

**Molekularbiologische Untersuchungen des
probiotischen *Escherichia coli* Stammes DSM 6601
und
Entwicklung der stammeigenen Plasmide als
Klonierungsvektoren**

Dissertation

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

vorgelegt von

Sibylle Oswald

aus Würzburg

Würzburg, 2006

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. Joachim Reidl

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

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

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

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

Würzburg, den 17. August 2006

Sibylle Oswald

Vielen Dank...

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Jörg Hacker für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Molekulare Infektionsbiologie durchführen zu können, für seine Unterstützung sowie für sein stetes Interesse am Fortgang und Erfolg meiner Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Joachim Reidl möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit bedanken.

Daneben gilt mein Dank Frau Dr. Inge Mühldorfer und Herrn Dr. Tobias Ölschläger für die Betreuung dieser Arbeit, ihre wissenschaftliche Anleitung und Unterstützung sowie ihre ständige Diskussionsbereitschaft.

Ganz besonders danke ich Frau Dr. Gabriele Blum-Oehler für die Möglichkeit zur Zusammenarbeit im Rahmen ihrer Projekte, das Interesse an meiner Arbeit und vor allem für ihre Geduld, Unterstützung und Freundschaft.

Der Firma Ardeypharm GmbH, der Bayerischen Forschungsstiftung sowie dem Europäischen Graduiertenkolleg bin ich für die finanzielle Unterstützung dankbar.

Weiterhin gilt mein Dank all jenen, die zum Gelingen dieser Arbeit durch die Bereitstellung von Stämmen, Plasmiden und Antikörpern beigetragen haben, insbesondere der Firma Ardeypharm GmbH, Dr. Marian Wachtel (Bethesda, Maryland, USA), Dr. Wieland Schrödl (Universität Leipzig) und Dr. Salam Khan (Universität Würzburg).

Bei Prof. Dr. Levente Emödy (Universität Pécs, Ungarn), unter dessen Anleitung ich die tierexperimentellen Versuche durchgeführt habe, bedanke ich mich herzlich für die Möglichkeit, in seinem Labor arbeiten zu dürfen, und für seine hilfreiche Unterstützung.

Des Weiteren danke ich Dr. Jean-Marc Ghigo (Institut Pasteur, Paris, Frankreich) für die Durchführung der Biofilmstudien.

Darüber hinaus gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie und des Zentrums für Infektionsforschung für ihre Hilfsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Vor allem bei Barbara M., Gudrun, Karin, Sabine, Kai, Shwan, Uli, Britta, Dagmar, Jutta, Anita, Artur, Stefan, Barbara P. und Hilde möchte ich mich für die freundliche Unterstützung in allen wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Bereichen bedanken.

Zuletzt bedanke ich mich herzlich bei meinen Eltern und der ganzen Familie für die Unterstützung während des Studiums und der Promotion.

Inhaltsverzeichnis

1 ZUSAMMENFASSUNG	1
1 SUMMARY	3
2 EINLEITUNG	5
2.1 Infektionsabwehrsysteme des Intestinaltrakts	5
2.1.1 Die Mikroflora des Gastrointestinaltrakts	6
2.1.2 Die mukosale Barriere	8
2.1.3 Das lokale intestinale Immunsystem	10
2.2 Einsatz von Lebendimpfstoffen.....	14
2.3 Probiotika.....	16
2.4 Der probiotische <i>E. coli</i> Stamm DSM 6601.....	21
2.5 Zielsetzung dieser Arbeit.....	23
3 MATERIAL.....	25
3.1 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide	25
3.1.1 Bakterienstämme	25
3.1.2 Plasmide.....	29
3.2 Oligonukleotide.....	30
3.3 Chemikalien und Enzyme.....	32
3.4 Geräte und Sonstiges.....	32
3.5 Medien und Nährböden	34
3.5.1 LB- (Luria-Bertani-) Medium	34
3.5.2 X-Gal-Medium	34
3.5.3 Saccharose-Medium	34
3.5.4 MacConkey-Agar	34
3.5.5 M63B1-Minimalmedium.....	35
3.5.6 Antibiotikazusätze	35
3.5.7 Nährmedium für INT407-Zellen	35
3.6 Patientenstuhlproben	36
3.7 Zelllinien.....	36

3.8 Versuchstiere	36
3.9 Puffer und Lösungen.....	36
3.10 Antikörper	36
3.11 Größenmarker	37
3.11.1 DNA-Größenmarker	37
3.11.2 Protein-Größenmarker	37
4 METHODEN	38
4.1 Isolierung von Plasmid-DNA mit der Schnelllysat-Methode	38
4.2 Plasmidisolierung, mittlerer Maßstab.....	39
4.3 Isolierung von DNA aus Stuhlproben.....	39
4.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	40
4.5 Ethanol-Fällung von Plasmid-DNA.....	40
4.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	40
4.7 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	41
4.8 Horizontale Gelelektrophorese	41
4.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	42
4.9.1 “GeneClean [®] Kit”	42
4.9.2 “QIAquick Gel Extraction Kit”	43
4.10 Entfernen von überhängenden 3'- und 5'-DNA-Enden	43
4.11 “Polymerase chain reaction” (PCR).....	44
4.12 “Long distance”-PCR	44
4.13 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	45
4.14 Herstellung rekombinanter DNA-Moleküle	45
4.15 Herstellung kompetenter Zellen	45
4.15.1 Behandlung mit CaCl ₂	45
4.15.2 Kompetente Zellen für die Elektroporation.....	46
4.16 Transformation von Bakterienzellen.....	46
4.16.1 Transformation mit Hitzeschock	46
4.16.2 Elektroporation	46
4.17 Konjugation zwischen einem <i>E. coli</i> Donor- und Rezipientenstamm	47

4.17.1 Konjugation	47
4.17.2 <i>In vitro</i> -Filterkonjugation	47
4.18 “One-step”-Inaktivierung von chromosomalen Genen in <i>E. coli</i>	47
4.19 Isolierung chromosomaler DNA aus <i>E. coli</i>.....	48
4.20 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)	49
4.20.1 Isolierung von “High Molecular Weight”-DNA für die Pulsfeld-Gelelektrophorese.....	49
4.20.2 Restriktionsspaltung von “High Molecular Weight”-DNA.....	50
4.20.3 Auftrennung von “High Molecular Weight”-DNA durch Gelelektrophorese	51
4.21 “Southern”-Hybridisierung.....	51
4.21.1 Vakuum-“Blotting”	51
4.21.2 Nichtradioaktive Markierung einer DNA-Sonde und Hybridisierung	52
4.22 Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden	53
4.23 Gewinnung von Gesamtzelllysaten durch Lyse mit Laemmli-Puffer	53
4.24 Gewinnung von Gesamtzelllysaten durch Ultraschall.....	54
4.25 Hitzeextraktion von Fimbrien.....	54
4.26 “Western”-Hybridisierung.....	55
4.26.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	55
4.26.2 “Western-Blotting”	56
4.26.3 Antikörperreaktion	57
4.27 Coomassie-Blau-Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen	57
4.28 Qualitative Agglutination	58
4.28.1 Hämagglutinationstest	58
4.28.2 Serumagglutination.....	58
4.28.3 Hefeagglutinationstest	58
4.29 Serumresistenztest.....	59
4.30 Induktion von Bakteriophagen durch Mitomycin C	59
4.31 Phagen-Plaque-Assay.....	59
4.32 Biofilmbildung	60
4.33 Herstellung spontan Antibiotika-resistenter Bakterienklone	60
4.34 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen	60
4.35 Aufzucht von eukaryotischen Zellen	61

4.35.1 Passagieren von INT407-Zellen	61
4.35.2 Stammhaltung von eukaryotischen Zellen	61
4.36 Koinfektions-Invasionsassay	61
4.37 Adhäsionsassay	63
4.38 <i>In vivo</i> Experimente	64
4.38.1 Schutzexperimente.....	64
4.38.2 Immunisierungsexperimente	64
5 ERGEBNISSE	65
5.1 Etablierung eines spezifischen PCR-Nachweissystems für den <i>E. coli</i> Stamm DSM 6601 in Humanstuhl.....	65
5.1.1 Sequenzanalyse des Plasmids pMUT1	65
5.1.2 Sequenzanalyse des Plasmids pMUT2	69
5.1.3 Überprüfung der Spezifität der PCR-Assays.....	72
5.1.4 Validierung der stammspezifischen PCR-Reaktionen auf Basis der Plasmide zum Nachweis von <i>E. coli</i> DSM 6601 aus Humanstuhl	76
5.1.5 Analyse von Patientenstuhlproben	78
5.2 Herstellung und Charakterisierung eines plasmidfreien Klons des <i>E. coli</i> Stammes DSM 6601	81
5.2.1 Konstruktion der Suizidplasmide für die Herstellung eines plasmidfreien Klons des <i>E. coli</i> Stammes DSM 6601	81
5.2.1.1 Konstruktion des Suizidplasmids pMUT1-Tc-Sac	82
5.2.1.2 Konstruktion des Suizidplasmids pMUT2-Kn-Sac.....	83
5.2.2 Herstellung eines plasmidfreien Klons des <i>E. coli</i> Stammes DSM 6601.....	84
5.2.3 Charakterisierung des plasmidfreien <i>E. coli</i> Stammes DSM 6601 Δ pMUT1/2.....	87
5.2.3.1 Einfluss der Plasmide auf das Bakterienwachstum.....	87
5.2.3.2 Einfluss der Plasmide auf die Inhibition der <i>Salmonella</i> -Invasion.....	88
5.2.3.3 Einfluss der Plasmide auf die Phagenresistenz	89
5.2.3.4 Einfluss der Plasmide auf die Biofilmbildung	89
5.2.3.5 Einfluss der Plasmide auf die Serumresistenz	90
5.3 Verwendung der Plasmide des <i>E. coli</i> Stammes DSM 6601 als Klonierungs- vektoren	92
5.3.1 Untersuchungen zur Stabilität der Plasmide pMUT1-Tc und pMUT2-Kn	92
5.3.2 Untersuchung zur Konjugierbarkeit des Plasmids pMUT2.....	93
5.3.3 Expression von fluoreszierenden Proteinen	94
5.3.4 Expression von Adhäsinen	97

5.3.4.1 Expression von ETEC-spezifischen K88ab- und K99-Fimbrien.....	97
5.3.4.2 Expression des Adhäsins Intimtin (Eae) aus EHEC-Bakterien	99
5.3.5 Erste tierexperimentelle Untersuchungen zur Induktion einer Immunantwort	100
5.4 Untersuchungen zur inhibitorischen Wirkung des <i>E. coli</i> Stammes DSM 6601.....	102
5.4.1 Bedeutung der Fimbrienadhäsine des <i>E. coli</i> Stammes DSM 6601 für die inhibitorischen Effekte <i>in vitro</i>	102
5.4.1.1 Herstellung der Fimbriendeletionsmutanten.....	102
5.4.1.2 Komplementation der Fimbriendeletionsmutanten.....	106
5.4.1.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen	107
5.4.1.4 Einfluss der Fimbrien auf die Adhärenz an INT407-Zellen	108
5.4.1.5 Bedeutung der Fimbrien für den inhibitorischen Effekt von <i>E. coli</i> DSM 6601 auf die Invasivität von Salmonellen	109
5.4.2 Untersuchungen zur inhibitorischen Wirkung des <i>E. coli</i> Stammes DSM 6601 <i>in vivo</i>	110
6 DISKUSSION	113
6.1 Entwicklung von stabilen Klonierungsvektoren für den probiotischen <i>E. coli</i> Stamm DSM 6601	113
6.2 Etablierung von Nachweissystemen für den <i>E. coli</i> Stamm DSM 6601	120
6.3 Verwendung des <i>E. coli</i> Stammes DSM 6601 als Modell für ein Lebendvakzin.....	123
6.4 Inhibitorische Wirkungen des <i>E. coli</i> Stammes DSM 6601.....	127
6.5 Ausblick.....	130
7 LITERATUR.....	131
8 ANHANG	148
8.1 Restriktionskarten der in dieser Arbeit konstruierten Plasmide	148
8.2 Sequenzen.....	157
8.3 Abkürzungen	160
8.4 Publikationen.....	163
8.4.1 Originalarbeiten	163
8.4.2 Tagungsbeiträge	163
8.4.3 Patent	164
8.5 Lebenslauf.....	165

1 Zusammenfassung

Der apathogene *E. coli* Stamm DSM 6601 (*E. coli* Nissle 1917) kann als Modellorganismus für die Verwendung eines kommensalen Gram-negativen Bakterienstammes als Probiotikum angesehen werden. Dieser *E. coli* Stamm wurde intensiv erforscht und seine Eigenschaften sind daher gut charakterisiert. Der probiotische Charakter dieses Bakterienstammes ist auf gute Kolonisierungseigenschaften des menschlichen Darms, immunmodulatorische Effekte und antagonistische Wirkungen zurückzuführen. Der *E. coli* Stamm DSM 6601 wird seit einigen Jahrzehnten zur Behandlung verschiedener gastrointestinaler Erkrankungen eingesetzt und seine therapeutische Wirksamkeit ist wissenschaftlich bewiesen. Daher eignet sich dieser Stamm als Modellstamm für die Entwicklung eines bakteriellen Lebendvektors, der für mukosale Immunisierungen oder die zielgerichtete Lieferung von therapeutischen Molekülen in den Darm eingesetzt werden könnte.

Ein Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der kryptischen Plasmide pMUT1 und pMUT2 des probiotischen *E. coli* Stammes DSM 6601 durch Analyse der DNA-Sequenz. Die Analyse ergab, dass das Plasmid pMUT1 ein Replikationssystem vom ColE1-Typ, ein Mobilisierungssystem sowie eine Stabilitätsregion enthält, während das Plasmid pMUT2 ein ColE2-ähnliches Replikationssystem und ein anderes Mobilisierungssystem besitzt. In beiden Plasmiden konnten keine weiteren offenen Leserahmen mit bekannter Funktion identifiziert werden.

Des Weiteren wurde ein spezifisches PCR-Nachweissystem für den *E. coli* Stamm DSM 6601 etabliert, das auf einer Methode zur direkten DNA-Isolierung aus Stuhlproben und einem optimierten PCR-Protokoll für auf den kryptischen Plasmiden basierende Primerkombinationen beruht. Dadurch konnte eine Sensitivität von 10^3 - 10^4 Bakterien/0,1 g Stuhl erreicht werden, die vergleichbar mit den Nachweisgrenzen anderer beschriebener PCR-Nachweissysteme ist. Durch Analysen von Patientenstuhlproben wurde die Spezifität und der diagnostische Nutzen dieses PCR-Nachweissystems bestätigt.

Darüber hinaus wurde eine plasmidfreie Variante des *E. coli* Stammes DSM 6601 hergestellt. Durch funktionelle Untersuchungen dieses Stammes konnten keine Unterschiede im Vergleich zu dem Wildtyp festgestellt werden, wodurch eine mögliche Funktion der beiden kryptischen Plasmide weiterhin unklar bleibt. Diese plasmidfreie Variante kann als Lebendvektor für rekombinante Plasmide auf Basis der Plasmide pMUT1 und pMUT2 verwendet werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von stabilen Klonierungsvektoren für den probiotischen *E. coli* Stamm DSM 6601. Durch Integration von Antibiotika-Resistenzkassetten in die Plasmide pMUT1 und pMUT2 wurden Klonierungsvektoren konstruiert, die auch nach Insertion weiterer DNA-Fragmente ohne Antibiotika-Selektionsdruck stabil in diesem Stamm beibehalten werden. Zusätzlich wurde durch die stabile Expression von fluoreszierenden Proteinen ein visuelles Nachweissystem etabliert, das bei *in vivo* Experimenten verwendet werden kann. Dadurch wird die Möglichkeit geboten, Erkenntnisse über Kolonisierungseigenschaften sowie Interaktionen des *E. coli* Stammes DSM 6601 mit endogenen Mikroorganismen und Zellen des Darmimmunsystems zu erlangen, was zur Aufklärung der Wirkungsweise dieses Stammes beitragen könnte.

Im Hinblick auf die Entwicklung eines Lebendvakzins auf der Basis des probiotischen *E. coli* Stammes DSM 6601 wurden Adhäsine von humanpathogenen enterohämorrhagischen *E. coli* und von tierpathogenen enterotoxischen *E. coli* in diesem Stamm exprimiert. Bei ersten Immunisierungsversuchen in Mäusen konnte jedoch keine Induktion einer spezifischen Immunantwort gegen diese Adhäsine nachgewiesen werden.

Weiterhin wurde die inhibitorische Wirkung des *E. coli* Stammes DSM 6601 auf die Invasivität von Salmonellen *in vitro* und *in vivo* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Typ 1- und F1C-Fimbrien keine Rolle bei dem inhibitorischen Effekt *in vitro* spielen und dass durch diesen *E. coli* Stamm in konventionellen Mäusen keine inhibitorischen Wirkungen nachzuweisen sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bilden durch die Entwicklung von stabilen Klonierungsvektoren und die Etablierung von Nachweissystemen für den probiotischen *E. coli* Stamm DSM 6601 die Grundlage für den Einsatz dieses Stammes als Lebendvektor und für *in vivo* Untersuchungen, die zur Aufklärung der Wirkungsmechanismen dieses Stammes beitragen könnten.

1 Summary

The nonpathogenic *E. coli* strain DSM 6601 (*E. coli* Nissle 1917) can be considered as model organism for the employment of a commensal Gram-negative bacterial strain as a probiotic. This *E. coli* strain has been intensively investigated and therefore its properties are well characterized. The probiotic character of this strain is due to excellent colonization properties of the human gut, immunomodulatory effects and antagonistic activities. The *E. coli* strain DSM 6601 has been used for decades for the treatment of various gastrointestinal diseases and its therapeutic efficacy is scientifically proved. Therefore, this strain is suited as a model strain for the development of a bacterial live vector, which might be used for mucosal immunization or localized delivery of therapeutic molecules into the intestine.

One major aim of this work was the characterization of the cryptic plasmids pMUT1 and pMUT2 of probiotic *E. coli* strain DSM 6601 by DNA sequence analysis. The analysis showed that plasmid pMUT1 carries a replication system of ColE1-type, a mobilization system as well as a stabilization region, whereas plasmid pMUT2 contains a ColE2-like replication system and another mobilization system. Further open reading frames with known function were not identified in both plasmids.

Furthermore, a specific PCR detection system for *E. coli* strain DSM 6601 was established, which uses a method for direct isolation of DNA from faecal samples and an optimized PCR protocol for primer combinations based on the cryptic plasmids. Thereby, a sensitivity of 10^3 - 10^4 bacteria/0,1 g faeces was achieved that is comparable with detection limits of other described PCR detection systems. The specificity and diagnostic utility of this PCR detection system was confirmed by analysis of faecal samples from patients.

In addition, a plasmid-free variant of *E. coli* strain DSM 6601 was constructed. Functional analyses of this strain detected no differences compared to the wildtype, whereby the possible function of both cryptic plasmids still remains unclear. This plasmid-free variant can be used as live vector for recombinant plasmids based on the plasmids pMUT1 and pMUT2.

Another aim of this work was the development of stable cloning vectors for the probiotic *E. coli* strain DSM 6601. Cloning vectors were constructed by integration of antibiotic resistance cassettes in the plasmids pMUT1 and pMUT2, which are still stably maintained following insertion of additional DNA fragments without selection pressure by antibiotics. Furthermore, a

visual detection system was established by the stable expression of fluorescent proteins that can be used in *in vivo* experiments. This offers the opportunity to gain knowledge of colonization properties as well as interactions of *E. coli* strain DSM 6601 with endogenous microorganisms and cells of the gut's immune system, which might contribute to explain the mode of action of this strain.

With regard to the development of a live vaccine based on the probiotic *E. coli* strain DSM 6601, adhesins of human pathogenic enterohaemorrhagic *E. coli* and animal pathogenic enterotoxigenic *E. coli* were expressed in this strain. Induction of specific immune responses to these adhesins were not demonstrated by first immunization experiments in mice.

Moreover, the inhibitory effect of the *E. coli* strain DSM 6601 on *Salmonella* invasion was investigated *in vivo* and *in vitro*. It was demonstrated that type 1 and F1C fimbriae have no influence on the inhibitory effect *in vitro* and that no inhibitory effects could be established in conventional mice by this *E. coli* strain.

By the development of stable cloning vectors and the establishment of detection systems for the *E. coli* strain DSM 6601, the results of this work provide the basis for the employment of this strain as live vector and for *in vivo* investigations, which might contribute to explain this strain's mode of action.

2 Einleitung

Am Anfang des 21. Jahrhunderts sind Infektionserkrankungen immer noch die Hauptursache für Mortalität und Morbidität in menschlichen Populationen, besonders in den Entwicklungsländern (Cripps *et al.*, 2001). Vor allem Darminfektionen, die Durchfallerkrankungen verursachen, gehören, speziell bei Kindern, immer noch zu den häufigsten Todesursachen weltweit (Svennerholm, 2004). Der Einsatz von Antibiotika in der Landwirtschaft sowie bei der Prophylaxe und Behandlung von Infektionskrankheiten beim Menschen führt zudem zu einer signifikanten Zunahme von Antibiotika-resistenten Mikroorganismen. Dies gestaltet die Behandlung dieser Erkrankungen immer schwieriger und teurer (Ogra *et al.*, 2001; Grandi, 2003).

In den industrialisierten Ländern wird außerdem eine Zunahme von Allergien, Autoimmunerkrankungen und inflammatorischen Erkrankungen festgestellt, deren Auftreten mit Störungen des Darmimmunsystems in Verbindung steht. Diese Störungen werden zum Teil durch genetische Faktoren, aber möglicherweise auch durch eine reduzierte Stimulation des Immunsystems durch Mikroben verursacht, was auf Ernährungsgewohnheiten und hygienische Bedingungen des modernen Lebensstils sowie auf verbesserten Impfschutz und den Einsatz antimikrobieller Medikamente zurückgeführt wird (Isolauri, 2001).

In den letzten Jahren wurde daher intensiv an der Erforschung und Entwicklung von Strategien gearbeitet, die zur Prävention und Therapie von Infektionskrankheiten, aber auch zur Prophylaxe und Behandlung von Allergien, Autoimmunerkrankungen und inflammatorischen Erkrankungen eingesetzt werden können. Diese Strategien beruhen unter anderem auf der Entwicklung von mukosalen Lebendimpfstoffen sowie der Verwendung von kommensalen und probiotischen Mikroorganismen.

2.1 Infektionsabwehrsysteme des Intestinaltrakts

Nach dem Respirationstrakt stellt der Gastrointestinaltrakt mit einer Fläche von ca. 250 m² die zweitgrößte Oberfläche des menschlichen Körpers dar. Zusätzlich zu der enormen Menge an Nahrung, die diesen Kanal passiert, ist diese mukosale Oberfläche vielen Aggressoren der äußeren Umgebung ausgesetzt und ist die Eintrittsstelle der meisten pathogenen Mikroorganismen. Aus diesem Grund ist die mukosale Oberfläche des Darms die erste Verteidigungslinie gegen bakterielle Toxine und Infektionen, die durch Bakterien, Viren oder Parasiten hervor-

gerufen werden (Mercenier *et al.*, 2003). Der Darm verfügt daher über ein komplexes Netzwerk von angeborenen, unspezifischen und erworbenen, spezifischen Abwehrmechanismen, die am Schutz des Wirts beteiligt sind. Dieses Verteidigungssystem basiert auf drei Hauptkomponenten, die in permanentem Kontakt und Dialog miteinander stehen: die Mikroflora, die mukosale Barriere und das lokale Immunsystem (Bourlioux *et al.*, 2003).

2.1.1 Die Mikroflora des Gastrointestinaltrakts

Es wird geschätzt, dass der Gastrointestinaltrakt eines erwachsenen Menschen etwa 10^{14} lebende Bakterien enthält. Die Kolonisierung beginnt mit der Geburt und setzt sich durch das ganze Leben fort, was zu einer sehr reichen Flora führt, die aus mehr als 400 verschiedenen Spezies besteht. Die Mehrheit dieser Bakterien ist jedoch nicht mit konventionellen Techniken kultivierbar, kann aber durch molekularbiologische Methoden identifiziert werden (Holzapfel *et al.*, 1998; Shanahan, 2002; Mercenier *et al.*, 2003).

Im Magen ist auf Grund des dort vorliegenden niedrigen pH-Werts, der auf die meisten Mikroben tödlich wirkt, nur eine geringe Anzahl an Mikroorganismen (10^3 - 10^4 koloniebildende Einheiten (KBE)/g) vorhanden. Dort dominieren vor allem säuretolerante Bakterien wie Streptokokken, Laktobazillen und *Helicobacter pylori*, aber auch Hefen wie *Candida albicans*. Durch aggressive Darmflüssigkeiten (z. B. Gallenflüssigkeit, Bauchspeichel) und die kurze Transitzeit stellt auch das Duodenum eine feindliche Umgebung dar und enthält nur eine relativ geringe Anzahl von lediglich transienten Mikroben.

Im Jejunum und Ileum nimmt die Anzahl (bis zu 10^8 KBE/g) und die Vielfalt der Mikroorganismen zu den distalen Regionen hin kontinuierlich zu. Neben Milchsäurebakterien treten Gram-negative fakultativ aerobe Gruppen wie Enterobacteriaceae (z. B. *Escherichia coli* und *Enterobacter* spp.) und obligat anaerobe Gattungen wie *Bacteroides* und *Fusobacterium* auf.

Das Kolon von gesunden Erwachsenen enthält mit einer Anzahl von 10^{10} - 10^{11} KBE/g die höchste Konzentration und Vielfalt an Mikroorganismen. Unter der bekannten Mikroflora des Kolons dominieren wenige Hauptgruppen, die alle strikt anaerob sind, wie *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium* und *Peptostreptococcus*. Fakultativ aerobe Bakterien werden der subdominanten Flora zugerechnet, bestehend aus Enterobacteriaceae, Streptokokken und Laktobazillen. Ebenfalls ist eine kleine Gruppe von pathogenen und opportunistischen Organismen wie z. B. *Clostridium difficile* in geringer Anzahl vorhanden (Berg, 1996; Holzapfel *et al.*, 1998; Isolauri *et al.*, 2004) (Abb. 1).

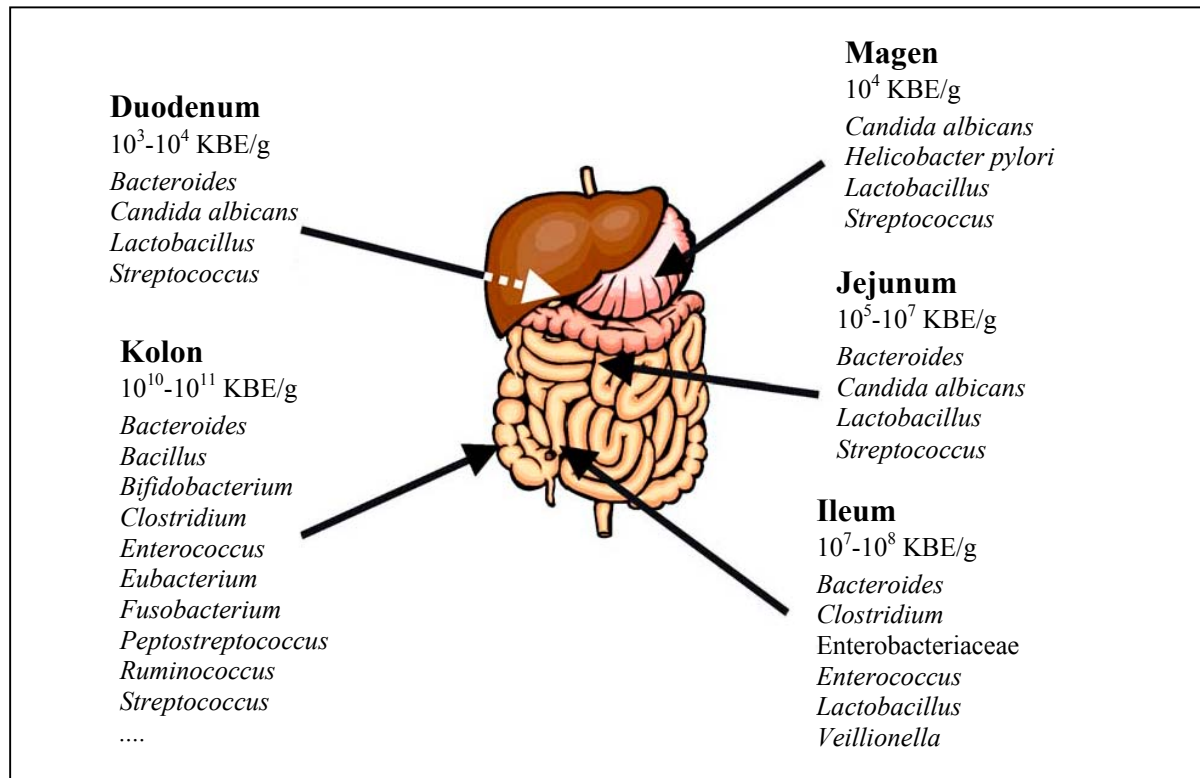


Abb. 1: Besiedlung des Gastrointestinaltrakts (modifiziert nach Isolauri *et al.*, 2004).

Die Normalflora des Darms besitzt eine wichtige Funktion bei der Verteidigung des Organismus gegen Infektionserreger. Sie stellt eine mikrobielle Barriere für die Ansiedlung pathogener und opportunistischer Mikroorganismen dar. Diese Eigenschaft wird als Kolonisierungsresistenz bezeichnet und beruht auf dem Dialog der Bakterien untereinander, Bakterien/Mucin-Interaktionen und dem "Crosstalk" zwischen Bakterien und den Kolonozyten in Verbindung mit Faktoren aus der Umgebung (Holzapfel *et al.*, 1998; Bourlioux *et al.*, 2003).

Zum einen wird hierbei die Ansiedlung von pathogenen Erregern durch die Besetzung potentieller Adhäsionsstellen verhindert, zum anderen wird das Wachstum von Fremdorganismen gehemmt oder diese werden durch die Produktion toxisch wirkender antimikrobieller Substanzen (kurzkettige Fettsäuren, dekonjugierte Gallensäuren, Lyssolezithin, Schwefelwasserstoff, Antibiotika, Bakteriozine und Mikroazine) abgetötet. Eine weitere Rolle spielt die Konkurrenz um essentielle Nährstoffe und Wachstumsfaktoren, die Absenkung des pH-Werts des Milieus durch die Freisetzung von Endprodukten des fermentativen Kohlenhydratstoffwechsels (Ameisen-, Essig-, Propion-, Butter- und Milchsäurebildung), die Absenkung des Sauerstoffpartialdrucks und die Aufrechterhaltung eines niedrigen Redoxpotentials. So wird durch die Metabolisierung von Nährstoffen eine lokale Umgebung geschaffen, die oft ungünstig für das Wachstum vieler Darmpathogene ist (Irrgang & Sonnenborn, 1988; Lu & Walker, 2001; Shanahan, 2002; Isolauri *et al.*, 2004).

Eine entscheidende Bedeutung kommt der normalen Darmflora auch bei der Entwicklung und Modulation des Immunsystems, der Verbesserung der Integrität sowie der Reduktion der Permeabilität des mukosalen Epithels zu (Mercenier *et al.*, 2003; Isolauri *et al.*, 2004).

Durch die intestinale Mikroflora werden zudem Nahrungsbestandteile abgebaut und Verdauungsenzyme, protektive Enzyme sowie Vitamine produziert. Darüber hinaus wird der Energiestoffwechsel der Darmmukosa durch die Produktion kurzkettiger Fettsäuren gefördert und die Peristaltik angeregt. Außerdem ist die Darmflora am Metabolismus potentiell karzinogener Substanzen beteiligt und kann eine Rolle bei der Wirkung von Arzneimitteln spielen (Berg, 1996; Holzapfel *et al.*, 1998; Shanahan, 2002).

2.1.2 Die mukosale Barriere

Die intestinale Mukosa stellt die Hauptinteraktionsstelle des menschlichen Körpers mit fremden Substanzen und Mikroorganismen dar. Sie besteht aus einem Monolayer intestinaler Epithelzellen, die durch enge Zellverbindungen (“tight junctions”) miteinander verbunden sind, und einer aufgelagerten Mukusschicht. Als solches stellt sie eine physikalische Barriere dar, die jedoch zusätzlich mit einer Reihe von angeborenen, unspezifischen Abwehrmechanismen ausgestattet ist (Lu & Walker, 2001; Bourlioux *et al.*, 2003; Mercenier *et al.*, 2003).

Die Mukusschicht ist hauptsächlich aus Mucinglykoproteinen zusammengesetzt, die von den Becherzellen (“goblet cells”) synthetisiert und sekretiert werden. Es werden zwei Arten von Mukus produziert: a) ein unlösliches Gel, das stark an die Epithelzellen adhäriert, und b) eine viskose Form, die wasserlöslich ist und das Gel bedeckt.

Mucinglykoproteine sind aus einem Peptidgrundgerüst und 5 verschiedenen Monosacchariden (Galaktose, Fukose, N-Acetylglukosamin, N-Acetylgalaktosamin und Sialinsäure) aufgebaut. Durch deren unterschiedliche Anordnung in Polysaccharidketten kann eine große Anzahl verschiedener Strukturen gebildet werden, die als Adhäsionsstellen für Bakterien dienen. Die Polysaccharidketten werden durch spezifische Glykosyltransferasen zusammengefügt, deren Expression von den Becherzellen reguliert wird. Jedoch kann die Synthese und Sekretion des Mukus auch durch bakterielle Substanzen wie Toxine und Lipopolysaccharide entweder direkt beeinflusst werden oder indirekt durch verschiedene Zytokine, die von aktivierten Zellen des Wirtsimmunsystems nach ihrem Kontakt mit intestinalen Bakterien sekretiert werden (Deplancke & Gaskins, 2001; Bourlioux *et al.*, 2003; Montagne *et al.*, 2004).

Die Hauptaufgabe des Mukus besteht im Schutz des Epithels vor chemischen, enzymatischen, physikalischen und bakteriellen Aggressoren, die im Darmlumen zugegen sind (Montagne *et al.*, 2004). Außerdem bietet die Mukusschicht den intestinalen Bakterien viele ökologische Vorteile. So stellen die Mucine eine direkte Quelle für Kohlenhydrate und Peptide dar, aber auch Nährstoffe wie Vitamine und Mineralstoffe liegen wahrscheinlich konzentriert im Mukus vor. Zudem wird durch die Kolonisation des Mukus eine schnelle Entfernung der Bakterien durch hydrokinetische Eigenschaften des Darms verhindert. Die Kolonisation der Mukusschicht stellt daher einen Wachstumsvorteil für Mikroorganismen dar, die den Mukus kolonisieren können (Deplancke & Gaskins, 2001).

Die Mukusschicht ist am Schutz vor Infektionen durch zwei unterschiedliche Effekte beteiligt. Zum einen wird durch die Expression spezifischer Mucinepitope die Adhäsion und damit die Kolonisierung von kommensalen Bakterien gefördert, zum anderen werden spezifische Adhäsine von pathogenen Bakterien durch lösliche Mucinepitope gebunden, wodurch verhindert wird, dass diese an Epithelzellen adhären können (Deplancke & Gaskins, 2001).

Zusätzlich verhindert eine stark hydrophobe Oberfläche der Mukusschicht das Eindringen von wasserlöslichen Toxinen in das Epithel. Diese Hydrophobizität wird durch eine Schicht von Lipiden bewirkt, die von den Epithelzellen sekretiert werden und die Oberfläche des Mukus bedecken (Bourlioux *et al.*, 2003).

Ein weiterer wichtiger Abwehrmechanismus der mukosalen Barriere besteht in der Produktion von einer Vielzahl antimikrobieller Peptide, vor allem von Defensinen. Defensine sind kleine kationische Peptide (28-44 Aminosäuren) mit einer charakteristischen β -Faltblattstruktur, die durch drei intramolekulare Cysteindisulfidbrücken stabilisiert werden. Es existieren zwei Subfamilien, α - und β -Defensine, die sich in der Länge der Peptidsegmente zwischen den 6 konservierten Cysteinen und ihrer Faltung unterscheiden. Durch Bildung von Poren zerstören Defensine die Integrität bakterieller Membranen (Bourlioux *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2005).

Spezialisierte Epithelzellen des Dünndarms, die Panethzellen, die an der Basis der Darmkrypten lokalisiert sind, exprimieren α -Defensine (HD-5, HD-6) und verschiedene bakteriolytische Enzyme (Lysozym, Phospholipase A2), die zusammen ein breites Wirkungsspektrum gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien besitzen. Die α -Defensine werden als inaktive Pro-Peptide produziert und gemeinsam mit den bakteriolytischen Enzymen in apikalen zytoplasmatischen Granula gespeichert. Nach der Sekretion des Granulainhalts in das Kryptenlumen werden die Pro-Peptide wahrscheinlich durch Trypsin, das zusammen mit Trypsin-Inhibitoren in Panethzellen exprimiert wird, in eine reife aktive Form umgewandelt. Die Sekretion wird durch

Gram-positive und Gram-negative Bakterien oder durch deren Bestandteile (Lipopolysaccharid, Lipoteichonsäuren, Lipid A, Muramyl-dipeptide) sowie durch cholinergische Substanzen stimuliert (Bourlioux *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2005).

Zusätzlich werden von den intestinalen Epithelzellen des gesamten Darms weitere antimikrobielle Peptide wie β -Defensine (HBD-1-4), das Cathelicidin LL-37/hCAP18, das BPI-Protein (“bactericidal/permeability-increasing protein”) und das Chemokin CCL20 produziert. Diese Peptide werden konstitutiv exprimiert, können aber auch induziert werden. Sie besitzen ein breites Aktivitätsspektrum gegen Gram-negative sowie Gram-positive Bakterien und teilweise sogar gegen Pilze (Müller *et al.*, 2005).

2.1.3 Das lokale intestinale Immunsystem

Der Darm ist das primäre Immunorgan des Körpers und wird durch das darmassoziierte Immunsystem repräsentiert, welches angeborene, antigenunspezifische und erworbene, antigen-spezifische Abwehrsysteme umfasst. Dieses Immunsystem ist in der Lage Nahrungsantigene und den Darm kolonisierende Bakterien zu tolerieren und enteropathogene Mikroorganismen abzuwehren (Bourlioux *et al.*, 2003). Das mukosale Immunsystem stellt somit die erste Verteidigungslinie gegen bakterielle und virale Infektionen dar und spielt außerdem eine bedeutende Rolle bei der Errichtung und Beibehaltung der mukosalen Homöostase zwischen Wirt und der äußeren Umgebung (Kunisawa & Kiyono, 2005).

Durch den Kontakt mit pathogenen Mikroorganismen wird zuerst das angeborene, unspezifische Immunsystem aktiviert (Erickson & Hubbard, 2000). An der unspezifischen Immunabwehr sind Leukozyten (z. B. neutrophile Granulozyten, Makrophagen), die Pathogene phagozytieren und abtöten können, sowie intestinale Epithelzellen beteiligt, die bei der Koordination der Wirtsantwort eine Rolle spielen (Bourlioux *et al.*, 2003).

Die Aktivierung von unspezifischen Immunzellen (Makrophagen, dendritische Zellen, polymorphkernige Leukozyten, Epithelzellen) erfolgt über verschiedene Muster-Erkennungsrezeptoren (“pattern recognition receptors”, PRRs) wie z. B. Toll-like Rezeptoren, die teilweise auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Diese Rezeptoren erkennen verschiedene bakterielle und virale Strukturen bzw. Moleküle, die sogenannten “pathogen associated molecular patterns” (PAMPs), wie Lipopolysaccharid, Lipoteichonsäuren, Lipopeptide, Peptidoglykan, Flagellin, virale doppelsträngige RNA und unmethylierte CpG-DNA-Sequenzmotive (Bourlioux *et al.*, 2003; Collier-Hyams & Neish, 2005; Kelly & Conway, 2005). Durch die Interaktion von PAMPs mit Toll-like

Rezeptoren werden Transmembransignale erzeugt, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (“nuclear transcription factor κ B”) führen, der an spezifische Promotorsequenzen bindet und die Transkription und Expression einer Reihe von Genen aktiviert, die für proinflammatorische Zytokine, Chemokine und induzierbare proinflammatorische Enzyme kodieren. Dies führt durch die Induktion phagozytischer Aktivitäten und durch die Produktion von reaktiven Sauerstoff/Stickstoffoxid-Radikalen, die ein hohes antimikrobielles Potential besitzen, zu einer inflammatorischen Immunantwort (Bourlioux *et al.*, 2003; Alexopoulou & Kontoyiannis, 2005).

