

Untersuchungen zur Molekularbiologie von *Escherichia coli*-Wildstämmen

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

vorgelegt von
Stefan Homburg
aus
Kassel

Würzburg 2007

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

- | | |
|---------------|-------------------------|
| 1. Gutachter: | Prof. Dr. Jörg Hacker |
| 2. Gutachter: | Prof. Dr. Joachim Reidl |
| 3. Gutachter: | Dr. Ulrich Dobrindt |

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Gemäß § 4 Abs. 3 Ziff. 3, 5 und 8 der Fakultät für Biologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Dissertation hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Ich erkläre weiterhin, dass ich bisher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg,

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den vielen Menschen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Jörg Hacker für die Bereitstellung von Thema und Arbeitsplatz sowie für sein Interesse am Fortschritt meiner Arbeit, seine Anregungen und stete Diskussionsbereitschaft
- Dr. Ulrich Dobrindt für seine kompetente Anleitung und Betreuung, seine Anregungen und Kritik, seine Geduld und Hilfsbereitschaft sowie das große jährliche Grünkohlessen
- Prof. Dr. Joachim Reidl für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens
- Dr. Eric Oswald und Jean-Philippe Nougayrède, INRA – ENVT, Toulouse, für die fruchtbare Kooperation sowie ihre Anregungen und die Expertise in Sachen Zellbiologie
- Prof. Dr. Jörn Piel, Universität Bonn, für die initiale Analyse des PKS/NRPS-Genclusters und die Berechnung der möglichen Struktur des Peptid-Polyketids
- allen Mitgliedern des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie und des Zentrums für Infektionsforschung für ihre stete Hilfsbereitschaft und die gute Atmosphäre
- den Mitgliedern des Graduiertenkollegs 587/2 für die nicht nur wissenschaftlichen Exkurse
- der ganzen *E. coli*-Arbeitsgruppe für das freundliche Miteinander und die allzeit gute Stimmung, besonders meinen Laborkolleginnen Mella, Karin und Claudia für die lustige Zeit zusammen
- Claudia, Suse, Barbara, Martin und Matthias für Gans, Ente, Kaninchen, Fußball, Poker, Kino, Mittagessen, Kaffeetrinken und so vieles mehr ...
- meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung und ihre Aufmunterungen in schwierigen Phasen
- Doris für ihre Liebe

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung, Summary	1
2 Einleitung	5
2.1 Bakterielle Besiedelung des menschlichen Organismus	5
2.2 Medizinischer Einsatz von Mikroorganismen	6
2.3 Die Spezies <i>Escherichia coli</i>	7
2.3.1 <i>E. coli</i> Nissle 1917	8
2.4 Fitness und Virulenz von <i>E. coli</i>	11
2.5 Bakterielle Toxine, die den eukaryotischen Zellzyklus beeinflussen	15
2.6 Polyketide und nichtribosomale Peptide	17
2.7 Zusammensetzung bakterieller Genome	21
2.8 Aufgabenstellung und Zielsetzung	23
3 Material	25
3.1 Bakterienstämme	25
3.2 Plasmide und Vektoren	27
3.3 Oligonukleotide	28
3.4 Chemikalien, Enzyme und Kits	28
3.5 Medien und Zusätze	30
3.6 Puffer und Lösungen	31
3.7 Geräte und Verbrauchsmaterialien	33
4 Methoden	35
4.1 Kultur von Bakterien	35
4.1.1 Anzucht und Stammhaltung	35
4.1.2 Bestimmung des Wachstums in Flüssigkulturen	35
4.1.3 Phänotypische Charakterisierung	35
4.2 Zellkultur	36
4.2.1 Propagation von Zelllinien	36
4.2.2 Kokultur von HeLa-Zellen mit <i>E. coli</i> -Stämmen	36
4.3 Allgemeine molekularbiologische Methoden	36
4.3.1 Isolierung genomischer DNA aus <i>E. coli</i>	36
4.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	37
4.3.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>E. coli</i> und RT-PCR	37
4.3.4 Bestimmung von Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen	38
4.3.5 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)	38
4.3.6 Enzymatische Hydrolyse von DNA	39
4.3.7 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren im Agarosegel	40
4.3.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	40
4.3.9 Klonierung von DNA	40

4.3.10	Transformation von <i>E. coli</i> -Stämmen	41
4.3.11	Konjugation von <i>E. coli</i> -Stämmen	42
4.3.12	DNA-Sequenzierung	42
4.3.13	Hybridisierungsanalysen	43
4.4	Konstruktion von Plasmiden	43
4.4.1	pGEM-T Easy <i>npt</i> -P _{tet}	43
4.4.2	pASK75-1943	44
4.4.3	pASK75-1960	44
4.4.4	pASK75-4711/1960	44
4.4.5	pFuseA- <i>npt</i>	44
4.4.6	pGEM-T Easy 673, 463, 445 und 235	45
4.5	Genetische Manipulationen von <i>E. coli</i> -Stämmen	45
4.5.1	Transposon-Mutagenese von <i>E. coli</i> Nissle 1917	45
4.5.2	Herstellung von <i>E. coli</i> -Deletionsmutanten	46
4.5.3	Promotoraustausch in <i>E. coli</i> -Stämmen	47
4.5.4	Herstellung von Reporterfusionen	48
4.6	Induktion von <i>clbA</i> , <i>clbB</i> , <i>clbQ</i> und <i>clbR</i> in der Zellkultur	49
4.7	Bestimmung der Promotoraktivitäten von <i>clbA</i> , <i>clbB</i> , <i>clbQ</i> und <i>clbR</i> mittels <i>lux</i> -Reporterfusionen	49
4.8	Computergestützte Analysen	49
5	Ergebnisse	51
5.1	Untersuchung des multizellulären Phänotyps von <i>E. coli</i> Nissle 1917	51
5.1.1	Inaktivierung von <i>csgBA</i> , <i>csgD</i> und <i>yaiC</i>	51
5.1.2	Einfluss der Mutationen auf den Morphotyp	52
5.1.3	Transposon-Mutagenese des Stammes <i>E. coli</i> Nissle 1917	53
5.2	Charakterisierung eines Polyketidsynthase-Genclusters in <i>E. coli</i> Nissle 1917	61
5.2.1	Das PKS/NRPS-Gencluster im chromosomalen Kontext	61
5.2.2	Verbreitung der PKS/NRPS-Gene in <i>E. coli</i>	62
5.2.3	Nachweis eines zytopathischen Effektes des Polyketids auf eukaryotische Zellen	63
5.2.4	Sequenzanalyse der <i>asnW</i> -Insel	65
5.2.5	Deletion der <i>asnW</i> -Insel	69
5.2.6	Reduktion der Größe von pBAC _{pks11}	70
5.2.7	Transkriptionsanalyse der <i>asnW</i> -Insel	71
5.2.8	Induktion der Polyketid-Synthese	75
5.2.9	Verwendung von Luziferase-Fusionen zur Untersuchung der Transkriptionsaktivität im PKS/NRPS-Gencluster	79
6	Diskussion	91
6.1	Untersuchung des <i>rdar</i> -Morphotyps von <i>E. coli</i> Nissle 1917	91
6.1.1	Biofilmbildung bei <i>E. coli</i>	91
6.1.2	Transposon-Mutagenese zur Identifizierung eines übergeordneten <i>rdar</i> -Regulators	93
6.1.3	Regulation von Curli- und Zelluloseexpression in <i>E. coli</i> Nissle 1917	97
6.2	Analyse des PKS/NRPS-Genclusters	99

6.2.1	Polyketide und nichtribosomale Peptide in <i>E. coli</i>	99
6.2.2	Aufbau und Domänenstruktur der PKS- und NRPS aus <i>E. coli</i>	99
6.2.3	Bedeutung der zusätzlichen Genprodukte im PKS/NRPS-Cluster	101
6.2.4	Putative Struktur der bioaktiven Komponente	103
6.2.5	Expression und Induktion der PKS/NRPS-Gene	104
6.2.6	Mögliche regulatorische Mechanismen bei der PK/NRP-Synthese	106
6.2.7	Biologische Funktion des Peptid-Polyketids <i>in vivo</i>	112
6.3	Beitrag von <i>rdar</i> -Morphotyp und PK/NPR-Synthese zur Fitness von <i>E. coli</i> Nissle 1917	114
6.4	Fazit und Ausblick	115
7	Literaturverzeichnis	117
A	Anhang	129
A.1	Abkürzungsverzeichnis	129
A.2	Oligonukleotide	130
A.3	Plasmidkarten	134
A.4	Polyketid-Gencluster aus <i>E. coli</i> IHE3034	137
A.5	Verbreitung der <i>asnW</i> -Insel innerhalb der ECOR-Stammsammlung	138
A.6	Promotor-Vorhersage	139
A.7	Klonierung des intergenischen Bereichs zwischen <i>clbB</i> und <i>clbR</i>	142
A.8	Wachstumskurven der Reportergen-Stämme	143
A.9	Luciferaseaktivität im Vergleich mit Kontrollstamm	145
A.10	Publikationen und Tagungsbeiträge	146
A.11	Lebenslauf	147

Abbildungsverzeichnis

1	Überblick über die verschiedenen Wirkungsweisen von <i>E. coli</i> Nissle 1917	9
2	Fitnessfaktoren von <i>E. coli</i> Nissle 1917	10
3	Regulation des <i>rdar</i> -Morphotyps	11
4	Bakterielle Zyklomoduline und ihr Einfluss auf den eukaryotischen Zellzyklus	16
5	Beispiele für bedeutsame Polyketide und nichtribosomale Petide	18
6	Funktion und Mechanismus der katalytischen und Träger-Domänen in PKS und NRPS	19
7	Zusammenstellung möglicher modifizierender Domänen in PKS und NRPS	20
8	Verteilung horizontal erworbener DNA in sequenzierten bakteriellen Genomen	22
9	Marker für die Elektrophorese	29
10	Schematische Darstellung des λ -Red-Rekombinase vermitteltem Allelaustauschs	46
11	Verifikation der <i>csgBA</i> -, <i>yaiC</i> und <i>csgD</i> -Mutanten von <i>E. coli</i> Nissle 1917	52
12	Phänotypen verschiedener Mutanten von <i>E. coli</i> Nissle 1917 auf Kongorot- und Calcofluor-Agar	53
13	Einzelkolonien aus der Transposon-Bibliothek auf Kongorot-Agar	54
14	Beispiele wiederholt auftretender Nicht-Wildtyp-Phänotypen nach der Transposon-Mutagenese	54
15	Southern-Hybridisierungsexperiment zum Nachweis zufälliger Transposon-Integrationen	55
18	Nachweis der Zelluloseproduktion auf Calcofluor-Agar	55
16	Schematische Darstellung der inversen PCR	56
17	Inverse PCR von 28 zufällig ausgewählten Transposon-Insertionsmutanten	56
19	Analyse der chromosomalen Lokalisation des PKS/NRPS-Genclusters in <i>E. coli</i> CFT073	62
20	Nachweis des zytopathischen Effekts	64
21	Vergleich der <i>Repeat</i> -Regionen von <i>E. coli</i> CFT073 und IHE3034	66
22	Schematische Darstellung der Strategie zur Deletion der <i>asnW</i> -Insel	70
23	Nachweis der Deletion der <i>asnW</i> -Insel aus dem Chromosom	70
24	Deletion und Komplementation der <i>asnW</i> -Insel	71
25	Vergleichende Transkriptmengenanalyse der <i>clb</i> -Gene unter verschiedenen Kulturbedingungen	72
26	Vergleichende Transkriptmengenanalyse der <i>clb</i> -Gene in Standard- und Kokultur	73
27	Vergleichende Transkriptmengenanalyse zwischen <i>E. coli</i> Nissle 1917 und CPE-negativer Mutante	73
28	Vergleichende Transkriptmengenanalyse von <i>E. coli</i> Nissle 1917 in Standard- und Kokultur	74
29	Transkriptionseinheiten der <i>asnW</i> -Insel	75

30	Schematische Darstellung der Strategie zur Insertion konstitutiver Promotoren	76
31	Nachweis der Induktion von <i>clbQ</i>	76
32	Promotorinsertionen im Bereich von <i>clbB</i> bis <i>clbA</i> und Nachweis der Induktion	77
33	Wiederherstellung des zytopathischen Effekts in CPE-negativem <i>E. coli</i> Nissle 1917	78
34	Wiederherstellung des zytopathischen Effekts in <i>E. coli</i> 536	79
35	Schematische Darstellung der Strategie zur Herstellung von Luziferase-Reporterfusionen	81
36	Relevanter Sequenzkontext bei der Herstellung von Reporterfusionen	81
37	Visualisierung der Luziferaseaktivität	83
38	Transkriptionsniveaus von <i>clbQ</i> , <i>clbB</i> , <i>clbR</i> und <i>clbA</i> in LB, schüttelnd	83
39	Transkriptionsniveaus von <i>clbQ</i> , <i>clbB</i> , <i>clbR</i> und <i>clbA</i> in LB, stehend	84
40	Transkriptionsniveaus von <i>clbQ</i> , <i>clbB</i> , <i>clbR</i> und <i>clbA</i> in DMEM, schüttelnd	85
41	Transkriptionsniveaus von <i>clbQ</i> , <i>clbB</i> , <i>clbR</i> und <i>clbA</i> in DMEM, stehend	85
42	Transkriptionsniveaus von <i>clbQ</i> , <i>clbB</i> , <i>clbR</i> und <i>clbA</i> in M63-Medium, schüttelnd	86
43	Transkriptionsniveaus von <i>clbQ</i> , <i>clbB</i> , <i>clbR</i> und <i>clbA</i> in M63-Medium, stehend	87
44	Transkriptionsniveaus von <i>clbQ</i> , <i>clbB</i> , <i>clbR</i> und <i>clbA</i> unter Eisenmangel	87
45	Transkriptionsniveaus von <i>clbA</i> und <i>clbR</i> in Wildtyp und CPE-negativem Klon von <i>E. coli</i> Nissle 1917	88
46	Transkriptionsniveaus von <i>clbQ</i> , <i>clbB</i> , <i>clbR</i> und <i>clbA</i> in Kokultur mit HeLa-Zellen	89
47	Modell zur Regulation der Zellulosesynthese in <i>Salmonella</i> und <i>E. coli</i>	93
48	Schematische Darstellung der Biosynthese von Yersiniabactin	100
49	Putative Struktur des Peptid-Polyketids	104
50	Modell der post-transkriptionalen Regulation der Genexpression durch BarA/UvrY und CsrA/CsrB	110
51	pGEM-T Easy <i>npt-P_{tet}</i>	134
52	pFuseA- <i>npt</i>	134
53	pASK-4711/1960	135
54	pASK-1960	135
55	pASK-1943	136
56	Polyketid-Gencluster aus <i>E. coli</i> IHE3034	137
57	Verbreitung der <i>asnW</i> -Insel innerhalb der ECOR-Stammsammlung	138
58	Darstellung des intergenischen Bereichs zwischen <i>clbB</i> und <i>clbR</i>	142
59	Wachstum der Reporterger-Stämme 1	143
60	Wachstum der Reporterger-Stämme 2	144
61	RLU der Reportergerfusionen im Vergleich zur Kontrolle	145

Tabellenverzeichnis

1	<i>E. coli</i> -Pathogruppen und deren dominierende Virulenzfaktoren	13
2	Pathogenitätsinseln von <i>E. coli</i> 536	23
3	Bakterienstämme	25
4	Plasmide und Vektoren	27
9	Aus der Transposon-Mutagenese hervorgegangene, nicht-wildtypische Phänotypen	57
10	Verbreitung der PKS/NRPS-Gene in verschiedenen <i>E. coli</i> -Varianten	63
11	Domänenstruktur der Polyketidsynthetasen und nichttribosomalen Peptidsynthetasen	67
12	Potentielle karzinogene Eigenschaften bakterieller Toxine	114
13	Oligonukleotide und deren Verwendungszwecke	130
14	Putative Promotoren der <i>asnW</i> -Insel	139

1 Zusammenfassung

Eine eindeutige Unterscheidung zwischen extraintestinal pathogenen (ExPEC) und kommensalen *E. coli*-Stämmen zu treffen, fällt häufig schwer, da Virulenz-assoziierte Faktoren von ExPEC auch in kommensalen Stämmen gefunden werden können. Daher ist die Funktion solcher Eigenschaften oft nicht eindeutig geklärt und könnte sowohl mit Virulenz als auch mit allgemeiner Fitness in Zusammenhang stehen.

Als naher Verwandter des uropathogenen Isolates *E. coli* CFT073 weist der apathogene, kommensale Stamm *E. coli* Nissle 1917 (O6:K5:H1) die Expression einer Vielzahl solcher „ExPEC-Virulenzfaktoren“ auf. Dazu gehören verschiedene Fimbrien, Siderophore und Proteine, die an der Biofilmbildung beteiligt sind. Der Vergleich des Stammes mit ExPEC-Isolaten lässt daher Rückschlüsse auf die Funktion dieser Faktoren im jeweiligen ökologischen Kontext zu.

E. coli Nissle 1917 bildet den sog. *rdar*-Morphotyp aus, eine multizelluläre Struktur, die auf der Koexpression von Zellulose und Curli-Fimbrien beruht. Dieser findet sich bei vielen *E. coli* und *Salmonella*-Spezies, tritt aber in der Regel nur bei Temperaturen ≤ 30 °C auf. *E. coli* Nissle 1917 hingegen weist diesen Phänotyp auch bei 37 °C auf, was vermutlich die Kolonisierungsfähigkeit gegenüber anderen kommensalen *E. coli* erhöht.

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass die Expression des *rdar*-Morphotyps bei *E. coli* Nissle 1917 unabhängig von den bisher beschriebenen Regulatoren CsgD und YaiC ist. Daher wurde mittels Mutagenese mit dem Transposon miniTn5 nach *rdar*-negativen Klonen gesucht mit dem Ziel, einen möglichen übergeordneten Regulator dieses Phänotyps zu identifizieren. Bei dieser Untersuchung wurden einige Gene ermittelt, deren Inaktivierung zwar nicht die erwünschte *rdar*-negative Kolonieform zur Folge hatte, die jedoch bislang nicht dafür bekannt waren, die Expression von Zellulose oder Curli-Fimbrien zu beeinflussen. Während die Funktion vieler der ermittelten ORFs unbekannt war, hatte vor allem die Inaktivierung von Genen, die an der Biosynthese von Oberflächenstrukturen (Fimbrien, Kapsel, Colansäure, LPS) einen veränderten Phänotyp zur Folge. Allerdings konnte in den wenigsten Fällen ein Zusammenhang zu Curli- oder Zellulosesynthese hergestellt werden. Es zeigte sich, dass die Regulation des *rdar*-Morphotyps offenbar komplexer und von mehr Faktoren zumindest indirekt abhängig ist, als bislang beschrieben.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde eine 55 kb große genomische Insel untersucht, die im

asnW-tRNA-Lokus inseriert ist und die Proteine für die Synthese eines hybriden nichtribosomalen Peptid-Polyketids kodiert. Die Insel konnte mittels PCR in extraintestinal pathogenen sowie kommensalen Isolaten der phylogenetischen Gruppe B2 nachgewiesen werden, darunter die Stämme *E. coli* Nissle 1917, IHE3034, CFT073 und J96. Eine Kokultivierung von HeLa-Zellen mit diesen Bakterien hatte eine Blockierung des Zellzyklus und Megalozytose (zytopathischer Effekt) zur Folge. Die Deletion der *asnW*-Insel führte zur Aufhebung des zytopathischen Phänotyps, der durch Einbringen des Genclusters auf einem BAC-Vektor wieder hergestellt werden konnte. Der zytopathische Effekt konnte nur nach direktem Kontakt der Bakterien mit HeLa-Zellen beobachtet werden und war weder durch Bakterienlysate, abgetötete Bakterien oder Kulturüberstände zu erzielen.

Das PKS/NRPS-Gencluster umfasst 18 ORFs (*clbA* bis *clbR*), von denen 17 an der Synthese der aktiven Komponente beteiligt sind. Die Anzahl der Genprodukte und die Abfolge der putativen Domänen unterscheidet sich dabei von allen bislang beschriebenen PKS/NRPS-Systemen. Untersuchungen zur Transkription ergaben drei monocistronisch und vier teilweise sehr große (bis 23 kb) polycistronisch transkribierte Einheiten aus bis zu sechs ORFs. Zudem konnte eine konstitutive Transkription aller ORFs festgestellt werden, wenngleich in unterschiedlicher Stärke. Nach Kontakt mit HeLa-Zellen wurde keine erhöhte Transkription oder Promotoraktivität einzelner ORFs festgestellt. Daher scheint die Kontaktabhängigkeit des zytopathischen Effekts nicht auf einer durch HeLa-Zellen hervorgerufenen Induktion der PKS/NRPS-Expression zu beruhen.

Die Kontaktabhängigkeit konnte durch die Induktion bzw. Überexpression einer PKS/NRPS (*clbB*), den putativen Schlüsselenzymen Thioesterase (*clbQ*) und Phosphopantetheinyl-Transferase (*clbA*) oder dem möglichen Regulator *clbR* nicht überwunden werden.

Mittels Luziferase-Reporterfusionen konnte ein Einfluss unterschiedlicher Medien und Kulturbedingungen auf die Promotoraktivität einzelner Gene festgestellt werden. Dies wurde auf den Einfluss des BarA/UvrY-Zweikomponentensystems zurückgeführt, welches über CsrA/CsrBC den Kohlenstoff-Metabolismus von *E. coli* post-transkriptional reguliert. Die natürliche *uvrY*-Deletionsmutante UPEC 536 wies trotz des Besitzes des kompletten PKS/NRPS-Genclusters keinen zytopathischen Effekt auf. Dieser konnte jedoch durch Komplementation mit *uvrY* wieder hergestellt werden. Dies ist der erste Hinweis für einen außerhalb der *asnW*-Insel liegenden Regulationsmechanismus der PK/NRP-Synthese. Die Funktion des Peptid-Polyketids *in vivo* bleibt weiterhin unklar und könnte sowohl Fitness als auch Virulenz von *E. coli* beeinflussen.

Summary

In many cases, it is difficult to draw a clear distinction between extraintestinal pathogenic (ExPEC) and commensal *E. coli* strains as virulence-associated factors of ExPEC can also be found in commensal strains. Thus, the function of those traits often cannot be clarified unequivocally and could be linked to virulence as well as to general fitness.

Being closely related to the uropathogenic strain CFT073 *E. coli* Nissle 1917 (O6:K5:H1) exhibits expression of several of such “ExPEC virulence factors”. Belonging to those are various fimbriae, siderophores, and proteins involved in biofilm formation. Therefore, the comparison of ExPEC isolates and *E. coli* Nissle 1917 can reveal insights into the function of these factors within the respective ecological context.

E. coli Nissle 1917 exhibits the so-called *rdar* morphotype, a multicellular structure based on the co-expression of cellulose and curli fimbriae. It can be found in many *E. coli* and *Salmonella* species, but is usually restricted to temperatures below 30 °C. However, *E. coli* Nissle 1917 features this phenotype also at 37 °C which might increase its colonization ability compared to other commensal *E. coli*. In the first part of this thesis, it could be demonstrated that expression of the *rdar* morphotype in *E. coli* Nissle 1917 is independent of the two regulators described so far, CsgD and YaiC. Thus, by applying transposon mutagenesis using miniTn5 it was screened for *rdar*-negative mutants. The aim was to discover a superordinate regulator of this phenotype. Though during this investigation the desired *rdar*-negative colony could not be detected, several genes were identified which so far had not been reported to influence expression of cellulose or curli fimbriae. While the function of many of the determined ORFs was unknown, the inactivation primarily of genes involved in the biosynthesis of surface structures (fimbriae, capsule, colanic acid, LPS) resulted in an altered phenotype. However, only in a few cases a connection to the biosynthesis of curli fimbriae or cellulose could be established. In conclusion, the regulation of curli and cellulose biosynthesis proved to be more complex and dependent – at least indirectly – on more factors than previously described.

In the second part of this thesis, a genomic island, 55 kb in size and inserted into the *asnW*-tRNA locus, was investigated, which encodes proteins necessary for the synthesis of a hybrid nonribosomal peptide-polyketide. By PCR the island was proven to be present in extraintestinal pathogenic as well as in commensal isolates of the phylogenetic group B2, among those the strains *E. coli* Nissle 1917, IHE3034, CFT073, and J96. Cocultivation of HeLa cells with

those bacteria induced cell cycle arrest and megalocytosis (cytopathic effect). Deletion of the *asnW* island resulted in abolition of the cytopathic effect, which could be restored by introduction of a BAC vector containing the gene cluster. The cytopathic effect was only observed after direct contact of the bacteria with HeLa cells and could not be achieved using bacterial lysates, killed bacteria or culture supernatants.

The PKS/NRPS gene cluster comprises 18 ORFs (*clbA* to *clbR*) of which 17 are involved in the synthesis of the active compound. The number of gene products and the sequence of putative domains differ from those of all PKS/NRPS systems described so far. Investigations on the transcription of the island revealed three monocistronically transcribed units and four polycistrons of sizes up to 23 kb. In addition, a constitutive transcription of every ORF was observed, albeit at variable levels. Upon cell contact, neither elevated transcription nor different promoter activities of single ORFs were observed. Thus, the contact dependence of the cytopathic effect does not seem to result from an induction of expression caused by HeLa cells.

The contact dependence could not be overcome by induction or overexpression of either a PKS/NRPS (*clbB*), the putative key enzymes thioesterase (*clbQ*) and phosphopantetheinyl transferase (*clbA*), or the potential regulator *clbR*.

Using luciferase reporter gene fusions an influence of diverse media and culture conditions on the promoter activities of single genes was detected. This was ascribed to the influence of the BarA/UvrY two-component system, which regulates the carbon metabolism of *E. coli* on the post-transcriptional level via CsrA/CsrBC. The natural *uvrY* deletion mutant UPEC 536, despite containing the complete PKS/NRPS gene cluster, did not exhibit a cytopathic effect. However, this feature could be restored by complementation with *uvrY*. This is the first evidence for a regulatory mechanism of the PK/NRP synthesis located beyond the *asnW* island. The *in vivo* function of the peptide-polyketide so far remains unclear, but it might affect fitness as well as virulence of *E. coli*.

2 Einleitung

2.1 Bakterielle Besiedelung des menschlichen Organismus

In gesunden Menschen sind die inneren Gewebe wie Blut, Hirn, Muskel, etc. in der Regel steril, während die oberflächlichen Gewebe wie Haut und Schleimhäute in ständigem Kontakt mit Mikroorganismen stehen und von bestimmten Spezies dauerhaft besiedelt werden. Die normale Flora des Menschen ist ausgesprochen komplex und besteht aus mehr als 400 bakteriellen Spezies. Ihre Zusammensetzung hängt von verschiedenen Faktoren wie Alter, Geschlecht, genetischen Anlagen, Ernährung, etc. ab, neben einigen eukaryotischen Pilzen und Protisten sowie methanogenen Archaea sind jedoch Bakterien der Hauptbestandteil der normalen Flora des Menschen (Todar, 2006).

Zwischen dem menschlichen Organismus und den ihn besiedelnden Bakterien bestehen in der Regel mutualistische Beziehungen, da sowohl Wirt als auch Bakterien von dieser Gemeinschaft profitieren. Die Bakterien erhalten von ihrem Wirt eine ständige Versorgung mit Nährstoffen sowie stabile Umweltbedingungen. Der Wirt auf der anderen Seite profitiert von der Bakterienflora durch bestimmte verdauungsfördernde Aktivitäten sowie vom Schutz vor Infektion mit pathogenen Spezies. Zudem stimuliert die bakterielle Besiedelung die Entwicklung und Aktivität des Immunsystems. Ist weder Nutzen noch Schaden durch die Präsenz bestimmter Bakterien zu erkennen, spricht man von Kommensalismus.

Neben der Haut, dem Respirationstrakt und dem Urogenitaltrakt beherbergt der Intestinaltrakt mit Abstand die meisten Bakterien. Hier finden sich mindestens 17 bakterielle Familien mit über 400 verschiedenen Arten. Die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft variiert zwischen den verschiedenen Regionen des Intestinaltraktes, oft mit einer engen Assoziation bestimmter Spezies zu bestimmten Geweben (Tropismus). Die Vielfalt und Gesamtzahl an Bakterien steigt vom Magen bis hin zum Colon an und beträgt dort ca. 10^{11} Bakterien/ml Stuhl, wobei die anaeroben Spezies *Bacteroides* und *Bifidobacterium* mit 10^{10} bzw. 10^9 Bakterien/ml dominieren (Hopkins *et al.*, 2002; Yan & Polk, 2004). Im Vergleich zu diesen findet sich *E. coli* hier in einer um den Faktor 10^3 bis 10^4 geringeren Anzahl. Weitere Spezies, die häufig in der Darmflora auftreten, sind *Lactobacillus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp. oder *Proteus mirabilis*.

Die bakterielle Flora des Intestinaltraktes hat verschiedene nutzbringende Effekte für den

menschlichen Wirt. Die metabolischen Fähigkeiten der Darmmikroflora sorgen für die Fermentation nicht absorbierter und unverdaulicher Nahrungsbestandteile wie Poly- und Oligosacchariden zu den drei kurzkettigen Fettsäuren Acetat, Propionat und Butyrat. Dadurch werden zusätzliche Energie und Nährstoffe für den Wirt freigesetzt sowie Wachstum und Vermehrung der Bakterien sichergestellt. Zudem spielen Darmbakterien eine Rolle in der Synthese von Vitaminen und der Absorption von Calcium, Magnesium und Eisen (Guarner & Malagelada, 2003). Eine wichtige Funktion der durch Bakterien produzierten kurzkettigen Fettsäuren ist ihr trophischer Effekt auf die Entwicklung intestinaler Epithelzellen, deren Proliferation und Differenzierung sie stimulieren. Zudem regen sie die schützenden Funktionen des Epithels und die Mucinproduktion an (Meier & Steuerwald, 2005). Auch bei der Entwicklung und Regulierung des Immunsystems besitzt die normale Darmflora eine wesentliche Aufgabe. Der ständige Dialog zwischen Bakterien und Wirt in der Darmschleimhaut führt zur Proliferation von Lymphozyten im Epithel sowie von Immunglobulin produzierenden Zellen in der *Lamina propria*. Da auch die normale Flora im Darm als Antigen wirkt, induziert sie eine schwache Antikörper-vermittelte Immunantwort. Die so generierten Antikörper sind auch gegen bestimmte verwandte Pathogene wirksam und können eine Infektion verhindern. Zudem stellen natürlich angesiedelte Bakterien eine Barriere für Pathogene dar indem sie mögliche Anheftungsorte im Epithel besetzt halten und das Nährstoffangebot limitieren. So werden die Proliferation und evtl. Invasion vorhandener Krankheitserreger stark eingeschränkt (Guarner & Malagelada, 2003).

2.2 Medizinischer Einsatz von Mikroorganismen

Mikroorganismen können eingesetzt werden, um die Gesundheit des Menschen zu verbessern. Ein Bakterium, das einen bestimmten gesundheitlichen Nutzen liefert, wenn es als Nahrungskomponente oder -ergänzung aufgenommen wird, bezeichnet man als probiotisch. Solche Stämme sind in der Lage, die Regeneration der normalen Darmflora unterstützen. In Patienten mit intestinalen Erkrankungen kann dies zur Linderung von Entzündungen und zur Verminderung der Infektionslast führen. Dazu müssen die Bakterien ihren Wirt nicht zwangsläufig dauerhaft besiedeln. Ein therapeutischer und physiologischer Effekt kann auch durch vorübergehenden Einsatz erzielt werden (Sartor, 2004).

Die nutzbringenden Effekte medizinisch wirksamer Bakterienstämme unterliegen einer Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen, die die Aufgaben der normalen Darmflora simulieren bzw. diese wieder herstellen. So können sie das Wachstum pathogener Bakterien inhibieren, indem sie den pH-Wert des Darmlumens (wieder) absenken, bakterizide Proteine

sezernieren, die Defensinproduktion des Epithels anregen oder den Wirt durch Besetzen bestimmter ökologischer Nischen kolonisierungsresistent machen. Auch Bindung an und Invasion in Epithelzellen wird in einigen Fällen verhindert. *Lactobacillus plantarum* induziert beispielsweise die Expression von MUC-2, einem Mucin-Glykoprotein, wodurch die Adhärenz von enteropathogenen *E. coli* vermindert wird. Probiotische Bakterien tragen wie die normale Flora zur Entwicklung und Integrität der Barrierefunktion der Schleimhaut bei, indem sie ebenfalls Substrate wie Butyrat produzieren und die Mukusproduktion anregen.

Verschiedene Bakterienstämme sind bisher erfolgreich gegen Durchfallerkrankungen, besonders bei Säuglingen und Kleinkindern eingesetzt worden. Hier zeigten vor allem *Lactobacillus*-Stämme sowohl präventiven Schutz als auch Wirkung gegen akute Beschwerden (Guarner & Malagelada, 2003). Gegen verschiedene chronische entzündliche Darmerkrankungen wie *Morbus Crohn* oder *Colitis ulcerosa* wurden Probiotika ebenfalls erfolgreich eingesetzt. Die Behandlungserfolge waren teilweise mit Standardtherapien vergleichbar, wobei sich besonders der kommensale *E. coli*-Stamm Nissle 1917 als therapeutisch sehr wirksam erwies (Sartor, 2005).

2.3 Die Spezies *Escherichia coli*

Escherichia coli besiedelt gewöhnlich als harmloses, kommensales Bakterium den menschlichen Darm und macht dort etwa 0,06 % der gesamten intestinalen Flora aus. Der Gram-negative, stäbchenförmige, fakultativ anaerobe Mikroorganismus wurde als *Bacterium coli commune* erstmals 1885 von Theodor Escherich isoliert und beschrieben. Das später in *Escherichia coli* umbenannte Bakterium ist mittlerweile einer der am besten untersuchten Mikroorganismen und darüber hinaus ein unverzichtbares Werkzeug in molekularbiologischen Forschungslaboren.

E. coli ist physiologisch sehr vielseitig und an seine jeweiligen Habitate gut angepasst. Unter Laborbedingungen kann das Bakterium mit Glukose als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen und hat keinen Bedarf an weiteren Wachstumsfaktoren. Zu seinen wichtigsten physiologischen Eigenschaften gehört die Fähigkeit, Glukose, Laktose und andere Zucker auch fermentativ zu verwerten (Ameisensäuregärung oder gemischte Säuregärung). Mit NO_3 oder Fumarat als terminale Elektronenakzeptoren ist zudem anaerobe Atmung möglich. Diese Fähigkeiten tragen zur Anpassungsfähigkeit von *E. coli* an intestinale (anaerobe) und extraintestinale (aerobe und anaerobe) Lebensräume bei (Todar, 2006).

2.3.1 *E. coli* Nissle 1917

Bei dem Stamm *E. coli* Nissle 1917 (O6:K5:H1) handelt es sich um ein nicht-pathogenes, kommensales Isolat, das im Jahre 1917 von Prof. Dr. med. Alfred Nissle aus dem Stuhl eines deutschen Soldaten angereichert wurde, der im Gegensatz zu seinen Kameraden nicht an der in seinem Stationierungsgebiet grassierenden Durchfall-Epidemie litt (Nissle, 1918). Der Stamm wurde im Folgenden als ein probiotisch wirksames Therapeutikum bei diversen Durchfallerkrankungen eingesetzt und es zeigte sich früh, dass er eine antagonistische Wirkung gegenüber *Salmonella typhi* ausübt (Nissle, 1925). In späteren Studien wurde u. a. beschrieben, dass *E. coli* Nissle 1917 in der Lage ist, den menschlichen Darm sehr erfolgreich zu kolonisieren (Malchow *et al.*, 1995). Unter der Markenbezeichnung Mutaflor[®] wird der Stamm mittlerweile erfolgreich zur Behandlung von chronischer Obstipation, Dyspepsie, Kolitis, Enteritis, Gastroenteritis, Fällen von Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüren sowie zur Vorbeugung von Infektionen mit *Candida albicans* nach Antibiotika-Therapien eingesetzt (Kruis *et al.*, 2001; Malchow, 1997; Möllenbrink & Bruckschen, 1994; Rembacken *et al.*, 1999; Lodinová-Zádníková & Sonnenborn, 1997). Viele dieser Behandlungserfolge sind offenbar darauf zurückzuführen, dass nach Besiedelung mit *E. coli* Nissle 1917 eine normale Darmflora wieder hergestellt wird.

Indessen wurde festgestellt, dass *E. coli* Nissle 1917 die Invasion verschiedener enteroinvasiver bakterieller Pathogene in Epithelzellen reduzieren kann (Altenhoefer *et al.*, 2004). Weiterhin wurde die Induktion zellulärer Abwehrmechanismen in Form der Expression des antimikrobiellen Peptids hBD-2 (humanes beta-Defensin-2) in Caco-2-Zellen nachgewiesen (Wehkamp *et al.*, 2004) sowie die erhöhte Expression von Genen, die für die proinflammatorischen Moleküle MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*), MIP-2 α (*Macrophage Inflammatory Protein-2 alpha*) und MIP-2 β (*Macrophage Inflammatory Protein-2 beta*) kodieren (Ukena *et al.*, 2005). Zudem hat eine Behandlung mit *E. coli* Nissle 1917 keinen Effekt auf Migration, klonale Ausbreitung und Aktivierungsstatus von spezifischen CD4⁺-T-Zellen (Westendorf *et al.*, 2005). Dies und die exzellenten Kolonisierungseigenschaften des Stammes haben ihn zu einem idealen Trägerorganismus für die *in situ*-Synthese therapeutisch wirksamer Moleküle gemacht (Rao *et al.*, 2005; Oswald, S., Würzburg, unveröffentlichte Daten). Die verschiedenen Wirkungsweisen des Stammes sind in Abb. 1 zusammengefasst und repräsentieren die meisten der in Abschnitt 2.2 beschriebenen medizinisch relevanten Prinzipien.

E. coli Nissle 1917 ist genotypisch und phänotypisch gut charakterisiert und stellt in der Anhäufung von Fitnessfaktoren, die wahrscheinlich zu seiner Konkurrenzfähigkeit im menschlichen Darm beitragen, eine Besonderheit dar. Er besitzt keine P- und S-Fimbriendeterminanten, aber exprimiert Typ-1- und F1C-Fimbrien (Blum *et al.*, 1995). Der Stamm produziert keine bekannten Virulenz-assoziierten Toxine und weist ein semi-raues

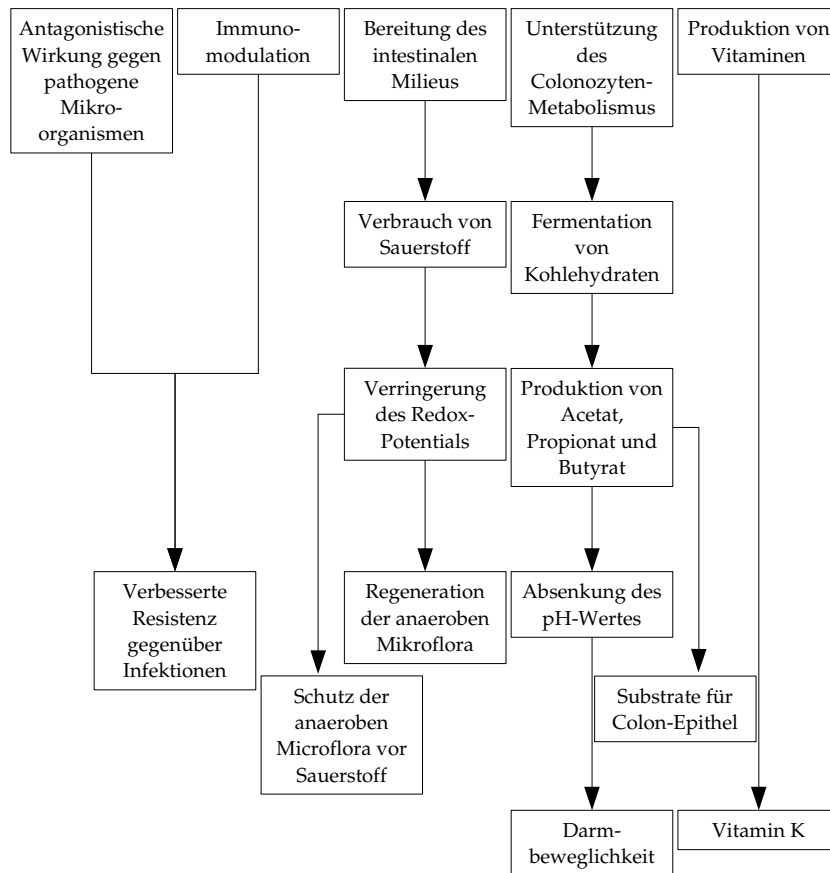


Abb. 1: Überblick über die verschiedenen Wirkungsweisen von *E. coli* Nissle 1917. Aus: Mutaflor® – Brief Summary of Therapeutic Principles, Ardeypharm GmbH.

Lipopolysaccharid auf, das auf einem Einzelnukleotidaustausch im *wzy*-Gen beruht, und ist dadurch serumsensitiv (Grozdánov *et al.*, 2002). Weiterhin exprimiert *E. coli* Nissle 1917 zwei Mikroazine (Patzner *et al.*, 2003) und besitzt eine außergewöhnlich hohe Anzahl von Eisenaufnahmesystemen (Enterobactin, Yersiniabactin, Aerobactin, Salmochelin, Eisen-Dicitrat-Transportsystem und Hämtransport). Viele dieser Faktoren liegen auf genomischen Inseln kodiert (Abb. 2; Grozdánov *et al.*, 2004).

Bei der Analyse der Rohsequenz des Genoms von *E. coli* Nissle 1917 konnte festgestellt werden, dass ca. 100 ORFs spezifisch für diesen Stamm sind und nicht in den bislang sequenzierten Stämmen auftreten. Es handelt sich hierbei hauptsächlich um Determinanten für Kapselbiosynthese, ein Typ-II-Sekretionssystem, Methioninstoffwechsel und mobile DNA-Elemente (Phagen, Plasmide) (Sun *et al.*, 2005). Ansonsten besitzt *E. coli* Nissle 1917 auf der DNA-Ebene sehr große Ähnlichkeit zu dem uropathogenen Stamm CFT073 (Grozdánov *et al.*, 2004).

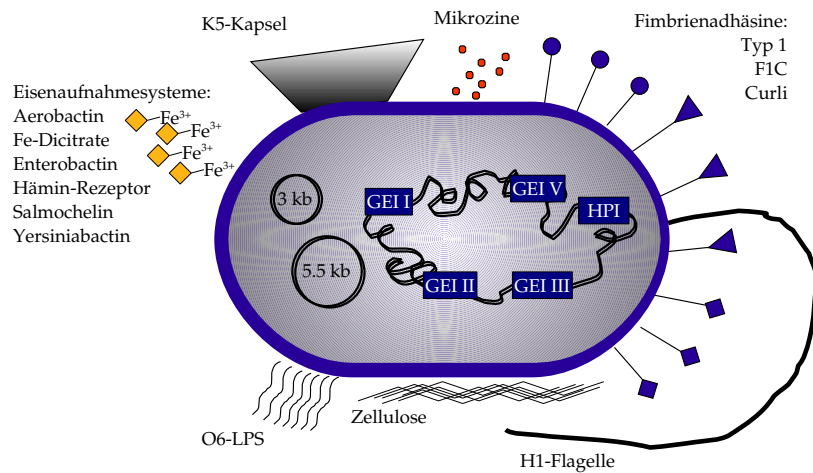


Abb. 2: Fitnessfaktoren von *E. coli* Nissle 1917. Schematische Darstellung der wichtigsten Oberflächenstrukturen und anderer Faktoren, die zur Fitness des Stammes beitragen. Modifiziert nach J. Hacker.

Zusätzlich zu den oben genannten Faktoren weist *E. coli* Nissle 1917 den sog. *rdar*-Morphotyp (*red dry and rough*) auf. Dieses multizelluläre Verhalten kann als eine Art Biofilm angesehen werden und wurde zuerst bei *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium (Römling *et al.*, 1998b), später auch bei diversen *E. coli*-Stämmen (Römling *et al.*, 1998a) beschrieben. Es beruht auf der starken Koexpression von Curli-Fimbrien und Zellulose als extrazelluläre Matrixkomponenten (Zogaj *et al.*, 2001) und kann durch den Farbstoff Kongorot auf Agarplatten sichtbar gemacht werden.

Die Zelluloseexpression erfolgt vom *bcsBAC*-Operon, das die Strukturgene zur Zellulosebiosynthese kodiert (Zogaj *et al.*, 2001). Die katalytische Untereinheit der Zellulose-Synthase bildet BcsA. Die Biosynthese von Curli-Fimbrien geschieht durch Expression der gegensätzlich angeordneten Operons *csgDEFG* und *csgBAC*, wobei CsgA die strukturelle Untereinheit darstellt. CsgD, ein transkriptionaler *Response Regulator* der LuxR-Superfamilie, aktiviert die Transkription sowohl von *csgBAC* als auch von *adrA* (*yaiC* in *E. coli*). AdrA stimuliert die Zellulosesynthese durch Produktion von zyklischem di-GMP, welches die Zellulose-Synthase durch Bindung an deren BcsB-Untereinheit aktiviert (Abb. 3; Römling, 2005; Amikam & Galperin, 2006).

Während ein Beitrag der Zellulosesynthese zur Virulenz bisher nicht beschrieben wurde, weisen Curli-Fimbrien einige Virulenz-assoziierte Eigenschaften auf. Sie interagieren mit Wirtsproteinen wie Fibronectin, Laminin, MHC I, TLR2, Plasminogen, t-PA, H-Kininogen, Fibrinogen und Faktor XII, von denen einige im Zusammenhang mit der Ausbreitung der

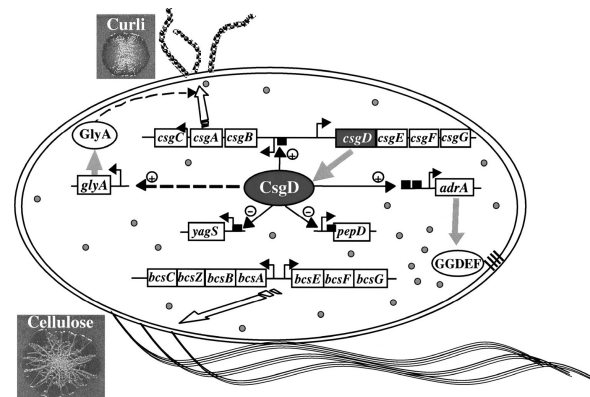


Abb. 3: Regulation des *rdar*-Morphotyps. Aus: Römmling (2005); siehe Text für Details.

Bakterien im Wirt stehen (Römmling, 2005 und Referenzen darin). Allerdings kann bisher keine allgemeine Aussage zur Rolle von Curli-Fimbrien in pathogenen *E. coli* getroffen werden, da nicht alle Gruppen diese einheitlich exprimieren. Während die Mehrheit der Sepsis-Isolate Curli-Fimbrien auch bei 37 °C bilden, zeigen EPEC, ETEC und UPEC deren Expression nur bei Raumtemperatur, während EIEC und EHEC diese in der Regel gar nicht ausprägen (Bian *et al.*, 2000; Cookson *et al.*, 2002; Sjöbring *et al.*, 1994; Uhlich *et al.*, 2001). Bei der Ausbildung des *rdar*-Morphotyps verhält es sich ähnlich: Fäkalisolate zeigen Koexpression von Curli und Zellulose bei 28 und 37 °C, Harnwegs isolate häufig nur bei 28 °C (Bokranz *et al.*, 2005). Dieses unterschiedliche Verhalten wird auch im Vergleich der *E. coli*-Stämme Nissle 1917, 536 und CFT073 deutlich. Während das kommensale Fäkalisolat Nissle 1917 einen stark ausgeprägten *rdar*-Morphotyp auch bei 37 °C aufweist, bildet Stamm 536 diesen nur bei Raumtemperatur aus. *E. coli* CFT073 zeigt hingegen trotz seiner großen Ähnlichkeit zu *E. coli* Nissle 1917 keinen *rdar*-Morphotyp und ist bei beiden Temperaturen *saw* (smooth and white).

2.4 Fitness und Virulenz von *E. coli*

Wie alle Organismen sind auch Bakterien angepasst, eine spezielle ökologische Nische zu besetzen. Die möglichen Lebensräume einer Spezies werden von ihrer jeweiligen genetische Ausstattung bestimmt. Dabei stehen vor allem Stoffwechselfähigkeiten im Vordergrund, da diese entscheidend für die Verwertung des jeweiligen Nährstoffangebotes sind und eine Adaption an veränderte Umweltbedingungen ermöglichen. Je größer die Konkurrenz um allgemeine Nahrungsressourcen ist, desto mehr fallen spezielle Kompetenzen der Bakterien ins Gewicht, die ihnen einen selektiven Vorteil einbringen. Diese reichen von der Möglichkeit

zur Verwertung anderer (komplexerer) Kohlenstoff- und Energiequellen über die Fähigkeit, auf andere Habitate auszuweichen bis hin zur Produktion von Substanzen, die Konkurrenten abtöten. Eigenschaften, die das Überleben und die Verbreitung eines Mikroorganismus in einer bestimmten ökologischen Nische erhöhen, werden als bakterielle Fitness angesehen (Preston *et al.*, 1998). So besitzen z. B. kolonisierende Bakterien in der Regel Eigenschaften, die eine enge Assoziation mit dem Wirt und nachfolgend eine erfolgreiche Proliferation ermöglichen. Häufig sind diese Interaktionen gewebespezifisch und abhängig von der Ausprägung bestimmter Adhäsionsmoleküle und/oder Fimbrien sowie den entsprechenden Wirtsrezeptoren.

Während der Wirt von den meisten Aktivitäten der normalen Flora profitiert, sind einige ihrer Vertreter parasitisch, d. h., sie leben auf Kosten des Wirtes. Pathogene Stämme sind darüber hinaus in der Lage, Krankheiten auszulösen. Viele der endogenen Krankheiten sind opportunistische Infektionen und treten besonders in immunbeeinträchtigten Personen auf. Exogene Krankheitserreger sind Stämme, die in der Lage sind, einen fremden Wirt oder ein fremdes Gewebe bzw. Organ erfolgreich zu besiedeln. So können auch kommensale Bakterien aus anderen Wirten im „falschen“ Wirt Krankheiten verursachen, da sie an eine enge Verbindung mit einem Organismus angepasst sind. Die verursachte Schädigung steht meist im Zusammenhang mit der Erschließung von Nahrungsquellen (z. B. durch Zerstörung von Gewebe) oder Verbreitung (z. B. durch Erzeugung von Durchfall oder Husten) (Wassenaar & Gaastra, 2001).

Pathogene *E. coli*-Stämme können verschiedene intestinale und extraintestinale Infektionen bei Menschen und Tieren verursachen und werden anhand der von ihnen hervorgerufenen Krankheiten in verschiedene Pathotypen unterteilt. Drei generelle Syndrome können aus einer Infektion mit *E. coli* resultieren: Darmerkrankungen, Harnwegserkrankungen und Meningitis/Sepsis. Die Kombinationen ihrer Virulenzfaktoren und die damit verbundenen Fähigkeiten, bestimmte klinische Symptome hervorzurufen, definieren die verschiedenen Pathogruppen von *E. coli* (Tab. 1). In vielen dieser Gruppen sind die Virulenzfaktoren auf genetischen Elementen (Plasmide, PAIs, Prophagen) kodiert, deren Ursprung häufig auf horizontalen Gentransfer zurückgeht (Kaper *et al.*, 2004).

Tab. 1: *E. coli*-Pathogruppen und deren dominierende Virulenzfaktoren. Nach Kaper *et al.* (2004) und <http://zdsys.chgb.org.cn/VFs/>. n. b.: nicht bekannt.

Pathogruppe	Virulenzfaktoren	PAIs, Plasmide
DAEC (diffus adhärierende <i>E. coli</i>)	Adhärenz (Afa/Dr-Adhäsine)	n. b.
EAEC (enteroaggregative <i>E. coli</i>)	Adhärenz (AAFs, Dispersin) Toxine (EAST1, Pet, Pic, ShET1)	oft Virulenzplasmide
EHEC (enterohämorrhagische <i>E. coli</i>)	Adhärenz (Efa-1/LifA, Intimin, Paa, ToxB) Eisenaufnahme (Chu) Proteasen (EspP, StcE) Regulation (Ler) Sekretionssystem (T3SS) Toxine (Hämolysin, Stx, Cif)	LEE-Insel pO157
EIEC (enteroinvasive <i>E. coli</i>)	Actin-basierende Beweglichkeit (IcsA) Endotoxin (LPS) Eisenaufnahme (Aerobactin) Proteasen (IcsP, Pic, SigA) Sekretionssystem (T3SS) Toxine (ShET1, ShET2)	SHI-1
ETEC (enterotoxigene <i>E. coli</i>)	Adhärenz (CFA, CS, PCF) Toxine (hitzelabiles Toxin (LT), hitzestabiles Toxin (ST))	n. b.
EPEC (enteropathogene <i>E. coli</i>)	Adhärenz (BFP, Intimin, Lymphostatin/LifA, Paa) Protease (EspC) Regulation (Ler, Per) Sekretionssystem (T3SS) Toxine (CDT, EAST1, Cif)	EspC-Insel LEE-Insel EAF-Plasmid
MNEC (Meningitis-assoziierte <i>E. coli</i>)	Adhärenz (S-Fimbrien) Invasion (AslA, Ibes, K1-Kapsel, OmpA, TraJ) Toxin (CNF-1)	n. b.
UPEC (uropathogene <i>E. coli</i>)	Adhärenz (Dr-Adhäsine, F1C-, S-, P-, TypI-Fimbrien) Eisenaufnahme (Aerobactin, Chu, Enterobactin, IroN) Protease (Pic, Sat, Tsh) Toxine (CNF-1, Hämolysin)	PAI I-VII ₅₃₆

Zur bakteriellen Fitness trägt im Falle pathogener Mikroorganismen maßgeblich deren Virulenz bei, da die Schädigung des Wirts in der Regel förderlich für das Überleben und die

Verbreitung der Bakterien ist. Jedoch kann eine Unterscheidung zwischen echten Virulenzfaktoren und möglichen Fitnessfaktoren oft nicht mit aller Eindeutigkeit getroffen werden, da der Lebensstil der Mikroorganismen für eine solche Definition in Betracht gezogen werden muss. Echte Virulenzgene sind nur solche, deren Produkte direkt für die pathologische Schädigung des Wirtes verantwortlich sind und die ausschließlich in Pathogenen exprimiert werden. Dies trifft vor allem auf Toxine sowie bestimmte Fimbrien, Adhäsine, Intimin und Invasine und im weiteren Sinne auf deren Regulatoren zu. Auch Mechanismen, die die Umgehung der Immunantwort des Wirtes ermöglichen, können hierzu gezählt werden (Finlay & Falkow, 1997; Wassarman *et al.*, 1999).

Viele Komponenten, die die Virulenz von Pathogenen erhöhen bzw. diese in bestimmten Wirten zu solchen machen, sind jedoch auch in nicht-pathogenen Mikroorganismen anzutreffen und sind daher vielmehr als Fitnessfaktoren anzusehen. Pathogenität korreliert somit nicht zwangsläufig mit der Expression von krankheitsverursachenden Faktoren, die in nicht-pathogenen Mikroorganismen fehlen. Dies trifft z. B. auf bestimmte Adhäsine, Oberflächenstrukturen, Resistenzen, Sekretionssysteme oder Abbaueigenschaften zu, die in Pathogenen die Virulenz erhöhen, in Nicht-Pathogenen jedoch auch anzutreffen sind und für diese in ihrem ökologischen Kontext einen Vorteil darstellen, also ihre Fitness erhöhen (Dobrindt *et al.*, 2003).

Ein Beispiel für eine Funktion, die in bestimmten Bakterien in direktem Zusammenhang mit deren Virulenz steht, aber auch in nicht-pathogenen Spezies vorkommt, ist das Siderophor Yersiniabactin, dessen Synthese, Regulation und Transport auf der *High Pathogenicity Island* von *Yersinia* spp. kodiert sind (Carniel *et al.*, 1996). Dieses Eisenaufnahmesystem ist notwendig für die Virulenz von *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* Serotyp O1 und *Y. enterocolitica* Biotyp 1B im Mausmodell (Carniel, 1999) und erhöht auch bei anderen pathogenen *Enterobacteriaceae* deren Virulenz (Schubert *et al.*, 1998; Bach *et al.*, 2000; Oelschlaeger *et al.*, 2003). Hingegen kann der Insel in *E. coli* 536 (PAI IV₅₃₆) keine Erhöhung der Pathogenität zugeschrieben werden, wie sich im Vergleich des Wildtyps mit einer Deletionsmutante zeigte (Brzuszkiewicz *et al.*, 2006). Da z. B. auch der nicht-pathogene, probiotische *E. coli*-Stamm Nissle 1917 diese Insel besitzt und Yersiniabactin exprimiert, kann die HPI nicht absolut als Pathogenitätsinsel bezeichnet werden, sondern vielmehr als Faktor, der die Fitness der sie tragenden Bakterien erhöht.

Besonders sog. „ExPEC-Virulenzfaktoren“ sind häufig auch in kommensalen Stämmen zu finden. Dazu können neben Mikrozininen, Fimbrien und Siderophoren sogar Toxine wie α -Hämolyisin oder CNF gehören (Hejnova *et al.*, 2005). Dies gilt beispielsweise auch für die Expression von F1C- (*foc*) und Typ-1- (*fim*) Fimbrien sowie weiterer Eisenaufnahmesysteme

(Aerobactin, Enterobactin) durch *E. coli*-Stamm Nissle 1917, die gemeinhin als Virulenzfaktoren angesehen werden und z. B. auch vom uropathogenen *E. coli*-Stamm 536 produziert werden (Blum *et al.*, 1995). Allein anhand dieser Eigenschaften kann somit keine klare Unterscheidung zwischen kommensalen und extraintestinal-pathogenen *E. coli*-Stämmen getroffen werden.

2.5 Bakterielle Toxine, die den eukaryotischen Zellzyklus beeinflussen

Unter den o. g. Virulenzfaktoren von *E. coli* (Tab. 1) finden sich neben den Toxinen, die auf Zellmembran, Zytoskelett oder Zellstoffwechsel wirken, auch solche, die Einfluss auf den Wirtszellzyklus nehmen. Diese sog. Zyklomoduline sind eine Familie von Toxinen und Effektoren, die aktiv das Fortschreiten des Wirtszellzyklus deregulieren. Einige Zyklomoduline treiben die Zellproliferation voran, wohingegen inhibitorische Vertreter den Zellzyklus blockieren (Nougayrède *et al.*, 2005; Oswald *et al.*, 2005 und Referenzen darin).

