fruktose-biphosphat-Aldolase, Klasse II	16130826	Zytoplasma	39143,30	5,47
N	FimA	Hauptstrukturuntereinheit der Typ 1-Fimbrien	48994873	Fimbrien	n. b.	n. b.
N	FlgG	“cell-distal portion of basal-body rod”	16129041	Flagelle	27743,93	4,52
N	FlgL	Flagellenbiosynthese, „hook-filament junction protein“	16129046	Flagelle	34281,12	4,48
N	FlgM	Anti-FliA (anti-Sigmafaktor), auch RflB Protein	16129034	Zytoplasma	10334,31	5,29
N	FliC	Flagellenbiosynthese, Flagellin, Strukturprotein des Filaments	16129870	Flagelle	51295,02	4,34
N	FliD	„filament capping protein“	16129871	Flagelle	48456,49	4,67
J	EF-G	Elongationsfaktor G, GTP-bindendes Protein	16131219	Zytoplasma	77578,44	5,11
E	GadB	Glutamat-Decarboxylase-Isoenzym	16129452	Zytoplasma	77578,44	5,11
G	GapA	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase A	16129733	Zytoplasma	35529,53	6,74
E	GlyA	Serin-Hydroxymethyltransferase	16130476	Zytoplasma	45313,66	6,03
G	Gnd	Glukonat-6-phosphat-Dehydrogenase, decarboxylierend	16129970	Zytoplasma	n. b.	n. b.
G	GpmA	Phosphoglyceromutase 1	16128723	Zytoplasma	28556,42	5,80
O	GroEL	GroEL, Hitzeschockprotein Hsp60, Chaperon	16131968	Zytoplasma	57325,98	4,69
O	GroES	GroES, 10 Kd Chaperon, bindet an Hsp60	16131967	Zytoplasma	10380,58	5,15
n.f.	HdeA	konserviertes Protein, putatives Chaperon, Säureresistenz	1789926	Periplasma	11823,18	5,39
n.f.	HdeB	hypothetisches Protein, Säureresistenz	16131381	nicht bekannt	12514,22	6,55
E	HisJ	Histidin-Transportprotein	16130244	Periplasma	28483,00	n. b.
Q	HlyA	Hämolysin A, Zytotoxin	24528030	Zytotoxin	110302,00	5,30
O	HtpG	Hitzeschockprotein Hsp90, Chaperon, Hsp C 62,5	16128457	Zytoplasma	n. b.	n. b.
C	IcdA	Isocitrat-Dehydrogenase, spezifisch für NADP ⁺	16129099	Zytoplasma	n. b.	n. b.

VIII.Anhang

Tab. 20: Liste aller identifizierten Proteine des Überstandes (Fortsetzung)

COG	Protein	Funktion	Accession NCBI	Kompartiment	Mw (Da)	pI
G	LamB	Maltoporin, Hochaffinitätsrezeptor für Maltose und Maltose-Oligosaccharide	16131862	Membran	n. b.	n. b.
C	LpdA	Lipoamid-Dehydrogenase (NADH)	16128109	Zytoplasma	n. b.	n. b.
G	MalE	periplasmatisches Maltose-bindendes Protein	16131860	Periplasma	43387,69	5,42
n. f.	MalM	periplasmatisches Protein des <i>mal</i> Regulons	16131863	Periplasma	n. b.	n. b.
C	mdh	Malat-Dehydrogenase	16131126	Zytoplasma	32317,21	5,61
G	MglB	Galaktose-Transportprotein, Rezeptor für Galaktosetaxis	16130088	Periplasma	35712,63	5,61
P	ModA	Molybdat-bindendes periplasmatisches Protein, Permease	16128731	Periplasma	n. b.	n. b.
M	NmpC	äußeres Membranporin, Locus für <i>qsr</i> Prophagen	16128536	Membran	n. b.	n. b.
M	OmpA	äußeres Membranprotein 3a (II*;G;d)	16128924	Membran	37198,79	5,98
M	OmpC	äußeres Membranprotein 1b (Ib;c)	16130152	Membran	40368,14	4,43
M	OmpX	äußeres Membranprotein X	16128782	Membran	18590,92	6,56
E	OppA	periplasmatisches Oligopeptid-Transportprotein	16129204	Periplasma	60896,99	6,04
n. f.	ORF1151	putative Komponente eines Prophagen	26249005	nicht bekannt	n. b.	n. b.
n. f.	ORF22 ₁	hypothetisches Protein, PAI I ₅₃₆	24528005	nicht bekannt	20381,00	5,77
N	ORF36 ₁	Hauptstrukturuntereinheit der putativen CS12-ähnlichen Fimbrien, PAI I ₅₃₆	24528018	Fimbrien	20375,10	4,90
P	ORF47 ₁	putatives periplasmatisches Protein, PAI I ₅₃₆	16130657	Periplasma	n. b.	n. b.
O	OsmC	osmotisch induzierbares Protein	16129441	Zytoplasma	15078,66	5,57
R	OsmY	„hyperosmotically inducible periplasmic protein“	16132194	Periplasma	21073,74	6,39
C	PckA	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase	16131280	Zytoplasma	n. b.	n. b.
G	Pgk	Phosphoglyceratkinase	16130827	Zytoplasma	41115,25	4,94
E	PotD	periplasmatisches Spermidin/Putrescin-Transportprotein	16129086	Periplasma	n. b.	n. b.
E	PotF	periplasmatisches Putrescin-bindendes Protein, Permease	16128822	Periplasma	n. b.	n. b.
N	PrfA	Hauptstrukturuntereinheit der Prf-Fimbrien, PAI II ₅₃₆	23954219	Fimbrien	n. b.	n. b.