Für die spezifische Immunabwehr besitzt das darmassoziierte Immunsystem zahlreiche immunkompetente Zellen (B- und T-Lymphozyten, dendritische Zellen, Makrophagen, Granulozyten), die ein dynamisches mukosales Netzwerk für die Induktion und Regulation von humoralen (sekretorische IgA-Antikörper) und zellulären Immunantworten (zytotoxische T-Zellen) bilden (Kunisawa & Kiyono, 2005). Diese Immunzellen sind Bestandteile des Mukosa-assoziierten Immunsystems (“mucosa-associated lymphoid tissue”, MALT) des Gastrointestinaltrakts. Das MALT ist zusammengesetzt aus spezialisierten histologischen Strukturen, den Peyer’schen Plaques im Dünndarm und den Lymphfollikeln im Dickdarm (organisiertes MALT), die als induktive Gewebe für mukosale Immunantworten fungieren, und aus verschiedenen Immunzellen, die über den Gastrointestinaltrakt verteilt sind (diffuses MALT) (Rumbo & Schiffrin, 2005). Das diffuse MALT besteht aus Immunglobulin A (IgA)-produzierenden Plasmazellen und reifen T-Zellen, die auf Grund ihrer Funktion als T-Helfer-Zellen ($CD4^+$) oder zytotoxische T-Lymphozyten ($CD8^+$) unterschieden werden, sowie aus intraepithelialen T-Lymphozyten (Bourlioux *et al.*, 2003).

Lymphozyten exprimieren spezifische Rezeptoren für Antigene, die in Verbindung mit Molekülen des Haupthistokompatibilitäts-Komplexes (“major histocompatibility complex”, MHC) von antigenpräsentierenden Zellen dargeboten werden. Diese Antigenpräsentation führt zur Aktivierung von verschiedenen Subtypen von T-Helfer-Zellen (Th-Zellen). Während Th2-Zellen Zytokine sekretieren, durch die antigenspezifische B-Zellen aktiviert werden, sind Th1-Zellen hauptsächlich an Entzündungsreaktionen und der Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen beteiligt (Erickson & Hubbard, 2000).

Die organisierten Strukturen des MALT (z. B. Peyer’sche Plaques) bestehen aus einer Ansammlung von naiven B-Zellen, die oftmals in ein Keimzentrum eingeschlossen sind, sowie aus follikulären dendritischen Zellen und $CD4^+$ T-Lymphozyten. Diese sind von dem Follikel-assoziierten Epithel (FAE) überlagert, das antigensammelnde M (“microfold”)-Zellen enthält, die

durch das Fehlen eines Bürstensaums, limitierte Mukusproduktion, eine geringe Degradationsaktivität sowie eine hohe Transzytoseaktivität charakterisiert sind (Kunisawa & Kiyono, 2005). Durch M-Zellen erfolgt die Translokation von Antigenen aus dem Darmlumen zu den dendritischen Zellen im subepithelialen Bereich der Peyer'schen Plaques (Müller *et al.*, 2005). Die dendritischen Zellen prozessieren diese Antigene und wandern in interfollikuläre Gebiete der Peyer'schen Plaques. Hier aktivieren sie durch die Präsentation von Antigenepitopen T-Zellen. In den Peyer'schen Plaques erfolgt zudem unter dem Einfluss von TGF- β ("transforming growth factor β ") und durch Antigenstimulation der Antikörper-Klassenswitch von IgM-sezernierenden B-Zellen zu IgA-spezifischen B-Zellen (Kunisawa & Kiyono, 2005). Nach der Aktivierung durch Antigene verlassen B- und T-Zellen die induktiven Gewebe, gelangen über die Lymphe in den Blutkreislauf und wandern zu mukosalen Effektorgeweben wie die intestinale Lamina propria. Dieser Prozess wird als "Homing" bezeichnet und wird durch die Expression von spezifischen Adhäsionsmolekülen ("mucosal addressin cell adhesion molecule 1", MAdCAM-1) auf vaskulären Endothelzellen und spezifischen Rezeptoren ($\alpha_4\beta_7$ -Integrine) auf der Oberfläche von aktivierten Lymphozyten kontrolliert (Ogra *et al.*, 2001; Pickard *et al.*, 2004; Holmgren & Czerkinsky, 2005) (Abb.2).

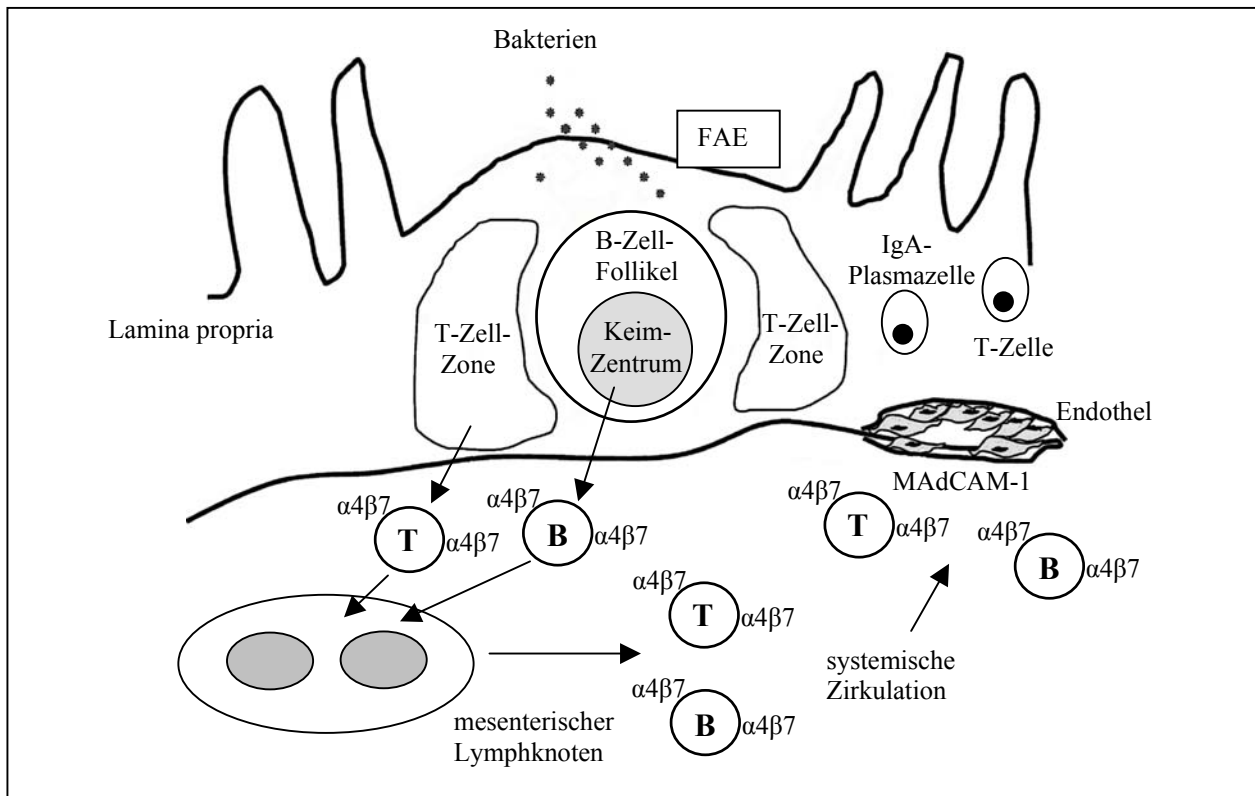


Abb. 2: Schematische Darstellung der Aktivierung von B- und T-Zellen in Peyer'schen Plaques und des Migrationsprozesses der B- und T-Zellen zur intestinalen Lamina propria (modifiziert nach Pickard *et al.*, 2004).

In der Lamina propria erfolgt unter dem Einfluss von Zytokinen (Interleukin-5 (IL-5) und IL-6) die terminale Differenzierung der aktivierten B-Zellen zu IgA-produzierenden Plasmazellen. Durch die zusätzliche Expression einer J-Kette ("joining chain") wird IgA zu Dimeren oder Polymeren oligomerisiert. Polymere IgA-Antikörper binden über die J-Kette an einen Poly-Immunglobulin-Rezeptor (pIgR), der an der Basalmembran von Epithelzellen exprimiert wird. Durch Transzytose erfolgt der Transport von IgA in das Darmlumen. Dort wird eine sekretorische Komponente des pIgR abgespalten und somit sekretorisches IgA (s-IgA) gebildet. Durch s-IgA werden Infektionen durch Viren und Bakterien verhindert sowie mikrobielle Toxine neutralisiert (Kunisawa & Kiyono, 2005; Rumbo & Schiffrin, 2005).

Das Effektorgewebe enthält zudem verschiedene T-Zellen, die Helfer-, Regulator- und zytolytische Aktivitäten aufweisen und so bei der Regulation der protektiven Immunität auf den mukosalen Oberflächen helfen. Zusätzlich ist eine T-Zellpopulation intraepithelialer Lymphozyten zwischen den Epithelzellen lokalisiert, die eine zytotoxische Funktion gegen pathogen-infizierte Zellen besitzen (Kunisawa & Kiyono, 2005).

Eine weitere wichtige Eigenschaft des darmassoziierten Immunsystems besteht in der Unterscheidung harmloser Nahrungsantigene und kommensaler Bakterien von pathogenen Mikroorganismen. Antigene von Kommensalen werden nicht einfach ignoriert, sondern steuern einen aktiven immunsupprimierenden Prozess, der als orale Toleranz bezeichnet wird (Dubois *et al.*, 2005).

Die Induktion der oralen Toleranz kann auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen. Während eine hohe Antigenexposition zur Inaktivierung von antigenspezifischen T-Zellen durch Anergie und/oder klonale Deletion führt, induziert eine geringe Antigenexposition Toleranz durch aktive Immunsuppression, die durch verschiedene regulatorische T-Zellen (Th3, Tr1 und T_{reg}) vermittelt wird. Die supprimierende Funktion von Th3 und Tr1 regulatorischen T-Zellen ist dabei im Wesentlichen von der Produktion von TGF- β ("transforming-growth factor β ") und Interleukin-10 (IL-10) abhängig, während T_{reg}-Zellen die Proliferation von antigenspezifischen T-Zellen durch einen zellkontaktabhängigen Mechanismus unterdrücken (Dubois *et al.*, 2005; Holmgren & Czerkinsky, 2005).

Da die meisten Bakterien, Viren und Parasiten ihren Wirt über mukosale Oberflächen infizieren, ist es wünschenswert, durch eine Impfung eine mukosale Immunantwort zu stimulieren, um eine Infektion und damit eine Erkrankung zu verhindern. Während parenteral verabreichte Vakzine hauptsächlich systemische Immunantworten auslösen, können auf dem mukosalen Weg (z. B. oral oder intranasal) applizierte Impfstoffe sowohl mukosale als auch systemische Immunant-

worten induzieren, wie sie auch bei natürlichen Infektionen durch ein Pathogen hervorgerufen werden (Medina & Guzmán, 2000; Garmory *et al.*, 2003). Aus diesem Grund wird an der Entwicklung neuer Impfstoffe gearbeitet, die auf dem mukosalen Weg verabreicht werden können. Eine Strategie beruht hierbei auf der Herstellung von bakteriellen Lebendvakzinen.

2.2 Einsatz von Lebendimpfstoffen

Als Lebendimpfstoffe werden in ihrer Virulenz abgeschwächte (attenuierte) Bakterien und Viren verwendet, die, obwohl sie den Wirt infizieren, keine oder nur schwache Krankheitssymptome hervorrufen (Babiuk, 1999). Zur Zeit werden die oral applizierbaren Impfstoffe gegen Polio ("oral poliovirus vaccine", OPV) und Typhus (*Salmonella thyphi* Ty21a) sowie die Injektionsimpfstoffe gegen Masern, Mumps, Röteln und Tuberkulose (attenuierter *Mycobacterium bovis* Stamm, Bacille Calmette-Guérin bzw. BCG) häufig eingesetzt. Alle diese Vakzine wurden durch klassische Methoden wie *in vitro* Passage oder chemische Mutagenese attenuiert (Ellis, 1999). Die moderne Biotechnologie und das Wissen über Virulenzfaktoren von Infektionserregern ermöglicht mittlerweile durch eine gezielte Deletion von Virulenz- oder essentiellen Stoffwechselgenen die Herstellung von genetisch definierten attenuierten Mikroorganismen (Ellis, 1999; Babiuk, 1999). So konnte zum Beispiel ein oral applizierbares lizenziertes Cholera-Vakzin (*Vibrio cholerae* Stamm CVD103-HgR) hergestellt werden, indem in dem wildtypischen *V. cholerae* O1-Stamm 94 % des für die A-Untereinheit des Choleratoxins kodierenden Gens deletiert und ein Quecksilberionen-Resistenzgen in den Hämolyisin A-Lokus inseriert wurde (Svennerholm, 2004).

Attenuierte Lebendimpfstoffe können nicht nur als Vakzine gegen das entsprechende Pathogen verwendet werden, sondern auch als Vektoren für die Expression heterologer Antigene von anderen pathogenen Mikroorganismen oder als Überträger von DNA-Vakzinen (Ellis, 1999). Zu diesem Zweck wurden zahlreiche attenuierte Mutanten von verschiedenen pathogenen Erregern hergestellt, von denen sich jedoch nur wenige als Trägerorganismen eignen. Am besten sind attenuierte Mutanten von *Salmonella* spp. charakterisiert, die defizient in den Genen für die Biosynthese aromatischer Aminosäuren (z. B. *aroA*, *aroC* und *aroD*) (Hoiseh & Stocker, 1981) oder Purinen (z. B. *purA* oder *purE*) (O'Callaghan *et al.*, 1988) und für die Produktion von Adenylatcyclase (*cya*) oder zyklischem AMP-Rezeptorprotein (*crp*) (Curtiss & Kelly, 1987) sind, sowie Stämme mit Mutationen, die das globale PhoP/PhoQ-Regulatorsystem betreffen (Galán & Curtiss, 1989; Hohmann *et al.*, 1996). Aber auch von anderen pathogenen Bakterien wie *Shigella*

flexneri (Phalipon & Sansonetti, 1995), *Yersinia enterocolitica* (O’Gaora *et al.*, 1989), *Vibrio cholerae* (Favre *et al.*, 1996), *Listeria monocytogenes* (Weiskirch & Paterson, 1997; Thompson *et al.*, 1998) und *Bordetella* spp. (Stevenson & Roberts, 2003) wurden geeignete attenuierte Vakzinestämme entwickelt.

Für die Übertragung von DNA-Vakzinen können intrazellulär replizierende attenuierte Bakterien eingesetzt werden. DNA-Vakzine bestehen aus Plasmiden, die eukaryotische Expressionskassetten enthalten. In der Wirtszelle werden auf dem Plasmid kodierte Antigene synthetisiert und induzieren je nach Art der Antigenexpression (sekretiert oder oberflächenassoziiert) humorale oder zelluläre Immunantworten (Ellis, 1999). Die Übertragung von DNA-Vakzinen und die Induktion von effizienten Immunantworten gegen verschiedene Antigene konnte im Tiermodell durch die Verwendung von *Salmonella typhimurium* (Darji *et al.*, 1997, 2000; Paglia *et al.*, 1998), *Yersinia enterocolitica* (Al-Mariri *et al.*, 2002) und *Shigella flexneri* (Sizemore *et al.*, 1997) als Lebendvektoren erfolgreich demonstriert werden.

Auf dem mukosalen Weg applizierbare attenuierte Bakterien können aber auch zur Expression von heterologen Antigenen verwendet werden (Ellis, 1999). Rekombinante *Salmonella* spp. induzierten im Tiermodell effiziente Immunantworten gegen zahlreiche Bakterien (z. B. enteropathogene *E. coli* (Schriefer *et al.*, 1999), *Bordetella pertussis* (Strugnell *et al.*, 1992), *Listeria monocytogenes* (Hess *et al.*, 1996), *Borrelia burgdorferi* (Dunne *et al.*, 1995), *Helicobacter pylori* (Koesling *et al.*, 2002) und *Streptococcus pneumoniae* (Kang *et al.*, 2002)), aber auch gegen Viren (z. B. Herpes Simplex Virus (Chabalgoity *et al.*, 1996) und humanes Papillomavirus (Baud *et al.*, 2004)) sowie gegen Parasiten (z. B. *Leishmania mexicana mexicana* (Gonzalez *et al.*, 1998) und *Plasmodium berghei* (Aggarwal *et al.*, 1990)). Auch andere attenuierte Bakterienstämme wie *Vibrio cholerae* (Ryan *et al.*, 1997; John *et al.*, 2002), *Bordetella pertussis* (Stevenson & Roberts, 2003), Bacille Calmette-Guérin (Cirillo *et al.*, 1995; Hayward *et al.*, 1999), *Listeria monocytogenes* (Peters *et al.*, 2003), *Yersinia enterocolitica* (Sory *et al.*, 1990) und *Shigella flexneri* (Altboum *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2005) wurden erfolgreich als Antigen-träger verwendet.

Obwohl intensiv daran gearbeitet wurde die Pathogenität von attenuierten Stämmen zu reduzieren, besitzen diese noch immer verschiedene invasive und virulente Eigenschaften. Daher sollten diese attenuierten Stämme nur begrenzt bei Kindern und Menschen mit einer Immunschwäche eingesetzt werden (Nouaille *et al.*, 2003). Aus diesem Grund wird an der Entwicklung von Lebendimpfstoffen gearbeitet, bei denen apathogene kommensale oder probiotische Bakterien als Trägerorganismen für die Expression heterologer Antigene eingesetzt werden.

So konnten durch die Verwendung rekombinanter Stämme von *Staphylococcus carnosus* (Cano *et al.*, 2000), *Streptococcus gordonii* (Oggioni *et al.*, 1999; Medaglini *et al.*, 2001), *Lactobacillus* spp. (Grangette *et al.*, 2001; Scheppler *et al.*, 2002) sowie *Lactococcus lactis* (Robinson *et al.*, 1997; Dieye *et al.*, 2003) Immunantworten gegen verschiedene Antigene im Tiermodell stimuliert werden. Durch die Coexpression von Interleukinen (IL-2, IL-6 oder IL-12) und heterologem Antigen in *Lactococcus lactis* konnte sogar die Immunantwort gegen das coexprimierte Antigen verstärkt werden (Steidler *et al.*, 1998; Bermudez-Humaran *et al.*, 2003).

Seit einigen Jahren wird zudem an Lebendimpfstoffen auf der Basis von apathogenen kommensalen und probiotischen Bakterien gearbeitet, die zur passiven Immunisierung (Krüger *et al.*, 2002), zur Induktion von mukosaler Toleranz (Maassen *et al.*, 2003) oder zur Übertragung von therapeutischen Molekülen (Steidler *et al.*, 2000; Drouault *et al.*, 2002; Paton *et al.*, 2005) verwendet werden können.

2.3 Probiotika

Probiotika sind definiert als “lebende Mikroorganismen, die eine positive Wirkung auf die Gesundheit ausüben, wenn sie in ausreichender Menge verabreicht werden” (FAO/WHO, 2001).

Das Konzept der Probiotika entwickelte sich aus einer Theorie des russischen Nobelpreisträgers Eli Metchnikoff zu Beginn des 20. Jahrhunderts, der vermutete, dass das lange Leben bulgarischer Kleinbauern aus deren Konsum fermentierter Milchprodukte resultierte. Er glaubte, dass der Verzehr des fermentierenden Bacillus (*Lactobacillus*) die Darmflora günstig beeinflusst durch Verminderung toxischer Effekte von Mikroorganismen. Dieses Konzept wurde in den vergangenen Jahrzehnten weiterentwickelt und positive Ergebnisse aus Untersuchungen an freiwilligen Testpersonen oder klinischen Studien bestätigten das probiotische Konzept (Gibson & Fuller, 2000; Sanders, 2000; Mercenier *et al.*, 2003).

Auf Grund des erkannten Nutzens für die Gesundheit wurden in den vergangenen 20 Jahren probiotische Bakterien, vor allem *Lactobacilli* und *Bifidobacteria*, zunehmend Joghurts und fermentierten Milchprodukten zugesetzt, aber auch pharmazeutische Präparate und Nahrungsergänzungsmittel in Form von Pulvern, Tabletten und flüssigen Suspensionen sind im Handel erhältlich (Gibson & Fuller, 2000; Saarela *et al.*, 2000; Mercenier *et al.*, 2003). In Tabelle 1 sind die am häufigsten verwendeten probiotischen Mikroorganismen zusammengefasst.

Tab.1: In probiotischen Produkten verwendete Mikroorganismen (Zusammenfassung Holzapfel *et al.*, 1998; Mercenier *et al.*, 2003).

Lactobacillus Spezies	Bifidobacterium Spezies	Weitere Milchsäurebakterien	Sonstige
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> ^{a)}	<i>Bacillus cereus</i> ("toyoi") ^{a), d)}
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	
<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>		<i>Escherichia coli</i> ("Nissle 1917") ^{d)}
<i>L. gallinarum</i> ^{a)}	<i>B. breve</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ^{c)}	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. infantis</i>		<i>Propionibacterium</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. lactis</i> ^{b)}	<i>Leuconostoc</i>	<i>freudenreichii</i> ^{a), d)}
<i>L. paracasei</i>	<i>B. longum</i>	<i>mesenteroides</i> ^{c)}	
<i>L. plantarum</i>	<i>B. species 420</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. reuteri</i>		<i>Pediococcus acidilactici</i> ^{c)}	("boulardii") ^{d)}
<i>L. rhamnosus</i>			
<i>L. bulgaricus</i>		<i>Sporolactobacillus</i>	
<i>L. delbrueckii</i>		<i>inulinus</i> ^{a)}	
<i>L. fermentum</i>			
<i>L. helveticus</i>		<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. salivarius</i>			

^{a)} hauptsächlich bei Tieren verwendet

^{b)} wahrscheinlich synonym zu *B. animalis*

^{c)} wenig bekannt von probiotischen Eigenschaften

^{d)} hauptsächlich pharmazeutische Präparate

In den letzten Jahren wurden zahlreiche experimentelle und klinische Versuche durchgeführt, bei denen der mögliche Einsatz von Probiotika zur Behandlung und Prävention verschiedener intestinaler und extraintestinaler Erkrankungen untersucht wurde. Hierbei konnten positive Wirkungen bei vielen verschiedenen Indikationen festgestellt werden, die jedoch kritisch betrachtet werden müssen, da diese Effekte zum größten Teil nicht durch anerkannte kontrollierte klinische Studien bewiesen wurden. Im Folgenden sind Erkrankungen aufgelistet bei denen durch Probiotika positive Wirkungen erzielt wurden:

Intestinale Erkrankungen:

- Durchfallerkrankungen:
 - Reisediarrhö (Saavedra, 2001)
 - Antibiotika-assoziierte Diarrhö (Surawicz *et al.*, 1989; Rolfe, 2000; Saavedra, 2001; Kotowska *et al.*, 2005)
 - akute Diarrhözustände bei Kindern (Oberhelman *et al.*, 1999; Saavedra, 2001; Weizman *et al.*, 2005)
 - Rotavirus-assoziierte Diarrhö (Rolfe, 2000; Mercenier *et al.*, 2003)
 - *Clostridium difficile*-assoziierte Diarrhö (McFarland *et al.*, 1994; Pochapin, 2000)
 - HIV-assoziierte Diarrhö (Rolfe, 2000)
 - mit künstlicher Ernährung assoziierte Diarrhö (Bleichner *et al.*, 1997)

- chronisch entzündliche Darmerkrankungen:
 - Colitis ulcerosa (Venturi *et al.*, 1999; Kruis *et al.*, 1997, 2004)
 - Morbus Crohn (Malchow, 1997; Guslandi *et al.*, 2000)
 - chronische Pouchitis (Gionchetti *et al.*, 2000; Marteau *et al.*, 2002)
- Reizdarmsyndrom (Madden & Hunter, 2002; Mercenier *et al.*, 2003)
- chronische Obstipation (Möllenbrink & Bruckschen, 1994)
- übermäßiges Bakterienwachstum im Dünndarm (Vanderhoof *et al.*, 1998)
- *Helicobacter pylori* Gastroenteritis (Cremonini *et al.*, 2001; Felley *et al.*, 2001)
- Darmkrebs (Brady *et al.*, 2000; Wollowski *et al.*, 2001; Rafter, 2002)
- Laktose-Intoleranz (Shermak *et al.*, 1995; Vesa *et al.*, 2000)
- Saccharase-Isomaltase-Defizienz (Harms *et al.*, 1987)

Extraintestinale Erkrankungen:

- Infektionen des Urogenitaltrakts (Hallen *et al.*, 1992; Sanders, 2000)
- Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems:
 - Bluthochdruck (Hata *et al.*, 1996; Sanders, 2000)
 - Erhöhter Cholesterolspiegel (Sanders, 2000; Mercenier *et al.*, 2003)
- Allergien (Pelto *et al.*, 1998; Lodinová-Zádníková *et al.*, 2003)
- atopische Erkrankungen, atopische Ekzeme (Majamaa & Isolauri, 1997; Isolauri *et al.*, 2000; Kalliomäki *et al.*, 2001)
- juvenile chronische Arthritis (Malin *et al.*, 1996)
- Endotoxämie in Verbindung mit alkoholinduzierter Lebererkrankung (Nanji *et al.*, 1994)
- Karies (Näse *et al.*, 2001)
- Nierensteine (Campieri *et al.*, 2001)

Neben dem Einsatz von Probiotika beim Menschen können probiotische Mikroorganismen auch in der Veterinärmedizin und bei der Tieraufzucht von Nutzen sein. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass durch die Applikation von Probiotika die Kolonisierung von Tieren durch verschiedene pathogene Bakterien wie *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7, *Campylobacter* spp. und *Listeria* spp. reduziert oder verhindert werden kann. Dies hat zur Folge, dass einerseits das Auftreten und die Ausprägung von Infektionskrankheiten, vor allem bei Jungtieren, reduziert und andererseits die Übertragung von pathogenen Keimen durch Schlachttiere auf den Menschen verhindert wird (Sanders, 2000; Ogawa *et al.*, 2001; von Buenau *et al.*, 2005).

Die Wirkungen von Probiotika beruhen hauptsächlich auf der Stärkung der endogenen Verteidigungsbarrieren (Isolauri *et al.*, 2001). So wird zum einen durch probiotische Mikroorganismen durch Konkurrenz um Nährstoffe, Blockierung von Adhäsionsstellen und Produktion von antimikrobiellen Substanzen (z. B. Bakteriozine, Mikroazine, organische Säuren, Wasserstoffperoxid) die Kolonisierung anderer Bakterien verhindert (Kolonisierungsresistenz). Dies führt zu Änderungen der Zusammensetzung der intestinalen Mikroflora, der metabolischen Aktivitäten und der Toxinproduktion (Holzapfel *et al.*, 1998; Rolfe, 2000; Sanders, 2000; Patzer *et al.*, 2003). Zum anderen wird die mukosale Barriere durch Produktion essentieller Nährstoffe für die Kolon-schleimhaut, Stimulation der Proliferation von Kolonozyten, Beeinflussung der Mucinproduktion und Induktion der Defensinproduktion stabilisiert, wodurch die Integrität der Darmmukosa aufrechterhalten und somit eine mikrobielle Translokation verhindert wird (Holzapfel *et al.*, 1998; Mack *et al.*, 1999; Frič, 2002; Wehkamp *et al.*, 2004; Snelling, 2005).

Des Weiteren konnte in zahlreichen *in vivo* und *in vitro* Studien gezeigt werden, dass durch probiotische Mikroorganismen sowohl spezifische als auch unspezifische Immunantworten stimuliert und moduliert werden. So wird durch Probiotika die Produktion von Makrophagen angeregt, die phagozytische Aktivität von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten gesteigert, die Synthese von proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen induziert und die Balance zwischen den verschiedenen T-Helfer-Zellen (Th1/Th2) reguliert. Außerdem werden mukosale und systemische Immunantworten stimuliert. Es wurde festgestellt, dass durch probiotische Bakterien die Produktion von Serum-IgA und sekretorischem IgA gesteigert wird, antigenspezifische Immunantworten durch adjuvante Effekte verstärkt und die Lymphozytenpopulationen vermehrt werden (Isolauri *et al.*, 2001; Cross, 2002; He *et al.*, 2000; Mercenier *et al.*, 2003).

Weitere beschriebene probiotische Wirkungen beruhen auf der Bereitstellung von Enzymen, der Beeinflussung von Enzymaktivitäten, der Modifikation von Nahrungsproteinen und antimutagenen Effekten (Holzapfel *et al.*, 1998; Sanders, 2000).

In Tabelle 2 sind mögliche Wirkungsmechanismen von Milchsäurebakterien in Verbindung mit den entsprechenden positiven Effekten für die Gesundheit zusammengefasst. Jedoch müssen diese Mechanismen größtenteils erst durch weitere Untersuchungen bewiesen werden.

Tab. 2: Zusammenfassung positiver Effekte von Milchsäurebakterien in Verbindung mit den vermutlich zu Grunde liegenden Wirkungsmechanismen (Mercenier *et al.*, 2003; Sanders, 2003)

positiver Effekt	möglicher Wirkungsmechanismus
Verminderung der Laktoseintoleranz	- Wirkung der bakteriellen β -Galaktosidase auf Laktose
Positiver Einfluss auf intestinale Flora	- Beeinflussung der Aktivität von übermäßig wachsender Flora verringert die Produktion von toxischen Metaboliten - Antibakterielle Eigenschaften
Prävention von Infektionen des Intestinaltrakts	- Erhöhung der Antikörperproduktion durch adjuvanten Effekt - Stimulation von systemischen oder sekretorischen Immunantworten - Kompetitive Exklusion - Änderung der intestinalen Bedingungen (pH, kurzkettige Fettsäuren, Bakteriozine) - Änderung von Toxin-Bindungsstellen - Änderung der Darmflora - Adhärenz an intestinale Mukosa verhindert Adhärenz von Pathogenen - Konkurrenz um Nährstoffe
Verbesserung des Immunsystems	- Stärkung der unspezifischen Abwehr gegen Infektionen - Erhöhung der phagozytischen Aktivität von Leukozyten - Erhöhung der IgA Produktion - Proliferation von intraepithelialen Lymphozyten - adjuvanter Effekt bei antigenspezifischen Immunantworten - Regulation der Th1/Th2 Balance, Induktion der Zytokinsynthese
Reduktion von inflammatorischen und allergischen Reaktionen	- Wiederherstellung der Homöostase des Immunsystems - Regulation der Zytokinsynthese - Prävention von Antigen-Translokation in den Blutkreislauf
Anti-Darmkrebsseffekt	- Mutagenbindung - Karzinogendeaktivierung - Änderung der Aktivität von Darmmikroben - Immunstimulation - Einfluss auf Konzentration sekundärer Gallensalze
Blutfette, Herzerkrankungen	- Assimilation von Cholesterol - Änderung der Aktivität von Gallensalz-Hydrolase-Enzymen - Antioxidativer Effekt
Blutdrucksenkender Effekt	- Aktivität von Peptidase auf Milch führt zu blutdrucksenkenden Tripeptiden (Angiotensin-Converting-Enzym Inhibitoren) - Zellwandkomponenten wirken als Angiotensin-Converting-Enzym Inhibitoren
Infektionen des Urogenitaltrakts	- Adhäsion an Zellen des Harn- und Vaginaltrakts - Kompetitive Exklusion - Produktion von Inhibitoren (H_2O_2 , "Biosurfactants")
Infektionen durch <i>Helicobacter pylori</i>	- Kompetitive Exklusion - Produktion von Milchsäure - Produktion von antimikrobiellen Substanzen - Reduzierung der Urease-Aktivität von <i>H. pylori</i>

Fortsetzung Tab. 2

positiver Effekt	möglicher Wirkungsmechanismus
Karies	- Änderung der oralen Mikroflora - Änderung der Aktivität der oralen Mikroflora - Beeinflussung der Fähigkeit, an Zähne zu adhären
Nierensteine	- Beeinflussung der Degradation von Oxalat durch Änderung der Darmflora
Endotoxämie	- Inhibierung von Endotoxin-produzierender intestinaler Mikroflora

2.4 Der probiotische *E. coli* Stamm DSM 6601

Der *Escherichia coli* Stamm DSM 6601 (synonym *E. coli* Nissle 1917), ein apathogenes Fäkal-Isolat der Serogruppe O6:K5:H1 (Nissle, 1918; Blum *et al.*, 1995), ist die aktive Komponente des probiotischen Medikaments Mutaflor[®], das bei der Behandlung von verschiedenen gastrointestinalen Störungen und Erkrankungen wie chronischer Obstipation (Möllenbrink & Bruckschen, 1994; Bruckschen & Horosiewicz, 1994), Colitis ulcerosa (Kruis *et al.*, 1997, 2004; Rembacken *et al.*, 1999) und Morbus Crohn (Malchow, 1997) eingesetzt wird. Dieser Bakterienstamm wurde während des ersten Weltkriegs im Jahre 1917 von dem Freiburger Hygieniker und Bakteriologen Alfred Nissle aus dem Stuhl eines Soldaten des Balkanfeldzugs isoliert, der im Gegensatz zu seinen Kameraden nicht an Diarrhö erkrankte. Nissle vermutete, dass dieser *E. coli* Stamm für den Schutz des Soldaten vor infektiöser Diarrhö verantwortlich war und daher hilfreich bei der Aufrechterhaltung eines gesunden Milieus im Darm durch Verdrängung von pathogenen Bakterien sein könnte (Nissle, 1925; Patzer *et al.*, 2003).

Die wissenschaftliche Anerkennung als therapeutisch wirksames Probiotikum erlangte der *E. coli* Stamm DSM 6601 auf Grund von klinischen kontrollierten, randomisierten Doppelblindstudien von Rembacken *et al.* (1999) und Kruis *et al.* (1997, 2004). In den Studien wurde gezeigt, dass durch diesen Stamm die Remission der chronisch entzündlichen Darmerkrankung Colitis ulcerosa erhalten werden kann und dabei eine mit dem Medikament Mesalazin äquivalente Wirksamkeit erzielt wird (Hoffmann & Kruis, 2002).

Der *E. coli* Stamm DSM 6601 besitzt die Fähigkeit, den Darm von Menschen (Lodinová-Žádníková & Sonnenborn, 1997; Malchow *et al.*, 1995) sowie von gnotobiotischen Ferkeln (Gunzer *et al.*, 2002) und Mäusen (Waidmann *et al.*, 2003) effizient zu kolonisieren. Dieser Stamm produziert drei unterschiedliche Fimbrientypen (Typ 1-, F1C- und Curli-Fimbrien) und verfügt über sechs verschiedene Eisenaufnahmesysteme (Aerobaktin, Salmochelin, Enterobaktin,

Yersiniabaktin, ein Hämin- und ein Citrat-abhängiges Eisenaufnahmesystem). Zusätzlich exprimiert der *E. coli* Stamm DSM 6601 eine K5-Kapsel, eine H1-Flagelle, eine Protease (Sat), zwei Mikrozine (H47 und M) und Zellulose. Darüber hinaus weist dieser Bakterienstamm einen semirauen O6-Lipopolysaccharid-Phänotyp auf und ist serumsensitiv (Patzner *et al.*, 2003; Grozdanov *et al.*, 2002, 2004) (Abb.3).

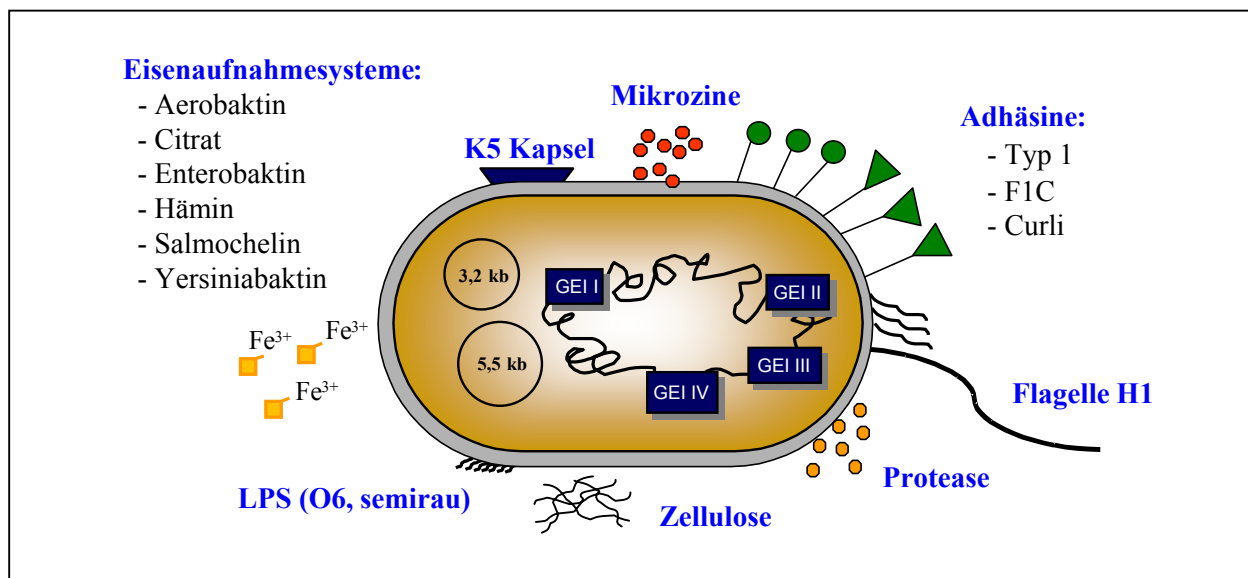


Abb. 3: Schematische Darstellung einer Bakterienzelle des *Escherichia coli* Stammes DSM 6601 (modifiziert nach G. Blum-Oehler).

Genomanalysen haben gezeigt, dass viele der genannten Faktoren, oftmals als Fitnessfaktoren bezeichnet, auf vier großen genomischen Inseln (GEI I-IV) und mehreren kleineren Genclustern lokalisiert sind (Grozdanov *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2005). Zudem sind im Genom von *E. coli* DSM 6601 zwei kleine kryptische “high-copy”-Plasmide vorhanden, die eine große genetische Stabilität besitzen (Blum-Oehler *et al.*, 2003).

Der probiotische *E. coli* Stamm DSM 6601 exprimiert keine Virulenzfaktoren wie Toxine (CNF1 (“cytotoxic necrotizing factor 1”), Hämolyisin) oder Mannose-resistente hämagglutinierende Adhäsine (P- und S-Fimbrien) (Blum *et al.*, 1995). Das Fehlen dieser Virulenzfaktoren, die Serumsensitivität und die Expression mehrerer Fitnessfaktoren, die das Überleben und die erfolgreiche Kolonisierung im menschlichen Darm unterstützen, bilden wahrscheinlich die Basis für den probiotischen Charakter des *E. coli* Stammes DSM 6601 (Grozdanov *et al.*, 2004).

Frühe Studien haben gezeigt, dass der *E. coli* Stamm DSM 6601 *in vitro* eine deutliche antagonistische Aktivität gegenüber anderen pathogenen und apathogenen Keimen wie *Salmonella enteritidis*, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Candida albicans* und

Saccharomyces cerevisiae aufweist (Irrgang & Sonnenborn, 1988). Außerdem wird durch diesen Stamm die Invasion von *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium und anderen invasiven Bakterien (Shigellen, Listerien, Legionellen, Yersinien, adhären-invasive *E. coli*) in humane Epithelzellen in Zellkulturversuchen gehemmt (Boudeau *et al.*, 2003; Altenhoefer *et al.*, 2004). Zudem kann durch die orale Verabreichung des *E. coli* Stammes DSM 6601 bei Neugeborenen die Kolonisation des Darms durch pathogene und potentiell pathogene Bakterien effektiv verringert werden (Lodinová-Žádníková & Sonnenborn, 1997).