Der eukaryotische Zellzyklus besteht aus vier aufeinanderfolgenden Phasen. Die G₁-Phase (2n Chromosomen) geht der DNA-Replikation voran, die in der S-Phase stattfindet. Es folgt die G₂-Phase mit anschließender Mitose. Ausgereifte (ausdifferenzierte), nicht mehr teilungsfähige Zellen, die eine bestimmte Aufgabe innerhalb des Organismus wahrnehmen, verbleiben in der G₁-Phase, die dann als G₀-Phase bezeichnet wird. Einige Zelltypen verbleiben nach ihrer Ausdifferenzierung für Wochen oder Monate in der G₀-Phase, können aber dann wieder in die G₁-Phase zurückkehren und sich teilen.

Dauer und Abfolge der Phasen werden von Steuerungsmechanismen, sog. Kontrollpunkten (*checkpoints*) überwacht, die dafür sorgen, dass erst dann der nächste Schritt des Zellzyklus erfolgt, wenn der vorhergehende abgeschlossen ist. An solchen *checkpoints* besteht die Möglichkeit einer Unterbrechung (Arretierung) des Zellzyklus oder des Übergangs in die Apoptose, den eingeleiteten programmierten Zelltod. Es existieren spezielle Zellzyklusproteine wie die CDKs (*Cycline Dependent Kinases*) und die sog. Zyklone, die zu bestimmten Zeitpunkten im Zyklus verstärkt exprimiert werden, bis ihre Konzentration ein Maximum erreicht. Von diesen Maxima nimmt man an, dass sie jeweils einen Kontrollpunkt darstellen. Danach werden die Zyklone schnell abgebaut. CDKs und die zugehörigen Zyklone bilden Komplexe, deren Aktivierung und Deaktivierung unter anderem durch Wachstumsfaktoren und Protoonkogene gesteuert werden. Die CDKs phosphorylieren spezifisch eine Reihe anderer Proteine und steuern so den Zellzyklus. Zum Beispiel kontrollieren Zyklin D und Cdk4 den G₁-*checkpoint*, während Zyklin B und Cdk1 den G₂-*checkpoint* überwachen (Abb. 4).

Das Exotoxin CDT (*Cytolethal Distending Toxin*) wird außer von EPEC auch von einer Rei-

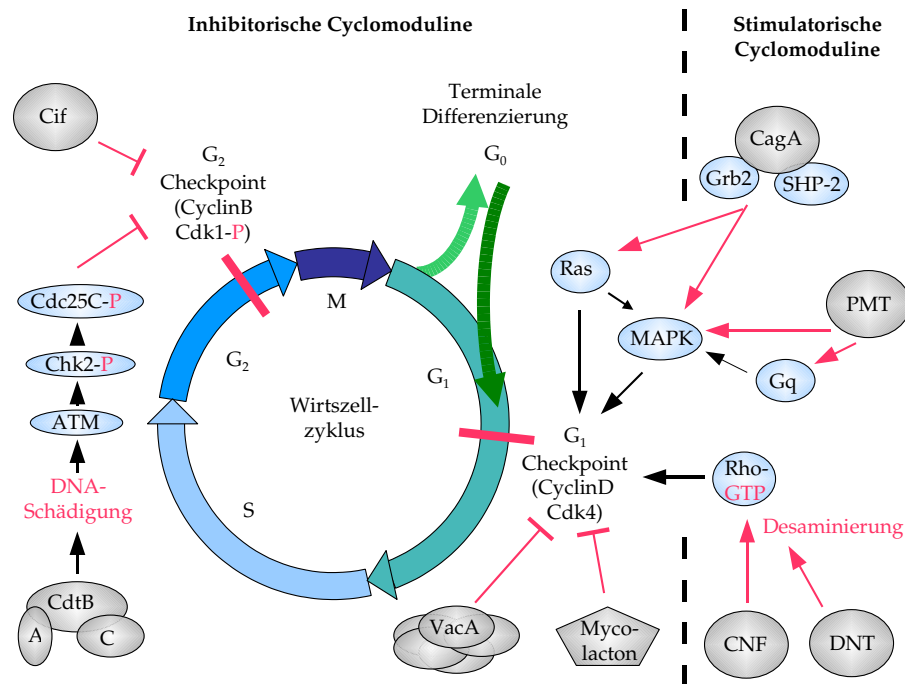


Abb. 4: Bakterielle Zyklomoduline und ihr Einfluss auf den eukaryotischen Zellzyklus.

Aus: Oswald *et al.* (2005); siehe Text für Details.

he weiterer pathogener Bakterien produziert, darunter *Shigella dysenteriae*, *Campylobacter* spp., *Salmonella typhi*, *Haemophilus ducreyi*, *Helicobacter hepaticus* und *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Die CdtB-Untereinheit wird in den Wirtszellkern transloziert und induziert dort DNA-Schäden. Diese führen zur aufeinanderfolgenden Phosphorylierung der Proteinkinasen ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), Chk2 (*Checkpoint Kinase 2*) und Cdc25 (*Cell Division Control Protein 25*). Dies hat zur Folge, dass Cdc25 den Zyklin-B/Cdk1-Komplex nicht mehr aktivieren kann, d. h., Cdk1 bleibt phosphoryliert und der Zellzyklus verbleibt in der G₂-Phase (Heywood *et al.*, 2005).

Das von EPEC und EHEC produzierte Toxin Cif (*Cycle Inhibiting Factor*) ist ein T3SS-translozierter Effektor, der ebenfalls zu einer nachhaltigen Phosphorylierung von Cdk1 und Arretierung des Zellzyklus in der G₂-Phase führt, ohne allerdings DNA-Schäden hervorzurufen. Der genaue Mechanismus dieser Cdk1-Inaktivierung ist bisher noch unbekannt (Marchès *et al.*, 2003).

In einigen MNEC- und UPEC-Stämmen wurde mit CNF (*Cytotoxic Necrotizing Factor*) ein Toxin beschrieben, das eine Aktivierung des G₁-checkpoints bewirkt. Diese Transglutaminase katalysiert die Desaminierung der kleinen GTPase Rho sowie anderer Mitglieder dieser

GTPase-Familie (Rac, Cdc42). Dies führt zur konstitutiven GTP-Bindung und damit zur Aktivierung des Proteins. Aktiviertes Rho bewirkt durch Kontrolle der Expression und Funktion von Zyklin D, dass Zellen aus der G₀ heraustreten und durch die G₁- in die S-Phase übergehen (Horiguchi, 2001). Ähnliche Wirkung hat DNT (*Dermonectrotic Toxin*) aus *Bordetella*.

Andere Bakterienarten produzieren ebenfalls Zyklomoduline, die den o. g. mitunter in ihrer Wirkung recht ähnlich sind. Das *Pasteurella multocida* Toxin (PMT) gilt als wirksames Mitogen für bestimmte Zelltypen. Es aktiviert verschiedene MAP-Kinasen über über das G-Protein Gq und führt zu erhöhter Expression von Zyklin D (Zywietz *et al.*, 2001). *Helicobacter pylori* exprimiert zwei verschiedene Zyklomoduline mit unterschiedlichen Wirkungen. Das Exotoxin VacA (*Vacuolating Cytotoxin A*) verhindert Zellproliferation durch eine p53-abhängige Blockade des Zellzyklus in der G₁-Phase. Durch Aktivierung des mitochondrialen Apoptoseweges führt dies zum Zelltod (Gebert *et al.*, 2003). CagA (*Cytotoxin Associated Antigen A*) hingegen induziert Zyklin D und den Übergang der Zelle in die S-Phase durch Bindung an Grb2 und SHP-2 und Aktivierung des MAPK/Ras-Weges (Higashi *et al.*, 2004).

Das Toxin Mycolacton ist der Hauptvirulenzfaktor bei der Ausbildung des Buruli-Ulcus nach Infektion mit *Mycobacterium ulcerans*. Es inhibiert die Proteinbiosynthese und verursacht Arretierung des Zellzyklus in G₀/G₁ und letztlich Zelltod (George *et al.*, 1999). Die Art und Weise dieser Wirkung von Mycolacton ist noch unbekannt. Auf Grund seiner Substanzklasse nimmt Mycolacton eine besondere Stellung unter den Zyklomodulinen ein. Es handelt sich hierbei um ein von einem Polyketid abstammendes Makrolid, das von riesigen Plasmid-kodierten Polyketidsynthasen und modifizierenden Enzymen synthetisiert wird (Stinear *et al.*, 2004).

Die Bedeutung der meisten o. g. Zyklomoduline für die Virulenz ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Fähigkeit einiger Bakterien, lange und persistierende Infektionen hervorzurufen, wird auf die Produktion von Zyklomodulinen zurückgeführt. Vor allem die immunmodulatorische Wirkung und die Inhibition der Epithelerneuerung scheinen hierbei eine Rolle zu spielen. Jedoch nutzen auch einige nicht-pathogene, kommensale Spezies zum Teil diese Toxine, um ihren Wirt erfolgreich zu kolonisieren. Somit sind auch nicht alle Zyklomoduline *per se* als Virulenzfaktoren anzusehen (Oswald *et al.*, 2005).

2.6 Polyketide und nichtribosomale Peptide

Polyketide (PK) und nichtribosomale Peptide (NRP) sind zwei große Familien komplexer Naturstoffe, die von einer Reihe von Bakterien, Pilzen und Pflanzen als Sekundärmetabolite produziert werden (Abb. 5; Staunton & Weissman, 2001; Finking & Marahiel, 2004 und

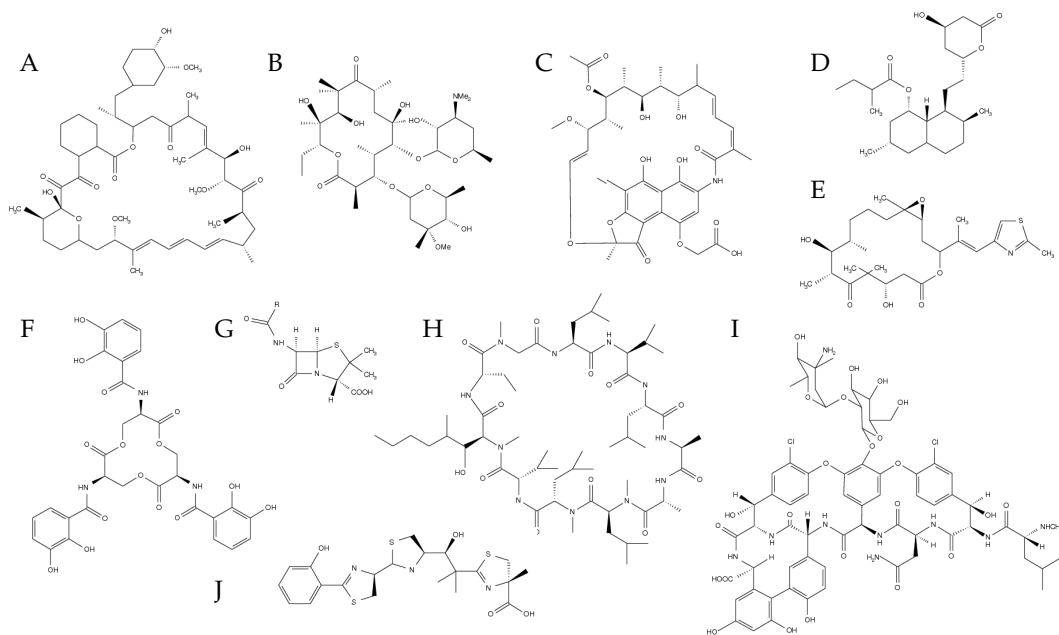


Abb. 5: Beispiele für bedeutsame Polyketide und nichtribosomale Peptide. A: Rapamycin; B: Erythromycin A; C: Rifamycin B; D: Lovostatin; E: Epothilon B; F: Enterobactin; G: Penicillin; H: Cyclosporin A; I: Vancomycin; J: Yersiniabactin.

Referenzen darin). Viele dieser Substanzen besitzen bedeutende pharmakologische Aktivitäten wie antibiotische, antimycotische, antitumor und antiparasitische Wirkungen. Wichtige Polyketide sind z. B. Erythromycin A (Makrolidantibiotikum aus *Saccharopolyspora erythraea*), Rifamycin (Antibiotikum aus *Amycolatopsis mediterranei*) oder Lovostatin (Cholesterinsenker aus *Aspergillus terreus*). Unter den nichtribosomalen Peptiden finden sich u. a. Penicillin (β -Lactam-Antibiotikum aus *Penicillium chrysogenum*), Vancomycin (Glykopeptid-Antibiotikum aus *Streptomyces orientalis*) oder Enterobactin (Eisenchelator aus *E. coli*). Rapamycin (Immunsuppressivum aus *Streptomyces hygroscopicus*), Epothilon (Krebstherapeutikum aus *Sorangium cellulosum*), Cyclosporin (Immunsuppressivum aus *Hypocladium inflatum gams*) und Yersiniabactin (Eisenchelator aus *Yersinia* und *E. coli*) stellen Kombinationen aus PK und NRP dar und werden durch hybride PKS/NRPS-Systeme synthetisiert (Du et al., 2001).

Polyketide und nichtribosomale Peptide sind aus einfachen Carbonsäuren (Acyl-CoA-Derivate) bzw. Aminosäure-Monomeren aufgebaut und werden von außergewöhnlich großen, multifunktionalen Proteinen, Polyketid-Synthasen (PKS) bzw. nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS), synthetisiert. Diese Enzyme sind aus sich wiederholenden, koordinierten Gruppen aktiver Zentren, sog. Modulen aufgebaut, die jeweils für die Katalyse eines Verlängerungs- oder Modifizierungsschrittes der Polyketid- bzw. Polypeptidkette ver-

antwortlich sind (Cane *et al.*, 1998; Cane & Walsh, 1999). Die Reihenfolge der biosynthetischen Module vom NH₂- zum COOH-Terminus jeder PKS bzw. NRPS und die Anzahl und Art der katalytischen Domänen innerhalb jedes Moduls bestimmen die Anordnung der strukturellen und funktionellen Elemente im entstehenden Produkt.

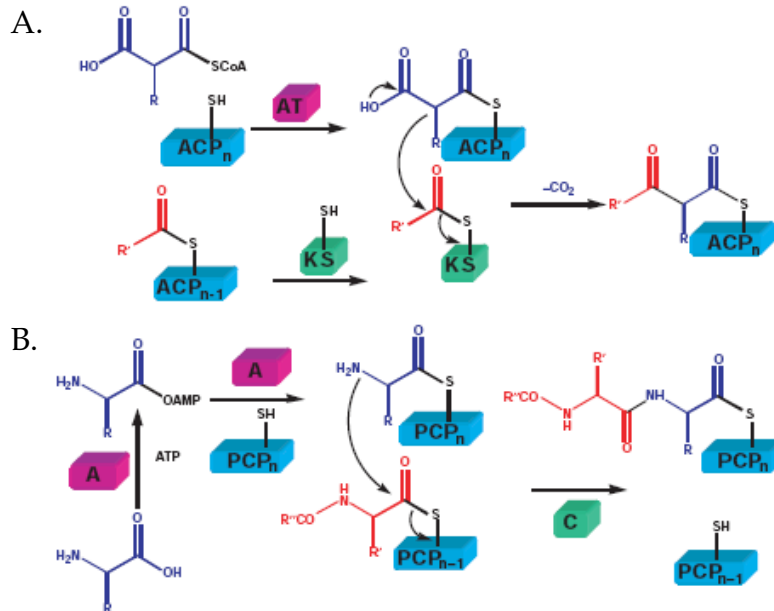


Abb. 6: Funktion und Mechanismus der katalytischen und Träger-Domänen in PKS (A) und NRPS (B). A: Die Acyltransferase-Domäne (AT) verbindet den flexiblen Phosphopantetheinyl-Rest der Acyl-Träger-Domäne (ACP) mit dem neuen Kettenglied (Malonyl- oder Methylmalonylgruppe). Die Ketosynthase-Domäne (KS) wird mit dem (Poly-)Ketid aus der vorangegangenen Kettenverlängerung acyliert und katalysiert den Transfer dieses Acyl-Restes auf das (Methyl-)Malonyl-S-ACP; B: Die Adenylierungs-Domäne (A) aktiviert ein neues Aminosäure-Kettenglied (blau), das als Aminoacyl-Adenylat auf den Phosphopantetheinyl-Rest der Petidyl-Träger-Domäne (PCP) übertragen wird. Die Kondensations-Domäne (C) katalysiert einen nukleophilen Angriff des Amino-Stickstoff des Akzeptors Aminoacyl-S-PCP aus der vorangegangenen Kettenverlängerung auf den Peptidylacyl-Rest des Donors. Aus: Cane & Walsh (1999).

Innerhalb jedes Moduls gibt es eine sog. Träger-Domäne, an die die wachsende Polyketid- bzw. Polypeptidkette kovalent gebunden ist. Neben der Träger-Domäne sind in jeder PKS und NRPS zwei weitere obligatorische katalytische Domänen vorhanden, die für die zentralen kettenbildenden Reaktionen bei der Polyketid- bzw. Polypeptidsynthese verantwortlich sind (Abb. 6). Darüber hinaus gibt es einen variablen Satz zusätzlicher Domänen, die Modifikatio-

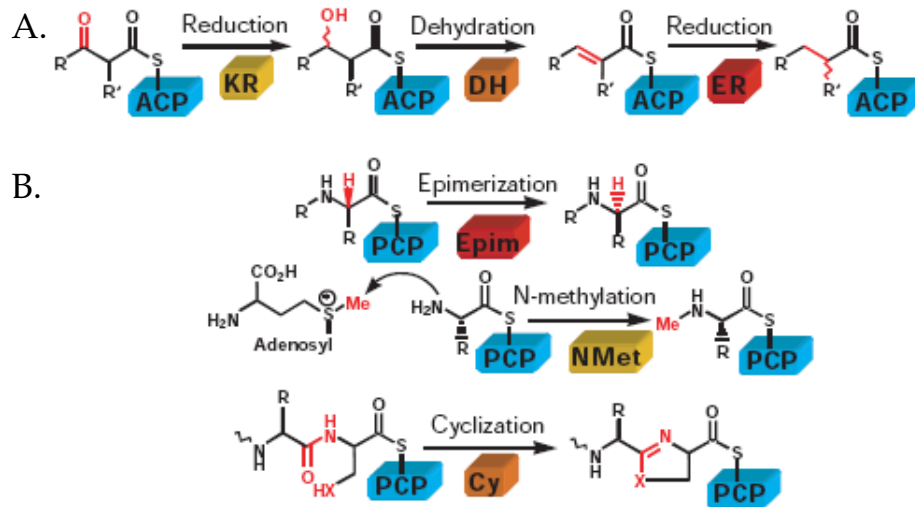


Abb. 7: Zusammenstellung möglicher modifizierender Domänen in PKS (A) und NRPS (B). Jede dieser Domänen übt ihre Aktivität vor dem Transfer der wachsenden Polyketid- bzw. Polypeptidkette zum nächsten Modul aus. KR: Ketoreduktion; DH: Dehydrierung; ER: Enoylacyl-Reduktion; Epim: Epimerisierung; NMet: N-Methylierung; Cy: Zyklisierung. Aus: [Cane & Walsh \(1999\)](#).

nen (z. B. Reduktion, Dehydrierung und Methylierung) der eben verlängerten Polyketid- oder Polypeptidkette durchführen. Die Größe und Komplexität der gebildeten Polyketide bzw. Polypeptide wird durch die Anzahl der sich wiederholenden Kettenverlängerungen bestimmt.

Während die grundlegenden Strukturen durch die Kern-Domänen weitgehend festgelegt sind, sind die zusätzlichen Domänen, die die wachsenden Polyketid- oder Polypeptidketten modifizieren, für die strukturelle Komplexität und die damit einhergehende biochemische Vielfalt der Polyketide und nichtribosomalen Peptide verantwortlich. Die Modifikationen werden durch Kombination von Ketoreduktion, Dehydrierung und Enoylreduktion bei Polyketiden sowie Epimerisierung, N-Methylierung und Heterozyklisierung bei nichtribosomalen Peptiden durch jeweils spezielle Domänen erreicht (Abb. 7). Zusätzlich gibt es in jedem Modul noch besondere Domänen, die das erste PKS- bzw. NRPS-Modul mit einem Startermolekül beladen und so für die Initiation der Kettenbildung sorgen. Am Ende des letzten Moduls findet sich oft eine Thioesterase-Domäne (TE), die für den Abschluss der Kettenverlängerung sorgt indem sie das Polyketid bzw. -peptid vom Enzymkomplex abspaltet. NRPS-TE-Domänen können zusätzlich eine Zyklisierung (Lactam- oder Lactonbildung) des Polypeptids katalysieren.

Neben den oben beschriebenen modularen PKS und NRPS finden sich noch weitere Typen

für die Synthese von Polyketiden und nichttribosomalen Peptiden. Typ-II-PKS sind Multienzymkomplexe, die nur einen einzelnen Satz von Kern-Domänen besitzen, der wiederholt benutzt wird. Typ-III-PKS sind homodimere Enzyme, die sich wiederholende Kondensationen katalysieren. Dabei sind sie unabhängig von einem Acyl-Träger-Protein und wirken direkt auf Acyl-CoA-Substrate (Shen, 2003). Ähnliches gilt für NRPS, von denen es neben den linearen auch iterative und nicht-lineare Vertreter gibt (Finking & Marahiel, 2004). Zudem sind für beide Enzymklassen diverse Mischformen zwischen den einzelnen Typen beschrieben worden.

2.7 Zusammensetzung bakterieller Genome

Bereits bevor DNA-Sequenzierung in heutigem Umfang und die damit verbundene computergestützte Analyse ganzer Genome möglich war, wurden bakterielle Genome hinsichtlich ihrer Zusammensetzung untersucht und verglichen. Hierbei wurde festgestellt, dass bestimmte Informationen durchaus weit verbreitet sind und sich nicht nur in einzelnen Spezies wiederfinden. Abgesehen vom Kerngenom, das für viele essentielle Stoffwechselwege und Replikationsmechanismen kodiert und somit relativ konserviert in vielen Organismen vorliegt, gibt es auch im Bereich vermeintlicher Spezialisierungen viele Gene bzw. ganze DNA-Abschnitte, die sich in einer Reihe unterschiedlicher Bakterien finden lassen. Hier sind besonders Virulenzfaktoren pathogener Mikroorganismen zu nennen, die zum einen ein hohes Maß an Spezialisierung darstellen, zum anderen aber auch in Form und Funktion weit verbreitet sind, teilweise sogar über Speziesgrenzen hinweg. Aus diesen Erkenntnissen ist der Begriff des horizontalen Gentransfers erwachsen, der erklärt, wie sich bestimmte Gene und DNA-Abschnitte zwischen verschiedenen Bakteriengruppen verteilen konnten (Ochman *et al.*, 2000; Frost *et al.*, 2005). Hierbei fällt auf, dass der Anteil an Fremd-DNA sehr unterschiedlich ist und artabhängig von Null bis ca. 17 % reicht (Abb. 8). Im Allgemeinen spiegelt die Genomstruktur von Bakterien deren Lebensstil wider. Während Genomreduzierungen hauptsächlich in intrazellulären Pathogenen und Endosymbionten zu beobachten ist, die dadurch teilweise gänzlich von ihren Wirtszellen abhängig sind, erhöht die Aufnahme von Fremd-DNA via horizontalen Gentransfer bei extrazellulären Bakterien deren Vielseitigkeit und Anpassungsfähigkeit.

Horizontal erworbene DNA wurde in *E. coli* zunächst hauptsächlich anhand der mit ihr korrelierenden Virulenzfaktoren identifiziert und charakterisiert. Oft sind die Gene solcher Faktoren in Bereichen des Chromosoms akkumuliert, welche sich vom sog. Kerngenom bezüglich GC-Gehalt und Codonverwendung teilweise erheblich unterscheiden. Dieser flexible

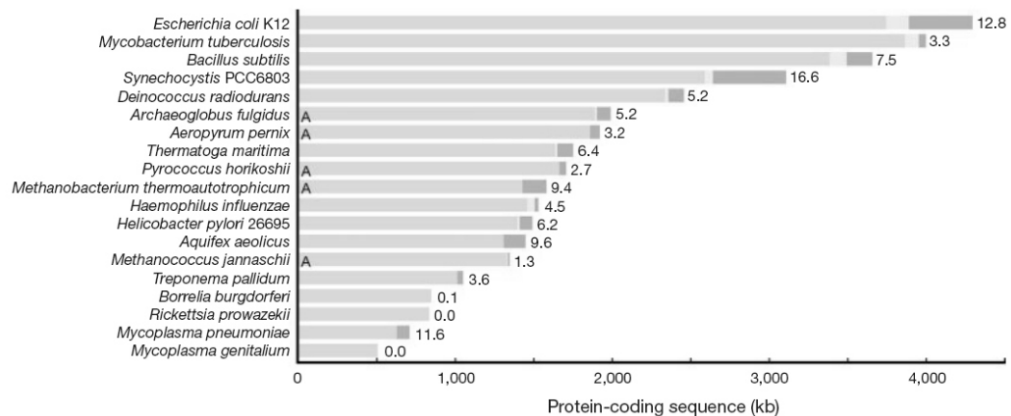


Abb. 8: Verteilung horizontal erworbener DNA in sequenzierten bakteriellen Genomen. Das Kerngenom ist grau, mobile Elemente (Transposons, Bakteriophagen) hellgrau und Fremd-DNA dunkelgrau dargestellt. Der prozentuale Anteil an Fremd-DNA ist rechts der Balken angegeben. A: Archaeen-Genome. Aus [Ochman *et al.* \(2000\)](#)

Genpool trägt in der Regel keine Gene für essentielle Funktionen des bakteriellen Stoffwechsels, sondern kodiert für Eigenschaften, die unter bestimmten Bedingungen vorteilhaft für den Organismus sein können. Oft sind diese genomischen Inseln (GEIs) mobilisierbar oder tragen zumindest Rudimente mobilisierbare Elemente wie Integrasen, Transposasen oder Wiederholungssequenzen. Als Integrationsorte im Chromosom konnten in den meisten Fällen tRNA-Gene identifiziert werden, die mit ihren repetitiven Sequenzen auch als Insertionsstellen für Phagen bekannt sind ([Canchaya *et al.*, 2004](#); [Campbell, 1992](#)). Aus diesen Erkenntnissen entstand der Begriff der Pathogenitätsinsel (PAI) ([Blum *et al.*, 1994](#); [Hacker *et al.*, 1997](#)), welche mittlerweile in unterschiedlicher Anzahl in verschiedensten Mikroorganismen identifiziert wurden ([Dobrindt *et al.*, 2004](#)). Als Modellorganismus kann der uropathogene *E. coli*-Stamm 536 angesehen werden, in dem mittlerweile sieben PAIs unterschiedlicher Größe und Funktion beschrieben worden sind (Tab. 2).

Tab. 2: Pathogenitätsinseln von *E. coli* 536.

Name	tRNA	Größe	Virulenzfaktoren	Referenz
PAI I ₅₃₆	<i>selC</i>	76,8 kb	α -Hämolyisin	Dobrindt <i>et al.</i> (2002)
PAI II ₅₃₆	<i>leuX</i>	102,2 kb	α -Hämolyisin, P-Fimbrien	Dobrindt <i>et al.</i> (2002)
PAI III ₅₃₆	<i>thrW</i>	68,1 kb	S-Fimbrien, Salmochelin	Dobrindt <i>et al.</i> (2002)
PAI IV ₅₃₆	<i>asnT</i>	31,5 kb	Yersiniabactin	Dobrindt <i>et al.</i> (2002)
PAI V ₅₃₆	<i>pheV</i>	79,6 kb	Kapselbiosynthese	Schneider <i>et al.</i> (2004)
PAI VI ₅₃₆	<i>asnW</i>	54,4 kb	Peptid-Polyketidsynthese	Brzuszkiewicz <i>et al.</i> (2006)
PAI VII ₅₃₆	<i>serU</i>	23,2 kb	Histonähnliches Protein Hlp	Brzuszkiewicz <i>et al.</i> (2006)

2.8 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Ein definierter medizinisch wirksamer Faktor konnte bislang in *E. coli* Nissle 1917 nicht ausgemacht werden und es ist nicht anzunehmen, dass es sich um ein einzelnes Genprodukt handelt, das diesem Stamm seinen antagonistischen Effekt verleiht. Vielmehr stellt *E. coli* Nissle 1917 eine Anhäufung von Eigenschaften dar, die in ihrer Gesamtheit dessen Fitness auszumachen scheinen und ihn im Vergleich zu anderen kompetitiver bei der Besiedelung des menschlichen Darms machen.

Die Aufklärung möglicher Fitnessfaktoren des Stammes *E. coli* Nissle 1917 sollte in dieser Arbeit in Angriff genommen werden. Der Fokus sollte hierbei auf der Regulation der Curli- und Zellulosebiosynthese liegen, da beide zum biofilmbildenden Phänotyp des Stammes beitragen und somit die Kolonisierungsfähigkeit maßgeblich beeinflussen könnten. In der auch bei 37 °C sehr starken Ausprägung des *rdar*-Morphotyps unterscheidet sich dieser Stamm von den uropathogenen O6-Stämmen *E. coli* 536 und CFT073, die diesen Morphotyp nur bei 28 °C bzw. gar nicht aufweisen. Da es bei *E. coli* Nissle 1917 zu Spontanmutanten kommen kann, die weder Curli-Fimbrien noch Zellulose synthetisieren, der wichtigste Regulator CsgD jedoch intakt ist (Grozdanov, 2004) wurde vermutet, dass evtl. ein übergeordneter Regulator eine Rolle spielt. Zur Überprüfung dieser Hypothese sollte mittels Transposon-Mutagenese ein *rdar*-negativer Klon gefunden und charakterisiert werden und so ein *csgD*-unabhängiger Regulationsmechanismus der Biofilmbildung nachgewiesen werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte eine bislang nicht beschriebene genomische Insel im Stamm *E. coli* Nissle 1917 untersucht werden. Auf dieser befindet sich ein PKS/NRPS-Gencluster, dessen Produkt *in vitro* einen zytopathischen Effekt auf Epithelzellen ausübt. Da zuvor keine aktiven Komponenten, die den Wirtsorganismus direkt beeinflussen können, be-

schrieben wurden, stand auch diese Untersuchung im Zusammenhang mit möglichen probiotischen Effekten des Stammes *E. coli* Nissle 1917 bzw. dessen Fitness. Zusätzlich war eine genauere Charakterisierung dieser neuen genomischen Insel von Interesse. Sowohl die Verbreitung der Insel als auch die Regulation der PKS/NRPS-Gene sollten untersucht und eine Überexpression der produzierten Substanz erzielt werden. Dazu sollten Transkriptions- und Luciferase-Reportergenanalysen in Zellkultur im Vergleich zu normalem Wachstum durchgeführt werden, um evtl. Expressionsunterschiede unter verschiedenen Bedingungen zu detektieren. Ausgesuchte Promotoren im Gencluster sollten gegen konstitutive Promotoren ausgetauscht werden, um eine gesteigerte Synthese der Substanz zu erzielen.

3 Material

3.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sowie deren genotypischen Eigenschaften sind in Tab. 3 einschließlich Herkunftsangaben aufgeführt.

Tab. 3: Bakterienstämme.

<i>E. coli</i> Stamm	Beschreibung	Quelle/Referenz
Nissle 1917 (DSM6601, EcN)	Wildtyp, Fäkalisolat (O6:K5:H1)	Nissle (1918)
Nissle 1917 Sm ^r	streptomycinresistente Variante von <i>E. coli</i> Nissle 1917	L. Grozdanov, Würzburg
IHE3034	Wildtyp, Neugeborenen-Meningitis-Isolat (O18:K1:H7)	Korhonen <i>et al.</i> (1985)
CFT073	Wildtyp, Pyelonephritis-Isolat (O6:K1:H?)	Mobley <i>et al.</i> (1990)
536	Wildtyp, Pyelonephritis-Isolat (O6:K15:H31)	Berger <i>et al.</i> (1982)
MG1655	K-12-Isolat	Blattner <i>et al.</i> (1997)
DH5 α	F ⁻ <i>endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1</i> Δ (<i>argF-lacZYA</i>) U169 (Φ 60 Δ <i>lacZ M15</i> λ ⁻)	Bethesda Research Laboratories
DH10B	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 endA1 ara</i> Δ 139 Δ (<i>ara leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ ⁻ <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>nupG</i>	Invitrogen
SY327 λ <i>pir</i>	Δ (<i>lac pro</i>) <i>argE</i> (Am) <i>rif nalA recA56 pir</i> R6K	Donnenberg & Kaper (1991)
SM10 λ <i>pir</i>	<i>thi thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu pir</i> R6K Km	Simon <i>et al.</i> (1982)
EcN Δ <i>csgBA</i>	<i>csgBA</i> -Deletionsmutante von <i>E. coli</i> Nissle 1917	diese Arbeit (4.5.2)
EcN Δ <i>csgD</i>	<i>csgD</i> -Deletionsmutante von <i>E. coli</i> Nissle 1917	diese Arbeit (4.5.2)
EcN Δ <i>yaiC</i>	<i>yaiC</i> -Deletionsmutante von <i>E. coli</i> Nissle 1917	diese Arbeit (4.5.2)
EcN Δ <i>yaiC</i> Δ <i>csgD</i>	<i>yaiC/csgD</i> -Doppelmutante von <i>E. coli</i> Nissle 1917	diese Arbeit (4.5.2)
EcN Δ PKS	Deletion der <i>asnW</i> -Insel in Nissle 1917	diese Arbeit (4.5.2)

3 Material

Tab. 3: Bakterienstämme. (Fortsetzung)

<i>E. coli</i> Stamm	Beschreibung	Quelle/Referenz
IHE3034 Δ PKS	Deletion der <i>asnW</i> -Insel in IHE3034	diese Arbeit (4.5.2)
CFT073 Δ PKS	Deletion der <i>asnW</i> -Insel in CFT073	diese Arbeit (4.5.2)
EcN Δ pMUT1/2	Nissle 1917 ohne seine kryptischen Plasmide pMUT1 und pMUT2	S. Oswald, Würzburg
EcN P _{tet} 1960	Insertion von <i>tet^{p/o}</i> oberhalb <i>clbA</i>	diese Arbeit (4.5.3)
EcN P _{tet} 1959	Insertion von <i>tet^{p/o}</i> oberhalb <i>clbB</i>	diese Arbeit (4.5.3)
EcN P _{tet} 1943	Insertion von <i>tet^{p/o}</i> oberhalb <i>clbQ</i>	diese Arbeit (4.5.3)
EcN P _{tet} 4711	Insertion von <i>tet^{p/o}</i> oberhalb <i>clbR</i>	diese Arbeit (4.5.3)
EcN P _{tet} 4711 Δ Repeat	Insertion von <i>tet^{p/o}</i> oberhalb <i>clbR</i> ; Deletion der <i>Repeat</i> -Region	diese Arbeit (4.5.3)
EcN P _{tet} 1959/1960	Insertion von <i>tet^{p/o}</i> jeweils oberhalb <i>clbB</i> und <i>clbA</i>	diese Arbeit (4.5.3)
IHE3034 P _{tet} 1960	Insertion von <i>tet^{p/o}</i> oberhalb <i>clbA</i>	diese Arbeit (4.5.3)
IHE3034 P _{tet} 1959	Insertion von <i>tet^{p/o}</i> oberhalb <i>clbB</i>	diese Arbeit (4.5.3)
IHE3034 P _{tet} 4711	Insertion von <i>tet^{p/o}</i> oberhalb <i>clbR</i>	diese Arbeit (4.5.3)
EcN 1943:: <i>lux</i>	Transkriptionsfusion von <i>clbQ</i> mit <i>luxABCDE</i> -Reporter	diese Arbeit (4.5.4)
EcN 1959:: <i>lux</i>	Transkriptionsfusion von <i>clbB</i> mit <i>luxABCDE</i> -Reporter	diese Arbeit (4.5.4)
EcN 1960:: <i>lux</i>	Transkriptionsfusion von <i>clbA</i> mit <i>luxABCDE</i> -Reporter	diese Arbeit (4.5.4)
EcN 4711:: <i>lux</i>	Transkriptionsfusion von <i>clbR</i> mit <i>luxABCDE</i> -Reporter	diese Arbeit (4.5.4)
IHE3034 1943:: <i>lux</i>	Transkriptionsfusion von <i>clbQ</i> mit <i>luxABCDE</i> -Reporter	diese Arbeit (4.5.4)
IHE3034 1959:: <i>lux</i>	Transkriptionsfusion von <i>clbB</i> mit <i>luxABCDE</i> -Reporter	diese Arbeit (4.5.4)
IHE3034 1960:: <i>lux</i>	Transkriptionsfusion von <i>clbA</i> mit <i>luxABCDE</i> -Reporter	diese Arbeit (4.5.4)
IHE3034 4711:: <i>lux</i>	Transkriptionsfusion von <i>clbR</i> mit <i>luxABCDE</i> -Reporter	diese Arbeit (4.5.4)
EcN <i>lacZ</i> :: <i>lux</i>	Transkriptionsfusion von <i>lacZ</i> mit <i>luxABCDE</i> -Reporter	diese Arbeit (4.5.4)

3.2 Plasmide und Vektoren

Verwendete Klonierungsvektoren sowie in dieser Arbeit konstruierte Plasmide sind unter Angabe ihrer Eigenschaften und Quellen in Tab. 4 angegeben.

Tab. 4: Plasmide und Vektoren.

Vektor/Plasmid	Beschreibung	Quelle/Referenz
pGEM [®] -T Easy	T/A-Klonierungsvektor; <i>bla lacZα</i>	Promega
pBeloBAC11	Klonierungsvektor; <i>cat lacZα repE sopABC cos loxP ori2</i>	New England Biolabs
pUC19	Klonierungsvektor; <i>bla lacZα</i>	New England Biolabs
pGP704	<i>bla oriR6K mobRP4</i>	Miller & Mekalanos (1984)
pASK75	Expressionsvektor; <i>bla tetR tet^{p/o}</i>	Skerra (1994)
pKD3	<i>bla FRT cat ori_{Rγ}</i>	Datsenko & Wanner (2000)
pKD4	<i>kan FRT cat ori_{Rγ}</i>	Datsenko & Wanner (2000)
pKD46	<i>bla araC-P_{araB}-γ-β-exo ori_{R101} repA101 (ts)</i>	Datsenko & Wanner (2000)
pCP20	<i>bla cat flp (ts)</i>	Cherepanov & Wackernagel (1995)
pUT mini-Tn5 Cm	Minitransposon-Vektor; <i>bla cat tnp oriR6K mobRP4</i>	Biomedal
pUC-Not-Dual	pUC19-Derivat; <i>gfp luxABCDE</i>	Qazi <i>et al.</i> (2001)
pBACpks	pBeloBAC11 mit 67,9 kb Fragment des IHE3034 Chromosoms einschließlich der kompletten <i>asnW</i> -Insel	Buchrieser C., unveröffentlicht
pGEM-T Easy <i>npt-P_{tet}</i>	pGEM [®] -T Easy-Derivat; Matrize zur Amplifikation des rekombinanten Konstrukts <i>npt-P_{tet}</i>	diese Arbeit (4.4.1)
pASK75-1943	pASK75-Derivat zur induzierbaren Expression von <i>clbQ</i> aus IHE3034	diese Arbeit (4.4.2)
pASK75-1960	pASK75-Derivat zur induzierbaren Expression von <i>clbA</i> aus IHE3034	diese Arbeit (4.4.3)
pASK75-4711/1960	pASK75-Derivat zur induzierbaren Expression von <i>clbR</i> und <i>clbA</i> aus IHE3034	diese Arbeit (4.4.4)

Tab. 4: Plasmide und Vektoren. (Fortsetzung)

Vektor/Plasmid	Beschreibung	Quelle/Referenz
pFuseA-npt	pGP704-Derivat zur Integration ins Chromosom via FRT-Sequenz (<i>kan oriR6K FRT luxABCDE</i>)	diese Arbeit (4.4.5)
pGEM T-Easy 673	pGEM [®] -T Easy-Derivat mit einkloniertem intergenischem Bereich von 673 bp zw. <i>clbB</i> und <i>clbR</i>	diese Arbeit (4.4.6)
pGEM T-Easy 463	pGEM [®] -T Easy-Derivat mit einkloniertem intergenischem Bereich von 463 bp zw. <i>clbB</i> und <i>clbR</i>	diese Arbeit (4.4.6)
pGEM T-Easy 445	pGEM [®] -T Easy-Derivat mit einkloniertem intergenischem Bereich von 445 bp zw. <i>clbB</i> und <i>clbR</i>	diese Arbeit (4.4.6)
pGEM T-Easy 235	pGEM [®] -T Easy-Derivat mit einkloniertem intergenischem Bereich von 235 bp zw. <i>clbB</i> und <i>clbR</i>	diese Arbeit (4.4.6)

3.3 Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG (Ebersberg) und Sigma-Genosys (Steinheim) bezogen und sind im Anhang in Tab. 13 mit Angaben zu ihrer Verwendung zusammengestellt.

3.4 Chemikalien, Enzyme und Kits

Die verwendeten Chemikalien, Antibiotika und Enzyme wurden von den Firmen New England Biolabs (Frankfurt am Main), Invitrogen (Karlsruhe), MBI Fermentas (St. Leon-Roth), Roche Diagnostics (Mannheim), Gibco BRL (Eggenstein), Dianova (Hamburg), Difco (Augsburg), Merck (Darmstadt), Oxoid (Wesel), GE Healthcare/Amersham Biosciences (Freiburg), Roth (Karlsruhe), Serva und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) erworben.

Lysozym-Stammlösung: 50 mg/ml Lysozym in H₂O_{dest.}

Proteinase-Stammlösung: 100 mg/ml Proteinase K in H₂O_{dest.}

RNase-Stammlösung: 10 mg/ml RNase A in 10 mM Na-Acetat, pH 5,2

Es kamen folgende Kits zum Einsatz:

- ABI Prism® Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Foster City (USA)
- ECL™ Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System, GE Healthcare/ Amersham Biosciences, Freiburg
- pGEM® T-Easy Vector System, Promega, Mannheim
- QIAGEN Plasmid Midi und Maxi Kit, QIAGEN, Hilden
- QIAquick® PCR Purification/Gel Extraction Kit, QIAGEN, Hilden
- QIAquick® RNeasy Kit, QIAGEN, Hilden
- Quick Ligation Kit, New England Biolabs, Frankfurt am Main
- SuperScript™ III Reverse Transcriptase, Invitrogen, Karlsruhe

Marker zur Größenbestimmung von DNA- und RNA-Fragmenten bei der Agarosegelelektrophorese wurden von den Firmen MBI Fermentas (St. Leon-Roth) und peqLab (Erlangen) bezogen (Abb. 9).

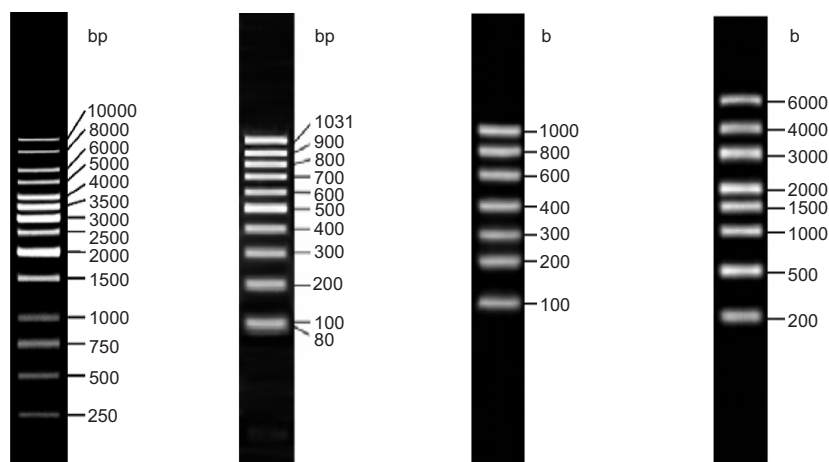


Abb. 9: Marker für die Elektrophorese. A: GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, (Fermentas); B: GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Fermentas); C: peqGOLD Low Range RNA-Leiter (peqLab); D: peqGOLD High Range RNA-Leiter (peqLab)

3.5 Medien und Zusätze

Als Lösungsmittel für Medien diene destilliertes Wasser. Feste Nährböden enthielten zusätzlich 1,5 % (w/v) Agar. Sterilisation erfolgte durch Autoklavieren (15 min, 121 °C). Hitzelabile Zusätze wurden durch Filtration sterilisiert und den Medien nach Abkühlen auf ca. 50 °C zugesetzt.

Lysogen Broth (LB)	Caseinhydrolysat (Pepton 140)	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
IPTG-X-Gal-Platten	LB-Agar mit:	
	IPTG	0,5 mM
	X-Gal	80 µg/ml
Terrific Broth (TB)	Caseinhydrolysat (Pepton 140)	12 g
	Hefeextrakt	24 g
	Glycerin	4 ml
	TB Kaliumsalze	100 ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
	TB Kaliumsalze:	
	K ₂ HPO ₄	125,5 g
	KH ₂ PO ₄	23 g
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
	Calcofluor-Medium	Caseinhydrolysat (Pepton 140)
Hefeextrakt		5 g
Calcofluor (200 mg/ml)		1 ml
H ₂ O _{dest.}		ad 1000 ml
Kongorot-Medium	Caseinhydrolysat (Pepton 140)	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	Kongorot (0,4 mg/ml)	1 ml
	Coomassie Brilliant Blue (0,2 mg/ml)	1 ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
SOB-Medium	Caseinhydrolysat (Pepton 140)	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	1 M Glukose	20 ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
M9-Minimalmedium	5× M9-Salze	200 ml
	10 % (w/v) Casaminosäuren	30 ml
	1 M MgCl ₂	2 ml
	1 M CaCl ₂	0,1 ml
	20 % (w/v) Glukose	10 ml

	0,2 % (w/v) Thiamin	1 ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
	5 × M9-Salze:	
	Na ₂ HPO ₄ × 7 H ₂ O	64 g
	KH ₂ PO ₄	15 g
	NaCl	2,5 g
	NH ₄ Cl	5 g
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
M63-Minimalmedium	20 % (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄	10 ml
	KH ₂ PO ₄	13,6 g
	10 % (w/v) MgSO ₄	1 ml
	0,1 % (w/v) FeSO ₄	1 ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 978 ml
	pH 7,0 (KOH)	
	0,05 % (w/v) Thiamin	2 ml
	20 % (w/v) Glukose	20 ml
Antibiotika	Ampicillin (Ap)	100 mg/ml in H ₂ O _{dest.}
	Chloramphenicol (Cm)	20 mg/ml in 70 % EtOH
	Kanamycin (Km)	50 mg/ml in H ₂ O _{dest.}
	Streptomycin (Sm)	500 mg/ml in H ₂ O _{dest.}
	Tetracylin (Tc)	10 mg/ml in 70 % EtOH

Antibiotika wurden als 1000-fach konzentrierte Stammlösungen angesetzt und bei -20 °C gelagert.

Zellkulturmedium	MEM (<i>Minimal Essential Medium</i>)	500 ml
	FCS (<i>Fetal Calf Serum</i>), hitzeinaktiviert	50 ml
	L-Glutamin	5,5 ml
	nicht-essentielle Aminosäuren	5,5 ml
Interaktionsmedium	DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)	500 ml
	FCS (<i>Fetal Calf Serum</i>), hitzeinaktiviert	25 ml
	L-Glutamin	5,5 ml
	nicht-essentielle Aminosäuren	5,5 ml
	HEPES	15 mM

Medien und Zusätze für die Zellkultur wurden gebrauchsfertig von den Firmen c.c.pro (Oberdorla) und PAA Laboratories (Pasching, Österreich) bezogen.

3.6 Puffer und Lösungen

CaCl₂-Lösung	50 mM CaCl ₂
	10 % (v/v) Glycerin

Cell-Stop-Solution	5 % (v/v) Phenol in Ethanol
Denaturierungslösung:	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
Depurinierungslösung:	250 mM HCl
DNA-Ladepuffer (6×):	50 % (v/v) TE 49,2 % (v/v) Glycerin 0,04 % (w/v) Xylencyanol 0,04 % (w/v) Bromphenolblau
EBSS:	1,8 mM CaCl ₂ 0,8 mM MgSO ₄ 5,4 mM KCl 116,2 mM NaCl 1,0 mM NaH ₂ PO ₄ 5,6 mM Glukose 26,2 mM NaHCO ₃
KMT:	10 mM KCl 5 mM MgCl ₂ 10 mM Tris
MOPS (10×):	200 mM MOPS 50 mM Na-Acetat 10 mM EDTA
NEMST:	400 mM NaCl 40 mM EDTA 20 mM Tris 1 % (w/v) SDS 1 % (v/v) β-Mercaptoethanol
Neutralisierungslösung:	1,5 M NaCl 0,5 M Tris-HCl pH 7,5
PBS:	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄
Restriktionspuffer (10×):	220 mM Tris-Acetat pH 7,9 660 mM K-Acetat 100 mM Mg-Acetat 5 mM DTT 1 mg/ml BSA
RNA-Ladepuffer (2×):	65 % (v/v) Formamid 12 % (v/v) Formaldehyd

	20 % (v/v) 10× MOPS 4 % (v/v) 50 % Saccharose 0,02 % (w/v) Bromphenolblau 0,02 % (w/v) Xylencyanol
Saline:	8,5 mM NaCl 0,7 mM MgSO ₄ × 7 H ₂ O
SSC (20×):	0,3 M Na ₃ -Citrat 3 M NaCl pH 7,0
TAE (50×):	2 M Tris 1 M Essigsäure 0,1 M EDTA pH 8,3
TE:	10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA
TNE:	10 mM Tris-HCl pH 8,0 10 mM NaCl 10 mM EDTA
TNEX:	TNE 1 % Triton-X 100
TSS:	85 % LB (3.5) 10 % (w/v) PEG 3350 5 % DMSO 50 mM MgCl ₂ × 6 H ₂ O pH 6,5
Waschpuffer (ECL):	6 M Harnstoff 0,4 % SDS 0,5 × SSC

3.7 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Autoklaven	Fedegari (FOM/B50, 9191E), H+P Labortechnik (Varioklav 500)
Chemilumineszenzkamera	Intas (Chemi Lux)
Elektrophoresekammern	Bio-Rad (Sub-Cell GT, Mini-PROTEAN 3)
Elektroporator	Bio-Rad (Gene Pulser Xcell)
Feinpipetten	Gilson (pipetman), Eppendorf (Reference)
Feinwaage	Chyo Balance Corp. (JL-180)
Gefrierschränke	Liebherr (Öko super, -20 °C), Hereaus (-80 °C)

3 Material

Geldokumentation	Intas (Gel iX Imager, Gel-Pro Analyzer 4.5)
Heizblock	Liebisch
Hybridisierungsöfen	Hybaid (Mini10)
Inkubatoren	Heraeus, Memmert
Kühlschrank	Privileg (Superöko)
Luminometer	Berhold (Lumat)
Magnetrührer	GLW (M21)
Mikroskope	Zeiss (Axiolab)
Mikrowelle	Privileg (8020)
Netzgeräte	Bio-Rad (PowerPac 300)
PCR-Gerät	Biometra (T3)
pH-Meter	WTW (pH 523)
Photometer	Pharmacia Biosystems (Ultraspec III)
Röntgenfilmentwickler	Agfa (Curix 60)
Schüttelinkubator	Braun-Melsungen (Clim-O-Shake), New Brunswick Scientific (Innova 4300)
Sequenzierer	Applied Biosystems (ABI Prism 310 Genetic Analyzer)
Sterilbank	Nunc (Microflow biological safety cabinet)
UV-Crosslinker	Bio-Rad (GS Gene Linker®)
Tischmischer	Scientific Industries (Vortex Genie 2)
Tischzentrifuge	Eppendorf (5415C), Heraeus (Biofuge fresco)
Wasseraufbereitungsanlage	GFL (Bi-Dest 2304)
Wasserbad	Memmert (GFL 1083)
Zentrifuge	Beckman (J2-HC)

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden sämtlich von den Firmen ABgene (Hamburg), Becton Dickinson (Heidelberg), Bio-Rad (München), Eppendorf (Hamburg), Greiner Bio-One (Frickenhausen), peqLab (Erlangen), Millipore (Schwalbach), Nalgene (Rochester, USA), Sarstedt (Nümbrecht) sowie Whatman (Dassel) bezogen.

4 Methoden

4.1 Kultur von Bakterien

4.1.1 Anzucht und Stammhaltung

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme wurden, soweit nicht anders angegeben, in LB oder auf LB-Agar angezogen, dem gegebenenfalls die entsprechenden Antibiotika zugesetzt wurden. Inkubation erfolgte je nach Anwendung bei 30 °C, 37 °C oder 42 °C. Stämme wurden auf Festmedien bei 4 °C gelagert und regelmäßig auf frische Agarplatten überstrichen. Flüssigkulturen wurden mit Einzelkolonien von Agarplatten beimpft und bei 180-220 Upm geschüttelt.

Für Dauerkonserven wurden Aliquots von Flüssigkulturen mit sterilem Glycerin versetzt (Endkonzentration 30 %) und bei -80 °C eingefroren.

4.1.2 Bestimmung des Wachstums in Flüssigkulturen

Das Bakterienwachstum in Flüssigkulturen wurde, gegebenenfalls in angemessener Verdünnung, durch die photometrische Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600 \text{ nm}$ verfolgt.

4.1.3 Phänotypische Charakterisierung

Nachweis des *rdar*-Morphotyps (Curli- und Zelluloseexpression) Zum Nachweis von Curli-Fimbrien und Zellulosesynthese (*rdar*-Morphotyp) wurden die zu testenden Stämme auf Kongorot-Agar (3.5) überimpft und bei 30 °C und 37 °C für 48 h inkubiert. Als Kontrollen dienten der *rdar*-positive Stamm *E. coli* Nissle 1917 sowie eine *rdar*-negative Spontanmutante des Stammes.

Nachweis der Zellulosesynthese Die Synthese von Zellulose wurde durch Kultur der entsprechenden Stämme auf Calcofluor-Agar (3.5) und anschließende Betrachtung der Kolonien unter UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) nachgewiesen. Zellulose-positive Stämme konnten durch deren Fluoreszenz identifiziert werden.

Nachweis von Polyketidproduktion Polyketidproduktion wurde durch Kokultur der entsprechenden Stämme mit HeLa-Zellen nachgewiesen (4.2.2).

4.2 Zellkultur

4.2.1 Propagation von Zelllinien

Humane Cervixepithelzellen (HeLa) wurden in Zellkulturmedium (MEM, 10 % FCS, neAA) bei 37 °C und 5 % CO₂ in Zellkulturflaschen kultiviert. Kulturen, die 60-80 % konfluent waren, wurden 5 min mit 5 ml Trypsin-EDTA inkubiert und mit 5 ml frischem Medium in Suspension gebracht. Die Zellen wurden in einer 1:5 oder 1:10 Verdünnung ausgesät und weiter kultiviert.

4.2.2 Kokultur von HeLa-Zellen mit *E. coli*-Stämmen

Für die Kokultur wurde das Zellkulturmedium gegen Interaktionsmedium (DMEM, 5 % FCS, 15 mM HEPES) ausgetauscht und mit 1/100 Vol. einer *E. coli*-ÜNK beimpft. Nach einer Inkubation von 4-5 h bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Medium entfernt, die Zellen viermal 1 min mit EBSS gewaschen und in Zellkulturmedium mit Gentamicin (200 µg/ml) für weitere 72 h kultiviert. Für die Mikroskopie wurden die Zellen gemäß Standardprotokoll mit Giemsa-Lösung gefärbt.

Zur Trennung von Bakterien und HeLa-Zellen bei gleichzeitiger Gewährleistung jeglichen Stofftransports wurden *E. coli*-Stämme gegebenenfalls in Filtereinsätzen (BD Falcon™ Cell Culture Inserts, 0,4 µm Porengröße) oberhalb der Epithelzellen kultiviert (Transwell-System).

4.3 Allgemeine molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders angegeben, sind alle molekularbiologischen Methoden dem „CHS Laboratory Manual“ (Maniatis *et al.*, 1989) entnommen.

4.3.1 Isolierung genomischer DNA aus *E. coli*

Die Isolierung genomischer DNA aus *E. coli* erfolgte nach Grimberg *et al.* (1989). Von einer Bakterien-ÜNK wurde 1 ml in einem Reaktionsgefäß abzentrifugiert (1 min, 14000 Upm), das Zellpellet einmal mit 1 ml TNE gewaschen und in 270 µl TNEX resuspendiert. Es wurden 30 µl Lysozymlösung zugesetzt und die Zellsuspension 20 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 15 µl Proteinase K folgte eine Inkubation für 2 h bei 65 °C. Die klare Lösung wurde mit 15 µl 5 M NaCl versetzt und eine Phenol- sowie eine Chloroformextraktion durchgeführt. Die genomische DNA wurde mit 2,5 Vol. 100 % Ethanol gefällt und durch Zentrifugation

(15 min, 14000 Upm) pelletiert. Nach einmaligem Waschen mit 70 % Ethanol wurde die DNA getrocknet, in 100 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gelöst und bei 4 °C aufbewahrt.

4.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Mini-Präparation Für die Isolierung von Plasmid-DNA im Kleinmaßstab wurden die Puffer 1-3 des *QIAGEN Plasmid Midi Kits* (3.4) verwendet. Von einer Bakterien-ÜNK wurde 1 ml in einem Reaktionsgefäß abzentrifugiert (1 min, 14000 Upm). Das Zellpellet wurde in 150 μl Puffer 1 resuspendiert, danach die Bakterien durch Zugabe von 150 μl Puffer 2 lysiert (5 min, RT). Zur Neutralisation wurden 150 μl Puffer 3 zugegeben. Durch Zentrifugation (10 min, 14000 Upm) wurden denaturierte Proteine und chromosomale DNA abgetrennt. Der verbleibende Überstand wurde mit 0,7 Vol. Isopropanol versetzt und die präzipitierte Plasmid-DNA abzentrifugiert (15 min, 14000 Upm). Nach Waschen mit 70 % Ethanol wurde die Plasmid-DNA getrocknet und in 30-50 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ aufgenommen.