VIII.Anhang

Tab. 20: Liste aller identifizierten Proteine des Überstandes (Fortsetzung)

COG	Protein	Funktion	Accession NCBI	Kompartiment	Mw (Da)	pI
P	PstS	periplasmatische Komponente eines Phosphat-spezifischen Hochaffinitäts-Transportsystem	16131596	Periplasma	37001,09	8,39
G	PtsH	Protein des PTS-Systems, HPr	16130341	Zytoplasma	9113,74	5,65
F	PurA	Adenylsuccinat-Synthase	16131999	Zytoplasma	47341,00	5,19
G	RbsB	D-Ribose-bindendes periplasmatisches Protein	16131619	Periplasma	n. b.	n. b.
J	RplI	50S ribosomale Untereinheit L9	16132025	Zytoplasma	15759,48	6,17
K	RpoA	RNA-Polymerase, α -Untereinheit	16131174	Zytoplasma	36507,75	4,83
N	SfaA	Hauptstrukturuntereinheit der Sfa-Fimbrien, PAI III ₅₃₆	28316230	Fimbrien	n. b.	n. b.
P	SodA	Superoxid-Dismutase, Mangan	16131748	Zytoplasma	23342,42	6,51
P	SodB	Superoxid-Dismutase, Eisen	16129614	Zytoplasma	21264,78	5,54
P	SodC	Superoxid-Dismutase Kupfer-Zink	16129604	Periplasma	17669,98	5,95
C	SucB	2-Oxoglutarat-Dehydrogenase (Komponente der Dihydrolipoyltranssuccinase E2)	16128702	Zytoplasma	n. b.	n. b.
C	SucC	Succinyl-CoA-Synthase, β -Untereinheit	16128703	Zytoplasma	n. b.	n. b.
C	SucD	Succinyl-CoA-Synthase, α -Untereinheit	16128704	Zytoplasma	29758,54	6,32
O	SurA	„survival protein“	16128047	Membran	n. b.	n. b.
G	TalB	Transaldolase B	16128002	Zytoplasma	n. b.	n. b.
O	Tig	Triggerfaktor, molekulares Chaperon bei der Zellteilung	16128421	Zytoplasma	n. b.	n. b.
N	TolB	periplasmatisches Protein der <i>tonB</i> -unabhängigen Aufnahme von Colicinen der Gruppe A	16128715	Periplasma	n. b.	n. b.
G	TpiA	Triosephosphat-Isomerase	16131757	Zytoplasma	26968,85	5,59
O	Tpx	Thiolperoxidase	16129285	Periplasma	17824,22	4,75
M	Tsx	Nukleosidkanal, Rezeptor für T6 Phagen und Colicin K	16128396	Membran	n. b.	n. b.
J	EF-Tu	Elongationsfaktor EF-Tu (Duplikat von <i>tufB</i>)	16131218	Zytoplasma	43280,61	5,18
F	Udp	Uridin-phosphorylase	16131680	Zytoplasma	27156,13	5,79

Tab. 20: Liste aller identifizierten Proteine des Überstandes (Fortsetzung)