Darüber hinaus besitzt der Stamm *E. coli* DSM 6601 immunmodulierende Aktivität sowohl für spezifische als auch für unspezifische Immunantworten. Es konnte gezeigt werden, dass bei ausgetragenen Neugeborenen und Frühgeborenen nach gezielter Kolonisierung mit diesem *E. coli* Stamm sowohl eine mukosale als auch eine systemische Immunität induziert wird (Lodinová-Žádníková *et al.*, 1992; Cukrowska *et al.*, 2002). *In vitro* konnte die Stimulation des unspezifischen Immunsystems (Hockertz, 1991) sowie die Induktion des humanen β -Defensins-2 (HBD-2) (Wehkamp *et al.*, 2004) nachgewiesen werden. Durch den *E. coli* Stamm DSM 6601 wurde in keimfrei aufgezogenen Mäusen eine effektive Reduktion der Erregerbelastung bei Infektionen mit *Listeria monocytogenes* und *Candida albicans* erreicht, was auf eine Stimulation des Immunsystems zurückgeführt wird (Hockertz, 1997). Vor kurzem durchgeführte Studien haben gezeigt, dass die immunmodulatorischen Eigenschaften des *E. coli* Stammes DSM 6601 auch eine Rolle bei der Behandlung von entzündlichen Darmerkrankungen spielen (Schultz *et al.*, 2004; Sturm *et al.*, 2005). Bisher ist jedoch unklar, durch welche Faktoren des *E. coli* Stammes DSM 6601 diese probiotischen Wirkungen hervorgerufen werden.

2.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Ein Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der kryptischen Plasmide pMUT1 und pMUT2 des probiotischen *E. coli* Stammes DSM 6601 durch Analyse der DNA-Sequenz. Darüber hinaus sollte ein auf diesen Plasmiden basierendes spezifisches PCR-Nachweissystem etabliert werden, mit dem dieser *E. coli* Stamm direkt in Humanstuhl detektiert werden kann.

Des Weiteren sollte eine plasmidfreie Variante des *E. coli* Stammes DSM 6601 hergestellt werden, die zum einen als Trägerorganismus für rekombinante Plasmide und zum anderen bei Untersuchungen zur Klärung einer möglichen Funktion der kryptischen Plasmide verwendet werden kann.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag bei der Entwicklung von stabilen Klonierungsvektoren auf Basis der kryptischen Plasmide pMUT1 und pMUT2 für die Expression von heterologen Proteinen in diesem *E. coli* Stamm. Durch die stabile Expression von fluoreszierenden Proteinen sollte außerdem ein visuelles Nachweissystem für den probiotischen *E. coli* Stamm DSM 6601 etabliert werden.

Im Hinblick auf eine Verwendung des probiotischen *E. coli* Stammes DSM 6601 als Lebendimpfstoff, sollten Virulenzfaktoren von humanpathogenen enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) und tierpathogenen enterotoxischen *E. coli* (ETEC) in diesem Stamm exprimiert werden. In ersten tierexperimentellen Untersuchungen sollte anschließend das immunogene Potential dieser möglichen Lebendvakzine getestet werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, die Bedeutung der Fimbrienadhäsine des *E. coli* Stammes DSM 6601 für die inhibitorische Wirkung auf die Invasivität von Salmonellen *in vitro* aufzuklären. Zudem sollte geprüft werden, ob die inhibitorischen Effekte dieses Stammes auch *in vivo* bei konventionellen Mäusen nachzuweisen sind.

3 Material

3.1 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

3.1.1 Bakterienstämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in den Tabellen 3 bis 5 aufgeführt.

Tab. 3: In dieser Arbeit verwendete *E. coli* Laborstämme

<i>E. coli</i> K-12-Stamm	Relevanter Geno- bzw. Phänotyp ^{a)}	Referenz oder Herkunft
5K	Sm ^R , <i>lacY1</i> , <i>tonA21</i> , λ^- , <i>thr-1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi</i> , r^- , m^+	S. Glover
AAEC189	Δ <i>fim</i> , Δ <i>lac</i> , <i>recA</i> ⁻ , <i>endA</i> ⁻ , <i>hsdR</i> ⁻ , <i>hsdM</i> ⁺	Blomfield <i>et al.</i> , 1991
BMH	K-12	IMIB-Stammsammlung
C600	<i>supE44</i> , <i>hsdR</i> , <i>thi-1</i> , <i>thr-1</i> , <i>leuB6</i> , <i>lacY1</i> , <i>tonA21</i>	Appleyard, 1954
C600(λ)	C600, lysogenisiert mit λ -Phage	IMIB-Stammsammlung
DH1	<i>supE44</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Low, 1968
DH5 α	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r_k^- , m_k^-), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , Δ (<i>argF-lac</i>)U169, λ^- , ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15, <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Bethesda Research Laboratories, 1986
E. c. 35	F ⁻ , <i>trp</i> ⁻ , <i>phe</i> ⁻ , <i>pro</i> ⁻ , <i>his</i> ⁻ , <i>lac</i> ⁻ , Nal ^R	Smith <i>et al.</i> , 1987
E. c. 678-54	F ⁻ , <i>thr-1</i> , <i>leu-6</i> , <i>thi-1</i> , <i>lacY1</i> , <i>malA1</i> , <i>xyl-7</i> , <i>ara-13</i> , <i>mtl-2</i> , <i>tonA2</i> , <i>gal-6</i> , λ^- , <i>rpsL</i> , <i>minA</i> , <i>minB</i>	Adler <i>et al.</i> , 1967
E. c. B		Neidhardt, 1987
EN99	<i>araD</i> , Δ <i>lac</i> , <i>aroB</i> , <i>rpsL</i> , <i>thi</i> , Tc ^R , pColIV-EN77, aber keine Aerobaktinsynthese	Braun <i>et al.</i> , 1983
HB101	F ⁻ , <i>ara-14</i> , <i>galK2</i> , <i>hsdD20</i> , (<i>hsr</i> ⁻ , <i>hsm</i> ⁻), <i>recA13</i> , <i>supE44</i> , <i>lacZ4</i> , <i>leuB6</i> , <i>proA2</i> , <i>thi-1</i> , <i>rpsL20</i> (Sm ^R), <i>xyl-5</i> , <i>mtl-5</i> , <i>mtl-1</i> , λ^-	Boyer & Roulland-Dussoix, 1969
J53	<i>met</i> ⁻ , <i>pro</i> ⁻	Taylor, 1983
JM109	<i>recA1</i> , <i>supE44</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>thi</i> Δ (<i>lac-proAB</i>)	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
K-12 WT	F ⁺ , λ^+	Bachmann, 1987
LE392	<i>supE44</i> , <i>supF58</i> , <i>hsdR514</i> , <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>metB1</i> , <i>trpR55</i> , <i>lacY1</i>	Borck <i>et al.</i> , 1976
Sm10 λ <i>pir</i>	<i>thi1</i> , <i>thr1</i> , <i>leuB6</i> , <i>supE44</i> , <i>tonA21</i> , <i>lacY1</i> , <i>recA</i> ⁻ ::RP4-2-Tc::Mu; Kn ^R , <i>lambda</i> <i>pir</i>	Miller & Mekalanos, 1988
SY327 λ <i>pir</i>	F ⁻ , <i>araD</i> , Δ (<i>lac-pro</i>), <i>argE</i> (Am), <i>nalA</i> , <i>recA56</i> , <i>lambda</i> <i>pir</i> , Rif ^R	Miller & Mekalanos, 1988
WK6	Δ (<i>lac-proAB</i>), <i>galE</i> , <i>strA</i> , <i>lacI</i> ^q Z Δ M15, <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ , F'	Zell & Fritz, 1987

^{a)} Phänotypische Bezeichnungen: F, Fertilitätsfaktor; + bzw. -, Eigenschaft vorhanden bzw. fehlend; Genotypbezeichnungen siehe Berlyn, 1998.

Tab. 4: In dieser Arbeit verwendete *E. coli* Wildstämme und Derivate

<i>E. coli</i> Wildstamm	Relevanter Geno- bzw. Phänotyp ^{a)}	Referenz oder Herkunft
156A	O55:H7, EPEC	Bokete <i>et al.</i> , 1997
179/2	O55:H6, EPEC	Nagy <i>et al.</i> , 2001
2907/97	O55:H6, EHEC	Nagy <i>et al.</i> , 2001
3574/92	O157:H ⁻ , EHEC	Datz <i>et al.</i> , 1996
3697/97	O26:H ⁻ , EHEC	Schmidt <i>et al.</i> , 1999
37-4	O55:H ⁻ , EPEC	Levine <i>et al.</i> , 1978
536	O6:K15:H31, <i>hly</i> ⁺ , <i>fim</i> ⁺ , <i>sfa</i> ⁺ , <i>prf</i> ⁺ , <i>ent</i> ⁺ , <i>fla</i> ⁺ , <i>sre</i> ⁺ , Sm ^R	Berger <i>et al.</i> , 1982
5477/94	O86:H7, EAEC	Nagy <i>et al.</i> , 2001
5720/96	O26:H ⁻ , EHEC	Zhang <i>et al.</i> , 2000
764	O18:K5:H5/11, <i>hly</i> ⁺ , <i>fim</i> ⁺ , <i>sfa</i> ⁺ , <i>pap/prf</i> ⁺ , <i>aer</i> ⁺	Ott <i>et al.</i> , 1986
764/2	O18:K5:H5/11, <i>hly</i> ⁻ , <i>fim</i> ⁺ , <i>sfa</i> ⁺ , <i>pap/prf</i> ⁺ , <i>aer</i> ⁺	Ott <i>et al.</i> , 1986
76-5	O143:HND, EIEC	Nagy <i>et al.</i> , 2001
86-24	O157:H7, EHEC, ϕ 86-24 Phage	Donnenberg <i>et al.</i> , 1993
86-24 Δ <i>eae</i>	O157:H7, <i>eae</i> -Deletionsmutante des EHEC- Wildtyps 86-24	Donnenberg <i>et al.</i> , 1993
A151	O18ab:K1:H ⁻ , <i>hly</i> ⁺ , Fäkal-Isolat	Achtman <i>et al.</i> , 1983
A152	O18ab:K1:H7, <i>hly</i> ⁻ , Fäkal-Isolat	Achtman <i>et al.</i> , 1983
AD110	O6:K2:H1:F7, <i>hly</i> ⁺ , <i>sfa</i> ⁺ , <i>foc</i> ⁺ , <i>pap</i> ⁺ , <i>aer</i> ⁺	van Die <i>et al.</i> , 1984
C9221a	O6:K15:H16, ETEC	Nagy <i>et al.</i> , 2001
CI-23	klinisches Isolat, lysogen, ϕ R73 Phage	Inouye <i>et al.</i> , 1991
DPA065	O119:HND, EAEC	Nagy <i>et al.</i> , 2001
DSM 6601 (Nissle 1917)	O6:K5:H1, <i>fim</i> ⁺ , <i>foc</i> ⁺ , <i>ent</i> ⁺ , <i>iuc</i> ⁺ , <i>fec</i> ⁺ , <i>chu</i> ⁺ , <i>mch</i> ⁺ , <i>mcm</i> ⁺	Ardeypharm GmbH, Herdecke
DSM 6601 Rif ^R	Rif ^R Mutante von DSM 6601	diese Arbeit
DSM 6601 Δ <i>fim</i>	wie DSM 6601, aber <i>fim</i> ⁻	diese Arbeit
DSM 6601 Δ <i>foc</i>	wie DSM 6601, aber <i>foc</i> ⁻	diese Arbeit
DSM 6601 Δ <i>foc/fim</i>	wie DSM 6601, aber <i>foc</i> ⁻ , <i>fim</i> ⁻	diese Arbeit
DSM 6601 Δ <i>foc/fim</i> Rif ^R	Rif ^R Mutante von DSM 6601 Δ <i>foc/fim</i>	diese Arbeit
DSM 6601 Δ pMUT1	wie DSM 6601, aber pMUT1 ⁻	diese Arbeit
DSM 6601 Δ pMUT2	wie DSM 6601, aber pMUT2 ⁻	diese Arbeit
DSM 6601 Δ pMUT1/2	wie DSM 6601, aber pMUT1 ⁻ und pMUT2 ⁻	diese Arbeit
DSM 6601 Δ pMUT1/2 Rif ^R	Rif ^R Mutante von DSM 6601 Δ pMUT1/2	diese Arbeit
E2348/69	O127:H6, EPEC	Levine <i>et al.</i> , 1978
ED142	O111:H ⁻ , EHEC	Rüssmann <i>et al.</i> , 1995
EDL1284	EIEC	Nagy <i>et al.</i> , 2001
EDL933	O157:H7, EHEC	Strockbine <i>et al.</i> , 1986
F18	R:K1:H5, <i>fim</i> ⁺ , <i>col</i> ⁺	Burghoff <i>et al.</i> , 1993
F18-Col ⁻	R:K1:H5, <i>fim</i> ⁺ , <i>col</i> ⁻	Burghoff <i>et al.</i> , 1993

Fortsetzung Tab. 4

<i>E. coli</i> Wildstamm	Relevanter Geno- bzw. Phänotyp ^{a)}	Referenz oder Herkunft
HK 043/93	<i>aer</i> ⁺ , <i>fyuA</i> ⁺ , <i>irp2</i> ⁺ , <i>hly</i> ⁺ , <i>cnf-1</i> ⁺ , <i>fim</i> ⁺ , <i>prs/prf</i> ⁺ , <i>sfa</i> ⁻	Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Universität Würzburg
HK 060/93	<i>aer</i> ⁺ , <i>fyuA</i> ⁺ , <i>irp2</i> ⁺ , <i>hly</i> ⁻ , <i>cnf-1</i> ⁻ , <i>fim</i> ⁺ , <i>prs/prf</i> ⁻ , <i>sfa</i> ⁻	"
HK 10058/93	<i>aer</i> ⁺ , <i>fyuA</i> ⁺ , <i>irp2</i> ⁺ , <i>hly</i> ⁺ , <i>cnf-1</i> ⁻ , <i>fim</i> ⁺ , <i>prs/prf</i> ⁺ , <i>sfa</i> ⁻	"
HK 10209/93	<i>aer</i> ⁺ , <i>fyuA</i> ⁺ , <i>irp2</i> ⁺ , <i>hly</i> ⁺ , <i>cnf-1</i> ⁻ , <i>fim</i> ⁺ , <i>prs/prf</i> ⁺ , <i>sfa</i> ⁻	"
HK 10222/93	<i>aer</i> ⁺ , <i>fyuA</i> ⁺ , <i>irp2</i> ⁺ , <i>hly</i> ⁻ , <i>cnf-1</i> ⁻ , <i>fim</i> ⁺ , <i>prs/prf</i> ⁻ , <i>sfa</i> ⁻	"
HK 10413/93	<i>aer</i> ⁻ , <i>fyuA</i> ⁺ , <i>irp2</i> ⁺ , <i>hly</i> ⁺ , <i>cnf-1</i> ⁺ , <i>fim</i> ⁻ , <i>prs/prf</i> ⁺ , <i>sfa</i> ⁺	"
HK 10521/93	<i>aer</i> ⁺ , <i>fyuA</i> ⁺ , <i>irp2</i> ⁺ , <i>hly</i> ⁻ , <i>cnf-1</i> ⁻ , <i>fim</i> ⁺ , <i>prs/prf</i> ⁻ , <i>sfa</i> ⁻	"
HK 10968/93	<i>aer</i> ⁺ , <i>fyuA</i> ⁺ , <i>irp2</i> ⁺ , <i>hly</i> ⁻ , <i>cnf-1</i> ⁻ , <i>fim</i> ⁺ , <i>prs/prf</i> ⁻ , <i>sfa</i> ⁻	"
HK 1247/93	<i>aer</i> ⁻ , <i>fyuA</i> ⁻ , <i>irp2</i> ⁻ , <i>hly</i> ⁻ , <i>cnf-1</i> ⁻ , <i>fim</i> ⁻ , <i>prs/prf</i> ⁻ , <i>sfa</i> ⁻	"
HK 1603/93	<i>aer</i> ⁻ , <i>fyuA</i> ⁻ , <i>irp2</i> ⁻ , <i>hly</i> ⁻ , <i>cnf-1</i> ⁻ , <i>fim</i> ⁺ , <i>prs/prf</i> ⁻ , <i>sfa</i> ⁻	"
HK 1939/93	<i>aer</i> ⁻ , <i>fyuA</i> ⁺ , <i>irp2</i> ⁺ , <i>hly</i> ⁻ , <i>cnf-1</i> ⁻ , <i>fim</i> ⁺ , <i>prs/prf</i> ⁻ , <i>sfa</i> ⁺	"
HK 2309/93	<i>aer</i> ⁺ , <i>fyuA</i> ⁺ , <i>irp2</i> ⁺ , <i>hly</i> ⁻ , <i>cnf-1</i> ⁻ , <i>fim</i> ⁺ , <i>prs/prf</i> ⁻ , <i>sfa</i> ⁻	"
HK 2355/93	<i>aer</i> ⁺ , <i>fyuA</i> ⁺ , <i>irp2</i> ⁺ , <i>hly</i> ⁻ , <i>cnf-1</i> ⁻ , <i>fim</i> ⁺ , <i>prs/prf</i> ⁻ , <i>sfa</i> ⁻	"
HK 2656/93	<i>aer</i> ⁺ , <i>fyuA</i> ⁺ , <i>irp2</i> ⁺ , <i>hly</i> ⁻ , <i>cnf-1</i> ⁻ , <i>fim</i> ⁺ , <i>prs/prf</i> ⁻ , <i>sfa</i> ⁻	"
HK 269/93	<i>aer</i> ⁻ , <i>fyuA</i> ⁺ , <i>irp2</i> ⁺ , <i>hly</i> ⁺ , <i>cnf-1</i> ⁺ , <i>fim</i> ⁺ , <i>prs/prf</i> ⁺ , <i>sfa</i> ⁺	"
HK 2770/93	<i>aer</i> ⁻ , <i>fyuA</i> ⁻ , <i>irp2</i> ⁻ , <i>hly</i> ⁻ , <i>cnf-1</i> ⁻ , <i>fim</i> ⁺ , <i>prs/prf</i> ⁻ , <i>sfa</i> ⁻	"
HK 2882/93	<i>aer</i> ⁻ , <i>fyuA</i> ⁻ , <i>irp2</i> ⁻ , <i>hly</i> ⁻ , <i>cnf-1</i> ⁻ , <i>fim</i> ⁺ , <i>prs/prf</i> ⁻ , <i>sfa</i> ⁻	"
HK 339/93	<i>aer</i> ⁺ , <i>fyuA</i> ⁺ , <i>irp2</i> ⁺ , <i>hly</i> ⁻ , <i>cnf-1</i> ⁻ , <i>fim</i> ⁺ , <i>prs/prf</i> ⁻ , <i>sfa</i> ⁻	"
HK 3690/93	<i>aer</i> ⁻ , <i>fyuA</i> ⁺ , <i>irp2</i> ⁺ , <i>hly</i> ⁻ , <i>cnf-1</i> ⁻ , <i>fim</i> ⁺ , <i>prs/prf</i> ⁻ , <i>sfa</i> ⁻	"
HK 3790/93	<i>aer</i> ⁻ , <i>fyuA</i> ⁺ , <i>irp2</i> ⁺ , <i>hly</i> ⁺ , <i>cnf-1</i> ⁺ , <i>fim</i> ⁺ , <i>prs/prf</i> ⁺ , <i>sfa</i> ⁺	"
HK 3812/93	<i>aer</i> ⁺ , <i>fyuA</i> ⁺ , <i>irp2</i> ⁺ , <i>hly</i> ⁻ , <i>cnf-1</i> ⁻ , <i>fim</i> ⁻ , <i>prs/prf</i> ⁻ , <i>sfa</i> ⁻	"
HK 3856/93	<i>aer</i> ⁻ , <i>fyuA</i> ⁺ , <i>irp2</i> ⁺ , <i>hly</i> ⁻ , <i>cnf-1</i> ⁻ , <i>fim</i> ⁺ , <i>prs/prf</i> ⁻ , <i>sfa</i> ⁻	"
HK 3875/93	<i>aer</i> ⁺ , <i>fyuA</i> ⁺ , <i>irp2</i> ⁺ , <i>hly</i> ⁺ , <i>cnf-1</i> ⁺ , <i>fim</i> ⁻ , <i>prs/prf</i> ⁺ , <i>sfa</i> ⁻	"
HK 4191/93	<i>aer</i> ⁺ , <i>fyuA</i> ⁺ , <i>irp2</i> ⁺ , <i>hly</i> ⁻ , <i>cnf-1</i> ⁻ , <i>fim</i> ⁺ , <i>prs/prf</i> ⁻ , <i>sfa</i> ⁻	"
HK 4193/93	<i>aer</i> ⁺ , <i>fyuA</i> ⁺ , <i>irp2</i> ⁺ , <i>hly</i> ⁺ , <i>cnf-1</i> ⁺ , <i>fim</i> ⁻ , <i>prs/prf</i> ⁻ , <i>sfa</i> ⁻	"
HK 4326/93	<i>aer</i> ⁺ , <i>fyuA</i> ⁺ , <i>irp2</i> ⁺ , <i>hly</i> ⁺ , <i>cnf-1</i> ⁻ , <i>fim</i> ⁺ , <i>prs/prf</i> ⁻ , <i>sfa</i> ⁻	"
HK 4549/93	<i>aer</i> ⁺ , <i>fyuA</i> ⁺ , <i>irp2</i> ⁺ , <i>hly</i> ⁻ , <i>cnf-1</i> ⁻ , <i>fim</i> ⁺ , <i>prs/prf</i> ⁻ , <i>sfa</i> ⁻	"
HK 5456/93	<i>aer</i> ⁻ , <i>fyuA</i> ⁻ , <i>irp2</i> ⁻ , <i>hly</i> ⁻ , <i>cnf-1</i> ⁻ , <i>fim</i> ⁺ , <i>prs/prf</i> ⁻ , <i>sfa</i> ⁻	"
HK 6253/93	<i>aer</i> ⁺ , <i>fyuA</i> ⁻ , <i>irp2</i> ⁻ , <i>hly</i> ⁻ , <i>cnf-1</i> ⁻ , <i>fim</i> ⁺ , <i>prs/prf</i> ⁻ , <i>sfa</i> ⁻	"
HK 6499/93	<i>aer</i> ⁻ , <i>fyuA</i> ⁺ , <i>irp2</i> ⁺ , <i>hly</i> ⁺ , <i>cnf-1</i> ⁺ , <i>fim</i> ⁻ , <i>prs/prf</i> ⁺ , <i>sfa</i> ⁻	"
HK 6551/93	<i>aer</i> ⁺ , <i>fyuA</i> ⁺ , <i>irp2</i> ⁺ , <i>hly</i> ⁻ , <i>cnf-1</i> ⁻ , <i>fim</i> ⁺ , <i>prs/prf</i> ⁻ , <i>sfa</i> ⁻	"
HK 7519/93	<i>aer</i> ⁺ , <i>fyuA</i> ⁺ , <i>irp2</i> ⁺ , <i>hly</i> ⁺ , <i>cnf-1</i> ⁺ , <i>fim</i> ⁺ , <i>prs/prf</i> ⁺ , <i>sfa</i> ⁻	"
HK 7594/93	<i>aer</i> ⁺ , <i>fyuA</i> ⁺ , <i>irp2</i> ⁺ , <i>hly</i> ⁻ , <i>cnf-1</i> ⁻ , <i>fim</i> ⁺ , <i>prs/prf</i> ⁻ , <i>sfa</i> ⁻	"
HK 8416/93	<i>aer</i> ⁺ , <i>fyuA</i> ⁺ , <i>irp2</i> ⁺ , <i>hly</i> ⁺ , <i>cnf-1</i> ⁺ , <i>fim</i> ⁺ , <i>prs/prf</i> ⁺ , <i>sfa</i> ⁺	"
HK 8572/93	<i>aer</i> ⁻ , <i>fyuA</i> ⁺ , <i>irp2</i> ⁺ , <i>hly</i> ⁻ , <i>cnf-1</i> ⁻ , <i>fim</i> ⁺ , <i>prs/prf</i> ⁻ , <i>sfa</i> ⁻	"
HK 8729/93	<i>aer</i> ⁻ , <i>fyuA</i> ⁻ , <i>irp2</i> ⁻ , <i>hly</i> ⁻ , <i>cnf-1</i> ⁻ , <i>fim</i> ⁺ , <i>prs/prf</i> ⁻ , <i>sfa</i> ⁻	"
HK 9094/93	<i>aer</i> ⁻ , <i>fyuA</i> ⁻ , <i>irp2</i> ⁻ , <i>hly</i> ⁻ , <i>cnf-1</i> ⁻ , <i>fim</i> ⁺ , <i>prs/prf</i> ⁻ , <i>sfa</i> ⁻	"
HK 9765/93	<i>aer</i> ⁻ , <i>fyuA</i> ⁺ , <i>irp2</i> ⁺ , <i>hly</i> ⁺ , <i>cnf-1</i> ⁺ , <i>fim</i> ⁺ , <i>prs/prf</i> ⁺ , <i>sfa</i> ⁻	"
HK 9855/93	<i>aer</i> ⁺ , <i>fyuA</i> ⁺ , <i>irp2</i> ⁺ , <i>hly</i> ⁺ , <i>cnf-1</i> ⁺ , <i>fim</i> ⁺ , <i>prs/prf</i> ⁻ , <i>sfa</i> ⁻	"
IHE3033	O18ac:K1:H7, <i>hly</i> ⁻ , NBM	Achtman <i>et al.</i> , 1983
IHE3034	O18:K1:H7/9, <i>hly</i> ⁻ , <i>sfa</i> ⁺ , <i>fim</i> ⁺ , <i>pil</i> ⁺	Korhonen <i>et al.</i> , 1985
IHE3035	O18ac:K1:H7, <i>hly</i> ⁺ , NBM	Achtman <i>et al.</i> , 1983
IHE3036	O18:K1:H7/9, <i>hly</i> ⁻ , <i>sfa</i> ⁺ , <i>fim</i> ⁺ , <i>pil</i> ⁺	Korhonen <i>et al.</i> , 1985
IHE3080	O18:K1:H7, <i>hly</i> ⁻ , <i>sfa</i> ⁺ , <i>pap/prs</i> ⁻ , <i>fim</i> ⁺	Nowicki <i>et al.</i> , 1986

Fortsetzung Tab. 4

<i>E. coli</i> Wildstamm	Relevanter Geno- bzw. Phänotyp ^{a)}	Referenz oder Herkunft
J96	O4:K6:H ⁻ , <i>hlyI</i> ⁺ , <i>hlyII</i> ⁺ , <i>pap/prf</i> ⁺ , <i>pil</i> ⁺ , <i>cnf</i> ⁺ , F1C ⁺	Hull <i>et al.</i> , 1981
J96-M1	O4:K6:H ⁻ , <i>hlyI</i> ⁻ , <i>hlyII</i> ⁺ , <i>pap/prf</i> ⁺ , <i>pil</i> ⁺ , <i>cnf</i> ⁺ , F1C ⁺ , PAI I _{J96} ⁻	Hacker <i>et al.</i> , 1990
O149:K88	ETEC Referenzstamm, Schweine-Isolat	A. Caprioli, Rom
PZ915	O19:H ⁻ , <i>hly</i> ⁻ , Fäkal-Isolat	Ardeypharm GmbH, Herdecke; Wehkamp <i>et al.</i> , 2004
PZ915 Rif ^R	Rif ^R Mutante von PZ915	diese Arbeit
RS180	O18:K1:H7, <i>hly</i> ⁻ , NBM	Achtman <i>et al.</i> , 1983
RS218	O18ac:K1:H7, <i>hly</i> ⁺ , <i>sfa</i> ⁺ , <i>pil</i> ⁺ , NBM	Achtman <i>et al.</i> , 1983
RS226	O18ac:K1:H7/6, <i>hly</i> ⁺ , <i>sfa</i> ⁺ , <i>pap/prs</i> ⁺ , <i>fim</i> ⁺ , <i>aer</i> ⁺ , Fäkal-Isolat	Achtman <i>et al.</i> , 1983
SF493/89	O157:H ⁻ , EHEC	Karch <i>et al.</i> , 1993

^{a)} Phänotypische Bezeichnungen: F, Fertilitätsfaktor; + bzw. -, Eigenschaft vorhanden bzw. fehlend; Genotypbezeichnungen siehe Berlyn, 1998.

Tab. 5: Andere in dieser Arbeit verwendete Wildstämme

Wildstamm	Relevanter Geno- bzw. Phänotyp	Referenz oder Herkunft
37/98	<i>Citrobacter freundii</i> , Hunde-Isolat	IMIB-Stammsammlung
3009	<i>Citrobacter freundii</i> , UTI-Isolat	Walter Reed Army Institute of Research, Washington DC; Oelschlaeger <i>et al.</i> , 1993
3056	<i>Citrobacter freundii</i> , UTI-Isolat	Walter Reed Army Institute of Research, Washington DC; Oelschlaeger <i>et al.</i> , 1993
WR7014	<i>Citrobacter freundii</i>	Walter Reed Army Institute of Research, Washington DC
WR7004	<i>Citrobacter freundii</i>	Walter Reed Army Institute of Research, Washington DC
DBS100	<i>Citrobacter rodentium</i> ATCC 51459	Deng <i>et al.</i> , 2001
DSM 8224	<i>Plesiomonas shigelloides</i> ATCC 14029	DSMZ (Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)
11184	<i>Plesiomonas shigelloides</i> , O36:H34, Gallenblasen-Isolat	Avison <i>et al.</i> , 2000
SL1344	<i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium	IMIB-Stammsammlung
SL1344 NaI ^R	NaI ^R Mutante von SL1344	diese Arbeit

3.1.2 Plasmide

Die Karten der konstruierten Plasmide sind im Anhang aufgeführt.

Tab. 6: In dieser Arbeit verwendete Vektoren und Plasmide

Plasmid	Vektor/Eigenschaften	Herkunft oder Referenz
pACYC177	Klonierungsvektor, <i>ori</i> p15A, Kn ^R , Ap ^R	New England Biolabs
pACYC184	Klonierungsvektor, <i>ori</i> p15A, Cm ^R , Tc ^R	New England Biolabs
pACYC184-F1C	pACYC184 mit <i>foc</i> -Genkluster aus <i>E. coli</i> DSM 6601, Cm ^R	diese Arbeit
pCos3YE4	Cosmidvektor SuperCos1 mit <i>mch/mcm</i> -, <i>foc</i> - und <i>iro</i> -Genkluster aus DSM 6601, Ap ^R	Grozdanov <i>et al.</i> , 2004
pCP20	FLP ⁺ , λ c1857, λ p _R , <i>rep</i> (ts), Cm ^R , Ap ^R	Datsenko & Wanner, 2000
pCVD442	<i>ori</i> R6K, <i>mob</i> RP4, <i>sac</i> B, Ap ^R	Donnenberg & Kaper, 1991
pDsRed	<i>ori</i> ColE1, P _{lac} , DsRed, Ap ^R	Clontech
pFK99	pBR322 mit K99-Genkluster aus <i>E. coli</i> B41, Ap ^R	de Graaf <i>et al.</i> , 1984
pFM205	pBR322 mit K88ab-Genkluster aus <i>E. coli</i> Stamm G7, Ap ^R	Mooi <i>et al.</i> , 1979
pGEM [®] -T Easy	Klonierungsvektor, <i>ori</i> f1, <i>lac</i> Z, Ap ^R	Promega
pGEM-Typ1	pGEM [®] -T Easy mit <i>fim</i> -Genkluster aus <i>E. coli</i> DSM 6601, Ap ^R	diese Arbeit
pGFPmut3.1	<i>ori</i> ColE1, P _{lac} , GFPmut3.1, Ap ^R	Clontech
pKD3	<i>ori</i> R _γ , Cm ^R , Ap ^R	Datsenko & Wanner, 2000
pKD46	<i>ori</i> R101, <i>rep</i> A101(ts), <i>ara</i> C, P _{araB-gam-bet-exo} , Ap ^R	Datsenko & Wanner, 2000
pKS- <i>tetA</i>	pBluescript II KS (-), <i>tetA</i> -Kassette, Ap ^R	Middendorf, 2005
pMUT1	kryptisches Plasmid aus <i>E. coli</i> DSM 6601	Ardeypharm GmbH, Herdecke
pMUT1-2	pMUT1 ligiert in pUC18, Plasmide linearisiert mit <i>Hind</i> III, Ap ^R	Blum-Oehler <i>et al.</i> , 2003
pMUT1-Tc	pMUT1 mit <i>tetA</i> -Kassette, Tc ^R	diese Arbeit
pMUT1-Tc-Eae	pMUT1-Tc mit <i>eaeA</i> aus O157:H7 Stamm 86-24, Tc ^R	diese Arbeit
pMUT1-Tc-Gfp	pMUT1-Tc mit <i>gfp</i> , Tc ^R	diese Arbeit
pMUT1-Tc-Red	pMUT1-Tc mit <i>dsRed</i> , Tc ^R	diese Arbeit
pMUT1-Tc-Sac	pMUT1-Tc mit <i>sacB</i> , Tc ^R	diese Arbeit
pMUT2	kryptisches Plasmid aus <i>E. coli</i> DSM 6601	Ardeypharm GmbH, Herdecke
pMUT2-2	pMUT2 ligiert in pUC18, Plasmide linearisiert mit <i>Sph</i> I, Ap ^R	Blum-Oehler <i>et al.</i> , 2003
pMUT2-Kn	pMUT2 mit <i>kn</i> -Kassette, Kn ^R	diese Arbeit
pMUT2-Kn-Eae	pMUT2-Kn mit <i>eaeA</i> aus O157:H7 Stamm 86-24, Kn ^R	diese Arbeit

Fortsetzung Tab. 6

Plasmid	Vektor/Eigenschaften	Herkunft oder Referenz
pMUT2-Kn-Gfp	pMUT2-Kn mit <i>gfp</i> , Kn ^R	diese Arbeit
pMUT2-Kn-K88	pMUT2-Kn mit K88ab-Gencluster aus <i>E. coli</i> Stamm G7, Kn ^R	diese Arbeit
pMUT2-Kn-K99	pMUT2-Kn mit K99-Gencluster aus <i>E. coli</i> B41, Kn ^R	diese Arbeit
pMUT2-Kn-Red	pMUT2-Kn mit <i>dsRed</i> , Kn ^R	diese Arbeit
pMUT2-Kn-Sac	pMUT2-Kn mit <i>sacB</i> , Kn ^R	diese Arbeit
pOSeae1	pUC18 mit <i>eaeA</i> aus O157:H7 Stamm 86-24, Ap ^R	Oswald, 1997
RP4Δ <i>kn</i>	konjugatives Helferplasmid, Ap ^R , Tc ^R	IMIB-Stammsammlung

3.2 Oligonukleotide

Die für PCR-Reaktionen und Sequenzierungen verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) oder Sigma-ARK (Steinheim) bezogen.

Tab. 7: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Verwendung und Referenz
27f	GAGTTTGATCCTGGCTCA	5'-Primer für Nachweis von eubakterieller 16S rRNA; Lane, 1991
798r	CCAGGGTATCTAATCCTGTT	3'-Primer für Nachweis von eubakterieller 16S rRNA
Fim 1	TATTGCTAACCCAGCACAGC TAGTGCGCTCTGTAATTATA AGGGAAAACGATGGTGTAG GCTGGAGCTGCTT	5'-Primer für Amplifikation von <i>cat</i> -Kassette aus pKD3 mit 55 Nukleotiden Sequenzhomologie zu 5'-"upstream"-Bereich von <i>fimB</i>
Fim 2	TTTAGCTTCAGGTAATATTGC GTACCAGCATTAGCAATGTC CTGTGATTTCTTTACATATGA ATATCCTCCTTAGTTCCTA	3'-Primer für Amplifikation von <i>cat</i> -Kassette aus pKD3 mit 55 Nukleotiden Sequenzhomologie zu 3'-"downstream"-Bereich von <i>fimH</i>
Fim 3	GTGATTGAGGAAGGTTTAAG TCG	5'-Primer für Komplementation von <i>fim</i> -Gencluster aus <i>E. coli</i> DSM 6601
Fim 4	CCAGCATTAGCAATGTCCTGT GA	3'-Primer für Komplementation von <i>fim</i> -Gencluster aus <i>E. coli</i> DSM 6601
Foc 1	GTTGTGATGACAGATACGGT GTGCGTAGTTCAATTAATAA CAGGAATTAATATGGTGTA GGCTGGAGCTGCTT	5'-Primer für Amplifikation von <i>cat</i> -Kassette aus pKD3 mit 55 Nukleotiden Sequenzhomologie zu 5'-"upstream"-Bereich von <i>focA</i>
Foc 2	ATATAAAGAGCAGTAATATC ATTACCGCCACAACCTGCATTC TACATATGAATATCCTCCTTA GTTTCCTA	3'-Primer für Amplifikation von <i>cat</i> -Kassette aus pKD3 mit 43 Nukleotiden Sequenzhomologie zu 3'-"downstream"-Bereich von <i>focH</i>

Fortsetzung Tab. 7

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Verwendung und Referenz
Hincrev 2	CAAGCTCGAATTACCGAC	3'-Sequenzierprimer für pMUT1
K12-L	TTCCCACGGACATGAAGACT ACA	5'-Primer für Nachweis von <i>E. coli</i> K-12; Kuhnert <i>et al.</i> , 1995
K12-R	ATCCTGCGCACCAATCAACA A	3'-Primer für Nachweis von <i>E. coli</i> K-12; Kuhnert <i>et al.</i> , 1995
M13 Reverse	CAGGAAACAGCTATGACC	3'-Sequenzierprimer für "multiple cloning site" von pUC18
M13 Universal	TGTA AAAACGACGGCCAGT	5'-Sequenzierprimer für "multiple cloning site" von pUC18
Micrev 1	CGCCAAAGAGATTGTATT	3'-Sequenzierprimer für pMUT1
Micrev 2	GGTTGCACAATAATGGCG	3'-Sequenzierprimer für pMUT1
Micrev 3	ATCGCCGATATGGTGGTCGC	3'-Sequenzierprimer für pMUT1
Micrev 4	GTTATCGCATAGCTCATA	3'-Sequenzierprimer für pMUT1
Micrev 5	CCGATCATCAGTCAGTGA	3'-Sequenzierprimer für pMUT1
Micrev 6	CAGGCCGCCATGTGTGAG	3'-Sequenzierprimer für pMUT1
Micuni 1	GTGGCCGTTGCCAGTGGC	5'-Sequenzierprimer für pMUT1
Micuni 3	GGAAACGCCTGGTATCTTTA	5'-Sequenzierprimer für pMUT1
Muta 1	ATACTACGACGGTAAATGGT	5'-Primer für Nachweis von <i>E. coli</i> DSM 6601 und Sonde gegen <i>fimA</i> ; Blum- Oehler <i>et al.</i> , 2003
Muta 2	TACATCAGTATCGGTAGCAT	3'-Primer für Nachweis von <i>E. coli</i> DSM 6601 und Sonde gegen <i>fimA</i> ; Blum- Oehler <i>et al.</i> , 2003
Muta 3	CCACGGTTAGGTGTGGTACA	5'-Primer für Nachweis von <i>E. coli</i> DSM 6601 und Sonde gegen <i>focA</i> ; Blum- Oehler <i>et al.</i> , 2003
Muta 4	CGTCGGCGTTGGCAATACCA	3'-Primer für Nachweis von <i>E. coli</i> DSM 6601 und Sonde gegen <i>focA</i> ; Blum- Oehler <i>et al.</i> , 2003
Muta 5	AACTGTGAAGCGATGAACCC	5'-Primer für Nachweis von <i>E. coli</i> DSM 6601 und 5'-Sequenzierprimer für pMUT1; Blum-Oehler <i>et al.</i> , 2003
Muta 6	GGACTGTT CAGAGAGCTATC	3'-Primer für Nachweis von <i>E. coli</i> DSM 6601 und 3'-Sequenzierprimer für pMUT1; Blum-Oehler <i>et al.</i> , 2003
Muta 7	GACCAAGCGATAACCGGATG	3'-Primer für Nachweis von <i>E. coli</i> DSM 6601 (pMUT2); Blum-Oehler <i>et al.</i> , 2003
Muta 8	GTGAGATGATGGCCACGATT	5'-Primer für Nachweis von <i>E. coli</i> DSM 6601 (pMUT2); Blum-Oehler <i>et al.</i> , 2003
Muta 9	GCGAGGTAACCTCGAACATG	5'-Primer für Nachweis von <i>E. coli</i> DSM 6601 (pMUT2); Blum-Oehler <i>et al.</i> , 2003

Fortsetzung Tab. 7

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Verwendung und Referenz
Muta 10	CGGCGTATCGATAATTCACG	3'-Primer für Nachweis von <i>E. coli</i> DSM 6601 (pMUT2); Blum-Oehler <i>et al.</i> , 2003
Mutrev 1	GTAGGTCGTTCGCTCCAAGC	3'-Sequenzierprimer für pMUT1
Mutuni 1	GAGTACGGCTTGCTGCTGC	5'-Sequenzierprimer für pMUT1
Mutuni 2	TCACTGACTGATGATCGG	5'-Sequenzierprimer für pMUT1
Mutuni 3	GATAGCTCTCTGAACAGTCC	5'-Sequenzierprimer für pMUT1

3.3 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Enzyme und Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham (Braunschweig), Roche Diagnostics (Mannheim), Gibco BRL (Eggenstein), New England Biolabs (Frankfurt am Main), Invitrogen (Karlsruhe), Promega (Heidelberg), Boehringer (Mannheim), QIAGEN (Hilden), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Steinheim), Difco (Augsburg); Oxoid (Wesel), Pharmacia Biotech (Freiburg), Dianova (Hamburg) und Clontech (Heidelberg).