Für hochreine Plasmid-DNA erfolgte vor der Fällung mit Isopropanol eine Phenol- sowie eine Chloroformextraktion.

Midi-Präparation Isolierung von Plasmid-DNA aus bis zu 100 ml Bakterien-ÜNK erfolgte mittels *QIAGEN Plasmid Midi Kit* (3.4) gemäß Protokoll des Herstellers.

4.3.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus *E. coli* und RT-PCR

Isolierung von Gesamt-RNA Die Isolierung von Gesamt-RNA aus *E. coli*-Stämmen erfolgte mittels heißer Phenolextraktion nach [Chuang et al. \(1993\)](#). 25 ml Flüssigkultur wurde bei der gewünschten OD_{600} mit 1/10 Vol. *Cell Stop Solution* vermischt und abzentrifugiert (5 min, $5500 \times g$, 4 °C). Das Pellet wurde in 960 μl eiskaltem KMT-Puffer resuspendiert und auf zwei Reaktionsgefäße mit jeweils 480 μl heißer Phenollösung (400 μl NEMST, 80 μl Phenol) verteilt. Die Suspension wurde 30 s gevortext und 5 min bei 90 °C inkubiert. Zelltrümmer und denaturierte Proteine wurden abzentrifugiert (15 min, 14000 Upm) und der Überstand zweimal mit 200 μl Phenol und zweimal mit 400 μl Chloroform extrahiert. Die RNA wurde durch Zusatz von 900 μl Isopropanol und zehnminütiger Inkubation auf Eis gefällt und durch Zentrifugation pelletiert (15 min, 14000 Upm). Das Pellet wurde mit 1 ml 70 % Ethanol (-20 °C) gewaschen, getrocknet und in 45 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ aufgenommen. Gleiche Proben wurden vereint und bei -80 °C eingefroren.

DNase I-Behandlung von Gesamt-RNA Zur enzymatischen Entfernung von DNA-Kontaminationen mittels DNase I wurden 20 μl der nach 4.3.3 isolierten Gesamt-RNA in

einem 100 μl Reaktionsansatz (65 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$, 10 μl 10 \times *One-Phor-All* Puffer, 5 μl DNase I) eine Stunde bei 37 °C inkubiert, anschließend mit Hilfe des *QIAquick RNeasy Kits* (QIAGEN, 3.4) gemäß Herstellerangaben aufgereinigt und mit 30 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ eluiert. Komplette Hydrolyse der DNA wurde mittels PCR nachgewiesen.

cDNA-Synthese und RT-PCR DNA-freie Gesamt-RNA wurde mittels *SuperScriptTM III Reverse Transcriptase* (Invitrogen) und 1 μg *random hexamer primers* gemäß Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. In der Regel wurden 2-4 μg RNA eingesetzt und die Reaktion für 60 min bei 50 °C inkubiert.

Transkripte wurden ausgehend von seriell verdünnter cDNA durch PCR nachgewiesen (4.3.5).

4.3.4 Bestimmung von Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentrationsbestimmung genomischer DNA und Plasmid-DNA erfolgte spektralphotometrisch in geeigneter Verdünnung bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine Absorption von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 μg dsDNA/ml bzw. 40 μg RNA/ml (Maniatis *et al.*, 1989).

Die Reinheit der Präparate wurde über den Quotienten aus E_{260}/E_{280} ermittelt. Reine Nukleinsäurelösungen weisen einen Quotienten von 1,8 bis 2,0 auf.

4.3.5 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Die PCR wurde angewendet um:

- DNA-Abschnitte in verschiedenen *E. coli*-Stämmen nachzuweisen
- DNA-Abschnitte für Klonierungen und Sequenzierungen zu amplifizieren
- Resistenzkassetten und andere Konstrukte für die direkte Integration ins Chromosom zu amplifizieren
- Insertion, Orientierung und Deletion von Resistenzkassetten und anderen Konstrukten zu überprüfen
- unterschiedliche DNA-Abschnitte rekombinant in einem PCR-Produkt miteinander zu verbinden (rekombinante PCR, 4.4.1)
- Insertionsstellen bei der Transposon-Mutagenese zu ermitteln (inverse PCR, 4.5.1)

- durch reverse Transkription erhaltene cDNA qualitativ und semi-quantitativ zu analysieren (RT-PCR, 4.3.3)

Standardansätze enthielten $1 \times$ Reaktionspuffer, $0,5 \mu\text{M}$ jedes Oligonukleotids, $25 \mu\text{M}$ jedes dNTPs, $1,5\text{-}3 \text{ mM}$ MgCl_2 sowie $0,025\text{-}0,04 \text{ U}/\mu\text{l}$ Polymerase und variierten im Volumen je nach Anwendung zwischen $20\text{-}400 \mu\text{l}$. Als Ausgangsmaterial (*template*) für die Amplifikation diente entweder Plasmid-DNA ($0,5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ Ansatz), ein Bakterienlysat ($0,05 \mu\text{l}/\mu\text{l}$ Ansatz) oder cDNA.

Als Polymerasen dienten für Standard-PCRs *Taq*-DNA-Polymerase (QIAGEN) und für Anwendungen, bei denen *proof-reading*-Aktivität benötigt wurde, *DAP GoldStar DNA-Polymerase* (Eurogentec) oder *PhusionTM High-Fidelity DNA-Polymerase* (Finnzymes).

Die PCR-Protokolle variierten je nach verwendeter Polymerase, Schmelztemperaturen der eingesetzten Oligonukleotide sowie der zu erwartenden Produktlänge. Generell setzten sie sich zusammen aus einer initialen Denaturierung des Templates ($60\text{-}120 \text{ s}$, $94\text{-}98 \text{ }^\circ\text{C}$), $25\text{-}35$ Zyklen von Denaturierung ($10\text{-}30 \text{ s}$, $94\text{-}98 \text{ }^\circ\text{C}$), *Annealing* der Oligonukleotid-Primer ($15\text{-}30 \text{ s}$, $55\text{-}65 \text{ }^\circ\text{C}$) und Elongation ($15\text{-}420 \text{ s}$, $72 \text{ }^\circ\text{C}$) sowie einer abschließenden Elongation ($180\text{-}600 \text{ s}$, $72 \text{ }^\circ\text{C}$).

Der Erfolg der PCR-Reaktion wurde durch Elektrophorese eines $5\text{-}10 \mu\text{l}$ Aliquots in einem Agarosegel überprüft. Bei Bedarf wurden PCR-Produkte mit dem *QIAquick PCR Purification Kits* (QIAGEN, 3.4) gemäß Herstellerangaben für weitere Anwendungen wie Transformationen, direkte Sequenzierungen oder Klonierungen gereinigt.

4.3.6 Enzymatische Hydrolyse von DNA

Für die enzymatische Hydrolyse von DNA wurden $0,5\text{-}2 \mu\text{g}$ genomische oder Plasmid-DNA in $1 \times$ Restriktionspuffer mit $1\text{-}2 \text{ U}/\mu\text{g}$ der entsprechenden Restriktionsendonuklease für $1\text{-}2 \text{ h}$ bei der für das Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Für analytische Zwecke betrug das Reaktionsvolumen $10 \mu\text{l}$, präparative Ansätze wurden in entsprechend größeren Volumina durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung des Enzyms (20 min , $65 \text{ }^\circ\text{C}$) gestoppt und gegebenenfalls mittels *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN) gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Vollständige Hydrolyse wurde durch Agarosegelelektrophorese (4.3.7) nachgewiesen.

4.3.7 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren im Agarosegel

Für Routineanalysen wurde DNA in 1-2 %-igen Agarosegelen in 1 x TAE bei 6 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Agarosegele wurden mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) gefärbt, mit H₂O_{dest.} gewaschen und unter UV-Licht ausgewertet.

Isolierte RNA wurde gemäß Standardprotokollen in 1 %-igen Agarosegelen unter Zusatz von MOPS und Formaldehyd elektrophoretisch aufgetrennt.

4.3.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten oder Restriktionsfragmenten für nachfolgende Anwendungen wurden diese durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, ausgeschnitten und mittels *QIAquick Gel Extraktion Kit* (QIAGEN) gemäß Herstellerangaben extrahiert.

4.3.9 Klonierung von DNA

Dephosphorylierung von DNA-5'-Enden Zur Entfernung von 5'-Phosphatgruppen von DNA-Fragmenten wurde der jeweilige Restriktionsansatz nach Hitzeinaktivierung mit 1/10 Vol. Phosphatasepuffer gemischt und pro µg DNA 5 U *Antarctic Phosphatase* (NEB) zugesetzt. Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert, hitzeinaktiviert (10 min, 65 °C) und über präparative Agarosegelelektrophorese (4.3.8) aufgereinigt.

Auffüllen und Entfernen überhängender Enden von Restriktionsfragmenten Durch Restriktionen generierte 5'- bzw. 3'-Überhänge wurden gegebenenfalls mittels T4-DNA-Polymerase (NEB) aufgefüllt bzw. entfernt. Dazu wurde dem jeweiligen Restriktionsansatz 100 µM dNTPs und 1 U/µg T4-DNA-Polymerase zugesetzt. Der Ansatz wurde 15 min bei RT inkubiert und die Reaktion nach Zugabe von EDTA (10 mM Endkonzentration) durch Erhitzen (20 min, 75 °C) gestoppt.

Klonierung von PCR-Produkten Durch PCR generierte DNA-Abschnitte wurden mit Hilfe des *pGEM[®] T-Easy Vector Systems* (Promega) gemäß Herstellerangaben kloniert. Für die PCR wurden hierbei in der Regel Polymerasen verwendet, die einen terminalen Adeninrest an das 3'-Ende ihrer Produkte anhängen, so dass eine direkte T/A-Klonierung möglich war. Bei der Verwendung von Polymerasen, die *blunt-end*-Produkte lieferten, wurden die 3'-Enden zunächst in einer weiteren Reaktion mittels *Taq*-DNA-Polymerase einfach adenyliert.

Klonierung von Restriktionsfragmenten Für Klonierungen von Restriktionsfragmenten mit kompatiblen Enden zum gespaltenen Klonierungsvektor wurden dephosphorylierter Vektor (4.3.9) und Insert in einem Verhältnis 1:3 gemischt und in einem Volumen von 10 μl zusammen mit 1/10 Vol. Ligationspuffer und 50 U T4-DNA-Ligase (NEB) über Nacht bei 4 °C inkubiert. *Blunt-End*-Klonierungen enthielten in der Regel mehr DNA und es wurden bis zu 400 U Ligase eingesetzt.

Alternativ wurde in einigen Fällen das *Quick Ligation Kit* (NEB) eingesetzt und gemäß Herstellerangaben angewendet.

4.3.10 Transformation von *E. coli*-Stämmen

Herstellung und Transformation Ca^{2+} -kompetenter Zellen Aus einer *E. coli* ÜNK wurden 25 ml LB 1:50 beimpft und bei 37 °C bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase geschüttelt ($\text{OD}_{600} \approx 0,6$). Die Kultur wurde 15 min auf Eis gekühlt, abzentrifugiert (5 min, 5000 Upm, 4 °C), in 1 Vol. eiskalter CaCl_2 -Lösung (3.6) resuspendiert und 30 min auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert, in 1/10 Vol. eiskalter CaCl_2 -Lösung resuspendiert und in Aliquots zu 100 μl bei -80 °C gelagert.

Für die Transformation wurden 100 μl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit ca. 0,5-1 μg Plasmid-DNA oder mit 10 μl Ligationsansatz versetzt und für 20 min auf Eis gekühlt. Nach einem Hitzeschock (90 s, 42 °C) wurden die Zellen mit 1 ml LB versetzt und 1 h bei für das Plasmid permissiver Temperatur geschüttelt. Anschließend wurden geeignete Volumina auf Selektionsmedium ausplattiert und die Platten bei entsprechender Temperatur über Nacht inkubiert.

Herstellung und Transformation TSS-kompetenter Zellen Alternativ zur Herstellung und Transformation Ca^{2+} -kompetenter Zellen wurde in einigen Fällen eine Methode nach Chung *et al.* (1989) angewendet. Hierfür wurden ebenfalls 25 ml LB aus einer *E. coli* ÜNK 1:50 beimpft und bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase geschüttelt ($\text{OD}_{600} \approx 0,6$). Anschließend wurden die Zellen pelletiert (5 min, 5000 Upm, 4 °C), in 1/10 Vol. TSS (3.6) aufgenommen und in Aliquots zu 100 μl bei -80 °C gelagert.

Die Transformation und weitere Schritte erfolgten wie unter 4.3.10 beschrieben.

Herstellung und Transformation elektrokompetenter Zellen Aus einer *E. coli* ÜNK wurden 25 ml LB 1:50 beimpft und bei 37 °C bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase geschüttelt ($\text{OD}_{600} \approx 0,6$). Die Kultur wurde 15 min auf Eis gekühlt, abzentrifugiert (5 min, 5000 Upm, 4 °C) und zweimal mit 1 Vol. eiskaltem $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ sowie einmal mit eiskaltem 10 %

Glycerin gewaschen. Das Pellet wurde in 1/125 Vol. 10 % Glycerin resuspendiert, direkt verwendet oder in Aliquots zu 50 μ l bei -80 °C gelagert.

Zur Herstellung elektrokompenter Zellen für die Transformation mit PCR-Produkten nach [Datsenko & Wanner \(2000\)](#) wurden die entsprechenden *E. coli*-Stämme unter geeignetem Selektionsdruck bei 30 °C angezogen und gegebenenfalls Arabinose (100 mM Endkonzentration) zur Induktion der λ -Red-Rekombinase vom Helferplasmid pKD46 zugesetzt.

Für die Transformation wurden die elektrokompenten Zellen auf Eis aufgetaut und mit Plasmid-DNA, PCR-Produkt oder einem Aliquot eines Ligationsansatzes vermischt. Gegebenenfalls wurden Ligationsansätze zu Verringerung der Ionenkonzentration 20 min durch eine Zellulosemembran (Millipore, 0,025 μ m) gegen H₂O_{dest.} dialysiert. Die Transformation erfolgte durch Elektroporation in 2-mm-Küvetten bei 2,5 kV, 25 μ F und 200 Ω (Plasmide) bzw. 600 Ω (PCR-Produkte). Die Zellen wurden in 1 ml LB überführt und 1 h bei permissiver Temperatur geschüttelt. Anschließend wurden geeignete Volumina auf Selektionsmedium ausplattiert und die Platten bei entsprechender Temperatur über Nacht inkubiert.

Wurde mit PCR-Produkten transformiert, erfolgte nach der Elektroporation in der Regel eine Inkubation über Nacht bei RT bevor auf Selektionsmedium ausplattiert wurde.

4.3.11 Konjugation von *E. coli*-Stämmen

Der Transfer von Plasmid-DNA zum Zwecke der Transposon-Mutagenese von *E. coli* Nissle 1917 erfolgte durch Konjugation. Hierfür wurden ÜNKs von Donor- und Rezipientenstamm (OD₆₀₀ jeweils \approx 2,5) abzentrifugiert, in 1 Vol. 10 mM MgSO₄ gewaschen und in erneut 1 Vol. MgSO₄ resuspendiert. Jeweils 600 μ l von Donor und Rezipient wurden miteinander gemischt, 6-fach aufkonzentriert und in 20- μ l-Tropfen auf LB-Platten gegeben. Die Konjugationsansätze wurden ca. 20 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien mit je 3 ml 10 mM MgSO₄ von den Platten gewaschen und 200 μ l der Suspension auf entsprechende Selektivmedien ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden Einzelkolonien isoliert.

4.3.12 DNA-Sequenzierung

Plasmide und PCR-Produkte wurden mittels *ABI Prism[®] Big Dye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) gemäß Herstellerangaben in einer modifizierten PCR-Reaktion sequenziert. Die Aufreinigung und Auftrennung der PCR-Produkte und somit die Bestimmung der DNA-Sequenz erfolgte an einem *ABI Prism[®] 3100 Genetic Analyzer* im Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg.

4.3.13 Hybridisierungsanalysen

Transfer von DNA oder RNA auf Nylonmembranen Der Transfer gelelektrophoretisch aufgetrennter RNA und gespaltener DNA erfolgte mittels Vakuum (-50 mbar) in einer entsprechenden Apparatur. Depurinierung, Denaturierung und Neutralisierung wurden direkt nach anlegen des Vakuums durch jeweils 10-minütiges Überschichten des Gels mit den entsprechenden Lösungen (3.6) durchgeführt. Der Transfer der DNA erfolgte mit $20\times$ SSC für 1-2 h. Anschließend wurde die Membran kurz mit $6\times$ SSC gewaschen und die DNA durch UV-Bestrahlung ($150\text{ mJ}/\text{cm}^2$) fixiert.

Herstellung und Markierung von DNA-Sonden DNA-Abschnitte, die als Sonden dienen sollten, wurden durch PCR amplifiziert und mittels *QIAquick PCR Purification Kits* (QIAGEN, 3.4) aufgereinigt. Die Markierung der Sonden durch kovalente Bindung von Meerrettich-Peroxidase erfolgte gemäß Herstellerangaben mit dem *ECLTM Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System* (GE Healthcare).

Hybridisierung und Signaldetektion Die Hybridisierung erfolgte nach einer einstündigen Prähybridisierung der Membran über Nacht mit 10 ng Sonde/ml Hybridisierungslösung.

Die Signaldetektion geschah nach vorschriftsmäßigem Waschen der hybridisierten Membran mit harnstoffhaltigem ECL-Waschpuffer durch Chemilumineszenz aus Peroxidase/ H_2O_2 -gesteuerter Oxidation von Luminol (*ECLTM Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System*). Emittiertes Licht wurde mittels Röntgenfilm nachgewiesen.

4.4 Konstruktion von Plasmiden

4.4.1 pGEM-T Easy *npt-P_{tet}*

Dieses Plasmid (Abb. 51) diente als Matrize zur Amplifikation des Konstrukts *npt-P_{tet}* für den Promotoraustausch in *E. coli*-Stämmen (4.5.3).

Zunächst wurde das Kanamycinresistenzgen von pKD4 sowie der *tetA*-Promotorbereich von pASK75 mit den Primerpaaren cat5/cat3 bzw. ptet_up_3'oh1/ptet_lp_Bam amplifiziert. Durch die Wahl der Primer entstand ein P_{tet} -Fragment mit einer 5'-Homologie zum 3'-Ende der *nptII*-Kassette. Beide PCR-Produkte wurden aufgereinigt und anschließend in einer weiteren PCR-Reaktion mit den Primern cat5/ptet_lp_Bam als Matrize eingesetzt. Das entstandene rekombinante Produkt wurde aufgereinigt und per T/A-Klonierung in den Vektor pGEM[®]-T Easy ligiert (4.3.9).

Die Richtigkeit des Konstrukts pGEM-T Easy *npt-P_{tet}* wurde durch DNA-Sequenzanalyse bestätigt.

4.4.2 pASK75-1943

Das Gen *clbQ* des Stammes IHE3034 wurde mittels PCR mit dem Oligonukleotidpaar 1943-XbaI_{up-new}/1943-HindIII_{lp} amplifiziert, aufgereinigt und in pGEM[®]-T Easy zwischenkloniert. Aus diesem wurde das *XbaI/HindIII*-Fragment isoliert und in das ebenfalls *XbaI/HindIII*-gespaltene und dephosphorylierte Plasmid pASK75 ligiert.

Die Richtigkeit des Konstrukts pASK75-1943 wurde durch DNA-Sequenzanalyse bestätigt.

4.4.3 pASK75-1960

Das Gen *clbA* des Stammes IHE3034 wurde mittels PCR mit dem Oligonukleotidpaar 1960-XbaI_{up}/1960_{lp} amplifiziert, aufgereinigt und in pGEM[®]-T Easy zwischenkloniert. Aus diesem wurde das *XbaI*-Fragment isoliert und in das ebenfalls *XbaI*-gespaltene und dephosphorylierte Plasmid pASK75 ligiert.

Die Richtigkeit des Konstrukts pASK75-1960 wurde durch DNA-Sequenzanalyse bestätigt.

4.4.4 pASK75-4711/1960

Die Gene *clbR* und *clbA* des Stammes IHE3034 wurde mittels PCR mit dem Oligonukleotidpaar 4711-XbaI_{up}/1960_{lp} amplifiziert, aufgereinigt und in pGEM[®]-T Easy zwischenkloniert. Aus diesem wurde das *XbaI*-Fragment isoliert und in das ebenfalls *XbaI*-gespaltene und dephosphorylierte Plasmid pASK75 ligiert.

Die Richtigkeit des Konstrukts pASK75-4711/1960 wurde durch DNA-Sequenzanalyse bestätigt.

4.4.5 pFuseA-npt

Das Kanamycinresistenzgen von pKD4 wurde mit dem Oligonukleotidpaar *npt_{up}/npt_{lp}* amplifiziert, aufgereinigt und in das *EcoRV*-gespaltene Plasmid pGP704 ligiert. Das resultierende Plasmid pGP704-npt wurde mit *Bam*HI gespalten, die 1561-bp-Bande isoliert und religiert, woraus pR6K-npt resultierte.

Das *luxABCDE*-Gencluster von Plasmid pUC-Not-Dual wurde mit dem Oligonukleotidpaar *FRTA_{luxA_{up}}/luxE_{lp}* amplifiziert. Durch die Wahl der Primer entstand eine FRT-Sequenz sowie eine Ribosomenbindestelle *upstream* von *luxA*. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt und in pGEM[®]-T Easy zwischenkloniert. Aus diesem wurde das 5694 bp *EcoRI*-

Fragment isoliert und in das ebenfalls *EcoRI*-gespaltene und dephosphorylierte Plasmid pR6K-npt ligiert. Das entstandene Plasmid pFuseA-npt sowie seine Vorstufen wurden auf Grund ihrer Pir-Abhängigkeit im Stamm *E. coli* SY327 propagiert.

Die Richtigkeit des Konstrukts pFuseA-npt wurde durch DNA-Sequenzanalyse bestätigt.

4.4.6 pGEM-T Easy 673, 463, 445 und 235

Verschiedene Abschnitte des intergenischen Bereichs zwischen *clbB* und *clbR* wurden mittels PCR amplifiziert und per T/A-Klonierung in pGEM[®]-T Easy ligiert. Die verwendeten Oligonukleotidpaare für die jeweiligen Abschnitte waren up-4710-for/down-4711-rev für pGEM-T Easy 673, up-4710-for/up-4711-rev für pGEM-T Easy 463, down-4710-for/down-4711-rev für pGEM-T Easy 445 sowie down-4710-for/up-4711-rev für pGEM-T Easy 235.

Die Richtigkeit der Konstrukte wurde durch DNA-Sequenzanalyse bestätigt.

4.5 Genetische Manipulationen von *E. coli*-Stämmen

4.5.1 Transposon-Mutagenese von *E. coli* Nissle 1917

Zufällige Insertionsmutanten von *E. coli* Nissle 1917 wurden mit Hilfe des Minitransposons mini-Tn5 Cm generiert (de Lorenzo *et al.*, 1990). Dieses wurde auf dem Plasmid pUTmini-Tn5 Cm konjugativ vom Donorstamm *E. coli* SM10 λ pir auf den streptomycinresistenten Rezipienten *E. coli* Nissle 1917 Sm^r übertragen (4.3.11). Da es sich hier um ein Pir-abhängiges Plasmid handelte, auf dem die Transposase *cis*-kodiert vorlag, fand nach der Übertragung ein einmaliges Transpositionereignis von mini-Tn5 in das Wirtschromosom statt.

Der abgeschwemmte Konjugationsansatz wurde auf LB-Agar (Sm/Cm) ausplattiert. Einzelkolonien wurden parallel auf LB-Agar (Sm/Cm) und Kongorot-Agar übertragen. Die Transposon-Mutanten wurden in 96er-Zellkulturplatten konserviert.

Die Integrationsstellen des Transposons im Chromosom wurden mittels inverser PCR ermittelt. Dazu wurde chromosomale DNA des relevanten Klons isoliert (4.3.1) und $\approx 5 \mu\text{g}$ in einem 50- μl -Ansatz mit *EcoRV* gespalten (4.3.6). Hiervon wurden 10 μl in einem 200- μl -Ansatz mit 100 U Ligase über Nacht bei 4 °C religiert. Die DNA wurde über Nacht bei -20 °C mit Ethanol gefällt und in 50 μl H₂O_{dest.} aufgenommen. Davon wurden 7,5 μl in einem 50- μl -PCR-Ansatz mit dem Oligonukleotidpaar mTn5-invers1/mTn5-invers2 eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt und sequenziert (4.3.12).

4.5.2 Herstellung von *E. coli*-Deletionsmutanten

Deletions- und Integrationsmutanten von *E. coli*-Stämmen wurden mittels einer λ -Red-Rekombinase vermittelten Allelaustauschmethode (Datsenko & Wanner, 2000) hergestellt, die gegebenenfalls für die jeweilige Anwendung modifiziert wurde. Generell wurden die entsprechenden Stämme, in denen die auf dem Plasmid pKD46 kodierte λ -Red-Rekombinase durch Arabinose induziert worden war, mit PCR-Produkten transformiert. Diese bestanden aus einem Chloramphenicol- oder Kanamycinresistenzgen, flankiert von zwei FRT-Sequenzen, und wurden durch Rekombination über kurze, durch die zur Amplifikation verwendeten Primer erzeugten, homologen Bereiche (40-55 bp) in das Chromosom integriert (Abb. 10).

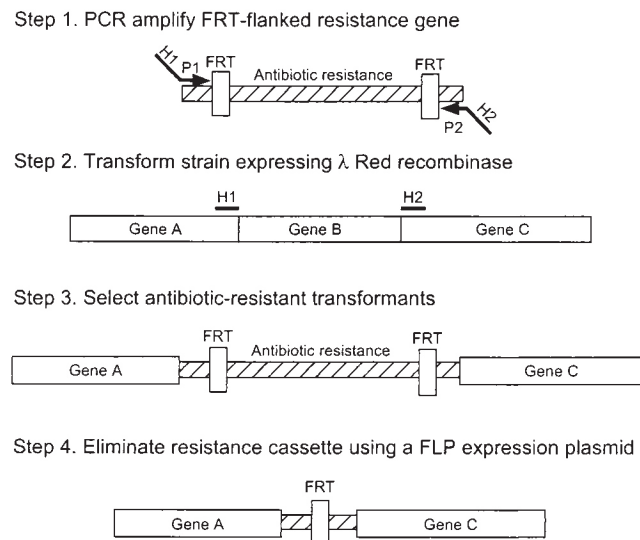


Abb. 10: Schematische Darstellung des λ -Red-Rekombinase vermitteltem Allelaustauschs. Aus Datsenko & Wanner, 2000.

In der Regel wurden die zu integrierenden PCR-Produkte in einem 400 μ l-Ansatz amplifiziert, aufgereinigt, mit Ethanol gefällt und in 10 μ l $H_2O_{dest.}$ aufgenommen. Zur Elektroporation wurden 2-3 μ l eingesetzt. Transformanten wurden bei 37 °C anhand ihres entsprechenden resistenten Phänotyps selektiert.

Die FRT-flankierten Resistenzkassetten wurden gegebenenfalls nach Transformation der Stämme mit pCP20 durch die Aktivität der auf diesem kodierten FLP-Rekombinase aus dem Chromosom entfernt. Dabei blieb nur eine einzelne FRT-Sequenz im Chromosom zurück. Das temperatursensitive pCP20 ging durch unselektive Inkubation der Stämme bei 42 °C verloren.

Integration und Exzision der jeweiligen Kassetten wurde mittels PCR überprüft, wobei ein Oligonukleotid in der (verbleibenden) FRT-Sequenz, das zweite im bakteriellen Chromosom band, so dass ein Produkt nur nach korrekter Integration erhalten werden konnte.

Deletion der Gene *csgBA*, *csgD* und *yaiC* in *E. coli* Nissle 1917 Die Gene *csgBA*, *csgD* und *yaiC* wurden jeweils mittels o.g. Methode durch ein Chloramphenicolresistenzgen (*cat*) ersetzt. Das Resistenzgen von Plasmid pKD3 wurde einschließlich flankierender FRT-Sequenzen mit den Oligonukleotidpaaren *csgBA1/csgBA2*, *csgD1/csgD2* bzw. *yaiC1/yaiC2* amplifiziert, aufgereinigt und in *E. coli* Nissle 1917/pKD46 transformiert. Chloramphenicolresistente Transformanten wurden per PCR mit den Oligonukleotidpaaren *cat5/csgBA3*, *cat5/csgD3* bzw. *cat5/yaiC3* überprüft. Ebenso wurde der Flp-Rekombinase vermittelte Verlust der Resistenzkassette nachgewiesen. Zusätzlich wurde die Deletion der Zielgene durch Southern-Hybridisierung (4.3.13) der mit *MscI* gespaltenen chromosomalen DNA mit *csgBA*-, *csgD*- bzw. *yaiC*-spezifischen Sonden sowie einer *cat*-spezifischen Sonde bestätigt.

Deletion der *asnW*-assoziierten genomischen Insel in den *E. coli*-Stämmen Nissle 1917, IHE3034, CFT073, J96 und 536 Die Deletion der *asnW*-GEI erfolgte mittels Modifikation der o.g. Methode, da dieser DNA-Bereich auf Grund seiner Größe nicht in einem Schritt durch einen Resistenzmarker ersetzt werden. Daher wurden zunächst eine *cat*-Kassette (pKD3) und eine *nptII*-Kassette (pKD4) mit den Primerpaaren PKS1_new/PKS1.1_noFRT_pKD3 bzw. PKS2_new/PKS2.1_noFRT_pKD4 amplifiziert, die *upstream* bzw. *downstream* der GEI integrieren konnten. Die PCR-Produkte wurden nacheinander in die jeweiligen pKD46-tragenden Stämme transformiert. Chloramphenicol- und kanamycinresistente Doppelmutanten wurden selektiert, in welchen die GEI nun von zwei FRT-Sequenzen flankiert war. Die Deletion der GEI erfolgte durch die Aktivität der Flp-Rekombinase nach Transformation mit pCP20 über die flankierenden FRT-Sequenzen. Der Verlust des DNA-Abschnittes wurde sowohl durch PCR mit dem Oligonukleotidpaar PKS3/PKS4 als auch durch Southern-Hybridisierung der *EcoRV*-gespaltenen chromosomalen DNA mit mehreren für die GEI spezifischen Sonden nachgewiesen.

4.5.3 Promotoraustausch in *E. coli*-Stämmen

Für die Insertion des konstitutiven *tetA*-Promotors (P_{tet}) *upstream* der Gene *clbA*, *clbB*, *clbQ* und *clbR* der *asnW*-GEI wurde zunächst das zu inserierenden Fragment bestehend aus *nptII*-Kassette und P_{tet} von Plasmid pGEM-T Easy *npt*- P_{tet} (4.4.1) mit den Oligonukleotidpaaren 1960_up_cat5/1960_lp_ptet (*clbA*), 1959_up_ptet/1959_lp_cat5 (*clbB*),

1943_up_ptet/1943_lp_cat5 (*clbQ*) bzw. 4711_up_cat5/4711_lp_ptet (*clbR*) amplifiziert, aufgereinigt und in die pKD46-tragenden Stämme elektroporiert. Kanamycinresistente Transformanten wurden per PCR mit den Oligonukleotidpaaren cat5/1960_test (*clbA*), cat5/1959_test (*clbB*), cat5/1943_test (*clbQ*) bzw. cat5/4711_test (*clbR*) überprüft. Nach Exzision der *nptII*-Kassette blieb nur die einzelne FRT-Sequenz gefolgt von P_{tet} im Chromosom zurück.

Neben der oben beschriebenen Insertion von Promotoren wurden oberhalb von *clbR* Sequenzbereiche deletiert. Dazu wurde *npt*- P_{tet} mit den Oligonukleotidpaaren 1959_up2_cat5/4711_lp_ptet bzw. 4711_up2_cat5/4711_lp_ptet amplifiziert und wie oben inseriert und überprüft.

Die korrekte Insertion der Promotoren wurde durch Sequenzierung des Übergangs zwischen inserierter DNA und dem entsprechenden ORF überprüft. Die konstitutive Expression der entsprechenden Gene in den manipulierten Stämmen wurde im Vergleich mit den jeweiligen Wildtypen mittels RT-PCR (4.3.3) nachgewiesen.

4.5.4 Herstellung von Reporterfusionen

Transkriptionsfusionen der Gene *clbA*, *clbB*, *clbQ* und *clbR* mit dem Reportergenkonstrukt *luxABCDE* wurden nach der Methode von [Ellermeier et al. \(2002\)](#) hergestellt. Hierzu wurde zunächst eine *nptII*-Kassette durch λ -Red-Rekombinase vermittelten Allelaustausch (4.5.2) direkt stromabwärts des jeweiligen Startcodons integriert. Das Resistenzgen wurde mit den Oligonukleotidpaaren 1943_1/1943_2 (*clbQ*), 1959_cat3/1959_lp_cat5 (*clbB*), 1960_cat3/1960_up_cat5 (*clbA*) bzw. 4711_up_cat5/4711_lp_cat3 (*clbR*) amplifiziert, aufgereinigt und in die pKD46-tragenden Stämme elektroporiert. Transformanten wurden anhand ihres kanamycinresistenten Phänotyps selektiert und per PCR mit den Primerpaaren cat3/1943_3 (*clbQ*), cat3/1959_test (*clbB*), cat3/1960_test (*clbA*) bzw. cat3/4711_test (*clbR*) überprüft. Zur Exzision der *nptII*-Kassette wurden die Stämme mit pCP20 transformiert und bis auf Weiteres bei 30 °C gehalten, um den Verlust des Plasmids zu verhindern. Ampicillinresistente, kanamycinsensitive Phänotypen wurden selektiert und per PCR mit cat3/1943_3 (*clbQ*), cat3/1959_test (*clbB*), cat3/1960_test (*clbA*) bzw. cat3/4711_test (*clbR*) überprüft.

Die Fusion mit den Luziferasegenen geschah nach Transformation der pCP20-tragenden Stämme mit dem Plasmid pFuseA-npt (4.4.5). Dieses wurde durch Flp-Rekombinase vermittelte Rekombination zwischen der chromosomalen und der auf pFuseA-npt liegenden FRT-Sequenz in das bakterielle Chromosom integriert. Kanamycinresistente Klone wurden selektiert und die korrekte Integration durch PCR mit den Primerpaaren luxA_rev_Seq/1943_3 (*clbQ*), luxA_rev_Seq/1959_test (*clbB*), luxA_rev_Seq/1960_test (*clbA*) bzw. luxA_rev_Seq/4711_test (*clbR*) überprüft sowie Mehrfachintegration von pFuseA-npt

mit dem Primerpaar *luxA_rev_Seq/npt_up* ausgeschlossen. Zusätzlich wurde die Richtigkeit der *lux*-Fusionen durch Sequenzierung bestätigt.

4.6 Induktion von *clbA*, *clbB*, *clbQ* und *clbR* in der Zellkultur

Die Plasmiden pASK-1960, pASK-1943 bzw. pASK4711/1960 wurden in die *E. coli*-Stämme Nissle 1917 und IHE3034 transformiert und die Stämme sowohl in regulärer Kokultur als auch im Transwell-System (4.2.2) kultiviert. Expression der klonierten Gene wurde jeweils durch Zugabe von 0,2 µg/ml Anhydrotetracyclin induziert.

Die durch Austausch der Promotoren konstitutiv exprimierenden Stämme wurden ebenso in Kokultur und im Transwell-System auf Polyketidaktivität überprüft.

4.7 Bestimmung der Promotoraktivitäten von *clbA*, *clbB*, *clbQ* und *clbR* mittels *lux*-Reporterfusionen

Die Bestimmung der Transkriptionsraten der mit dem *lux*-Reporter gen fusionierten Gene *clbA*, *clbB*, *clbQ* und *clbR* in den Stämmen *E. coli* IHE3034 und Nissle 1917 erfolgte durch stündliche Messung der Lichtemission in einem Luminometer. Dazu wurde den Kulturen jeweils 100 µl entnommen und die relativen Lichteinheiten (RLU) über eine Integrationsdauer von 2 s ermittelt. Die jeweiligen Werte wurden bezogen auf die optische Dichte der Kulturen (RLU/OD) festgehalten.

4.8 Computergestützte Analysen

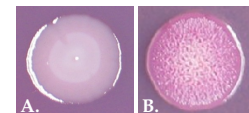
Für standardmäßige Nukleotid- und Aminosäuresequenz- und Datenbankvergleiche wurde BLAST (*basic local alignment search tool*; Altschul *et al.*, 1990) unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> verwendet. Als weitere Datenbanken wurde EcoCyc (Keseler *et al.*, 2005; <http://ecocyc.org>) und KEGG (Ogata *et al.*, 1999; <http://www.genome.jp/kegg/>) genutzt. Abgleich mehrerer Sequenzen wurde mit ClustalW (Thompson *et al.*, 1994; <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) oder MUSCLE (Edgar, 2004; <http://www.drive5.com/muscle/>) durchgeführt. Graphische Darstellung der Resultate erfolgte mit Mauve (Darling *et al.*, 2004; <http://gel.ahabs.wisc.edu/mauve/>) oder ACT v5 (Carver *et al.*, 2005; <http://www.sanger.ac.uk/Software/ACT/>). Zur graphischen Darstellung von DNA-Sequenzen kamen Artemis v8 (Rutherford *et al.*, 2000; <http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/>) und VectorNTI™ v10 (Invitrogen) zum Einsatz. Primer-Design wurde mittels Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)

oder PerlPrimer v1.1.8 (<http://perlprimer.sourceforge.net/>) durchgeführt. Restriktionsschnittstellen für DNA-Sequenzen wurden mit NEBcutter v2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) ermittelt. Digitale Fotoverarbeitung erfolgte mit CorelDRAW®(Corel Corp.) oder GIMP (<http://www.gimp.org>).

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchung des multizellulären Phänotyps von *E. coli* Nissle 1917

Im *E. coli*-Stamm Nissle 1917 konnte festgestellt werden, dass mit einer gewissen Frequenz Phänotypen auftraten, die die Fähigkeit zur Koexpression von Zellulose und Curli-Fimbrien verloren hatten. Diese sog. *saw*-Morphotypen (*smooth and white*) konnten durch einfaches Ausplattieren einer Kultur des Stammes auf Kongorot-Agar isoliert werden (Abb. rechts, A.; B.: Wildtyp).



Die Frequenz solcher *rdar*-negativer Spontanmutanten ist mit der Mutationsrate eines einzelnen Nukleotids (10^{-6} - 10^{-7}) vergleichbar (U. Dobrindt, persönlich). Da dies den Einfluss eines einzelnen Gens auf die Ausprägung der Biofilmbildung nahelegte, wurde zunächst der Einfluss einiger bekannter Struktur- und Regulationsgene auf die Ausprägung des *rdar*-Morphotyps untersucht werden, um zu klären, ob Mutationen in diesen den *rdar*-Morphotyp derart beeinflussen, dass der *rdar*-negative Morphotyp mit spontanen Mutationen in diesen Genen erklärt werden konnte.

5.1.1 Inaktivierung von *csgBA*, *csgD* und *yaiC*

Die Genprodukte von *csgD* und *yaiC* (*adrA*) sind an der Regulation der Ausprägung des *rdar*-Morphotyps in *S. typhimurium* und einigen *E. coli*-Stämmen beteiligt, während *csgBA* die strukturellen Untereinheiten von Curli-Fimbrien kodieren (Zogaj *et al.*, 2001). Um den Einfluß dieser bekannten Faktoren auf den *rdar*-Morphotyp von *E. coli* Nissle 1917 zu untersuchen, wurden Deletionsmutanten hergestellt. Dabei wurden die Curli-Strukturgene *csgBA* sowie die Regulatorgene *csgD* und *yaiC* mittels λ -Red-Rekombinase-vermittelter Allelaustausch entfernt (Datsenko & Wanner, 2000). Dabei wurden die entsprechenden Gene durch Antibiotika-Kassetten ersetzt, denen per PCR Nukleotidüberhänge homolog zu den die Zielsequenz flankierenden Bereichen angefügt wurden (Kap. 4.5.2). Nach dem Allelaustausch wurde das Markergen durch Flp-Rekombinase entfernt, so dass eine komplette Deletion der Zielsequenz erfolgte. Auf die gleiche Weise wurde *csgBA*-*yaiC*-Doppelmutante hergestellt. Die Rekombinationsereignisse ließen sich mittels PCR anhand der Veränderung der Fragmentgrößen, die mit entsprechenden Primerpaaren detektiert wurden sowie durch Southern-Blot dokumentieren.

5 Ergebnisse

Die Ergebnisse von Southern-Blot und/oder PCR bestätigten, dass die Gene *csgBA*, *csgD* und *yaiC* in *E. coli* Nissle 1917 erfolgreich deletiert wurden (Abb. 11).

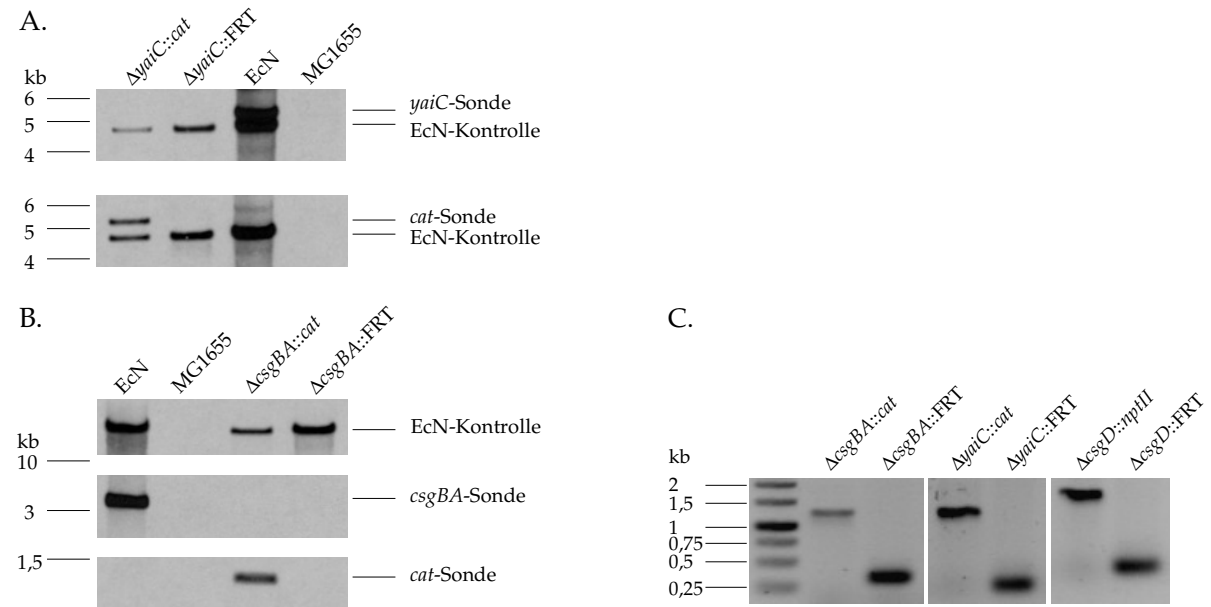


Abb. 11: Verifikation der *csgBA*-, *yaiC* und *csgD*-Mutanten von *E. coli* Nissle 1917. A: Southern-Blot von *HpaI*-gespaltener chromosomaler DNA hybridisiert mit PCR-generierten Sonden spezifisch für *E. coli* Nissle 1917, *csgBA* und *cat*. B: Southern-Blot von *MscI*-gespaltener chromosomaler DNA hybridisiert mit PCR-generierten Sonden spezifisch für *E. coli* Nissle 1917, *yaiC* und *cat*. C: PCR zur Überprüfung der Deletionen von *csgBA* (Primer *csgBA3*/*cat3*), *yaiC* (*yaiC3*/*cat3*) und *csgD* (*csgD3*/*cat5*).

5.1.2 Einfluss der Mutationen auf den Morphotyp

Curli-Fimbrien binden den Farbstoff Kongorot, und Stämme, die Curli-Fimbrien ausprägen, bilden entsprechend rote Kolonien. Der Fluoreszenzfarbstoff Calcofluor bindet Zellulose und kann unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Der Einfluss der oben generierten Mutationen auf die Fähigkeiten, Curli-Fimbrien zu binden sowie Zellulose zu produzieren wurde durch Inkubation der Stämme auf Kongorot-Agar bzw. Calcofluor-Agar bei verschiedenen Temperaturen überprüft (Abb. 12). Es konnte festgestellt werden, dass die Mutanten in *csgBA* eine hellere Rotfärbung aufwiesen, was auf eine verminderte Fähigkeit, Kongorot zu binden, hinweist. Besonders deutlich wird dieser Effekt bei 30 °C. Hingegen zeigte sich nach Deletion von *yaiC*, dem Aktivator der Zellulosesynthese in *Salmonella*, keine Veränderung des Morphotyps auf Kongorot-Agar. Durch Deletion von *csgD* wurde lediglich die Fähigkeit, Kongorot zu binden, herabgesetzt. Der Phänotyp glich hier dem der *csgBA*-Mutante. Die Fähigkeit, Zellulose zu synthetisieren wurde weder durch die Einzelmutationen noch durch die *csgBA*-

yaiC-Doppelmutation eingeschränkt. Diese Ergebnisse deuten auf eine von *csgD* und *yaiC* unabhängige Regulation der Koexpression von Curli und Zellulose hin.

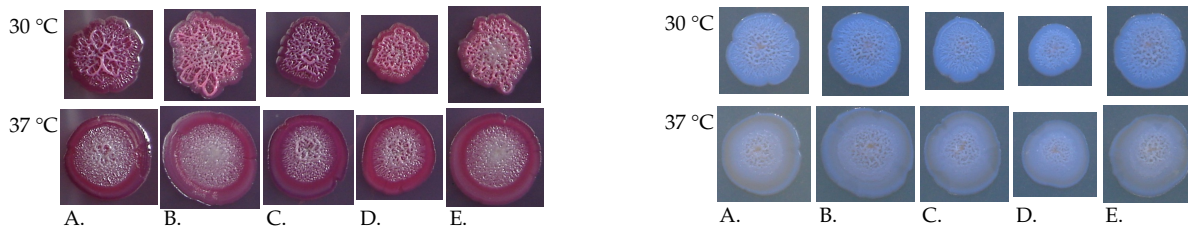


Abb. 12: Phänotypen verschiedener Mutanten von *E. coli* Nissle 1917 auf Kongorot- und Calcofluor-Agar. A: Wildtyp; B: $\Delta csgBA$; C: $\Delta yaiC$; D: $\Delta csgD$; E: $\Delta csgBA/\Delta yaiC$.

5.1.3 Transposon-Mutagenese des Stammes *E. coli* Nissle 1917

Um evtl. ein einzelnes Gen zu finden, dessen Inaktivierung einen *rdar*-negativen Morphotyp zur Folge hat, wurde eine Transposon-Mutagenese des Stammes *E. coli* Nissle 1917 durchgeführt. Hierzu mussten zunächst geeignete Bedingungen für die konjugative Übertragung des Minitransposon-Vektors pUTmini-Tn5 gefunden werden. Es zeigte sich, dass die Konjugation am effektivsten war, wenn Donor und Rezipient in gleichen Verhältnissen eingesetzt wurden und der Ansatz direkt auf LB-Agar bei 30 °C inkubiert wurde. Dennoch variierte die Anzahl an Transkonjuganten nach Selektion auf Streptomycin- und Chloramphenicolresistenz sehr stark von Ansatz zu Ansatz.

Insgesamt wurden ca. 6000 Transkonjuganten isoliert und in einer Bibliothek zusammengefasst. Diese Klone wurden auf die Fähigkeit hin überprüft, Kongorot zu binden und Zellulose zu produzieren. Dies geschah durch Übertragung sämtlicher Transposon-Mutanten auf Kongorot-Agar (Abb. 13). Nach Inkubation bei 30 bzw. 37 °C konnten mehrere Phänotypen gefunden werden, die nicht dem Wildtyp entsprachen. Der Anteil solcher Klone unter sämtlichen Transkonjuganten lag bei ca. 10 %.

Es konnten vier Arten nicht-wildtypischer Phänotypen detektiert werden, die wiederholt auftraten (Abb. 14):

- Hellrote Kolonien, die ansonsten dem *rdar*-Morphotyp des Wildtyps entsprachen (Abb. 14 B).
- Glatte, rote Kolonien, die ihre Färbung erst nach längerer Inkubation (2-3 Tage) entwickelten (Abb. 14 C und D).
- Stark strukturierte, rote Kolonien von normaler Größe (Abb. 14 E).

- Extrem große, stark strukturierte, rote Kolonien, die ungefähr dem *Salmonella rdar*-Morphotyp entsprachen (Abb. 14 F).

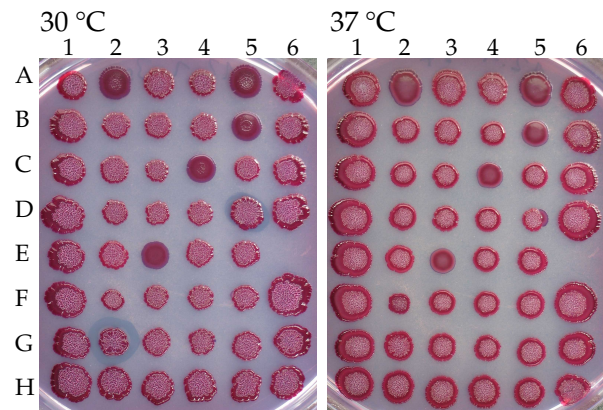
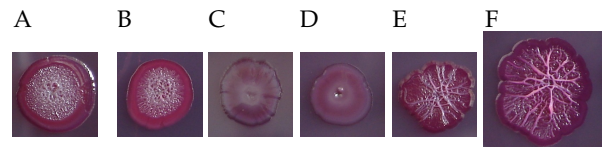


Abb. 13: Einzelkolonien aus der Transposon-Bibliothek auf Kongorot-Agar. Transkonjuganten wurden zunächst in 96-Well-Platten unter Selektionsdruck angezogen und archiviert. Hieraus wurden sie später auf Kongorot-Agar überstempelt und bei 30 und 37 °C drei bzw. zwei Tage inkubiert.

Abb. 14: Beispiele wiederholt auftretender Nicht-Wildtyp-Phänotypen nach der Transposon-Mutagenese. A: *E. coli* Nissle 1917; B-F: *E. coli* Nissle 1917::mini-Tn5.



Die zufällige Integration des Transposons ins Chromosom konnte anhand eines Southern-Blots *EcoRV*-gespaltener DNA verschiedener Klone mit einer mini-Tn5-spezifischen Sonde bestätigt werden. Das erhaltene Hybridisierungsmuster ließ Banden unterschiedlicher Größen erkennen, die aus den jeweils unterschiedlichen Entfernungen zwischen der transposon-eigenen und der nächstgelegenen chromosomalen *EcoRV*-Erkennungssequenzen resultieren (Abb. 15).

Um die Insertionsstelle des Transposons im Chromosom zu bestimmen, wurde der Sequenzbereich zwischen diesen *EcoRV*-Schnittstellen mittels inverser PCR amplifiziert und sequenziert (Abb. 16). Auch hier zeigten sich unterschiedliche Bandengrößen, die auf eine zufällige Integration des Transposons schließen lassen (Abb. 17). Der überwiegende Anteil der amplifizierten Fragmente lag zwischen 0,5 und 3,5 kb. Größere Abschnitte konnten mitunter durch Verwendung anderer Polymerasen detektiert werden. Für einige wenige Transposon-Insertionsmutanten konnten keine PCR-Produkte bei der inversen PCR erhalten werden.

Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte mit dem Oligonukleotid mTn5-invers2, und die erhaltenen Sequenzen wurden mittels BLAST gegen vorhandene Datenbanken abgeglichen, um die vom Transposon unterbrochenen Gene und putativen ORFs zu ermitteln. Zunächst wurden vorwiegend Sequenzen der Insertionsmutanten vom Typ C und D (Abb. 14)

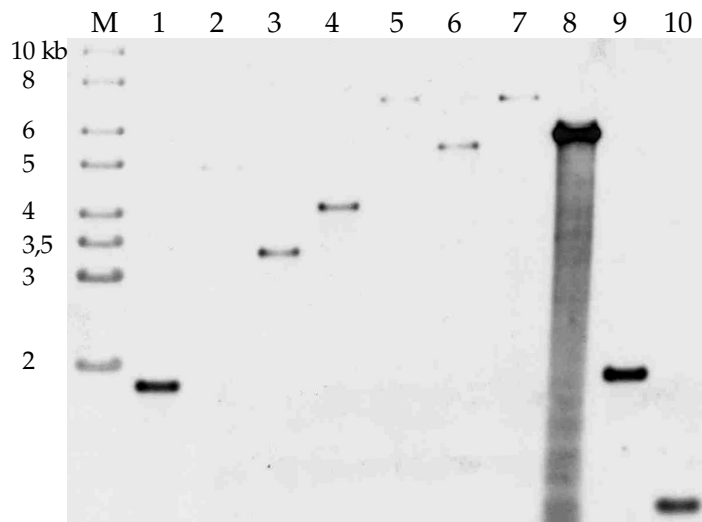


Abb. 15: Southern-Hybridisierungsexperiment zum Nachweis zufälliger Transposon-Integrationen. Hybridisierung *EcoRV*-gespaltener chromosomaler DNA zehn zufällig ausgewählter Transposon-Mutanten mit einer mini-Tn5-spezifischen Sonde.

bestimmt, da diese dem gesuchten *rdar*-negativen Phänotyp am ähnlichsten erschienen. Es zeigte sich, dass diese Klone ausschließlich Insertionen in den Genen *yhjL* (*bcsC*) und *yhjN* (*bcsB*) des Zellulose-Synthase-Operons besitzen, oft sogar an jeweils identischer Position. Bei dem Genprodukt von *yhjL* handelt es sich um eine Untereinheit der Zellulose-Synthase selbst, YhjN ist ein Protein mit regulatorischer Funktion und einer zyklischen di-GMP-bindenden Domäne (Zogaj *et al.*, 2001). Die Insertionen in *yhjN* befanden sich sämtlich an identischer Stelle im Gen, so dass davon ausgegangen werden muss, dass es sich hier um Abkömmlinge eines einzigen Transpositionereignisses handelt. Der Verlust der Fähigkeit, Zellulose zu synthetisieren, konnte durch Inkubation der Klone auf Calcofluor-Agar bestätigt werden. Hier zeigten die relevanten Kolonien keine Fluoreszenz unter UV-Bestrahlung (Abb. 18).

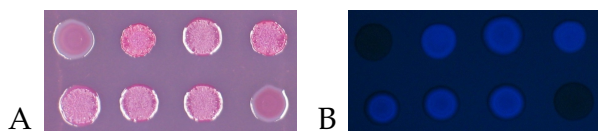


Abb. 18: Nachweis der Zelluloseproduktion auf Calcofluor-Agar. A: *E. coli* Nissle 1917::mini-Tn5 auf Kongorot-Agar; B: *E. coli* Nissle 1917::mini-Tn5 auf Calcofluor-Agar unter UV-Bestrahlung.

Es konnten in der gesamten Sammlung keine Transposon-Insertionsmutanten identifiziert werden, die dem *rdar*-negativen Phänotypen der Spontanmutante entsprachen. Eine Kolonie zeigte zwar die gewünschte Morphologie, eine Bestimmung des Integrationsortes war

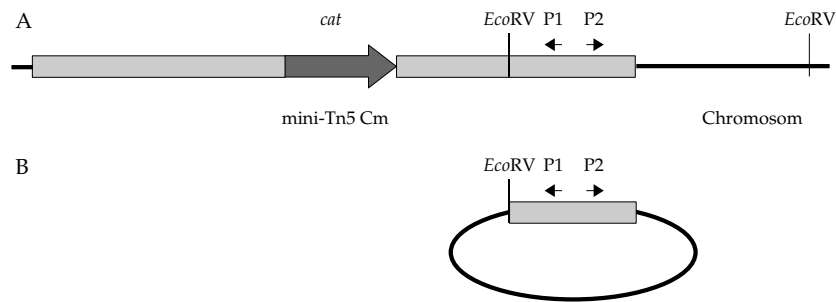


Abb. 16: Schematische Darstellung der inversen PCR. A: Integration von mini-Tn5 (grau dargestellt) in das Wirtschromosom; B: *EcoRV*-gespaltene chromosomale DNA nach der Religation. Die Bestimmung der chromosomalen Insertionsstelle erfolgt durch PCR-Amplifikation und Sequenzierung der unbekannt Region zwischen den Primer-Bindestellen P1 und P2. *cat*: Chloramphenicol-Resistenzgen.

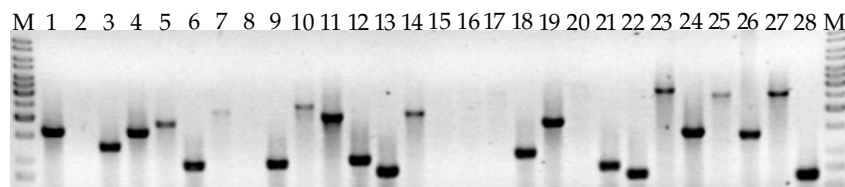







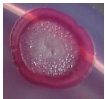
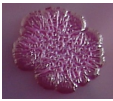





Abb. 17: Inverse PCR von 28 zufällig ausgewählten Transposon-Insertionsmutanten. In der Regel wurden 7,5 μ l religierter chromosomaler DNA in einem PCR-Ansatz von 50 μ l eingesetzt. Amplifikation erfolgte mit dem Oligonukleotidpaar mTn5-invers1/mTn5-invers2. M: Größenstandard (GeneRuler 1 kb).

jedoch mittels inverser PCR auch unter Verwendung verschiedener Restriktionsenzyme nicht erfolgreich. Direkte Sequenzierung mit dem Primer mTn5-invers2 und Primer-Walking ergab ausschließlich Plasmidsequenz, so dass davon ausgegangen werden muss, dass es sich bei diesem Klon um eine streptomycinresistente Spontanmutante des Donorstammes handelte.









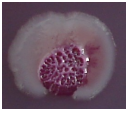
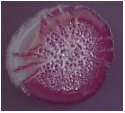
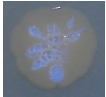







Da der gewünschte *rdar*-negative Phänotyp nicht gefunden werden konnte, wurden nun auch andere nicht-wildtypische Klone untersucht, um weitere Faktoren, die die Koloniemorphologie beeinflussen, zu bestimmen. Auch hierzu wurden die Insertionsorte des Transposons im Chromosom mittels inverser PCR und Sequenzierung identifiziert. Bei dieser Analyse ergab sich eine Reihe von betroffenen Genen, deren Produkte bisher nicht als den Phänotyp beeinflussende Faktoren beschrieben worden sind. Ebenso konnte einigen Proteinen anhand der durchgeführten BLAST-Analysen keine bisher bekannte Funktion zugeschrieben werden.