COG	Protein	Funktion	Accession NCBI	Kompartiment	Mw (Da)	pI
G	UgpB	sn-Glycerol-3-phosphat Transportsystem, periplasmatisches Bindeprotein	16131325	Periplasma	n. b.	n. b.
F	UshA	UDP-Zucker-hydrolase (5'-Nukleotidase)	16128464	Zytoplasma	n. b.	n. b.
R	WrbA	Trp-Repressor-bindendes Protein; beeinflusst die Verbindung von Trp Repressor und Operator	16128970	Zytoplasma	20845,60	5,53
S	YbiS	hypothetisches Protein	16128787	nicht bekannt	33304,17	5,99
Q	YcaC	putatives Enzyme mit Cystein-Hydrolase Domäne	16128864	nicht bekannt	23098,33	5,08
P	YcdO	hypothetisches Protein	16128982	nicht bekannt	41138,00	n. b.
E	YdcS	putatives Transportprotein	16129399	Periplasma	42295,00	n. b.
M	YehZ	putative Permease eines Transportsystems	16130069	Periplasma	32609,00	n. b.
J	YfiA	putativer <i>yhbH</i> sigma 54 Modulator	16130518	Zytoplasma	12776,63	6,20
S	YggE	putatives Aktin	16130823	nicht bekannt	26635,00	n. b.
S	YgiW	hypothetisches Protein	16130920	nicht bekannt	14002,06	5,08
R	YhdH	putative Dehydrogenase	16131141	nicht bekannt	34701,89	5,63
S	YifE	hypothetisches Protein	16131624	nicht bekannt	13125,44	6,10
R	YjjK	putative ATP-bindende Komponente eines Transportsystems	16132208	Zytoplasma	62404,27	5,43
G	YtfQ	putativer Transkriptionsregulator vom LACI-Typ	16132049	Periplasma	n. b.	n. b.

n. b.: nicht bestimmt

6. Publikationen und Tagungsbeiträge

K. Lindner, U. Dobrindt, G. Nagy, L. Emödy, S. Engelmann, D. Albrecht, M. Hecker und J. Hacker. The ATP-dependent protease ClpXP affects the expression and regulation of virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. Proteomics, **Manuskript eingereicht.**

N. J. Holden, M. Totsika, E. Mahler, A. J. Roe, K. Catherwood, K. Lindner, U. Dobrindt und D. L. Gally. Demonstration of regulatory cross-talk between P-fimbriae and type 1 fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. Microbiology, **Manuskript eingereicht.**

C. Beloin, K. Michaelis, K. Lindner, P. Landini, J. Hacker, J.-M. Ghio und U. Dobrindt. The transcriptional antiterminator RfaH represses biofilm formation in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., **Manuskript in Revision.**

H. Schneider, F. Thürmer, J.J. Zhu, N. Wistuba, P. Gessner, K. Lindner, B. Herrmann, G. Zimmermann, W. Hartung, F.-W. Bentrup und U. Zimmermann (1999). Diurnal changes in xylem pressure of the hydrated resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia*: evidence for lipid bodies in conducting xylem fessels. **New Phytol.** **143**, 471-484.

K. Lindner, U. Dobrindt und J. Hacker. Role of *clpX* for expression of virulence associated genes of uropathogenic *Escherichia coli* 536. Posterpräsentation auf der VAAM-Jahrestagung in Braunschweig, März 2004.

7. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Karin Anna Lindner
geboren am: 2. August 1969 in Rothenburg ob der Tauber

Schulbildung

1975 - 1979 Grundschule in Rothenburg/Tbr.
1979 - 1988 Gymnasium in Rothenburg/Tbr.
5/1988 Allgemeine Hochschulreife

Beruflicher Werdegang

05/1988 - 08/1989 Beschäftigung in der elterlichen Glaserei
09/1989 - 07/1991 Besuch der PTA-Lehranstalt in Würzburg
09/1991 - 02/1992 Praktikum in der Löwen-Apotheke, Rothenburg/Tbr.
03/1992 Erhalt der Erlaubnis für pharmazeutisch-technische Assistenten
05/1992 - 10/1994 als PTA in der St. Georgs-Apotheke, Würzburg beschäftigt

Hochschulausbildung

11/1994 - 12/2000 Studium der Biologie und Chemie für das Lehramt an Gymnasien an der Universität Würzburg
12/2000 Erste Staatsprüfung für das Lehramt an Gymnasien
Thema der Staatsexamensarbeit: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Wiederbefüllungsmechanismus der afrikanischen Auferstehungspflanze *Myrothamnus flabellifolius*
01/2001 - 6/2001 nebenberufliche wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Biotechnologie, Universität Würzburg
seit 7/2001 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg, zur Anfertigung der Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. Dr. h. c. mult. J. Hacker