Folgende Kits wurden verwendet:

- “ECLTM Direct Nucleic Acid Labelling And Detection Systems”, Amersham (Braunschweig)
- “GeneClean[®] Kit”, Dianova (Hamburg)
- “ELONGase[®] Enzyme Mix”, Invitrogen (Karlsruhe)
- “AmpliTa[®] FS BigDyeTerminator”-Sequenzierkit, Perkin Elmer (Weiterstadt)
- “QIAGEN Plasmid Midi Kit”, QIAGEN (Hilden)
- “QIAquick PCR Purification Kit”, QIAGEN (Hilden)
- “QIAquick Gel Extraction Kit”, QIAGEN (Hilden)

3.4 Geräte und Sonstiges

Analysenwaage	Chyo Balance Corp.
Autoklav	Webeco
Brutschränke	Memmert TV40b
	Heraeus B5050E
Eismaschine	Scotsman AF-20
Elektronenmikroskop	Zeiss EM 900

Elektrophoresekammern	Institutswerkstatt BioRad
Elektroporationsgerät	Gene Pulser Transfection, BioRad
Exponierkassette	Dr. Goos Suprema
Filme	Hyperfilm ECL, Amersham
Filmentwicklungsgerät	Curix 60, Agfa
Fluoreszenzimager	Typhoon 8600, Amersham
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 25, Zeiss, Zeiss Filtersets 00 und 10 Kamera: Intas Lowlight CCD
Geldokumentationsanlage	GelDoku2000, BioRad
Geltrockner	BioRad 1125 B
Gene Linker	BioRad Gene Linker GS
Grobwaage	Chyo Electronic Balance Mp-3000
Hybridisierungs-ofen	Hybaid Mini 10
Kühlzentrifugen	J2-HC Centrifuge, JA10-und JA20-Festwinkelrotoren, Beckmann Biofuge 13R, Heraeus Megafuge 1.0R, Heraeus
Magnetrührer	Janke und Kunkel KMO 2
Mikropipetten	Gilson P20, P200, P1000 Eppendorf Reference 0,5-10 µl
Mikrowellenofen	AEG Micromat
Netzgeräte	Consort E455 BioRad Power Pac 300
Nylonmembran	Pall Biodyne B, 0,45 µm
PCR-Geräte	Eppendorf Thermocycler Biometra T3 Thermocycler
pH-Meter	WTW pH 523
Photometer	Pharmacia Ultrospec 3000
Protein-Minigelkammer	BioRad Mini-Protean II
Proteinblotkammer	Hartenstein Laborbedarf
Schüttelinkubatoren	Bühler W55 swip Innova TM 4300
Sequenziergerät	ABI Prism 310 Genetic Analyzer, Perkin Elmer
Speedvac-Konzentrator	SpeedVac SC 110 Savant
Sterilarbeitsbank	Nuaire A/B3
Sterilfilter	Schleicher & Schuell, 0,45 µm und 0,22 µm

Tischinkubatoren	Eppendorf Thermostat 5320 Liebisch Thermoblock
Tischzentrifuge	Eppendorf 5415C
Ultraschallgerät	Bandelin Sonoplus HD 70
Vakuum-Blot-System	Pharmacia Biotech
Videoprintanlage	Mitsubishi, Hitachi, Cybertech Cb 1
Vortexer	Vortex-Genie 2, Scientific Industries
Wasserbad	GFL 1083
Zellinkubator	Heraeus T10A

3.5 Medien und Nährböden

Alle Nährmedien wurden für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Zur Herstellung von Agarplatten wurde den Medien vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar zugegeben. Für Softagar wurde dem Medium 0,5 % (w/v) Agar (Difco) hinzugefügt.

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

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

3.5.2 X-Gal-Medium

LB-Medium mit folgenden Zusätzen:

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

3.5.3 Saccharose-Medium

LB-Medium ohne NaCl

10 % (w/v) Saccharose (Stocklösung 50 % (w/v) Saccharose, sterilfiltriert)

3.5.4 MacConkey-Agar

50 g/l Difco MacConkey-Agar (enthält 1 % Laktose)

3.5.5 M63B1-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

Nach dem Autoklavieren wurden folgende getrennt sterilisierte Komponenten zugesetzt:

0,05 % (w/v) Thiamin	2 ml
20 % (w/v) Glukose	20 ml

3.5.6 Antibiotikazusätze

Die Antibiotika-Stocklösungen (1000-fach konzentriert) wurden sterilfiltriert und den autoklavierten Medien nach dem Abkühlen auf 45 °C zugesetzt. Die Antibiotika-Stocklösungen wurden bei -20 °C gelagert.

Antibiotikum	Endkonzentration [µg/ml]	Lösungsmittel
Ampicillin	100	H ₂ O _{bidest.}
Chloramphenicol	20	100 % EtOH
Kanamycin	50	H ₂ O _{bidest.}
Nalidixin	20	H ₂ O _{bidest.}
Rifampicin	30	70 % (v/v) EtOH
Streptomycin	100	H ₂ O _{bidest.}
Tetrazyklin	10	70 % (v/v) EtOH

3.5.7 Nährmedium für INT407-Zellen

Die in der Zellkultur verwendeten Nährmedien und Medienzusätze (FCS, Gentamycin, Glutamin, Trypsin/EDTA, DMSO) wurden von Gibco BRL (Eggenstein), C.C.pro GmbH (Neustadt) oder PAA (Cölbe) bezogen.

Das fötale Kälberserum (FCS) wurde vor Zugabe zum Medium 1 h bei 65 °C hitzeinaktiviert, aliquotiert (50 ml) und bei -20 °C aufbewahrt. Glutamin-Lösungen wurden in 5 ml Aliquots bei -20 °C gelagert. Die Supplemente wurden steril zugesetzt.

Medium:	MEM
Supplemente:	10 % (v/v) FCS 2 mM Glutamin

3.6 Patientenstuhlproben

Die Patientenstuhlproben wurden erhalten von Prof. Dr. W. Kruis (Abteilung Innere Medizin des Krankenhauses Kalk, Köln).

3.7 Zelllinien

Für die Zellversuche wurde die humane embryonale intestinale Epithelzelllinie INT407 verwendet. Die Zellen wurden von der "European Collection of Cell Cultures" (England) bezogen.

3.8 Versuchstiere

Die Mausinzuchtlinie Balb/c wurde von Charles River (Sulzfeld) bezogen. Die Tiere wurden am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie der Universität Pécs (Ungarn) gehalten und *ad libitum* mit Wasser und Trockenfutter versorgt. Die Isolatoren wurden täglich gereinigt.

3.9 Puffer und Lösungen

Für Enzymreaktionen wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer und Lösungen verwendet. Wurden Puffer und Lösungen selbst angesetzt, sind diese unter den jeweiligen Methoden angegeben. Bei Enzymreaktionen wurde $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ und für alle anderen Lösungen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ eingesetzt.

3.10 Antikörper

- Polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen Intimin ($\alpha\text{RIHisEae}$) (McKee & O'Brien, 1996; erhalten von Dr. M. R. Wachtel, Bethesda, Maryland, USA)
- Polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen K88-Fimbrien zur Serumagglutination (erhalten von Dr. W. Schrödl, Universität Leipzig)
- Polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen K99-Fimbrien zur Serumagglutination (erhalten von Dr. W. Schrödl, Universität Leipzig)
- Polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen F1C-Fimbrien (erhalten von Dr. A. S. Khan, Universität Würzburg)
- Peroxidase-gekoppelter Anti-Kaninchen-Antikörper (Dianova, Hamburg)
- Peroxidase-gekoppelter Anti-Maus-Antikörper (Dianova, Hamburg)

3.11 Größenmarker

3.11.1 DNA-Größenmarker

Für die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen wurden die folgenden Größenmarker eingesetzt.

Die 1kb Leiter und die 100 bp-Leiter wurden von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

100 bp-Leiter		1 kb-Leiter	
Fragment	Größe in kb	Fragment	Größe in kb
1	3,000	1	10,00
2	2,000	2	8,00
3	1,500	3	6,00
4	1,200	4	5,00
5	1,031	5	4,00
6	0,900	6	3,50
7	0,800	7	3,00
8	0,700	8	2,50
9	0,600	9	2,00
10	0,500	10	1,50
11	0,400	11	1,00
12	0,300	12	0,75
13	0,200	13	0,50
14	0,100	14	0,25

3.11.2 Protein-Größenmarker

Als Molekulargewichtstandard für Proteine diente der “Full Range Rainbow”-Marker der Firma Amersham (Braunschweig).

Fragment	Größe in kDa	Farbe
1	250	Blau
2	160	Rot
3	105	Grün
4	75	Gelb
5	50	Violett
6	35	Blau
7	30	Orange
8	25	Grün
9	15	Blau
10	10	Rot

4 Methoden

Soweit nicht anders angegeben sind die Anleitungen dem "CSH Laboratory Manual" (Sambrook *et al.*, 1989) entnommen. Zentrifugationsschritte ohne weitere Angaben wurden in einer Tischzentrifuge mit 10 000 x g ausgeführt.

4.1 Isolierung von Plasmid-DNA mit der Schnelllysat-Methode (Boom *et al.*, 1990)

Eine unter Selektionsdruck angezogene 3 ml Übernachtskultur (ÜNK) wird in einem Reaktionsgefäß 1 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in 150 µl Puffer I gelöst. Zu dieser Zellsuspension werden 150 µl frisch angesetzter Puffer II gegeben. Der Ansatz wird durch mehrmaliges Invertieren gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Die Lösung sollte dabei aufklaren, was die erfolgreiche Zellyse anzeigt. Nach Zugabe von 150 µl eiskaltem Puffer III wird der Ansatz kurz gemischt und nochmals für 5 min auf Eis inkubiert. Ausgefallene chromosomale DNA und Zelltrümmer werden anschließend abzentrifugiert (5 min). Der klare Überstand wird abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in das 900 µl L6-Puffer und 50 µl Diatomeenerde-Suspension vorgelegt wurden. Während einer Inkubationszeit von 1 min bei Raumtemperatur (RT) bindet die Plasmid-DNA an die Diatomeenerde, die von der verbleibenden Flüssigkeit über einen Filter getrennt und mit 2 ml Waschpuffer gewaschen wird. Flüssigkeitsreste werden durch kurzzeitiges (15 s) Zentrifugieren entfernt. Zur Elution der Plasmid-DNA von der Diatomeenerde wird der Filter auf ein neues Reaktionsgefäß gesteckt und mit 50 µl H₂O_{bidest.} 5 min inkubiert. Nach 15 s Zentrifugation liegt die Plasmid-DNA gereinigt im Reaktionsgefäß vor und wird bei -20 °C aufbewahrt.

Benötigte Lösungen:

Puffer I:	1 M Tris-HCl, pH 7,5	5 ml
	0,5 M EDTA, pH 8,0	2 ml
	RNase (10 mg/ml)	1 ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 100 ml
Puffer II:	NaOH	0,2 N
	SDS	1 % (w/v)
Puffer III:	Na-Acetat, pH 4,8	3 M

L6-Puffer:	0,1 M Tris-HCl, pH 6,4	100 ml
	0,5 M EDTA, pH 8,0	8,8 ml
	H ₂ O _{dest.}	13,2 ml
	Triton X-100	2,6 ml
	Guanidinthiocyanat	120 g
Diatomeenerde-Suspension:	Diatomeenerde	10 g
	H ₂ O _{dest.}	50 ml
	HCl konz.	500 µl
Waschpuffer:	5 M NaCl	10 ml
	1 M Tris-HCl, pH 7,5	5 ml
	0,5 M EDTA, pH 8,0	2,5 ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 250 ml
	EtOH (p. a.)	250 ml

4.2 Plasmidisolierung, mittlerer Maßstab (“Plasmid Midi Kit”, QIAGEN)

Der “Plasmid Midi Kit” von QIAGEN wird für die Isolierung von “high-copy”- und “low-copy”-Plasmiden verwendet. Dazu wird eine 50 ml- (bei “high-copy”-Plasmiden) bzw. 200 ml- (bei “low-copy”-Plasmiden) Baktrienkultur unter Selektionsdruck des entsprechenden Antibiotikums ÜN bei 37 °C angezogen und anschließend für 10 min mit 6 000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wird in 4 ml bzw. 8 ml Lösung P1 resuspendiert. Es werden 4 ml bzw. 8 ml Lösung P2 zugegeben, der Ansatz wird vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Danach werden 4 ml bzw. 8 ml kalte Lösung P3 hinzugefügt. Anschließend wird für 15 min auf Eis inkubiert und für 15 min mit 20 000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird in einen neuen Zentrifugenbecher überführt und erneut für 15 min mit 20 000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Eine QIAGEN-Säule wird mit 4 ml Puffer QBT äquilibriert und der Überstand der Zentrifugation auf die Säule gegeben. Es wird zweimal mit jeweils 10 ml Puffer QC gewaschen. Die Säule wird auf ein neues Zentrifugenröhrchen gesetzt und die Plasmid-DNA mit 5 ml Puffer QF eluiert. Durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol wird die Plasmid-DNA gefällt. Die DNA wird durch Zentrifugation für 30 min mit 15 000 x g bei 4 °C pelletiert, mit 200 µl eiskaltem 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, 5 min luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen H₂O_{bidest.} aufgenommen.

4.3 Isolierung von DNA aus Stuhlproben (Blum-Oehler *et al.*, 2003)

Für die Isolierung von Plasmid-DNA direkt aus Stuhlproben werden 100 mg Stuhl mit 500 µl H₂O_{bidest.} gemischt und der Ansatz wird für 10 min bei 100 °C aufgeköcht. Anschließend werden

alle Feststoffe für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand (500 µl) wird mit 900 µl L6-Puffer und 50 µl Diatomeenerde-Suspension (siehe 4.1) vermischt und für 2 min bei RT inkubiert. Während dieser Zeit bindet die DNA an die Diatomeenerde, die von der verbleibenden Flüssigkeit über einen Filter getrennt und mit 2 ml Waschpuffer (siehe 4.1) gewaschen wird. Flüssigkeitsreste werden durch kurzzeitiges (15 s) Zentrifugieren entfernt. Zur Elution der DNA von der Diatomeenerde wird der Filter auf ein neues Reaktionsgefäß gesteckt und mit 30 µl H₂O_{bidest.} 5 min inkubiert. Nach 15 s Zentrifugation liegt die DNA gereinigt im Reaktionsgefäß vor und wird bei -20 °C aufbewahrt. Für PCR-Reaktionen werden 2 µl des Eluats eingesetzt.

4.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten (“QIAquick PCR Purification Kit”, QIAGEN)

Der “QIAquick PCR Purification Kit” eignet sich für die Aufreinigung von einzel- oder doppelsträngigen DNA-Fragmenten aus PCR-Reaktionen und anderen enzymatischen Reaktionen. Dazu werden 5 Volumen Puffer PB zu 1 Volumen wässriger DNA-Lösung gegeben und miteinander vermischt. Anschließend wird der Ansatz auf eine Säule pipettiert und 30 s abzentrifugiert. Die an die Säule gebundene DNA wird mit 0,75 ml Puffer PE gewaschen und Flüssigkeitsreste werden 1 min abzentrifugiert. Danach wird die Säule auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt und die DNA mit 50 µl H₂O_{bidest.} eluiert.

4.5 Ethanol-Fällung von Plasmid-DNA

Zur Konzentrierung von DNA werden DNA-Lösungen mit 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 4,8) und 2 Volumen absolutem Ethanol versetzt, geschüttelt und mindestens 20 min bei -80 °C gefällt. Anschließend wird die gefällte DNA 10 min in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert, zur Entfernung von Salzen mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und im Speedvac-Konzentrator getrocknet. Das getrocknete DNA-Pellet wird in einem geeigneten Volumen H₂O_{bidest.} aufgenommen.

4.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgt durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm. Eine Absorption von $A_{260} = 1$ entspricht bei Verwendung von Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von $d = 1$ cm ca. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, ca. 40 µg/ml RNA bzw. ca. 33 µg/ml einzelsträngiger Oligonukleotide. Die Reinheit von Nukleinsäuren kann durch zusätzliche Bestimmung der Absorption bei 280 nm ermittelt werden. Die Nukleinsäuren weisen eine ausreichende Reinheit auf, wenn das Verhältnis von A_{260}/A_{280} über 1,8 liegt.

4.7 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen erfolgt nach den von den Herstellern angegebenen Bedingungen. Im 20 µl-Reaktionsansatz wird die in H₂O_{bidest.} gelöste DNA mit 0,1 Volumen des geeigneten 10 x Reaktionspuffers und mit ca. 5 Units des entsprechenden Restriktionsenzym gemischt. Die Temperatur, bei der die Spaltungsansätze für 1-2 h inkubiert werden, beträgt je nach verwendeter Endonuklease 30 °C oder 37 °C. Zur Entfernung von RNA kann zum Spaltansatz 1µl RNase (10 mg/ml) zugesetzt werden. Die Spaltung wird durch Zugabe von 0,2 Volumen Stop-Mix (siehe 4.8) beendet. Soll die DNA weiter aufgearbeitet werden, wird das Restriktionsenzym entweder durch Erhitzen für 20 min bei 75 °C inaktiviert oder durch Aufreinigung entfernt.

4.8 Horizontale Gelelektrophorese

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

% Agarose	Größe der linearen DNA (kb)
0,3	5,0 - 60
0,6	1,0 - 20
0,7	0,8 - 10
0,9	0,5 - 7
1,2	0,4 - 6
1,5	0,2 - 4
2,0	0,1 - 3

Zur Herstellung des Agarosegels wird die Agarose in dem geeigneten Laufpuffer in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sie vollständig gelöst ist. Nach Abkühlung auf ca. 50 °C wird die Agarose in eine abgedichtete Gießvorrichtung gegossen und der Kamm eingesetzt. Nachdem das Gel erstarrt ist, wird der Kamm herausgezogen und das Gel in die Elektrophoresekammer gelegt. Das Gel wird mit Laufpuffer überschichtet, die Proben werden mit 0,2 Volumen Stop-Mix versetzt und aufgetragen. Nach erfolgter Gelelektrophorese kann die aufgetrennte DNA durch Inkubation des Gels in einem Ethidiumbromidbad (10 mg/ml) 15 min angefärbt und anschließend unter UV-Licht analysiert oder zur Dokumentation fotografiert werden.

Bedingungen für verschiedene Gele:

Gelart	Laufpuffer	Spannung	Dauer
analytisches Gel	0,5 x TBE	120 V	1-2 h
präparatives Gel	1 x TAE	80 V	2-4 h
analytisches Gel	1 x TPE	30 V	ÜN

Benötigte Lösungen:

50 x Tris-Acetat-EDTA (TAE):	Tris	242	g
	Eisessig	57,1	ml
	0,5 M EDTA, pH 8,0	100	ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000	ml
10 x Tris-Phosphat-EDTA (TPE):	Tris	108	g
	85 % Phosphorsäure	15	ml
	0,5 M EDTA, pH 8,0	40	ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000	ml
10 x Tris-Borat-EDTA (TBE):	Tris	108	g
	Borsäure	55	g
	0,5 M EDTA, pH 8,0	40	ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000	ml
6 x Stop-Mix:	Bromphenolblau	0,25	% (w/v)
	Xylencyanol	0,25	% (w/v)
	Ficoll Type 400	15	% (w/v)

4.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente werden durch Elektrophorese auf einem präparativen TAE-Gel getrennt und anschließend mit EtBr gefärbt. Die gewünschte Bande wird unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und das Agarosestück in ein Reaktionsgefäß überführt.

4.9.1 “GeneClean[®] Kit” (Dianova)

Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass DNA in einer Lösung hoher Ionenstärke (Agarose-NaI-Lösung) an Glasmilch gebunden wird und anschließend mit einer Lösung niedriger Ionenstärke (H₂O_{bidest.}) von der Glasmilch abgelöst wird.

Das Gelstück mit dem zu isolierenden DNA-Fragment wird in 3 Volumen (w/v) 6 M Natriumjodidlösung bei 50 °C geschmolzen. Danach wird der Ansatz mit 5 µl Glasmilch versetzt, gut gemischt und für 5 min bei RT inkubiert, wodurch die DNA fest an die Glasmilch binden kann. Anschließend wird die Glasmilch für ca. 20 s abzentrifugiert und dreimal mit 1 ml eiskaltem “New-Wash”-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschvorgang werden die Waschlösungsreste sorgfältig beseitigt. Das Pellet wird nun in 10 µl H₂O_{bidest.} aufgenommen und erneut 5 min bei 50 °C inkubiert, wobei sich die DNA von der Glasmilch löst. Die Glasmilch wird 2 min abzentrifugiert und der Überstand mit der gelösten DNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

4.9.2 “QIAquick Gel Extraction Kit” (QIAGEN)

Das Gelstück mit dem zu isolierenden DNA-Fragment wird in 3 Volumen (w/v) Puffer QG 10 min bei 50 °C erwärmt. Sobald die Agarose aufgelöst ist, wird 1 Volumen (w/v) des Gelstücks entsprechend Isopropanol zugegeben und der Ansatz vermischt. Anschließend wird das Gemisch auf eine Säule gegeben und abzentrifugiert, wobei die DNA an das Säulenmaterial bindet. Um Agarosereste und Salze zu entfernen, wird die Säule zunächst mit 0,5 ml Puffer QG und anschließend mit 0,75 ml Puffer PE gewaschen. Flüssigkeitsreste werden 1 min abzentrifugiert. Danach wird die Säule auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt und die an das Säulenmaterial gebundene DNA durch Zugabe von 50 µl H₂O_{bidest.} eluiert.

4.10 Entfernen von überhängenden 3'- und 5'-DNA-Enden

Zur Auffüllung von 5'-überhängenden Enden sowie zum Abbauen von 3'-überhängenden Enden von DNA-Fragmenten, die über “blunt ends” ligiert werden sollen, wird das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase verwendet. Dazu werden 13 µl des aufzufüllenden DNA-Fragments (ca. 1 µg DNA), 4 µl dNTP-Mix, 2 µl 10 x Reaktionspuffer und 5 Units Klenow-Enzym gemischt und der Ansatz wird für 30 min bei 30 °C inkubiert. Danach wird das Klenow-Enzym durch Erhitzen bei 75 °C (10 min) inaktiviert oder die DNA aufgereinigt.

dNTP-Mix:	dATP	0,5 mM
	dCTP	0,5 mM
	dGTP	0,5 mM
	dTTP	0,5 mM

4.11 “Polymerase chain reaction” (PCR) (Saiki *et al.*, 1988)

Mit dieser Methode können Nukleotidsequenzen *in vitro* enzymatisch exponentiell amplifiziert werden. Die DNA-Sequenz des PCR-Produktes kann dabei gezielt verändert werden.

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

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

Dieser Reaktionsansatz wird 3 min bei 94 °C aufgeköcht. Die Amplifikation der DNA erfolgt über 30 Zyklen unter den jeweils optimalen Bedingungen für das eingesetzte Primerpaar und das zu amplifizierende DNA-Fragment: 1 min Denaturierung bei 94 °C, 1 min “Annealing” der Primer (ca. 2 °C unterhalb der Schmelztemperatur der Oligonukleotide), DNA-Synthese (1 min/kb der zu amplifizierenden DNA) bei 72 °C. Danach wird der Ansatz nochmals 3 min bei 72 °C inkubiert, um die vollständige Synthese aller DNA-Fragmente zu gewährleisten.

4.12 “Long distance”-PCR (“ELONGase[®] Enzyme Mix”, Invitrogen)

Für die Amplifizierung von großen DNA-Fragmenten ist die *Taq* DNA-Polymerase allein nicht stabil genug. Um eine effektive Amplifizierung von DNA-Fragmenten über 4 kb zu erreichen, wird deswegen häufig ein Zwei-Polymerasen System verwendet. Der “ELONGase Enzyme mix” enthält sowohl eine *Taq* DNA-Polymerase als auch eine *Pyrococcus species* GB-D thermostabile DNA-Polymerase. Zusätzlich können noch die Pufferbedingungen und hierbei speziell die Mg²⁺-Konzentration verändert werden.

Für eine “long distance” PCR wird folgender Ansatz in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß gegeben:

10 mM dNTP-Mix	1 µl
10 µM Primer 1	1 µl
10 µM Primer 2	1 µl
100 ng/µl Template-DNA	1 µl
eLONGase Enzymmix	1 µl
5 x Puffer A	abgestimmt auf jeweilige PCR-Reaktion
5 x Puffer B	abgestimmt auf jeweilige PCR-Reaktion
H ₂ O _{bidest.}	ad 50 µl

Der Reaktionsansatz wird 30 s bei 94 °C denaturiert. Die Amplifikation der DNA erfolgt über 35 Zyklen unter den jeweils optimalen Bedingungen für das eingesetzte Primerpaar und das zu amplifizierende DNA-Fragment: 30 s Denaturierung bei 94 °C, 30 s “Annealing” der Primer (ca. 2 °C unterhalb der Schmelztemperatur der Oligonukleotide), DNA-Synthese (1 min/kb der zu amplifizierenden DNA) bei 68 °C.

4.13 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um eine Religation von Vektor-DNA nach erfolgter Restriktion zu verhindern, sollten die DNA-Enden dephosphoryliert werden. Die Abspaltung der 5'-Phosphatgruppe erfolgt durch Zugabe von 0,1 Volumen des mit der Phosphatase mitgelieferten 10 x Phosphatasepuffers und alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (1 Unit). Dieser Ansatz wird 60 min bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der Phosphatase wird der Ansatz 15 min bei 85 °C inkubiert oder die DNA direkt aufgereinigt.

4.14 Herstellung rekombinanter DNA-Moleküle

Vektor- und Insert-DNA werden mit entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten und aufgereinigt. Der Ligations-Ansatz enthält Vektor- und Insert-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:3, 4 µl 5 x Ligationspuffer und 1 µl T4-Ligase (1 Unit) in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Die Ligation von “blunt ends” erfolgt ÜN bei RT, “sticky end”-Ligationen werden ÜN bei 14 °C durchgeführt.

4.15 Herstellung kompetenter Zellen

Zur Aufnahme rekombinanter Plasmidmoleküle muss die bakterielle Zellwand und Zellmembran durchlässig (transformationskompetent) gemacht werden. Dieses kann durch spezielle vorherige Behandlung der Zellen induziert bzw. vorbereitet werden.

4.15.1 Behandlung mit CaCl₂

50 ml LB-Medium werden mit 500 µl einer ÜN-Kultur angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 geschüttelt. Nach einer Abkühlung auf Eis wird die Bakterienkultur 10 min mit 2 000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wird in 20 ml eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und für mindestens 20 min auf Eis inkubiert. Danach werden die Zellen erneut für 10 min mit 2 000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wird anschließend in insgesamt

2,5 ml 100 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen, mit Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 15 % (v/v) versetzt, aliquotiert (jeweils 200 µl) und bei -80 °C gelagert.

4.15.2 Kompetente Zellen für die Elektroporation

150 ml LB-Medium werden mit 1,5 ml einer ÜN-Kultur beimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 geschüttelt. Danach wird die Bakterienkultur 10 min mit 2 000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wird 3 x in sterilem, eiskalten 10 % (v/v) Glycerin gewaschen, zuerst mit 100 %, dann mit 50 % und zuletzt mit 10 % des Ausgangsvolumens. Schließlich wird das gewaschene Pellet in 300 µl 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert, aliquotiert (jeweils 40 µl) und bei -80 °C gelagert.

4.16 Transformation von Bakterienzellen

Die Aufnahme isolierter DNA durch Bakterien kann mit Hilfe einer Inkubation der Bakterien mit CaCl₂ in Kombination mit einem kurzen Hitzeschock oder durch kurzzeitiges Anlegen eines elektrischen Feldes erreicht werden.

4.16.1 Transformation mit Hitzeschock

Die CaCl₂-kompetenten Zellen werden auf Eis aufgetaut. Danach werden ca. 0,5 µg Plasmid-DNA bzw. 10 µl des Ligationsansatzes zu den Zellen pipettiert und miteinander vermischt. Der Ansatz wird für 30-60 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA in die Zellen erfolgt durch einen kurzen Hitzeschock von 90 s bei 43 °C. Danach wird der Ansatz sofort wieder auf Eis gestellt. In das Reaktionsgefäß wird 1 ml LB-Medium zugegeben und der Ansatz für 1-2 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert. In dieser Zeit können die Zellen auf dem Plasmid kodierte Resistenzgene exprimieren. Die Bakterien werden danach abzentrifugiert und der Überstand wird bis auf 100 µl entfernt. Das Pellet wird im restlichen Überstand resuspendiert und auf einer Selektionsagarplatte ausplattiert.

4.16.2 Elektroporation

Auf Eis aufgetaute elektrokompetente Zellen werden mit 1-2 µl salzfreier Plasmid-DNA-Lösung (1-100 ng DNA) gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Danach wird dieser Ansatz luftblasenfrei zwischen die beiden Elektroden einer sterilen und vorgekühlten 2 mm Elektroporationsküvette pipettiert. Die Küvette wird gut abgetrocknet und in den Elektrodenhalter eingesetzt. Nach der

Durchführung des Elektroimpulses bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 μ F wird die Bakteriensuspension mit 1 ml LB-Medium aus der Küvette gespült und bei 37 °C für 1-2 h im Schüttler inkubiert. Anschließend werden die Bakterien auf einer Selektionsagarplatte ausplattiert.

4.17 Konjugation zwischen einem *E. coli* Donor- und Rezipientenstamm

4.17.1 Konjugation

Jeweils 1 ml einer ÜN-Kultur des Donor- und Rezipientenstammes wird in 24 ml LB-Medium verdünnt und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 geschüttelt. Nach 10 min Inkubation auf Eis werden 100 μ l der beiden Kulturen miteinander gemischt, auf einer LB-Platte ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wird der Bakterienrasen mit 2 ml LB-Medium oder 0,9 % (w/v) NaCl abgeschwemmt. Diese Suspension wird entsprechend verdünnt und auf Selektionsagarplatten ausplattiert, die nur das Wachstum von Transkonjuganten zulassen.

4.17.2 *In vitro*-Filterkonjugation

Eine ÜN-Kultur des Donor- und Rezipientenstammes wird jeweils 1:20 in LB-Medium verdünnt und bei 37 °C für 2 h geschüttelt. Daraufhin werden je 0,5 ml der beiden Kulturen miteinander gemischt und das Medium wird über einen Nitrozellulosefilter mittels Unterdruck (Wasserstrahlpumpe) abgesaugt. Die Unterseite des Filters wird auf einer vorgewärmten LB-Agarplatte platziert, die Bakterien befinden sich dabei auf der Oberseite. Die Inkubation des Ansatzes erfolgt 1 h bei 37 °C. Anschließend werden die Bakterien mit 1 ml 0,9 % (w/v) NaCl vom Filter gewaschen. Diese Suspension wird entsprechend verdünnt und auf Selektionsagarplatten ausplattiert, die nur das Wachstum von Transkonjuganten zulassen.

Zur Bestimmung der Konjugationsfrequenz wird zusätzlich eine geeignete Verdünnung des Konjugationsansatzes auf Selektionsagarplatten ausplattiert, die nur ein Wachstum des Donors zulassen. Aus der Anzahl der Transkonjuganten pro Donorzelle kann die Konjugationsfrequenz berechnet werden.

4.18 “One-step”-Inaktivierung von chromosomalen Genen in *E. coli* (Datsenko & Wanner, 2000)

Diese Methode ist eine einfache und höchst effiziente einstufige Allelaustauschmethode, um chromosomale Gene in *E. coli* unter Verwendung von PCR-Produkten zu inaktivieren, wobei PCR-Primer die Sequenzhomologien zu den Randbereichen der Zielgene liefern. Bei dieser

Prozedur ist für die Rekombination die Red-Rekombinase des λ -Phagen erforderlich, welche unter der Kontrolle eines mit L-Arabinose induzierbaren Promotors auf einem Helferplasmid (pKD46) mit temperatursensitivem Replikationsursprung kodiert ist.

Das Templateplasmid pKD3 trägt ein Chloramphenicol-Resistenzgen, das von FLP-Erkennungssequenzen (FRT) flankiert wird. Dieses DNA-Fragment wird mit Primern amplifiziert, die eine mindestens 36 Nukleotide lange homologe Sequenz zu den Randbereichen des zu deletierenden Zielgens besitzen. Der zu verändernde *E. coli* Stamm wird mit dem Helferplasmid pKD46 transformiert. Von diesen Transformanten werden elektrokompetente Zellen hergestellt. Hierfür werden die Bakterien unter Zugabe von Ampicillin (100 $\mu\text{g/ml}$) und 1 mM L-Arabinose, wodurch die Expression der Red-Rekombinase des λ -Phagen induziert wird, bei 30 °C bis zu einer OD_{600} von 0,6 angezogen. Die kompetenten Zellen werden mit 10-100 ng PCR-Produkt transformiert und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die induzierte Red-Rekombinase kann während dieser Zeit die Integration des PCR-Fragments in das Chromosom katalysieren. Anschließend wird eine Hälfte des Transformationsansatzes auf Chloramphenicol-Agarplatten ausplattiert, die andere Hälfte wird über Nacht bei RT inkubiert und danach ausplattiert. Chloramphenicol-resistente Klone werden auf LB-Platten ohne Selektionsdruck überstrichen und bei 43 °C inkubiert. Bei dieser Temperatur kann das Helferplasmid pKD46 nicht mehr replizieren. Danach werden die Klone auf Ampicillin-Sensitivität getestet, was den Verlust des Helferplasmids pKD46 bedeutet.

Um die Chloramphenicol-Kassette aus dem Chromosom zu entfernen, werden die Bakterienzellen mit dem Helferplasmid pCP20 transformiert. Der Ansatz wird auf Ampicillin-Agarplatten ausplattiert und bei 30 °C über Nacht inkubiert. Anschließend werden die erhaltenen Klone auf LB-Agarplatten übertragen und bei 43 °C inkubiert. Da das Plasmid pCP20 das unter der Kontrolle eines temperaturabhängigen Promotors stehende FLP-Rekombinasegen trägt und einen temperatursensitiven Replikationsursprung besitzt, wird die FLP-Rekombinase exprimiert und gleichzeitig kann das Helferplasmid pCP20 nicht mehr replizieren. Die FLP-Rekombinase erkennt die FRT-Sequenzen und schneidet das Chloramphenicol-Resistenzgen aus. Die Bakterienstämme werden anschließend auf den Verlust aller Antibiotika-Resistenzen getestet.

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

1 ml einer ÜN-Kultur des betreffenden *E. coli* Stammes wird in einem Reaktionsgefäß abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wird mit 1 ml TNE gewaschen und anschließend in 270 μl TNEX aufgenommen. Es werden 30 μl frisch angesetzte Lysozymlösung (5 mg/ml) zugegeben und der Ansatz wird für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 15 μl

Proteinase K (20 mg/ml) und eine weitere Inkubation von 1-2 h bei 65 °C, wobei die Lösung vollständig aufklaren muss. Die chromosomale DNA wird durch Zugabe von 0,05 Volumen 5 M NaCl (15 µl) und 500 µl Ethanol (p.a.) ausgefällt, danach in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert, zweimal mit 200 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und 20 min luftgetrocknet. Das Pellet wird in 100 µl H₂O_{bidest.} aufgenommen.

Benötigte Lösungen:

TNE:	Tris-HCl, pH 8,0	10 mM
	NaCl	10 mM
	EDTA, pH 8,0	10 mM
TNEX:	TNE	
	Triton X-100	1 % (v/v)

4.20 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Voraussetzung für die Durchführung der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) ist die Verwendung von unbeschädigter Gesamt-DNA. Bei der herkömmlichen DNA-Isolierung treten durch mechanische Scherkräfte häufig Strangbrüche auf. Dies wird durch die Einbettung der Bakterien in “low-melting” (LGT)-Agarose vor der DNA-Isolierung vermieden.

4.20.1 Isolierung von “High Molecular Weight”-DNA für die Pulsfeld-Gelelektrophorese

10 ml LB-Medium werden mit einer Bakterienkolonie beimpft und ÜN bei 37 °C inkubiert. Mit 100 µl dieser ÜN-Kultur wird eine 1:10 Verdünnung in 0,9%iger (w/v) NaCl-Lösung hergestellt und die optische Dichte bei 600 nm bestimmt. Liegt der Wert OD₆₀₀ bei 0,17, werden 4 ml der ÜN-Kultur für die Isolierung verwendet. Die errechnete Menge an Bakteriensuspension wird in einem 2 ml Reaktionsgefäß pelletiert und anschließend zweimal mit 1 ml SE-Puffer gewaschen. Nachdem die Zellen wieder in 1 ml SE-Puffer aufgenommen wurden, wird erneut die optische Dichte bei 600 nm gemessen (100 µl Zellen + 900 µl SE-Puffer). Die OD₆₀₀ sollte zwischen 0,6 und 0,8 liegen. Zum Gießen der Blöckchen werden zwei Aluminiumschienen ineinander gelegt und an beiden Enden so mit Abstandshaltern versehen, dass eine Rinne entsteht. Zum Einbetten der Bakterien wird 2 % (w/v) LGT-Agarose verwendet. Die Agarose wird aufgeköcht und nach kurzem Abkühlen werden 900 µl Bakteriensuspension mit 900 µl Agarose gemischt und schnell luftblasenfrei in die vorbereitete Schiene pipettiert. Nach Erstarren der Agarose im Kühlschrank werden Blöckchen zugeschnitten und in ein 15 ml Greiner-Röhrchen überführt, das 5 ml NDS-

Lösung und 2 mg/ml Proteinase K enthält. Die Röhren werden ÜN bei 50 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Diese Behandlung bewirkt die Zelllyse und Reinigung der DNA. Zur Entfernung der Proteinase K, die die Spaltung der DNA mit Restriktionsenzymen behindern würde, werden die Agaroseblöckchen viermal gegen TE-Puffer (10 ml) äquilibriert. Nach jeweils 2-stündiger Inkubation bei RT unter leichtem Schütteln wird der TE-Puffer gewechselt. Die Blöckchen können dann im Kühlschrank längere Zeit aufbewahrt werden. Blöckchen mit genomischer DNA von *E. coli* Bakterien sollten erst nach einer Woche zur Restriktionsspaltung verwendet werden.