In Tab. 9 werden einige dieser bezüglich ihrer Koloniemorphologie auffälligen Klone vorgestellt und die durch das Transposon unterbrochenen Gene näher charakterisiert. Die BLAST-Analyse beruht in den meisten Fällen auf dem Genom von *E. coli* CFT073 (Refseq Accession No. NC_004431). Abgebildet sind jeweils die Klone nach Inkubation bei 30 °C (links) und 37 °C (rechts) auf Kongorot-Agar, gegebenenfalls auch auf Calcofluor-Agar.

Tab. 9: Aus der Transposon-Mutagenese hervorgegangene, nicht-wildtypische Phänotypen. Vom Wildtyp abweichende Morphotypen auf KR-Agar sind für 30 °C und 37 °C dargestellt. Bei Abweichungen in der Zelluloseexpression sind die Kolonien zusätzlich auf CF-Agar unter UV-Bestrahlung dargestellt. Unterschiede der Koloniegrößen entsprechen den tatsächlichen Relationen.



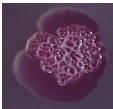
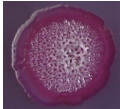














Klon	Kolonieform 30 °C/37 °C		Gen	Produkt	Funktion
1F3			<i>lldP</i>	L-Laktat-Permease	Transport von Laktat, Glycolat
					
2C5			<i>csgB</i>	CsgB	kleine Untereinheit der Curli-Fimbrien
2H1			<i>ytfG</i>	NADP(H)-Chinon-Oxidoreduktase	unbekannt
3B8			<i>caiT</i>	Carnitin-Transporter	Kohlenstoff-Transporter der Betaine/Carnitine/Choline Transporter (BCCT) Family
6B4			<i>yadK</i>	mögliches Adhäsion	unbekannt

Tab. 9: Nicht-wildtypische Phänotypen. (Fortsetzung)

Klon	Kolonieform 30 °C/37 °C		Gen	Produkt	Funktion
5F7			<i>csgA</i>	CsgA	Hauptuntereinheit der Curli-Fimbrien
14D12					
12G10			<i>c4896</i>	putative 5'-Nukleotidase (<i>S. typhimurium</i> LT2)	unbekannt
13H6			<i>tonB</i>	TonB	Energieabhängiger Transport kleiner Moleküle (Cobalamin und verschiedene Eisenverbindungen wie Eisen-Dicitrat, Enterochelin, Aerobactin, etc.)
14F1			<i>c2490</i>	hypothetisches Protein YaiO	unbekannt
					
14H3			<i>kfiD</i>	UDP-Glucose-6- Dehydrogenase	Bildung von UDP-Glucuronsäure (K5-Kapsel- Biosynthese)
15C4			<i>rfaG</i>	WaaG, Glucosyl- transferase I	LPS-Synthese; Addition des ersten Glukoserestes zum LPS-Core
					

5.1 Untersuchung des multizellulären Phänotyps von *E. coli* Nissle 1917

Tab. 9: Nicht-wildtypische Phänotypen. (Fortsetzung)

Klon	Kolonieform 30 °C/37 °C		Gen	Produkt	Funktion
15H12			<i>yfcQ</i>	hypothetisches Protein	mögliches Fimbrienadhäsion
18C6					
17C7			<i>yghT</i>	hypothetisches ATP-bindendes Protein	unbekannt; besitzt Thymidylat-Kinase-Domäne
18F12					
					
17H11			<i>bdm</i>	biofilmabhängiges Protein Bdm	unbekannt; verminderte Expression in Biofilmen
18C8			<i>ypdI</i>	hypothetisches Lipoprotein	beteiligt an Colansäure-Biosynthese
47D2			<i>fepE</i>	Enterobactin-Transportprotein	Aufnahme von Eisen(III)-Verbindungen
47G9			<i>ldhA</i>	D-Laktat-Dehydrogenase LdhA	Energiemetabolismus, Fermentation

Unterbrochene Gene, die direkt mit dem *rdar*-Morphotyp in Zusammenhang gebracht werden können, wurden nur in wenigen Fällen gefunden. Hier handelte es sich um Transposon-Insertionen in das Gen *csgA*, welches für die Hauptuntereinheit der Curli-Fimbrien kodiert (Klone 14D12 und 14E10), oder in *csgB*, die kleinere Untereinheit dieser Oberflächenstrukturen (Klon 2C5). Entsprechend der verminderten Fähigkeit, Kongorot zu binden, zeigten diese Klone eine hellere Rotfärbung als der Wildtyp.

Ansonsten konnten lediglich einige Gene identifiziert werden, die an der Synthese anderer Oberflächenstrukturen beteiligt sind und daher mit der Zell- und Koloniemorphologie ansatzweise in Zusammenhang gebracht werden konnten. So war bei Klon 14H3 das Gen *kfiD* zerstört, welches bei der K5-Kapselbiosynthese eine Rolle spielt. Als leichte Veränderung gegenüber dem Wildtyp konnte ebenfalls eine leicht hellere Rotfärbung der Kolonie bei 37 °C ausgemacht werden. Ebenfalls an der Kapselexpression beteiligt ist das Gen *ypdI*, das in der Colansäure-Biosynthese eine Rolle spielt und bei Klon 18C8 unterbrochen wurde. Seine Überexpression hat einen mukoiden Phänotyp zur Folge (Potrykus & Wegrzyn, 2004). Die Inaktivierung des Gens bewirkte hier eine hellere Rotfärbung der Kolonien. Bei Klon 15C4 konnte eine Insertion des Transposons in das Gen *rfaG* festgestellt werden, dessen Produkt in die LPS-Biosynthese involviert ist. Dieser Klon zeigte besonders bei 37 °C einen erheblichen Wachstumsdefekt. Zudem war seine Oberfläche mehr oder weniger glatt, was auf reduzierte Zellulosesynthese hinweist und auf Calcofluor-Agar bestätigt werden konnte. Auch die Expression von Curli-Fimbrien scheint etwas eingeschränkt, da die Kolonie bei 30 °C eine hellere Rotfärbung aufweist als der Wildtyp. Mit der Biofilmbildung steht das Gen *bdm* im Zusammenhang, welches als in Biofilmen reprimiert beschrieben wird (Prigent-Combaret *et al.*, 1999) und in Klon 17H11 unterbrochen wurde. Die Kolonien wiesen hier bei 30 °C einen Übergang in glatte, helle Randzonen auf, in denen offenbar keine Zellulosesynthese und eingeschränkte Curli-Expression auftrat, was jedoch auf Calcofluor-Agar nicht beobachtet werden konnte. In zwei weiteren Klonen (15H12 und 18C6) war mit dem Gen *yfcQ*, das für ein mögliches Fimbrienadhäsion kodiert, eine weitere Oberflächenstruktur betroffen. Überraschenderweise zeigten jedoch beide Klone unterschiedliche Morphotypen. Während die Kolonien von 15H12 etwas größer und stärker strukturiert als im Wildtyp waren, wies Klon 18C6 einen Übergang in dunkle, glatte Randzonen auf.

Bei allen anderen hier aufgeführten Transposon-Mutanten konnte kein direkter Zusammenhang zwischen unterbrochenem Gen und Koloniemorphologie hergestellt werden. Ein möglicher Einfluss dieser Gene auf den jeweiligen Phänotyp wird in Kap. 6 diskutiert. Weiterhin sind diese Ergebnisse mit Vorbehalt zu betrachten, da eine individuelle Überprüfung durch Inaktivierung der Gene im Wildtyp noch aussteht.

5.2 Charakterisierung eines Polyketidsynthase-Genclusters in *E. coli* Nissle 1917

Im Zuge der Sequenzierungsinitiativen der letzten Jahre sind mittlerweile sieben *E. coli*-Genome vollständig sequenziert worden, etliche weitere stehen kurz vor der Fertigstellung. Bei vergleichenden Sequenzanalysen wurden in den Stämmen *E. coli* CFT073, 536 und UTI89 Abschnitte identifiziert, die Homologien zu PKS/NRPS-Genen aufweisen. Da bislang nur wenige Polyketide und nichtribosomale Peptide in *Enterobacteriaceae* bekannt waren, wurde eine genauere Analyse dieses Genclusters vorgenommen.

5.2.1 Das PKS/NRPS-Gencluster im chromosomalen Kontext

Die identifizierten PKS/NRPS-Gene liegen im *E. coli* CFT073-Genom bei etwa 43 Minuten. Insgesamt finden sich 20 ORFs, von denen acht Ähnlichkeiten mit PKS/NRPS-Systemen aus verschiedenen Organismen besitzen. In unmittelbarer Nähe des letzten putativen PKS-Gens befinden sich mit dem *asnW*-tRNA-Gen und einer P4-ähnlichen Integrase zwei Marker, die für horizontal erworbene DNA-Abschnitte charakteristisch sind (Hacker *et al.*, 1997). Da mittels BLAST-Analysen in den übrigen bis dahin verfügbaren *E. coli*-Genomen keines der PKS/NRPS-Gene identifiziert werden konnte, wurde der chromosomale Kontext der Gene hinsichtlich weiterer Merkmale genomischer Inseln analysiert. Der Vergleich mit der entsprechenden chromosomalen Region des K-12-Stammes MG1655 bestätigt, dass ein gesamter ca. 54 kb umfassender DNA-Bereich, in dem sämtliche PKS/NRPS-Gene liegen, in Stamm MG1655 nicht vorhanden ist (Abb. 19). Weiter stromaufwärts liegen zwei bereits beschriebene GEIs von 23 bzw. 31 kb. Es handelt sich um eine u. a. das histonähnliche Protein Hlp kodierende Insel (Müller, 2006) sowie die Kernregion der *High Pathogenicity Island* (HPI) aus *Yersinia* Dobrindt *et al.* (2002). Stromabwärts befindet sich eine weitere bisher nicht beschriebene Insertion von ca. 44 kb.

Wie sich zeigte, weist die Region, in der die PKS/NRPS-Gene liegen, neben der Assoziation mit einem tRNA-Gen und dem Vorhandensein einer Integrase zwei weitere für eine genomische Insel entscheidenden Merkmale auf. Zum einen ist der durchschnittliche GC-Gehalt des Abschnittes mit 52,97 % fast drei Prozent höher als der Gesamt-GC-Gehalt von *E. coli* CFT073 (50,5 %), zum anderen wird der Bereich von zwei 16 bp langen direkten Wiederholungssequenzen flankiert. Auf Grund dieser Charakteristika kann somit davon ausgegangen werden, dass die *asnW*-Insel von *E. coli* CFT073 einen durch horizontalen Gentransfer erworbenen DNA-Bereich darstellt.

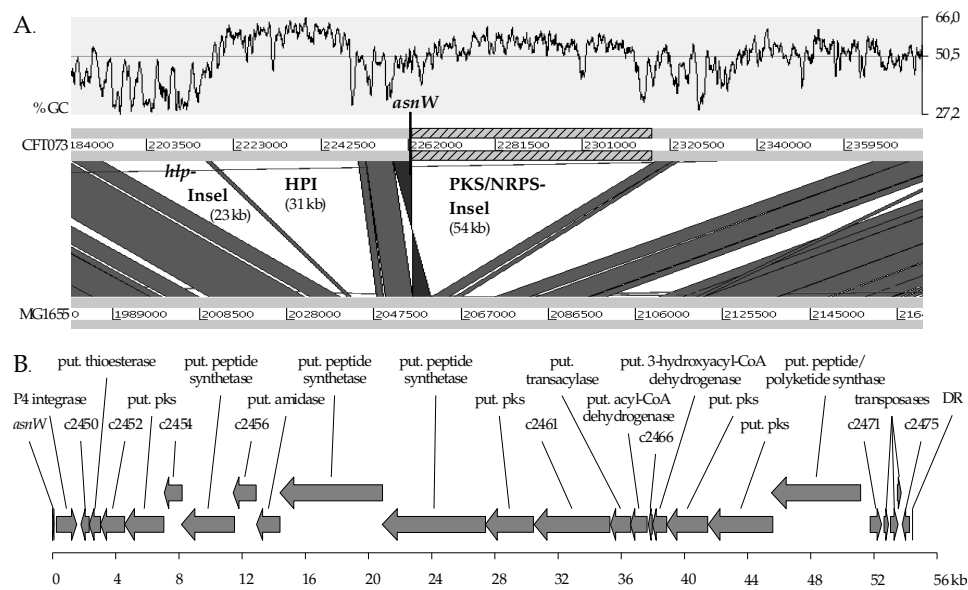


Abb. 19: Analyse der chromosomalen Lokalisation des PKS/NRPS-Genclusters in *E. coli* CFT073. A: Sequenzvergleich der *asnW*-Region des UPEC-Stammes CFT073 und des nicht-pathogenen *E. coli* K-12-Stammes MG1655. Grau hinterlegte Bereiche weisen auf Homologien hin, dunkelgraue auf invertierte Regionen. Die Lokalisation der PKS/NRPS-Insel sowie des *asnW*-tRNA-Gens sind in der Sequenz markiert. Der GC-Gehalt des Stammes CFT073 ist mit einer Fenstergröße von 500 bp oberhalb der Sequenzen abgebildet (Generiert mit ACT, Sanger Center). B: Schematische Karte der *asnW*-Insel von *E. coli* CFT073 gemäß der Annotation von Welch *et al.* (2002).

5.2.2 Verbreitung der PKS/NRPS-Gene in *E. coli*

Da das PKS/NRPS-Gencluster auf Grund der beschriebenen Merkmale als genomische Insel betrachtet werden kann, wurde die Verbreitung dieses Abschnittes in verschiedenen *E. coli*-Stämmen untersucht. Dazu wurden 55 intestinal-pathogene (EIEC, EPEC, EHEC, ETEC, EAEC), 97 extraintestinal-pathogene (ExPEC) und 32 Fäkalisolate gesunder Individuen sowie die ECOR-Stammsammlung (Ochman & Selander, 1984) überprüft. Mittels PCR mit acht über die Insel verteilt bindenden Primerpaaren konnte die Insel sowohl in ExPEC als auch in Kommensalen nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigte sich, dass die genomische Insel auf Stämme der ECOR-Gruppe B2 beschränkt ist. In intestinalen Isolaten wurden die PKS/NRPS-Gene nicht gefunden. Diese Analyse wurde zum Teil von E. Brzuszkiewicz, Universität Göttingen, durchgeführt und ist in Tab. 10 zusammengefasst. Die Verbreitung des PKS/NRPS-Genclusters innerhalb der ECOR-Stammsammlung findet sich im Anhang (Abb. 57).

Tab. 10: Verbreitung der PKS/NRPS-Gene in verschiedenen *E. coli*-Varianten.

Variante		PKS ⁺	PKS ⁻	% PKS ⁺
ExPEC (n = 164)		62	102	38 %
davon:	Fäkalisolate (n = 68)	12	56	17 %
	UPEC (n = 70)	36	34	51 %
	Sepsisolate (n = 15)	7	8	47 %
	MNEC (n = 11)	7	4	64 %
IPEC (n = 60)		0	60	0 %
Total (n = 224)		62	162	28 %

Unter den überprüften Stämmen wurde die PKS-Insel u. a. in den UPEC-Stämme J96 und 536, dem MNEC-Stamm IHE3034 sowie dem probiotischen Stamm *E. coli* Nissle 1917 nachgewiesen.

Von *E. coli* IHE3034 lag eine BAC-Bibliothek vor, die das komplette Genom des Stammes beinhaltet. Diese Sammlung wurde ebenfalls per PCR auf Abschnitte der *asnW*-Insel in einzelnen BACs überprüft. Es konnten zwei BACs mit Inserts von 67 kb bzw. 76 kb ermittelt werden, in denen das Cluster komplett vorlag. In diesen Konstrukten, pBAC*pks11* und pBAC*pks18*, wird die Insel von zusätzlicher Sequenzinformation von ca. 10 kb bzw. 2,8 kb stromaufwärts und 4 kb bzw. 18,7 kb stromabwärts flankiert.

5.2.3 Nachweis eines zytopathischen Effektes des Polyketids auf eukaryotische Zellen

Die durch das PKS/NRPS-Gencluster der *asnW*-Insel kodierte Komponente übt eine den Zellzyklus inhibierende Aktivität auf eukaryotische Zellen aus. Dies konnte durch Inkubation von HeLa-Zellen mit *E. coli*-Stämmen, die ein aktives PKS/NRPS-Gencluster besitzen, nachgewiesen werden. Dazu wurden HeLa-Zellen für vier bis fünf Stunden mit den entsprechenden Stämmen infiziert und nach dem Entfernen der Bakterien für drei Tage weiter inkubiert. Nach dieser Zeit konnte eine deutliche Veränderung der Zellmorphologie beobachtet werden. Betroffene Zellen waren im Vergleich zu nicht infizierten oder mit einem PKS-negativen Stamm infizierten Zellen um ein Vielfaches größer und schienen eine erhebliche Menge an DNA akkumuliert zu haben. Zudem schien keine Teilungsaktivität mehr stattzufinden (Abb. 20). Dieser zytopathische Effekt (CPE) wird u. a. von den *E. coli*-Stämmen IHE3034, CFT073, J96 und Nissle 1917 ausgeübt. Darüber hinaus konnten in der institutseigenen Stammsammlung weitere Stämme mit funktionalem PKS/NRPS-Gencluster gefunden werden (5.2.2).

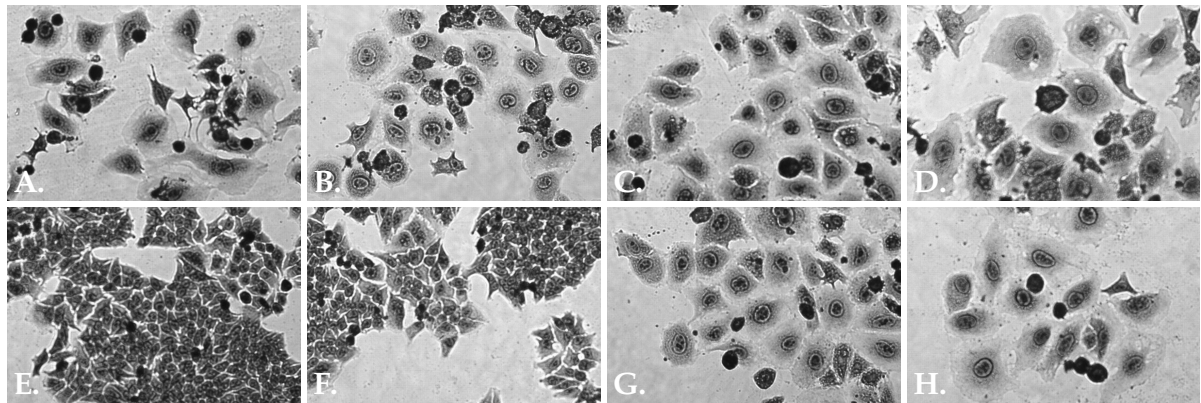


Abb. 20: Nachweis des zytopathischen Effekts. Morphologie von HeLa-Zellen 72 h nach Kokultur mit verschiedenen *E. coli*-Stämmen (Giemsafärbung). A: Nissle 1917; B: IHE3034; C: J96; D: CFT073; E: Kontrolle ohne Bakterien; F: DH10B; G: DH10B pBACpks11; H: DH10B pBACpks18.

Ein für genetische Manipulationen verwendeter Klon des Stammes *E. coli* Nissle 1917 zeigte überraschenderweise keinen zytopathischen Effekt mehr auf HeLa-Zellen. Die Ursache hierfür war zunächst nicht bekannt und die weiteren Untersuchungen wurden mit dem ursprünglichen Isolat durchgeführt. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde dieser CPE-negative Stamm jedoch wieder interessant, da durch Komplementation mit *clbRA* die zytotoxische Aktivität wieder hergestellt werden konnte (5.2.8).

Der uropathogene Stamm *E. coli* 536 wies in Kokultur mit HeLa-Zellen trotz vorhandenem und unverändertem PKS/NRPS-Gencluster (Brzuszkiewicz *et al.*, 2006) keine zytotoxische Aktivität auf. Dieses Phänomen konnte nicht mit der Anzahl an Wiederholungssequenzen in Zusammenhang gebracht werden, da Stämme mit identischer *Repeat*-Struktur den zytopathischen Effekt zeigten (5.2.4). Somit war hier ein erster Hinweis auf einen außerhalb der *asnW*-Insel liegenden Regulationsmechanismus der Polyketidsynthese gegeben, was zu einem späteren Zeitpunkt bestätigt werden konnte (5.2.8).

Die zur Verfügung stehenden Konstrukte pBACpks11 und pBACpks15 versetzten den Laborstamm *E. coli* DH10B in die Lage, ebenfalls einen zytopathischen Effekt auf HeLa-Zellen auszuüben (Abb. 20). Dies konnte ebenfalls durch Kokultivierung von Bakterien und Epithelzellen nachgewiesen werden. Somit ist die Sequenzinformation der klonierten DNA-Abschnitte für Synthese und Aktivierung der aktiven Substanz ausreichend und es bedarf hierfür offenbar keiner weiteren Faktoren bzw. können diese auch vom Laborstamm zur Verfügung gestellt werden.

Der zytopathische Effekt konnte nur durch direkten Kontakt von Bakterien und Epithelzellen erreicht werden. Eine räumliche Trennung beider mittels eines Transwell-Einsatzes hatte

keine Veränderung der Zellmorphologie zur Folge. Auch der Einsatz von sterilfiltriertem bakteriellem Kulturüberstand oder Überstand einer Kokultur zwischen HeLa-Zellen und Bakterien konnte den zytopathischen Effekt nicht induzieren. Abgetötete Bakterien und Bakterienlysat zeigten ebenso keine Polyketidaktivität (Nougayrède *et al.*, 2006).

Die zellbiologischen Veränderungen, die dem zytopathischen Effekt zu Grunde liegen, wurden im Labor von E. Oswald (INRA, Toulouse) tiefer gehend analysiert. Dabei wurde herausgefunden, dass nach dem Kontakt mit Bakterien, die das Zytotoxin produzieren, in den eukaryotischen Zellen DNA-Doppelstrangbrüche auftraten. Diese hatten dann die typischen zellulären Reaktionen zur Folge, die schließlich dazu führten, dass Cdk1 in seiner phosphorylierten inaktiven Form verbleibt. Daraus resultierte ein Stillstand des Zellzyklus in der G₂-Phase (Nougayrède *et al.*, 2006). Die Blockierung des Übergangs in die Mitose hatte eine Verdoppelung des Kernmaterials zur Folge, ohne dass jedoch eine Zellteilung stattfand. Dadurch ergab sich der oben geschilderte Phänotyp der Megalozytose.

5.2.4 Sequenzanalyse der *asnW*-Insel

Sequenzierung und Annotation der *asnW*-Insel aus IHE3034 In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Gottschalk, Universität Göttingen, wurde die Sequenz der *asnW*-Insel ermittelt und annotiert (GenBank: AM229678). Beim Vergleich mit der veröffentlichten Sequenz des Stammes CFT073 (GenBank: AE014075) konnte festgestellt werden, dass dort durch ein zusätzliches Thymin in Position 3284 ein Frameshift in ORF c2455 vorliegt, der zu einer Verkürzung dieses ORFs auf 3363 bp führt und einen weiteren ORF, c2454 (1116 bp), nach sich zieht. In IHE3034 stellt das orthologe Gen *clbN* einen einzigen ORF von 4368 bp dar. Eine weitere Diskrepanz zwischen CFT073 und IHE3034 fand sich in ORF c2470, wo einem zusätzlichem Guanin in Position 5622 ein Stop-Codon folgt. Dadurch wurden in CFT073 anstatt eines 9621 bp ORF (*clbB* in IHE3034) zwei überlappende Sequenzen von 5628 bp (c2470) und 4059 bp (c2469) annotiert. Diese fraglichen Abschnitte wurden in *E. coli* CFT073 resequenziert (E. Oswald, Toulouse). Dabei wurde festgestellt, dass die ursprüngliche CFT073-Sequenz fehlerhaft war und in diesen Punkten tatsächlich nicht von der IHE3034-Sequenz abweicht. Eine Darstellung der *asnW*-Insel des Stammes IHE3034 inkl. neuer Annotation und Kennzeichnung einzelner, an der Polyketidsynthese beteiligter Domänen findet sich im Anhang (Abb. 56).

In der Arbeitsgruppe von E. Oswald, Toulouse, wurde mittels systematischer Inaktivierung sämtlicher ORFs des Genclusters festgestellt, dass bis auf ClbM alle Genprodukte an der Ausprägung des zytopythischen Effekts beteiligt sind (Nougayrède *et al.*, 2006).

Analyse von Wiederholungssequenzen in verschiedenen *E. coli*-Stämmen Ein weiterer Unterschied zwischen beiden Sequenzen findet sich in einem nicht-kodierenden Abschnitt zwischen *clbB* (c2470) und *clbR* (in CFT073 nicht annotiert). Hier konnte eine sich wiederholende 8-bp-Sequenz (ACAGATAC) identifiziert werden, die in beiden Stämmen unterschiedlich oft aneinandergesetzt ist. In CFT073 wiederholt sie sich sieben Mal und besteht entsprechend aus 56 bp, während sie in IHE3034 13 Mal aufeinander folgt und entsprechend 104 bp ausmacht (Abb. 21). Auch in den *E. coli*-Stämmen Nissle 1917 und 536 konnte diese Sequenzen in unterschiedlich häufiger Wiederholung identifiziert werden und kehrt dort 13 Mal (104 bp) bzw. zehn Mal (80 bp) wieder (ohne Abb.).

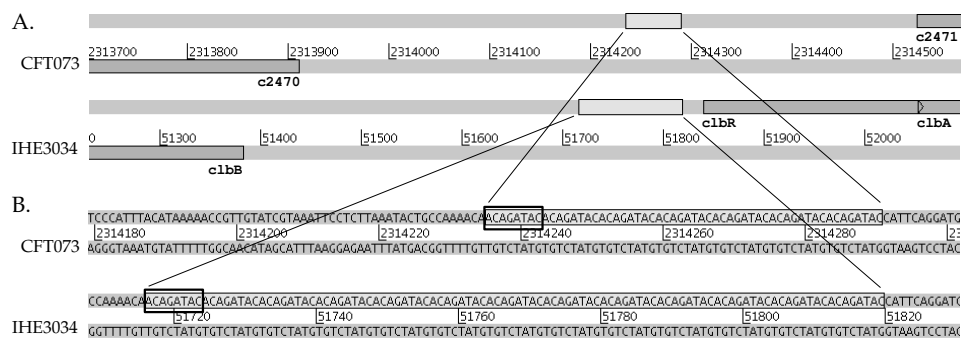


Abb. 21: Vergleich der Repeat-Regionen von *E. coli* CFT073 und IHE3034. A: Lokalisation der Wiederholungssequenz (hellgrau) im Chromosom; B: Repeat-Regionen (hellgrau unterlegt) auf Sequenzebene. Eine einzelne 8-bp-Wiederholungssequenz ist jeweils schwarz umrahmt.

Diese Wiederholungssequenzen liegen unmittelbar vor einem ORF (*clbR*), dessen Produkt Ähnlichkeiten mit der DNA-bindenden HTH-Domäne (*helix-turn-helix*) des LuxR-Proteins aus *Vibrio* sp. besitzt. Obwohl dem Protein die übliche Domäne zur Bindung von *autoinducer*-Molekülen fehlt, ist eine regulatorische Funktion von ClbR nicht auszuschließen.

Ob die unterschiedliche Anzahl sich wiederholender Sequenzen *upstream* des putativen Regulators *clbR* mit der Aktivität des Polyketids korreliert, wurde mittels PCR-Amplifikation und Sequenzierung der entsprechenden Region in verschiedenen *E. coli*-Stämmen sowie Aktivitätstests in Zellkultur überprüft. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Anzahl sich wiederholender 8-bp-Sequenzen von vier bis 20 variiert (U. Dobrindt, persönlich). Ein Zusammenhang zwischen Anzahl der *Repeats* und der Aktivität des Polyketids konnte jedoch nicht abgeleitet werden.

Domänenstruktur der Polyketidsynthasen und nichtribosomalen Peptidsynthetasen Ein Zusammenhang zwischen Sequenzinformation und Funktion kann ohne experimentelle Daten bis zu einem gewissen Grad bioinformatisch hergestellt werden. Dazu werden die zu analysierenden Genprodukte auf Ähnlichkeiten zu bereits funktionell charakterisierten Mitgliedern der entsprechenden Proteinfamilien überprüft. Im Falle der auf der *asnW*-Insel liegenden Polyketidsynthasen und nichtribosomalen Peptidsynthetasen geschah diese Analyse mit Hilfe der NRPS-PKS Database unter <http://linux1.nii.res.in/~pkssdb/DBASE/page.html> bzw. NRSPredictor unter <http://www-ab.informatik.uni-tuebingen.de/toolbox/index.php?view=domainpred>. Die mit diesen Werkzeugen erhaltenen Vorhersagen über die Domänenstruktur der einzelnen Proteine ist in Tab. 11 zusammengefasst.

Tab. 11: Domänenstruktur der Polyketidsynthasen und nichtribosomalen Peptidsynthetasen.

Protein	Funktion	Domänen ¹	Start ²	Ende	Spezifität ³	% Identität mit (aus) ⁴	Accession
ClbB	NRPS-PKS	C	21	477		29 % MycB (<i>B. s.</i>)	AAF08797
		A	523	976	Val	36 % GrsB (<i>B. b.</i>)	BAA06146
		PCP	1005	1065		40 % SyrE (<i>P. s.</i>)	AAC80285
		KS	1086	1503		45 % EpoC (<i>P. c.</i>)	AAF62882
		AT	1604	1896	Malonat	40 % PltC (<i>P. f.</i>)	AAC38076
		KR	2189	2361		29 % EryA (<i>P. s.</i>)	AAA26493
		ER	2687	2996		41 % EpoD (<i>P. c.</i>)	AAF62883
		ACP	3101	3161		39 % FenA (<i>B. s.</i>)	AAB80955
ClbC	PKS	KS	12	431		50 % MtaD (<i>S. a.</i>)	AAF19812
		ACP	787	851		43 % AcnC (<i>S. c.</i>)	AAF42473
ClbE	PKS	ACP	24	72		33 % ORF5 (<i>B. t.</i>)	AAL32271
ClbG	PKS	AT	8	296	Malonat	28 % AmphC (<i>S. n.</i>)	AAK73514
ClbH	NRPS	A	30	509	Ser	42 % ItuC (<i>B. s.</i>)	BAB69700
		C	534	966		32 % SyrE (<i>P. s.</i>)	AAC80285
		A	965	1477	Cys?	34 % SyrE (<i>P. s.</i>)	AAC80285
		PCP	1496	1558		50 % SyrE (<i>P. s.</i>)	AAC80285
ClbI	PKS	KS	8	433		54 % EpoC (<i>P. c.</i>)	AAF62882
		AT	532	805	Malonat	44 % EpoD (<i>P. c.</i>)	AAF62883
		ACP	926	988		42 % TycC (<i>B. b.</i>)	AAC45930
ClbJ	NRPS	C	47	452		31 % SyrE (<i>P. s.</i>)	AAC80285
		A	506	982	Gly	40 % Dhbf (<i>B. s.</i>)	AAD56240
		PCP	1006	1069		44 % TycC (<i>B. b.</i>)	AAC45929
		Cy	1099	1524		40 % BlmIV (<i>S. v.</i>)	AAG02364
		A	1533	2040	Cys	44 % BlmIV (<i>S. v.</i>)	AAG02364
		PCP	2067	2131		43 % BlmIX (<i>S. v.</i>)	AAG02364

Tab. 11: Domänenstruktur der Polyketidsynthetasen und nichtribosomalen Peptidsynthetasen. (Fortsetzung)

Protein	Funktion	Domänen ¹	Start ²	Ende	Spezifität ³	% Identität mit (aus) ⁴	Accession
ClbK	PKS-NRPS	KS	8	422		46 % MtaD (<i>S. a.</i>)	AAF19812
		ACP	721	783		41 % TycC (<i>B. b.</i>)	AAC45930
		Cy	812	1252		43 % BlmIV (<i>S. v.</i>)	AAG02364
		A	1247	1704	Cys	45 % BlmIV (<i>S. v.</i>)	AAG02364
		OX	1765	1944		42 % CtaD (<i>C. f.</i>)	AAW03327
		PCP	2045	2109		41 % McyG (<i>M. a.</i>)	AAAX73195
ClbN	NRPS	C	11	355		24 % SrfA (<i>B. s.</i>)	BAA02522
		A	454	931	Asn	37 % Acmb (<i>S. c.</i>)	AAC38442
		PCP	973	1017		33 % SrfA (<i>B. s.</i>)	CAA51223
ClbO	PKS	E	1038	1362	Asn	24 % ItuB (<i>B. s.</i>)	BAB69699
		KS	13	422		45 % MtaD (<i>S. a.</i>)	AAF19812
		ACP	753	811		33 % BacC (<i>B. l.</i>)	AAC06348
ClbQ	NRPS	TE	6	217		25 % YbtT (<i>Y. p.</i>)	AAA93463

¹ A: Adenylierung; ACP: *Acyl Carrier Protein*; AT: Acyltransferase; C: Kondensation; Cy: Zyklisierung; ER: Enoylreduktase; KR: Ketoacylreduktase; KS: Ketoacylsynthetase; OX: Oxidation; PCP: *Peptidyl Carrier Protein*.

² Start und Ende der aufgelisteten Domänen beziehen sich auf die Aminosäurepositionen (N → C).

³ Die Spezifität gibt das wahrscheinlichste Substrat der entsprechenden Domäne an.

⁴ Die Identität zu bereits beschriebenen PKS bzw. NRPS bezieht sich auf die entsprechenden Domänen in den angegebenen Proteinen. *B. s.*: *Bacillus subtilis*; *B. b.*: *Brevibacillus brevis*; *P. s.*: *Pseudomonas syringae*; *P. c.*: *Polyangium cellulorum*; *P. f.*: *Pseudomonas fluorescens*; *S. a.*: *Stigmatella aurantiaca*; *S. c.*: *Streptomyces chrysomallus*; *B. t.*: *Bacillus thuringiensis*; *S. n.*: *Streptomyces nodosus*; *S. v.*: *Streptomyces verticillus*; *C. f.*: *Cystobacter fuscus*; *M. a.*: *Microcystis aeruginosa*; *B. l.*: *Bacillus licheniformis*; *Y. p.*: *Yersinia pestis*.

Promotor-Vorhersage Im Rahmen der Sequenzanalyse wurde auch eine Berechnung möglicher Promotoren des PKS/NRPS-Genclusters mit Hilfe der *Neural Network Promoter Prediction Software* unter http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html durchgeführt. Mit dieser kann prokaryotische DNA-Sequenz anhand charakteristischer Konsensussequenzen, vorwiegend der -35- und -10-Boxen, auf mögliche Bindungsstellen der RNA-Polymerase und/oder Transkriptionsfaktoren hin untersucht werden. Auf Grund der großen Anzahl möglicher Promotoren im PKS/NRPS-Gencluster wurde der Schwellenwert für die Annahme einer Promotor-Sequenz mit 0,95 sehr hoch angesetzt, um möglichst wenige falsch-positive Ergebnisse zu erhalten. Hierbei bestand allerdings eine höhere Wahrscheinlichkeit, nicht alle tatsächlichen Promotoren vorherzusagen. Da jedoch diese Berechnung nur als erster Anhaltspunkt für die Betrachtung der transkriptionellen Organisation der *clb*-Gene galt, sollte die Datenmenge möglichst klein gehalten werden. Dennoch zeigte sich, dass die verwendete Software lediglich bekannte Motive aufspürt, ohne die ORF-Struktur zu berücksichtigen. Daher wurden auf dem *Forward*-Strang, auf dem nur drei Gene annotiert wurden, fast

ebenso viele putative Promotoren gefunden wie auf dem Reverse-Strang, auf dem die übrigen 19 Gene des PKS/NRPS-Genclusters liegen. Die computergestützte Analyse möglicher Transkriptionsstartpunkte und -einheiten kann somit die experimentelle Bestimmung dieser nicht vollwertig ersetzen.

In Tab. 14 sind die errechneten Promotorsequenzen einschließlich ihrer Start- und Endposition angegeben. Zusätzlich sind die Startpositionen der Gene aufgeführt, deren Transkription von einem der ihnen voranstehenden Promotoren am wahrscheinlichsten beeinflusst wird. Es konnte festgestellt werden, dass vor fast allen Genen des PKS/NRPS-Genclusters mögliche Promotoren in mehr oder weniger großen Abständen zum postulierten Startcodon liegen. Allerdings konnte auf diesem Weg nicht ermittelt werden, welche Sequenz tatsächlich die Transkription initiiert. Bei den Genen *clbE* und *clbF*, *clbL* und *clbM* sowie *clbO* und *clbP* besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass diese kotranskribiert werden, da das jeweils zweitgenannte Gen keinen exklusiv diesem zuweisbaren Promotor besitzt bzw. in sehr großem Abstand zu einem putativen Promotor liegt. Die in Abschnitt 5.2.7 beschriebene Untersuchung zu einzelnen Transkriptionseinheiten der *asnW*-Insel unterstützen teilweise diese Annahme.

5.2.5 Deletion der *asnW*-Insel

In der Arbeitsgruppe von E. Oswald (INRA, Toulouse) konnte mittels Transposon-Mutagenese bei *E. coli* IHE3034 bereits die Beteiligung einiger ORFs des PKS/NRPS-Genclusters an dem durch das Polyketid ausgeübten zytopathischen Effekt nachgewiesen werden.

Um geeignete Kontrollen für zukünftige Experimente zur Hand zu haben, sollte die Insel in den Stämmen IHE3034, CFT073, J96, 536 und Nissle 1917 komplett deletiert werden. Auf Grund der Größe der Insel von 54 kb gelang dies nicht mittels einschrittigem, λ -Red-Rekombinase vermitteltem Allelaustausch (Datsenko & Wanner, 2000) wie es für kürzere DNA-Abschnitte bisher durchgeführt wurde. Offenbar ist die λ -Red-Rekombinase nicht in der Lage, eine homologe Rekombination über einen solch großen Bereich zu katalysieren. Die Deletion wurde stattdessen durch die Einführung von FRT-Sequenzen an beiden Enden der Insel und Flp-Rekombinase vermittelter Rekombination erreicht (Abb. 22).

Die erfolgreiche Deletion der Insel in den oben genannten Stämmen wurde durch PCR mit außerhalb liegenden Primern und Southern-Hybridisierung mit spezifischen Sonden für beide Enden sowie für einen internen Abschnitt nachgewiesen (Abb. 23). Wie zu erwarten, war in Zellkultur kein zytopathischer Effekt der Deletionsmutanten auf HeLa-Zellen mehr zu beobachten. Dieser konnte durch Komplementation der Mutante mit dem Konstrukt pBAC $_{pks}$ wieder hergestellt werden (Abb. 24).

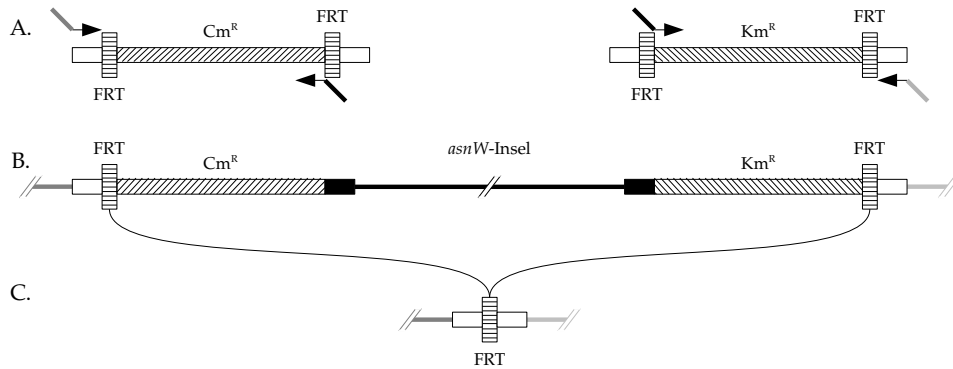


Abb. 22: Schematische Darstellung der Strategie zur Deletion der *asnW*-Insel. A: Amplifikation von Antibiotikaresistenz-Kassetten (Cm^R, Km^R) inkl. je einer FRT-Sequenz mit entsprechende homologe Überhänge generierenden Primern; B: Insertion der PCR-Produkte *upstream* und *downstream* der Insel mittels λ-Red-Rekombinase vermitteltem Allelaustausch; C: Deletion der Insel mittels Flp-Rekombinase vermittelter Rekombination.

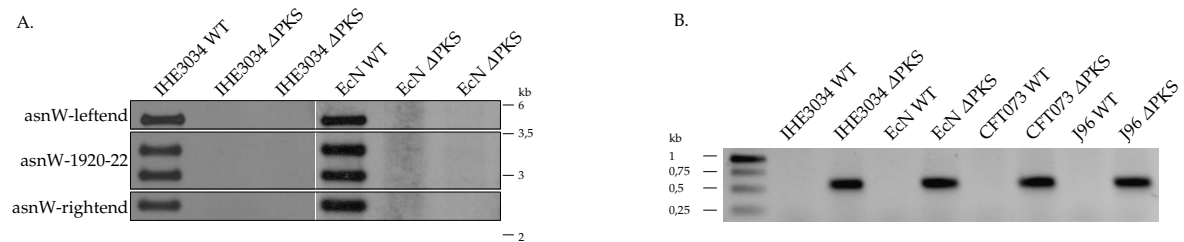


Abb. 23: Nachweis der Deletion der *asnW*-Insel aus dem Chromosom. A: Southern-Hybridisierung *EcoRV*-gespaltener chromosomaler DNA von *E. coli* IHE3034 und Nissle 1917 mit DNA-Sonden spezifisch für verschiedene Teile der *asnW*-Insel; B: PCR-Nachweis der Deletion in verschiedenen Stämmen mit außerhalb der *asnW*-Insel bindenden Oligonukleotiden (PKS3/PKS4).

5.2.6 Reduktion der Größe von pBACpks11

Beide zur Verfügung stehenden, die PKS/NRPS-Gene tragenden BAC-Vektoren enthielten neben der kompletten Insel noch größere DNA-Abschnitte *upstream* und *downstream* der relevanten Bereiche. Um das Insert in pBACpks auf die Region zwischen den beiden direkten Wiederholungssequenzen zu beschränken und somit die Beteiligung weiterer Gene an der Polyketidsynthese auszuschließen, wurden die überflüssigen DNA-Sequenzen mittels λ-Red-Rekombinase vermittelter Mutagenese deletiert. Der daraus resultierende pBACpks-1 trägt eine FRT-Sequenz unmittelbar vor *asnW* sowie eine Kanamycin-Resistenzkassette am anderen Ende der Insel. Die Deletionen innerhalb von pBACpks konnten durch PCR und Sequenzierung nachgewiesen werden.

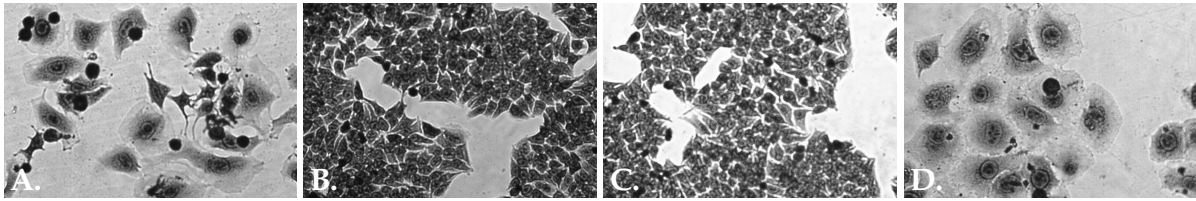


Abb. 24: Deletion und Komplementation der *asnW*-Insel. Morphologie von HeLa-Zellen 72 h nach Kokultur mit verschiedenen *E. coli*-Stämmen (Giemsafärbung). A: Nissle 1917; B: Nissle 1917 Δ PKS; C: IHE3034 Δ PKS; D: Nissle 1917 Δ PKS pBACpks11.

Eine Inkubation von HeLa-Zellen mit *E. coli* DH10B pBACpks-1 hatte erwartungsgemäß den selben zytopathischen Effekt zur Folge wie eine Infektion der Zellen mit dem den ursprünglichen pBACpks tragenden Stamm. Somit sind offenbar keine weiteren auf pBACpks liegenden Gene an der Synthese und Aktivierung des Polyketids beteiligt. Mögliche zusätzliche Faktoren, die an der Biosynthese der aktiven Komponente beteiligt sind, sind daher allgemeiner Natur und können offensichtlich vom verwendeten Laborstamm ebenso zur Verfügung gestellt werden.

5.2.7 Transkriptionsanalyse der *asnW*-Insel

Die strikte Kontaktabhängigkeit des zytopathischen Effektes legte die Vermutung nahe, dass hierbei möglicherweise regulatorische Prozesse eine Rolle spielen und durch den Kontakt der Bakterien zur Zelloberfläche der Epithelzellen die Expression bestimmter ORFs des PKS/NRPS-Genclusters induziert wird. Um zu ermitteln, welche Gene während der Kokultur mit HeLa-Zellen transkribiert werden und ob die Transkriptionsraten sich zu denen in Standardkultur unterscheiden, wurden RT-PCR-Analysen durchgeführt.

Transkriptmengen der Gene der *asnW*-Insel unter unterschiedlichen Bedingungen In einem ersten Experiment wurde untersucht, ob eine generelle Abhängigkeit der Transkription der Gene der *asnW*-Insel von Medium und Wachstumsbedingungen besteht. Hierbei wurden die *E. coli*-Stämme Nissle 1917 und IHE3034 in LB und DMEM schüttelnd und statisch (5 % CO₂) bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen und die RNA extrahiert. Alle ORFs des PKS/NRPS-Genclusters wurden mittels RT-PCR hinsichtlich der jeweiligen Transkriptmengen unter den verschiedenen Bedingungen überprüft. Dabei zeigte sich, dass die Gene *clbI* bis *clbQ* generell sehr schwach transkribiert wurde (Abb. 25). Hier war kein Unterschied zwischen verschiedenen Wachstumsbedingungen und Medien festzustellen. Die Gene *clbA* bis *clbH* wurden hingegen verstärkt transkribiert. Für diesen Teil der Insel zeigten sich auch

Unterschiede für die verschiedenen Anzuchtbedingungen. Während unter Schütteln hohe Expressionsraten festgestellt werden konnten, wurde in statischer Kultur erheblich weniger Transkript nachgewiesen.

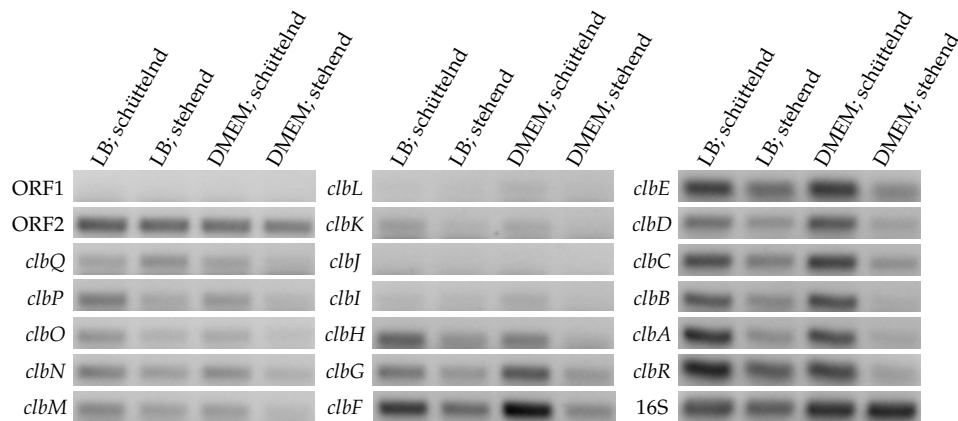


Abb. 25: Vergleichende Transkriptmengenanalyse der *clb*-Gene unter verschiedenen Kulturbedingungen. *E. coli* Nissle 1917 wurde in LB und DMEM unter Schütteln und stehend kultiviert. RNA wurde bei $OD_{600} = 0,5$ extrahiert.

Transkriptmengen der Gene der *asnW*-Insel mit und ohne Zellkontakt Der Einfluss des Kontaktes zwischen Bakterien und HeLa-Zellen auf die Transkriptmengen der *clb*-Gene wurde in einem weiteren Versuch überprüft. Dazu wurden die Bakterien unter Zellkulturbedingungen ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\text{ }\%$ CO_2) zwei Stunden (ko-)kultiviert und danach ihre RNA isoliert. Da bei dieser Prozedur aus der Kokultur ebenfalls eukaryotische RNA isoliert wurde, war die Menge der Bakterien-RNA nicht genau zu ermitteln. Daher wurden die cDNA-Mengen nach der reversen Transkription für einen direkten Vergleich zwischen Kokultur und Standardkultur zunächst anhand der Bandenstärken der 16S-rDNA angeglichen. Die cDNA aus der Kokultur wurde daraufhin weniger stark verdünnt (1:20) eingesetzt als jene aus der Standardkultur (1:40). Die Genauigkeit dieser Analyse war daher nur zur Detektion größerer Unterschiede in den Transkriptmengen ausreichend.

Die RT-PCR-Analyse zeigte, dass sämtliche ORFs des PKS/NRPS-Genclusters mehr oder weniger stark transkribiert werden. Die höchsten Raten zeigten dabei die Gene *clbB* und *clbC*, während die Gene *clbE*, *clbF* und *clbJ* nur sehr schwache Expression aufwiesen (Abb. 26). Ein genereller Unterschied einzelner Gene zwischen Kokultur und Standardkultur konnte nicht ausgemacht werden. Lediglich *clbQ* zeigte in Standardkultur eine etwas geringere Transkription im Vergleich zur Kokultur.

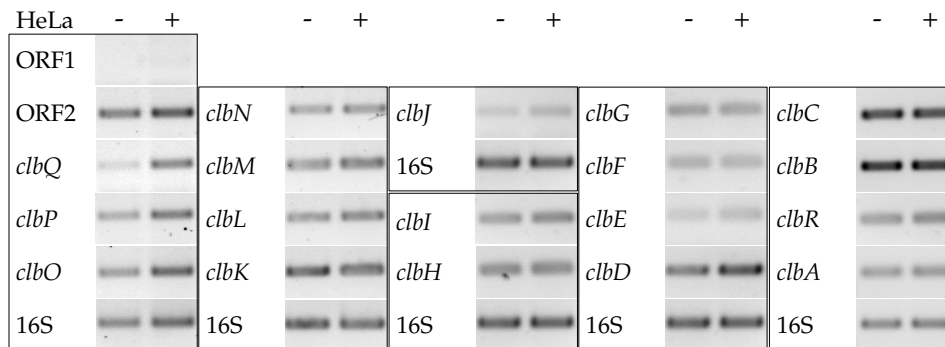


Abb. 26: Vergleichende Transkriptmengenanalyse der *clb*-Gene in Standard- und Kokultur. *E. coli* Nissle 1917 wurde in Anwesenheit (+) und Abwesenheit (-) von HeLa-Zellen kultiviert und die RNA zu gleichen Zeitpunkten isoliert.

Bei dem CPE-negative Klon von *E. coli* Nissle 1917 konnte mittels RT-PCR eine reduzierte Transkription von *clbA* detektiert werden, während alle übrigen ORFs im Vergleich mit dem Wildtyp identische Transkriptmengen aufwiesen (Abb. 27). Dies legte die Vermutung nahe, dass in der Mutante entweder das Gen selbst oder seine Regulation gestört war. Dass eine Inaktivierung von *clbA* einen CPE-negativen Phänotyp zur Folge hat, konnte bereits zuvor gezeigt werden (Nougayrède *et al.*, 2006). Offenbar kann jedoch auch eine reduzierte Transkription des Gens die (funktionale) Synthese des Polyketids verhindern.

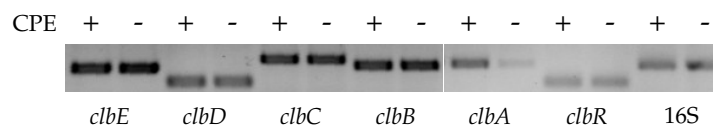


Abb. 27: Vergleichende Transkriptmengenanalyse zwischen *E. coli* Nissle 1917 und dessen CPE-negativer Mutante. RT-PCR mit RNA aus *E. coli* Nissle 1917 (+) und *E. coli* Nissle 1917 CPE⁻ (-).

Semiquantitative RT-PCR der *clb*-Gene In einem weiteren Experiment wurde ein möglicher zeitlicher Unterschied in der Expression der *clb*-Gene während des Kontakts zu HeLa-Zellen ebenfalls mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht. Dazu wurden HeLa-Zellen mit einer bereits zwei Stunden wachsenden *E. coli* Nissle 1917-Kultur versetzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 1 h, 2 h) wurde RNA aus dieser Kokultur sowie aus Standardkultur isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese wurde in verschiedenen Verdünnungsstufen in der nachfolgenden PCR eingesetzt, um so auch geringere Unterschiede in den Expressionsraten erkennen

zu können (LD-RT-PCR; [Schwan et al., 2005](#)). Mit dieser Methode konnte festgestellt werden, dass die Transkriptmengen der überprüften Gene im Zeitverlauf zwar zunahmen, ein Unterschied zwischen Standard- und Kokkultur konnte jedoch auch hierbei nicht nachgewiesen werden (Abb. 28).

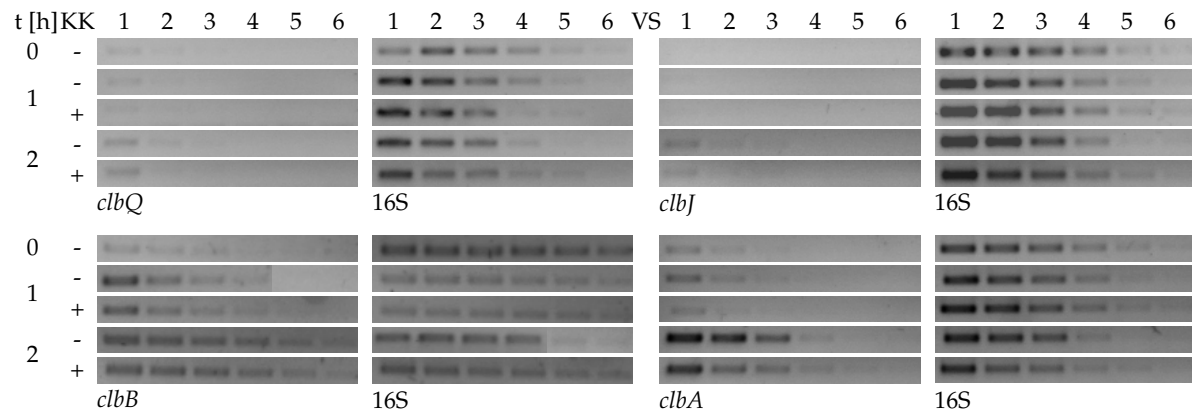


Abb. 28: Vergleichende Transkriptmengenanalyse von *E. coli* Nissle 1917 in Standard- und Kokkultur. Semi-quantitative RT-PCR (LD-RT-PCR) mit RNA aus *E. coli* Nissle 1917 kultiviert in Anwesenheit (KK +) und Abwesenheit (KK -) von HeLa-Zellen. VS 1-6: Verdünnungsstufen (1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200) der cDNA

Transkriptionsheiten der Gene der *asnW*-Insel Ausgehend von der *in silico* Promotor-Vorhersage (5.2.4) kann man lediglich eine mögliche Kotranskription der Gene *clbE* und *clbF*, *clbL* und *clbM* sowie *clbO* und *clbP* postulieren, während die sonstige Anordnung der transkribierten Einheiten daraus nicht ersichtlich ist. Mittels Northern-Hybridisierungsexperimenten wurde versucht, die transkriptionelle Organisation des PKS/NRPS-Genclusters zu ermitteln, um mögliche kotranskribierte Einheiten zu identifizieren. Diese Untersuchungen führten jedoch zu unbefriedigenden Ergebnissen, da auf Grund der sehr geringen Transkriptmengen und der überdurchschnittlichen Länge der einzelnen ORFs keine auswertbaren Hybridisierungssignale erhalten werden konnten. Aus diesem Grund wurden mögliche polycistronische Einheiten lediglich mittels RT-PCR bestimmt, indem jeweils zwei benachbarte ORFs auf ein gemeinsames PCR-Produkt zwischen dem Ende des einen und dem Beginn des nachfolgenden ORFs hin überprüft wurden. Auf diese Weise konnte festgestellt werden, dass die transkribierten Einheiten im PKS/NRPS-Gencluster möglicherweise sehr groß sind und mehrere Gene umfassen könnten (Abb. 29). Anscheinend bilden die Gene *clbC* bis *clbG* sowie *clbI* bis *clbN* zwei große Operons von ca. 6,2 bzw. 23,3 kb. Auch die Gene *clbO* und *clbP* (3,9 kb) sowie *clbR* und *clbA* (0,9 kb) werden offenbar kotranskribiert. Einzig die Gene *clbB* und *clbH*

werden gemäß dieser Analyse monocistronisch transkribiert. Es muss bei dieser Art der Analyse eingeschränkt werden, dass je nach Wahl der Oligonukleotid-Primer ein sehr weit vom postulierten Startcodon entfernter, in den *downstream*-Bereich des vorangehenden Gen hineinreichender Transkriptionsstart ebenfalls zu einem RT-PCR-Produkt führen und so fälschlicherweise als Polycistron identifiziert würde.