Benötigte Lösungen:

SE-Puffer:	NaCl	75	mM
	EDTA, pH 7,4	25	mM
TE-Puffer:	Tris-HCl, pH 7,5	10	mM
	EDTA, pH 7,5	5	mM
NDS-Puffer:	N-Laurylsarkosin	1	% (w/v)
	EDTA, pH 9,5	0,5	mM
	Proteinase K (frisch zugeben)	2	mg/ml
LGT-Agarose Puffer:	Tris-HCl, pH 7,5	10	mM
	MgCl ₂	10	mM
	EDTA, pH 7,5	0,1	mM
	LGT-Agarose	2	% (w/v)

4.20.2 Restriktionsspaltung von “High Molecular Weight”-DNA

Vor der Restriktionsspaltung der DNA-Blöckchen muss der TE-Puffer aus den Blöckchen entfernt werden, da das EDTA die Spaltung mit Restriktionsenzymen stören würde. Für die Restriktionsspaltung mit dem Enzym *NotI* werden die Blöckchen 1 h bei 50 °C in 1 ml 1 x Restriktionspuffer vorinkubiert. Anschließend wird der Puffer von den Blöckchen entfernt und durch 150 µl frischen 1 x Restriktionspuffer ersetzt. Die DNA in den Agaroseblöckchen wird dann 3 h mit 30 Units Enzym bei 37 °C gespalten.

10 x Restriktionspuffer:	Tris-Acetat	100	mM
	K-Acetat	500	mM
	Mg-Acetat	100	mM

4.20.3 Auftrennung von “High Molecular Weight”-DNA durch Gelelektrophorese

Die Auftrennung der “High Molecular Weight”-DNA erfolgt in einer horizontalen Elektrophoresekammer. Die Agarosekonzentration des Gels beträgt 0,8 % (w/v) in 0,5 x TBE-Puffer (siehe 4.8). Die Dauer des Gellaufs liegt zwischen 21 und 24 h bei steigenden Pulszeiten von 5-50 s. Als Größenstandard wird der “Lambda Ladder”-PFGE-Marker der Firma New England Biolabs verwendet. Nach Beendigung der Elektrophorese wird die DNA durch Inkubation des Gels im Ethidiumbromidbad (10 mg/ml) angefärbt. Das Gel wird anschließend auf einem UV-Transilluminator zur Dokumentation fotografiert.

4.21 “Southern”-Hybridisierung

15 µg chromosomale DNA werden mit einem geeigneten Restriktionsenzym gespalten und in einem 0,8 % (w/v) TPE-Agarosegel (siehe 4.8) aufgetrennt. Die DNA in dem Gel wird anschließend angefärbt und das Gel neben einem fluoreszierenden Lineal unter UV-Licht fotografiert, um die nach der Hybridisierung auftretenden Signale später einzelnen Banden zuordnen und ihre Größe bestimmen zu können. Danach wird die DNA durch Vakuum-“Blotting” auf eine Nylonmembran (Pall Biotodyne B, 0,45 µm) transferiert.

4.21.1 Vakuum-“Blotting”

Zum Blotten wird die Nylonmembran zugeschnitten, die ca. 5 mm größer als das Gel sein sollte. Diese Membran wird kurz in $H_2O_{\text{dest.}}$ und dann für 5 min in 20 x SSC geschwenkt. Währenddessen wird die poröse Trägerplatte der Blotkammer mit $H_2O_{\text{dest.}}$ getränkt und mit der glatten Seite nach oben in die Blotkammer eingelegt. Die Nylonmembran wird nun auf die Trägerplatte gelegt und mit einer Plastikmaske so abgedeckt, dass die Maske die Membran um etwa 2-4 mm überlappt. Das Agarosegel wird luftblasenfrei auf die Plastikmaske aufgelegt, die Kammer mit dem Rahmen verschlossen und anschließend ein Vakuum (50 mbar) angelegt. Die Geloberfläche wird darauf nacheinander mit folgenden Lösungen für die angegebenen Zeiten überschichtet:

Depurinisierungslösung	(0,25 N HCl)	8 min
Denaturierungslösung	(0,5 N NaOH; 1,5 M NaCl)	8 min
Neutralisierungslösung	(0,5 M Tris-HCl, pH 7,5; 1,5 M NaCl)	8 min
20 x SSC	(0,3 M Na-Citrat, pH 7,0; 3 M NaCl)	45 min

Im Anschluss an das "Blotting" wird die Nylonmembran für jeweils 1 min in 0,4 N NaOH geschwenkt und danach in 0,25 M Tris-HCl (pH 7,5) neutralisiert. Nach kurzem Trocknen der Membran auf Whatmanpapier wird die DNA durch UV-Bestrahlung auf der Membran fixiert.

4.21.2 Nichtradioaktive Markierung einer DNA-Sonde und Hybridisierung ("ECLTM-Kit", Amersham)

Die Bindung einer spezifischen, zuvor mit Peroxidase markierten DNA-Sonde an komplementäre Sequenzen auf der Membran kann durch eine Substratreaktion mit anschließender Lichtemission sichtbar gemacht werden. Die Methode der nichtradioaktiven DNA-Markierung mit dem "ECLTM-Kit" ("enhanced chemiluminescence") beruht auf der elektrostatischen Bindung von positiv geladenen Komplexen des Enzyms Peroxidase an die negativ geladene DNA. Durch Glutaraldehyd wird diese lockere Bindung in eine kovalente Bindung umgewandelt. Die Zugabe von zwei Detektionsreagenzien führt bei Substratumsetzung der Peroxidase zu einer Lichtemission: Die Reduktion von Wasserstoffperoxid durch die Peroxidase wird mit der Oxidation von Luminol gekoppelt. Dabei wird Licht emittiert, das auf einem lichtempfindlichen Film nachgewiesen werden kann.

Für die Markierung der Sonde werden 0,1 µg DNA in 10 µl H₂O_{bidest.} aufgenommen und für 5 min bei 96 °C denaturiert. Danach wird das Reaktionsgefäß sofort 5 min auf Eis gestellt. Zu dieser denaturierten DNA werden 10 µl DNA-Labeling-Reagenz gegeben, das die Peroxidase enthält, und der Ansatz wird gut vermischt. Nach Zugabe von 10 µl Glutaraldehyd wird 10 min bei 37 °C inkubiert, um die Bindung des Enzyms an die DNA zu fixieren. Die markierte Sonde wird dann sofort für die Hybridisierungsreaktion eingesetzt.

Die Hybridisierung erfolgt ÜN bei 42 °C im Hybridisierungsröhrchen, nachdem die Membran bereits für 30-60 min unter diesen Bedingungen mit 10-15 ml Hybridisierungslösung vorhybridisiert worden ist. Am nächsten Tag wird die Membran zunächst zweimal für 10 min bzw. 20 min bei 42 °C in entsprechend vorgewärmter Waschlösung I gewaschen. Zwei weitere fünfminütige Waschschrte bei RT mit Waschlösung II schließen sich an. In dieser Lösung kann der Blot einige Zeit aufbewahrt werden, bevor die Signaldetektion stattfindet. Die Membran wird aus der Waschlösung II in ein neues Gefäß überführt, mit gleichen Volumina (5-10 ml, je nach Größe der Membran) Detektionslösung I und II benetzt und unter leichtem Schwenken 1 min inkubiert. Dann wird die überschüssige Flüssigkeit von der Membran entfernt und der Blot in Frischhaltefolie eingeschlagen. Je nach erwarteter Signalstärke wird ein Hyperfilm-ECL für 1-15 min aufgelegt.

Benötigte Lösungen:

Waschlösung I: 0,5 x SSC; 0,4 % (w/v) SDS; 6 M Harnstoff

Waschlösung II: 2 x SSC

4.22 Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden (AmpliTa[®] FS BigDye-Terminator, Perkin Elmer)

Die DNA-Sequenzierung basiert auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Zur Bestimmung der Nukleotidsequenz wird eine PCR-Reaktion durchgeführt, wobei mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte ddNTP's eingesetzt werden. Dadurch kann die Sequenzierreaktion in einem Reaktionsgefäß stattfinden. Zudem können auch PCR-Primer als Sequenzierprimer verwendet werden.

Für eine Sequenzierreaktion werden 4 µl "Premix" und 10 pmol Primer zu 0,5 µg Plasmid-DNA gegeben. Der Ansatz wird mit H₂O_{bidest.} (Merck, Darmstadt) auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die anschließende Sequenzierreaktion wird unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Zunächst wird die Plasmid-DNA für 2 min bei 96 °C denaturiert. Danach folgen 25 Zyklen mit jeweils 30 s Denaturierung bei 96 °C, 15 s "Annealing" bei entsprechender Schmelztemperatur des Primers und 4 min Elongation bei 60 °C. Anschließend erfolgt eine Fällung des Reaktionsansatzes bei Raumtemperatur durch Zugabe von mit 90 µl H₂O_{bidest.} (Merck, Darmstadt), 10 µl 3 M Na-Acetat (pH 4,6) und 250 µl 100 % Ethanol. Nach 15-minütiger Zentrifugation wird der Überstand entfernt und das Pellet mit 250 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und dem Entfernen des Ethanols wird das Pellet im Speedvac-Konzentrator getrocknet. Vor dem Probenauftrag wird das Pellet in 25 µl TSR ("Template Suppression Reagens") aufgenommen und der Ansatz für 2 min bei 90 °C denaturiert.

4.23 Gewinnung von Gesamtzelllysaten durch Lyse mit Laemmli-Puffer

Für die Gewinnung von Gesamtzelllysaten werden jeweils 1,5 ml ÜN-Kultur abzentrifugiert. Sollen die Mengen eines bestimmten Proteins zwischen verschiedenen Stämmen verglichen werden, so sind die ÜN-Kulturen dieser Stämme zuvor auf dieselbe OD₆₀₀ einzustellen. Die Pellets werden in 100 µl H₂O_{bidest.} aufgenommen, mit je 25 µl 5 x Laemmli-Puffer versetzt und für 10 min bei 96 °C gekocht. Daraufhin werden die Proben ein weiteres Mal für 5 min abzentrifugiert und die klaren Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt, die direkt im SDS-PAGE eingesetzt werden können.

- 5 x Laemmli-Puffer:
- I. 1,1 g SDS
0,41 g EDTA
0,17 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
1,1 ml β -Mercaptoethanol
pH-Wert mit NaOH auf 7,2 einstellen
mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ auf 10 ml auffüllen
 - II. 0,2 % (w/v) Bromphenolblau in 50 % (v/v) Glycerin
 - III. I. und II. zu gleichen Teilen mischen

4.24 Gewinnung von Gesamtzelllysaten durch Ultraschall

Für die Herstellung eines 3-fachen Proteinkonzentrats durch Ultraschall werden 6 ml einer ÜN-Kultur 5 min mit 6 000 x g abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wird in 2 ml 1 x PBS aufgenommen und in Intervallen von ca. 30 s solange beschallt, bis die Lösung deutlich aufgeklärt ist. Während des Beschallvorgangs wird die Probe auf Eis gekühlt, um ein Erhitzen und damit die Zerstörung der Proteine zu verhindern. Anschließend wird für 5 min abzentrifugiert und der Überstand bei -20 °C gelagert oder direkt auf ein Proteingel aufgetragen.

10 x PBS:	NaCl	80	g/l
	KCl	2	g/l
	Na_2HPO_4	11,5	g/l
	KH_2PO_4	2	g/l

4.25 Hitzeextraktion von Fimbrien (Khan & Schifferli, 1994)

150 ml LB-Medium werden mit einer Bakterienkolonie beimpft und ÜN bei 37 °C geschüttelt. Die Bakterien werden 5 min mit 6 000 x g abzentrifugiert und das Pellet wird in 10 ml Fimbrienextraktionspuffer aufgenommen. Diese Bakteriensuspension wird für 30 min im 60 °C Wasserbad geschüttelt und anschließend werden die Zellen 10 min mit 10 000 x g abzentrifugiert. Der fimbrienhaltige Überstand wird abgenommen und in ein Centripräp 50 Röhrchen (Millipore) überführt. Durch Zentrifugation werden die 10 ml Ausgangssuspension aufkonzentriert, wobei nach jedem Schritt der sich im oberen Kompartiment befindende Überstand verworfen und die verbleibende Suspension erneut aufkonzentriert wird. Der erste und zweite Zentrifugationsschritt erfolgt für 1 h mit 1 500 x g bei 4 °C, der dritte Schritt unter denselben Bedingungen für 30 min. Die im unteren Kompartiment des Röhrchens verbleibende Flüssigkeit enthält die Fimbrien.

Fimbrienextraktionspuffer:	Tris-HCl	0,5 mM
	NaCl	75 mM
	pH 7,4	

4.26 “Western”-Hybridisierung

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proteinbestandteile werden diese auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Anschließend wird das zu untersuchende Protein durch einen spezifischen Antikörper detektiert.

4.26.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

In der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine unterschiedlicher Größe und Ladung aufgetrennt. Durch das Detergenz SDS wird einerseits die Quartärstruktur von Proteinen zerstört und andererseits SDS an die hydrophoben Regionen des Proteins angelagert. Auf Grund des anionischen Charakters des Dodecylsulfates werden die Ladungen des Proteins kompensiert, und ein Gemisch verschiedener Proteine trennt sich unabhängig von der Ladung den Molekularmassen entsprechend auf.

Für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wird eine Minigelkammer benutzt, in der Gele mit den Maßen 7 x 9 x 0,1 cm (Höhe x Breite x Tiefe) verwendet werden. Die Elektrophorese wird bei RT durchgeführt. Je nach Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine wird das Trenngel mit unterschiedlichen Polyacrylamidkonzentrationen hergestellt. Die Trenngellösung wird zwischen die zuvor mit Ethanol gereinigten Glasplatten gegossen und vorsichtig mit 1-Butanol überschichtet. Nach der Polymerisation wird das 1-Butanol entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. In dieses wird ein Kamm luftblasenfrei zur Ausformung von Taschen eingesetzt. Die Proben werden vor dem Auftragen auf das Gel mit dem entsprechenden Volumen 5 x Laemmli-Puffer (siehe 4.23) versetzt und 10 min bei 96 °C aufgeköcht. Die Auftrennung der Proteine erfolgt bei 30 V, bis die Bromphenolblaubande das Ende des Gels erreicht hat. Als Standard für die Molekulargewichtsbestimmung dient der “Full Range Rainbow”-Marker (Amersham).

Benötigte Lösungen:

10 x Elektrophoresepuffer:	Tris	30	g
	Glycin	144,4	g
	10 % (w/v) SDS	100	ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000	ml

Trenngel:		8 % (w/v)	12 % (w/v)	15 % (w/v)	
	30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid	10,7	16	20	ml
	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	10	10	10	ml
	H ₂ O _{dest.}	18,5	13,2	9,2	ml
	10 % (w/v) SDS	0,4	0,4	0,4	ml
	10 % (w/v) APS	0,4	0,4	0,4	ml
	TEMED	24	16	16	μl
5 % (w/v) Sammelgel:	30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid			0,83	ml
	1,0 M Tris-HCl, pH 6,8			0,63	ml
	H ₂ O _{dest.}			3,4	ml
	10 % (w/v) SDS			50	μl
	10 % (w/v) APS			50	μl
	TEMED			5	μl

4.26.2 “Western-Blotting”

Nach Auftrennung der Proteine in einem diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel werden diese auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell BA S85 reinforced, 0,45 μm) transferiert. Durch einen spezifischen Antikörper kann dann ein bestimmtes Protein aus dem aufgetrennten Proteingemisch sichtbar gemacht werden.

Zum Transfer der Proteine wird eine Blotapparatur mit Graphitplatten verwendet. Zuerst werden die Nitrozellulosemembran und 12 Whatmanpapierfilter auf Gelgröße zurechtgeschnitten. Die Membran wird für 10 min in Anodenpuffer II inkubiert. Auf die untere mit H₂O_{dest.} angefeuchtete Graphitplatte (Anode) werden nun luftblasenfrei 6 Lagen mit Anodenpuffer I getränkte Whatmanpapierstücke gefolgt von 3 Lagen Whatmanpapier, getränkt in Anodenpuffer II, und der eingeweichten Nitrozellulosemembran aufeinander geschichtet. Auf diese wird das Gel gelegt und mit 3 Lagen in Kathodenpuffer getränktem Whatmanpapier bedeckt. In dem Aufbau vorhandene Luftblasen werden entfernt, bevor die obere Graphitplatte (Kathode) aufgelegt wird. Der Transfer erfolgt mit 0,8 mA/cm² Gelfläche für 1 h bei RT.

Benötigte Lösungen:

Anodenpuffer I:	Tris	0,3 M
	Methanol	20 % (v/v)
Anodenpuffer II:	Tris	25 mM
	Methanol	20 % (v/v)

Kathodenpuffer:	Tris	25	mM
	ϵ -Amino-n-Caproneisäure	40	mM
	Methanol	20	% (v/v)

4.26.3 Antikörperreaktion

Nach dem Transfer der Proteine werden zuerst die freien Proteinbindungsstellen auf der Nitrozellulose durch Inkubation für 1 h bei RT in TBS mit 5 % (w/v) Magermilch abgesättigt. Anschließend wird der Blot 1 h bei RT in der Primärantikörperlösung inkubiert (alternativ ÜN bei 4 °C). Die Verdünnung des primären Antikörpers ist abhängig vom jeweiligen Serum und erfolgt in TBS mit 5 % (w/v) Magermilch. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, folgen drei Waschschrirte mit TBS für 5 min bei RT. Daran schließt sich die Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper für ebenfalls 1 h bei RT an (Verdünnung in TBS mit 5 % (w/v) Magermilch). Abschließend wird wiederum dreimal mit TBS für 10 min bei RT gewaschen, bevor die Antikörperdetektion stattfindet. Dazu wird der Blot mit gleichen Volumina "ECL"-Detektionslösung I und II (siehe 4.21.2) benetzt und unter leichtem Schwenken 1 min inkubiert. Dann wird die überschüssige Flüssigkeit von der Membran entfernt und der Blot in Frischhaltefolie eingeschlagen. Je nach erwarteter Signalstärke wird ein Hyperfilm-ECL für 1 s - 4 min aufgelegt.

TBS:	Tris-HCl, pH 7,5	0,05	M
	NaCl	0,15	M

4.27 Coomassie-Blau-Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine können durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht werden. Das Proteingel wird zunächst unter leichtem Schwenken in der Färbelösung für 1 h bei RT gefärbt. Die anschließende Entfärbung durch leichtes Schütteln in Entfärberlösung erfolgt so lange, bis die Hintergrundfärbung entfernt wurde, so dass die Proteinbanden deutlich zu erkennen sind. Der Entfärbevorgang kann durch Zugabe von einem Stückchen Schaumstoff beschleunigt werden. Polyurethane adsorbieren Coomassie Brilliant Blue und regenerieren so kontinuierlich den Entfärber.

Benötigte Lösungen:

Färbelösung:	Coomassie Brilliant Blue R250	0,2	% (w/v)
	Methanol	227	ml
	Eisessig	46	ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 500	ml

Entfärber:	Methanol	30	% (v/v)
	Eisessig	10	% (v/v)

4.28 Qualitative Agglutination

Zum schnellen Nachweis der Fimbrienexpression wird die Zellagglutination durch adhäsinspezifische Bindung an Rezeptorstrukturen ausgenutzt.

4.28.1 Hämagglutinationstest (Jones & Rutter, 1974)

Zum Nachweis der Mannose-resistenten Hämagglutination durch K99-Fimbrien werden 10 ml Schafblut in 0,9 % (w/v) NaCl solange gewaschen (5 min, 2 000 x g, 4 °C), bis der Überstand klar ist. Die verbliebenen Erythrozyten werden in 10 ml 0,9 % (w/v) NaCl aufgenommen und 1:10 verdünnt. Für den Nachweis Mannose-resistenter Hämagglutination wird 1 % (w/v) Mannose zur Erythrozytenlösung zugegeben, bevor 30 µl davon auf einen Glasobjektträger getropft werden. Die zu untersuchenden Bakterien werden mit einem sterilen Zahnstocher von einer Agarplatte abgenommen und mit den Erythrozyten homogen vermischt. Nach einer Inkubation von 5 min auf Eis ist bei Hämagglutinations-positiven Stämmen eine Verklumpung der Erythrozyten zu beobachten.

4.28.2 Serumagglutination

Für den Nachweis von Fimbrien durch Agglutination der Bakterien mit Antikörpern werden 10 µl verdünntes Antiserum mit 10 µl Bakteriensuspension aus einer ÜNK oder mit Bakterien direkt von einer Agarplatte, resuspendiert in PBS (siehe 4.24), auf einem Objektträger vermischt. Nach kurzer Inkubation ist bei positiven Stämmen eine Verklumpung der Bakterienzellen zu beobachten.

4.28.3 Hefeagglutinationstest (Ørskov & Ørskov, 1983)

Typ 1-Fimbrien können durch Mannose-sensitive Agglutination von *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen nachgewiesen werden. Dazu wird eine Spatelspitze frischer Bäckerhefe in 5 ml 0,9 % (w/v) NaCl suspendiert. Davon werden 30 µl auf einen Glasobjektträger getropft und mit demselben Volumen der zu untersuchenden Bakterienkultur vermischt. Nach wenigen Minuten Inkubation auf Eis ist bei Agglutinations-positiven Stämmen eine Verklumpung der Hefezellen zu beobachten. Bei Zusatz von 2 % (w/v) Mannose zum Zellgemisch tritt keine Agglutination auf.

4.29 Serumresistenztest

Eine ÜN-Kultur der zu untersuchenden Stämme wird 1:20 in 10 ml LB verdünnt und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Die Zellen werden 2 x mit 0,9 % (w/v) NaCl gewaschen und 10 min mit 2 000 x g zentrifugiert. Das Pellet wird in 5 ml 0,9 % (w/v) NaCl aufgenommen und anschließend auf eine Verdünnungsstufe von 10⁻² eingestellt. Diese dient als Ausgangsverdünnung (10⁰) für den weiteren Versuch. Die Lebendzellzahl zum Zeitpunkt t₀ wird durch Ausplattieren eines 100 µl Aliquots der Verdünnungsstufen 10⁻³ und 10⁻⁴ der Ausgangsverdünnung auf LB-Agarplatten bestimmt. Um das Wachstum der Stämme in 90 % Humanserum zu überprüfen, werden 450 µl Humanserum mit 50 µl Bakteriensuspension (Ausgangsverdünnung 10⁰) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 3 h bei 37 °C in einem Schüttler inkubiert. Diesem Ansatz werden nach 1, 2 und 3 h jeweils 100 µl entnommen und bis auf die Verdünnungsstufen 10⁻³ und 10⁻⁴ verdünnt. Von diesen werden 100 µl auf LB-Agarplatten ausplattiert. Nach Inkubation der LB-Agarplatten ÜN bei 37 °C können die Lebendzellzahlen in koloniebildenden Einheiten/ml (KBE/ml) errechnet werden.

4.30 Induktion von Bakteriophagen durch Mitomycin C

Die ÜN-Kultur eines *E. coli* Stammes mit einem lysogenen Bakteriophagen wird 1:100 in LB-Medium verdünnt und bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 angezchtet. Für die Phageninduktion durch Mitomycin C werden einer Hälfte der Kultur 200 ng/ml dieses Antibiotikums zugesetzt. Der Kolben wird mit Alufolie abgedunkelt und zusammen mit der anderen Hälfte als Kontrollkultur bei 37 °C geschüttelt. Die Abdunklung ist notwendig, um die Fotoreaktivierung der DNA-Reparatur zu verhindern. Nach ca. 4 h nimmt die OD₆₀₀ der induzierten Kultur auf Grund der einsetzenden Lysis im Vergleich zur Kontrollkultur ab.

4.31 Phagen-Plaque-Assay

Von der mit Mitomycin C induzierten Kultur werden nach Wachstum für 5 h 2 ml abzentrifugiert. Der Überstand wird durch einen 0,45 µm Filter sterilfiltriert. Das Filtrat enthält die extrahierten Phagen. Anschließend werden die Phagenextrakte in LB-Medium, das 10 mM CaCl₂ enthält, verdünnt. 100 µl jeder Verdünnung werden mit 100 µl eines Indikatorstammes gemischt, der in LB-Medium mit 10 mM CaCl₂ und 0,2 % (w/v) Maltose bis zur stationären Phase angezogen wurde, und 20 min bei 37 °C geschüttelt. Danach werden jeweils 2,5 ml flüssiger, 46 °C warmer LB-Softagar zugegeben. Das Bakterien/Agar-Gemisch wird auf LB-Agarplatten

gegossen und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Nach Inkubation der Platten ÜN bei 37 °C kann eine Infektion des Indikatorstammes an der Bildung von Phagen-Plaques erkannt werden.

4.32 Biofilmbildung (Ghigo, 2001)

Diese Experimente werden in dreifacher Ausfertigung in M63B1 Minimalmedium mit 0,4 % (w/v) Glukose bei 37 °C durchgeführt. Geschlossene 60 ml Mikrofermenter mit vier Öffnungen zur Probenentnahme von Flüssigkeit und Gas werden als Durchfluss-Bioreaktoren mit einer Durchflussrate (F) von 40 ml/h angeordnet. Die Mikrofermenter werden mit 10^8 Bakterien einer ÜN-Kultur beimpft und für 72 h inkubiert. Das Flüssigkeitsvolumen (V) bleibt während des Versuchs konstant und es wird eine Verdünnungsrate (D) von 0,66/h eingestellt ($D = F/V$). Die hohe Zugabe von frischem Medium wird gewählt, um eine gleichbleibende Bakteriendichte in der Kultur zu erhalten, wodurch signifikantes planktonisches Wachstum verhindert wird. Die Durchmischung der Kultur wird durch Belüftung mit steriler Druckluft (0,3 bar) sichergestellt. Eingetauchte und entfernbare Pyrex-Objektträger ($22,4 \text{ cm}^2$) dienen als Wachstumsunterlage. Die entstandenen Biofilme auf den Objektträgern werden in 10 ml M63B1 Minimalmedium resuspendiert. Von dieser Suspension wird anschließend die OD_{600} bestimmt.

4.33 Herstellung spontan Antibiotika-resistenter Bakterienklone

Für die Herstellung spontan Antibiotika-resistenter Bakterienklone werden Einzelkolonien der Bakterien auf den entsprechenden Antibiotika-Agarplatten ausgestrichen. Nach Anzucht der Bakterien über Nacht wachsen auf den Antibiotika-Agarplatten Bakterienklone, die eine spontane Resistenz gegenüber dem verwendeten Antibiotikum entwickelt haben.

4.34 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen

Für diese Untersuchungen werden die Bakterienstämme über Nacht auf LB-Agarplatten bei 37 °C inkubiert. Für die Transmissionselektronenmikroskopie werden 20 µl 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung auf ein Trägernetz gegeben. Mit einer Pipettenspitze werden wenige Bakterien von einer Agarplatte durch leichtes Bewegen in diese Lösung eingebracht. Nach 30-60 s Inkubationszeit, während der sich die Bakterien auf das Trägernetz absetzen können, wird die Flüssigkeit mit einem Filterpapier vorsichtig abgesaugt. Anschließend werden 20 µl 0,2 % Uranylacetet-Lösung auf das Trägernetz pipettiert. Nach 30–60 s Inkubation wird diese Lösung mit einem Filterpapier sorgfältig entfernt. Die Trägernetze werden bis zur elektronenmikroskopischen Untersuchung in einer “grid box” aufbewahrt. Die Untersuchung erfolgt mit dem Elektronenmikroskop EM 900 bei einer Spannung von 60 kV.

4.35 Aufzucht von eukaryotischen Zellen

4.35.1 Passagieren von INT407-Zellen

Die INT407-Zellen werden im Zellkulturbrutschrank bei 37 °C in einer 5 % CO₂/95 % Luftatmosphäre mit 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert und zweimal wöchentlich in einem Verhältnis von 1:10 gesplittet. Hierzu werden das Zellkulturmedium und die Trypsin/EDTA-Lösung auf 37 °C vorgewärmt. Das Zellkulturmedium wird abgegossen und die INT407-Zellen werden mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung im Brutschrank für 2 min bei 37 °C inkubiert. Danach wird die Trypsin/EDTA-Lösung wieder entfernt. Die Zellen werden durch Klopfen auf den Flaschenboden von der Plastikoberfläche abgelöst. Anschließend werden die Zellen mit 5 ml Zellkulturmedium vom Flaschenboden abgespült und gut resuspendiert, so dass eine Einzelzellsuspension entsteht. Von dieser Suspension werden 0,5 ml in eine neue Zellkulturflasche mit 20 ml frischem Zellkulturmedium überführt. Dieser Ansatz wird dann im Zellkulturbrutschrank inkubiert, bis sich wieder ein einschichtiger Zellrasen gebildet hat.

4.35.2 Stammhaltung von eukaryotischen Zellen

Die Zellen werden wie unter 4.35.1 beschrieben trypsiniert und in dem entsprechenden Zellkulturmedium mit 10 % (v/v) DMSO resuspendiert. Jeweils 1 ml dieser Zellsuspension wird in ein Cryo-Röhrchen überführt. Anschließend werden die Zellen 2 Tage bei -80 °C eingefroren und danach in flüssigem Stickstoff gelagert.

Die tiefgefrorenen Zellen werden im 37 °C-Wasserbad rasch aufgetaut und in Zellkulturflaschen überführt, in die 20 ml vorgewärmtes Zellkulturmedium vorgelegt wurde. Am folgenden Tag wird das Medium gewechselt, um das restliche DMSO zu entfernen.

4.36 Koinfektions-Invasionsassay

Die Invasionsassays wurden mit kleinen Veränderungen wie von Oelschlaeger & Tall (1997) beschrieben durchgeführt. Durch einen Invasionsassay kann die Invasionsfähigkeit und die Invasionsrate eines bestimmten Bakterienstammes in verschiedene eukaryotische Zelllinien bestimmt werden. Bei einem Koinfektions-Invasionsassay werden die Zellen simultan mit einem invasiven und einem nichtinvasiven Bakterienstamm inkubiert.

Hierzu werden eukaryotische Zellen in 24-Napf-Platten (Falcon) ausgesät. Es wird je nach Zelllinie eine so große Menge an Zellen verwendet, dass sich nach einer Inkubation der Zellen ÜN bei 37 °C im Zellkulturbrutschrank ein einschichtiger Zellrasen in jedem Napf bildet. Im Fall

der INT407-Zellen werden 4 ml einer Zellsuspension, gewonnen aus einem konfluenten Zellrasen einer 75 cm² Zellkulturflasche, zu 44 ml Zellkulturmedium gegeben. In jedem Napf wird 1 ml dieser Zellsuspension ausgesät. Die Platte wird kurz geschüttelt, damit sich die Zellen gleichmäßig im Napf verteilen, und ÜN im Zellkulturbrutschrank bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag werden 2 ml Zellkulturmedium mit 20-60 µl einer Bakterien-ÜNK angeimpft und für ca. 2 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wird die OD₆₀₀ gemessen. Diese sollte zwischen 0,4 und 0,6 liegen, das heißt, dass sich die meisten Bakterien in der Mitte der logarithmischen Wachstumsphase befinden. Die Bakterienkultur wird durch Verdünnung in Zellkulturmedium auf einen Wert OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt, was einer Bakteriendichte von ca. 2 x 10⁶ entspricht. Von dieser Verdünnung werden nun von den invasiven und nichtinvasiven Stämmen jeweils 25 µl in einen Napf zu den Zellen gegeben. Für die Kontrollen wird jeder Stamm einzeln verwendet. Dieser Ansatz wird für 3 h bei 37 °C im Zellkulturbrutschrank inkubiert, um den Bakterien Zeit zu geben, in die Zellen einzudringen. Der tatsächliche Wert des Inokulums wird durch Bestimmung der koloniebildenden Einheiten ermittelt. Nach der Invasionsperiode wird das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen werden einmal mit EBSS (“Earle's balanced salt solution”) gewaschen. Danach wird in jeden Napf 1 ml frisches Zellkulturmedium mit 100 µg/ml Gentamycin gegeben, um die extrazellulären Bakterien abzutöten. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C wird der Zellrasen dreimal mit EBSS gewaschen und mit 1 % (v/v) Triton X-100 für 10 min bei RT unter Schütteln lysiert. Die Anzahl der freigesetzten intrazellulären Bakterien wird durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungen des Lysats bestimmt. Die Invasionsrate in % ist definiert als die Anzahl überlebender Bakterien nach Gentamycin-Behandlung in Bezug auf das Inokulum. Zur Ermittlung der relativen Invasionsrate in % wird die Invasionsrate in Anwesenheit eines nichtinvasiven Stammes in Bezug auf die Invasionsrate des invasiven Stammes alleine (= 100 %) gesetzt. Jeder Assay wird im Duplikat durchgeführt und mindestens dreimal unabhängig wiederholt. Die Invasionswerte der Bakterienstämme in % werden mittels eines zweiseitigen t-Tests verglichen. Unterschiedliche Werte werden als signifikant bezeichnet, wenn der p-Wert kleiner als 0,01 ist. Die Ergebnisse geben den Mittelwert aller wiederholten Experimente an.

Für die Herstellung von EBSS werden jeweils 50 ml Lösung 1 und 2, 15 ml Lösung 3 und 2,5 ml Lösung 4 zu 382,5 ml H₂O_{dest.} gegeben. Anschließend wird der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

Lösung 1 (autoklaviert):	CaCl ₂	1,06 g
	MgSO ₄	0,79 g
	H ₂ O _{dest.}	ad 400 ml

Lösung 2 (autoklaviert):	KCl	1,58 g
	NaCl	27,35 g
	NaH ₂ PO ₄	0,62 g
	H ₂ O _{dest.}	ad 400 ml
Lösung 3 (sterilfiltriert):	NaHCO ₃	7,5 % (w/v)
Lösung 4 (sterilfiltriert):	Glukose	22,2 % (w/v)

4.37 Adhäsionsassay

Durch einen Adhäsionsassay kann die Adhäsionsfähigkeit und die Häufigkeit der Adhäsion eines bestimmten Bakterienstammes an eukaryotische Zelllinien qualitativ überprüft werden.

Hierzu werden eukaryotische Zellen in beschichteten Objektträgern mit acht aufgesetzten Inkubationskammern, "SonicSeal Slide Wells" (Falcon), ausgesät. Es wird je nach Zelllinie eine so große Menge an Zellen verwendet, dass sich nach einer Inkubation der Zellen ÜN bei 37 °C im Zellkulturbrutschrank ein einschichtiger Zellrasen in jeder Inkubationskammer bildet. Im Fall der INT407-Zellen wird 1 ml einer Zellsuspension, gewonnen aus einem konfluenten Zellrasen einer 75 cm² Zellkulturflasche, zu 12 ml Zellkulturmedium gegeben. In jeder Inkubationskammer werden nun 200 µl dieser Zellsuspension ausgesät. Der Objektträger wird kurz geschüttelt, damit sich die Zellen gleichmäßig verteilen, und dann ÜN im Zellkulturbrutschrank bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag werden 2 ml Zellkulturmedium mit 20-60 µl einer Bakterien-ÜNK angeimpft und für ca. 2 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wird die OD₆₀₀ gemessen. Diese sollte zwischen 0,4 und 0,6 liegen, das heißt, dass sich die meisten Bakterien in der Mitte der logarithmischen Wachstumsphase befinden. Die Bakterienkultur wird durch Verdünnung in Zellkulturmedium auf einen Wert OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt, was einer Bakteriendichte von ca. 2×10^6 entspricht. Von dieser Verdünnung werden nun von den zu testenden Bakterienstämmen jeweils 6 µl zu den Zellen gegeben. Dieser Ansatz wird für 2 h bei 37 °C im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Anschließend werden die Zellen fünfmal mit jeweils 200 µl EBSS (siehe 4.36) gewaschen und durch die Zugabe von je 200 µl Methanol für 20 min bei RT fixiert. Das Methanol und die aufgesetzten Inkubationskammern werden entfernt. Der Objektträger wird mit H₂O_{dest.} abgespült und an der Luft getrocknet. Danach erfolgt die Färbung in Giemsalösung (1:10 verdünnt) für 20 min. Der Objektträger wird mit H₂O_{dest.} abgespült, dreimal für je 5 min in 10 ml 0,9 % (w/v) NaCl geschwenkt und getrocknet. Das Präparat kann nun mikroskopisch ausgewertet werden.

4.38 *In vivo* Experimente

Den *in vivo* Experimenten liegen keine standardisierten Protokolle zu Grunde. Diese Versuche wurden nach eigenen Konzepten durchgeführt.

4.38.1 Schutzexperimente

Für diese Experimente werden Gruppen von je 8 Mäusen verwendet. Eine Gruppe erhält nur den Nalidixin-resistenten *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Stamm SL1344 (Positivkontrolle), während den anderen Gruppen zusätzlich zu dem *Salmonella* Stamm jeweils verschiedene Rifampicin-resistente *E. coli* Stämme verabreicht werden. Vor der Applikation der resistenten Bakterienstämme werden Stuhlproben der einzelnen Mäuse daraufhin untersucht, ob diese Nalidixin- und Rifampicin-resistente Stämme enthalten.

Den Mäusen werden täglich über einen Zeitraum von 14 Tagen jeweils verschiedene Rifampicin-resistente *E. coli* Stämme (1×10^8 Bakterien) mittels einer Fütterungsnadel oral verabreicht. Am 2. Tag wird den Tieren anstatt der *E. coli* Stämme der Nalidixin-resistente *Salmonella* Stamm (1×10^4 Bakterien) appliziert, wobei das fünffache der LD₅₀ (letale Dosis, bei der 50 % der infizierten Mäuse sterben) dieses Stammes eingesetzt wird. Die Bakterienzahl wird in einem speziellen Salzpuffer (Ardeypharm GmbH, Herdecke) so eingestellt, dass ein Flüssigkeitsvolumen von 300 µl verabreicht werden kann. Jeden zweiten Tag werden Stuhlproben genommen und die Anzahl der resistenten Bakterien wird bestimmt. Vom Zeitpunkt der Infektion an werden die Tiere täglich auf klinische Symptome hin untersucht. Final erkrankte Tiere werden direkt getötet, während die anderen Mäuse am 12. Tag nach der Infektion mit dem *Salmonella* Stamm getötet werden.

4.38.2 Immunisierungsexperimente

Die Mäuse (5 Tiere pro Bakterienstamm) werden über einen Zeitraum von 14 Tagen täglich oral mittels einer Fütterungsnadel mit den rekombinanten Bakterienstämmen immunisiert. Die Bakterienzahl wird in einem speziellen Salzpuffer (Ardeypharm GmbH, Herdecke) so eingestellt, dass die Anzahl von 1×10^8 Bakterien in einem Flüssigkeitsvolumen von 300 µl verabreicht werden kann. Am 15. Tag werden die Mäuse mit Ether betäubt und zur Serumgewinnung wird das Blut über das Auge entnommen. Das Blut wird anschließend in Reaktionsgefäße überführt, 4 h bei RT inkubiert und zentrifugiert (10 min, 10 000 x g). Das Serum wird abpipettiert und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

5 Ergebnisse

Die Konstruktion von Plasmiden, die in dieser Arbeit hergestellt wurden, ist an den entsprechenden Stellen in den folgenden Abschnitten beschrieben. Karten der Plasmide sind im Anhang zu finden.

5.1 Etablierung eines spezifischen PCR-Nachweissystems für den *E. coli* Stamm DSM 6601 in Humanstuhl

Der *E. coli* Stamm DSM 6601 (synonym *E. coli* Nissle 1917) bildet die Basis des Medikaments Mutaflor[®], welches als Probiotikum zur Behandlung verschiedener gastrointestinaler Erkrankungen beim Menschen eingesetzt wird. Auf Grund der Verwendung dieses Bakterienstammes in der Medizin und zur schnellen Identifizierung dieses Stammes ist ein spezifischer Nachweis erforderlich. Dabei können traditionelle Stammtypisierungsmethoden wie Phagen- und Serotypisierung, aber auch moderne Techniken wie PCR und Pulsfeld-Gelelektrophorese angewendet werden. Der Vorteil der PCR-Methode ist jedoch die hohe Sensitivität und Zeitersparnis. In vorangegangenen Arbeiten wurden für den *E. coli* Stamm DSM 6601 fünf spezifische PCR-Reaktionen etabliert, die auf den chromosomal kodierten Typ 1 (*fim*)- und F1C (*foc*)-Fimbriengklustern (Primer Muta 1-4) sowie auf den beiden kryptischen Plasmiden pMUT1 und pMUT2 (Primer Muta 5-10) basieren. Diese PCR-Reaktionen können für den schnellen und spezifischen Nachweis verwendet werden (Blum-Oehler *et al.*, 2003).

Der *E. coli* Stamm DSM 6601 besitzt zwei kryptische Plasmide, pMUT1 und pMUT2, deren DNA-Sequenzen bereits bestimmt wurden und unter den GenBank-Nummern A84793 (pMUT1) und A95448 (pMUT2) veröffentlicht sind. Zielsetzung dieser Arbeit war, neben der Etablierung eines spezifischen PCR-Nachweissystems, diese Sequenzdaten zu überprüfen, zu verifizieren und durch die Analyse der DNA-Sequenz nähere Informationen über eine eventuelle Funktion dieser Plasmide zu erlangen.

5.1.1 Sequenzanalyse des Plasmids pMUT1

Für die Bestimmung der DNA-Sequenz des Plasmids pMUT1 wurde zunächst das Plasmid pMUT1-2 verwendet. Das Plasmid pMUT1-2 besteht aus dem Vektor pUC18, in den das mit *Hind*III linearisierte Plasmid pMUT1 ligiert wurde. So konnten anfänglich die Sequenzierprimer

M13 Universal und M13 Reverse, die in der “multiple cloning site” von pUC18 binden, für die Ermittlung der DNA-Sequenz benutzt werden. Durch “primer walking” wurde dann die gesamte Basenfolge in dem Plasmid pMUT1 bestimmt. Die vollständig korrigierte, 3173 bp lange Sequenz mit den Bindungsstellen der verwendeten Primer ist im Anhang abgedruckt.

Die Homologiesuche auf DNA- und Proteinebene wurde mit dem BLASTX- bzw. dem BLASTN-Programm des “National Center for Biotechnology Information” (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt (Altschul *et al.*, 1997). Die Suche nach “open reading frames” (ORFs) erfolgte mit dem Programm “ORF-Finder” (NCBI). Die Ergebnisse der Sequenzanalyse des Plasmids pMUT1 sind im Folgenden beschrieben und in Abb. 4 dargestellt.

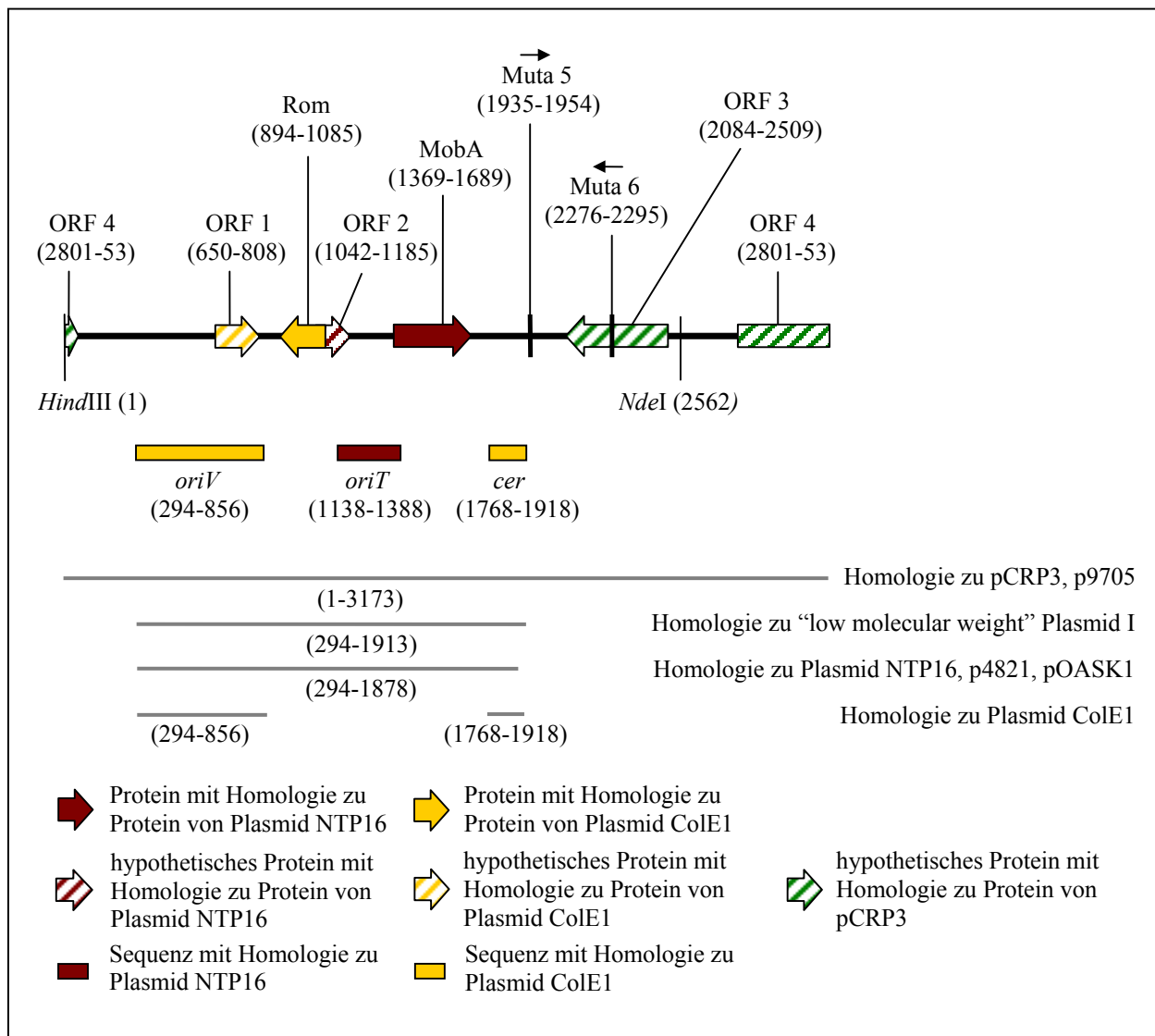


Abb. 4: Graphische Darstellung der genetischen Organisation des 3173 bp großen Plasmids pMUT1 aus *E. coli* DSM 6601. Identifizierte ORFs und die Bindungsstellen der PCR-Primer Muta 5/6 sind eingezeichnet. Relevante Restriktionsenzyme mit singularer Schnittstelle und ihre jeweiligen Positionen in der Sequenz von pMUT1 sind angegeben.

Die Homologiesuche auf DNA-Ebene zeigte, dass die Nukleotidsequenz über die gesamte Länge des Plasmids pMUT1 nahezu identisch mit den Sequenzen der Plasmide pCRP3 aus *Citrobacter rodentium* Stamm DBS100 (98 % Identität, GenBank-Nummer AF311902) und p9705 aus *Escherichia coli* O157:H7 Stamm 9705 (98 % Identität, GenBank-Nummer AB040037) ist. Zudem konnte eine signifikante Ähnlichkeit zu dem “low molecular weight” Plasmid I aus *Salmonella enteritidis* (95 % Identität, GenBank-Nummer AF218051) über eine Distanz von 1620 bp festgestellt werden. Über einen Bereich von 1585 bp weist die Basensequenz des Plasmids pMUT1 eine Identität von 94 % zu dem Plasmid NTP16 aus *Salmonella typhimurium* (GenBank-Nummer L05392) sowie eine Identität von 93 % zu den Plasmiden p4821 aus *Escherichia coli* O157:H7 Stamm 4821 (GenBank-Nummer Y14016) und pOSAK1 aus *Escherichia coli* O157:H7 Stamm RIMD 0509952 (GenBank-Nummer AB011548) auf. Eine signifikante Ähnlichkeit (93 % Identität) zeigt sich auch über eine Distanz von 563 bp zu dem Plasmid ColE1 aus *Escherichia coli* (GenBank-Nummer J01566) und zu verschiedenen weiteren ColE1-Plasmiden.

Das Plasmid pMUT1 besitzt einen ColE1-ähnlichen vegetativen Replikationsursprung (*oriV*), der über die Distanz von 563 bp (Position 294-856) zu 93 % identisch mit dem vegetativen Replikationsursprung des Plasmids ColE1 ist, jedoch unterscheiden sich die Sequenzen von pMUT1 und ColE1 in dem Bereich, der das Plasmid-Replikationskontrollsystem, bestehend aus RNA I und RNA II, umfasst. Die Sequenz zwischen Position 1768 und 1918 des Plasmids pMUT1 zeigt eine Ähnlichkeit von 64 % zu der “ColE1 resolution”-Sequenz (*cer*) des Plasmids ColE1. Alle funktionell wichtigen Merkmale von *cer* sind in pMUT1 vorhanden. Zwischen den Koordinaten 1138 und 1388 ist ein Transfer-Replikationsursprung (*oriT*) lokalisiert, der zu 92 % identisch mit dem des Plasmids NTP16 ist.

Bei der Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden sechs ORFs gefunden, von denen jedoch nur Zweien eine Funktion zugeordnet werden konnte (Tab. 8). Das MobA-Protein weist eine Homologie von 99 % zu dem MobA-Protein von Plasmid NTP16 auf. Ebenso konnte das Rom-Protein (“RNA I inhibition modulator protein”) identifiziert werden, das an der Kontrolle der Plasmid-Replikation beteiligt ist. Es zeigt eine Homologie von 58 % zu dem Rom-Protein des Plasmids ColE1 und eine hohe Homologie (85 %) zu einem anderen Rom-ähnlichen Protein. Den weiteren vier ORFs konnten keine Funktionen zugeordnet werden, jedoch bestehen Homologien zu anderen hypothetischen Proteinen.

Tab. 8: Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des Plasmids pMUT1

Nukleotid (Bezeichnung)	Homologie zu	e-Wert ^{a)}	Länge des homologen ORFs (AS)	Länge des vorhandenen ORFs (AS)	AS/AS (Identität in %)	GenBank- Nummer
650-808 (ORF 1)	ORF 1, hypothetisches Protein, Plasmid pCRP3, <i>Citrobacter rodentium</i> 6,0 kDa ORF, hypothetisches Protein, Plasmid ColE1, <i>E. coli</i>	7e-20	61	53	52/61 (85 %)	AAL06390 AAB59126
894-1085 (Rom)	ORF 2, Rom-ähnliches Protein, Plasmid pCRP3, <i>Citrobacter rodentium</i> Rom-ähnliches Protein, Plasmid pEC156, <i>E. coli</i>	5e-25	64	64	58/62 (93 %)	AAL06391 AAF71175
1042-1185 (ORF 2)	“RNA I inhibition modulator” Protein (Rom), Plasmid ColE1, <i>E. coli</i>	6e-12	63		37/63 (58 %)	AAB59132
1369-1689 (MobA)	ORF 3, hypothetisches Protein, Plasmid pCRP3, <i>Citrobacter rodentium</i> hypothetisches 6,2 kDa Protein, Plasmid NTP16, <i>Salmonella typhimurium</i>	2e-20	85	48	44/46 (95 %)	AAL06392 JQ1540
2084-2509 (ORF 3)	ORF 4, MobA, Plasmid pCRP3, <i>Citrobacter rodentium</i> 12 kDa Protein, MobA, Plasmid NTP16, <i>Salmonella typhimurium</i>	2e-56	115	107	115/115 (100 %)	AAL06393 AAA72309
2801-53 (ORF 4)	ORF 5, hypothetisches Protein, Plasmid pCRP3, <i>Citrobacter rodentium</i>	9e-77	142	142	142/142 (100 %)	AAL06394
	ORF 6, hypothetisches Protein, Plasmid pCRP3, <i>Citrobacter rodentium</i>	2e-70	142	142	124/124 (100 %)	AAL06395

^{a)} Die Signifikanz ist mit dem BLASTX-Programm bestimmt worden. Die angegebenen Zahlenwerte sind ein Maß für die Signifikanz der gefundenen Homologie. Sie sind um so bedeutender, je kleiner sie sind, da sie die Wahrscheinlichkeit wiedergeben, dass es sich nur um eine zufallsbedingte Ähnlichkeit handelt.

Zusätzlich wurde noch der durchschnittliche G+C-Gehalt des 3173 bp großen Plasmids pMUT1 bestimmt. Er liegt für das gesamte Plasmid bei 46,9 %. Auffällig ist jedoch, dass der G+C-Gehalt des 1625 bp großen Fragments zwischen den Positionen 294 und 1918 bei 52,1 % liegt, während die restliche DNA-Sequenz einen wesentlich niedrigeren G+C-Gehalt von 41,5 % besitzt. In Abb.5 ist ein Überblick über die Verteilung des G+C-Gehalts des Plasmids pMUT1 dargestellt. Die Analyse wurde mit dem Programm Vector NTI 7.1 durchgeführt (Fenstergröße: 40 bp).

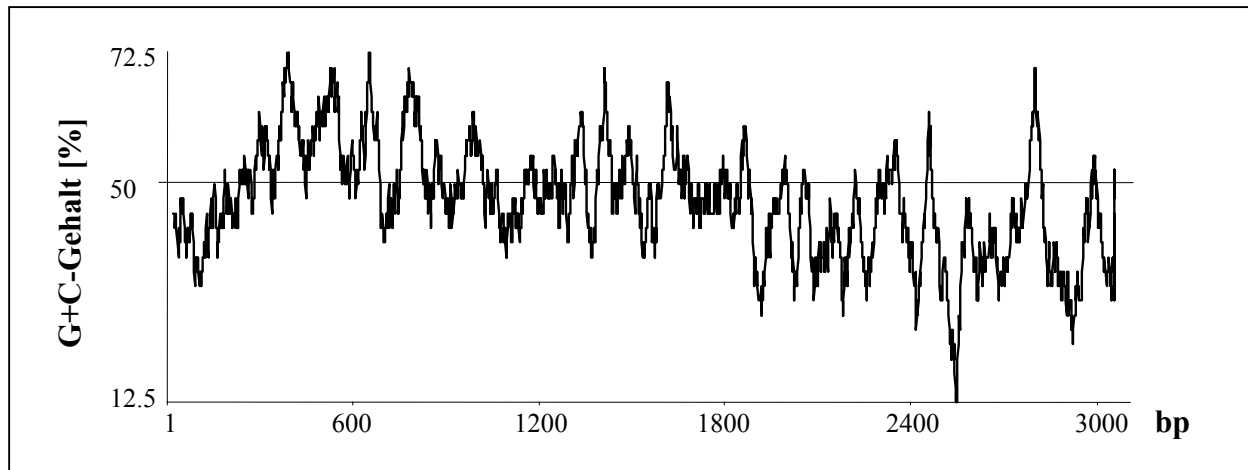


Abb. 5: G+C-Gehalt der 3173 bp langen Sequenz des Plasmids pMUT1 des *E. coli* Stammes DSM 6601.

5.1.2 Sequenzanalyse des Plasmids pMUT2

Die DNA-Sequenz des Plasmids pMUT2 wurde nur teilweise korrigiert. Hierzu wurde das Plasmid pMUT2-2 verwendet, das aus dem Vektor pUC18 besteht, in den das mit *SphI* linearisierte Plasmid pMUT2 ligiert wurde. Daher konnten die Sequenzierprimer M13 Universal und M13 Reverse, die in der “multiple cloning site” von pUC18 binden, für die Ermittlung der DNA-Sequenz benutzt werden. Die verbesserte 5520 bp lange Nukleotidsequenz ist im Anhang abgedruckt. Die Homologiesuche auf DNA- und Proteinebene wurde mit den in 5.1.1 beschriebenen Programmen durchgeführt. Die Ergebnisse der Sequenzanalyse des Plasmids pMUT2 sind im Folgenden beschrieben und in Abb. 6 dargestellt.

Die Homologiesuche auf DNA-Ebene zeigte, dass das Plasmid pMUT2 über eine Distanz von 3529 bp nahezu identisch (97 % Identität) mit dem Cole2-ähnlichen Plasmid pUB6060 aus *Plesiomonas shigelloides* Isolat 11184 (GenBank-Nummer AJ249644) ist, das eine Größe von 5804 bp besitzt.

Das Plasmid pMUT2 hat einen Cole2-ähnlichen vegetativen Replikationsursprung (*oriV* von Position 1919-1938). Dieser weist eine Homologie von 95 % zu dem Replikationsursprung des

Plasmids ColE3-CA38 und weiteren ColE2-verwandten Plasmiden auf (Hiraga *et al.*, 1994). Zwischen den Koordinaten 1843 und 1867 ist ein Transfer-Replikationsursprung (*oriT*) lokalisiert, der eine Homologie von 64 % zu dem Transfer-Replikationsursprung des Plasmids ColE1 (GenBank-Nummer J01566) zeigt. Es konnten keine Regionen gefunden werden, die für die Stabilität des Plasmids eine Rolle spielen.

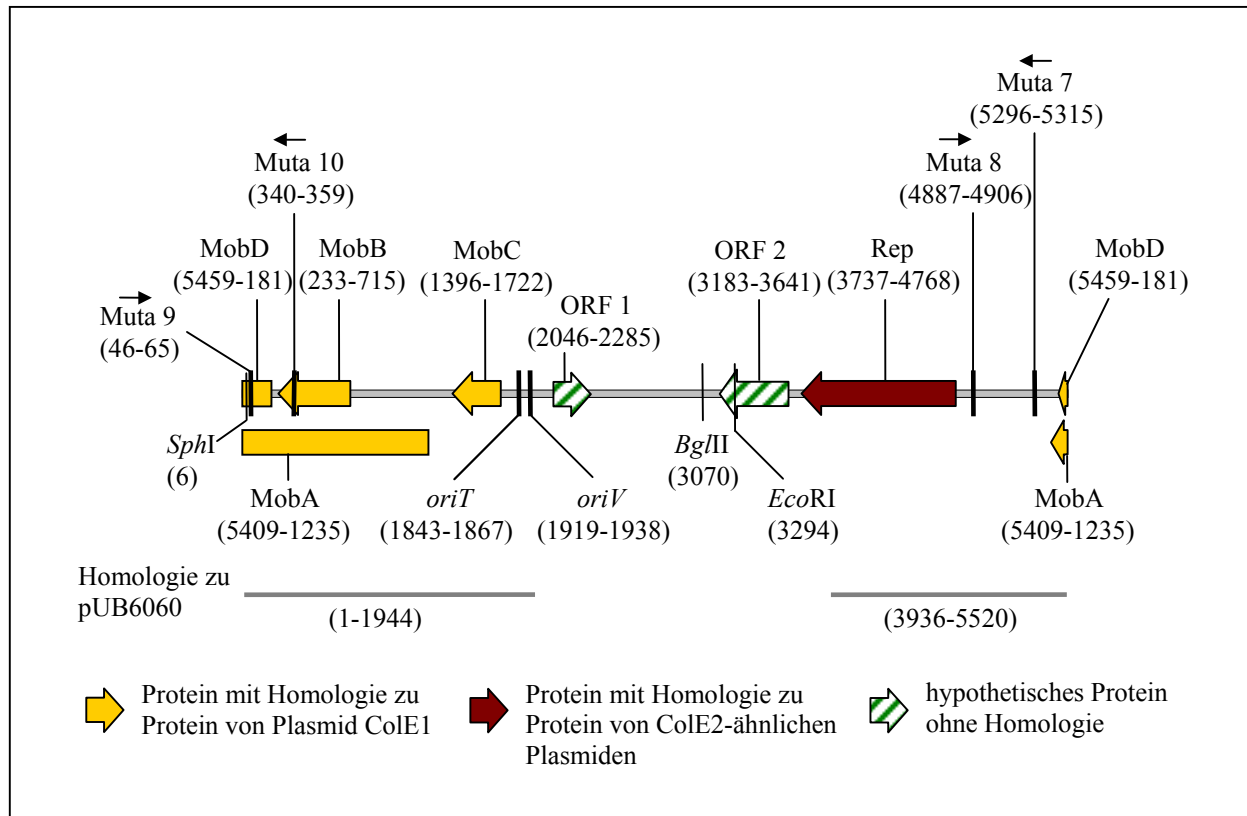


Abb. 6: Graphische Darstellung der genetischen Organisation des 5520 bp großen Plasmids pMUT2 aus *E. coli* DSM 6601. Identifizierte ORFs und die Bindungsstellen der PCR-Primer Muta 7/8 und Muta 9/10 sind eingezeichnet. Relevante Restriktionsenzyme mit singularer Schnittstelle und ihre jeweiligen Positionen in der Sequenz von pMUT2 sind angegeben.

Bei der Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden fünf ORFs identifiziert, die auf Grund ihrer Homologie zu dem Mobilisierungslokus des Plasmids ColE1 mit MobA (41 % Identität), MobB (27 % Identität), MobC (47 % Identität), MobD (45 % Identität) und durch die Homologie zu verschiedenen Replikationsproteinen von ColE2-ähnlichen Plasmiden (58 % und 63 % Identität) mit Rep bezeichnet wurden. Zwei weiteren möglichen ORFs (ORF 1, ORF 2) konnten keine Funktionen zugeordnet werden und es bestehen auch keine Homologien zu bekannten Proteinen. Die Ergebnisse der Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tab. 9: Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des Plasmids pMUT2

Nukleotid (Bezeichnung)	Homologie zu	e-Wert ^{a)}	Länge des homologen ORFs (AS)	Länge des vorhandenen ORFs (AS)	AS/AS (Identität in %)	GenBank- Nummer
233-715 (MobB)	putatives Mobilisationsprotein (MobB), Plasmid pUB6060, <i>Plesiomonas shigelloides</i> mob6 ORF, MobB, Plasmid ColE1, <i>E. coli</i>	4e-81	161	161	156/161 (96 %)	CAB56516
1396-1722 (MobC)	putatives Mobilisationsprotein (MobC), Plasmid pUB6060, <i>Plesiomonas shigelloides</i> mob2 ORF, MobC, Plasmid ColE1, <i>E. coli</i>	1e-47	108	109	99/109 (90 %)	CAB56514
2046-2285 (ORF 1)	ohne Homologie	-	-	80	-	-
3183-3641 (ORF 2)	ohne Homologie	-	-	153	-	-
3737-4768 (Rep)	putatives Replikonprotein (Rep), Plasmid pUB6060, <i>Plesiomonas shigelloides</i> Rep-Protein, Plasmid ColE9-J, <i>E. coli</i> Rep-Protein, Plasmid ColE2-CA42, <i>E. coli</i> Rep-Protein, Plasmid ColE7-K317, <i>E. coli</i>	e-151	297	344	251/289 (86 %)	CAB56518
5409-1235 (MobA)	putatives Mobilisationsprotein (MobA), Plasmid pUB6060, <i>Plesiomonas shigelloides</i> mob3 ORF, MobA, Plasmid ColE1, <i>E. coli</i>	0.0	528	449	430/443 (97 %)	CAB56515
5459-181 (MobD)	putatives Mobilisationsprotein (MobD), Plasmid pUB6060, <i>Plesiomonas shigelloides</i> mob7 ORF, MobD, Plasmid ColE1, <i>E. coli</i>	2e-27	77	81	61/61 (100 %)	CAB56517
		0.008	77	77	32/71 (45 %)	AAB59137

^{a)} Die Signifikanz ist mit dem BLASTX-Programm bestimmt worden. Die angegebenen Zahlenwerte sind ein Maß für die Signifikanz der gefundenen Homologie. Sie sind um so bedeutender, je kleiner sie sind, da sie die Wahrscheinlichkeit wiedergeben, dass es sich nur um eine zufallsbedingte Ähnlichkeit handelt.

Zusätzlich wurde noch der durchschnittliche G+C-Gehalt des 5520 bp großen Plasmids pMUT2 bestimmt. Er liegt für das gesamte Plasmid bei 45,9 %. Auffällig ist jedoch eine zwischen den Positionen 1939 und 3736 lokalisierte sehr AT-reiche Sequenz. Der G+C-Gehalt dieses 1798 bp großen Fragments liegt bei 34,4 %, während die restliche DNA-Sequenz einen G+C-Gehalt von 51,5 % besitzt. In Abb. 7 ist ein Überblick über die Verteilung des G+C-Gehalts des Plasmids pMUT2 dargestellt. Die Analyse wurde mit dem Programm Vector NTI 7.1 durchgeführt (Fenstergröße: 40 bp).

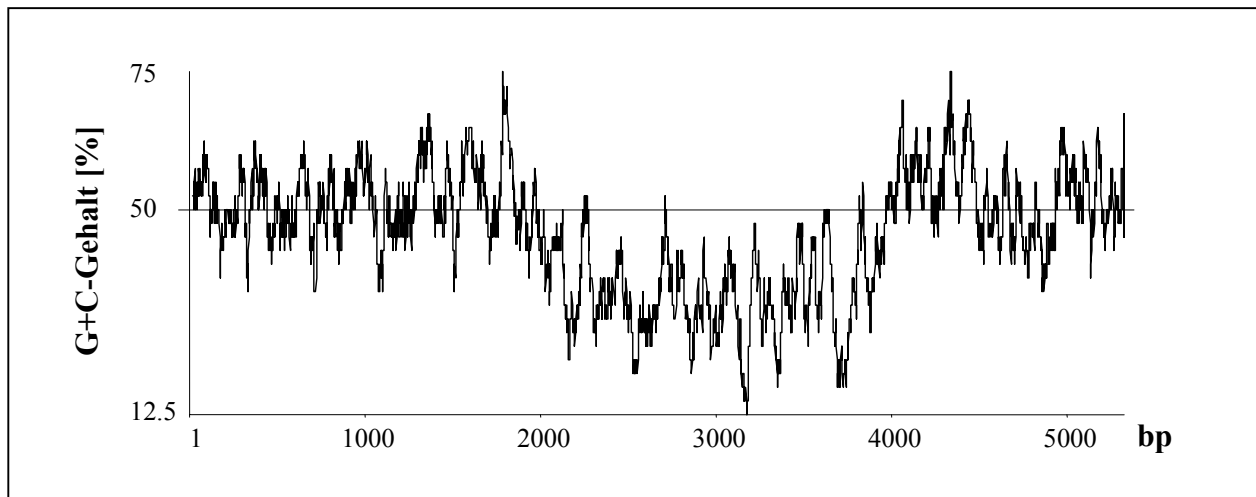


Abb. 7: G+C-Gehalt der 5520 bp langen Sequenz des Plasmids pMUT2 des *E. coli* Stammes DSM 6601.

5.1.3 Überprüfung der Spezifität der PCR-Assays

Die Spezifität der fünf PCR-Reaktionen mit den Oligonukleotiden Muta 1-10 für den Nachweis des *E. coli* Stammes DSM 6601 war bereits durch die Untersuchung von verschiedenen *E. coli* Isolaten aus Fäzes und Umwelt sowie von *E. coli* Stämmen der Serogruppe O6:K5 überprüft worden (Blum-Oehler *et al.*, 2003).

Auf Grund der hohen Homologie der Plasmide pMUT1 und pMUT2 des *E. coli* Stammes DSM 6601 zu Plasmiden aus enterohämorrhagischen *E. coli*- (EHEC), *Citrobacter*- und *Plesiomonas* Stämmen wurde eine Kollektion weiterer Stämme unterschiedlichen Ursprungs untersucht. Darunter waren *Citrobacter*- und *Plesiomonas* Stämme, *E. coli* K-12-Stämme, weitere *E. coli* Fäkal-Isolate, extraintestinale *E. coli* Stämme (UPEC, MENEC, SEPEC) und intestinale *E. coli* Stämme (EHEC, EPEC, ETEC, EIEC, EAEC). Als interne Positivkontrolle für die PCR-Reaktionen wurden 16S rRNA-spezifische Primer (27f/798r) verwendet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den Tabellen 10 und 11 dargestellt.

Tab. 10: Anwesenheit von *E. coli* DSM 6601-spezifischen DNA-Sequenzen in verschiedenen Bakterienstämmen

	Stamm	Primerkombinationen					27f/798r
		Muta 1/2	Muta 3/4	Muta 5/6	Muta 7/8	Muta 9/10	
<i>Citrobacter freundii</i>	37/98	-	-	-	-	-	+
	3009	-	+	-	-	-	+
	3056	-	-	-	-	-	+
	WR7014	-	-	- ¹	-	-	+
	WR7004	-	-	- ¹	-	-	+
<i>Citrobacter rodentium</i>	DBS100	-	-	+	-	-	+
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	DSM 8224	-	-	-	-	-	+
	11184	+	-	-	+	+	+
<i>E. coli</i> K-12 n = 17	5K	-	-	-	-	-	+
	BMH	-	-	-	- ¹	-	+
	C600	-	-	-	-	-	+
	DH1	-	-	-	-	-	+
	DH5 α	-	-	-	-	-	+
	E. c. 35	-	-	-	-	-	+
	E. c. 678-54	-	-	-	-	-	+
	E. c. B	-	-	-	-	-	+
	EN99	-	-	-	-	-	+
	HB101	-	-	-	- ¹	-	+
	J53	-	-	-	-	-	+
	JM109	-	-	-	-	-	+
	K-12 WT	-	-	-	-	-	+
	LE392	-	-	-	-	-	+
	Sm10 λ pir	-	-	-	- ¹	-	+
SY327 λ pir	-	-	-	- ¹	-	+	
WK6	-	-	-	-	-	+	
Fäkal-Isolate n = 3	CI-23	+	-	-	-	-	+
	F18	-	-	-	-	-	+
	F18-Col ^r	-	-	-	-	-	+
Extraintestinale <i>E. coli</i> (UPEC, MENEK, SEPEC) n = 53	536	-	+	-	-	-	+
	764	-	+	-	-	+	+
	764/2	-	+	-	-	+	+
	AD110	-	+	-	-	-	+
	HK 043/93	-	+	-	-	-	+
	HK 060/93	-	-	-	-	-	+
	HK 10058/93	-	+	-	-	-	+
	HK 10209/93	-	+	-	-	-	+
	HK 10222/93	-	-	-	-	-	+
	HK 10413/93	-	+	-	-	-	+
	HK 10521/93	+	+	+	-	-	+
	HK 10968/93	-	-	-	-	-	+
	HK 1247/93	+	-	-	-	-	+
	HK 1603/93	+	-	-	-	-	+
	HK 1939/93	-	-	-	-	-	+
	HK 2309/93	-	-	-	-	-	+
	HK 2355/93	-	-	-	-	-	+
	HK 2656/93	-	-	-	-	-	+
	HK 269/93	-	+	-	-	-	+
	HK 2770/93	+	-	-	-	-	+
HK 2882/93	-	-	-	-	-	+	
HK 339/93	+	+	-	-	-	+	

Fortsetzung Tab. 10

	Stamm	Primerkombinationen					27f/798r
		Muta 1/2	Muta 3/4	Muta 5/6	Muta 7/8	Muta 9/10	
Extraintestinale <i>E. coli</i> (UPEC, MENEK, SEPEC) n = 53	HK 3690/93	-	-	-	-	-	+
	HK 3790/93	-	+	-	-	-	+
	HK 3812/93	-	-	-	-	-	+
	HK 3856/93	-	-	-	-	-	+
	HK 3875/93	-	+	-	-	-	+
	HK 4191/93	-	-	-	-	-	+
	HK 4193/93	-	+	-	-	-	+
	HK 4326/93	-	+	-	-	-	+
	HK 4549/93	+	-	-	-	-	+
	HK 5456/93	-	-	-	-	-	+
	HK 6253/93	-	-	-	-	-	+
	HK 6499/93	-	-	-	-	-	+
	HK 6551/93	-	-	-	-	-	+
	HK 7519/93	-	+	-	-	-	+
	HK 7594/93	+	-	-	-	-	+
	HK 8416/93	-	+	-	-	-	+
	HK 8572/93	-	-	-	-	-	+
	HK 8729/93	-	-	-	-	-	+
	HK 9094/93	-	-	-	-	-	+
	HK 9765/93	-	+	-	-	-	+
	HK 9855/93	-	-	-	-	-	+
	IHE3033	-	-	-	-	-	+
	IHE3034	-	-	-	-	-	+
	IHE3035	-	-	-	-	-	+
	IHE3036	-	-	-	-	-	+
	IHE3080	-	-	-	-	-	+
	J96	-	+	-	-	-	+
	J96-M1	-	+	-	-	-	+
RS180	-	-	-	-	-	+	
RS218	-	-	-	-	-	+	
RS226	-	-	-	-	-	+	
Intestinale <i>E. coli</i> (EHEC, EPEC, ETEC, EIEC, EAEC) n = 20	156A	-	-	-	-	-	+
	179/2	-	-	-	-	-	+
	2907/97	-	-	-	-	-	+
	3574/92	-	-	-	-	-	+
	3697/97	+	-	-	-	-	+
	37-4	-	-	-	-	-	+
	5477/94	-	-	-	-	-	+
	5720/96	-	-	-	-	-	+
	76-5	-	-	-	-	-	+
	86-24	-	-	-	-	-	+
	A151	-	-	-	-	-	+
	A152	-	-	-	-	-	+
	C9221a	-	-	-	-	-	+
	DPA065	-	-	-	-	-	+
	E2348/69	-	-	-	-	-	+
	ED124	-	-	-	-	-	+
	EDL1284	-	-	-	- ¹	-	+
EDL933	-	-	-	-	-	+	
O149:K88	-	-	-	-	-	+	
SF493/89	-	-	-	-	-	+	

¹ Amplifiziertes Fragment vorhanden, das jedoch in der Größe nicht mit dem DSM 6601-spezifischen Fragment übereinstimmt.

Tab. 11: Anwesenheit von *E. coli* DSM 6601-spezifischen DNA-Sequenzen in verschiedenen *E. coli* Isolaten (Zusammenfassung von Tab. 10)

Primer-kombination	<i>E. coli</i> K-12-Stämme n = 17	Fäkal-Stämme n = 3	Extraintestinale <i>E. coli</i> Stämme^{a)} n = 53	Intestinale <i>E. coli</i> Stämme^{b)} n = 20
Muta 1/2 (<i>fimA</i>)	0 (0 %)	1 (33,3 %)	7 (13,2 %)	1 (5,0 %)
Muta 3/4 (<i>focA</i>)	0 (0 %)	0 (0 %)	20 (37,7 %)	0 (0 %)
Muta 5/6 (pMUT1)	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (1,9 %)	0 (0 %)
Muta 7/8 (pMUT2)	0 (0 %) ^{c)}	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %) ^{d)}
Muta 9/10 (pMUT2)	0 (0 %)	0 (0 %)	2 (3,8 %)	0 (0 %)

^{a)} UPEC-, MENEC-, SEPEC-Isolate

^{b)} EHEC-, EPEC-, ETEC-, EIEC- und EAEC-Isolate

^{c)} Vier Stämme zeigten ein PCR-Produkt, das jedoch in der Größe nicht mit dem DSM 6601-spezifischen Fragment übereinstimmt.

^{d)} Ein Stamm zeigte ein PCR-Produkt, das jedoch in der Größe nicht mit dem DSM 6601-spezifischen Fragment übereinstimmt.

Bei der Untersuchung der beiden *Plesiomonas shigelloides* Isolate und verschiedener *Citrobacter* Stämme zeigte sich für den Stamm *Plesiomonas shigelloides* Isolat 11184, der ein Plasmid mit DNA-Sequenzhomologie über eine Distanz von 3529 bp zu pMUT2 besitzt, ein positives Ergebnis mit den für das Plasmid pMUT2 spezifischen Primern Muta 7-10. Ein PCR-Produkt mit den Primern Muta 5/6 wurde für den *Citrobacter rodentium* Stamm DBS100 erhalten, der ein mit pMUT1 fast identisches Plasmid besitzt.

Wie in Tab. 10 und 11 gezeigt, wurden für *E. coli* K-12-Stämme in allen fünf PCR-Assays keine DSM 6601-spezifischen PCR-Produkte beobachtet. Etwa 33 % der Fäkal-Stämme, 13 % der extraintestinalen *E. coli* Stämme und 5 % der intestinalen *E. coli* Stämme zeigten ein positives Ergebnis bei PCR-Reaktionen mit den *fimA*-spezifischen Primern Muta 1/2, während mit den *focA*-spezifischen Primern Muta 3/4 bei 38 % der extraintestinalen *E. coli* Stämme ein positives Ergebnis erhalten wurde.

Weitaus bessere Ergebnisse wurden mit den PCR-Assays erzielt, die auf den beiden Plasmiden pMUT1 und pMUT2 beruhen. So zeigten nur drei der extraintestinalen *E. coli* Stämme eine positive Reaktion mit den Primern Muta 5/6 bzw. Muta 9/10, die spezifisch für die Plasmide pMUT1 bzw. pMUT2 sind. Das lässt auf eine niedrige Frequenz dieser DNA-Sequenzen in anderen *E. coli* Stämmen schließen. Ein Vergleich der Daten aller fünf verschiedenen PCR-Reaktionen zeigt, dass bei keinem der getesteten *E. coli* Stämme ein positives Ergebnis für mehr als drei PCR-Assays erhalten wurde, wobei die auf den chromosomal kodierten Typ 1 (*fim*)- und F1C (*foc*)- Fimbriengenklustern basierenden Primer Muta 1-4 die geringste Spezifität aufwiesen.

5.1.4 Validierung der stammspezifischen PCR-Reaktionen auf Basis der Plasmide zum Nachweis von *E. coli* DSM 6601 aus Humanstuhl

Ein Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines PCR-Protokolls, das für den spezifischen und schnellen Nachweis des apathogenen *E. coli* Stammes DSM 6601 in Gegenwart von anderen kommensalen *E. coli* Stämmen in humanem Stuhl benutzt werden kann. Bisher wurden für die PCR-Reaktionen reine Bakterienkulturen oder einzelne Bakterienkolonien verwendet, so dass eine Zwischenzüchtung der zu testenden Bakterien nötig war. Durch die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen sollte ein Nachweissystem etabliert werden, bei dem die für die Plasmide des *E. coli* Stammes DSM 6601 spezifischen PCR-Reaktionen (Muta 5-10) direkt auf Humanstuhl angewendet werden können, so dass eine Zwischenzüchtung der Bakterien entfällt. Zudem sollte mit diesen Versuchen die Sensitivität dieser PCR-Reaktionen ermittelt werden.

Es wurde eine Methode etabliert, mit der DNA direkt aus Stuhlproben isoliert werden kann (siehe 4.3). Um die Nachweisgrenze dieser Methode zu bestimmen und die PCR-Bedingungen für die plasmidspezifischen Primerpaare (Muta 5-10) zu optimieren, wurde DNA aus einer Verdünnungsreihe ausgehend von 10^9 Bakterien/ml von einer Übernachtskultur des Stammes DSM 6601 mit Stuhlzusatz isoliert. Hierzu wurden die einzelnen Verdünnungsstufen mit jeweils 100 mg Stuhl eines gesunden Probanden gemischt, der bisher nicht mit dem probiotischen *E. coli* Stamm DSM 6601 in Form des Präparates Mutaflor[®] behandelt worden ist. Im Anschluss daran erfolgte die DNA-Isolierung aus diesen Ansätzen. Mit der erhaltenen DNA wurden PCR-Reaktionen mit verschiedenen *Taq* DNA-Polymerasen, Templatemengen, $MgCl_2$ -Konzentrationen und "Annealingtemperaturen" durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Die größte Sensitivität wurde hierbei mit der *Taq* DNA-Polymerase von QIAGEN unter folgenden Bedingungen beobachtet:

Templatemenge:	2 µl Eluat der DNA-Isolierung		
$MgCl_2$ -Konzentration:	4,5 mM (Muta 5/6) bzw. 3 mM (Muta 7/8 und Muta 9/10)		
PCR-Bedingungen:	3 min	95 °C	1 x
	45 s	95 °C	35 Zyklen
	45 s	60 °C	
	45 s	72 °C	

Als interne Kontrolle wurden die DNA-Extrakte einer PCR-Reaktion mit den 16S rRNA-spezifischen Primern 27f und 798r unterzogen, um nachzuweisen, dass die Proben in ausreichender Menge eubakterielle DNA enthalten (Abb. 8).