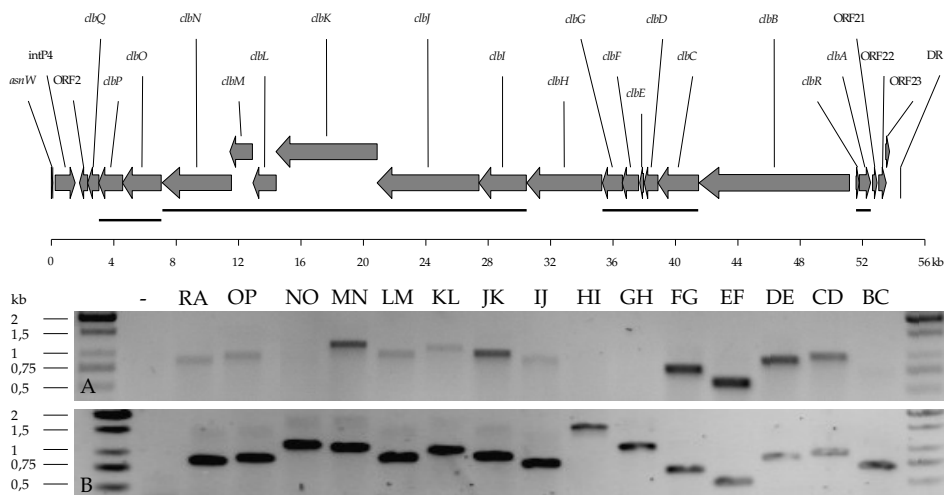
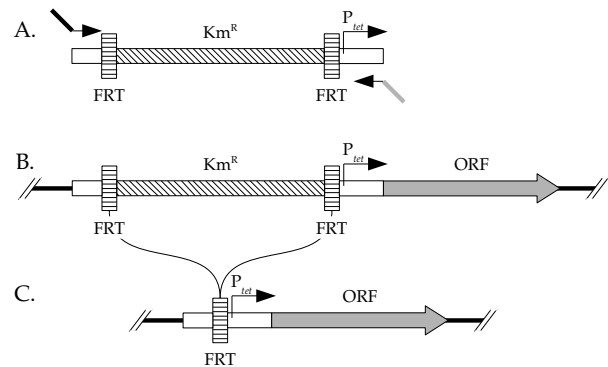


Abb. 29: Transkriptionseinheiten der *asnW*-Insellinse. Gemeinsam transkribierte ORFs wurden durch RT-PCR ermittelt und sind als horizontale Linien unterhalb der *asnW*-Insellinse dargestellt. Die gewählten Primer banden jeweils in zwei benachbarten ORFs, so dass ein Signal nur erhalten wurde, wenn ein gemeinsames Transkript vorlag. A: Signale der RT-PCR; B: Kontrolle mit chromosomaler DNA als Matrize.

5.2.8 Induktion der Polyketid-Synthese

Austausch der natürlichen Promotoren von *clbA*, *clbB*, *clbQ* und *clbR* Auf Grund der leicht erhöhten Transkriptmenge von *clbQ* in der Kokultur (5.2.7) wurde der Versuch unternommen, diesen ORF auch in Standardkultur in erhöhtem Maße zu exprimieren. Bei *clbQ* handelt es sich um eine putative Thioesterase, die als letzten Schritt in der Biosynthese von Polyketiden und nichtribosomalen Peptiden eine Zyklisierung katalysieren kann und die Freisetzung des Produkts vom Proteinkomplex bewirkt (Grünwald & Marahiel, 2006). Daher wurde angenommen, dass eine verstärkte Expression dieses Gens dazu führen könnte, mehr Produkt freizusetzen und somit die beschriebene Kontaktabhängigkeit des zytopathischen Effektes zu überwinden. Dazu wurde die Promotorsequenz des *tetA*-Gens, das für Tetrazyklinresistenz kodiert und ohne das Repressor-Protein TetR konstitutiv aktiv ist, *upstream* von *clbQ* mittels λ -Red-Rekombinase vermitteltem Allelaustausch integriert (Abb. 30).

Abb. 30: Schematische Darstellung der Strategie zur Insertion konstitutiver Promotoren. A: Amplifikation der Antibiotikaresistenz-Promotor-Fusion (Km^R , P_{tet}) vom Plasmid pGEM-T Easy npt - P_{tet} inkl. FRT-Sequenzen mit entsprechende homologe Überhänge generierenden Primern ; B: Insertion der PCR-Produkte *upstream* des zu induzierenden ORFs mittels λ -Red-Rekombinase vermitteltem Allelaustausch; C: Deletion der Antibiotikaresistenz-Kassette mittels Flp-Rekombinase vermittelter Rekombination.



Diese Vorgehensweise beim Austausch chromosomaler Promotoren wurde in dieser Arbeit basierend auf der Methode von [Datsenko & Wanner \(2000\)](#) entwickelt und erstmals angewendet. Inzwischen wurde dieser „knock-in“-Ansatz für die Integration und Expression von Modell-Antigenen in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium beschrieben ([Husseiny & Hensel, 2005](#)). Einen Promotor-Austausch, wie er hier durchgeführt wurde, bietet mittlerweile die Firma Gene Bridges GmbH, Dresden, als Dienstleistung an.

Die korrekte Integration der Antibiotikaresistenz::Promotor-Fusion in das Chromosom der *E. coli*-Stämme Nissle 1917 und IHE3034 sowie die anschließende Deletion der Antibiotikaresistenz-Kassette konnte mittels PCR und Sequenzierung des Überganges zwischen inserierter DNA und Chromosom bestätigt werden. Leider konnten für dieses Konstrukt mittels RT-PCR nur schwach erhöhte Transkriptmengen nachgewiesen werden ([Abb. 31](#)), so dass hier für weitere Experimente vorzugsweise auf den in ein Plasmid klonierten ORF (siehe unten) zurückgegriffen wurde.

Eine weitere Annahme bezüglich der Regulation der PK/NRP-Synthese bestand darin, dass die an die variable Region der *asnW*-Insel angrenzenden ORFs *clbR*, *clbA* und *clbB* hierbei eine besondere Rolle spielen könnten ([5.2.4](#)). Daher wurden auch hier konstitutive Promotoren integriert, um eine kontaktunabhängige Expression des Polyketids zu erreichen. In den *E. coli*-Stämmen Nissle 1917 und IHE3034 wurden jeweils die einzelnen ORFs mit P_{tet} fusioniert. In *E. coli* Nissle 1917 wurde zudem auch eine Doppelinserion des Promotors jeweils oberhalb von *clbA* und *clbB* durchgeführt ([Abb. 32](#)). Für diese Konstrukte konnten mit Ausnahme von *clbR* mittels RT-PCR erhöhte Transkriptmengen nachgewiesen werden.



Abb. 31: Nachweis der Induktion von *clbQ*. RT-PCR von *clbQ* des Promotor-Austausch-Stammes (P_{tet}) im Vergleich mit dem Wildtyp (wt).

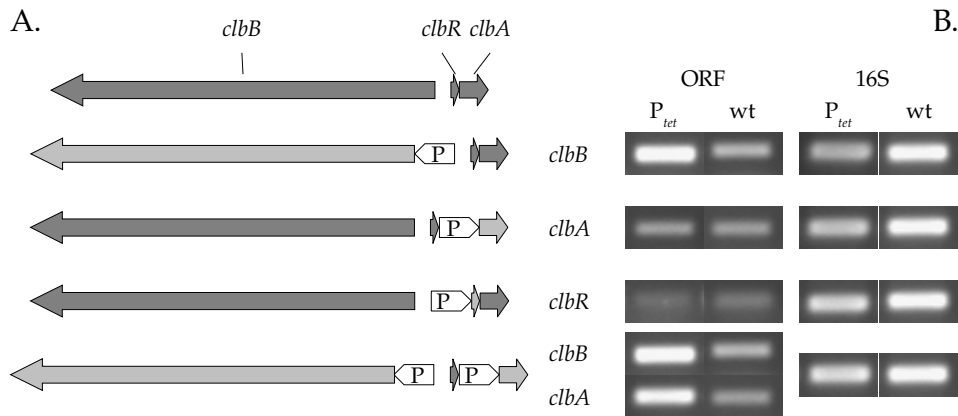


Abb. 32: Promotorinsertionen im Bereich von *clbB* bis *clbA* und Nachweis der Induktion. A: Schematische Darstellung der verschiedenen hergestellten Promotor-Austausch-Stämme. Der jeweils induzierte ORF ist hellgrau dargestellt; B: RT-PCR von *clbB*, *clbA* und *clbR* der Promotor-Austausch-Stämme (P_{tet}) im Vergleich mit dem Wildtyp (wt).

Die Induktion der Gene *clbQ*, *clbB*, *clbR* und *clbA* hatte keine verstärkte Synthese des Polyketids zur Folge bzw. konnte die Kontaktabhängigkeit zwischen Bakterien und Epithelzellen nicht aufheben. Auch nach siebenstündiger Kokultur im Transwell-System konnte in der Folge keine Veränderung der Morphologie der HeLa-Zellen beobachtet werden (ohne Abb.). Somit kann die Substanz auch durch erhöhte Syntheserate offenbar nicht kontaktunabhängig in die Epithelzellen gelangen.

Klonierung und Induktion von *clbA*, *clbQ* und *clbR* In einem zweiten Ansatz wurde versucht, die Überexpression der entsprechenden Proteine und somit möglicherweise eine verstärkte Synthese des Polyketids zu erreichen, indem die Gene *clbA*, *clbQ* und *clbRA* unter die Kontrolle eines Tetrazyklin-induzierbaren Promotors in das Plasmid pASK75 (Skerra, 1994) kloniert wurden (Abb. 4.4).

Auch durch Klonierung und Induktion der gewählten Gene konnte kein zytopathischer Effekt im Transwell-System erreicht werden. Dies bestätigt die o. g. Ergebnisse hinsichtlich der Möglichkeit, die Polyketidsynthese auf die hier beschriebene Weise zu verstärken bzw. die Kontaktabhängigkeit aufzuheben.

Die Konstrukte wurden auch in einen Klon des Stammes *E. coli* Nissle 1917 transformiert, der die Fähigkeit, einen zytopathischen Effekt auf eukaryotische Zellen auszuüben, verloren hatte und in dem eine verminderte Transkription den Gens *clbA* nachgewiesen worden war (5.2.7). Auf diese Weise sollte versucht werden, den Defekt, dessen Ursache unbekannt war, zu komplementieren.

Der Defekt dieses PKS-negativen Klons des Stammes *E. coli* Nissle 1917 konnte durch Transformation und Induktion des Plasmids pASK-4711/1960 aufgehoben werden. Der so komplementierte Stamm war in der Lage, den zytopathischen Effekt auf HeLa-Zellen erneut auszuüben. Allerdings gelang es nicht, den Effekt mittels Induktion von *clbA* allein (pASK-1960) wieder herzustellen (Abb. 33).

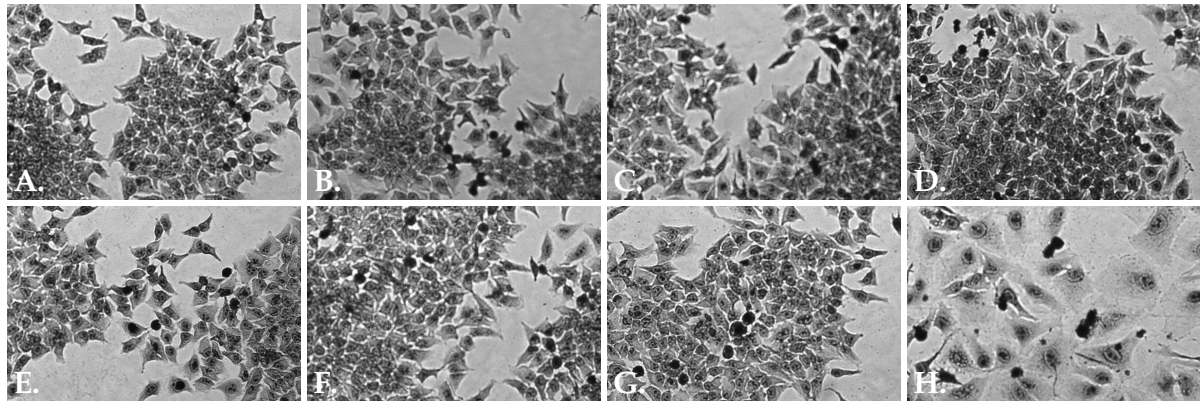


Abb. 33: Wiederherstellung des zytopathischen Effekts in CPE-negativem *E. coli* Nissle 1917. Morphologie von HeLa-Zellen 72 h nach Kokultur mit verschiedenen *E. coli* Nissle 1917-Stämmen (Giemsa-Färbung). A: CPE⁻; B: CPE⁻ pASK75; C: CPE⁻ pASK-1960; D: CPE⁻ pASK-4711/1960; E-H: wie A-D, induziert mit 0,2 µg/ml aTc.

Klonierung und Induktion der variablen Region zwischen *clbB* und *clbR* Um festzustellen, ob die oben erwähnte variable Region zwischen den Genen *clbB* und *clbR* (5.2.4) einen regulatorischen Einfluss auf die Biosynthese des Polyketids besitzt, wurden Fragmente der Größen 673, 463, 445 und 235 bp dieses Bereiches in pGEM-T Easy kloniert. Diese schlossen folgende Abschnitte ein (Abb. 58 im Anhang):

1. die Sequenz zwischen *clbB* und *clbA* (673 bp)
2. die Sequenz zwischen *clbB* und *clbR* (463 bp)
3. 235 bp *upstream* von *clbR* inkl. *Repeat*-Region (235 bp)
4. wie vor, jedoch inkl. *clbR* (445 bp)

Die Konstrukte wurden sowohl in *E. coli* Nissle 1917 als auch in IHE3034 transformiert und die Stämme im Transwell-System hinsichtlich eines kontaktunabhängigen zytopathischen Effekts untersucht. Die Transkription der inklonierten DNA wurde durch Zugabe von IPTG induziert. Es zeigte sich jedoch kein Einfluss auf die eukaryotischen Zellen (ohne Abb.). Somit

besteht offenbar kein Zusammenhang zwischen den zur Expression gewählten Abschnitten und einer regulatorischen Aufgabe im Biosynthese-Cluster.

Komplementation des CPE-negativen Phänotyps von *E. coli* 536 durch *uvrY* Der Einfluss von UvrY, dem *Response Regulator* des BarA/UvrY-Zweikomponentensystems (Pernestig *et al.*, 2001), auf die Funktionalität des Polyketids wurde bereits zuvor untersucht (E. Oswald, persönlich). Es konnte festgestellt werden, dass *uvrY*-Deletionsmutanten keinen zytopathischen Effekt auf Epithelzellen mehr bewirkten.

Transkriptionsstudien und Sequenzanalysen des Stammes *E. coli* 536 offenbarten eine Deletion von *uvrY* aus dem Genom (J. Zdziarski, persönlich; Brzuszkiewicz *et al.*, 2006). Daraus konnte man folgern, dass möglicherweise die Abwesenheit von UvrY zum CPE-negativen Phänotyp des Stammes führte. Aus diesem Grund wurde *E. coli* 536 mit dem *uvrY*-Plasmid pCA9505 (van Sluis *et al.*, 1983) transformiert und der so komplementierte Stamm in Kokultur mit HeLa-Zellen untersucht. Als Kontrolle wurde der Stamm mit dem Plasmid pCA9505-MluI transformiert, in dem das *uvrY*-Gen unterbrochen war (Pernestig *et al.*, 2003).

Durch die Komplementation des Stammes *E. coli* 536 mit *uvrY* über das Plasmid pCA9505 konnte ein CPE-positiver Phänotyp hergestellt werden. Dadurch wurde gezeigt, dass UvrY eine grundlegende Rolle in der Expression der PKS/NRPS-Gene spielt und der Stamm 536 lediglich durch den Verlust von *uvrY* kein funktionales Polyketid synthetisiert (Abb. 34).

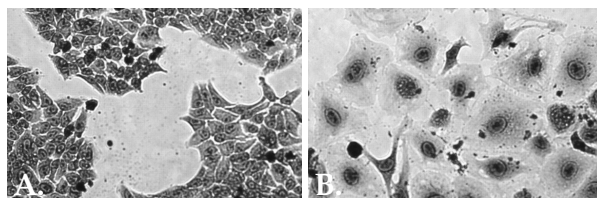


Abb. 34: Wiederherstellung des zytopathischen Effekts in *E. coli* 536. Morphologie von HeLa-Zellen 72 h nach Kokultur mit A: 536; B: 536 pCA9505 (Giemsa-färbung).

5.2.9 Verwendung von Luziferase-Fusionen zur Untersuchung der Transkriptionsaktivität im PKS/NRPS-Gencluster

Bei der weiteren Charakterisierung des PKS/NRPS-Genclusters war die Untersuchung der Regulation und der Transkription der einzelnen ORFs von großem Interesse, da dadurch Rückschlüsse auf die Bedingungen, unter denen Polyketid-Synthese stattfindet, gezogen wer-

den können. Da der direkte Kontakt der Bakterien zu Epithelzellen unerlässlich für die Aktivität der Komponente zu sein scheint, sollte insbesondere bestimmt werden, ob sich die Transkriptionsaktivitäten unter diesen Bedingungen von denen unter Standardbedingungen unterscheiden. Erkenntnisse in dieser Hinsicht sollten helfen, geeignete Voraussetzungen für eine kontaktunabhängige Expression der bioaktiven Substanz zu finden, um diese schließlich isolieren und strukturell charakterisieren zu können. Konventionelle RNA-Experimente führten bei diesen Untersuchungen zu unbefriedigenden Ergebnissen, da sich die RNA-Isolation aus einer Kokultur als schwierig erwies und die Kontamination mit eukaryotischer RNA eine genaue Quantifizierung der Transkriptmengen unmöglich machte. Zudem war eine Untersuchung der zeitlichen Änderung der Transkription während einer Kokultur auf diese Weise nicht praktikabel.

Mittels Reporterfusionen sollte die Promotoraktivität einzelner ORFs im PKS/NRPS-Gencluster analysiert werden. Dazu wurde ein Luziferase-System gewählt, das sein eigenes Substrat kodiert und so direkt in Kultur gemessen werden kann. Luziferase schien auf Grund des zur Transkription zeitnahen Aktivitätsmaximums und der geringen Halbwertszeit besonders geeignet, den Infektionsverlauf zu verfolgen.

Herstellung von Reporterfusionen Um das mit 5694 bp relativ große Luziferase-Gencluster sowie ein geeignetes Markergen mit ausgewählten ORFs der *asnW*-Insel zu fusionieren, wurde zunächst versucht, ein entsprechendes PCR-Produkt mittels λ -Red-Rekombinase vermittelter Rekombination (Datsenko & Wanner, 2000) zu inserieren. Auf Grund der Größe dieses Fragments war eine Integration jedoch auf diesem Wege nicht erfolgreich. Da jedoch eine möglichst universelle Anwendung für diese Untersuchung notwendig war, kam eine Methode zum Einsatz, die die bei der λ -Red-Mutagenese generierten FRT-Sequenzen als Insertionsstelle für ein die Luziferase-Gene tragendes Plasmid nutzt (Ellermeier *et al.*, 2002). Auf diese Weise kann jeder Stamm, in dem ein Gen mittels λ -Red-Rekombinase vermittelter Mutagenese deletiert wurde, in einen Luziferase-Reporterstamm umgewandelt werden, sofern bereits die Antibiotika-Resistenzkassette korrekt inseriert wurde. Das Grundprinzip zur Generierung solcher Reporter-Stämme ist in Abb. 35) dargestellt.

Luziferase-Reporter wurden zunächst in die Gene *clbA*, *clbB*, *clbQ* und *clbR* integriert und mittels PCR verifiziert. Dabei wurden die Stämme auch hinsichtlich mehrfacher Insertionen des Plasmids überprüft, die durch die Verdoppelung der FRT-Sequenz bei der Rekombination auftreten konnten. Der Übergang zwischen chromosomaler Sequenz und integriertem Reporter-Plasmid wurde jeweils sequenziert und ist in Abb. 36 exemplarisch mit allen relevanten Elementen für das putative Thioesterase-Gen *clbQ* dargestellt.

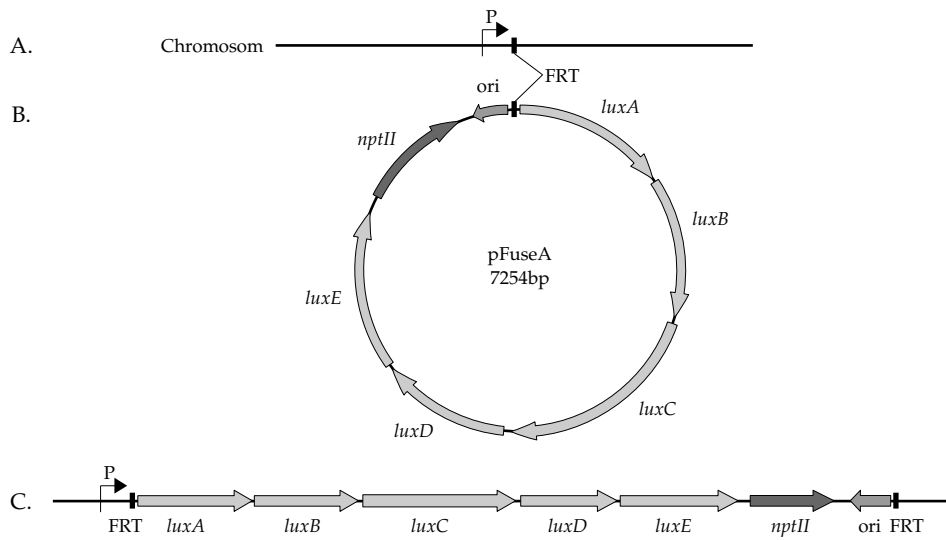


Abb. 35: Schematische Darstellung der Strategie zur Herstellung von Luziferase-Reporterfusionen. A: Chromosom mit FRT-Sequenz nach λ -Red-Rekombinase vermittelter Mutagenese; B: Rekombination zwischen dieser und der auf dem Fusionsplasmid vorhandenen FRT-Sequenz, katalysiert durch Flp-Rekombinase; C: Integriertes Fusionsplasmid, flankiert von FRT-Sequenzen. P: Promoter-Region des deletierten Gens.

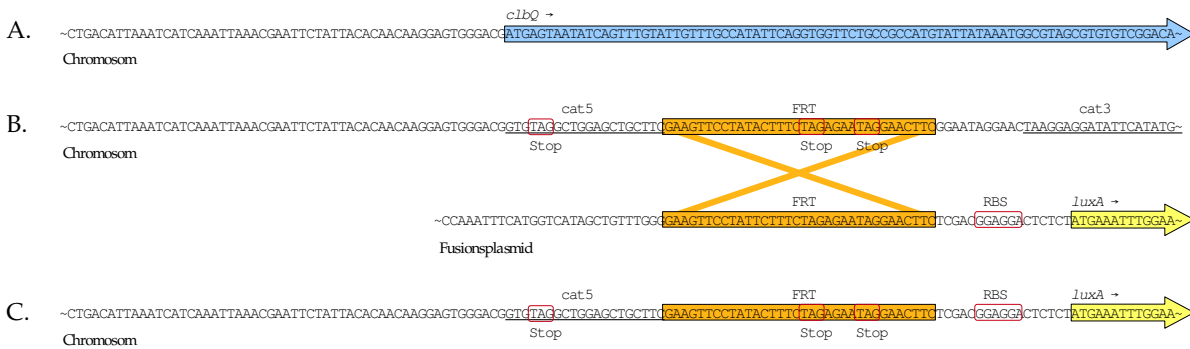


Abb. 36: Relevanter Sequenzkontext bei der Herstellung von Reporterfusionen. A: Chromosomaler Kontext von *clbQ*; B: Die Deletion von *clbQ* mittels λ -Red-Rekombinase vermittelter Mutagenese hinterlässt eine FRT-Sequenz. Rekombination zwischen dieser und der auf dem Fusionsplasmid vorhandenen FRT-Sequenz, katalysiert durch Flp-Rekombinase; C: Transkriptionsfusion des *upstream*-Bereichs von *clbQ* mit dem Luziferase-Gencluster. *cat5*, *cat3*: Oligonukleotid-Bindestellen zur Amplifikation der Antibiotika-Resistenzkassette; RBS: Ribosomenbindestelle.

Die jeweils verwendeten Klone wurden in Vorversuchen anhand ihres Wachstumsverhaltens in verschiedenen Medien ausgewählt. Es wurden diejenigen Stämme als repräsentativ angesehen, die dem Durchschnitt aller überprüften Klone entsprachen. Als Kontroll-Stämme wurden Fusionen mit dem chromosomalen *lacZ*-Gen im Stamm *E. coli* Nissle 1917 generiert. Für die Positivkontrollen wurde das Luziferase-Gencluster in den natürlichen Leserahmen eingeführt, für die Negativkontrolle entgegengesetzt.

Messung der Luziferaseaktivität unter verschiedenen Bedingungen Um die generelle Anwendbarkeit der Luziferase-Fusionen zu demonstrieren, wurden die generierten Stämme zunächst unter verschiedenen Wachstumsbedingungen ohne Zellkontakt untersucht. Dazu wurden in der Regel Wachstumskurven über acht bis zehn Stunden aufgenommen und parallel dazu die Luziferaseaktivität in Form von relativen Lichteinheiten (RLU) mit einem Lumino-meter gemessen. Die Lichteinheiten wurden jeweils auf eine $OD_{600} = 1$ umgerechnet, um ein OD-unabhängiges Maß für die Expression der entsprechenden ORFs zu erhalten. Die untersuchten Bedingungen waren:

1. LB, 37 °C, schüttelnd
2. LB, 37 °C, stehend
3. DMEM, 37 °C, schüttelnd
4. DMEM, 37 °C, stehend
5. M63-Medium, 37 °C, schüttelnd
6. M63-Medium, 37 °C, stehend
7. LB, 150 μ M Dipyritydyl, 37 °C, schüttelnd

Die Wachstumskurven für die jeweiligen Bedingungen (A.8) sowie die ermittelten RLU im Vergleich mit dem Kontrollstamm (Luziferasefusion im *lacZ*-Gen) (A.9) sind im Anhang zu finden. Eine qualitative Demonstration der Entwicklung der Luziferaseaktivität über die Zeit ist in Abb. 37 gezeigt. Hierzu wurden je vier individuelle Klone der angegebenen Fusion in Mikrotiterplatten in LB kultiviert und die Lichtproduktion mit einer CCD-Kamera festgehalten.

Sämtliche Messungen wurden mindestens dreimal wiederholt. Sie ergaben jeweils gleiche Relationen zwischen den Promotoraktivitäten der unterschiedlichen Gene, allerdings waren die erhaltenen absoluten RLU von Experiment zu Experiment mitunter stark verschieden.

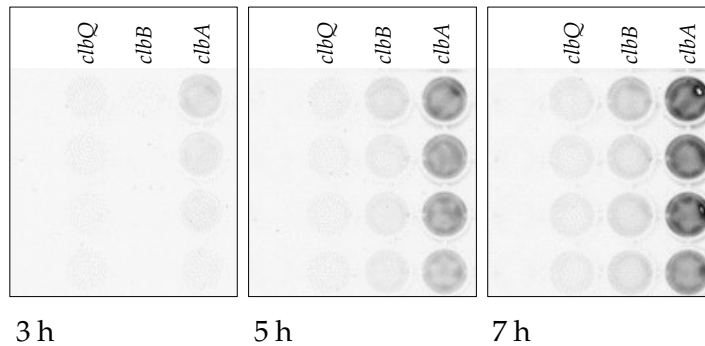


Abb. 37: Visualisierung der Luziferaseaktivität. Zeitliche Zunahme der Lichtintensität während der Kultivierung verschiedener Klone der Luziferasefusionen von *clbQ*, *clbB* und *clbA* des Stammes *E. coli* Nissle 1917.

Daher stellen die nachfolgenden Abbildungen jeweils die Luziferaseaktivitäten einer repräsentativen Messung dar.

LB, 37 °C, schüttelnd Hier zeigte sich, dass die Luziferaseaktivität in *E. coli* Nissle 1917 erheblich höher war, als in IHE3034 (Abb. 38). Dies galt für alle vier untersuchten Fusionen. Der Unterschied zwischen Nissle 1917 und IHE3034 betrug mindestens das Dreifache und belief sich auf das maximal 20-fache im Fall der *clbR*-Fusion nach sieben Stunden.

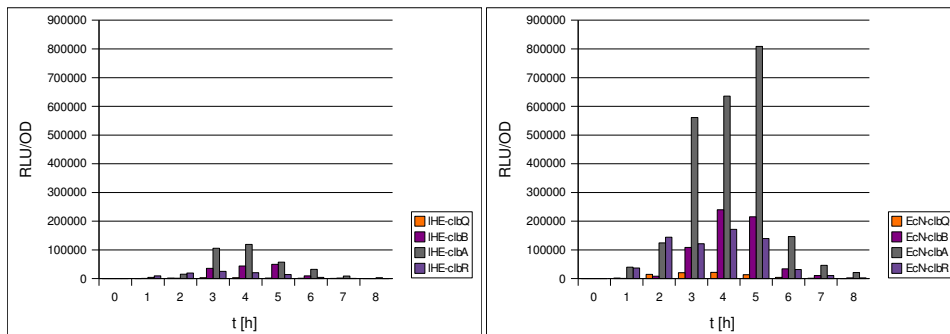


Abb. 38: Transkriptionsniveaus von *clbQ*, *clbB*, *clbR* und *clbA* in LB, schüttelnd. Die relativen Lichteinheiten (RLU/OD) repräsentieren die Transkriptionsaktivität der entsprechenden Gene über die Zeit (links: IHE3034; rechts: Nissle 1917).

Die Expressionsraten für die einzelnen Gene relativ zueinander waren jedoch in beiden Stämmen ähnlich. Das Gen *clbA* zeigt jeweils die stärkste maximale Luziferaseaktivität, während *clbQ* am wenigsten exprimiert wurde. *clbB* und *clbR* besaßen jeweils eine mittlere Tran-

skriptionsrate. Das Maximum der Luziferaseaktivität lag bei vier bis fünf Stunden. Dies entsprach dem Übergang der Kulturen in die stationäre Phase. Nachdem diese erreicht war, nahm die Lichtintensität rapide ab und war nach acht Stunden nicht mehr messbar.

LB, 37 °C, stehend Bei der Kultivierung der Reporter-gen-Stämme ohne Schütteln konnte ab der dritten Stunde jeweils eine mehr oder weniger konstante Luziferaseaktivität gemessen werden. Die RLU entsprachen bei *E. coli* Nissle 1917 ungefähr den Maxima, die auch unter Schütteln erreicht wurden und nahmen über den untersuchten Zeitraum von zehn Stunden nicht maßgeblich ab. Im Gegensatz zu *E. coli* Nissle 1917 ließen sich bei IHE3034 unter diesen Bedingungen erheblich höhere RLU messen als unter Schütteln. Die bestimmten Werte betrug teilweise das Dreifache der dort ermittelten Intensitäten. Jedoch blieben auch hier die RLU über die Zeit nahezu konstant, stiegen sogar in den letzten zwei Stunden leicht an (Abb. 39).

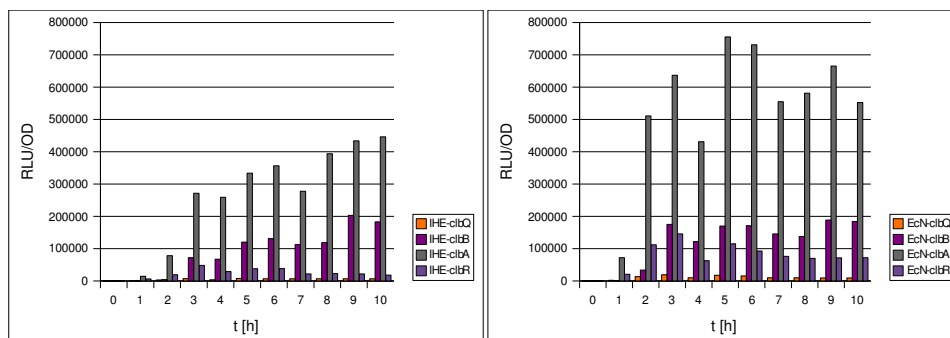


Abb. 39: Transkriptionsniveaus von *clbQ*, *clbB*, *clbR* und *clbA* in LB, stehend. Die relativen Lichteinheiten (RLU/OD) repräsentieren die Transkriptionsaktivität der entsprechenden Gene über die Zeit (links: IHE3034; rechts: Nissle 1917).

DMEM, 37 °C, schüttelnd Die Expressionsraten der verschiedenen Fusionen in Zellkulturmedium unterschieden sich teilweise von den in LB ermittelten Werten (Abb. 40). Insgesamt konnte eine höhere Luziferaseaktivität festgestellt werden, jedoch unterschiedliche Steigerungen für die einzelnen Gene. Während in IHE3034 besonders die Transkription von *clbA* zunahm und im Vergleich zur Kultur in LB ein ca. 14-fach höheres Maximum erreichte, war in Nissle 1917 dieser Anstieg nur ca. zwei bis drei Mal so groß. Auch die Expression der Gene *clbQ*, *clbB* und *clbR* war in IHE3034 bis zu zehn Mal höher als in LB. *E. coli* Nissle 1917 zeigte neben der Verdoppelung der *clbA*-Expression eine vier- bis fünffache Erhöhung der Expression von *clbQ*, *clbB* und *clbR*. Die Luziferaseaktivität nahm in *E. coli* IHE3034 nach dem Erreichen des Maximums nach vier bis fünf Stunden wieder stark ab und blieb bis zum Ende der

5.2 Charakterisierung eines Polyketidsynthase-Genclusters in *E. coli* Nissle 1917

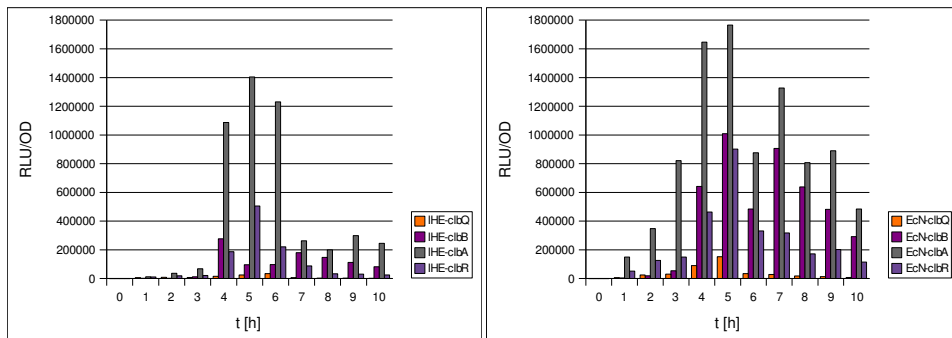


Abb. 40: Transkriptionsniveaus von *clbQ*, *clbB*, *clbR* und *clbA* in DMEM, schüttelnd. Die relativen Lichteinheiten (RLU/OD) repräsentieren die Transkriptionsaktivität der entsprechenden Gene über die Zeit (links: IHE3034; rechts Nissle 1917).

Messung mehr oder weniger konstant. *E. coli* Nissle 1917 hingegen zeigte eine kontinuierliche Abnahme der Expression der untersuchten Gene.

DMEM, 37 °C, stehend In statischen Kulturen in DMEM konnten erheblich höhere Expressionsraten gemessen werden als unter Schütteln (Abb. 41). Der Verlauf der RLU-Kurven beider Stämme war ähnlich, wobei die Aktivitäten in *E. coli* Nissle 1917 jeweils um ca. 50 % höher waren. Nach dem Erreichen eines Maximums nach vier bis fünf Stunden erfolgte jeweils eine schnelle, kontinuierliche Abnahmen der RLU. Zum Ende der Messung war keine Luziferase-Expression mehr zu detektieren.

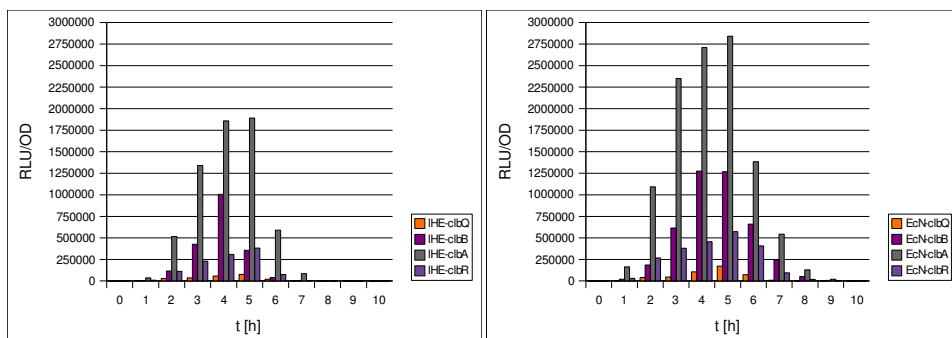


Abb. 41: Transkriptionsniveaus von *clbQ*, *clbB*, *clbR* und *clbA* in DMEM, stehend. Die relativen Lichteinheiten (RLU/OD) repräsentieren die Transkriptionsaktivität der entsprechenden Gene über die Zeit (links: IHE3034; rechts Nissle 1917).

M63-Medium, 37 °C, schüttelnd In M63-Minimalmedium erreichte *clbB* in *E. coli* Nissle 1917 ähnlich hohe Expressionsraten wie in DMEM, jedoch folgte hier dem Maximum eine stärkere

Abnahme der Luziferaseaktivität als dort, fiel aber über mehrere Stunden nicht komplett ab. Die Gene *clbQ*, *clbR* und *clbA* hingegen zeigten eine geringere Luziferaseexpression als in DMEM. Bei *E. coli* IHE3034 zeigte sich ein ähnliches Bild, die maximalen Expressionsraten betrug jedoch nur ca. 50 % der in DMEM erzielten Werte. Interessanterweise konnte in beiden Stämmen eine Expression von *clbR* beobachtet werden, die bis zur fünften Stunde stets über der von *clbB* lag (Abb. 42).

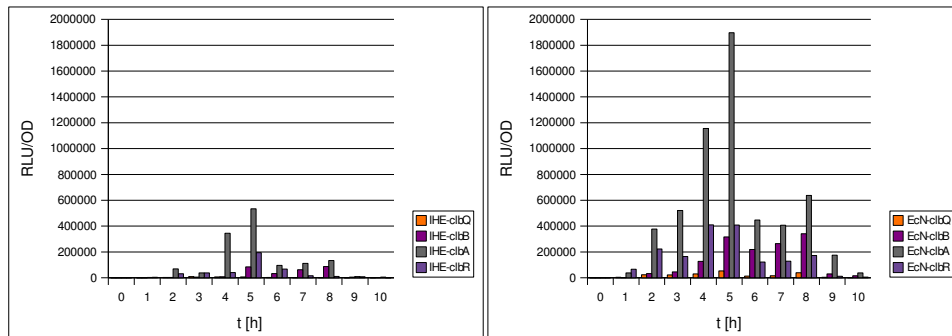


Abb. 42: Transkriptionsniveaus von *clbQ*, *clbB*, *clbR* und *clbA* in M63-Medium, schüttelnd. Die relativen Lichteinheiten (RLU/OD) repräsentieren die Transkriptionsaktivität der entsprechenden Gene über die Zeit (links: IHE3034; rechts Nissle 1917).

M63-Medium, 37 °C, stehend Unter diesen Bedingungen wurden die höchsten Luziferaseaktivitäten gemessen. Sie betrug bei *E. coli* Nissle 1917 ca. das Doppelte der unter Schütteln beobachteten Werte, bei IHE3034 sogar das Dreifache. Der Anstieg der Lichtproduktion war bis zum Erreichen des Maximums jeweils gleichmäßig. Danach fielen die Werte stark ab, blieben jedoch bis zum Ende der Messung konstant auf einem Niveau, das je nach Stamm und Gen zwischen 10 und 20 % des Maximums betrug (Abb. 43).

Eisenmangel-Bedingungen Der Einfluss von Eisenmangel auf die Expression von *clbQ*, *clbB*, *clbR* und *clbA* in *E. coli* Nissle 1917 wurde durch Zugabe von 150 μ M Dipyrindyl zum Wachstumsmedium (LB) analysiert. Es zeigte sich, dass das Wachstum der Bakterien durch diese Maßnahme etwas eingeschränkt wurde. Es konnten leichte Unterschiede in den Expressionsmustern der Gene *clbQ*, *clbB* und *clbR* festgestellt werden, während *clbA* von Eisenmangel nicht beeinflusst wurde (Abb. 44).

Die Expression von *clbQ* wurde durch Zugabe von Dipyrindyl leicht vermindert. Die maximale Luziferaseaktivität lag etwa 30 % unter der des Kontrollstammes und wurde nach kontinuierlichem Anstieg erreicht, während unter Anwesenheit von Eisen bereits nach zwei

5.2 Charakterisierung eines Polyketidsynthase-Genclusters in *E. coli* Nissle 1917

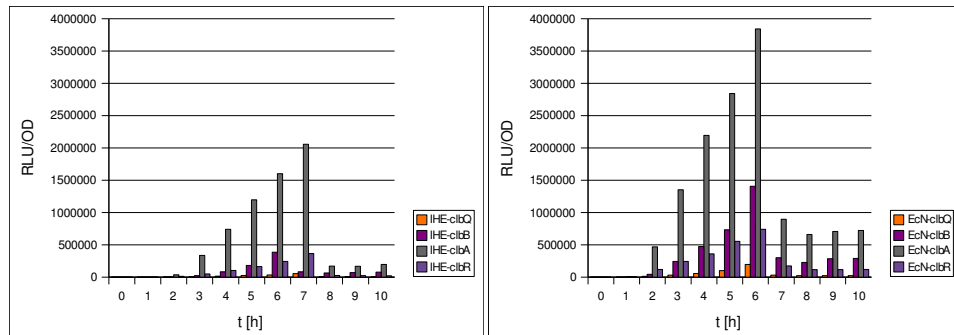


Abb. 43: Transkriptionsniveaus von *clbQ*, *clbB*, *clbR* und *clbA* in M63-Medium, stehend. Die relativen Lichteinheiten (RLU/OD) repräsentieren die Transkriptionsaktivität der entsprechenden Gene über die Zeit (links: IHE3034; rechts Nissle 1917).

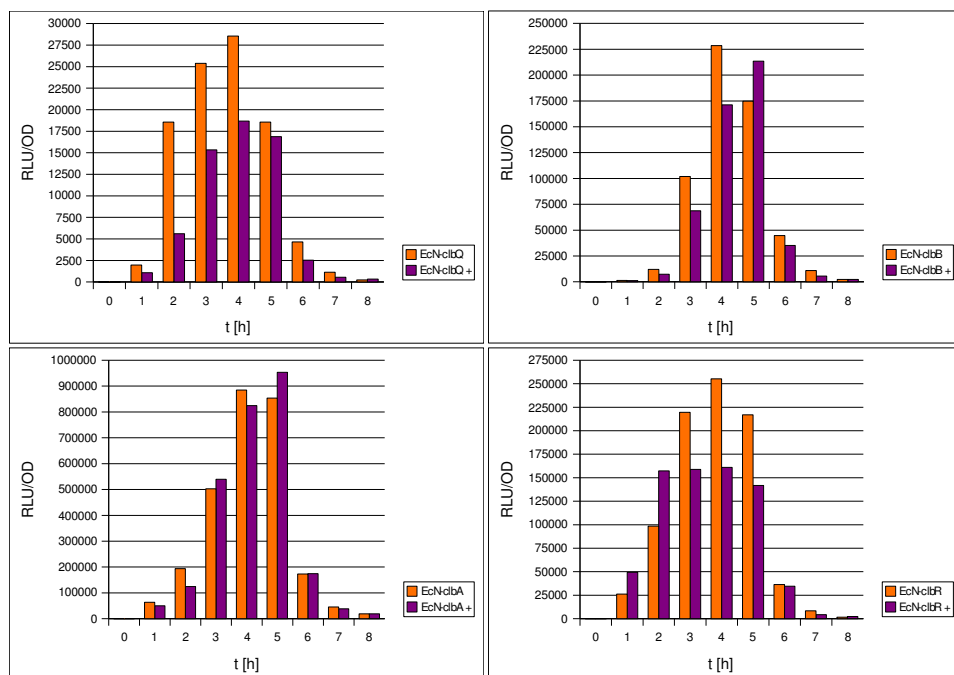


Abb. 44: Transkriptionsniveaus von *clbQ*, *clbB*, *clbR* und *clbA* unter Eisenmangel. Stämme wurden in LB bzw. LB + 150 μM Dipyrindyl (+) kultiviert. Die relativen Lichteinheiten (RLU/OD) repräsentieren die Transkriptionsaktivität der entsprechenden Gene über die Zeit.

Stunden ein sprunghafter Anstieg der RLU zu verzeichnen war. Nach dem Erreichen der maximalen Expressionsrate wurden unter beiden Bedingungen ähnliche RLU erhalten. Das Expressionsmuster von *clbB* war unter Eisenmangel zeitlich leicht verschoben. Die maximale Luziferaseaktivität war gleich der der Kontrolle, konnte hier jedoch erst nach fünf, nicht bereits nach vier Stunden gemessen werden. *clbR* erreichte unter Eisenmangel nicht die Expressionsrate der Kontrolle, sondern verlief über mehrere Stunden auf einem Plateau, das ca. 40 % unter dem Maximum der Kontrolle lag. Ab der sechsten Stunde waren die Expressionsmuster unter beiden Bedingungen wieder identisch. Einzig *clbA* blieb von Eisenmangel unbeeinflusst.

Luziferaseaktivitäten im PKS-negativen Klon des Stammes *E. coli* Nissle 1917 Für die weitere Untersuchung des PKS-negativen Klons des Stammes *E. coli* Nissle 1917 wurden von diesem ebenfalls Reporterfusionen der Gene *clbR* und *clbA* angefertigt. Die Luziferaseexpression wurde in LB unter Schütteln ermittelt. Während sich in der Expression von *clbA* ein Unterschied zwischen Wildtyp und CPE-negativem Klon nur zu Beginn der Kultur zeigte, war die Expression von *clbR* in der Mutante stark abgeschwächt und betrug nur ca. 20 % des Wildtyp-Allels (Abb. 45).

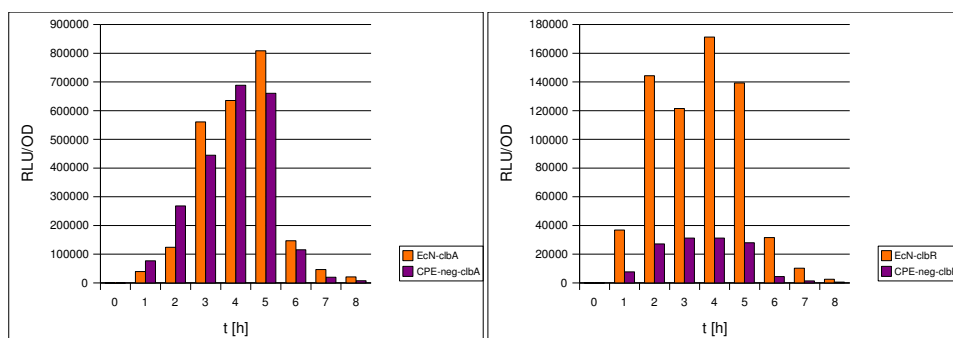


Abb. 45: Transkriptionsniveaus von *clbA* und *clbR* in Wildtyp und CPE-negativem Klon von *E. coli* Nissle 1917. Die relativen Lichteinheiten (RLU/OD) repräsentieren die Transkriptionsaktivität der entsprechenden Gene über die Zeit.

Messung der Luziferaseaktivität in Kokultur Die Messung der Luziferaseaktivität in Kokultur erfolgte über die für ein Infektionsexperiment üblichen fünf Stunden (Abb. 46). Mögliche, durch Zellkontakt induzierte Veränderungen der Promotortätigkeit mussten in diesem Zeitraum liegen, da spätere Zeitpunkte auch für Standardexperimente nicht relevant waren.

Es konnte in Kokultur der Reporter-gen-Stämme mit HeLa-Zellen für keines der ausgewähl-

5.2 Charakterisierung eines Polyketidsynthase-Genclusters in *E. coli* Nissle 1917

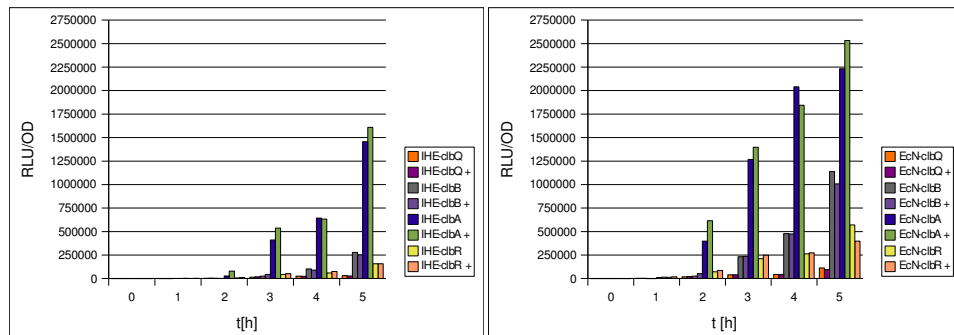


Abb. 46: Transkriptionsniveaus von *clbQ*, *clbB*, *clbR* und *clbA* in Kokultur mit HeLa-Zellen. Stämme wurden in Standard- bzw. Kokultur mit HeLa-Zellen (+) in DMEM kultiviert. Die relativen Lichteinheiten (RLU/OD) repräsentieren die Transkriptionsaktivität der entsprechenden Gene über die Zeit.

ten Gene eine erhöhte Promotoraktivität festgestellt werden. Die Luziferaseaktivitäten gleichen den unter Standardbedingungen in DMEM gemessenen Werten (Abb. 41) und stiegen im Verlauf der Messung kontinuierlich an. Somit wird die Transkription der ausgewählten Gene durch Kontakt mit HeLa-Zellen nicht induziert oder verstärkt.

6 Diskussion

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Faktoren untersucht, die möglicherweise zur bakteriellen Fitness, d. h., zur erfolgreichen Etablierung und Proliferation verschiedener *E. coli*-Stämme beitragen. Diese Faktoren waren sehr unterschiedlicher Natur und könnten auf verschiedene Weise einen Nutzen für die sie ausprägenden Bakterien darstellen. Während es sich bei der Expression des *rdar*-Morphotyps um einen Kolonisierungsfaktor im klassischen Sinne handelt, stellt die Synthese eines hybriden Peptid-Polyketids eine Fähigkeit dar, die zunächst keinen Aufschluss über ihre Funktion zulässt. Das Auftreten beider Eigenschaften in dem probiotischen Stamm *E. coli* Nissle 1917 machte diesen zu einem interessanten Studienobjekt, da so allgemeingültige Mechanismen bakterieller Fitness in einem apathogenen Mikroorganismus untersucht werden können, der ansonsten große Ähnlichkeit zu virulenten Stämmen besitzt.

6.1 Untersuchung des *rdar*-Morphotyps von *E. coli* Nissle 1917

6.1.1 Biofilmbildung bei *E. coli*

Bei der Ausprägung des *rdar*-Morphotyps handelt es sich um ein multizelluläres Verhalten verschiedener Bakterienstämme, die über die normale Koloniebildung hinausgeht. Durch die konzertierte Synthese von Zellulose und Curli-Fimbrien entsteht eine extrazelluläre Matrix, in die die Bakterien eingebettet sind. Im Allgemeinen wird eine solche Anordnung von Mikroorganismen als Biofilm bezeichnet. Biofilme werden definiert als mikrobielle Populationen, die sich an Grenzflächen (meist fest/flüssig) ansammeln und normalerweise von einer extrazellulären Matrix eingeschlossen sind (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Die Zusammensetzung dieser gelartigen Matrix ist in der Regel sehr komplex und besteht aus einer Mischung verschiedener langkettiger Makromoleküle, wie Exopolysacchariden, Proteinen aber auch DNA als strukturgebende Faktoren (Branda *et al.*, 2005). Gram-negative Bakterien leben in Biofilmen innerhalb pilzförmig ausgebildeter Mikrokolonien, welche durch Wasserkanäle getrennt sind und die Versorgung mit Nährstoffen sowie das Aussondern von Abfallprodukten gewährleisten. Dies hat zur Folge, dass es zur Ausbildung von Stoffgradienten (Sauerstoff, Salze und Stoffwechselprodukte) innerhalb der Mikrokolonien kommt (Ghigo, 2003).

Der *rdar*-Morphotyp stellt gemäß o. g. Definition eine spezielle Form des Biofilms dar, da er

zum einen maßgeblich von einer einzelnen Komponente der komplexen Mischung extrazellulärer Matrixbestandteile abhängt, zum anderen von einem Fimbrienadhäsion, das mit dieser Matrix interagiert und so zu diesem charakteristischen Phänotyp beiträgt. Des Weiteren ist die Ausbildung dieses Biofilmtyps von bestimmten Umwelteinflüssen abhängig und kann in der Regel nur bei Temperaturen unter 37 °C sowie niedriger Osmolarität beobachtet werden. Dieses durch Zellulose und Curli vermittelte multizelluläre Verhalten ist neben *E. coli* und *S. enterica* auch bei anderen Gattungen der Familie der *Enterobacteriaceae* zu verzeichnen (Zogaj *et al.*, 2003). In pathogenen Isolaten können zumindest Curli-Fimbrien als Virulenzfaktor betrachtet werden, da sie, neben Flagellen und anderen Fimbrientypen, die initiale Adhäsion der Bakterien an verschiedene Oberflächen vermitteln und so die Bildung erster Mikrokolonien ermöglichen (Prigent-Combaret *et al.*, 2000; Uhlich *et al.*, 2006; Watnick & Kolter, 2000).

Als wichtigster Regulator der Koexpression von Curli und Zellulose gilt CsgD, ein Transkriptionsfaktor der LuxR-Familie, der für die Expression der Curli-Strukturgene *csgBA* notwendig ist. In einigen Stämmen, die trotz vorhandener *csg*-Gene keine Curli-Fimbrien exprimieren, ist *csgD* aus verschiedenen Gründen inaktiv (Hammar *et al.*, 1995). Zudem stimuliert CsgD die Transkription von *yaiC*, dem Aktivator der Zellulosesynthese in *S. enterica* Serovar Typhimurium (Römling *et al.*, 2000) und *E. coli* (Brombacher *et al.*, 2003), was den Stellenwert dieses Regulators bei der Ausprägung des *rdar*-Morphotyps verdeutlicht. CsgD reagiert, abhängig von entsprechenden Umweltbedingungen, auf einige globale Regulatoren wie OmpR, CpxR, H-NS, IHF und RpoS (Brown *et al.*, 2001; Gerstel & Römling, 2003; Jubelin *et al.*, 2005; Römling, 2002), wobei RpoS über den Transkriptionsfaktor MlrA die Expression von *csgD* indirekt stimuliert.

Aus diesem Grund ist es bemerkenswert, dass *E. coli* Nissle 1917 offenbar in der Lage ist, diesen multizellulären Phänotyp unabhängig von CsgD sowie bei 37 °C zu bilden. Wie die Ergebnisse in Kap. 5.1 zeigen, beeinflusst die Deletion von *csgD* lediglich die Fähigkeit, Kongorot zu binden. Demzufolge wird nur die Expression der Curli-Fimbrien gestört. Dieser Phänotyp gleicht somit dem der *csgBA*-Deletion, welche die Strukturgene der Fimbrien betrifft, wodurch ebenfalls die Kongorot-Bindung beeinträchtigt wird. Die Zellulosesynthese ist durch die Deletion von *csgD* nicht betroffen, ebensowenig wie durch die Deletion von *yaiC*. Auch die gleichzeitige Inaktivierung von *yaiC* und *csgBA* führt nur zu Curli-negativen Mutanten, während die Zelluloseexpression unbeeinflusst bleibt. Dies steht im Gegensatz zu den für *S. enterica* Serovar Typhimurium beschriebenen Beobachtungen, die für solche Doppelmutanten den *rdar*-Morphotyp vollständig aufgehoben sehen (Römling *et al.*, 2000; Zogaj *et al.*, 2001). Durch diese Ergebnisse wird eine bisher nicht beschriebene Regulation dieses Polysaccharids Zellulose nahegelegt, da ein Defekt, der die Bindung von CsgD im Promo-

torbereich von *yaiC* und *csgBA* verhindern und so zu einem *rdar*-negativen Phänotyp führen würde, ausgeschlossen werden kann.

In der Tat wurde vor kurzem von [Da Re & Ghigo \(2006\)](#) für einige *E. coli*-Stämme, darunter auch Nissle 1917, ein CsgD-unabhängiger Weg für die Zellulosesynthese beschrieben, der das Protein mit GGDEF-Domäne YedQ bedingt (Abb. 47). Dieses Protein übernimmt dort offenbar die Rolle von YaiC (AdrA) und aktiviert die Zellulosesynthese auf post-transkriptionaler Ebene, indem es – wie YaiC – die Synthese von zyklischem Diguanylat (c-di-GMP) kontrolliert. Dieser *Second Messenger* bindet an die α -Untereinheit der Zellulose-Synthase und stimuliert deren Aktivität auf bislang unbekannte Weise ([Römling, 2005](#)). Das Signal für die Expression von *yedQ* konnte in diesem CsgD-unabhängigen Weg nicht identifiziert werden. Auch der Mechanismus, über den RpoS Einfluss auf die CsgD-unabhängige Zellulosesynthese nimmt, bleibt dort unklar ([Da Re & Ghigo, 2006](#)).

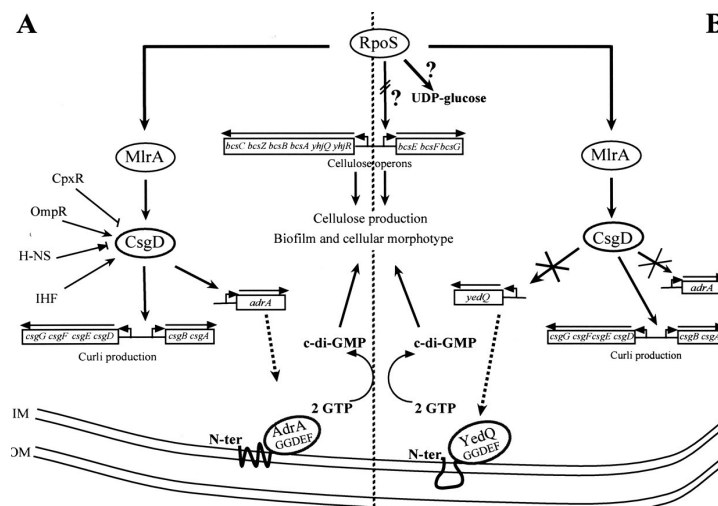


Abb. 47: Modell zur Regulation der Zellulosesynthese in *Salmonella* und *E. coli*. Schematische Darstellung von CsgD/AdrA-abhängiger (A) und -unabhängiger (B) Regulation. Aus: [Da Re & Ghigo \(2006\)](#)

6.1.2 Transposon-Mutagenese zur Identifizierung eines übergeordneten *rdar*-Regulators

Die o. g. Ergebnisse tragen wesentlich zum Verständnis der Regulation des *rdar*-Morphotyps in *E. coli* Nissle 1917 bei, indem sie den CsgD-unabhängigen Weg der Zellulosesynthese aufzeigen. Allerdings wird durch YedQ die Curli-Biosynthese ebensowenig beeinflusst wie durch YaiC und ist somit auch in einer *yedQ*-Deletionsmutante noch intakt ([Da Re & Ghigo, 2006](#)). Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte KR-negative Phänotyp besitzt jedoch we-

der die Fähigkeit zu Zelluloseproduktion noch prägt er Curli-Fimbrien aus. Kolonien dieses Stammes sind auf Kongorot-Agar sowohl bei 30 °C als auch bei 37 °C weiß und mukoid. Das spontane Auftreten dieses Phänotyps mit einer Frequenz, die der von Punktmutationen entspricht, legte daher einen Defekt in einem einzelnen übergeordneten Gen nahe, das sowohl Curli- als auch Zellulosebiosynthese betrifft.