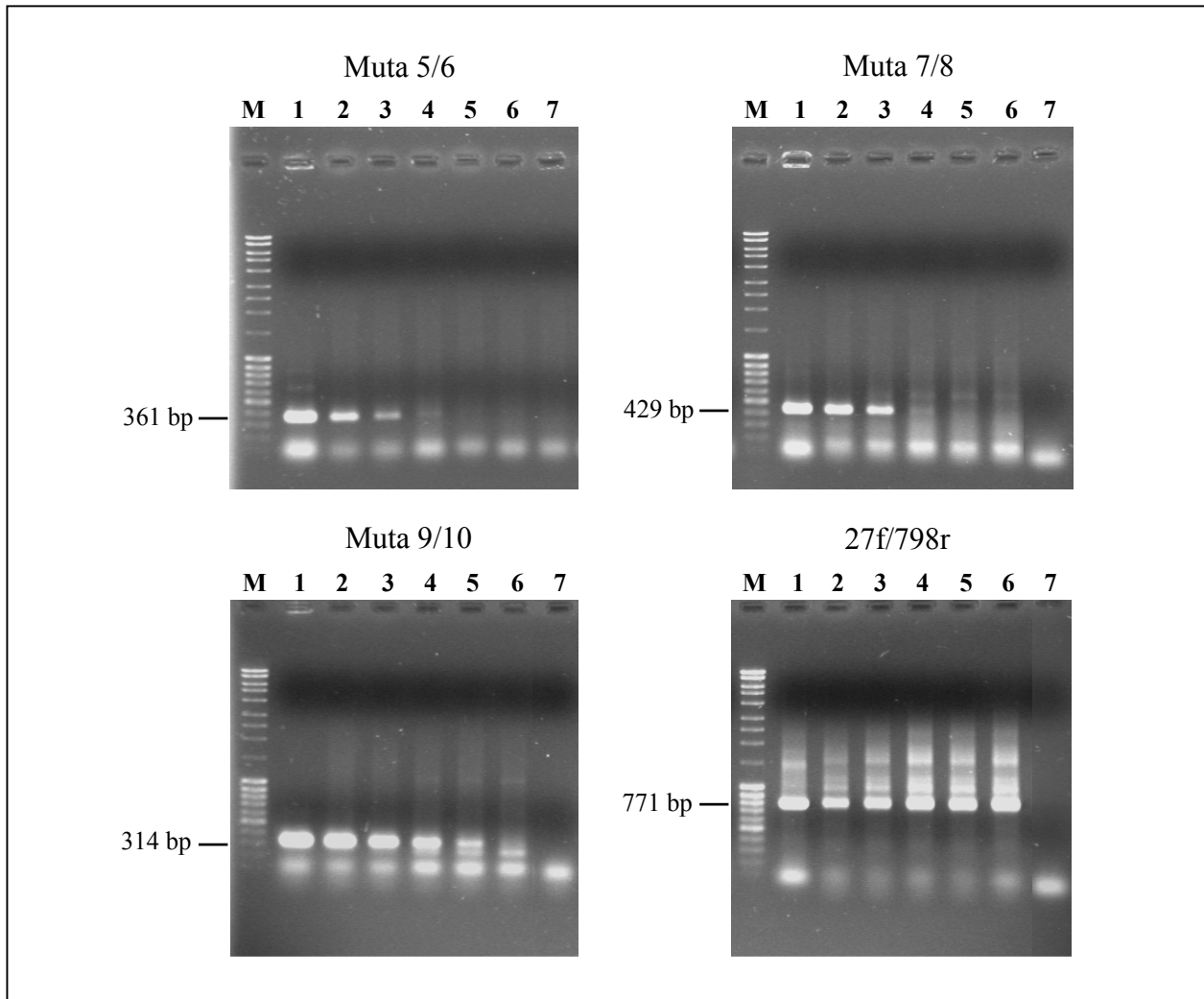


Abb. 8: Ergebnisse der PCR-Assays mit den Primern Muta 5/6, Muta 7/8, Muta 9/10 und als Positivkontrolle mit den 16S rRNA-spezifischen Primern 27f/798r. Für die PCR-Reaktionen wurden DNA-Extrakte eingesetzt, die aus mit Stuhl vermischten Verdünnungsstufen des *E. coli* Stammes DSM 6601 gewonnen wurden (Spur 2-6).

(M) 1 kb-Leiter als DNA-Größenstandard, (1) DSM 6601 aus ÜN-Kultur (10^9 Bakterien/ml), (2) Stuhlprobe vermisch mit 10^6 Bakterien, (3) Stuhlprobe vermisch mit 10^5 Bakterien, (4) Stuhlprobe vermisch mit 10^4 Bakterien, (5) Stuhlprobe vermisch mit 10^3 Bakterien, (6) Stuhlprobe (Negativkontrolle), (7) PCR-Mix (Kontrolle). Die Größe der einzelnen PCR-Produkte ist angegeben.

Für alle drei plasmidspezifischen PCR-Reaktionen konnten PCR-Produkte nachgewiesen werden. Die Sensitivität der einzelnen Primerpaare war unterschiedlich. Während mit den Primerpaaren Muta 5/6 (pMUT1) und Muta 7/8 (pMUT2) etwa 10^4 Bakterien detektiert werden konnten, lag die Nachweisgrenze mit der Primerkombination Muta 9/10 (pMUT2) bei 10^3 Bakterien. Wie Abb. 8 zeigt, ist deutlich zu erkennen, dass mit abnehmender Konzentration des *E. coli* Stammes DSM 6601 die Stärke der spezifischen Banden abnimmt, was auf das Erreichen der Nachweisgrenze hindeutet.

Um zu untersuchen, ob die Anwesenheit von humanem Stuhl bei der DNA-Isolierung einen Einfluss auf die Nachweisgrenze ausübt, wurde DNA aus einer Verdünnungsreihe ausgehend von 10^9 Bakterien/ml von einer Übernachtskultur des Stammes DSM 6601 ohne Stuhlzusatz isoliert. Unter denselben PCR-Bedingungen konnte für die Primerpaare Muta 5/6 und Muta 7/8 eine Nachweisgrenze von 10^3 Bakterien, für die Primerkombination Muta 9/10 eine Nachweisgrenze von 10^2 Bakterien erreicht werden (Daten nicht gezeigt). Dadurch konnte demonstriert werden, dass die Nachweisgrenze des *E. coli* Stammes DSM 6601 nach der DNA-Isolierung aus Verdünnungsstufen ohne Stuhlzusatz um etwa eine 10-er Potenz niedriger liegt als bei der Gewinnung der DNA aus humanen Stuhlproben.

5.1.5 Analyse von Patientenstuhlproben

Um den diagnostischen Nutzen des auf PCR-Reaktionen basierenden Nachweises des *E. coli* Stammes DSM 6601 zu zeigen, wurden Stuhlproben von sechs an Colitis ulcerosa (chronisch entzündliche Darmerkrankung) leidenden Patienten untersucht, von denen einige mit dem probiotischen *E. coli* Stamm in Form des Medikaments Mutaflor[®] behandelt wurden. Die Untersuchungen wurden als Blindstudie durchgeführt, das heißt, dass zur Zeit der Versuchsdurchführung nicht bekannt war, welcher der Patienten das Präparat Mutaflor[®] erhalten hatte bzw. in welcher Dosis es verabreicht wurde. Die Stuhlproben wurden mittels der auf den Plasmiden basierenden PCR-Assays (Muta 5/6 für pMUT1, Muta 7/8 und Muta 9/10 für pMUT2) auf die Anwesenheit des *E. coli* Stammes DSM 6601 hin untersucht. Als interne Kontrollen für die PCR-Reaktionen wurden 16S rRNA-spezifische Primer (27f/798r) als Positivkontrolle und *E. coli* K-12-spezifische Primer (K12-R/K12-L) als Negativkontrolle verwendet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab. 12 und Abb. 9 dargestellt.

Tab. 12: Ergebnisse der PCR-Untersuchungen von Patientenstuhlproben

Primer	Patient 1 (200 mg/d)	Patient 2	Patient 3 (200 mg/d)	Patient 4	Patient 5 (100 mg/d)	Patient 6 (200 mg/d)
Muta 5/6	+	-	+	-	-	+
Muta 7/8	+	-	+	-	-	+
Muta 9/10	+	-	+	-	+	+
K12-R/K12-L	-	-	-	-	-	-
27f/798r	+	+	+	+	+	+

Unter den Patienten ist die jeweilige Mutaflor[®]-Dosis angegeben, sofern der Patient behandelt wurde.

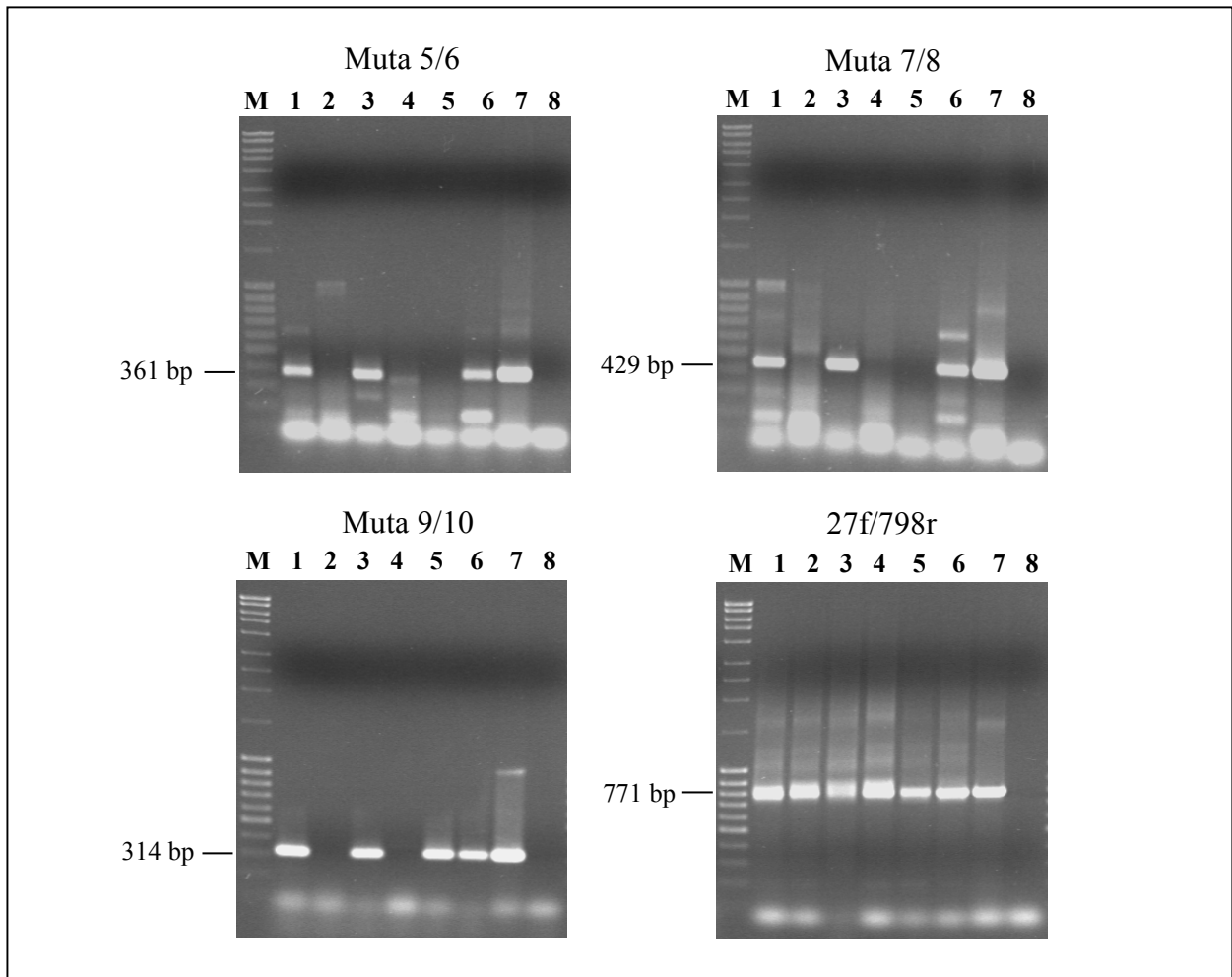


Abb. 9: Ergebnisse der Untersuchung von Patientenstuhlproben mit den Primerkombinationen Muta 5/6, Muta 7/8, Muta 9/10 und mit den 16S rRNA-spezifischen Primern 27f/798r. Für die PCR-Reaktionen wurden DNA-Extrakte eingesetzt, die aus Patientenstuhl gewonnen wurden (Spur 1-6).

(M) 1 kb-Leiter, (1) Patient 1, (2) Patient 2, (3) Patient 3, (4) Patient 4, (5) Patient 5, (6) Patient 6, (7) *E. coli* DSM 6601 aus ÜN-Kultur (10^9 Bakterien/ml) (8) PCR-Mix (Negativkontrolle). Die Größe der einzelnen PCR-Produkte ist angegeben.

Drei der Patienten (1, 3 und 6) wurden mit allen drei spezifischen Primerkombinationen PCR-positiv getestet. Patient 5 konnte nur mit dem Primerpaar Muta 9/10 PCR-positiv getestet werden, das wie schon zuvor gezeigt die sensitivste Primerkombination darstellt. Nach der Entblindung stellte sich heraus, dass dieser Patient nur mit 100 mg/d des Präparates Mutaflor[®] behandelt wurde, während die Patienten 1, 3 und 6 eine tägliche Dosis von 200 mg Mutaflor[®] erhalten hatten. Die Patienten 2 und 4, die nicht mit dem Medikament Mutaflor[®] behandelt wurden, zeigten auch keine PCR-Produkte bei den *E. coli* DSM 6601-spezifischen PCR-Assays.

Zusammenfassung der Ergebnisse des Abschnitts 5.1:

- Bei der Sequenzanalyse des Plasmids pMUT1 (3173 bp) zeigte sich, dass dieses Plasmid ein Replikationssystem vom ColE1-Typ (*oriV*, *rom*) und notwendige Informationen für seine Stabilität (*cer*) und Mobilisierung (*oriT*, *mobA*) enthält. Es konnten keine weiteren ORFs mit bekannter Funktion identifiziert werden.
- Die Analyse des Plasmids pMUT2 (5520 bp) ergab, dass dieses Plasmid ein ColE2-ähnliches Replikationssystem (*oriV*, *rep*) und einen Mobilisierungslokus (*oriT*, *mobABCD*) besitzt. Es konnten keine weiteren ORFs mit bekannter Funktion identifiziert werden.
- Bei der Untersuchung einer Kollektion verschiedener Bakterienstämme unterschiedlichen Ursprungs konnte gezeigt werden, dass die für den *E. coli* Stamm DSM 6601 existierenden PCR-Reaktionen mit den Primern Muta 1-10 eine hohe Spezifität besitzen. Dabei sind die auf den Plasmiden pMUT1 und pMUT2 basierenden PCR-Assays (Muta 5-10) am spezifischsten.
- Es wurde eine Methode etabliert, durch die der probiotische *E. coli* Stamm DSM 6601 direkt aus Humanstuhl spezifisch nachgewiesen werden kann. Die Nachweisgrenze liegt mit den Primerkombinationen Muta 5/6 und Muta 7/8 bei 10^4 Bakterien/0,1 g Stuhl, während sich mit dem Primerpaar Muta 9/10 10^3 Bakterien/0,1 g Stuhl detektieren lassen.
- In einer als Blindstudie durchgeführten PCR-Analyse von Patientenstuhlproben wurde die entwickelte Methode zum spezifischen Nachweis des *E. coli* Stammes DSM 6601 aus Humanstuhl angewendet. Es konnte gezeigt werden, welcher der Patienten mit dem probiotischen *E. coli* Stamm DSM 6601 in Form des Medikaments Mutaflor[®] behandelt wurde. Dabei war eine Abhängigkeit zwischen der Nachweisgrenze und der verabreichten Medikamentendosis zu beobachten.

5.2 Herstellung und Charakterisierung eines plasmidfreien Klons des *E. coli* Stammes DSM 6601

In den letzten Jahren wurde mit großem Einsatz daran gearbeitet, oral applizierbare bakterielle Lebendvakzine zu entwickeln, durch die Antigene oder therapeutisch wirksame Moleküle direkt an mukosalen Oberflächen präsentiert werden können. Hierzu wurden hauptsächlich attenuierte pathogene Stämme wie *Salmonella typhi* oder *Salmonella paratyphi*, Bacille Calmette-Guérin oder *Bordetella pertussis* Stämme verwendet, aber auch kommensale Bakterien wie Laktobazillen oder Streptokokken und Staphylokokken (Holmgren & Czerkinsky, 2005). In letzter Zeit wird auch die Möglichkeit untersucht, Moleküle zielgerichtet mit Hilfe des probiotischen *E. coli* Stammes DSM 6601 im Darm zu präsentieren (Westendorf *et al.*, 2005).

Für die Verwendung des probiotischen *E. coli* Stammes DSM 6601 als Trägerstamm für die Expression von fremden Proteinen ist es jedoch notwendig, stabile Systeme zu entwickeln, durch die heterologe Proteine in diesem Stamm exprimiert werden können. Daher sollten die stamm-eigenen kryptischen Plasmide pMUT1 und pMUT2 dieses Stammes als Klonierungsvektoren verwendet werden. Um jedoch diese rekombinanten Plasmide in dem *E. coli* Stamm DSM 6601 verwenden zu können, sollte zuerst ein plasmidfreier Klon dieses Stammes hergestellt werden. Anhand dieser plasmidfreien Mutante sollte zudem untersucht werden, ob die Plasmide des *E. coli* Stammes DSM 6601 eine Funktion erfüllen und ob der Verlust der Plasmide zu einer Änderung von Eigenschaften im Vergleich zum Wildtyp führt.

5.2.1 Konstruktion der Suizidplasmide für die Herstellung eines plasmidfreien Klons des *E. coli* Stammes DSM 6601

Um einen plasmidfreien Klon des Stammes *E. coli* DSM 6601 herzustellen, wurde der negative Selektionsmarker *sacB* verwendet. Die durch das *sacB*-Gen aus *Bacillus subtilis* kodierte Levansaccharase polymerisiert in Anwesenheit von Saccharose das Fruktosepolymer Levan, welches in den periplasmatischen Raum Gram-negativer Bakterien eingelagert wird und dort eine toxische Wirkung hat (Steinmetz *et al.*, 1985; Reyrat *et al.*, 1998). Werden Plasmide mit dem *sacB*-Gen markiert, können auf Selektionsmedien mit hohem Saccharoseanteil nur Bakterien wachsen, die keine Levansaccharase exprimieren und somit die markierten Plasmide verloren haben.

5.2.1.1 Konstruktion des Suizidplasmids pMUT1-Tc-Sac

Für die Herstellung des Suizidplasmids pMUT1-Tc-Sac wurde zunächst zur Selektionserleichterung eine Tetrazyklin-Resistenzkassette und anschließend der negative Selektionsmarker *sacB* in das Plasmid pMUT1 inseriert. Die Konstruktion des Plasmids pMUT1-Tc-Sac ist in Abb. 10 dargestellt.

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten in das Plasmid pMUT1 stehen nur wenige Restriktionsenzyme zur Verfügung, deren Schnittstellen nur einmal vorhanden sind und nicht in funktionellen ORFs oder anderen funktionellen Regionen des Plasmids liegen (eine entsprechende Restriktionskarte ist im Anhang zu finden). Diese verfügbaren Restriktionsenzyme sind jedoch für Klonierungen nicht sehr gut geeignet, so dass eine Insertion von DNA-Fragmenten meistens nur durch “blunt end”-Ligationen möglich ist.

Für die Insertion der Tetrazyklin-Resistenzkassette in das Plasmid pMUT1 wurde die singular vorkommende Restriktionsschnittstelle *NdeI* gewählt. Das Plasmid pMUT1 wurde mit *NdeI* linearisiert und mit Klenow-Enzym behandelt, um “blunt ends” zu erhalten. Zusätzlich wurde eine Dephosphorylierungsreaktion durchgeführt, um eine Religation des Plasmids zu verhindern. Die Tetrazyklin-Resistenzkassette wurde mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *XbaI* aus dem Plasmid pKS-*tetA* herausgespalten und das erhaltene DNA-Fragment ebenfalls einer Klenow-Behandlung unterzogen. Die 1449 bp große Tetrazyklin-Resistenzkassette wurde nun in das vorbereitete Plasmid pMUT1 ligiert. Das daraus resultierende Plasmid wurde pMUT1-Tc genannt.

Durch die Insertion der Tetrazyklin-Resistenzkassette wurde gleichzeitig eine singular vorkommende *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle aus dem Polylinker des Plasmids pKS-*tetA* eingeführt. Das Plasmid pMUT1-Tc wurde daher mit *EcoRI* linearisiert und anschließend einer Klenow- sowie einer Dephosphorylierungsbehandlung unterzogen. Das *sacB*-Gen wurde mit *PstI* aus dem Plasmid pCVD442 herausgespalten und das erhaltene DNA-Fragment wurde ebenso mit Klenow-Enzym behandelt. Anschließend wurde das 2612 bp große *sacB*-Gen tragende DNA-Fragment in das vorbereitete Plasmid pMUT1-Tc ligiert. Das entstandene Suizidplasmid erhielt die Bezeichnung pMUT1-Tc-Sac.

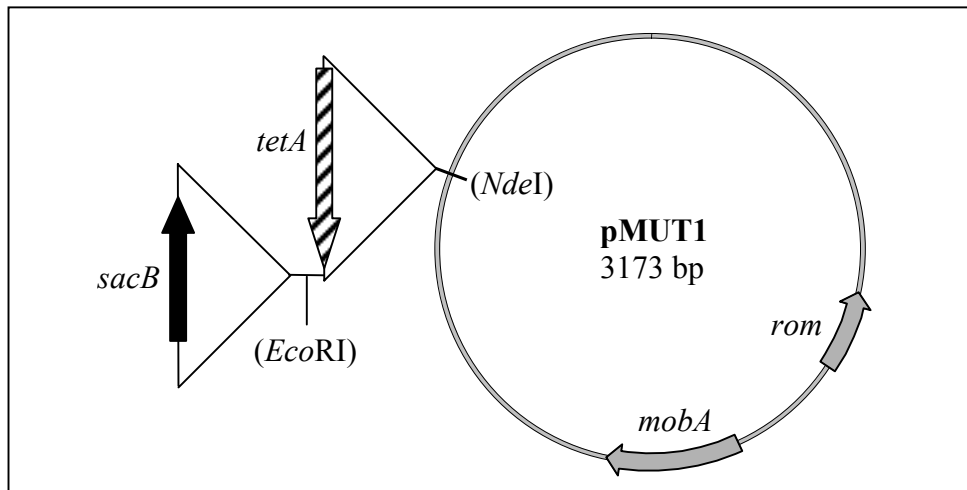


Abb. 10: Schematische Darstellung der Konstruktion des Suizidplasmids pMUT1-Tc-Sac. Die Strategie ist im Text detailliert erklärt. Plasmidkarten sind im Anhang abgebildet.

5.2.1.2 Konstruktion des Suizidplasmids pMUT2-Kn-Sac

Für die Herstellung des Suizidplasmids pMUT2-Kn-Sac wurde zunächst eine Kanamycin-Resistenzkassette und anschließend der negative Selektionsmarker *sacB* in das Plasmid pMUT2 inseriert. Die Konstruktion des Plasmids pMUT2-Kn-Sac ist in Abb. 11 dargestellt.

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten in das Plasmid pMUT2 stehen einige Restriktionsenzyme zur Verfügung, deren Einzelschnittstellen nicht in funktionellen ORFs oder anderen funktionellen Regionen des Plasmids liegen (eine entsprechende Restriktionskarte ist im Anhang zu finden). Diese verfügbaren Restriktionsenzyme sind jedoch für Klonierungen nicht sehr gut geeignet, so dass auch bei diesem Plasmid eine Insertion von DNA-Fragmenten meistens nur durch “blunt end”-Ligationen möglich ist.

Für die Insertion der Kanamycin-Resistenzkassette in das Plasmid pMUT2 wurde die singular vorkommende Restriktionsschnittstelle *Bgl*II gewählt. Das Plasmid pMUT2 wurde mit *Bgl*II linearisiert, zur Erzeugung von “blunt ends” mit Klenow-Enzym behandelt und zudem dephosphoryliert, um eine Religation des Plasmids zu verhindern. Die Kanamycin-Resistenzkassette wurde mit *Stu*I aus dem Plasmid pACYC177 herausgespalten. Die 1340 bp große Kanamycin-Resistenzkassette wurde nun in das vorbereitete Plasmid pMUT2 ligiert. Das daraus resultierende Plasmid wurde pMUT2-Kn genannt.

Für die Insertion eines weiteren DNA-Fragments in das Plasmid pMUT2-Kn wurde die singular vorkommende Restriktionsschnittstelle *EcoRI* gewählt, die in einem putativen ORF liegt. Diesem konnte jedoch durch Homologievergleiche keine Funktion zugeordnet werden. Das Plasmid pMUT2-Kn wurde daher mit *EcoRI* linearisiert und anschließend einer Klenow- sowie einer Dephosphorylierungsbehandlung unterzogen. Das *sacB*-Gen wurde mit *PstI* aus dem Plasmid pCVD442 herausgespalten und das erhaltene DNA-Fragment wurde mit Klenow-Enzym behandelt. Anschließend wurde das 2612 bp große *sacB*-Gen tragende DNA-Fragment in das vorbereitete Plasmid pMUT2-Kn ligiert. Das entstandene Suizidplasmid erhielt die Bezeichnung pMUT2-Kn-Sac.

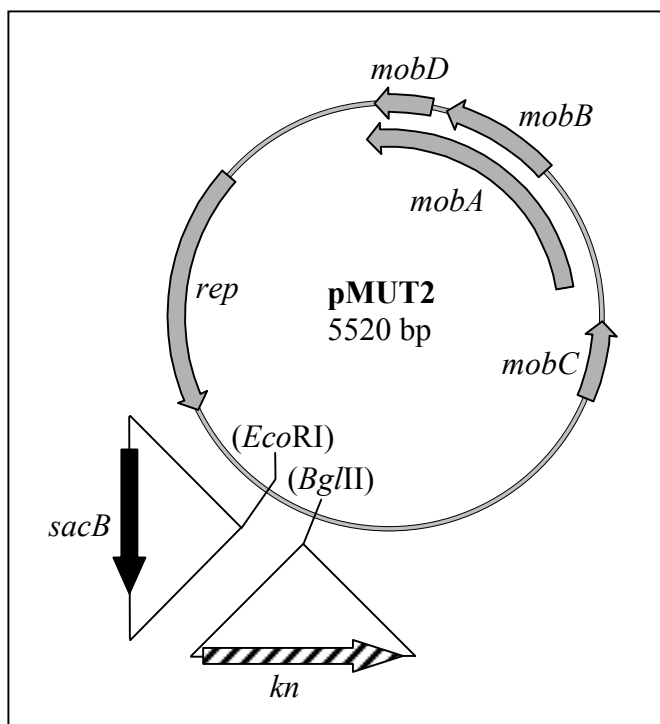


Abb. 11: Schematische Darstellung der Konstruktion des Suizidplasmids pMUT2-Kn-Sac. Die Strategie ist im Text detailliert erklärt. Plasmidkarten sind im Anhang abgebildet.

5.2.2 Herstellung eines plasmidfreien Klons des *E. coli* Stammes DSM 6601

Für die Herstellung eines plasmidfreien Klons des *E. coli* Stammes DSM 6601 wurden die beiden natürlich vorkommenden Plasmide pMUT1 und pMUT2 zunächst durch das Einbringen der Suizidplasmide pMUT1-Tc-Sac und pMUT2-Kn-Sac ersetzt, die jeweils einen Antibiotika-Resistenzmarker und das *sacB*-Gen kodieren. Anschließend wurde sich zu Nutze gemacht, dass die durch das *sacB*-Gen kodierte Levansaccharase in Anwesenheit von Saccharose bei 30 °C Levan polymerisiert, was für Bakterien toxisch ist. Daher können nur Klone, die das *sacB*-Gen tragende Plasmid verloren haben, auf 10 % Saccharoseplatten wachsen. Die Strategie für die Herstellung eines plasmidfreien Klons des *E. coli* Stammes DSM 6601 ist in Abb. 12 dargestellt.

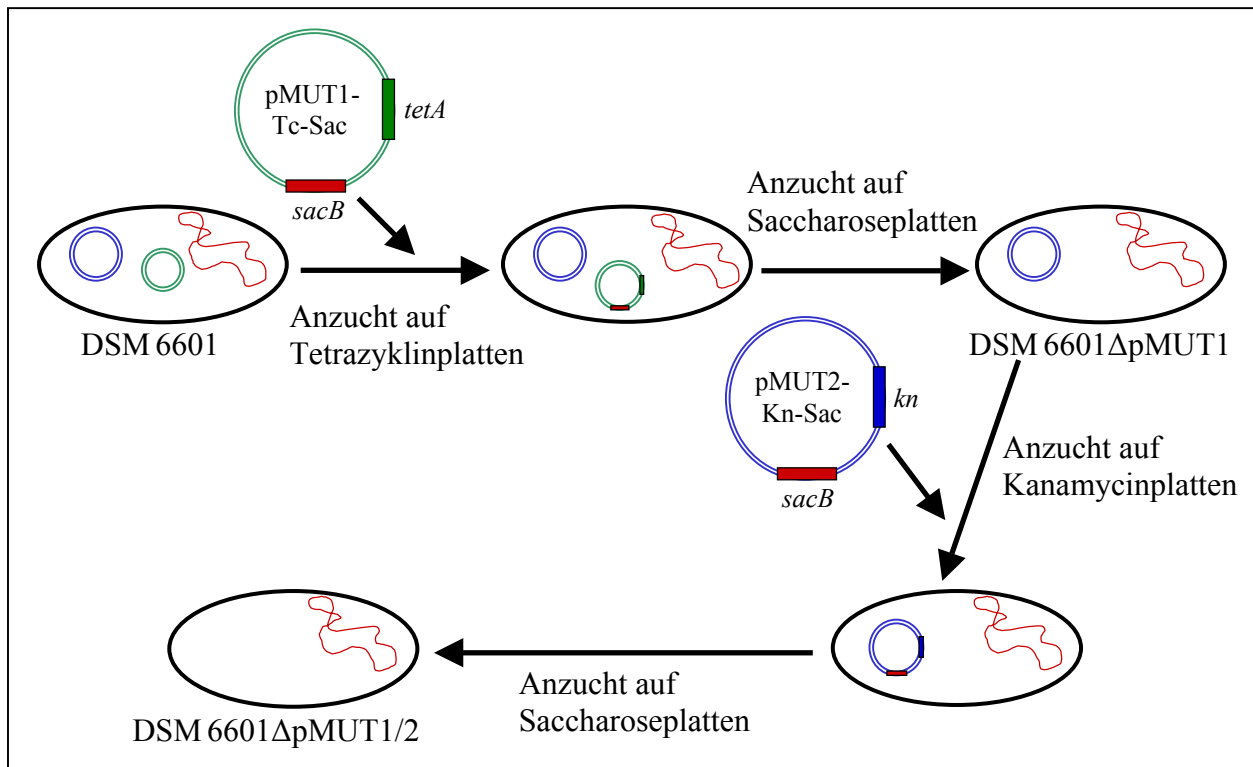


Abb. 12: Strategie zur Herstellung eines plasmidfreien Klonen des *E. coli* Stammes DSM 6601. Die Strategie ist im Text detailliert erklärt.

Zunächst wurde der wildtypische *E. coli* Stamm DSM 6601 mit den Plasmiden pMUT1-Tc-Sac bzw. pMUT2-Kn-Sac durch Elektroporation transformiert. Der Transformationsansatz wurde auf Tetrazyklin-haltigen bzw. Kanamycin-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert. Die erhaltenen Bakterienklone wurden durch Isolierung der Plasmid-DNA auf den Besitz des Plasmids pMUT1-Tc-Sac bzw. pMUT2-Kn-Sac und den damit verbundenen Verlust des natürlich vorkommenden Plasmids pMUT1 bzw. pMUT2 überprüft (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde jeweils einer dieser Klone über Nacht in LB-Medium mit 10 % Saccharose bei 30 °C angezogen und danach auf LB-Platten mit 10 % Saccharose ausplattiert. Die Platten wurden wiederum bei 30 °C inkubiert. Da unter diesen Bedingungen nur noch jene Klone replizieren können, die keine Levansaccharase mehr exprimieren, wurden nur Bakterienklone erhalten, die das Plasmid pMUT1-Tc-Sac bzw. pMUT2-Kn-Sac verloren haben. Die daraus resultierenden Stämme DSM 6601ΔpMUT1 und DSM 6601ΔpMUT2 wurden durch Isolierung von Plasmid-DNA und PCR auf den Verlust des Plasmids pMUT1-Tc-Sac und pMUT2-Kn-Sac überprüft (Abb. 13).

Um einen vollständig plasmidfreien Klon des *E. coli* Stammes DSM 6601 zu erhalten, wurde in einem nächsten Schritt das Plasmid pMUT2-Kn-Sac durch Elektroporation in den Stamm DSM 6601ΔpMUT1 eingebracht und somit das Plasmid pMUT2 ersetzt. Um den Verlust des

Plasmids pMUT2-Kn-Sac herbeizuführen, wurde wie oben beschrieben verfahren. Der daraus resultierende Stamm DSM 6601 Δ pMUT1/2 wurde durch Isolierung der Plasmid-DNA und PCR auf den Verlust des Plasmids pMUT2-Kn-Sac überprüft (Abb. 13).

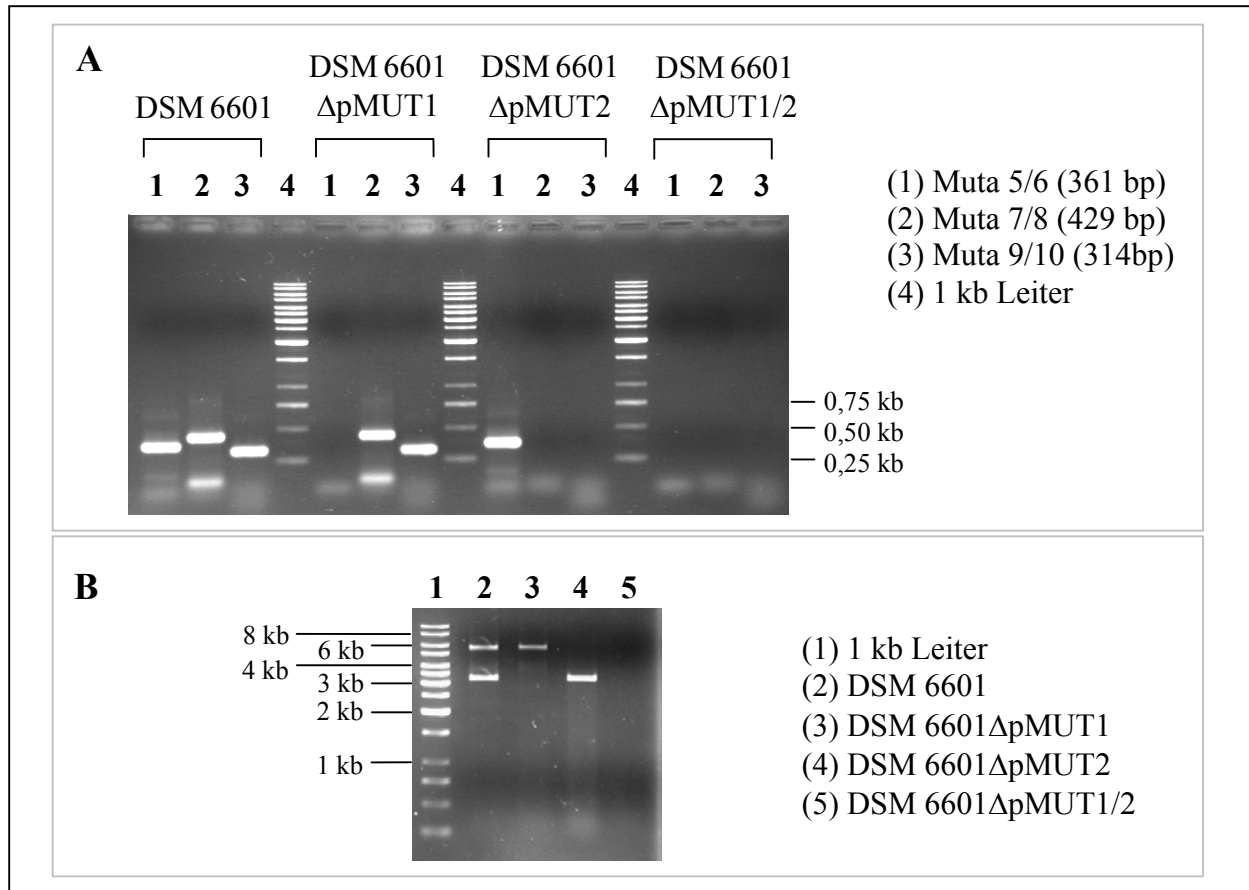


Abb. 13: Nachweis des Plasmidverlustes mittels PCR (**A**) und Isolierung von Plasmid-DNA (**B**). Die PCR wurde mit den für die Plasmide spezifischen Primern Muta 5/6 (pMUT1) sowie Muta 7/8 und Muta 9/10 (pMUT2) durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde mit *EcoRI* und *EcoRV* verdaut, was zu einer Linearisierung der Plasmide pMUT1 (3173 bp) und pMUT2 (5520 bp) führt.

Um ausschließen zu können, dass sich bei der Herstellung des plasmidfreien Klons DSM 6601 Δ pMUT1/2 größere Veränderungen in der chromosomalen DNA ereignet haben, wurde eine Pulsfeld-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierbei wurden die *NotI*-Restriktionsmuster der Stämme DSM 6601 Δ pMUT1, DSM 6601 Δ pMUT2 und DSM 6601 Δ pMUT1/2, die entweder nur eines der Plasmide oder kein Plasmid mehr besitzen, mit dem Restriktionsmuster des wildtypischen *E. coli* Stammes DSM 6601 verglichen. Die *NotI*-Restriktionsmuster der untersuchten Derivate waren alle identisch mit dem Muster des wildtypischen *E. coli* Stammes DSM 6601 (Abb. 14). Anhand des typischen Bandenmusters konnte somit gezeigt werden, dass neben dem Verlust der Plasmide pMUT1 und pMUT2 keine auffälligen Veränderungen in der genomischen DNA stattgefunden haben und es sich bei dem plasmidfreien Stamm wirklich um

ein Derivat des *E. coli* Stammes DSM 6601 handelt. Eventuell aufgetretene Punktmutationen können jedoch nicht ausgeschlossen werden.

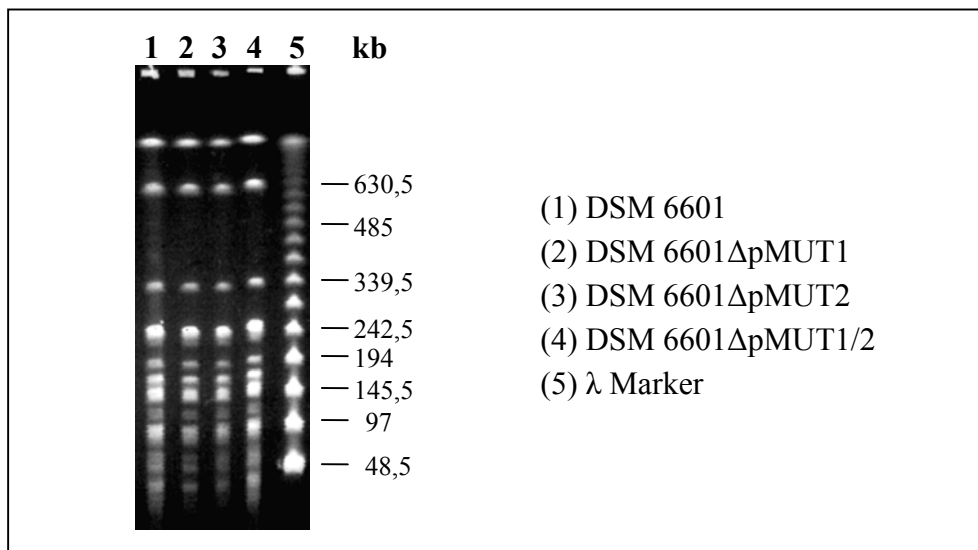


Abb. 14: Pulsfeldgel-Analyse mit *NotI* gespaltener genomischer DNA. Als Größenmarker wurden λ-Konkatamere verwendet. Die Größe der Markerbanden ist in kb am rechten Rand angegeben.