Um solch ein Gen aufzuspüren wurde eine Transposon-Mutagenese des Stammes *E. coli* Nissle 1917 durchgeführt. Mit dieser Methode kann in der Regel relativ einfach eine große Sammlung zufälliger Insertionsmutanten hergestellt werden, in der, bei entsprechend hoher Zahl von Klonen, jedes Gen mit hoher Wahrscheinlichkeit mindestens ein Mal betroffen, d. h., durch die Transposon-Insertion unterbrochen sein sollte. Das verwendete Transposon war ein Tn5-Derivat, dessen Transposase in *trans* auf dem zur Übertragung des Elements konstruierten Plasmids pUTmini-Tn5 zur Verfügung gestellt wurde (de Lorenzo *et al.*, 1990). Da das Plasmid selbst nicht im Akzeptor-Stamm replizieren konnte und so auch die Transposase nur kurzfristig exprimiert wurde, erfolgte jeweils nur ein einziges Transpositionsereignis.

Die Übertragung des Plasmids fand durch Konjugation statt, und Transkonjuganten wurden anhand der übertragenen Kanamycinresistenz selektiert. Während diese Methode in einem Kontrollexperiment mit *E. coli* MG1655 sehr erfolgreich war, stellte sich heraus, dass *E. coli* Nissle 1917 offenbar keinen geeigneten Akzeptor-Stamm für eine Konjugation darstellt. Der Transfer des Plasmids war in ersten Experimenten nicht erfolgreich, so dass keine Transkonjuganten selektiert werden konnten. Auch die Transformation mittels Elektroporation stellte keine geeignete Alternative dar und führte zu keiner angemessenen Anzahl von Mutanten. Die Gründe hierfür ließen sich nicht ermitteln. Allerdings stehen sie im Einklang mit später erzielten Ergebnissen mit dem kommerziell erhältlichen *EZ-Tn5TM TransposomeTM Kit* (Epicentre, Madison, USA), dessen Transfer ebenfalls durch Elektroporation geschieht, wobei gleichermaßen keine Transkonjuganten erhalten wurden. Diese Resultate stehen wahrscheinlich mit der natürlichen „Resistenz“ von *E. coli* Nissle 1917 gegenüber Fremd-DNA in Zusammenhang, die dazu führt, dass der Stamm nur eingeschränkt natürlich transformierbar ist.

Die Bedingungen für eine erfolgreiche Konjugation konnten soweit angepasst werden, dass aus einem Experiment eine akzeptable Anzahl von Insertionsmutanten erhalten wurde. Die Veränderung der Inkubationstemperatur während des *Matings* von 37 °C auf 30 °C schien dabei eine entscheidende Rolle zu spielen. Allerdings war auch eine Verlängerung der Inkubationsdauer vonnöten, um den Transfer des Plasmids zu ermöglichen. Aus diesem Grund fand vermutlich bereits eine Replikation derjenigen Bakterien statt, auf die das Plasmid sehr früh übertragen wurde. Dadurch wäre die erhöhte Anzahl identifizierter Mutanten mit iden-

tischer Transposon-Insertionsstelle zu erklären. Hinsichtlich dieser Erkenntnis ist der Umfang der hergestellten Transposon-Bibliothek mit 6000 Klonen sicherlich etwas zu gering, um das komplette Genom abzudecken.

Da unter den ersten ca. 50 analysierten Zellulose-negativen Transposon-Insertionsmutanten mit *yhjL* (*bcsC*) und *yhjN* (*bcsB*) stets die gleichen Gene betroffen waren und die Insertionsstellen bis auf wenige Ausnahmen identisch waren, wurde die Untersuchung solcher Klone nicht weiter verfolgt. In Anbetracht der o. g. Arbeit von [Da Re & Ghigo \(2006\)](#) wäre jedoch möglicherweise im Zuge einer ausgedehnteren Betrachtung ebenfalls das dort beschriebene YedQ als ein die Zellulosesynthese regulierendes Protein identifiziert worden. So blieb es lediglich beim Beweis der praktischen Realisierbarkeit, mit der Transposon-Mutagenese entsprechende Gene, die für den *rdar*-Morphotyp von Wichtigkeit sind, ausfindig zu machen. Der erwartete KR-negative Phänotyp konnte dabei nicht gefunden werden. Allerdings wurden einige andere Mutanten isoliert, deren Phänotyp nicht dem des Wildtyps entsprach. Die in diesen unterbrochenen Gene konnten nicht direkt mit einer Veränderung der Koloniemorphologie in Zusammenhang gebracht werden.

Einige in ihrer Morphologie veränderten Klone besitzen Insertionen in Genen, die für Proteine verschiedener Wege des Kohlenstofftransports oder -metabolismus sowie des Eisentransports kodieren. So spiegeln sich z. B. sowohl Mutationen in der L-Laktat-Permease (*lldP*, Klon 1F3) als auch in der fermentativen D-Laktat-Dehydrogenase (*ldhA*, Klon 47G9) in nicht-wildtypischen Kolonieformen wider. Diese waren insgesamt größer (*ldhA*) und/oder stärker strukturiert, was eigentlich auf eine erhöhte Zelluloseproduktion hinweist, allerdings war die *lldP*-Mutante bei 37 °C nicht in der Lage, Calcofluor zu binden, produzierte also keine Zellulose. Ein Bezug zwischen Phänotyp und unterbrochenen Genen bzw. Stoffwechselwegen kann hier nicht hergestellt werden, da bislang keine Vernetzung von Laktat-Metabolismus und Zellulosesynthese beschrieben ist. Zudem ist die Energiegewinnung via Substratkettenphosphorylierung unter aeroben Bedingungen für die Zellen nicht von Bedeutung, so dass diese Mutationen eigentlich keine Auswirkungen haben sollten.

Auch das in Klon 3B8 unterbrochene Gen *caiT*, das einen L-Carnitin-Transporter kodiert, spielt hauptsächlich unter anaeroben Bedingungen eine Rolle, wo ein Abbauprodukt des L-Carnitin als externer Elektronenakzeptor dienen kann ([Buchet et al., 1998](#)). Die Verbindung zum *rdar*-Morphotyp, bei dem die Mutation bei 30 °C zu einer veränderten Oberflächenstruktur führt, bleibt auch hier unerkannt.

Eisenaufnahmesysteme sind in den Klonen 13H6 (*tonB*) und 47B2 (*fepE*) durch Transposon-Insertionen betroffen. Die Inaktivierung des Proteins TonB hat eine ernsthafte Wachstumsdefizienz zur Folge, die so bislang noch nicht beschrieben wurde. TonB liefert als membrangebunden

bundenen Protein die Energie, die für die Aufnahme von chelierten Eisen(III)-Verbindungen (Hämin, Aerobactin, Enterobactin, Ferrichrom) via eines TonB-ExbB-ExbD-Komplexes in die Zelle (Braun, 1995). Die Inaktivierung dieses Proteins verhindert die Aufnahme dieser Verbindungen und hat eine reduzierte Virulenz von UPEC CFT073 im Mausmodell zur Folge (Torres *et al.*, 2001). Da *E. coli* Nissle 1917 jedoch über weitere TonB-unabhängige Eisenaufnahmesysteme verfügt (Salmochelin, Yersiniabactin) und im verwendeten Komplexmedium Eisen ohnehin zur Verfügung steht, lässt sich das beobachtete Wachstumsdefizit nicht plausibel erklären. Während die Mutation von *tonB* das Wachstum stark einschränkt, hat die Unterbrechung des Gens *fepE* ungewöhnlich große Kolonien zur Folge. *fepE* findet sich zwar im Enterobactin-Biosynthese- und -Transportcluster, besitzt jedoch keine essentielle Funktion in diesem Eisentransportsystem (Ozenberger *et al.*, 1987; Hong & Payne, 1997). Vielmehr wurde FepE beschrieben als ein Modulator der O-Antigen-Kettenlänge in *S. enterica* Serovar Typhimurium, homolog zu WzzE (Murray *et al.*, 2003), und der veränderte Phänotyp hängt somit eher mit einer Modifikation des LPS zusammen.

Der Einfluss eines veränderten LPS auf den *rdar*-Morphotyp wurde kürzlich für *ddhC*- und *waaG*-Mutanten von *S. enterica* Serovar Typhimurium geschildert. Diese produzierten weniger Curli und mehr Zellulose als der Wildtyp (Anriany *et al.*, 2006). In Klon 15C4 wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls das Gen *waaG* (*rfaG*) durch Transposon-Mutagenese unterbrochen und die Kolonien zeigten auch hier einen nicht-wildtypischen Phänotyp, der zumindest bei 30 °C mit der Kolonief orm der o. g. *Salmonella*-Mutanten übereinstimmt. Die Kolonien sind heller, was auf eingeschränkte Curli-Expression hinweist. Die Zellulosesynthese scheint nicht beeinflusst, ist jedoch mittels CF-Agar nicht zu quantifizieren und könnte ebenso leicht erhöht sein. Eine Temperaturabhängigkeit wurde von Anriany *et al.* (2006) nicht beschrieben, ist jedoch bei Klon 15C4 gegeben, der bei 37 °C keine Zellulosesynthese und eingeschränktes Wachstum aufweist. Es lässt sich also ein deutlicher Einfluss eines modifizierten LPS auf den *rdar*-Morphotyp von *E. coli* Nissle 1917 herleiten, obwohl mit *fepE* ein anderes Gen betroffen ist und teilweise ein deutlicher Unterschied zu den von Anriany *et al.* (2006) vorgestellten Kolonief ormen besteht.

Der Einfluss anderer Oberflächenstrukturen auf Curli- und Zelluloseexpression ist offenbar nur gering. Zwar scheinen Defekte in der Kapsel- und Colansäure-Biosynthese zu einer Einschränkung der Curli-Produktion zu führen, worauf die weniger intensive Rotfärbung der Klone 14H3 (*kfiD*; UDP-Glukose-6-Dehydrogenase) und 18C8 (*ypdI*) hinweist, ansonsten ähneln diese jedoch sehr dem Wildtyp. Bislang ist kein Zusammenhang zwischen beiden Oberflächen-Polysacchariden und dem *rdar*-Morphotyp beschrieben worden und kann auch mittels der hier generierten Mutanten nicht hergestellt werden. Allerdings stellt UDP-Glukose

die Ausgangsverbindung für die Zellulosesynthese dar und die Inaktivierung von *kfiD* führt möglicherweise zu einem Überschuss dieses Zuckers in der Zelle und zu verstärkter Zellulosebildung. Dies könnte die etwas stärkere Strukturierung der *kfiD*-Mutante erklären.

Sehr ungewöhnliche Phänotypen entstanden durch die Inaktivierung der Gene *yaiO* (Klon 14F1) sowie *bdm* (Klon 17H11). Hier zeigten sich jeweils Übergänge vom *rdar*- zum *saw*-Morphotyp, bei dem weder Curli- noch Zellulosesynthese stattfindet. Dieser Übergang ist irreversibel, d. h., er beruht nicht auf einer Art Phasenvariation, wie dies z. B. für die Expression von Antigen 43 (*flu*) in *E. coli* MG1655 und 536 beschrieben wurde (Danese *et al.*, 2000; Beloin *et al.*, 2006). Während YaiO bislang nicht weiter untersucht wurde, stellt Bdm ein Protein dar, das in Biofilmen vermindert exprimiert wird (Prigent-Combaret *et al.*, 1999) sowie in Reaktion auf osmotischen Stress positiv reguliert wird (Francez-Charlot *et al.*, 2005). Hierbei spielt das Rcs-Zweikomponentensystem eine entscheidende Rolle, indem RcsB die Transkription von *bdm* aktiviert. RcsCDB ist an der Regulation von Oberflächenstrukturen wie Kapseln, Flagelle, Membranproteinen und auch Curli-Fimbrien beteiligt. Das System wird u. a. durch Kontakt mit verschiedenen Oberflächen induziert und trägt somit zur Biofilmbildung bei (Prigent-Combaret *et al.*, 1999; Ferrières & Clarke, 2003; Majdalani & Gottesman, 2005). Die Funktion von Bdm bleibt jedoch auch in diesen Untersuchungen unbekannt, so dass es keinen Hinweis auf den Zusammenhang zwischen Deletion des Gens und einem veränderten Phänotyp gibt.

Hinsichtlich eines deutlichen Unterschieds einer Insertionsmutante zum wildtypischen *rdar*-Morphotyp sind die Klone 17C7 und 18C12 sehr interessant, in denen das Gen *yghT* unterbrochen wurde. Diese Mutanten weisen eine eingeschränkte Zellulosesynthese auf, die nicht auf der direkten Inaktivierung eines Gens des *bcs*-Operons beruht. YghT stellt ein putatives ATP-bindendes Protein dar, das eine Nukleosidtriphosphat-Hydrolase-Domäne besitzt und Ähnlichkeiten zur Thymidylat-Kinase (*tmk*) aus *E. coli* aufweist. Dieses Enzym katalysiert die Phosphorylierung von Deoxythymidylat (dTMP) zu Deoxythymidin-Diphosphat und ist das letzte essentielle Enzym in der Biosynthese von Deoxythymidin-Triphosphat (Chaperon, 2006). Eine Funktion für YghT ist hingegen bislang nicht beschrieben. Durch die Kinaseaktivität könnte das Protein jedoch möglicherweise die Phosphorylierung anderer Zellbestandteile katalysieren und dadurch eine regulatorische Wirkung ausüben. Eine eingehendere Untersuchung dieser Transposon-Insertionsmutanten bezüglich des Einflusses von YghT auf die Zellulosesynthese wäre daher von Interesse.

6.1.3 Regulation von Curli- und Zelluloseexpression in *E. coli* Nissle 1917

Betrachtet man die bei der Transposon-Mutagenese erhaltenen Ergebnisse hinsichtlich der Phänotypen der verschiedenen Mutanten auf KR- und CF-Agar, lässt sich konstatieren, dass

es eine Reihe von Faktoren gibt, die Curli- und/oder Zelluloseexpression beeinflussen. Neben den bereits bekannten Genen des *bcs*-Operons (Zellulose) sowie des *csgBA*-Operons (Curli), deren Inaktivierung jeweils den erwarteten Effekt zur Folge hatte, fanden sich hier weitere Gene mit mehr oder weniger starkem Einfluss auf den *rdar*-Morphotyp. Leider konnte in keinem dieser Fälle ein direkter Bezug zu Curli- oder Zellulosesynthese hergestellt werden. Es lässt sich aber festhalten, dass es sich hier zumeist um Gene bekannter oder putativer Oberflächenstrukturen wie Kapsel, Colansäure, LPS oder Fimbrien handelte, die durch Transposon-Insertion unterbrochen wurden. Möglicherweise haben diese Modifikationen die Induktion solcher Zweikomponentensysteme zur Folge, die auf Veränderungen der Zelloberfläche reagieren und u. a. auch die Curlisynthese beeinflussen. Das Rcs-System nimmt beispielsweise solche Veränderungen wahr, stimuliert die Kapselsynthese und reprimiert beide *csg*-Operons (Ferrières & Clarke, 2003; Jubelin *et al.*, 2005; Majdalani & Gottesman, 2005; Vianney *et al.*, 2005) ebenso wie CpxA/CpxR, welches auf Stress der Zellhülle reagiert (Danese & Silhavy, 1998; Dorel *et al.*, 1999).

Die Regulation des *rdar*-Morphotyps in *E. coli* Nissle 1917 scheint in Anbetracht der hier erhaltenen Erkenntnisse komplexer und von mehr Faktoren zumindest indirekt abhängig als bislang beschrieben. Leider gelang es nicht, den postulierten übergeordneten Regulator, dessen Inaktivierung zum kompletten Verlust der Curli- und Zelluloseexpression führt, zu identifizieren. Allerdings wurde mit YghT ein Protein entdeckt, das offenbar die Zellulose-synthese beeinflusst und bisher nicht beschrieben wurde. Die Wirkungsweise dieses Faktors sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein, da dieser sich von bekannten Regulatoren wie CsgD, YaiC und YedQ unterscheidet. Während diese nämlich den Umsatz und die Konzentration von zyklischem di-GMP in der Zelle maßgeblich beeinflussen, besitzt YghT keine GGDEF-, EAL- oder HD-GYP-Domäne, die für die Bildung bzw. den Abbau dieses *Second Messengers* verantwortlich sind (Römling *et al.*, 2005; Ryan *et al.*, 2006) und stellt daher möglicherweise eine neue Art Regulator der Zellulosesynthese dar. Insgesamt scheint die Expression von Curli-Fimbrien und Zellulose einen sehr wichtigen Beitrag zur bakteriellen Fitness zu liefern, da beide Komponenten sehr komplexen, teils globalen Regulationsmechanismen unterliegen. So wird sichergestellt, dass die verschiedenen Schritte der Biofilmbildung koordiniert ablaufen und keine Energie für die Synthese aufwändiger Strukturen unter Bedingungen, unter denen diese nicht benötigt werden, verschwendet wird.

6.2 Analyse des PKS/NRPS-Genclusters

6.2.1 Polyketide und nichtribosomale Peptide in *E. coli*

Während Polyketide und nichtribosomale Peptide in großer Vielfalt als teilweise wichtige bioaktive Substanzen mit u. a. antibiotischer Wirkung bislang vorwiegend in Actinomyceten und Streptomyceten gefunden wurden, sind in *E. coli* beide Substanzklassen von geringerer Bedeutung. Sieht man von den Enzymen der Biosynthese der Fettsäuren ab, die der Polyketidsynthese prinzipiell ähnlich ist, sind die Siderophore Enterobactin und Yersiniabactin die beiden einzigen Vertreter dieser Klassen. Beide Verbindungen komplexieren Eisen(III)-Verbindungen im umgebenden Medium und werden über spezielle Rezeptoren wieder von der Zelle aufgenommen. Während es Hinweise auf eine Beteiligung der Enterobactinrezeptoren FepA und Iron an der Virulenz von UPEC und *Salmonella* gibt (Rabsch *et al.*, 2003; Russo *et al.*, 2002), ist Yersiniabactin als ein eindeutiger Virulenzfaktor in *Yersinia* und einigen *E. coli*-Stämmen identifiziert worden (Carniel, 1999; Schubert *et al.*, 2002).

Enterobactin (Abb. 5 F) ist ein nichtribosomales Peptid und wird aus den Substraten 2,3-Dihydroxybenzoesäure und L-Serin synthetisiert. Jeweils drei dieser Ausgangsverbindungen werden zu einem Zyklotrimer miteinander verbunden. An dieser Reaktion sind die Produkte von mindestens fünf Genen (*entB*, *entC*, *entD*, *entE*, *entF*) beteiligt, die diesen mehrschrittigen Prozess katalysieren. Die endgültige Verbindung komplexiert Eisen(III) über die sechs Sauerstoffatome der drei diphenolischen Gruppen (Ehmann *et al.*, 2000; Crosa & Walsh, 2002). Yersiniabactin stellt ein Hybrid aus Polyketid und nichtribosomalem Peptid dar, und die Enzyme für die Synthese sind auf der sog. HPI (*High Pathogenicity Island*) kodiert, die neben *Yersinia* auch in zahlreichen *E. coli*-Stämmen gefunden wird (Clermont *et al.*, 2001; Schubert *et al.*, 1998). Die Synthese besteht aus den vier Proteinen YbtE, HMWP1, HMWP2 und YbtU mit insgesamt 17 Domänen, die Salicylat, drei Cystein- und einen Malonylrest zum funktionellen Eisenchelator zusammensetzen (Abb. 48; Miller *et al.*, 2002; Pfeifer *et al.*, 2003). Beiden Systemen ist gemeinsam, dass sie einzelne Bausteine in genau festgelegter Abfolge binden, aktivieren und zu einer wachsenden Molekülkette verestern, die schließlich in einem letzten Schritt von einer Thioesterase zyklisiert und freigesetzt wird. Diese Modularität ist ein entscheidendes Merkmal von Polyketidsynthasen und nichtribosomalen Peptidsynthetasen.

6.2.2 Aufbau und Domänenstruktur der PKS- und NRPS aus *E. coli*

Die meisten der bislang untersuchten Polyketidsynthasen/nichtribosomalen Peptidsynthetasen bestehen meist aus wenigen, jedoch außerordentlich großen Proteinen. Die Anzahl der Proteine und Domänen kann dabei jedoch stark variieren. Während beispielsweise Yersinia-

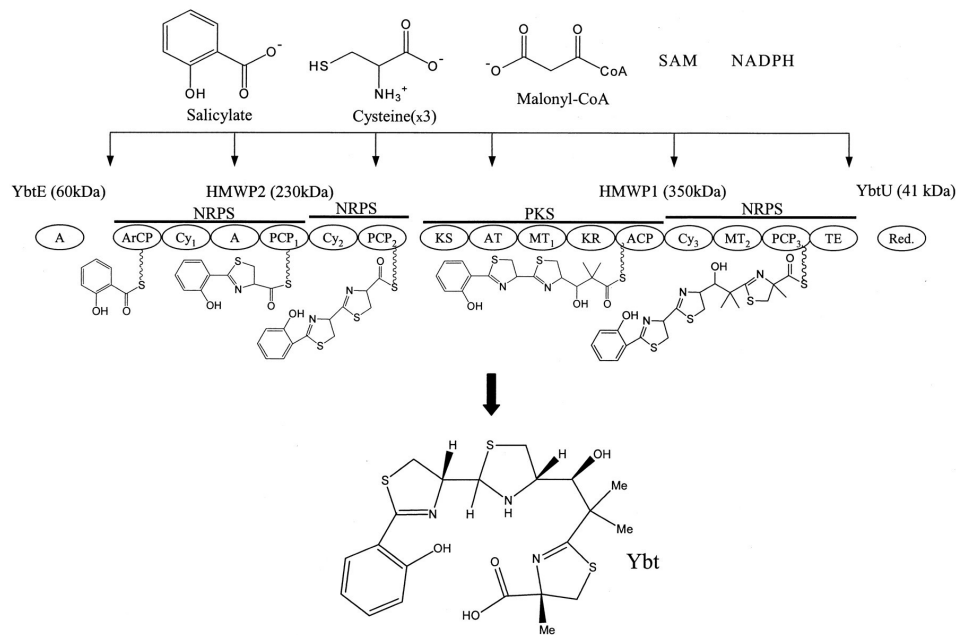


Abb. 48: Schematische Darstellung der Biosynthese von Yersiniabactin. ArCP: *Aryl Carrier Protein*; A: Adenylierung; PCP: *Peptidyl Carrier Protein*; Cy: Zyklisierung; KS: Ketosynthase; ACP: *Acyl Carrier Protein*; AT: Acyltransferase; KR: NADPH-abhängige Keto-reduktase; MT: Methyltransferase; SAM: *S*-Adenosylmethionin; TE: Thioesterase. Aus: Pfeifer *et al.* (2003).

bactin von einem relativ kleinen System (vier Enzyme mit 17 Domänen, s. o.) synthetisiert wird, bestehen beispielsweise die Enzymkomplexe für die Bildung von Iturin und Mycosubtilin (Fungizide aus *Bacillus subtilis*) aus jeweils nur drei Proteinen, aber 33 bzw. 32 Domänen (Tsuge *et al.*, 2001; Duitman *et al.*, 1999). Das Mycrocystin-Operon aus *Microcystis aeruginosa* besteht aus sechs Genen, die für Enzyme mit insgesamt 44 Domänen kodieren (Nishizawa *et al.*, 2000), das antitumoral wirksame Bleomycin aus *Streptomyces verticillus* ATCC15003 wird von acht Proteinen mit 35 Domänen gebildet (Du *et al.*, 2000). Die Anordnung der einzelnen Domänen in diesen Proteinen spiegelt in den meisten Fällen die Reihenfolge der für die Synthese des Endprodukts notwendigen Reaktionen direkt wider (Kolinearität).

Auch das hier beschriebene Gencluster kodiert für ein hybrides System aus modularen Polyketidsynthasen und nichtribosomalen Peptidsynthetasen. Allerdings ist die Anzahl der an der Synthese der bioaktiven Substanz beteiligten Genprodukte ungewöhnlich hoch und die Abfolge der kodierten Domänen ähnelt keinem der bislang beschriebenen PKS/NRPS-Systeme. Während die Gesamtzahl der für die einzelnen Reaktionen verantwortlichen Domänen mit 38 vergleichbar ist mit den o. g. Daten anderer NRPS/PKS, verteilen sich diese

jedoch auf elf mitunter sehr kleiner Proteine. Es lassen sich folglich nur wenige Genprodukte finden, die, wie für andere Systeme typisch, mehrere PKS- oder NRPS-Module tragen. Weiterhin scheint die Reihenfolge der kodierten Domänen nicht mit der tatsächlichen Abfolge der chemischen Reaktionen, die zum Endprodukt führen, zu korrelieren. So findet sich in der Ketoacylsynthetase-Domäne von ClbI ein Serin-Rest anstelle eines konservierten Cysteins. Dies ist normalerweise typisch für PKS-Module, die eine „Starter-Einheit“ bilden (J. Piel, Bonn, persönlich). ClbI befindet sich jedoch in der Mitte der *asnW*-Insel, so dass das erste Enzym dieser Synthese-Folge an sehr ungewöhnlicher Position kodiert ist.

Des Weiteren fehlen in einigen PKS-Modulen (ClbC, ClbE, ClbO) die zu erwartenden Acyltransferase-Domänen. Zumindest finden sich in diesen Proteinen keine Homologien zu solchen Abschnitten. Möglicherweise komplementiert jedoch das Genprodukt von *clbG* (putative Malonyl-CoA Transacylase) diese fehlende Funktion.

Auch die Abfolge der Domänen von ClbH (A C A PCP) ist ungewöhnlich und bislang nicht beschrieben. Allerdings ist in der zweiten Adenylierungs-Domäne ein stark konservierter Asparagin-Rest durch ein Serin ersetzt (J. Piel, Bonn, persönlich), was zur Inaktivierung der Funktion führen könnte. Dies könnte durch die erste Adenylierungs-Domäne kompensiert werden, was deren Auftreten an dieser „falschen“ Position erklären könnte.

Eine Domäne an „falscher“ Stelle findet sich auch in ClbB. Hier wäre die übliche Anordnung der Domänen (KS AT DH ER KR ACP), wobei die Dehydrogenase-Funktion (DH) das Substrat für die folgende Enoylreduktase-Reaktion bereitstellt (J. Piel, Bonn, persönlich). In ClbB ist die Abfolge der Domänen jedoch (C A PCP KS AT KR ER ACP), es fehlt also die notwendige Dehydrogenase-Aktivität. Daher ist zu vermuten, dass auch die ER-Domäne ein nicht-funktionelles Relikt darstellt.

6.2.3 Bedeutung der zusätzlichen Genprodukte im PKS/NRPS-Cluster

In dem auf der *asnW*-Insel identifizierten PKS/NRPS-Cluster finden sich neben Genen, die für Polyketidsynthetasen/nichtribosomalen Peptidsynthetase kodieren, noch acht weitere ORFs, die an der Synthese der aktiven Komponente beteiligt sind. Während einige dieser zusätzlichen modifizierenden Enzyme in den meisten bislang beschriebenen PKS/NRPS-System vorkommen und dort essentielle Reaktionen katalysieren, stellen die übrigen Genprodukte Besonderheiten dar, deren Funktion sich nicht auf den ersten Blick erschließt.

Bei den „konventionellen“ editierenden Enzymen handelt es sich um eine Thioesterase (ClbQ) und eine Phosphopantetheinyl-Transferase (ClbA). Thioesterasen finden sich häufig als letztes Modul der Synthese-Maschinerie von Polyketiden und nichtribosomalen Peptiden. Sie sind verantwortlich für die Freisetzung des endgültigen Produktes und führen entweder

zu einem linearen Peptid-Polyketid oder zu einer makrozyklischen Verbindung (Finking & Marahiel, 2004). Die hier vorliegende Thioesterase ClbQ ist im Gegensatz zu der üblichen Anordnung nicht als Modul in eine der Megasyntasen eingebettet, sondern stellt ein eigenständiges Protein dar. Die Position am Ende des Genclusters ist jedoch in Übereinstimmung mit bekannten PKS/NRPS-Systemen.

Phosphopantetheinyl-Transferasen sorgen für eine post-translationale Modifikation von Polyketidsynthasen und nichtribosomalen Peptidsynthetasen, indem sie einen 4'-Phosphopantethein-Rest von Coenzym A auf einen konservierten Serin-Rest im entsprechenden Protein übertragen. Diese Reaktion ist die Voraussetzung für die Biosynthese vieler Naturprodukte. Sie wandelt die inaktiven *apo*-Formen der ACP- bzw. PCP-Domänen in ihre aktiven *holo*-Formen um, so dass diese über die endständige Sulfhydryl-Gruppe acyliert werden können (Lambalot *et al.*, 1996; Walsh *et al.*, 1997).

Der Phosphopantetheinyl-Transferase ClbA in *E. coli* geht das LuxR-ähnliche Protein ClbR voran. Dieses Protein besitzt das DNA-bindende HTH-(*Helix-Turn-Helix*)-Motiv des bakteriellen *Response Regulator* LuxR, welcher in *Vibrio fischeri* am *Quorum Sensing* beteiligt ist und die Transkription des *lux*-Operons aktiviert (Lazdunski *et al.*, 2004; Miyamoto *et al.*, 2000). ClbR fehlt allerdings die Domäne zur Bindung des *Autoinducer*, also der Teil, der für die Signalerkennung verantwortlich ist. Daher ist die Funktion von ClbR bislang nicht geklärt. Das Protein scheint jedoch in engem Zusammenhang mit ClbA zu stehen, da die Komplementation der CPE-negativen Mutante von *E. coli* Nissle 1917 lediglich mit dem Konstrukt, das sowohl *clbR* als auch *clbA* beinhaltet, möglich war (5.2.8). Ob ein regulatorischer Effekt von ClbR auf ClbA oder gar auf andere Gene der *asnW*-Insel ausgeht, wird in einem späteren Abschnitt diskutiert (6.2.6).

Die Gene *clbD* und *clbF* kodieren für Enzyme mit Ähnlichkeiten zu einer 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase bzw. einer Acyl-CoA-Dehydrogenase. Diese sind am Fettsäuremetabolismus beteiligt und katalysieren Redox-Reaktionen bei der Verlängerung von Fettsäureketten. Da die Polyketidsynthese der Fettsäuresynthese prinzipiell ähnelt, sind die durch ClbD und ClbF zur Verfügung gestellten Reaktionen nicht ungewöhnlich im Rahmen der Modifikation von Acyl-Substraten. Dennoch ist das Auftreten dieser beiden Dehydrogenasen als einzelne, eigenständige Proteine untypisch für bislang beschriebene System, wo entsprechende Domänen für gewöhnlich in die Megasyntasen eingebettet sind (Staunton & Weissman, 2001). Möglicherweise kompensieren die Aktivitäten von ClbD und ClbF einen Verlust von KR-Domänen, der während der Evolution der Bakterien stattgefunden hat. Denkbar ist auch, dass erst der Erwerb beider Enzyme die Synthese einer aktiven Komponente ermöglicht hat und so einen evolutionären Vorteil darstellte.

Auch die Amidase-Domäne von ClbL ist offenbar für eine notwendige Modifikation des Peptid-Polyketids verantwortlich. Die katalysierte Reaktion, die Abspaltung einer Aminogruppe, wurde allerdings in PKS/NRPS-Genclustern bisher nicht beschrieben und stellt somit eine Besonderheit dieses Systems dar. Die Funktion, die das Enzym bei der Synthese einnimmt, lässt sich bislang nicht ermitteln.

Das Protein ClbP hat Ähnlichkeiten zu FmtA aus *Bacillus cereus* ATCC 10987 (Komatsuzawa *et al.*, 1999) und besitzt eine AmpC-ähnliche β -Lactamase-Domäne. β -Lactamasen katalysieren die Hydrolyse des Lactam-Ringes in β -Lactam-Antibiotika wie Penicillin und Cephalosporin und deaktivieren diese Verbindungen (Wilke *et al.*, 2005). Inwiefern das Protein von Bedeutung für die Bildung eines aktiven Peptid-Polyketids ist, ist unklar. Möglicherweise spielt die für β -Lactamasen beschriebene Esterase-Aktivität hier eher eine Rolle (Knott-Hunziker *et al.*, 1982) und trägt eventuell wie ClbQ zur Freisetzung der nativen Komponente vom Enzymkomplex bei.

Das einzige Genprodukt, das keine essentielle Funktion bei der Synthese des Peptid-Polyketids besitzt, ist ClbM (Nougayrède *et al.*, 2006). Hierbei handelt es sich um eine putative Efflux-Pumpe vom MATE-Typ mit Ähnlichkeiten zu NorM. Diese Transporter sind am Export von Antibiotika und anderen zytotoxischen Komponenten beteiligt (Brown *et al.*, 1999). Möglicherweise ist ClbM für den Transport des Peptid-Polyketids aus der Zelle heraus verantwortlich, kann aber durch andere, chromosomal kodierte Efflux-Pumpen komplementiert werden.

6.2.4 Putative Struktur der bioaktiven Komponente

Aus den oben genannten Erkenntnissen lassen sich Rückschlüsse auf eine mögliche Struktur der von den auf der *asnW*-Insel kodierten Polyketidsynthasen und nichtribosomalen Peptidsynthetasen gebildeten Substanz ziehen. Wenn man die o. g. Unregelmäßigkeiten in der Domänenstruktur der verschiedenen Synthasen einbezieht und ansonsten von einer üblichen kolinearen Abfolge der möglichen Reaktionen ausgeht, ergibt sich die in Abb. 49 dargestellte Verbindung. Diese Struktur berücksichtigt die für die Adenylierungs-Domänen vorhergesagten Aminosäure-Substrate sowie mögliche, durch die restlichen Domänen verursachten Umlagerungen. Besonders zu erwähnen ist hier der von ClbK durch Zyklisierung und Oxidation aus einem Cystein gebildete Thiazol-Ring. Thiazol-Ringe stellen charakteristische Pharmakophore vieler Naturstoffe dar und bilden beispielsweise als DNA-interkalierende Strukturen den funktionellen Bestandteil von Bleomycin (Chen & Stubbe, 2005).

Bislang konnte dieses hypothetische Molekül nicht experimentell verifiziert werden, da eine für chemische Analysen notwendige Anreicherung und Isolierung der Substanz nicht

erfolgreich war. Auch berücksichtigt diese Berechnung weder eine durch die Thioesterase-Aktivität von ClbQ mögliche Zyklisierung der Verbindung noch andere Acylreste als Malonyl. Aus diesem Grund finden sich die beiden unbekanntesten Reste R_1 und R_2 an den Enden des Moleküls.

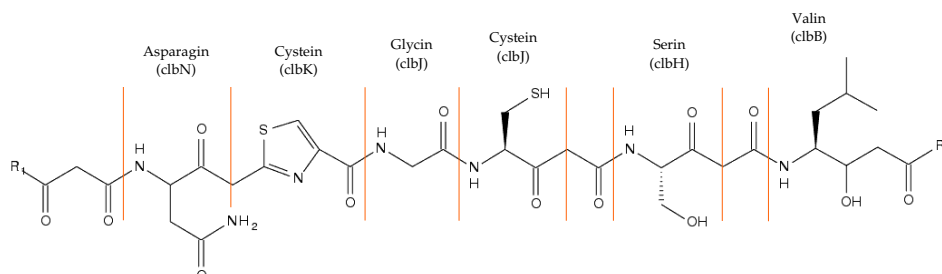


Abb. 49: Putative Struktur des Peptid-Polyketid. Die Verbindung wurde unter Berücksichtigung der vorhergesagten Domänen von J. Piel, Bonn, vorgeschlagen. Die Aminosäure-Substrate der Adenylierungs-Domänen der beteiligten Proteine sind zur Veranschaulichung durch vertikale Linien im Molekül abgegrenzt.

6.2.5 Expression und Induktion der PKS/NRPS-Gene

Kontaktabhängigkeit der Expression In dieser Arbeit konnte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von E. Oswald, Toulouse, gezeigt werden, dass Epithelzellen nach zeitlich begrenzter Exposition mit bestimmten *E. coli*-Stämmen eine morphologische Veränderung (Megalozytose) aufwiesen. Während die molekularen Mechanismen, die zu dem sog. zytopathischen Effekt (CPE) führen, weitestgehend aufgeklärt werden konnten und auf DNA-Doppelstrangbrüche und der entsprechenden zellulären Antwort darauf zurückzuführen sind (Nougayrède *et al.*, 2006), ist der Übertragungsweg des Zytotoxins bislang unbekannt.

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen wurde eine strikte Kontaktabhängigkeit des zytopathischen Effekts festgestellt. Es gelang nicht, diesen zu erreichen, indem Bakterienlysate, hitzeinaktivierte Bakterien oder Kulturüberstände eingesetzt wurden. Auch die räumliche Trennung von Epithelzellen und Bakterien im Transwell-System führte nicht zur Megalozytose. Somit wird offenbar kein oder nur eine sehr geringe Menge Peptid-Polyketid in das umgebende Medium abgegeben. Möglicherweise besitzt die Komponente eine sehr kurze Halbwertszeit und zerfällt, nachdem sie ins Medium gelangt ist. Auch eine besondere Affinität der Substanz zu bestimmten Oberflächen wie Glas oder Polystyrol könnte erklären, warum nur direkter Zellkontakt ihre Übertragung möglich macht. Letztendlich wäre auch ein aktiver Transport des Peptid-Polyketids vom Bakterium in die eukaryotische Zelle denk-

bar. Allerdings sind bislang keine spezialisierten Transportsysteme für Polyketide oder nichtribosomale Peptide identifiziert worden und wenig ist über Sekretionsmechanismen dieser Verbindungen bekannt. Lediglich für das membranassoziiertes Polyketid PDIM aus *Mycobacterium tuberculosis* ist ein Protein beschrieben worden, dass für den Transport dieser Substanz notwendig ist (Jain & Cox, 2005). Die Beobachtung, dass ausgerechnet die im PKS/NRPS-Gencluster kodierte Efflux-Pumpe ClbM das einzig erlässliche Genprodukt für die Aktivität von des Toxins ist, spricht dafür, dass die Sekretion über „konventionelle“ Transportmechanismen verläuft.

(Über-)Expression von Polyketiden und nichtribosomalen Peptiden Die komplexe Struktur und Stereochemie von Polyketiden und nichtribosomalen Peptiden begrenzt die effiziente synthetische Produktion dieser biologisch äußerst aktiven Substanzen. Daher ist die biotechnologische Herstellung durch bakterielle Fermentation von großer ökonomischer Bedeutung. Allerdings muss in den meisten Fällen auf eine heterologe Expression der Biosynthesegene in dazu geeigneten Wirten zurückgegriffen werden, da der Großteil der interessanten Substanzen von nicht-kultivierbaren Mikroorganismen stammt. Der Transfer in einen geeigneten Wirt ist ein kritischer Schritt für die Expression von Naturprodukten, da dieser einiger Voraussetzungen erfüllen muss. Zunächst muss der heterologe Wirt die zellulären Eigenschaften besitzen, die gewünschten Proteine in einer aktiven Form zu produzieren. Dabei spielen Codon-Gebrauch und spezielle regulatorische Elemente sowie die Stabilität der fremden mRNA eine Rolle (Gustafsson *et al.*, 2004; Wenzel *et al.*, 2005). Eine besondere Schwierigkeit stellt die Notwendigkeit zur post-translationalen Modifikation von Polyketidsynthasen und nichtribosomalen Peptidsynthetasen durch Phosphopantetheinylierung dar (Lambalot *et al.*, 1996). Zudem sind viele dieser Verbindungen aus ungewöhnlichen Bausteinen zusammengesetzt, die ein heterologer Wirt oft nicht zur Verfügung stellen kann (Dayem *et al.*, 2002; Kinoshita *et al.*, 2003).

Im Falle des auf der *asnW*-Insel kodierten Peptid-Polyketids treten diese Probleme nicht auf, da das betreffende Gencluster bereits einem für biotechnologische Zwecke besonders geeigneten Wirt entstammt. Darüber hinaus konnten die Gene bereits kloniert und heterolog in einem *E. coli*-Laborstamm exprimiert werden. Allerdings wird durch die Kontaktabhängigkeit der Expression eine Anreicherung und Isolierung der Komponente für chemische Analysen und die Aufklärung ihrer Struktur erheblich erschwert und gelang bis zum heutigen Zeitpunkt auch mit aufwändigen biotechnologischen Methoden (in Kooperation mit A. Brakhage, Jena) nicht. Auch die Induktion der möglichen „Schlüsselgene“ *clbA*, *clbB*, *clbQ* und *clbR* durch Austausch ihrer natürlichen Promotoren gegen konstitutiv aktive oder durch in-

duzierte Expression der klonierten Gene konnte die Kontaktabhängigkeit des zytopathischen Effektes nicht überwinden. Daher stellt sich die Frage, ob eine Überexpression des Zytotoxins überhaupt erreichbar ist. Sieht man von den oben dargelegten möglichen Mechanismen für eine Kontaktabhängigkeit ab, die vermutlich mit mehr oder weniger großem molekularbiologischem Aufwand überwunden werden könnten, stellt möglicherweise die Toxizität des Peptid-Polyketids ein erhebliches Problem dar, wenn es in größeren Mengen synthetisiert wird. Prinzipiell ist es möglich, dass die DNA-Schädigung, die das Toxin hervorruft, auch in Bakterien erzeugt werden können. Daher sind sowohl eine straff regulierte Synthese als auch ein schneller Transport der aktiven Komponente notwendig, um den Wirt nicht zu schädigen. Da keine offensichtlichen Resistenzmechanismen gegen das Toxin im PKS/NRPS-Gencluster kodiert liegen, scheint daher eine Überexpression ohne besondere Anpassung des Wirts nicht möglich. Eventuell könnte dazu der putative Transporter ClbP überexprimiert werden, um einen schnelleren Efflux der Substanz zu erreichen. Auch die Anreicherung einer möglichen nicht-toxischen Vorstufe des Peptid-Polyketids, die dann durch induzierbare Expression der Thioesterase oder ein rekombinantes Protein aktiviert wird, ist eine denkbare Prozedur.

Momentan wird versucht, das PKS/NRPS-Gencluster heterolog auch in anderen Wirtsorganismen als *E. coli* zu exprimieren. Dazu wird mit *Pseudomonas putida* ein Organismus mit ähnlichem GC-Gehalt zu *E. coli* untersucht (G. Krumbholz, Würzburg, persönlich). Davon verspricht man sich eine kontaktunabhängige sowie eine stärkere Expression des Peptid-Polyketids.

6.2.6 Mögliche regulatorische Mechanismen bei der PK/NRP-Synthese

Neben den dargestellten mechanistischen Erklärungen für die Kontaktabhängigkeit sind auch regulatorische Vorgänge denkbar. Es sind viele bakterielle Systeme bekannt, die durch Kontakt mit Epithelzellen induziert werden. Die meisten stehen in Zusammenhang mit Adhäsion oder Sekretion. So ist beispielsweise die Aktivität des Typ-III-Sekretionssystems, das in verschiedenen Gram-negativen Bakterien wie *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella* oder *Yersinia* eine Reihe von Effektoren transloziert, kontaktabhängig (Hueck, 1998; Lee, 1997). In *Neisseria meningitidis* ist ein kontaktabhängiges Promotorelement (CREN) identifiziert worden, das u. a. für die Induktion *pilC*, einem Pilus-assoziierten Gen, verantwortlich ist (Deghmane *et al.*, 2000). Auch die Expression von Toxingenen kann durch Zellkontakt stimuliert werden. So wurde zum Beispiel beschrieben, dass das Gen *stn* in *Salmonella enterica*, das für ein Enterotoxin kodiert, nur bei Kontakt mit Epithelzellen transkribiert wird (Dinjus *et al.*, 1997).

Induktion der Transkription der *clb*-Gene durch Zellkontakt Welche der möglichen Faktoren für die Kontaktabhängigkeit der Aktivität des Peptid-Polyketids verantwortlich sind, ist bisher unbekannt. Es konnte nicht festgestellt werden, dass in Kokultur mit HeLa-Zellen die Transkription der Gene *clbA*, *clbB*, *clbQ* oder *clbR*, für die Luziferase-Fusionen hergestellt wurden, auf irgendeine Weise verstärkt wurde. Dies deutet darauf hin, dass entweder andere Gene der *asnW*-Insel reguliert werden bzw. regulierend wirken oder dass tatsächlich eine konstitutive Expression des Zytotoxins stattfindet. Besonders die Gene *clbI* bis *clbQ* im *downstream*-Bereich der Insel werden sehr schwach exprimiert und könnten daher durch Zellkontakt stimuliert werden, um so eine ausgewogene Menge an für die Synthese notwendigen Proteinen zu gewährleisten. Auch die überdurchschnittliche Größe des putativen Transkripts dieser Gene spricht für diese Vermutung, da die Produktion einer solch großen mRNA sehr energieaufwändig ist und daher differentiell reguliert sein sollte. Allerdings konnte bei der Transkriptionsanalyse dieser Gene mittels RT-PCR kein Unterschied zwischen Kokultur und Standardkultur festgestellt werden, was jedoch auf die zu geringe Sensitivität der Methode zurückzuführen sein könnte. Da von einer kontaktabhängigen Induktion nur die Bakterien in unmittelbarer Nähe der Epithelzellen betroffen sein sollten, und diese nur einen Bruchteil der Gesamtzahl an Bakterien ausmachen, könnte deren spezifisches Signal in der RT-PCR möglicherweise gar nicht detektiert werden. Die endgültige Aufklärung der Operonstruktur könnte weitere Hinweise auf die Regulation der Transkription geben, steht aber bislang noch aus.

Repetitive Sequenzen zwischen *clbB* und *clbR* Der Bereich der *asnW*-Insel zwischen den Genen *clbB* und *clbR* stellt den einzigen variablen Abschnitt im ansonsten konservierten PKS/NRPS-Gencluster dar. Hier finden sich 8-bp-Wiederholungssequenzen, die sich in verschiedenen Stämmen unterschiedlich oft wiederholen. Kurze (< 200 bp) repetitive DNA-Sequenzen von unterschiedlichen Längen wurden zuerst in *E. coli* und *Salmonella typhimurium* als sog. REP- und ERIC-Elemente beschrieben und ähnliche Strukturen sind bislang in vielen bakteriellen Spezies identifiziert worden (Lupski & Weinstock, 1992). Zumeist handelt es sich um nicht-kodierende, intercistronische Sequenzen, die über das gesamte Genom verteilt sein können. Die Funktion der meisten dieser Element ist bisher unbekannt, sie werden jedoch genutzt, um Mikroorganismen zu identifizieren und zu typisieren (Versalovic & Lupski, 2002).

Kurze, sich wiederholende DNA-Sequenzen können jedoch auch regulatorische Wirkung sowohl auf Transkription als auch auf Translation verschiedener Gene haben (van Belkum *et al.*, 1998). So können sie u. A. Veränderungen der Primärstruktur von Proteinen und Phasenvariationen bewirken. In *Haemophilus influenzae* verändert beispielsweise eine unterschiedlich

Anzahl von CAAT-Sequenz-Wiederholungen in den Genen *lic1-lic3* die Primärstruktur der an der LPS-Synthese beteiligten Genprodukte (Hood *et al.*, 1996) und TA-Wiederholungen zwischen zwei divergenten Fimbrien-Operons bewirken eine phasenvariable Expression (van Ham *et al.*, 1993). In *Neisseria gonorrhoeae* wurden bis zu 31 Gene identifiziert, deren Phasenvariation auf Wiederholungssequenzen zurückzuführen ist (Saunders *et al.*, 2000).

Möglicherweise spielt daher der im Rahmen dieser Arbeit in verschiedenen *E. coli*-Stämmen identifizierte variable Abschnitt eine regulatorische Rolle im PKS/NRPS-Gencluster. Diese Annahme beruht auf der Tatsache, dass in dieser Region zwischen *clbB* und *clbR* die Transkriptionsrichtung wechselt und auf die Wiederholungssequenzen mit *clbR* ein möglicher Regulator folgt. Das *clbR* folgende Gen *clbA* kodiert für eine putative Phosphopantetheinyl-Transferase, welche essentiell für die Aktivität der Polyketidsynthasen und nichtribosomalen Peptidsynthetasen ist.

In der anderen Richtung liegt das erste große hybride PKS/NRPS-Protein, dessen Transkription ebenfalls durch die repetitiven Sequenzen betroffen sein könnte. Es ist nicht zu vermuten, dass diese Wiederholungssequenzen entscheidend für die generelle Ausprägung der Peptid-Polyketid-Synthese sind, da sich die Anzahl der in verschiedenen Stämmen wiederkehrenden *Repeats* nicht mit einem CPE-positiven oder -negativen Phänotyp korrelieren lässt. Vielmehr könnten sich unterschiedlich lange intergenische Sequenzen auf die Menge des produzierten Zytotoxins auswirken, ähnlich der Fimbrienexpression in *N. gonorrhoeae*, die abhängig von der Anzahl der TA-Wiederholungen nicht nur ein- und ausgeschaltet werden kann, sondern auch in der Expressionsstärke variiert (van Belkum *et al.*, 1998; van Ham *et al.*, 1993). Da ein quantitativer Unterschied in der Expression mit dem hier verwendeten Versuchsaufbau nicht nachgewiesen werden kann, steht eine Überprüfung dieser Hypothese weiterhin aus.

Regulation über *clbR* und/oder *clbA* Die exponierte Lage der Gene *clbR* und *clbA* in unmittelbarer Nähe möglicher regulatorisch wirksamer Wiederholungssequenzen wurde oben bereits diskutiert. Dass jedoch diese beiden Gene möglicherweise auch einem weiteren Regulationsmechanismus unterliegen, zeigte sich bei der Untersuchung einer CPE-negativen Mutante von *E. coli* Nissle 1917. Dieser Klon konnte mit einem *clbRA*-Konstrukt über ein Plasmid-System komplementiert werden. Da beide Gene, sowie deren unmittelbare Umgebung in der Mutante offenbar intakt waren, kann spekuliert werden, dass dieser Stamm einen Defekt in einem Gen außerhalb des Genclusters besitzt, der sich auf die Expression von *clbR* und/oder *clbA* auswirkt. Die Komplementation gelang nur mit beiden Genen zusammen, wobei die Überprüfung von *clbR* alleine noch aussteht.

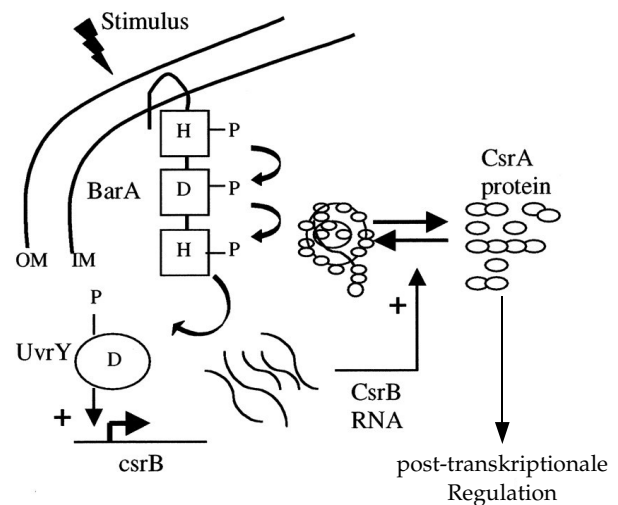
Die Ermittlung der Transkriptionseinheiten des PKS/NRPS-Genclusters deutet darauf hin, dass *clbR* und *clbA* zusammen transkribiert werden. Jedoch zeigten sich in der CPE-negativen Mutante sowohl bei der RT-PCR als auch bei den Luziferase-Messungen unterschiedlich starke Transkriptionsniveaus beider Gene. Allerdings widersprachen sich die Ergebnisse beider Versuchsansätze. Während mittels Luziferase-Fusion eine via RT-PCR festgestellte geringere *clbA*-Transkription einer Zwei-Stunden-Kultur (Zeitpunkt der RNA-Isolation) der Mutante mehr oder weniger nachvollzogen werden konnte, waren die Ergebnisse für *clbR* genau entgegengesetzt. Hier wies die Mutante nur 20 % der Luziferaseaktivität des Wildtyps auf, während die Signale der RT-PCR für das Gen identisch waren. Eine Erklärung für dieses Phänomen konnte bisher nicht gefunden werden, könnte aber mit unterschiedlichen Stabilitäten der RNAs zusammenhängen. Dennoch deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass beide Gene jeweils einen eigenen Promotor besitzen und möglicherweise unabhängig voneinander reguliert werden.

Kohlenstoff-Stoffwechsel – die Rolle von UvrY Die Expression eines aktiven Peptid-Polyketids ist abhängig von der Ausprägung des Zweikomponentensystems BarA/UvrY. Experimente in der Arbeitsgruppe von E. Oswald, Toulouse, zeigten, dass die Deletion von *uvrY* den zytopathischen Effekt aufhebt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass UPEC 536 als natürliche *uvrY*-Mutante keinen zytopathischen Effekt auf HeLa-Zellen ausübt, dieser Phänotyp jedoch durch Einbringen des *uvrY*-Gens hervorgerufen werden kann. Dies ist der erste definitive Hinweis auf einen globalen Regulationsmechanismus, der außerhalb des PKS/NRPS-Genclusters liegt.

UvrY ist der *response regulator* des BarA/UvrY-Zweikomponentensystems (Pernestig *et al.*, 2001). Dieses ist beteiligt an der Kontrolle des zentralen Kohlenstoffmetabolismus der Zelle über das CsrA/CsrB-System, welches hauptsächlich für den Wechsel zwischen Glykolyse und Glukoneogenese verantwortlich ist. Dabei aktiviert UvrY direkt die Transkription der regulatorischen RNAs CsrB und CsrC. Diese wiederum binden den Transkriptionsregulator CsrA und verhindert dessen Bindung an mRNA-Moleküle, so dass diese translatiert werden können (Abb. 50; Pernestig *et al.*, 2003; Weilbacher *et al.*, 2003). Unter anderem reprimiert CsrA die Glykogen-Biosynthese sowie die Glukoneogenese und aktiviert glykolytische Enzyme (Romeo, 1998). Die Umweltbedingungen und die physiologischen Signale, auf die BarA/UvrY reagiert, sind weitestgehend unbekannt. Kürzlich wurde jedoch gezeigt, dass niedrige pH-Werte (< 5,5) die Aktivierung des BarA/UvrY-Systems verhindern (Mondragón *et al.*, 2006).

Einige dieser Erkenntnisse lassen sich auf Beobachtungen, die im Rahmen dieser Arbeit ge-

Abb. 50: Modell der post-transkriptionalen Regulation der Genexpression durch BarA/UvrY und CsrA/CsrB. Die Stimulation von BarA durch ein unbekanntes Signal führt zur Phosphorylierung von UvrY. Phosphoryliertes UvrY aktiviert die Transkription von *csrB*, welches freies CsrA-Protein abfängt. Zwischen 16 und 32 % der CsrA-Moleküle liegen an CsrB gebunden vor. OM: äußere Membran; IM: innere Membran. Modifiziert nach: [Pernestig et al. \(2003\)](#).



macht wurden, übertragen. Die für die Überwachung der Genexpression in Kokultur mit Epithelzellen angefertigten Luziferase-Reportergen-Fusionen wurden zunächst in verschiedenen Medien und unter verschiedenen Bedingungen charakterisiert. Dabei wurden die höchsten Expressionsraten aller untersuchten Gene in der späten logarithmischen und frühen stationären Phase gemessen. Zu diesen Zeitpunkten ist die Expression von *barA*, *uvrY*, *csrB* und *csrC* bzw. *csrA* in Schüttelkulturen jeweils am höchsten ([Suzuki et al., 2002](#)). Das bedeutet, dass offenbar eine direkte Korrelation zwischen der Ausprägung des CsrA/CsrBC- und BarA/UvrY-Systems und der Expression der PKS/NRPS-Gene bestehen könnte. Sämtliche mittels Reportergen-Messungen ermittelten Expressionsraten hängen möglicherweise hauptsächlich mit den momentan vorhandenen Kohlenstoffquellen im Medium zusammen. Daraus ergibt sich die Frage, ob ein durch BarA/UvrY bzw. CsrA/CsrBC reguliertes Enzym selbst einen regulierenden Einfluss auf die *clb*-Gene ausübt.

Wenn in einer Kultur die Glukosekonzentration durch den bakteriellen Umsatz sinkt, beginnen die Bakterien, zunächst die durch den glykolytischen Abbau der Glukose im Medium angereicherten Produkte wie Acetat und α -Ketosäuren zu verwerten ([Tao et al., 1999](#)). Sind auch diese aufgebraucht, stützt sich der Metabolismus auf Kohlenstoffquellen lysierter Bakterien, hauptsächlich auf Aminosäuren ([Zinser & Kolter, 1999](#)). Möglicherweise werden beim Übergang der PKS und NRPS exprimierenden *E. coli*-Stämme in die stationäre Phase die Substrate für die Synthese des Peptid-Polyketids für die Aufrechterhaltung des zellulären Grundumsatzes verbraucht. Da Acetat verstärkt verstoffwechselt wird, steht vermutlich weniger Acetyl-CoA und in der Folge weniger Malonyl-CoA als Bausteine für die Polyketidsynthesen zur Verfügung. Aminosäuren aus dem Medium werden neben der Nutzung als

Kohlenstoffquellen wahrscheinlich vermehrt in essentielle Proteine eingebaut und werden nicht für die nichtribosomale Peptidsynthese verwendet.

Diese physiologischen Stadien, in der sich eine Kultur befinden kann und der damit verbundenen regulatorischen Einfluss von BarA/UvrY bzw. CsrA/CsrBC spielt sicherlich eine Rolle bei der Menge des produzierten Zytotoxins. Dadurch lässt sich jedoch nicht erklären, warum die natürliche *uvrY*-Mutante *E. coli* 536 offenbar überhaupt kein Peptid-Polyketid synthetisiert und erst nach Komplementation mit dem Gen wieder dazu in der Lage ist. Da der Organismus auch ohne UvrY lebensfähig ist, ist das System nicht essentiell und die zellulären Vorgänge bleiben offenbar unbeeinflusst. Möglicherweise kompensieren andere Mechanismen den Ausfall von UvrY. Da somit jedoch offenbar sowohl alle benötigten Enzyme aktiv sind und alle Metabolite zur Verfügung stehen, wäre bei einem indirekten Einfluss auch die Synthese des Peptid-Polyketids möglich. Daher besteht auch die Möglichkeit, dass CsrA direkt eines oder mehrere Gene des PKS/NRPS-Genclusters beeinflusst und diese post-transkriptional reguliert. Eine *uvrY*-Mutante zeigt keine Transkription von *csrB* mehr (Suzuki *et al.*, 2002). Weil CsrC eine schwächere Bindung an CsrA zeigt (Weilbacher *et al.*, 2003), steigt vermutlich die Konzentration an CsrA in der Zelle an und bleibt an den Ziel-mRNAs gebunden. Diese werden dadurch degradiert oder können nicht translatiert werden. Ein solcher Einfluss von CsrA auf die Gene des PKS/NRPS-Genclusters würde erklären, warum deren Transkription in einer *uvrY*-Mutante nicht beeinträchtigt ist (Daten nicht präsentiert). Eine *in silico* Suche nach der von Dubey *et al.* (2005) identifizierten Konsensus-Sequenz für die CsrA-Bindung an mRNAs könnte Aufschluss darüber geben, ob post-translationale Regulation des PKS/NRPS-Genclusters stattfindet.

Die teilweise auftretenden Diskrepanzen zwischen den Stärken der Luziferase-Expression und Signalen der RT-PCR sind möglicherweise auf unterschiedliche Stabilitäten der mRNAs zurückzuführen. Diese kann regulatorischen Einfluss auf die Expression verschiedener Gene und Operons haben und ist von verschiedenen Faktoren abhängig (Grunberg-Manago, 1999). Besonders auffällig sind diese Unterschiede im Vergleich verschiedener Wachstumsbedingungen. So waren bei stehender Anzucht die mittels Reporterfusionen bestimmten Expressionsraten höher als unter Schütteln, während die Transkriptmengenbestimmung per RT-PCR ein umgekehrtes Bild lieferte. Dies könnte mit einer verminderten mRNA-Stabilität bei geringen Wachstumsraten zusammenhängen, wie dies beispielsweise für die *ompA*-mRNA beschrieben wurde (Nilsson *et al.*, 1984).

6.2.7 Biologische Funktion des Peptid-Polyketids *in vivo*

Die Verbreitung des PKS/NRPS-Genclusters in *E. coli* beschränkt sich auf extraintestinal Pathogene (ExPEC), der phylogenetischen Gruppe B2 sowie nichtpathogene Stuhlisolate. Bei intestinalen Pathogenen ist die *asnW*-Insel nicht anzutreffen. Diese Ergebnisse lassen Spekulationen sowohl auf die Evolution als auch auf die Funktion dieser genomischen Insel zu.

Das Auftreten des Genclusters in nur einer distinkten phylogenetischen Gruppe (Abb. 57) lässt darauf schließen, dass diese klonal weitergegeben wird. Obwohl es sich hier offensichtlich um ein durch horizontalen Transfer erworbenes genetisches Element handelt, das alle Merkmale eines solchen trägt (Hacker *et al.*, 1997), scheint diese Art der Weiterverbreitung seit der evolutionären Abspaltung der B2-Gruppe nicht mehr aufzutreten. Ansonsten wäre das PKS/NRPS-Gencluster auch in anderen phylogenetischen Gruppen anzutreffen, da die horizontale Weitergabe von genetischem Material weitestgehend ungerichtet stattfindet. In der Tat konnte mit den etablierten Methoden zur Überprüfung der Stabilität von genomischen Inseln in *E. coli* 536 nur eine sehr geringe Deletionsrate ermittelt werden, was darauf hindeutet, dass diese Insel unter natürlichen Bedingungen nicht exzidiert (Hochhut *et al.*, 2006; Middendorf *et al.*, 2004).

Damit stellt sich die Frage nach einem möglichen selektiven Vorteil, den die Propagation der *asnW*-Insel darstellen könnte. Da bakterielle Genome dazu tendieren, überflüssige Information zu eliminieren, d. h., nicht benötigte DNA-Abschnitte, die keinen selektiven Vorteil vermitteln, zu verlieren, kann horizontal erworbenen Elementen zumeist eine distinkte Funktion zugeordnet werden (Dobrindt *et al.*, 2004). Dieses Prinzip ist besonders bei Pathogenitätsinseln festzustellen. Auf diesen DNA-Abschnitten finden sich vermehrt Faktoren, die die Besiedelung und Infektion des Wirtes bzw. bestimmter Gewebe ermöglichen oder unterstützen. Somit bieten PAIs unter gewissen Umständen einen selektiven Vorteil und bleiben daher im Genom erhalten.

Aus diesem Grund liegt es nahe, dass auch die Synthese des Peptid-Polyketids, d. h., die Propagation der *asnW*-Insel eine Funktion darstellt, die unter gewissen Voraussetzungen für die Bakterien von Nutzen ist. Die Tatsache, dass das PKS/NRPS-Gencluster nur in ExPEC und kommensalen Darmisolaten zu finden ist, lässt vermuten, dass diese besonders von der Aktivität des Zytotoxins profitieren. Daher bleibt die Frage, ob die Expression des Peptid-Polyketids für ExPEC als Pathogenitätsfaktor anzusehen ist oder als allgemeiner Fitnessfaktor im angestammten Habitat, dem Darm.

Zur Zeit werden mit den *E. coli*-Stämmen IHE3034 und Nissle 1917 *in vivo*-Studien im Mausmodell durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Expression des Peptid-Polyketids einen Kolonisierungsvorteil im Mäusedarm verleiht. Bislang deutet jedoch wenig darauf

hin, dass hierbei der Wildtyp einer *asnW*-Insel-Deletionsmutante überlegen ist (T. Ölschläger, Würzburg, persönlich). Da das Darmepithel in der Regel von einer dicken Mukusschicht bekleidet ist, besteht kein direkter Kontakt zwischen Bakterien und Epithelzellen. Daher ist eine direkte Wirkung des Peptid-Polyketids auf die Zellen der Mucosa eher unwahrscheinlich. Sollten PKS/NRPS-positive Bakterien dennoch die Krypten des Darmepithels erreichen, könnte die Wirkung des Zytotoxins etwa auf intestinale Stammzellen die Erneuerung des Darmepithels verlangsamen. Dies könnte zu einer längeren Persistenz der Mikroorganismen im Darm führen (Nougayrède *et al.*, 2006). Auch eine Modulation des intestinalen Immunsystems durch das Peptid-Polyketid ist denkbar, da die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen als universelles Prinzip sämtliche Zellen betrifft. Für *E. coli* Nissle 1917 konnte kürzlich eine Translokation aus dem Darmlumen in *Peyer's Patches* und mesenterische Lymphknoten nachgewiesen werden (Schultz *et al.*, 2005), was diese Theorie untermauern könnte.

Möglicherweise stellt die Expression des Peptid-Polyketids auf Grund der oben dargestellten modulatorischen Einflüsse für ExPEC einen Pathogenitätsmechanismus dar. Der im Urogenitaltrakt oder Gehirn gegebene direkte Kontakt zu Epithelzellen könnte auch dort zu einer erfolgreicheren und längeren Kolonisierung der Gewebe führen. *In vivo*-Experimente, die die Virulenz von PKS/NRPS-negativen Mutanten im Vergleich zu ihrem Wildtyp untersuchen, stehen bislang noch aus.

Die durch das Peptid-Polyketid induzierten Veränderungen des eukaryotischen Zellzyklus' könnten neben ihrem Beitrag zur bakteriellen Fitness bzw. Virulenz auch an der Entstehung von Krebs beteiligt sein. Viele bakterielle Toxine haben ein karzinogenes Potential, das auf der Modulation des Zellzyklus' oder der Induktion von Inflammation, Apoptose oder DNA-Schädigungen beruht (Tab. 12). Ein direkter Zusammenhang zwischen Toxinproduktion und Krebsentstehung konnte bislang jedoch nicht gesichert nachgewiesen werden (Lax, 2005). Auch die normale intestinale Mikroflora spielt möglicherweise eine Rolle bei der Entstehung von Dickdarmkrebs (Hope *et al.*, 2005). Ein genauer Mechanismus ist auch hierfür nicht bekannt. Jedoch stellen Stämme der phylogenetischen Gruppe B2 die dominierenden kommensalen *E. coli*-Stämme in den Industrienationen dar (Nowrouzian *et al.*, 2005), wo auch Dickdarmkrebs vermehrt auftritt (Ilyas *et al.*, 1999). Da PKS/NRPS-positive *E. coli*-Stämme ausschließlich in der B2-Gruppe gefunden wurden, besteht möglicherweise eine Korrelation beider Phänomene.

Tab. 12: Potentielle karzinogene Eigenschaften bakterieller Toxine. Modifiziert nach Lax (2005).

Bakterium	Toxin	Aktivität	Karzinogenes Potential
<i>Helicobacter pylori</i>	CagA	Bindung an SHP2 und c-Met	Zellausbreitung
<i>Helicobacter pylori</i>	cag-PAI	?	Inflammation
<i>Helicobacter pylori</i>	VacA	Vakuolisierung, ?	Apoptose, Inflammation
<i>Citrobacter rodentium</i>	MAP	?	Proliferation
<i>Escherichia coli</i>	Cif	?	Zellzyklus
<i>Escherichia coli</i>	CNF1	Modifikation von Rho, Rac, Cdc42	Inflammation, Zellzyklus
<i>Escherichia coli</i>	CDT	DNase	DNA-Schädigung, Zellzyklus
<i>Campylobacter</i> spp.	CDT	DNase	DNA-Schädigung, Zellzyklus
<i>Shigella dysenteriae</i>	CDT	DNase	DNA-Schädigung, Zellzyklus
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	CDT	DNase	DNA-Schädigung, Zellzyklus
<i>Haemophilus ducreyi</i>	CDT	DNase	DNA-Schädigung, Zellzyklus
<i>Helicobacter hepaticus</i>	CDT	DNase	DNA-Schädigung, Zellzyklus
<i>Salmonella enterica</i>	CdtB	DNase	DNA-Schädigung, Zellzyklus
<i>Pasteurella multocida</i>	PMT	Modifikation von Gq ?	Proliferation
<i>Bacteroides fragilis</i>	BFT	Spaltung von E-Cadherin	Proliferation

BFT: *B. fragilis* Toxin; Cag: Cytotoxin Associated Gene; CDT: Cytolethal Distending Toxin; CdtB: Untereinheit von CDT; Cif: Cycle Inhibiting Factor; CNF: Cytotoxic Necrotizing Factor; MAP: Mitochondrial Associated Protein.

6.3 Beitrag von *rdar*-Morphotyp und PK/NPR-Synthese zur Fitness von *E. coli* Nissle 1917

Das sehr hohe Kolonisierungspotential von *E. coli* Nissle 1917 repräsentiert höchstwahrscheinlich einen wichtigen Aspekt des probiotischen Naturells des Stammes und wird durch verschiedene Komponenten positiv beeinflusst. Zum einen stellt die außergewöhnlich hohe Anzahl an Eisenaufnahmesystemen sicherlich in der Konkurrenz um diese knappe Ressource einen erhöhten Selektionsvorteil dar. Zudem kann die Expression zweier Mikroazine die Anzahl konkurrierender Bakterien in unmittelbarer Nähe vermindern.

Der Beitrag beider in dieser Arbeit untersuchten Faktoren – *rdar*-Morphotyp und PK/NRP-Synthese – zur Fitness des Stammes *E. coli* Nissle 1917 beruht wahrscheinlich auf einer Erhöhung des Kolonisierungspotentials des Stammes im menschlichen Darm. Die Ausprägung des *rdar*-Morphotyps stellt eine Art Biofilm dar. Dies kann in der Regel die Kolonisierung eines Wirtes verbessern. Die dichte Anordnung in einer extrazellulären Matrix vermindert z. B. die Exposition der Zellen gegenüber dem Wirts-Immunsystem oder gegenüber Antibiotika. Dass *E. coli* Nissle 1917 in der Lage ist, diese Strukturen auch bei 37 °C zu bilden, könnte sich als Selektionsvorteil gegenüber *rdar*-negativen Isolaten erweisen. Bislang konnten *in vivo* jedoch keine größeren Aggregate des Stammes an der Mukosa oder im Darmlumen nachgewiesen werden (T. Ölschläger, Würzburg, persönlich).

Für den kommensalen *E. coli*-Stamm TOB1 wurde beschrieben, dass Zellulose und Curli-Fimbrien die Adhärenz, Internalisierung und IL-8-Produktion in HT-29-Zellen beeinflussen. Zudem kann Flagellin mit Curli-Fimbrien interagieren, wodurch die IL-8-Produktion gedämpft wird (Wang *et al.*, 2006). Möglicherweise tragen also solche durch den *rdar*-Morphotyp vermittelten Mechanismen zu einer antagonistischen Wirkung von *E. coli* Nissle 1917 bei.

Auch die Expression des untersuchten Peptid-Polyketids könnte durch eine Verlangsamung der Erneuerung des Darmepithels und die Modulation von Immunzellen die Kolonisationsfähigkeit des Stammes erhöhen. Auch ist eine Wirkung der Substanz auf andere Mikroorganismen weiterhin nicht auszuschließen. Dies könnte neben der Ausprägung von Mikrozininen, die gegen einige *Enterobacteriaceae* aktiv sind (Patzner *et al.*, 2003), weitere konkurrierende Bakterien verdrängen.

6.4 Fazit und Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zu *rdar*-Morphotyp und PK/NRP-Synthese von *E. coli* Nissle 1917 dienen als Grundlage für zukünftige Untersuchungen dieser Eigenschaften. Zwar kann über deren Beitrag zur Fitness des Stammes weiterhin nur spekuliert werden, aber ihre weitere Erforschung verspricht tiefere Einblicke in den Zusammenhang zwischen der Lebensweise eines Bakteriums und den unterschiedlichen Funktionen, die solche Faktoren besitzen können.

Im Fall des *rdar*-Morphotyps wurde ein übergeordneter Regulator vermutet, dessen Inaktivierung einen Kongorot-negativen Phänotyp zur Folge hat, wie dieser bei Spontanmutanten beobachtet wurde. Mittels Transposon-Mutagenese konnte in einer Sammlung von ca. 6000 Mutanten dieser gewünschte Klon jedoch nicht identifiziert werden, wohl aber einige Gene, von denen bislang nicht bekannt war, dass sie den *rdar*-Morphotyp beeinflussen. Daher

sind zukünftig zwei Aspekte von Interesse. Erstens steht weiterhin die Aufklärung der Ursache für einen spontan auftretenden KR-negativen Phänotyp aus. Nach den hier gewonnenen Erkenntnissen ist dafür eine erneute Transposon-Mutagenese nicht die Methode der Wahl. Möglicherweise kann eine vergleichende Transkriptom-Analyse von Wildtyp und Mutante Aufschluss über relevante deregulierte Gene geben. Zweitens könnte die weitere Analyse der generierten nicht-wildtypischen Phänotypen neue Einblicke in die Ausprägung und Regulation von biofilmähnlichen Strukturen geben.

Die Untersuchung des PKS/NRPS-Genclusters steht auch nach den hier gewonnenen Erkenntnissen erst am Beginn. Neben weiteren grundlegenden Analysen, wie der Aufklärung der Operonstruktur, den Transkriptionsstartpunkten der einzelnen ORFs und des Transportmechanismus, sind besonders regulatorische Mechanismen, die die Expression des hybriden nichtribosomalen Peptid-Polyketids beeinflussen, von großem Interesse. Hier sind vor allem das Zweikomponentensystem BarA/UvrY bzw. die regulatorischen RNAs CsrA/CsrB vielversprechende Untersuchungsobjekte, da diese ein außerhalb der *asnW*-Insel liegendes, globales Regulationssystem darstellen, das Einfluss auf die Synthese des Zytotoxins haben. Wahrscheinlich wird dieser nur indirekt über die vorhandenen Substrate für die Synthese des Peptid-Polyketids ausgeübt, eine direkte Bindung von CsrA an eine oder mehrere PKS/NRPS-RNAs ist jedoch nicht ausgeschlossen und sollte untersucht werden. Dies könnte gleichzeitig Aufschluss über Bedingungen erhöhter PK/NRP-Synthese geben, was wiederum eine Voraussetzung für die Überexpression und Isolation der Verbindung darstellt. Letzteres bleibt weiterhin vorrangiges Ziel, um Struktur und biologische Aktivität der Komponente aufklären zu können. Dies wäre Bedingung, um Einsatzmöglichkeiten der Verbindung bewerten zu können.

7 Literaturverzeichnis

- Altenhoefer, A., Oswald, S., Sonnenborn, U., Enders, C., Schulze, J., Hacker, J., & Oelschlaeger, T. A. (2004) The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol* **40**:223–229.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**:403–410.
- Amikam, D. & Galperin, M. Y. (2006) Pilz domain is part of the bacterial c-di-gmp binding protein. *Bioinformatics* **22**:3–6.
- Anriany, Y., Sahu, S. N., Wessels, K. R., McCann, L. M., & Joseph, S. W. (2006) Alteration of the rugose phenotype in *waaG* and *ddlC* mutants of *Salmonella enterica* serovar typhimurium dt104 is associated with inverse production of curli and cellulose. *Appl Environ Microbiol* **72**:5002–5012.
- Bach, S., de Almeida, A., & Carniel, E. (2000) The *Yersinia* high-pathogenicity island is present in different members of the family *Enterobacteriaceae*. *FEMS Microbiol Lett* **183**:289–294.
- Beloin, C., Michaelis, K., Lindner, K., Landini, P., Hacker, J., Ghigo, J.-M., & Dobrindt, U. (2006) The transcriptional antiterminator RfaH represses biofilm formation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**:1316–1331.
- Berger, H., Hacker, J., Juarez, A., Hughes, C., & Goebel, W. (1982) Cloning of the chromosomal determinants encoding hemolysin production and mannose-resistant hemagglutination in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **152**:1241–1247.
- Bian, Z., Brauner, A., Li, Y., & 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., 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., & Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**:1453–1474.
- Blum, G., Marre, R., & Hacker, J. (1995) Properties of *Escherichia coli* strains of serotype O6. *Infection* **23**:234–236.
- Blum, G., Ott, M., Lischewski, A., Ritter, A., Imrich, H., Tschäpe, H., & Hacker, J. (1994) Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. *Infect Immun* **62**:606–614.
- Bokranz, W., Wang, X., Tschäpe, H., & Römling, U. (2005) Expression of cellulose and curli fimbriae by *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract. *J Med Microbiol* **54**:1171–1182.
- Branda, S. S., Vik, S., Friedman, L., & Kolter, R. (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* **13**:20–26.
- Braun, V. (1995) Energy-coupled transport and signal transduction through the gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS Microbiol Rev* **16**:295–307.
- Brombacher, E., Dorel, C., Zehnder, A. J. B., & Landini, P. (2003) The curli biosynthesis regulator CsgD coordinates the expression of both positive and negative determinants for biofilm formation in *Escherichia coli*. *Microbiology* **149**:2847–2857.
- Brown, M. H., Paulsen, I. T., & Skurray, R. A. (1999) The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. *Mol Microbiol* **31**:394–395.
- Brown, P. K., Dozois, C. M., Nickerson, C. A., Zuppardo, A., Terlonge, J., & Curtiss, R. (2001) MlrA, a novel regulator of curli (AgF) and extracellular matrix synthesis by *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **41**:349–363.

- Brzuszkiewicz, E., Brüggemann, H., Liesegang, H., Emmerth, M., Ölschläger, T., Nagy, G., Albermann, K., Wagner, C., Buchrieser, C., Emödy, L., Gottschalk, G., Hacker, J., & Dobrindt, U. (2006) How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:12879–12884.
- Buchet, A., Eichler, K., & Mandrand-Berthelot, M. A. (1998) Regulation of the carnitine pathway in *Escherichia coli*: investigation of the *cai-fix* divergent promoter region. *J Bacteriol* **180**:2599–2608.
- Campbell, A. M. (1992) Chromosomal insertion sites for phages and plasmids. *J Bacteriol* **174**:7495–7499.
- Canchaya, C., Fournous, G., & Brüssow, H. (2004) The impact of prophages on bacterial chromosomes. *Mol Microbiol* **53**:9–18.
- Cane, D. E. & Walsh, C. T. (1999) The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* **6**:R319–R325.
- Cane, D. E., Walsh, C. T., & Khosla, C. (1998) Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations. *Science* **282**:63–68.
- Carniel, E. (1999) The *Yersinia* high-pathogenicity island. *Int Microbiol* **2**:161–167.
- Carniel, E., Guilvout, I., & Prentice, M. (1996) Characterization of a large chromosomal 'high-pathogenicity island' in biotype 1b *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **178**:6743–6751.
- Carver, T. J., Rutherford, K. M., Berriman, M., Rajandream, M.-A., Barrell, B. G., & Parkhill, J. (2005) ACT: the Artemis Comparison Tool. *Bioinformatics* **21**:3422–3423.
- Chaperon, D.-N. (2006) Construction and complementation of in-frame deletions of the essential *Escherichia coli* thymidylate kinase gene. *Appl Environ Microbiol* **72**:1288–1294.
- Chen, J. & Stubbe, J. (2005) Bleomycins: towards better therapeutics. *Nat Rev Cancer* **5**:102–112.
- Cherepanov, P. P. & Wackernagel, W. (1995) Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**:9–14.
- Chuang, S. E., Daniels, D. L., & Blattner, F. R. (1993) Global regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**:2026–2036.
- Chung, C. T., Niemela, S. L., & Miller, R. H. (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:2172–2175.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2001) The *Yersinia* high-pathogenicity island is highly predominant in virulence-associated phylogenetic groups of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **196**:153–157.
- Cookson, A. L., Cooley, W. A., & Woodward, M. J. (2002) The role of type 1 and curli fimbriae of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in adherence to abiotic surfaces. *Int J Med Microbiol* **292**:195–205.
- Crosa, J. H. & Walsh, C. T. (2002) Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**:223–249.
- Da Re, S. & Ghigo, J.-M. (2006) A CsgD-Independent Pathway for Cellulose Production and Biofilm Formation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**:3073–3087.
- Danese, P. N., Pratt, L. A., Dove, S. L., & Kolter, R. (2000) The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol* **37**:424–432.
- Danese, P. N. & Silhavy, T. J. (1998) CpxP, a stress-combative member of the Cpx regulon. *J Bacteriol* **180**:831–839.
- Darling, A. C. E., Mau, B., Blattner, F. R., & Perna, N. T. (2004) Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res* **14**:1394–1403.

- Datsenko, K. A. & 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.
- Dayem, L. C., Carney, J. R., Santi, D. V., Pfeifer, B. A., Khosla, C., & Kealey, J. T. (2002) Metabolic engineering of a methylmalonyl-CoA mutase-epimerase pathway for complex polyketide biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **41**:5193–5201.
- de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U., & Timmis, K. N. (1990) Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J Bacteriol* **172**:6568–6572.
- Deghmane, A. E., Petit, S., Topilko, A., Pereira, Y., Giorgini, D., Larribe, M., & Taha, M. K. (2000) Intimate adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial cells is under the control of the *crgA* gene, a novel LysR-type transcriptional regulator. *EMBO J* **19**:1068–1078.
- Dinjus, U., Hänel, I., Müller, W., Bauerfeind, R., & Helmuth, R. (1997) Detection of the induction of *Salmonella* enterotoxin gene expression by contact with epithelial cells with RT-PCR. *FEMS Microbiol Lett* **146**:175–179.
- Dobrindt, U., Agerer, F., Michaelis, K., Janka, A., Buchrieser, C., Samuelson, M., Svanborg, C., Gottschalk, G., Karch, H., & Hacker, J. (2003) Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays. *J Bacteriol* **185**:1831–1840.
- Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Nagy, G., Schneider, G., Johann, A., Gottschalk, G., & Hacker, J. (2002) Genetic structure and distribution of four pathogenicity islands (PAI I(536) to PAI IV(536)) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect Immun* **70**:6365–6372.
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U., & Hacker, J. (2004) Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **2**:414–424.
- Donnenberg, M. S. & Kaper, J. B. (1991) Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect Immun* **59**:4310–4317.
- Dorel, C., Vidal, O., Prigent-Combaret, C., Vallet, I., & Lejeune, P. (1999) Involvement of the Cpx signal transduction pathway of *E. coli* in biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett* **178**:169–175.
- Du, L., Sánchez, C., Chen, M., Edwards, D. J., & Shen, B. (2000) The biosynthetic gene cluster for the antitumor drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 supporting functional interactions between nonribosomal peptide synthetases and a polyketide synthase. *Chem Biol* **7**:623–642.
- Du, L., Sánchez, C., & Shen, B. (2001) Hybrid peptide-polyketide natural products: biosynthesis and prospects toward engineering novel molecules. *Metab Eng* **3**:78–95.
- Dubey, A. K., Baker, C. S., Romeo, T., & Babitzke, P. (2005) RNA sequence and secondary structure participate in high-affinity CsrA-RNA interaction. *RNA* **11**:1579–1587.
- Duitman, E. H., Hamoen, L. W., Rembold, M., Venema, G., Seitz, H., Saenger, W., Bernhard, F., Reinhardt, R., Schmidt, M., Ullrich, C., Stein, T., Leenders, F., & Vater, J. (1999) The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:13294–13299.
- Edgar, R. C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **32**:1792–1797.
- Ehmann, D. E., Shaw-Reid, C. A., Losey, H. C., & Walsh, C. T. (2000) The EntF and EntE adenylation domains of *Escherichia coli* enterobactin synthetase: sequestration and selectivity in acyl-AMP transfers to thiolation domain cosubstrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:2509–2514.
- Ellermeier, C. D., Janakiraman, A., & Slauch, J. M. (2002) Construction of targeted single copy *lac* fusions using lambda Red and FLP-mediated site-specific recombination in bacteria. *Gene* **290**:153–161.

- Ferrières, L. & Clarke, D. J.** (2003) The RcsC sensor kinase is required for normal biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 and controls the expression of a regulon in response to growth on a solid surface. *Mol Microbiol* **50**:1665–1682.
- Finking, R. & Marahiel, M. A.** (2004) Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annu Rev Microbiol* **58**:453–488.
- Finlay, B. B. & Falkow, S.** (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**:136–169.
- Francez-Charlot, A., Castanié-Cornet, M.-P., Gutierrez, C., & Cam, K.** (2005) Osmotic regulation of the *Escherichia coli* *bdm* (biofilm-dependent modulation) gene by the RcsCDB His-Asp phosphorelay. *J Bacteriol* **187**:3873–3877.
- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., & Toussaint, A.** (2005) Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* **3**:722–732.
- Gebert, B., Fischer, W., Weiss, E., Hoffmann, R., & Haas, R.** (2003) *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science* **301**:1099–1102.
- George, K. M., Chatterjee, D., Gunawardana, G., Welty, D., Hayman, J., Lee, R., & Small, P. L.** (1999) Mycolactone: a polyketide toxin from *Mycobacterium ulcerans* required for virulence. *Science* **283**:854–857.
- Gerstel, U. & Römling, U.** (2003) The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella typhimurium*. *Res Microbiol* **154**:659–667.
- Ghigo, J. M.** (2003) Are there biofilm-specific physiological pathways beyond a reasonable doubt? *Res Microbiol* **154**:1–8.
- Grimberg, J., Maguire, S., & Belluscio, L.** (1989) A simple method for the preparation of plasmid and chromosomal *E. coli* DNA. *Nucleic Acids Res* **17**:8893.
- Grozdanov, L.** (2004) Analysis of the genome organization and fitness traits of non-pathogenic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (O6:K5:H1). Dissertation, Bayerische Julius-Maximilians-Universität, Würzburg.
- Grozdanov, L., Raasch, C., Schulze, J., Sonnenborn, U., Gottschalk, G., Hacker, J., & Dobrindt, U.** (2004) Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J Bacteriol* **186**:5432–5441.
- 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., & 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.
- Grunberg-Manago, M.** (1999) Messenger RNA stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages. *Annu Rev Genet* **33**:193–227.
- Grünwald, J. & Marahiel, M. A.** (2006) Chemoenzymatic and template-directed synthesis of bioactive macrocyclic peptides. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**:121–146.
- Guarner, F. & Malagelada, J.-R.** (2003) Gut flora in health and disease. *Lancet* **361**:512–519.
- Gustafsson, C., Govindarajan, S., & Minshull, J.** (2004) Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol* **22**:346–353.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühldorfer, I., & Tschäpe, H.** (1997) Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol* **23**:1089–1097.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P.** (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* **2**:95–108.

- Hammar, M., Arnqvist, A., Bian, Z., Olsén, A., & Normark, S. (1995) Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **18**:661–670.
- Hejnova, J., Dobrindt, U., Nemcova, R., Rusniok, C., Bomba, A., Frangeul, L., Hacker, J., Glaser, P., Sebo, P., & Buchrieser, C. (2005) Characterization of the flexible genome complement of the commensal *Escherichia coli* strain A0 34/86 (O83 : K24 : H31). *Microbiology* **151**:385–398.
- Heywood, W., Henderson, B., & Nair, S. P. (2005) Cytolethal distending toxin: creating a gap in the cell cycle. *J Med Microbiol* **54**:207–216.
- Higashi, H., Nakaya, A., Tsutsumi, R., Yokoyama, K., Fujii, Y., Ishikawa, S., Higuchi, M., Takahashi, A., Kurashima, Y., Teishikata, Y., Tanaka, S., Azuma, T., & Hatakeyama, M. (2004) Helicobacter pylori CagA induces Ras-independent morphogenetic response through SHP-2 recruitment and activation. *J Biol Chem* **279**:17205–17216.
- Hochhut, B., Wilde, C., Balling, G., Middendorf, B., Dobrindt, U., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., Carniel, E., & Hacker, J. (2006) Role of pathogenicity island-associated integrases in the genome plasticity of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Mol Microbiol* **61**:584–595.
- Hong, M. & Payne, S. M. (1997) Effect of mutations in *Shigella flexneri* chromosomal and plasmid-encoded lipopolysaccharide genes on invasion and serum resistance. *Mol Microbiol* **24**:779–791.
- Hood, D. W., Deadman, M. E., Jennings, M. P., Bisercic, M., Fleischmann, R. D., Venter, J. C., & Moxon, E. R. (1996) DNA repeats identify novel virulence genes in *Haemophilus influenzae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:11121–11125.
- Hope, M. E., Hold, G. L., Kain, R., & El-Omar, E. M. (2005) Sporadic colorectal cancer—role of the commensal microbiota. *FEMS Microbiol Lett* **244**:1–7.
- Hopkins, M. J., Sharp, R., & Macfarlane, G. T. (2002) Variation in human intestinal microbiota with age. *Dig Liver Dis* **34 Suppl 2**:S12–S18.
- Horiguchi, Y. (2001) *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factors and *Bordetella* dermonecrotic toxin: the dermonecrosis-inducing toxins activating Rho small GTPases. *Toxicon* **39**:1619–1627.
- Hueck, C. J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:379–433.
- Husseiny, M. I. & Hensel, M. (2005) Rapid method for the construction of *Salmonella enterica* serovar typhimurium vaccine carrier strains. *Infect Immun* **73**:1598–1605.
- Ilyas, M., Straub, J., Tomlinson, I. P., & Bodmer, W. F. (1999) Genetic pathways in colorectal and other cancers. *Eur J Cancer* **35**:1986–2002.
- Jain, M. & Cox, J. S. (2005) Interaction between polyketide synthase and transporter suggests coupled synthesis and export of virulence lipid in *M. tuberculosis*. *PLoS Pathog* **1**:e2.
- Jubelin, G., Vianney, A., Beloin, C., Ghigo, J.-M., Lazzaroni, J.-C., Lejeune, P., & Dorel, C. (2005) CpxR/OmpR interplay regulates curli gene expression in response to osmolarity in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**:2038–2049.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**:123–140.
- Keseler, I. M., Collado-Vides, J., Gama-Castro, S., Ingraham, J., Paley, S., Paulsen, I. T., Peralta-Gil, M., & Karp, P. D. (2005) EcoCyc: a comprehensive database resource for *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **33**:D334–D337.
- Kinoshita, K., Pfeifer, B. A., Khosla, C., & Cane, D. E. (2003) Precursor-directed polyketide biosynthesis in *Escherichia coli*. *Bioorg Med Chem Lett* **13**:3701–3704.

- Knott-Hunziker, V., Petursson, S., Waley, S. G., Jaurin, B., & Grundström, T.** (1982) The acyl-enzyme mechanism of beta-lactamase action. the evidence for class C Beta-lactamases. *Biochem J* **207**:315–322.
- Komatsuzawa, H., Ohta, K., Labischinski, H., Sugai, M., & Suginaka, H.** (1999) Characterization of *fmtA*, a gene that modulates the expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:2121–2125.
- Korhonen, T. K., Valtonen, M. V., Parkkinen, J., Väisänen-Rhen, V., Finne, J., Orskov, F., Orskov, I., Svenson, S. B., & 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.
- Kruis, W., Fric, P., & Stolte, M.** (2001) The mutaflor study group. Maintenance of remission in ulcerative colitis is equally effective with *Escherichia coli* Nissle 1917 and with standard mesalamine. *Gastroenterology* **120**(Suppl):A127.
- Lambalot, R. H., Gehring, A. M., Flugel, R. S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M. A., Reid, R., Khosla, C., & Walsh, C. T.** (1996) A new enzyme superfamily – the phosphopantetheinyl transferases. *Chem Biol* **3**:923–936.
- Lax, A. J.** (2005) Opinion: Bacterial toxins and cancer—a case to answer? *Nat Rev Microbiol* **3**:343–349.
- Lazdunski, A. M., Ventre, I., & Sturgis, J. N.** (2004) Regulatory circuits and communication in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* **2**:581–592.
- Lee, C. A.** (1997) Type III secretion systems: machines to deliver bacterial proteins into eukaryotic cells? *Trends Microbiol* **5**:148–156.
- Lodinová-Zádníková, R. & Sonnenborn, U.** (1997) Effect of preventive administration of a nonpathogenic *Escherichia coli* strain on the colonization of the intestine with microbial pathogens in newborn infants. *Biol Neonate* **71**:224–232.
- Lupski, J. R. & Weinstock, G. M.** (1992) Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J Bacteriol* **174**:4525–4529.
- Majdalani, N. & Gottesman, S.** (2005) The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. *Annu Rev Microbiol* **59**:379–405.
- Malchow, H., Sonnenborn, U., Greinwald, R., & Körner, A.** (1995) Colonization of adults by a non-pathogenic *Escherichia coli* strain. *Gastroenterology* **108**(Suppl):A869.
- Malchow, H. A.** (1997) Crohn's disease and *Escherichia coli*. a new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease? *J Clin Gastroenterol* **25**:653–658.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., & Sambrook, J.,** *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY., 1989, second edn..
- Marchès, O., Ledger, T. N., Boury, M., Ohara, M., Tu, X., Goffaux, F., Mainil, J., Rosenshine, I., Sugai, M., Rycke, J. D., & Oswald, E.** (2003) Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* deliver a novel effector called Cif, which blocks cell cycle G2/M transition. *Mol Microbiol* **50**:1553–1567.
- Meier, R. & Steuerwald, M.** (2005) Place of probiotics. *Curr Opin Crit Care* **11**:318–325.
- Middendorf, B., Hochhut, B., Leipold, K., Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., & Hacker, J.** (2004) Instability of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* 536. *J Bacteriol* **186**:3086–3096.
- Miller, D. A., Luo, L., Hillson, N., Keating, T. A., & Walsh, C. T.** (2002) Yersiniabactin synthetase: a four-protein assembly line producing the nonribosomal peptide/polyketide hybrid siderophore of *Yersinia pestis*. *Chem Biol* **9**:333–344.
- Miller, V. L. & Mekalanos, J. J.** (1984) Synthesis of cholera toxin is positively regulated at the transcriptional level by *toxR*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**:3471–3475.

- Miyamoto, C. M., Lin, Y. H., & Meighen, E. A. (2000) Control of bioluminescence in *Vibrio fischeri* by the LuxO signal response regulator. *Mol Microbiol* **36**:594–607.
- Mobley, H. L., Green, D. M., Trifillis, A. L., Johnson, D. E., Chippendale, G. R., Lockett, C. V., Jones, B. D., & Warren, J. W. (1990) Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. *Infect Immun* **58**:1281–1289.
- Mondragón, V., Franco, B., Jonas, K., Suzuki, K., Romeo, T., Melefors, O., & Georgellis, D. (2006) pH-dependent activation of the BarA-UvrY two-component system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**:8303–8306.
- Murray, G. L., Attridge, S. R., & Morona, R. (2003) Regulation of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide O antigen chain length is required for virulence; identification of FepE as a second Wzz. *Mol Microbiol* **47**:1395–1406.
- Möllenbrink, M. & Bruckschen, E. (1994) Behandlung der chronischen Obstipation mit physiologischen *Escherichia coli*-Bakterien. *Med Klin (Munich)* **89**:587–593.
- Müller, C. M. (2006) Studies on the Role of Histone-like Proteins in Gene Regulation in Uropathogenic *Escherichia coli* Isolate 536. Dissertation, Bayerische Julius-Maximilians-Universität, Würzburg.
- Nilsson, G., Belasco, J. G., Cohen, S. N., & von Gabain, A. (1984) Growth-rate dependent regulation of mRNA stability in *Escherichia coli*. *Nature* **312**:75–77.
- Nishizawa, T., Ueda, A., Asayama, M., Fujii, K., Harada, K., Ochi, K., & Shirai, M. (2000) Polyketide synthase gene coupled to the peptide synthetase module involved in the biosynthesis of the cyclic heptapeptide microcystin. *J Biochem (Tokyo)* **127**:779–789.
- Nissle, A. (1918) Die antagonistische Behandlung chronischer Darmstörungen mit Kolibakterien. *Med Klein* **2**:29–30.
- Nissle, A. (1925) Weiteres über Grundlagen und Praxis der Mutaflorbehandlung. *DMW* **4**:1809–1813.
- Nougayrède, J.-P., Homburg, S., Taieb, F., Boury, M., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., Buchrieser, C., Hacker, J., Dobrindt, U., & Oswald, E. (2006) *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* **313**:848–851.
- Nougayrède, J.-P., Taieb, F., Rycke, J. D., & Oswald, E. (2005) Cyclomodulins: bacterial effectors that modulate the eukaryotic cell cycle. *Trends Microbiol* **13**:103–110.
- Nowrouzian, F. L., Wold, A. E., & Adlerberth, I. (2005) *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2 have superior capacity to persist in the intestinal microflora of infants. *J Infect Dis* **191**:1078–1083.
- Ochman, H., Lawrence, J. G., & Groisman, E. A. (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**:299–304.
- Ochman, H. & Selander, R. K. (1984) Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J Bacteriol* **157**:690–693.
- Oelschlaeger, T. A., Zhang, D., Schubert, S., Carniel, E., Rabsch, W., Karch, H., & Hacker, J. (2003) The high-pathogenicity island is absent in human pathogens of *Salmonella enterica* subspecies I but present in isolates of subspecies III and VI. *J Bacteriol* **185**:1107–1111.
- Ogata, H., Goto, S., Sato, K., Fujibuchi, W., Bono, H., & Kanehisa, M. (1999) KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res* **27**:29–34.
- Oswald, E., Nougayrède, J.-P., Taieb, F., & Sugai, M. (2005) Bacterial toxins that modulate host cell-cycle progression. *Curr Opin Microbiol* **8**:83–91.
- Ozenberger, B. A., Nahlik, M. S., & McIntosh, M. A. (1987) Genetic organization of multiple *fep* genes encoding ferric enterobactin transport functions in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**:3638–3646.

- Patzer, S. I., Baquero, M. R., Bravo, D., Moreno, F., & Hantke, K.** (2003) The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catechol siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and IroN. *Microbiology* **149**:2557–2570.
- Pernestig, A.-K., Georgellis, D., Romeo, T., Suzuki, K., Tomenius, H., Normark, S., & Melefors, O.** (2003) The *Escherichia coli* BarA-UvrY two-component system is needed for efficient switching between glycolytic and gluconeogenic carbon sources. *J Bacteriol* **185**:843–853.
- Pernestig, A. K., Melefors, O., & Georgellis, D.** (2001) Identification of UvrY as the cognate response regulator for the BarA sensor kinase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **276**:225–231.
- Pfeifer, B. A., Wang, C. C. C., Walsh, C. T., & Khosla, C.** (2003) Biosynthesis of Yersiniabactin, a complex polyketide-nonribosomal peptide, using *Escherichia coli* as a heterologous host. *Appl Environ Microbiol* **69**:6698–6702.
- Potrykus, J. & Wegrzyn, G.** (2004) The *ypdI* gene codes for a putative lipoprotein involved in the synthesis of colanic acid in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **235**:265–271.
- Preston, G. M., Haubold, B., & Rainey, P. B.** (1998) Bacterial genomics and adaptation to life on plants: implications for the evolution of pathogenicity and symbiosis. *Curr Opin Microbiol* **1**:589–597.
- Prigent-Combaret, C., Prensier, G., Thi, T. T. L., Vidal, O., Lejeune, P., & Dorel, C.** (2000) Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environ Microbiol* **2**:450–464.
- Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C., & Lejeune, P.** (1999) Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**:5993–6002.
- Qazi, S. N., Counil, E., Morrissey, J., Rees, C. E., Cockayne, A., Winzer, K., Chan, W. C., Williams, P., & Hill, P. J.** (2001) *agr* expression precedes escape of internalized *Staphylococcus aureus* from the host endosome. *Infect Immun* **69**:7074–7082.
- Rabsch, W., Methner, U., Voigt, W., Tschäpe, H., Reissbrodt, R., & Williams, P. H.** (2003) Role of receptor proteins for enterobactin and 2,3-dihydroxybenzoylserine in virulence of *Salmonella enterica*. *Infect Immun* **71**:6953–6961.
- Rao, S., Hu, S., McHugh, L., Lueders, K., Henry, K., Zhao, Q., Fekete, R. A., Kar, S., Adhya, S., & Hamer, D. H.** (2005) From the Cover: Toward a live microbial microbicide for HIV: Commensal bacteria secreting an HIV fusion inhibitor peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:11993–11998.
- Rembacken, B. J., Snelling, A. M., Hawkey, P. M., Chalmers, D. M., & Axon, A. T.** (1999) Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* **354**:635–639.
- Romeo, T.** (1998) Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol Microbiol* **29**:1321–1330.
- Russo, T. A., McFadden, C. D., Carlino-MacDonald, U. B., Beanan, J. M., Barnard, T. J., & Johnson, J. R.** (2002) IroN functions as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **70**:7156–7160.
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M. A., & Barrell, B.** (2000) Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* **16**:944–945.
- Ryan, R. P., Fouhy, Y., Lucey, J. F., & Dow, J. M.** (2006) Cyclic di-GMP signaling in bacteria: recent advances and new puzzles. *J Bacteriol* **188**:8327–8334.
- Römling, U.** (2002) Molecular biology of cellulose production in bacteria. *Res Microbiol* **153**:205–212.
- Römling, U.** (2005) Characterization of the *rdar* morphotype, a multicellular behaviour in *Enterobacteriaceae*. *Cell Mol Life Sci* **62**:1234–1246.

- Römling, U., Bian, Z., Hammar, M., Sierralta, W. D., & Normark, S. (1998a) Curli fibers are highly conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. *J Bacteriol* **180**:722–731.
- Römling, U., Gomelsky, M., & Galperin, M. Y. (2005) C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Mol Microbiol* **57**:629–639.
- Römling, U., Rohde, M., Olsén, A., Normark, S., & Reinköster, J. (2000) AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways. *Mol Microbiol* **36**:10–23.
- Römling, U., Sierralta, W. D., Eriksson, K., & Normark, S. (1998b) Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Mol Microbiol* **28**:249–264.
- Sartor, R. B. (2004) Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* **126**:1620–1633.
- Sartor, R. B. (2005) Probiotic therapy of intestinal inflammation and infections. *Curr Opin Gastroenterol* **21**:44–50.
- Saunders, N. J., Jeffries, A. C., Peden, J. F., Hood, D. W., Tettelin, H., Rappuoli, R., & Moxon, E. R. (2000) Repeat-associated phase variable genes in the complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* strain MC58. *Mol Microbiol* **37**:207–215.
- Schneider, G., Dobrindt, U., Brüggemann, H., Nagy, G., Janke, B., Blum-Oehler, G., Buchrieser, C., Gottschalk, G., Emödy, L., & Hacker, J. (2004) The pathogenicity island-associated K15 capsule determinant exhibits a novel genetic structure and correlates with virulence in uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect Immun* **72**:5993–6001.
- Schubert, S., Picard, B., Gouriou, S., Heesemann, J., & Denamur, E. (2002) *Yersinia* high-pathogenicity island contributes to virulence in *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Infect Immun* **70**:5335–5337.
- Schubert, S., Rakin, A., Karch, H., Carniel, E., & Heesemann, J. (1998) Prevalence of the “high-pathogenicity island” of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infect Immun* **66**:480–485.
- Schultz, M., Watzl, S., Oelschlaeger, T. A., Rath, H. C., Göttl, C., Lehn, N., Schölmerich, J., & Linde, H.-J. (2005) Green fluorescent protein for detection of the probiotic microorganism *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) in vivo. *J Microbiol Methods* **61**:389–398.
- Schwan, W. R., Beck, M. T., Hultgren, S. J., Pinkner, J., Woolever, N. L., & Larson, T. (2005) Down-regulation of the *kps* region 1 capsular assembly operon following attachment of *Escherichia coli* type 1 fimbriae to D-mannose receptors. *Infect Immun* **73**:1226–1231.
- Shen, B. (2003) Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Curr Opin Chem Biol* **7**:285–295.
- Simon, R., Priefer, U., & Pühler, A. (1982) A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Biotechnology* **1**:784–791.
- Sjöbring, U., Pohl, G., & Olsén, 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.
- Skerra, A. (1994) Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* **151**:131–135.
- Staunton, J. & Weissman, K. J. (2001) Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat Prod Rep* **18**:380–416.

- Stinear, T. P., Mve-Obiang, A., Small, P. L. C., Frigui, W., Pryor, M. J., Brosch, R., Jenkin, G. A., Johnson, P. D. R., Davies, J. K., Lee, R. E., Adusumilli, S., Garnier, T., Haydock, S. F., Leadlay, P. F., & Cole, S. T. (2004) Giant plasmid-encoded polyketide synthases produce the macrolide toxin of *Mycobacterium ulcerans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:1345–1349.
- Sun, J., Gunzer, F., Westendorf, A. M., Buer, J., Scharfe, M., Jarek, M., Gößling, F., Blöcker, H., & Zeng, A.-P. (2005) Genomic peculiarity of coding sequences and metabolic potential of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 inferred from raw genome data. *J Biotechnol* **117**:147–161.
- Suzuki, K., Wang, X., Weilbacher, T., Pernestig, A.-K., Melefors, O., Georgellis, D., Babitzke, P., & Romeo, T. (2002) Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**:5130–5140.
- Tao, H., Bausch, C., Richmond, C., Blattner, F. R., & Conway, T. (1999) Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media. *J Bacteriol* **181**:6425–6440.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**:4673–4680.
- Todar, K., *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. University of Wisconsin Department of Bacteriology, Madison, WI, 2006, <http://www.textbookofbacteriology.net>.
- Torres, A. G., Redford, P., Welch, R. A., & Payne, S. M. (2001) TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. *Infect Immun* **69**:6179–6185.
- Tsuge, K., Akiyama, T., & Shoda, M. (2001) Cloning, sequencing, and characterization of the iturin A operon. *J Bacteriol* **183**:6265–6273.
- Uhlich, G. A., Cooke, P. H., & Solomon, E. B. (2006) Analyses of the red-dry-rough phenotype of an *Escherichia coli* O157:H7 strain and its role in biofilm formation and resistance to antibacterial agents. *Appl Environ Microbiol* **72**:2564–2572.
- Uhlich, G. A., Keen, J. E., & Elder, R. O. (2001) Mutations in the *csgD* promoter associated with variations in curli expression in certain strains of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **67**:2367–2370.
- Ukena, S. N., Westendorf, A. M., Hansen, W., Rohde, M., Geffers, R., Coldewey, S., Suerbaum, S., Buer, J., & Gunzer, F. (2005) The host response to the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917: specific up-regulation of the proinflammatory chemokine MCP-1. *BMC Med Genet* **6**:43.
- van Belkum, A., Scherer, S., van Alphen, L., & Verbrugh, H. (1998) Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:275–293.
- van Ham, S. M., van Alphen, L., Mooi, F. R., & van Putten, J. P. (1993) Phase variation of *H. influenzae* fimbriae: transcriptional control of two divergent genes through a variable combined promoter region. *Cell* **73**:1187–1196.
- van Sluis, C. A., Moolenaar, G. F., & Backendorf, C. (1983) Regulation of the *uvrC* gene of *Escherichia coli* K12: localization and characterization of a damage-inducible promoter. *EMBO J* **2**:2313–2318.
- Versalovic, J. & Lupski, J. R. (2002) Molecular detection and genotyping of pathogens: more accurate and rapid answers. *Trends Microbiol* **10**:S15–S21.
- Vianney, A., Jubelin, G., Renault, S., Dorel, C., Lejeune, P., & Lazzaroni, J. C. (2005) *Escherichia coli* *tol* and *rcs* genes participate in the complex network affecting curli synthesis. *Microbiology* **151**:2487–2497.
- Walsh, C. T., Gehring, A. M., Weinreb, P. H., Quadri, L. E., & Flugel, R. S. (1997) Post-translational modification of polyketide and nonribosomal peptide synthases. *Curr Opin Chem Biol* **1**:309–315.

- Wang, X., Rochon, M., Lamprokostopoulou, A., Lünsdorf, H., Nimtz, M., & Römling, U. (2006) Impact of biofilm matrix components on interaction of commensal *Escherichia coli* with the gastrointestinal cell line ht-29. *Cell Mol Life Sci* **63**:2352–2363.
- Wassarman, K. M., Zhang, A., & Storz, G. (1999) Small RNAs in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol* **7**:37–45.
- Wassenaar, T. M. & Gaastra, W. (2001) Bacterial virulence: can we draw the line? *FEMS Microbiol Lett* **201**:1–7.
- Watnick, P. & Kolter, R. (2000) Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* **182**:2675–2679.
- Wehkamp, J., Harder, J., Wehkamp, K., von Meissner, B. W., Schlee, M., Enders, C., Sonnenborn, U., Nuding, S., Bengmark, S., Fellermann, K., Schröder, J. M., & Stange, E. F. (2004) NF- κ B- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infect Immun* **72**:5750–5758.
- Weilbacher, T., Suzuki, K., Dubey, A. K., Wang, X., Gudapaty, S., Morozov, I., Baker, C. S., Georgellis, D., Babbitzke, P., & Romeo, T. (2003) A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **48**:657–670.
- Welch, R. A., Burland, V., Plunkett, G., Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., Buckles, E. L., Liou, S.-R., Boutin, A., Hackett, J., Stroud, D., Mayhew, G. F., Rose, D. J., Zhou, S., Schwartz, D. C., Perna, N. T., Mobley, H. L. T., Donnenberg, M. S., & Blattner, F. R. (2002) Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:17020–17024.
- Wenzel, S. C., Gross, F., Zhang, Y., Fu, J., Stewart, A. F., & Müller, R. (2005) Heterologous expression of a myxobacterial natural products assembly line in pseudomonads via Red/ET recombineering. *Chem Biol* **12**:349–356.
- Westendorf, A. M., Gunzer, F., Deppenmeier, S., Tapadar, D., Hunger, J. K., Schmidt, M. A., Buer, J., & Bruder, D. (2005) Intestinal immunity of *Escherichia coli* NISSLE 1917: a safe carrier for therapeutic molecules. *FEMS Immunol Med Microbiol* **43**:373–384.
- Wilke, M. S., Lovering, A. L., & Strynadka, N. C. J. (2005) Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr Opin Microbiol* **8**:525–533.
- Yan, F. & Polk, D. B. (2004) Commensal bacteria in the gut: learning who our friends are. *Curr Opin Gastroenterol* **20**:565–571.
- Zinser, E. R. & Kolter, R. (1999) Mutations enhancing amino acid catabolism confer a growth advantage in stationary phase. *J Bacteriol* **181**:5800–5807.
- Zogaj, X., Bokranz, W., Nimtz, M., & Römling, U. (2003) Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family *Enterobacteriaceae* isolated from the human gastrointestinal tract. *Infect Immun* **71**:4151–4158.
- Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., & 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.
- Zywietz, A., Gohla, A., Schmelz, M., Schultz, G., & Offermanns, S. (2001) Pleiotropic effects of *Pasteurella multocida* toxin are mediated by Gq-dependent and -independent mechanisms. involvement of Gq but not G11. *J Biol Chem* **276**:3840–3845.

A Anhang

A.1 Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	Volumen pro Volumen	LB	<i>Lysogen Broth</i>
(w/v)	Masse pro Volumen	M	Molar
°C	Grad Celsius	mA	Milliampere
µg	Mikrogramm	MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
µl	Mikroliter	mg	Milligramm
µm	Mikrometer	min	Minute
A	Adenin	ml	Milliliter
Abb.	Abbildung	mm	Millimeter
Ap	Ampicillin	mM	Millimolar
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>	mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
bp	Basenpaare	MW	Molekulargewicht
BSA	Bovines Serumalbumin	nm	Nanometer
C	Cytosin	NRP	nichtribosomales Peptid
CF	Calcofluor	NRPS	nichtribosomale Peptidsynthetase
Cm	Chloramphenicol	nt	Nukleotide
CPE	<i>Cytopathic Effect</i>	OD _x	Optische Dichte bei x nm
DEPC	Diethylpyrocarbonat	ORF	<i>Open Reading Frame</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
DNase	Desoxyribonuklease	PK	Polyketid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	PKS	Polyketidsynthase
DR	<i>Direct Repeat</i>	RLU	<i>Relative Light Units</i>
DTT	Dithiothreitol	RNA	Ribonukleinsäure
EcN	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	RNase	Ribonuklease
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	rpm	<i>rounds per minute</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>	RT	Raumtemperatur
EtOH	Ethanol	s	Sekunde
FCS	Fötales Kälberserum	SDS	Natriumdodecylsulfat
FRT	<i>Flp Recombinase Target</i>	SSC	<i>Standard Saline Citrate</i>
g	Gramm	Sm	Streptomycin
G	Guanin	T	Thymidin
GEI	genomische Insel	Tab.	Tabelle
H ₂ O _{dest.}	einfach destilliertes Wasser	TAE	Tris-Acetat-EDTA
H ₂ O _{bidest.}	zweifach destilliertes Wasser	Tc	Tetrazyklin
h	Stunde	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure	u	Unit
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	U	Uracil
IS	Insertionssequenz	ÜNK	Übernachtkultur
kb	Kilobasen	UV	Ultraviolett
kDa	Kilodalton	V	Volt
Km	Kanamycin	WT	Wildtyp
KR	Kongorot	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
l	Liter		

A.2 Oligonukleotide

Tab. 13: Oligonukleotide und deren Verwendungszwecke. Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Anwendung
M13uni M13rev	TGTAAAACGACGGCCAGT CAGGAAACAGCTATGACC	Sequenzierung von pGEM-T-Easy-Derivaten
tet ^{P/o} ASK3	CCATCGAATGGCCAGATGAT TGACGCAGTAGCGGTAAACG	Sequenzierung von pASK75-Derivaten
cat5 cat3	GTGTAGGCTGGAGCTGCTT CATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTA	Überprüfung der Integration von <i>cat</i> und <i>nptII</i>
csgBA1 csgBA2 csgBA3	AATACAGGTTGCGTTAACAACCAAGTTGAAATGATTTAAT TTCTTAAATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC GAAAAAAACAGGGCTTGCGCCCTGTTTCTTTCATACTGA TGATGTATTACATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTA TGATAGCGGAAAAACGGAGAT	Deletion von <i>csgBA</i> und Überprüfung der Deletion
yaiC1 yaiC2 yaiC3	CTTCTGCCTTTAGCTCCGCTCTCTATAAATTGGGAAAATG TTTCTGAATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTT GGAAAAATCAGAAAACTCAGCAAAATCCTGATGACTTTTCG CCGGACGTCACATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTA GCTACGAAAATGGCTCACCC	Deletion von <i>yaiC</i> und Überprüfung der Deletion
1943_1 1943_2 1943_3	CTGACATTAAATCATCAAATTAACGAATTCATTACACA ACAAGGAGTGGGACGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC TTTGTATGATGGAACAGCCATATCTATTGCTCCTTGTATA GTTACACAATTTTCATATGAATATCCTCCTTAGTTC TGAAAAACAGCAGAGGTACG	Deletion von <i>clbQ</i> und Überprüfung der Deletion
lacZ1_cat3 lacZ2_cat5 lacZ3	GCTCGTATGTTGTGTAATTTGTGAGCGGATAACAATTC ACACAGGATACAGCTCATATGAATATCCTCCTTAGTTC ACATAATGGATTTCTTACGCGAAATACGGGCAGACATAG CCTGCCCGTTATTAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC CCGTCTCACTGGTGAAGAAGAA	Deletion von <i>lacZ</i> und Überprüfung der Deletion
luxA_rev_Seq	TATGCAGCAGCGACATAAGG	Sequenzierung von Fusionen
FRTA_luxA_up FRTA_gfp_up luxE_lp	GAAGTTCCTATTCTTTCTAGAGAATAGGAACCTCTCGACG GAGGACTCTCTATGAAATTTGGAACTTTTTCG GAAGTTCCTATTCTTTCTAGAGAATAGGAACCTCTCGACG GGAGGACTCTCTATGAGTAAAGGCGAAGAAGCTTTTC TCAACTATCAAACGCTTTCGG	Amplifikation von <i>luxABCDE</i> bzw. <i>gfp-luxABCDE</i> inkl. einer FRT-Sequenz
npt_up npt_lp	GCAAGCGCAAAGAGAAAGC AACGATTCGAAGCCCAAC	Amplifikation von <i>nptII</i>
1943-XbaI_up-new 1943-HindIII_lp	GCTCTAGATAACGAGGGCAAAAAATGAGTAATATCAGTTT GTATTGTTTCG CCC <u>AGCT</u> TGGGCTACCCTACTATTTTCGAGTGATTCAATC	Amplifikation von <i>clbQ</i> zur Klonierung
csgD-XbaI_up csgD-EcoRI_lp	GCTCTAGATAACGAGGGCAAAAAATGTTTAAATGAAGTCCA TAGTATTCATG CGGAATTCGGTTATCGCCTGAGGTTATCG	Amplifikation von <i>csgD</i> zur Klonierung
1960_XbaI_up 4711_XbaI_up 1960_lp	GCTCTAGATAACGAGGGCAAAAAATGAGGATTGATATATT AATTGG GCTCTAGATAACGAGGGCAAAAAATGGATAAGTTCAAAGA AAAAACC AATATTATCGACGGCTCAGA	Amplifikation von <i>clbA</i> bzw. <i>clbA-clbR</i> zur Klonierung

Tab. 13: Oligonukleotide. (Fortsetzung)

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Anwendung
ptet_up_3'OH_1	GGAACCTAAGGAGGATATTCATATGGCCATCGAATGGCCAG ATGAT	Amplifikation von <i>tet^{p/o}</i>
ptet_lp_Bam	CGCGAATCCGCGGAGCTCGAATTCGGTCTCA	
1959_up_ptet	TACGCGTGTCATCTTATTACATGGAAAATCTCCAGAGGT ATTATCCATAACCATTTCACTTTTCTCTATCACTGATAGG	Amplifikation von <i>nptIII-P_{tet}</i> für <i>clbB</i> -Promotoraustausch bzw.
1959_cat3	GCTTACGCGTGTCATCTTATTACATGGAAAATCTCCAGA GGTATTATCCATAACCCATATGAATATCCTCCTTAGTTCC	Amplifikation von <i>nptIII</i> zur Insertion in <i>clbB</i> und Überprüfung der Insertion
1959_lp_cat5	GGATAGGTGTGCCATTTAGAATAATCATGTTAAATAATCT ATAAATCCGATAATAAGGTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTT	
1959_test	TTGACTGAATAAGGTAGGCCCG	
1959_Seq	TGGGGGTATTCTGTAAAGTGA	
4711_lp_ptet	GCAATACTTGTCTTTCACGCAGAGATAACGGGTTTTTTTC TTTGAAGCTTATCCATTTCACTTTTCTCTATCACTGATAGG	Amplifikation von <i>nptIII-P_{tet}</i> für <i>clbR</i> -Promotoraustausch bzw.
4711_up_cat5	ACAGATACACAGATACACAGATACACAGATACACAGATAC CATTCCAGGATGGGGGAAACGTGTAGGCTGGAGCTGCTT	Amplifikation von <i>nptIII</i> zur Insertion in <i>clbR</i> und Überprüfung der Insertion
4711_up2_cat5	TTCAATGAATTAGATTCTGTCTGTAAAGCAAAAACATGTAA GTCATGCAGTACATACATGAGTGTAGGCTGGAGCTGCTT	
1959_up2_cat5	CACCTTATATCGGATTATAGATTATTTAACATGATTAT TCTAAATGGCACACCTATCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTT	
4711_test	GCGTGATTCTGTATTCGAGC	
1960_lp_ptet	CTCTACTGGTTTGTATGAAAAAACTAGTATGTCCAATTAA TATATCAATCCTCATTTCACCTTTCTCTATCACTGATAGG	Amplifikation von <i>nptIII-P_{tet}</i> für <i>clbA</i> -Promotoraustausch bzw.
1960_cat3	TATCTCTACTGGTTTGTATGAAAAAACTAGTATGTCCAAT TAATATATCAATCCTCCATATGAATATCCTCCTTAGTTCC	Amplifikation von <i>nptIII</i> zur Insertion in <i>clbA</i> und Überprüfung der Insertion
1960_up_cat5	ATACAAGCTCGGAATACGAATCAGCTATACACATTGCTA ACAGGAATGAGATTATCTAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTT	
1960_Seq	CATAAAATACAAGCTCGGAATACG	
PKS1.1_noFRT_pKD3	CAGCGCGCTACACGCCATTTGCCCGGAAACCATGACCGCAG ATATCTTGTTCGTGTGCAGAATAAATAATCCTGGTGT	Amplifikation von <i>cat</i> zur Insertion <i>upstream</i> der <i>asnW</i> -GEI
PKS1_new	AAAATTGGTGGTCAAATCTGGGGTCAGGTTAGTTCGATAA TGGAGTGACCCCATGTGTAGGCTGGAGCTGCTT	
PKS2.1_noFRT_pKD4	TCCTATGCAGTCCCACTTTATCACCAGACTATCAGCTA ATTCATTCTGTCAAATGGGCAGCTTGCAGTGGGCTTACAT	Amplifikation von <i>nptIII</i> zur Insertion <i>downstream</i> der <i>asnW</i> -GEI
PKS2_new	AGAAGCTTTCACGCAGGCATTATCGTAGCAGCAGTGTAA ATAGACCCATTTACATATGAATATCCTCCTTAGTTCCCTA	
PKS3	TCGGTAGAACGGCGGACTGTTAAT	Nachweis der <i>asnW</i> -GEI-Deletion
PKS4	ATGGACACTGCCTAAGCGAGGTT	
asnW-PAlleftend1	AATCAACCCAGCTGCAATC	Sonden für Southern-Hybridisierungsanalysen und Nachweis der <i>asnW</i> -GEI in verschiedenen <i>E. coli</i> -Stämmen
asnW-PAlleftend2	CACCCCATCATTA AAAACG	
asnW-PAIrightend1	AGCCGTATCCTGCTCAAAAC	
asnW-PAIrightend2	TCGGTATGTCCGGTTAAAGC	
ORF1907-1908.1	TCTGTCTTGGTCGCGTAGTG	
ORF1907-1908.2	TCAGTTCGGGTATGTGTGGA	
ORF1911-1912.1	ATTCGATAGCGTCACCCAAC	
ORF1911-1912.2	TAAGCGTCTGGAATGCAGTG	
ORF1913-1914.1	CGCTTCAATCAACAGCTTTA	
ORF1913-1914.2	CGCATCAGGATGTTCTGCTA	
ORF1915-1918.1	TCATCGCAATTTGGATTCA	
ORF1915-1918.2	TGATGAACGTGGCGGTAATA	
ORF1919-1920.1	CCTCGCTAAAGAAGGTGACG	
ORF1919.1920.2	ACCGTTGACTGTGATGGACA	
ORF1920-1922.1	ATTCGCCCTGATATTGTCG	
ORF1920-1922.2	CCTTCGTTGGCAGATTGATT	

Tab. 13: Oligonukleotide. (Fortsetzung)

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Anwendung
mTn5_invers1 mTn5_invers2	CGTCGGCTTGAACGAATTGTTAG TCTAGCGAGGGCTTTACTAAGCTG	Identifizierung von Transposon-Integrationsorten
mTn5_probe1 mTn5_probe2	CTAACAAATTCGTTCAAGCCGAC CAGCTTAGTAAAGCCCTCGCTAGA	Sonden für Southern-Hybridisierungsanalysen
Muta5 Muta6 Muta7 Muta8	AACTGTGAAGCGATGAACCC GGACTGTTTCAGAGAGCTATC GACCAAGCGATAACCCGATG GTGAGATGATGGCCACGATT	Nachweis der Plasmide pMUT1 bzw. pMUT2 in <i>E. coli</i> Nissle 1917
RT_1941_up RT_1941_lp	CTGTATCTGCTGGTCAAACC AGCTCGGTAACCTGGTAGATG	Amplifikation des <i>intP4</i> - Transkripts in der RT-PCR
RT_1942_up RT_1942_lp	TGAACCTCTATTGGAAGGGC GGCGAGGGGTATTAAATTG	Amplifikation des <i>OFR2</i> - Transkripts in der RT-PCR
RT_1943_up RT_1943_lp	GTGAAACACTACACAGGTGG CACGATCGGACAGGTTAATG	Amplifikation des <i>clbQ</i> - Transkripts in der RT-PCR
RT_1944_up RT_1944_lp	GATGTGGCTAGTCAGAAAGC CATAATTGGCGGAGGCATAG	Amplifikation des <i>clbP</i> - Transkripts in der RT-PCR
RT_1945_up RT_1945_lp	GCACAGAAGACGATAATGGG CCTGAGCACACAAGTAATCC	Amplifikation des <i>clbO</i> - Transkripts in der RT-PCR
RT_1946_up RT_1946_lp	TTTGTGATGGGAGAGGAGAG CAGAAATGGCTATAGGCTG	Amplifikation des <i>clbN</i> - Transkripts in der RT-PCR
RT_1947_up RT_1947_lp	GGTATGTTAACGCAGGTGAC CACGATCGCAAAGAATAGCG	Amplifikation des <i>clbM</i> - Transkripts in der RT-PCR
RT_1948_up RT_1948_lp	GCACGGATTACCTTGTACTG GTGAGCCAAACAATCGCTG	Amplifikation des <i>clbL</i> - Transkripts in der RT-PCR
RT_1949_1_up RT_1949_1_lp RT_1949_2_up RT_1949_2_lp	GGACATGCAGAGCTACAAAG CTCAAAGTGCCTGCTGAATAC CGCTGAACAACGTCTATGAG GACCATGATTTGGAGACCAC	Amplifikation des <i>clbK</i> - Transkripts in der RT-PCR
RT_1950_up RT_1950_lp	CTGTGCTTTAATCAGGAGCG CTGAATTACCGCATCTAGCG	Amplifikation des <i>clbJ</i> - Transkripts in der RT-PCR
RT_1951_up RT_1951_lp	TACTACCATCGCCTATCACC GACCGCATAGATGTTATCGC	Amplifikation des <i>clbI</i> - Transkripts in der RT-PCR
RT_1952_up RT_1952_lp	CTGGATGCAGAACGCTTATC GGATCCTGTTTCATCTCCAG	Amplifikation des <i>clbH</i> - Transkripts in der RT-PCR
RT_1953_up RT_1953_lp	GTCGGTACTTTGGTACAAC CCCTTGCTTGATGATAGTGG	Amplifikation des <i>clbG</i> - Transkripts in der RT-PCR
RT_1954_up RT_1954_lp	GTACTIONAGGTGCGTCAATCC CACGTTCACTAAGTCACTGC	Amplifikation des <i>clbF</i> - Transkripts in der RT-PCR
RT_1955_up RT_1955_lp	CATTACGTGGGCATACGTTG GACGGTAGCAATCTGTTCTG	Amplifikation des <i>clbE</i> - Transkripts in der RT-PCR
RT_1957_up RT_1957_lp	CACGGATGAATACGATCTGC TATCGATATCCTCAGCACGG	Amplifikation des <i>clbD</i> - Transkripts in der RT-PCR

Tab. 13: Oligonukleotide. (Fortsetzung)

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Anwendung
RT_1958_up RT_1958_lp	GAGTGGGTCACCTTCTTTAG CGTAGCCAATCCACATCTTC	Amplifikation des <i>clbC</i> - Transkripts in der RT-PCR
RT_1959_up RT_1959_lp	CTAAATGGCACACCTATCCG GTACTGCATGACTTACATGTTT	Amplifikation des <i>clbB</i> - Transkripts in der RT-PCR
RT_1960_up RT_1960_lp	CCGTTATCTCTGCGTGAAAG AGCGTGATTTCGTATTCGAG	Amplifikation des <i>clbA</i> - Transkripts in der RT-PCR
RT_4711_up RT_4711_lp	CTCCACAGGAAGCTACTAAC CGTGGTGATAAAGTTGGGAC	Amplifikation des <i>clbQ</i> - Transkripts in der RT-PCR
RT_16S_up RT_16S_lp	TCTCCTGAGAACTCCGGCA CAGCGTTCAATCTGAGCCA	Amplifikation des <i>rRNA</i> - Transkripts als Kontrolle in der RT-PCR

A.3 Plasmidkarten

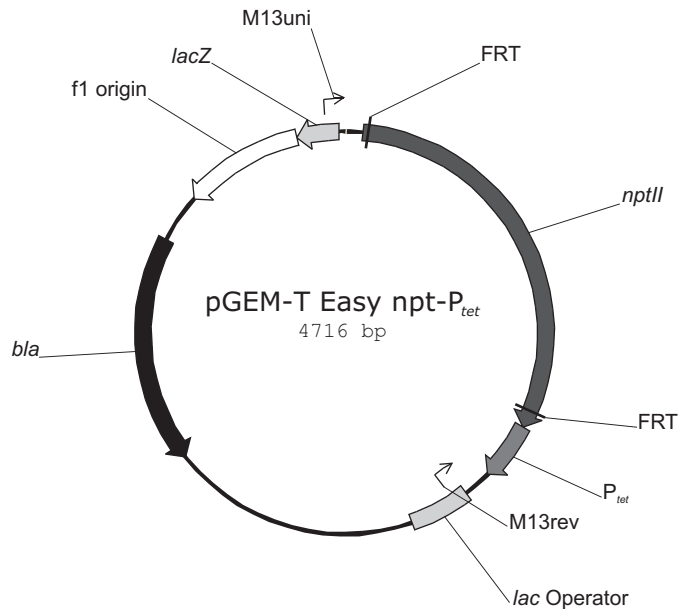


Abb. 51: pGEM-T Easy *npt-P_{tet}*. Matrize zur Amplifikation des rekombinanten Inserts *npt-P_{tet}* für den Austausch von Promotorsequenzen.

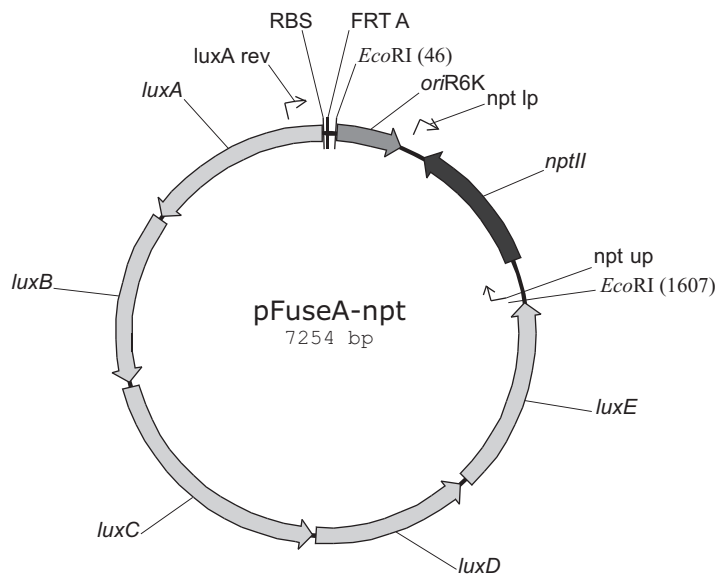


Abb. 52: pFuseA-npt. Plasmid für die Integration der Luciferasegene in das bakterielle Chromosom durch Rekombination via FRT-Sequenzen.

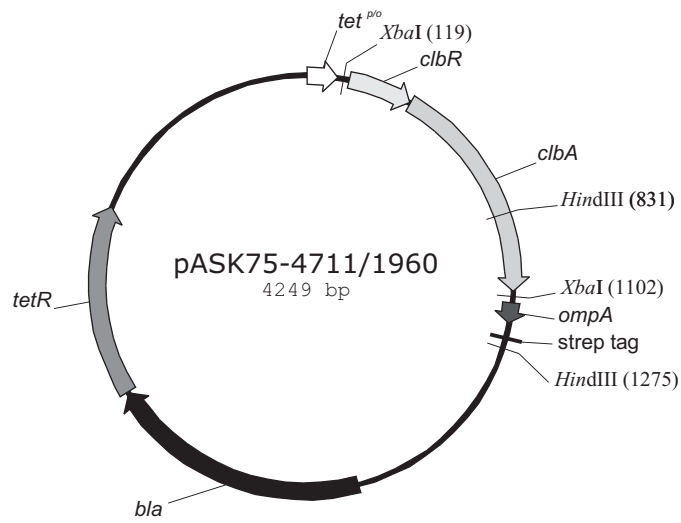


Abb. 53: pASK-4711/1960. Plasmid zur induzierbaren Überexpression von *clbR* und *clbA*.

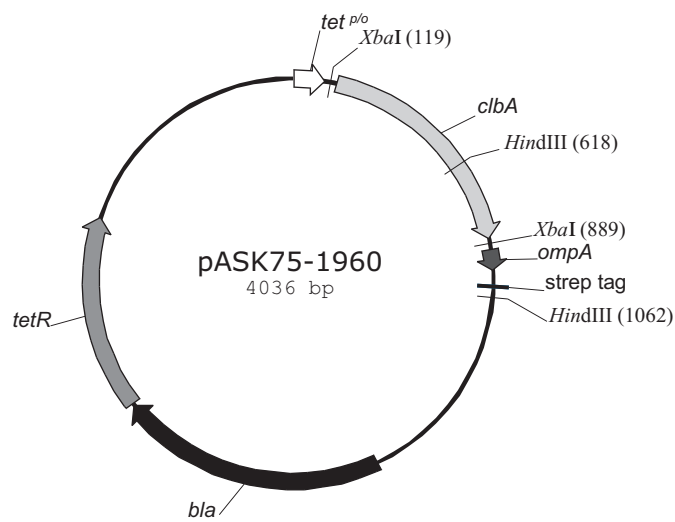


Abb. 54: pASK-1960. Plasmid zur induzierbaren Überexpression von *clbA*.

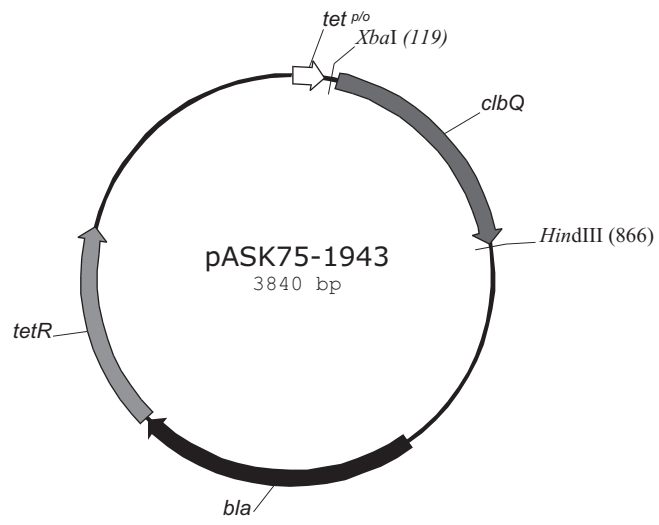


Abb. 55: pASK-1943. Plasmid zur induzierbaren Überexpression von ORF *clbQ*.

A.4 Polyketid-Gencluster aus *E. coli* IHE3034

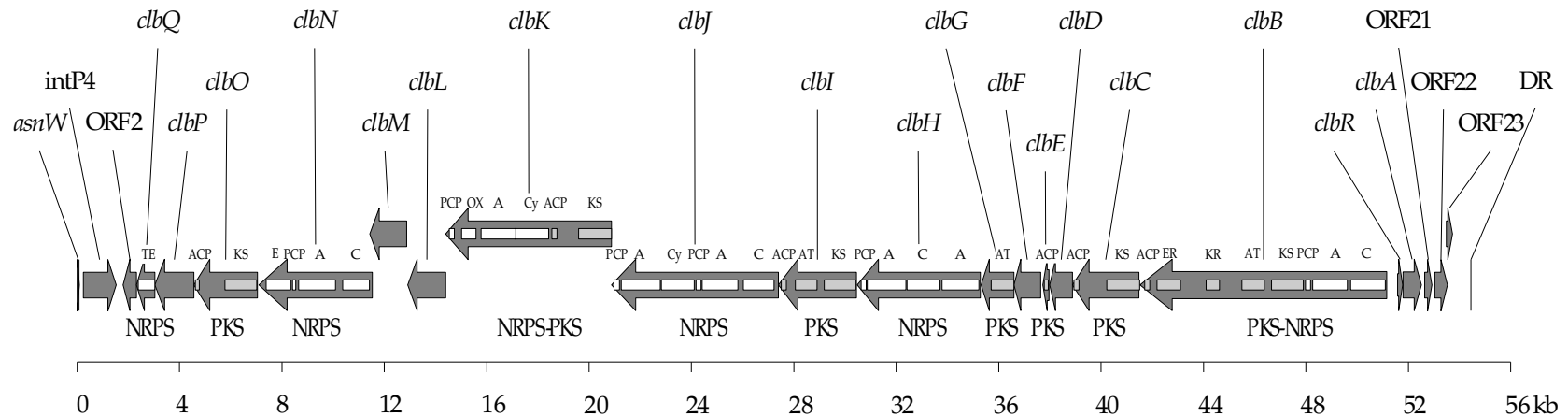


Abb. 56: Polyketid-Gencluster aus *E. coli* IHE3034. Schematische Darstellung der *asnW*-Insel inklusive Annotation der Gene und ermittelter putativer PKS/NRPS-spezifischer Domänen der kodierten Proteine. DR: *direct repeat*; *asnW*: *asnW*-tRNA-Gen; *intP4*: P4-ähnliche Integrase; ORF2: hyp. konserviertes Protein; *clbQ*: put. Thioesterase; *clbP*: FmtA-ähnliches Protein; *clbO*: PKS; *clbN*: NRPS; *clbM*: MatE-ähnliches Protein; *clbL*: Amidase; *clbK*: PKS/NRPS; *clbJ*: NRPS; *clbI*: PKS; *clbH*: NRPS; *clbG*: Malonyl-CoA-Transacylase; *clbF*: Acyl-CoA-Dehydrogenase; *clbE*: *Acyl Carrier Protein*; *clbD*: 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase; *clbC*: PKS; *clbB*: NRPS/PKS; *clbR*: LuxR-ähnliches Protein; *clbA*: Phosphopantetheinyl-Transferase; ORF21: IS1400-Transposase ORFA; ORF22: IS1400-Transposase ORFB; ORF23: Transposase-Fragment; A: Adenylierung; ACP: *Acyl Carrier Protein*; AT: Acyltransferase; C: Kondensation; Cy: Zyklisierung; ER: Enoylreduktase; KR: Ketoacylreduktase; KS: Ketoacylsynthetase; OX: Oxidation; PCP: *Peptidyl Carrier Protein*. PKS-Domänen sind grau, NRPS-Domänen weiß als Rechtecke innerhalb der die ORFs kennzeichnenden Pfeile dargestellt.

A.5 Verbreitung der *asnW*-Insel innerhalb der ECOR-Stammsammlung

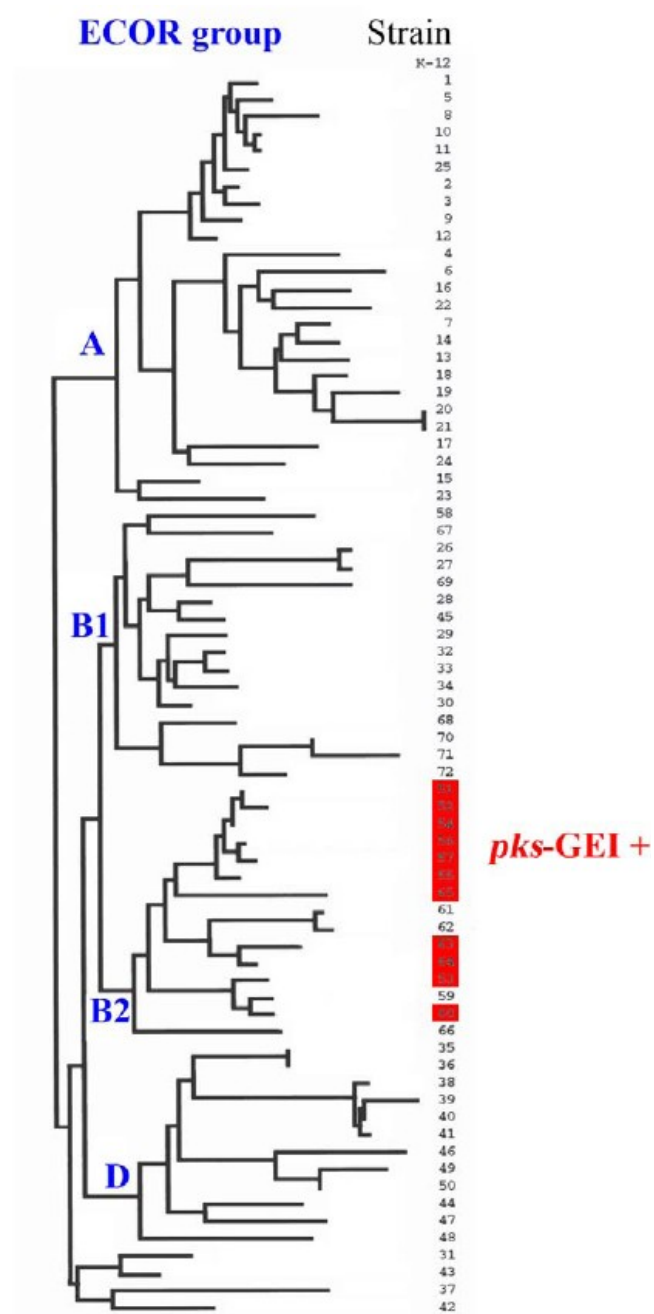


Abb. 57: Verbreitung der *asnW*-Insel innerhalb der ECOR-Stammsammlung. PKS/NRPS-positive Stämme sind rot unterlegt.

A.6 Promotor-Vorhersage

Tab. 14: Putative Promotoren der *asnW*-Insel. Promotoren wurden mit der *Neural Network Promoter Prediction Software* mit einem Schwellenwert (Score) $\geq 0,95$ berechnet. Neben Start und Ende der Promotor-Sequenz ist auch jeweils das Gen angegeben, das von den vorangehenden Promotoren beeinflusst werden könnte. Der berechnete Transkriptions-Start ist **fett** dargestellt.

Start	End	Score	Promoter Sequence	Gene	Start
forward					
179	224	0.96	caggctttgacattgtgggtgggcatcgctaataattcgcc tc gttctcac		
384	429	0.99	tgcattttgattttaccctctgcatcgggaaaaatggta agt caaatctg	<i>IntP4</i>	469
2041	2086	0.96	cagtttatttaacctccccgaagcattttttataaggcgagg g cggtattaa		
2063	2108	0.98	gcattttttataaggcgaggcggtattaaattgaatcatac g acctcgggt		
2464	2509	0.97	cttattttaataaagaaaaataactatataatagctttaatt aa actcttctt		
3300	3345	0.96	cttggtgtgtaataagaattcgtttaatttgatgatttaatt gt cagaacga		
3331	3376	0.99	tgatttaattgtcagaacgaaagctaacaggataattccg aa cggtatcgc		
4194	4239	0.99	cacattttcaatcaccgcgcccaacacatcataattggcg g aggcatagc		
4953	4998	0.97	tccgatttcgaaaataaccgctgttctgcataatgatc gat gcataaca		
12909	12954	0.99	ctggtgggtgacatcaatgtggctcagccaaaaaatatcg gg cgatggcata		
14508	14553	0.96	cggcttggttaactgcgccatacgtgaaaaatagtgatt ca ccaacgccca		
15109	15154	0.96	cagttgctgacgcaggccgcgcagcatggcatctttgtagct ct ctgcatgt		
18579	18624	0.96	tatgggtggaatattgcccaatcccaaggattttcgcc g cccaacccaa		
24309	24354	0.99	ggttgatgacgatgctcagggtcgtgcaactatcaccag tc atcctgaga		
30172	30217	0.96	aggttgaggtgataggcgatggtagtagtataactgtctt tg tcgttacc		
30480	30525	0.95	tttggccttgacgtaactcgggtgctgaacaaattcagg act gattocca		
32874	32919	0.98	gcataattgtcgagttggaacatgcaactgatataattggg aa atgtccggcg		
34079	34124	0.99	ttttggacagtgcgtccattaaggccgccaaattgagc gg cacgctact		
34255	34300	0.97	aattttaatctgaaaatcattacggccaatgtaataat tt ggttgcttt		
38099	38144	0.95	taacgaatggacaagcccagagaaaaaatatcgtcatc at cgttcaacg		
38380	38425	0.98	caacgattgcaaatcgtatccaagccaatcaaatcggc ag tttgtagtg		
38931	38976	0.98	tctttttttatgctgcgggtgaaaaattataaagcgt aa gttcgcttcg		
42140	42185	0.97	ccgctttttactgtctgctgagtaatcgtatcgttagc gg cagacggta		
42467	42512	0.99	ggatttgcatggaaggagcggtagcgtgttatcatctat ca aagcgacaa		
43724	43769	0.95	cagttggtgacgctgtgccagcgcggccatagtgg aa gtgctgctcg		
45257	45302	0.97	gatgctggtgaaatgcgtcagaatacggctcattatccca ca cgctcct		
47279	47324	0.99	cgttgattgcccgatcacactcggcgcggatagccgatt tt gttattgc		
48152	48197	0.99	cgttggaattgcatcctccggcgatacggcagtatcgag aa atgtgcta		
48785	48830	0.97	gccagttttgtacatcataccgcccgggaataaaaggatc agg gacaaaa		
50105	50150	0.95	cttctggtgagtgatggtcaaggctcagcggatagtgct tt gttcatgta		
50629	50674	0.97	aattgttctcggttcagtatctgtgtgatattgtgacagc gg caagata		
50967	51012	0.99	tattttaaatcagcctgtagcagttgaggaattatagcat ca ataacgctc		
51489	51534	0.96	gcattttatcacttacaggaatacccccaaaaaatcctt at attctgatt		
51618	51663	0.99	gtatgaattgatacagccaccacatagaaaaataatgcgta aat tcccattt		
51659	51704	0.96	ttccattttacataaaaaccgttgatcgt aa attcctct ta aaatactgc	<i>clbR</i>	51840
51965	52010	0.98	gtttcatgtgaaaaacatcaaacataaaaatacaagctc gga atcgaatc	<i>clbA</i>	52052
52317	52362	1.00	attttttttaacctttcccatactatagatacagtagcc gt tgctattag		
52440	52485	0.98	catttttttactccacaggaagctactaacatagttt ca cttctcctgta		
52580	52625	0.99	tattgaatttcatttaacaaataaaaaactaacctcaaa at atagaggtt		
53355	53400	0.96	gatgattttaaccgtgaggcattgtcgattgaaatcgat ct gaaatctgcc		
54340	54385	0.97	agattgtagatgtacgaagcctagaaatttaaaacactc gg atttttag		
54363	54408	0.99	gaaatttaaaacactcggatttttagagaggatttta at gataaagtcag		
54671	54716	0.95	gtggtcttgacaggaagataaactctggttttagcttactt at tagcoactt		

Tab. 14: Promotoren. (Fortsetzung)

Start	End	Score	Promoter Sequence	Gene	Start
55048	55093	0.98	aataat tt gtacacgagtg cct acaggaacattatcaaac ag atatttga reverse		
54816	54771	0.99	GACAGATGTTTTAAGAGCGTTGGTAATTAGAAAAGTAAAAAGCCTGCTCGA		
54635	54590	0.97	TAAATTTGGTTTGAGCTTCCCTACTGCATGTGGTGATAGTTACTATAGTG		
54376	54331	1.00	TCCGAGTGTAAAAATTTCTAGGCTTCGTACATCTACAATCTGTACTCGT		
53845	53800	0.98	ACTTTCAGTGAATGAAAGAAGCTTCCACGCAGGCATTATCTGTAGCAGCA		
53390	53345	0.98	AGATCGATTTCAATCGACAATGCCTCACGGTAAAAATCATCAACGACATT		
52652	52607	0.95	ATTTTCCATTGAGAGAAATAAACAGGTGAACCTCTATATTTTGAAGTTAG		
52625	52580	0.98	GAACCTCTATATTTGAAGTTAGTTTTTTATTTGTTAAATGAAATTC AAT		
52610	52565	0.98	GAAGTTAGTTTTTTATTTGTTAAATGAAATTC AATACAATCCAGTCC TAA		
52441	52396	0.95	AAAAATGCTGACTGATATTCAGATAAGAGTTGTCTAAATCTCTTATTTGT		
52278	52233	0.98	TTTGCCATATTTGCACGTACTAAATGCGCATGATTGTAATGAGACATCAG		
52257	52212	0.96	AAATTGCCATGATTGTAATGAGACATCAGGTGATATCTTTTGTAGTGCTG		
52215	52170	0.98	TAGTGTGTTTTGAGCAGGATACGGCTAAAAATATAGAGTTCTTTATCAC		
52099	52054	0.99	TACTGGTTTGATGAAAAAACTAGTATGTCCAATTAATATATCAATCCTC		
51984	51939	0.97	ATGTTTGATGTTTTTCACATGAACTTTACTGTGTTTATTGATATGTTAA		
51718	51673	1.00	GTATCTGTTGTTTTGGCAGTATTTAAGAGGATTTACGATACCAACGGTTT		
51559	51514	0.99	ATCTAATTCATTGAAGAAAAACATGTAATCAGAATAATAAGGATTTTTTGG		
51525	51480	0.98	TATAAGGATTTTTGGGGGTATTCCTGTAAGTGATAAAAATGCAATATGAT		
51438	51393	1.00	GGTGTGCCATTTAGAATAATCATGTTAAATAATCTATAAATCCGATAATA	<i>clbB</i>	51382
51424	51379	0.97	AATAATCATGTTAAATAATCTATAAATCCGATAATAAGGTGATGGTTATG		
51189	51144	0.92	AACGTTATTTTCGAAAGCATGAGTGTTCGCACTGATTATAACTGGGAGA		
51127	51082	0.96	CTTGTGAGGTGGTGAAGACCGATGTGTGCGCGATATATATGTGTTAGAC		
51095	51050	0.94	GATATATATGTGTTAGACTGTGAGCAAGAGGAAATACGTTTCTACTAGC		
50247	50202	0.99	TGGGGATCTTTTAATACCTTAGTGGTGTGGAGAATTATCCCGTTGATA		
50228	50183	0.99	TTAGTGGTGTGGAGAATTATCCCGTTGATATGACATTATGTGCATGCGC		
48751	48706	0.95	GTGTTGACTGTTTTGGGCGTAAAGACGGTCAAATTAAGATCAATGGACAA		
48300	48255	0.98	TGGCACCTCATTGGATACCATCAGGGTTAAAGGGGATATTAGCGGGCAAC		
47140	47095	0.96	CTGTTCCGTTTTGTGTGGTTTCAGCGCTGAAAAGTAAATATGGCCACCTC		
46440	46395	0.95	CAAGGCGTTGTTGTTGACGATGAGGATACGCGGGATATTGATCAAACGC		
46348	46303	0.93	CGCGCACCTTGATTGATCTGGGGATTACGCGGACAGTATGATCGGGCAC		
46222	46177	0.96	GCGGACGTTTGATGACAGTCCATGCGTCCCGGTAGCATGATGGCGGTCTAC		
45251	45206	0.94	TGCGCACTTTTAGCACACAAAACCTACCGACAGTTACATTGCTTGTATGC		
45186	45141	0.93	AGGATCATCGTTGACACAGTCGCTCTCGGGACTTTATCGTGTGCTCGCT		
44277	44232	1.00	GGGCATGTTGTTGGATGCTATAAACGGCAGTGAATACGATGCTTTGCGTG		
44223	44178	0.98	GCGCCATTGATGACGGGAACGTTGCTACAGGCTTATAAACCAACAAGGGG		
41907	41862	0.95	GCTGGGACGTTTTTGCCAGCCCCGGAGGGCGAGTCAAATCGCCATCAC	<i>clbC</i>	41721
41333	41288	0.94	AGAAGATGTGGATTGGCTACGGCGTTCGCTGTCACAGATTGGCGCGGATG		
40467	40422	0.97	TCAGTTCTTTTGGCATTGGCGGTACTAATGTGCATATGATTTTGGAAAGGG	<i>clbD</i>	39111
38877	38832	0.97	TGGACGACATTGTAGAATGTGATTTGGTGATTGAGAATATTAAGTGGGAT		
38862	38817	0.97	AATGTGATTTGGTGATTGAGAATATTAAGTGGGATATAGAGAAAAAAAT		
38741	38696	0.98	TATCACTGCGTTGTCAAATTAATGCGACATCCGGAGAATGTAGTCCGGC		
38396	38351	0.98	GGATACGATTTTGAATCGTTGCAGGTGCTATATGAAAGTTTAAATGATG	<i>clbE</i>	38212
				<i>clbF</i>	37960
37480	37435	0.98	CTGATTTTTTTATTGTTTTAATCCACTGTGGTAATCAATTAAGCGACAGTG	<i>clbG</i>	36833
35420	35375	0.95	AGCCGCTGATTGATGGGGACGCGGCGCTGAGCTATCACGATCTTAATG	<i>clbH</i>	35292

Tab. 14: Promotoren. (Fortsetzung)

Start	End	Score	Promoter Sequence	Gene	Start
33497	33452	0.98	GAAAGGCGTTTTGTTACGCGAATTGCAGGCCGCATATAACGGTGAATCGC		
32831	32786	1.00	ACCATTATTGTTGGATACCAGTGCATCTCAGGTGGATATTTTCGCTAAGTA	<i>clbI</i>	30671
30391	30346	0.97	CCGTGTCCTGTTGGAAACCGCTGGGCAGCCTTCGAAGATGCGGGCTATG		
30317	30272	0.98	TGGGTATTTTTGCTGGCAAAGCATGGATTCCATTTGATGCTGAACCTTG		
29918	29873	0.99	TAAAGCGTGTGATGAAGCGCTGCGTGATGGCGATAACATCTATGCGGTC		
29780	29735	0.96	AGGCACAGCGGTTGGCAGGTTTGACACCGCAGGATATCACCTTATGTGGAA	<i>clbJ</i>	27355
24462	24417	0.96	CAACCGCACTTTTCACTGCGCCTTGACCCTGAAGGACATTTTCCACTACT		
22682	22637	0.99	CGCCAGCTTTTGTCTGACGGTGGGCAGGTTGCGGGTACAAGTAACGCAGCC	<i>clbK</i>	21084
20889	20844	0.95	CCAACTTTTTGGCTACAGCCGTGCAGAAGCAGAAATCATGGATCCACAG		
17457	17412	0.98	TGGAACAATTGTTTGAACCGCGCTAATGGATCAGATGTTCCAGTGTTAT		
17029	16984	0.99	CGCCAGCTTTTGTCTGACGGTGGGCAGGTTGCGGGTACAAGTAACGCAGCC	<i>clbL</i>	14627
				<i>clbM</i>	13102
12773	12728	0.97	CAGCGGATTTTGTGCGTTCGGTATCATCATCGCGCTATTCTTTGCGATCGT		
11887	11842	0.99	ATTCGGTGTGTTGACGCTGATGCGTCACGTGTTTATATCTGTCCCTGTC		
11828	11783	0.99	CTGGCGATTGTGTTAGAGATGCGTATTACCGGCGTCTATTTTGGGGCGAT	<i>clbN</i>	11666
10724	10679	0.99	TGAAACGCGGTTTTAAACACAGCAAATATCCCATTACCTTATTCAACCAG		
7686	7641	0.97	GCTTCCGATTTGGCAAAACGCACGCATGGTGGGGGAGATTACGGTCTGCT	<i>clbO</i>	7268
				<i>clbP</i>	4796
4820	4775	0.95	TTGATGGTATTTTATGAGGTGTTACAGGATGACAATAATGGAACACGTT	<i>clbQ</i>	3289
2642	2597	0.97	CATTTTTTTCGATAAAGCATTTTGAACAGGTGGTAGGTTATGTAACCA		
2427	2382	1.00	TTGAACCTCTATTGGAAGGGCACGCGAAGGGGACTACGATTAGCGTAGCG		
2283	2238	0.98	GATTTAAATGGAATGAATTGGGGCGTTTAGCACAGAAATCTACCGTGAC		
1581	1536	0.97	TTGCGCTCTTGGTGACTCATCTGACGCTCCACTGCATCTTGCGACCATAA		
1437	1392	0.99	TTGATAGTATTTTCACTCATCGCTTGTAGGGTTCATGATAGCCGGGGAA		
375	330	0.99	GGAAGAGTTTTACGCTAACCTGTTGAATAAAAATAACATAAGGATTCGC		
180	135	1.00	AAGCCTGTTTTTAAATTTGAAATCGTTTGCTGAAATAATCTGCATTTTG		
161	116	0.98	GAAATCGTTTTGCTGAAATAATCTGCATTTTGTGCTTTATTCCGATAACAAC		

A.7 Klonierung des intergenischen Bereichs zwischen *clbB* und *clbR*

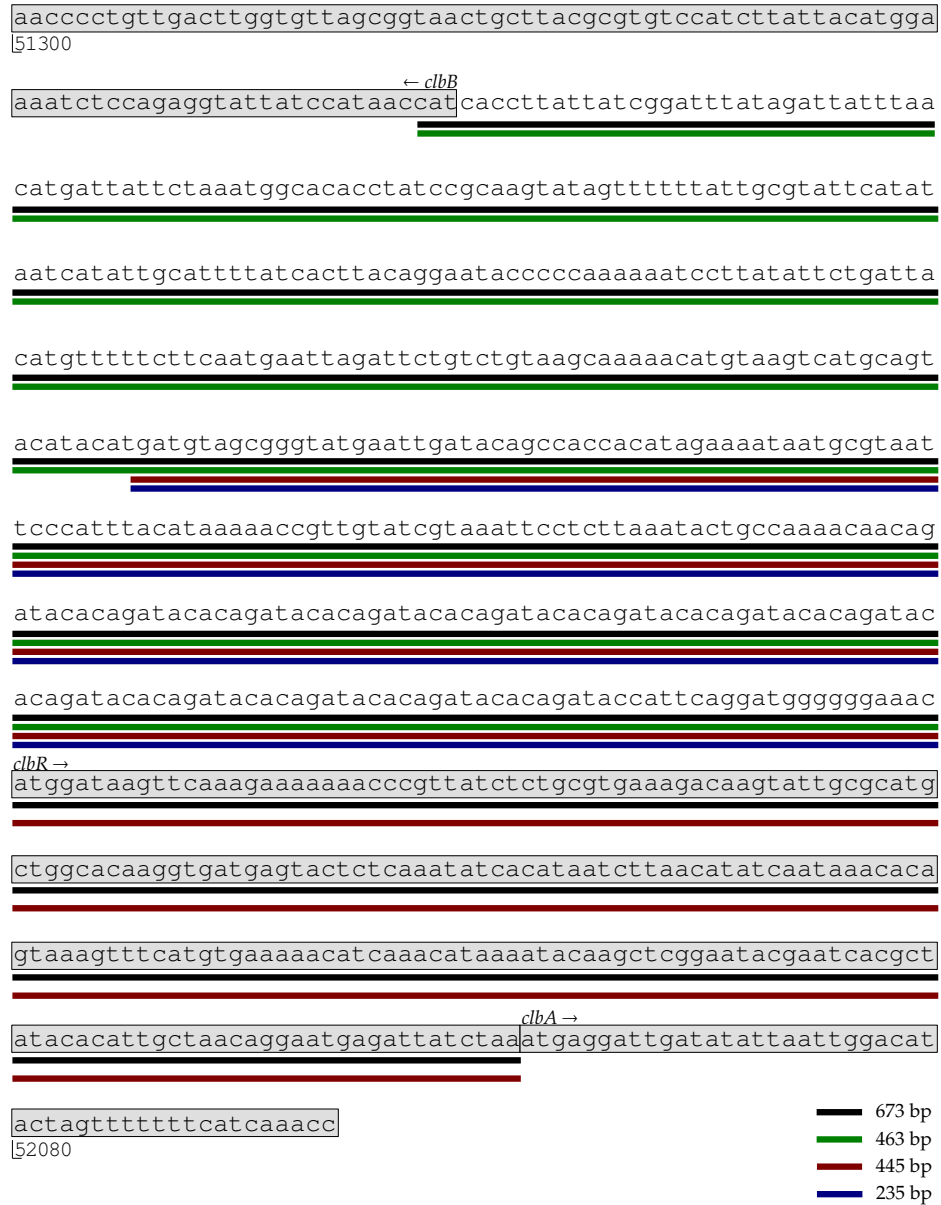


Abb. 58: Darstellung des intergenischen Bereichs zwischen *clbB* und *clbR*. Ausschnitt der *asnW*-Insel von *E. coli* IHE3034 zwischen den Genen *clbB* und *clbR* (Pos. 51300-52100 von GenBank AM229678). Die farbigen Linien unterhalb der Sequenz zeigen den jeweils klonierten Abschnitt an.

A.8 Wachstumskurven der Reportergeren-Stämme

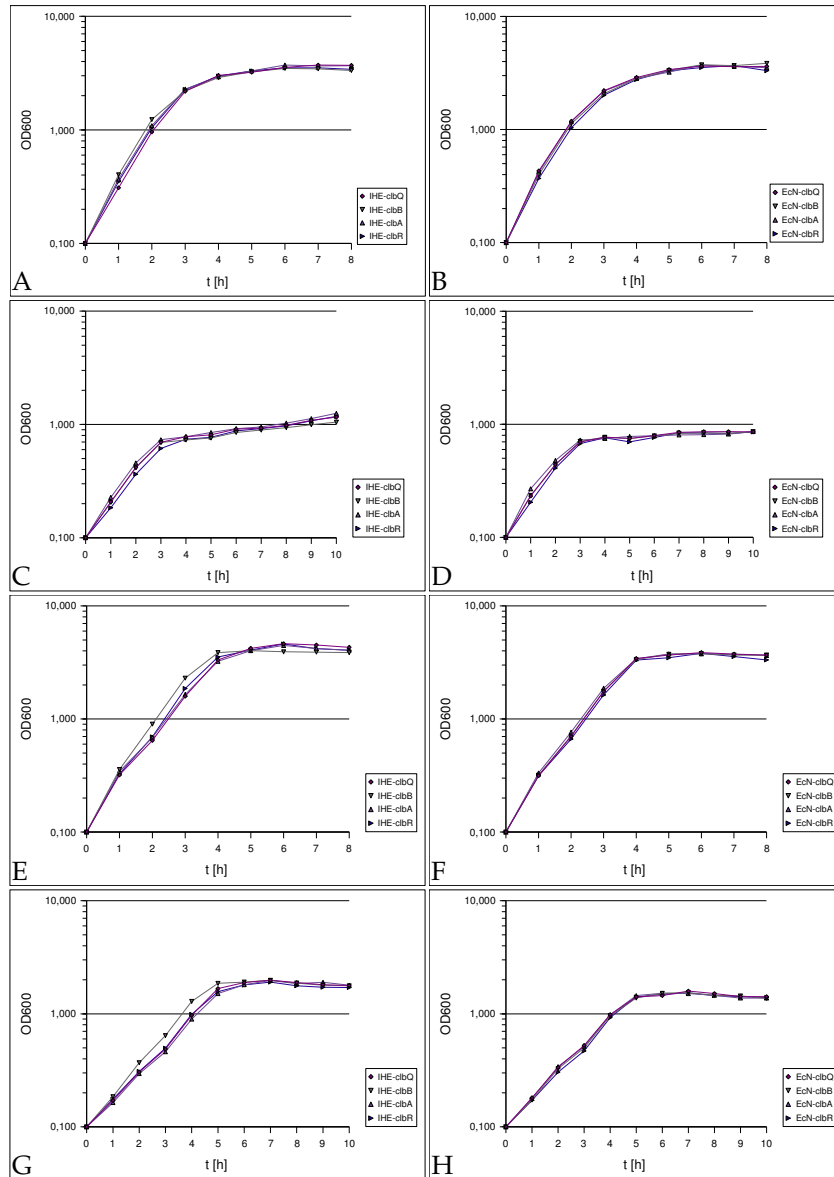


Abb. 59: Wachstum der Reportergeren-Stämme 1. A: *E. coli* IHE3034, LB, 37 °C, schüttelnd; B: *E. coli* Nissle 1917, LB, 37 °C, schüttelnd; C: *E. coli* IHE3034, LB, 37 °C, stehend; D: *E. coli* Nissle 1917, LB, 37 °C, stehend; E: *E. coli* IHE3034, DMEM, 37 °C, schüttelnd; F: *E. coli* Nissle 1917, DMEM, 37 °C, schüttelnd; G: *E. coli* IHE3034, DMEM, 37 °C, stehend; H: *E. coli* Nissle 1917, DMEM, 37 °C, stehend.

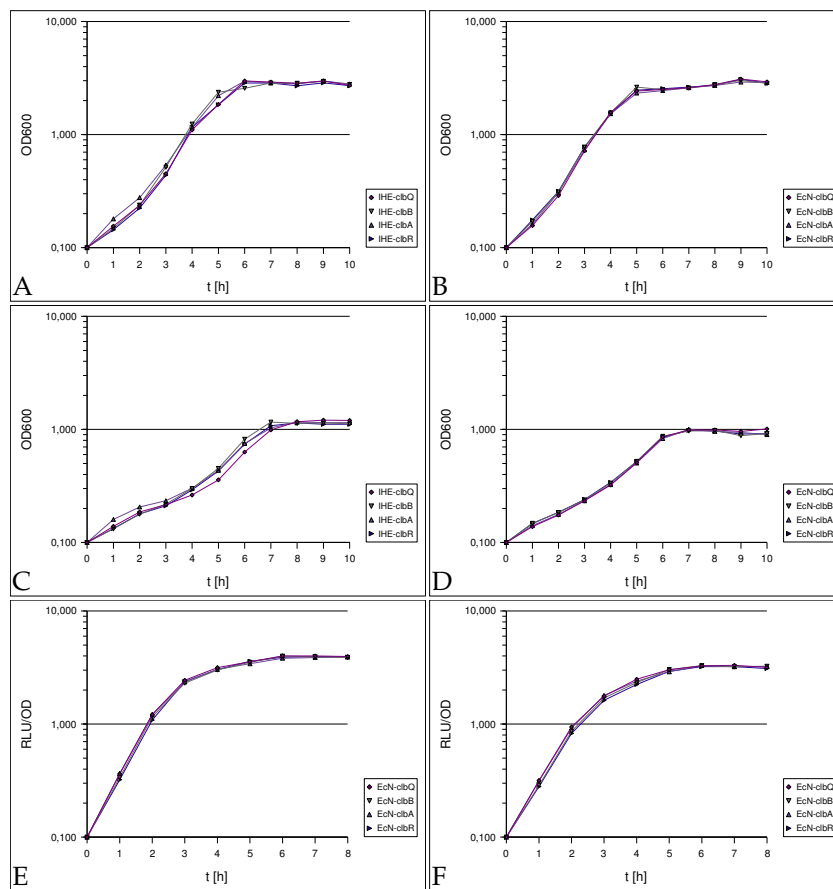


Abb. 60: Wachstum der Reporter-gen-Stämme 2. A: *E. coli* IHE3034, M63-Medium, 37 °C, schüttelnd; B: *E. coli* Nissle 1917, M63-Medium, 37 °C, schüttelnd; C: *E. coli* IHE3034, M63-Medium, 37 °C, stehend; D: *E. coli* Nissle 1917, M63-Medium, 37 °C, stehend; E: *E. coli* IHE3034, LB, 37 °C, schüttelnd; F: *E. coli* Nissle 1917, LB + 150 μM Dipyrityl, 37 °C, schüttelnd.

A.9 Luciferaseaktivität im Vergleich mit Kontrollstamm

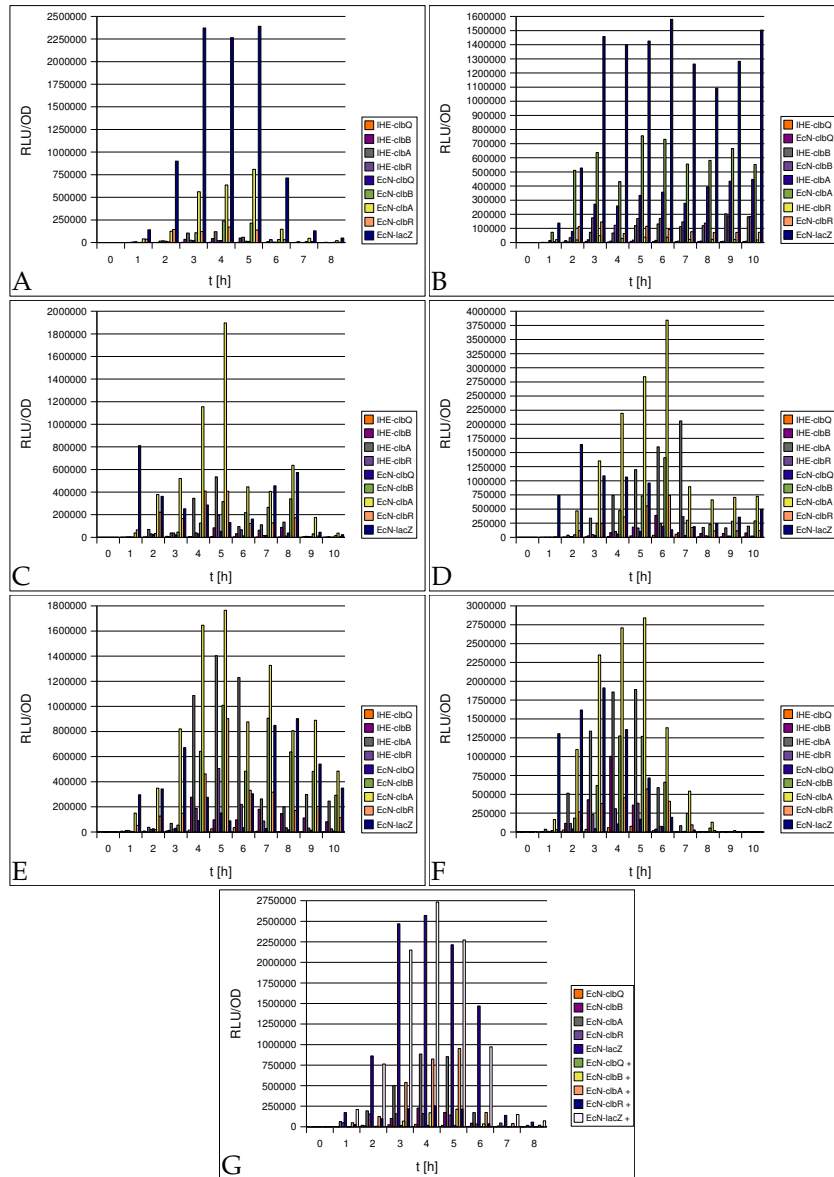


Abb. 61: RLU der Reportergenfusionen im Vergleich zur Kontrolle. Sämtliche in 5.2.9 dargestellten Luciferaseaktivitäten im Vergleich zur Fusion mit *lacZ* im Stamm Nissle 1917. A: LB, 37 °C, schüttelnd; B: LB, 37 °C, stehend; C: DMEM, 37 °C, schüttelnd; D: DMEM, 37 °C, stehend; E: M63-Medium, 37 °C, schüttelnd; F: M63-Medium 37 °C, stehend; G: LB + 150 μM Dipyridyl, 37 °C, schüttelnd.

A.10 Publikationen und Tagungsbeiträge

Publikationen

Overhage, J., Sielker, S., Homburg, S., Parschat, K., and Fetzner, S. (2005) Identification of large linear plasmids in *Arthrobacter* spp. encoding the degradation of quinaldine to anthranilate. *Microbiology* **151**:491–500.

Nougayrède, J.-P., Homburg, S., Taieb, F., Boury, M., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., Buchrieser, C., Hacker, J., Dobrindt, U., and Oswald, E. (2006) *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* **313**:848–851.

Tagungsbeiträge

Homburg, S., Dobrindt, U., and Hacker, J. (2004) Transposon Mutagenesis of *Escherichia coli* Strain Nissle 1917. Workshop des Europäischen Graduiertenkollegs 587, Würzburg. Poster.

Homburg, S., Dobrindt, U., Grozdanov, L., Merkert, R., and Hacker, J. (2005) Multicellular behavior of *Escherichia coli* Strain Nissle 1917 – implication for the strain’s probiotic character? Joint Meeting of FEMS and the Israeli Center for the Study of Emerging Diseases: Molecular Basis of Bacterial Pathogenesis, Ein Gedi, Israel. Poster.

Homburg, S., Nougayrède, J.-P., Oswald, E., Dobrindt, U., and Hacker, J. (2005) Characterization of an *Escherichia coli* genomic island associated with a cytopathic effect on eukaryotic cells. Workshop des Europäischen Graduiertenkollegs 587: Molecular Microbial Pathogenesis, Umeå, Schweden. Poster.

Homburg, S., Dobrindt, U., Grozdanov, L., Merkert, R., and Hacker, J. (2005) Multicellular behavior of *Escherichia coli* Strain Nissle 1917 – implication for the strain’s probiotic character? Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie, Göttingen. Poster.

Homburg, S. (2005) Characterization of an *Escherichia coli* pathogenicity island coding for a novel cytotoxic compound. Joint Meeting of the “EuroPathoGenomics Graduate Academy” NoE “EuroPathoGenomics” and the European Graduate School 587 (Würzburg – Umeå), Würzburg. Vortrag.

Homburg, S., Nougayrède, J.-P., Oswald, E., Dobrindt, U., and Hacker, J. (2006) Characterization of an *Escherichia coli* genomic island associated with a cytopathic effect on eukaryotic cells. 58. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg. Vortrag.

A.11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Stefan Homburg
Geburtsdatum 04.04.1975
Geburtsort Kassel

Schulausbildung

1981-1985 Grundschule, Heckershausen
1985-1994 Engelsburg-Gymnasium, Kassel
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

1994-1996 Studiengang Biologie (Diplom), Universität Kassel
08/1996 Vordiplom
1996-1997 Studiengang Biologie (Diplom), Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
1997-1998 Biologiestudium, University of Saskatchewan, Kanada
1998-2002 Studiengang Biologie (Diplom), Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
Diplomarbeit am Lehrstuhl von Prof. Dr. S. Fetzner „Isolation und Charakterisierung von Abbauplasmiden in Chinolin, Isochinolin und Chinaldin verwertenden Bakterien“
11/2002 Abschluss: Diplom-Biologe (Gesamtnote: sehr gut)
seit 01/2003 Anfertigung der Dissertation am Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. h. c. mult. J. Hacker und Dr. Ulrich Dobrindt
Assoziiertes Mitglied des Internationalen Graduiertenkollegs 587/2 und der Graduiertenschule – Klasse Biomedizin

Würzburg, im Februar 2007