5.2.3 Charakterisierung des plasmidfreien *E. coli* Stammes DSM 6601ΔpMUT1/2

Da bei der Analyse der Basensequenzen und der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von den beiden Plasmiden pMUT1 und pMUT2 des *E. coli* Stammes DSM 6601 keine Erkenntnisse zu deren Funktion erlangt werden konnten, wurde nun überprüft, ob der Verlust der Plasmide einen Einfluss auf das Bakterienwachstum und auf weitere bekannte Eigenschaften dieses Stammes wie die Inhibition einer *Salmonella*-Invasion, die Phagenresistenz, die Biofilmbildung und die Serumresistenz hat.

5.2.3.1 Einfluss der Plasmide auf das Bakterienwachstum

Um zu überprüfen, ob auf den Plasmiden pMUT1 und pMUT2 mögliche Faktoren kodiert sind, die einen Einfluss auf das Bakterienwachstum ausüben, wurde eine Wachstumskurve der plasmidfreien Variante DSM 6601ΔpMUT1/2 im Vergleich zum wildtypischen *E. coli* Stamm DSM 6601 in LB-Medium bei 37 °C erstellt. Wie in Abb. 15 gezeigt, ist kein Unterschied im Wachstumsverhalten zwischen Wildtyp und der plasmidfreien Mutante zu erkennen.

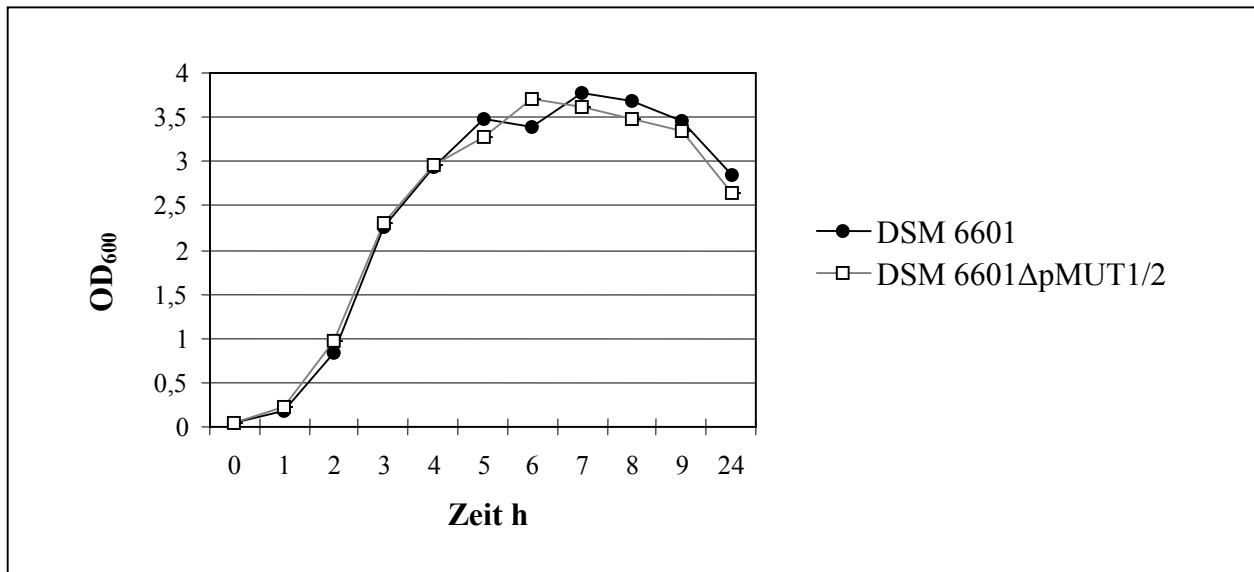


Abb. 15: Vergleich des Bakterienwachstums in Flüssigkultur der *E. coli* Stämme DSM 6601 und der plasmidfreien Mutante DSM 6601ΔpMUT1/2.

5.2.3.2 Einfluss der Plasmide auf die Inhibition der *Salmonella*-Invasion

Von Altenhoefer *et al.* (2004) konnte gezeigt werden, dass der probiotische *E. coli* Stamm DSM 6601 die Invasion von Bakterien wie *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, *Yersinia enterocolitica*, *Legionella pneumophila* und *Listeria monocytogenes* in die humane embryonale intestinale Zelllinie INT407 deutlich inhibieren kann. Um zu überprüfen, ob die kryptischen Plasmide pMUT1 und pMUT2 des *E. coli* Stammes DSM 6601 einen Einfluss auf diesen inhibitorischen Effekt ausüben, wurden Koinfektions-Invasionsassays mit INT407-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden der invasive *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Stamm SL1344, der *E. coli* Stamm DSM 6601 sowie die plasmidfreie Variante DSM 6601ΔpMUT1/2 verwendet.

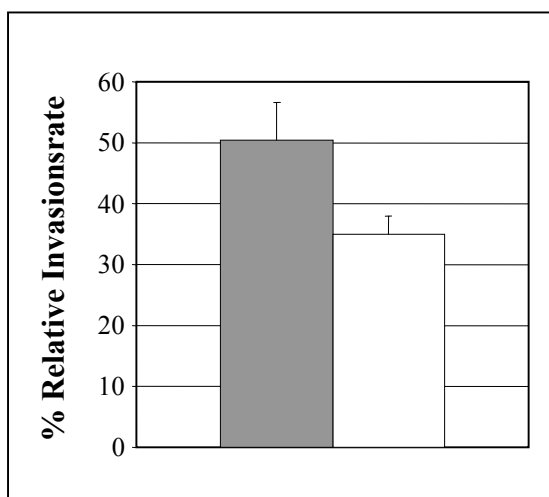


Abb. 16: Vergleich der relativen Invasionsraten von *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Stamm SL1344 in Anwesenheit der *E. coli* Stämme DSM 6601 (grau) und der isogenen plasmidfreien Variante DSM 6601ΔpMUT1/2 (weiß). Die gezeigten Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichungen von vier unabhängig voneinander durchgeführten Koinfektions-Invasionsassays.

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abb. 16 dargestellt. Der plasmidfreie *E. coli* Stamm DSM 6601 Δ pMUT1/2 reduziert die Invasivität von *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Stamm SL1344 ebenso wie der Wildtypstamm DSM 6601. Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden ($p = 0,087$). Somit konnte gezeigt werden, dass die Plasmide pMUT1 und pMUT2 keine Bedeutung für den inhibitorischen Effekt des *E. coli* Stammes DSM 6601 auf die Invasivität von Salmonellen haben.

5.2.3.3 Einfluss der Plasmide auf die Phagenresistenz

Untersuchungen von Feldgarden *et al.* (1995) lassen vermuten, dass durch bestimmte Col-Plasmide die Resistenz gegen eine Bakteriophageninfektion gesteigert wird und kryptische Plasmide eventuell eine Rolle bei der Phagenresistenz spielen könnten. In meiner Diplomarbeit (Oswald, 1997) konnte gezeigt werden, dass der *E. coli* Stamm DSM 6601 nicht mit dem Bakteriophagen λ oder dem Stx2 konvertierenden Phagen 86-24 infizierbar ist. Daher wurde überprüft, ob der plasmidfreie *E. coli* Stamm DSM 6601 Δ pMUT1/2 im Gegensatz zum Wildtyp mit diesen beiden Phagen infiziert werden kann. Hierzu wurde der Phage 86-24 aus *E. coli* O157:H7 Stamm 86-24 und der λ -Phage aus *E. coli* C600(λ) mittels Induktion durch Mitomycin C extrahiert (siehe 4.30). Nach Extraktion der Phagen erfolgte der Versuch einer Infektion der *E. coli* Stämme DSM 6601 und DSM 6601 Δ pMUT1/2. Zur Kontrolle wurde ebenfalls der *E. coli* K-12-Stamm C600 mit denselben Phagenlysaten infiziert.

Während der *E. coli* K-12-Stamm C600 zur Aufnahme der getesteten Phagen fähig war, konnte weder der wildtypische noch der plasmidfreie *E. coli* Stamm DSM 6601 Δ pMUT1/2 mit einem der beiden Phagen infiziert werden. Somit wurde gezeigt, dass die beiden kryptischen Plasmide pMUT1 und pMUT2 keine Rolle bei der Resistenz des *E. coli* Stammes DSM 6601 gegenüber den Phagen λ und 86-24 spielen.

5.2.3.4 Einfluss der Plasmide auf die Biofilmbildung

Von Ghigo (2001) wird vermutet, dass die Expression von Faktoren, die auch die Biofilmbildung beeinflussen, eine Erklärung für die stabile Beibehaltung von kryptischen Plasmiden darstellt. Daher wurde untersucht, ob die Plasmide pMUT1 und pMUT2 einen Einfluss auf die Biofilmbildung in dem *E. coli* Stamm DSM 6601 haben.

Diese Untersuchungen wurden freundlicherweise von Dr. Jean-Marc Ghigo am Institut Pasteur in Paris (Frankreich) durchgeführt. Hierbei wurde getestet, ob die *E. coli* Stämme DSM 6601, DSM 6601 Δ pMUT1, DSM 6601 Δ pMUT2 und DSM 6601 Δ pMUT1/2 unterschiedlich starke Biofilme ausbilden (siehe 4.32). Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abb. 17 gezeigt.

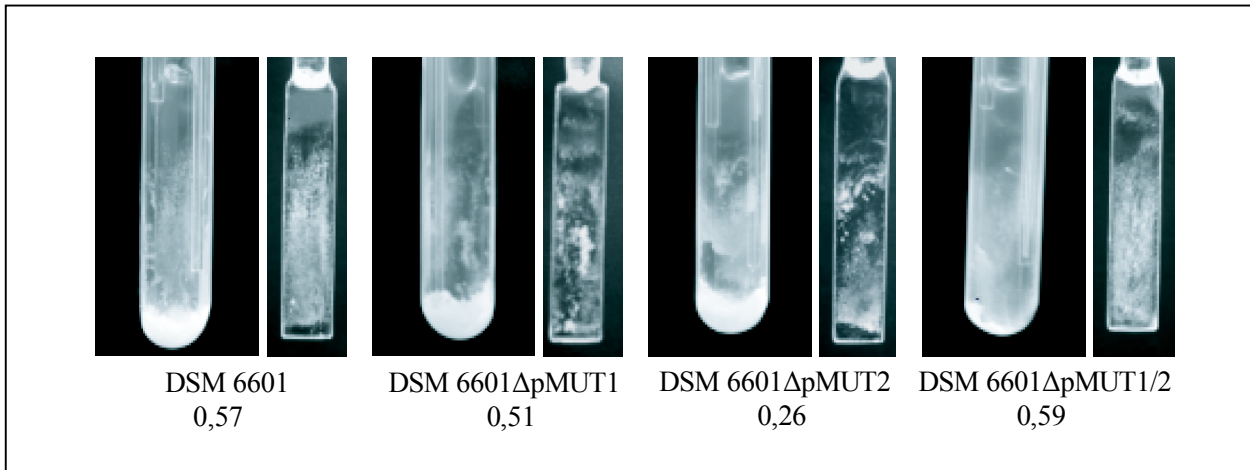


Abb. 17: Vergleich der Biofilmbildung nach 72 Stunden zwischen den *E. coli* Stämmen DSM 6601, DSM 6601 Δ pMUT1, DSM 6601 Δ pMUT2 und DSM 6601 Δ pMUT1/2. Unter den einzelnen Stämmen ist die entsprechende OD₆₀₀ der in Minimalmedium resuspendierten Biofilme angegeben.

Bei den getesteten Stämmen konnte auf Grund stark überlappender Standardabweichungen kein signifikanter Unterschied in der Ausprägung des Biofilms festgestellt werden. Somit konnte kein Einfluss der Plasmide auf die Biofilmbildung nachgewiesen werden.

5.2.3.5 Einfluss der Plasmide auf die Serumresistenz

Um zu überprüfen, ob die Plasmide pMUT1 und pMUT2 des *E. coli* Stammes DSM 6601 einen Einfluss auf die Serumsensitivität ausüben, wurde mit dem *E. coli* Stamm DSM 6601 und der isogenen plasmidfreien Variante DSM 6601 Δ pMUT1/2 ein Serumresistenztest in 90 % Humanserum durchgeführt (siehe 4.29). Die Serumresistenz ist definiert als die Fähigkeit von Bakterien, der Wirkung des Komplementsystems des Wirtsorganismus erfolgreich zu entgehen. Im Serumresistenztest zeigte sich, dass der plasmidfreie Stamm *E. coli* DSM 6601 Δ pMUT1/2 ebenso wie der Wildtyp DSM 6601 serumsensitiv ist und durch das humane Serum vollständig abgetötet wird.

Zusammenfassung der Ergebnisse des Abschnitts 5.2:

- Die Plasmide pMUT1 und pMUT2 wurden mit Antibiotika-Resistenzkassetten markiert (pMUT1-Tc und pMUT2-Kn) und können als Klonierungsvektoren verwendet werden.
- Durch das Einbringen des *sacB*-Gens in die Plasmide pMUT1-Tc und pMUT2-Kn wurden die Suizidplasmide pMUT1-Tc-Sac und pMUT2-Kn-Sac konstruiert, die für die Herstellung einer plasmidfreien Variante des *E. coli* Stammes DSM 6601 eingesetzt wurden.
- Es wurde ein plasmidfreier Klon des *E. coli* Stammes DSM 6601 hergestellt. Das Derivat *E. coli* DSM 6601 Δ pMUT1/2 wurde für Untersuchungen zur möglichen Funktion der Plasmide pMUT1 und pMUT2 verwendet. Darüber hinaus kann dieser Stamm als Trägerorganismus für die Klonierungsvektoren pMUT1-Tc und pMUT2-Kn benutzt werden.
- Durch Untersuchungen zur möglichen Funktion der Plasmide pMUT1 und pMUT2 konnte festgestellt werden, dass diese Plasmide keinen Einfluss auf das Bakterienwachstum, die Inhibition einer *Salmonella*-Invasion, die Phagenresistenz, die Biofilmbildung und die Serumresistenz ausüben.

5.3 Verwendung der Plasmide des *E. coli* Stammes DSM 6601 als Klonierungsvektoren

Ein Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines stabilen Systems für die Expression heterologer Proteine in dem probiotischen *E. coli* Stamm DSM 6601, um diesen Stamm als Lebendvakzinvektor einzusetzen.

Gewöhnlich verwendete Klonierungsvektoren unterscheiden sich in ihrer Replikationsweise, Kopienzahl, Größe und Komplexität. Diese Eigenschaften sowie das Expressionsniveau plasmidkodierter Gene können die Beibehaltung eines Plasmids während des Bakterienwachstums beeinflussen. Um den Plasmidverlust *in vitro* zu verhindern, enthalten die meisten Klonierungsvektoren Antibiotika-Resistenzgene, durch die Plasmide enthaltende Bakterienzellen selektioniert werden können. Jedoch ist die Selektion eines Plasmids durch Antibiotika-Resistenz *in vivo* nicht wünschenswert. Daher sollte ein Klonierungsvektor im Idealfall ohne äußeren Selektionsdruck stabil in der Bakterienzelle beibehalten werden (Dunstan *et al.*, 2003).

Eine Möglichkeit für die Konstruktion von stabilen Vektoren besteht darin, die Replikons von kleinen kryptischen Plasmiden zu verwenden und Selektionsmarker zu integrieren (Shareck *et al.*, 2004). *E. coli* Wildtypstämme enthalten häufig kleine kryptische Plasmide, die nur auf Grund ihrer Replikationsfähigkeit beibehalten werden und in hoher Kopienzahl ohne offensichtlichen Nutzen für ihren Wirt vorliegen (Burian *et al.*, 1997). Auch der probiotische *E. coli* Stamm DSM 6601 besitzt zwei kleine kryptische Plasmide, pMUT1 und pMUT2. Es wurde nachgewiesen, dass diese kryptischen Plasmide in dem *E. coli* Stamm DSM 6601 über eine Periode von 28 Monaten stabil beibehalten werden (Hawkey & Snelling, 1998). Auf Grund dieser Stabilität könnten sich diese Plasmide als Klonierungsvektoren eignen, ohne dass ein Selektionsdruck von Außen notwendig ist.

Um jedoch die Selektion von rekombinanten Plasmiden bei der praktischen Arbeit zu erleichtern, wurden die mit Antibiotika-Resistenzkassetten versehenen Plasmide pMUT1-Tc und pMUT2-Kn als Klonierungsvektoren verwendet.

5.3.1 Untersuchungen zur Stabilität der Plasmide pMUT1-Tc und pMUT2-Kn

Um zu überprüfen, ob die kryptischen Plasmide pMUT1 und pMUT2 auch nach der Insertion von Fremd-DNA noch stabil in dem *E. coli* Stamm DSM 6601 beibehalten werden und somit keine für die Stabilität notwendigen DNA-Bereiche durch die Insertion zerstört worden sind, wurden Stabilitätstests mit den Plasmiden pMUT1-Tc und pMUT2-Kn durchgeführt. Hierzu wurden die *E. coli* Stämme DSM 6601 Δ pMUT1/2(pMUT1-Tc) und DSM 6601 Δ pMUT1/2(pMUT2-Kn) ver-

wendet. Die beiden Stämme wurden über einen Zeitraum von 9 Tagen in LB-Medium ohne Selektionsdruck durch Antibiotika täglich subkultiviert und anschließend in einer entsprechenden Verdünnungsstufe auf LB-Agarplatten ausplattiert. Um festzustellen, ob die Plasmide noch in den untersuchten Stämmen vorhanden waren, wurden jeweils 1000 Kolonien von den LB-Agarplatten auf die entsprechenden Selektionsplatten übertragen (Tetrazyklin für pMUT1-Tc; Kanamycin für pMUT2-Kn). Alle getesteten Kolonien wiesen hierbei die entsprechende Resistenz auf, woraus gefolgert wird, dass die beiden Plasmide pMUT1-Tc und pMUT2-Kn stabil in dem *E. coli* Stamm DSM 6601 Δ pMUT1/2 vorliegen und sich somit für die Verwendung als Klonierungsvektoren eignen.

5.3.2 Untersuchung zur Konjugierbarkeit des Plasmids pMUT2

Da die Analyse des Plasmids pMUT2 gezeigt hat, dass dieses Plasmid eine *mob*-Region und einen Transfer-Replikationsursprung enthält, wurde überprüft, ob dieses Mobilisierungssystem funktionell ist. Da das Plasmid pMUT2 jedoch keine eigenen *tra*-Gene beinhaltet, die für die Ausbildung eines Pilus und andere konjugationsspezifische Funktionen verantwortlich sind, kann eine Übertragung des Plasmids pMUT2 nur mittels eines Helferplasmids erfolgen. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob durch das *IncP*-Helferplasmid RP4, welches unter anderem Resistenz gegen Ampicillin kodiert und ColE1-Plasmide mobilisiert (Pansegrau *et al.*, 1994; Cabezón *et al.*, 1997), auch das Plasmid pMUT2 des *E. coli* Stammes DSM 6601 mobilisiert werden kann. Zur leichteren Identifizierung der Transkonjuganten wurde das mit einer Kanamycin-Resistenzkassette markierte Plasmid pMUT2-Kn des rekombinanten Stammes *E. coli* DSM 6601 Δ pMUT1/2(pMUT2-Kn) für die Konjugationsexperimente verwendet.

Das Helferplasmid RP4 Δ kn wurde mittels Konjugation von dem Donorstamm *E. coli* J53(RP4 Δ kn) auf den Rezipientenstamm *E. coli* DSM 6601 Δ pMUT1/2(pMUT2-Kn) übertragen. Die Selektion des *E. coli* Stammes DSM 6601 Δ pMUT1/2(pMUT2-Kn/RP4 Δ kn) erfolgte auf Kanamycin- und Ampicillin-haltigen MacConkey-Agarplatten, auf denen der *E. coli* Stamm J53 weiße Kolonien und der *E. coli* Stamm DSM 6601 rote Kolonien bildet.

Um festzustellen, ob das Plasmid pMUT2-Kn durch das Helferplasmid RP4 Δ kn mobilisiert werden kann, wurden *in vitro*-Filterkonjugationsversuche durchgeführt (siehe 4.17.2). Als Donor dienten die rekombinanten *E. coli* Stämme DSM 6601 Δ pMUT1/2(pMUT2-Kn/RP4 Δ kn) und DSM 6601 Δ pMUT1/2(pMUT2-Kn). Letzterer wurde verwendet, um zu überprüfen, ob auch eine Übertragung des Plasmids pMUT2-Kn ohne die Anwesenheit eines Helferplasmids stattfindet. Als Rezipient wurde der Streptomycin-resistente *E. coli* K-12-Stamm HB101 verwendet. Die

Übertragung der Plasmide pMUT2-Kn und RP4 Δ kn vom Donor- auf den Rezipientenstamm *E. coli* HB101 konnte auf Grund seiner Streptomycin-Resistenz und der durch die Plasmide erworbenen Kanamycin-Resistenz und Ampicillin-Resistenz nachgewiesen werden. Wie erwartet konnten bei der Verwendung des Donorstammes *E. coli* DSM 6601 Δ pMUT1/2(pMUT2-Kn) keine Transkonjuganten erhalten werden. Im Gegensatz dazu wurden bei der Verwendung des Stammes *E. coli* DSM 6601 Δ pMUT1/2(pMUT2-Kn/RP4 Δ kn) als Donor Transkonjuganten des *E. coli* Stammes HB101 erhalten, die sowohl Kanamycin- und Ampicillin-resistent als auch nur Kanamycin-resistent waren. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Plasmide pMUT2-Kn und RP4 Δ kn unabhängig voneinander übertragen werden und dass für die Mobilisierung von pMUT2-Kn ein Helferplasmid notwendig ist. Die Transferfrequenz des Plasmids pMUT2-Kn lag bei 5×10^{-4} , wobei in 66 % der Übertragungen eine Cotranslokation des Plasmids RP4 Δ kn vorlag. Dies wurde auch durch Isolierung von Plasmid-DNA bestätigt (Daten nicht gezeigt). Diese Untersuchung zeigt, dass das Plasmid pMUT2 ein funktionelles Mobilisationssystem kodiert.

5.3.3 Expression von fluoreszierenden Proteinen

Da eine Unterscheidung des probiotischen *E. coli* Stammes DSM 6601 von anderen Bakterien bisher nur durch molekularbiologische Methoden möglich ist, wurden die Klonierungsvektoren pMUT1-Tc und pMUT2-Kn verwendet, um fluoreszierende Proteine als visuelle Marker zu exprimieren.

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* wird als Reporter und Marker in eukaryotischen und prokaryotischen Zellen eingesetzt. Für seine Fluoreszenz benötigt das GFP im Gegensatz zu anderen Reportern keine weiteren Cofaktoren oder Substrate und kann somit für die Detektion von lebenden Zellen verwendet werden (Chalfie *et al.*, 1994). Inzwischen sind eine Reihe von genetisch veränderten GFP-Mutanten hergestellt worden, um die Detektion und Expression des fluoreszierenden Proteins in prokaryotischen Zellen zu verbessern (Cormack *et al.*, 1996; Andersen *et al.*, 1998).

In der Riffkoralle *Discosoma species* wurde ein rot fluoreszierendes Protein (DsRed) entdeckt, das eine ähnliche Struktur wie das GFP besitzt und auf gleiche Weise als Reporter eingesetzt werden kann (Matz *et al.*, 1999).

Für die Expression der fluoreszierenden Proteine GFP und DsRed wurden die entsprechenden Gene, *gfp* und *dsRed*, in die Klonierungsvektoren pMUT1-Tc und pMUT2-Kn inseriert. Diese wurden mit *EcoRI* linearisiert, anschließend zur Erzeugung von "blunt ends" einer Klenow-Behandlung unterzogen und dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors zu verhindern. Die auf diese Weise vorbereiteten Vektoren wurden dann für die im Folgenden beschriebenen Ligationen eingesetzt.

Das *gfp*-Gen unter Kontrolle eines *lac*-Promotors wurde mit den Restriktionsenzymen *SapI* und *SpeI* aus dem Plasmid pGFPmut3.1 isoliert. Um glatte Enden zu erzeugen, wurden die 5'-überhängenden Enden unter Verwendung des Klenow-Enzyms aufgefüllt. Das so erhaltene *gfp*-Gen tragende DNA-Fragment (1050 bp) wurde sowohl in die *EcoRI*-Schnittstelle des Klonierungsvektors pMUT1-Tc als auch des Klonierungsvektors pMUT2-Kn ligiert. Die resultierenden Plasmide wurden pMUT1-Tc-Gfp und pMUT2-Kn-Gfp genannt.

Das *dsRed*-Gen unter Kontrolle eines *lac*-Promotors wurde aus dem Plasmid pDsRed über die Restriktionsschnittstellen *PvuII* und *SpeI* herausgespalten und das DNA-Fragment ebenfalls einer Klenow-Behandlung unterzogen. Das so behandelte das DsRed-Protein kodierende DNA-Insert (994 bp) wurde anschließend jeweils in die *EcoRI*-Schnittstellen der beiden Plasmide pMUT1-Tc und pMUT2-Kn ligiert. Die entstandenen Plasmide erhielten die Bezeichnung pMUT1-Tc-Red und pMUT2-Kn-Red.

Um die Expression der fluoreszierenden Markerproteine in dem probiotischen *E. coli* Stamm DSM 6601 nachzuweisen, wurde die plasmidfreie isogene Mutante DSM 6601 Δ pMUT1/2 mit den markierten Plasmiden entweder einzeln oder in Kombination transformiert.

Wie in Abb. 18 gezeigt, ist durch die Expression der fluoreszierenden Proteine GFP und DsRed der *E. coli* Stamm DSM 6601 sowohl als Einzelkolonie mit Hilfe eines Fluoreszenzimagers als auch auf Einzelzellebene mittels Fluoreszenzmikroskopie nachzuweisen. Auch eine gleichzeitige Expression von beiden unterschiedlich fluoreszierenden Proteinen in dem rekombinanten Stamm DSM 6601 Δ pMUT1/2(pMUT1-Tc-Red/pMUT2-Kn-Gfp) ist ohne Probleme möglich. Durch die Überlagerung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen mit den dazugehörigen Phasenkontrastbildern der rekombinanten *E. coli* Stämme DSM 6601 Δ pMUT1/2(pMUT1-Tc-Gfp) und DSM 6601 Δ pMUT1/2(pMUT2-Kn-Red) konnte demonstriert werden, dass jede einzelne Bakterienzelle fluoresziert. Die Kontrollstämme *E. coli* DSM 6601 Δ pMUT1/2(pMUT1-Tc) und DSM 6601 Δ pMUT1/2(pMUT2-Kn) zeigten dagegen keine Eigenfluoreszenz.

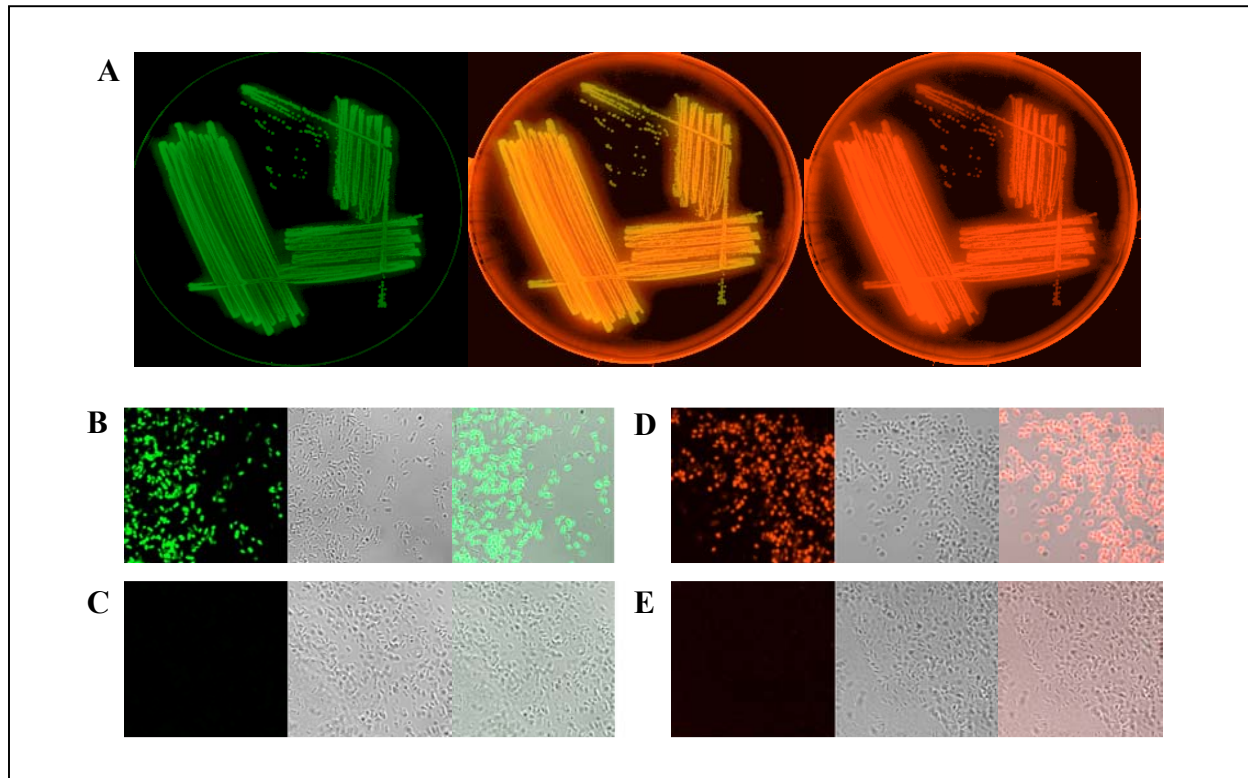


Abb. 18: Expression des GFP und/oder des DsRed-Proteins in verschiedenen rekombinanten *E. coli* DSM 6601 Δ pMUT1/2-Stämmen.

Fluoreszenzimager-Aufnahmen von dem auf einer LB-Agarplatte ausgestrichenen *E. coli* Stamm DSM 6601 Δ pMUT1/2(pMUT1-Tc-Red/pMUT2-Kn-Gfp) (**A**). In den einzelnen Bildern ist zunächst die Fluoreszenz von GFP, dann die Überlagerung der Fluoreszenz von GFP und DsRed, zuletzt die Fluoreszenz von DsRed gezeigt.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von DSM 6601 Δ pMUT1/2(pMUT1-Tc-Gfp) (**B**), DSM 6601 Δ pMUT1/2(pMUT1-Tc) (Kontrolle) (**C**), DSM 6601 Δ pMUT1/2(pMUT2-Kn-Red) (**D**) und DSM 6601 Δ pMUT1/2(pMUT2-Kn) (Kontrolle) (**E**). In den einzelnen Bildern ist zunächst das fluoreszenzmikroskopische Bild, dann die Phasenkontrastaufnahme und zuletzt die Überlagerung dieser beiden dargestellt.

Um zu überprüfen, ob die Plasmide pMUT1-Tc und pMUT2-Kn auch nach der Insertion von weiterer Fremd-DNA noch stabil sind und somit keine für die Stabilität notwendigen DNA-Bereiche durch diese Insertion zerstört worden sind, wurden Stabilitätstests mit den Plasmiden pMUT1-Tc-Red und pMUT2-Kn-Gfp durchgeführt. Hierzu wurden die rekombinanten *E. coli* Stämme DSM 6601 Δ pMUT1/2(pMUT1-Tc-Red) und DSM 6601 Δ pMUT1/2(pMUT2-Kn-Gfp) über einen Zeitraum von 16 Tagen (ca. 136 Generationen) in LB-Medium ohne Zugabe von Antibiotika täglich subkultiviert. Anschließend wurden die Kulturen auf LB-Platten ausplattiert und die Fluoreszenz der einzelnen Kolonien wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzimagers detektiert. Hierbei wurde festgestellt, dass 100 % von jeweils ca. 1000 untersuchten Einzelkolonien der Stämme DSM 6601 Δ pMUT1/2(pMUT1-Tc-Red) und DSM 6601 Δ pMUT1/2(pMUT2-Kn-Gfp) eine entsprechende Fluoreszenz aufwiesen. Dieses Ergebnis zeigt, dass die beiden Plasmide

pMUT1-Tc-Red und pMUT2-Kn-Gfp stabil in dem *E. coli* Stamm DSM 6601 Δ pMUT1/2 vorliegen und dass sich die *EcoRI*-Restriktionsschnittstellen der Klonierungsvektoren pMUT1-Tc und pMUT2-Kn für die Insertion von weiterer Fremd-DNA eignen.

5.3.4 Expression von Adhäsinen

Im Hinblick auf die Entwicklung eines Lebendvakzins auf der Basis des probiotischen *E. coli* Stammes DSM 6601 sollten verschiedene Antigene mit adhäsiven Eigenschaften von darm-pathogenen Infektionserregern in diesem Stamm exprimiert werden. Die Präsentation von Antigenen im Darm von Mensch und Tier könnte zur Induktion einer spezifischen mukosalen und systemischen Immunantwort führen, wodurch sowohl die Bindung des jeweiligen Pathogens an Epithelzellen als auch die Kolonisation verhindert werden könnte. Neben einer Stimulierung der Immunantwort könnten auch spezifische Rezeptoren auf Epithelzellen durch das adhäsive Antigen selbst blockiert und dadurch die Etablierung des pathogenen Organismus im Darm verhindert werden.

Als Antigene für die Expression in dem *E. coli* Stamm DSM 6601 wurden die fimbriellen Adhäsine K88ab und K99 von tierpathogenen enterotoxischen *E. coli* (ETEC) sowie das Adhäsin Intimin von humanpathogenen enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) ausgewählt.

5.3.4.1 Expression von ETEC-spezifischen K88ab- und K99-Fimbrien

Enterotoxische *E. coli* Stämme (ETEC) sind wichtige Verursacher von akuter Diarrhö bei Menschen und Jungtieren. Sie kolonisieren die mukosalen Oberflächen des Dünndarms und produzieren dort ein hitzelabiles Enterotoxin (LT) und/oder ein hitzestabiles Enterotoxin (ST). Durch deren Aktivität wird das Krankheitsbild ausgelöst. Die Kolonisation des Dünndarms durch ETEC-Bakterien erfolgt durch die Expression von Fimbrien, welche dem Pathogen seine Wirtsspezifität verleihen. So sind ETEC-Stämme, die K99-Fimbrien exprimieren, pathogen für Kälber, Lämmer und Schweine, während Organismen, die K88-Fimbrien besitzen, nur für Schweine pathogen sind. Von K88-Fimbrien sind zudem mehrere serologisch unterschiedliche Varianten beschrieben, K88ab, K88ac und K88ad. Humanpathogene ETEC-Stämme exprimieren eine Reihe eigener Kolonisationsfimbrien (CFAs) (Mooi *et al.*, 1982; Nataro & Kaper, 1998).

Für die Expression der K88ab- und K99-Fimbrien wurde das Plasmid pMUT2-Kn verwendet. Das Plasmid pMUT2-Kn wurde mit *EcoRI* linearisiert, anschließend zur Erzeugung von glatten Enden einer Klenow-Behandlung unterzogen und dephosphoryliert, um eine Religation des

Vektors zu verhindern. Der auf diese Weise vorbereitete Vektor wurde dann für die folgenden Klonierungen eingesetzt.

Zur Herstellung des Plasmids pMUT2-Kn-K88 wurde das gesamte K88ab-Fimbriengenkluster mit *Sau3AI* aus dem Plasmid pFM205 herausgeschnitten. Das ca. 6,7 kb große DNA-Fragment wurde einer Klenow-Behandlung unterzogen und in die *EcoRI*-Schnittstelle des Plasmids pMUT2-Kn ligiert.

Für die Expression der K99-Fimbrien wurde das gesamte K99-Fimbriengenkluster mit *BamHI* aus dem Plasmid pFK99 gespalten. Das ca. 6698 bp große DNA-Fragment wurde mit Klenow-Enzym behandelt und in den vorbereiteten Vektor pMUT2-Kn ligiert. Das entstandene Plasmid erhielt die Bezeichnung pMUT2-Kn-K99.

Der plasmidfreie *E. coli* Stamm DSM 6601 Δ pMUT1/2 wurde anschließend mit den Plasmiden pMUT2-Kn-K88 und pMUT2-Kn-K99 transformiert. Der Nachweis einer Expression der K88ab- und K99-Fimbrien erfolgte durch Serumagglutination mit polyklonalen Kaninchen-Antiseren gegen K88- bzw. K99-Fimbrien. Die Expression der K99-Fimbrien konnte zudem durch Mannose-resistente Hämagglutination von Schaferythrozyten nachgewiesen werden (siehe 4.28.1). Während der Stamm DSM 6601 Δ pMUT1/2(pMUT2-Kn-K99) und die Positivkontrolle C600(pFK99) die Erythrozyten deutlich agglutinierten, konnte bei dem als Negativkontrolle verwendeten *E. coli* Stamm DSM 6601 Δ pMUT1/2(pMUT2-Kn) keine Agglutination beobachtet werden (Tab.13).

Tab.13: Nachweis der Fimbrienexpression

Stamm	Serumagglutination	Hämagglutination (Schafblut)	
		ohne Mannose	mit Mannose
DSM 6601 Δ pMUT1/2 (pMUT2-Kn-K88)	+ (K88-Antiserum)	nicht bestimmt	
DSM 6601 Δ pMUT1/2 (pMUT2-Kn) (Negativkontrolle)	- (K88-Antiserum)	nicht bestimmt	
HB101(pFM205) (Positivkontrolle)	+ (K88-Antiserum)	nicht bestimmt	
DSM 6601 Δ pMUT1/2 (pMUT2-Kn-K99)	+ (K99-Antiserum)	+	+
DSM 6601 Δ pMUT1/2 (pMUT2-Kn) (Negativkontrolle)	- (K99-Antiserum)	-	-
C600(pFK99) (Positivkontrolle)	+ (K99-Antiserum)	+	+

5.3.4.2 Expression des Adhäsins Intimin (Eae) aus EHEC-Bakterien

Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) als Verursacher von Durchfallerkrankungen, hämorrhagischer Kolitis (HC) und dem hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) beim Menschen sind wegen ihrer hohen Infektiosität und der Schwere der verursachten Erkrankungen von großer Bedeutung. Dabei sind Stämme der Serogruppe O157:H7 am häufigsten Auslöser dieser Erkrankungen. Zu den wichtigsten Virulenzfaktoren von humanpathogenen EHEC-Bakterien zählen die Shiga-Toxine (Stx1 und Stx2) und der Adhärenzfaktor Intimin (Eae) (Nataro & Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004).

EHEC-Bakterien induzieren ebenso wie enteropathogene *E. coli* (EPEC) eine charakteristische Histopathologie in intestinalen Epithelzellen, die als “attaching and effacing” (A/E)-Läsion bezeichnet wird. A/E-Läsionen sind charakterisiert durch lokale Zerstörung von Bürstensaummikrovilli, eine enge Adhärenz von Bakterien und eine Umstrukturierung des Zytoskeletts. Die Gene aller Faktoren, die an der Ausprägung dieser Läsionen beteiligt sind, befinden sich auf einer 43,4 kb großen Pathogenitätsinsel, dem sogenannten “locus of enterocyte effacement” (LEE). Das *eae* Gen kodiert für das bakterielle Oberflächenadhäsins Intimin, welches für die enge Wechselwirkung der Bakterienzelle mit der Wirtsepithelzelle verantwortlich ist (Frankel *et al.*, 1998; Perna *et al.*, 1998).

Das *eaeA*-Gen des EHEC-Stammes O157:H7 Stamm 86-24 wurde mit *Bam*HI und *Kpn*I aus dem Plasmid pOSeae1 ausgeschnitten. Die 5'-überhängenden und 3'-überhängenden Enden des DNA-Fragments wurden mit Hilfe des Klenow-Enzyms aufgefüllt bzw. abgedaut. Das so erhaltene Intimin kodierende 2886 bp große DNA-Fragment wurde in die mittels Klenow-Enzym aufgefüllten und dephosphorylierten *Eco*RI-Schnittstellen der beiden Klonierungsvektoren pMUT1-Tc und pMUT2-Kn ligiert. Die entstandenen Plasmide wurden pMUT1-Tc-Eae und pMUT2-Kn-Eae genannt. Anschließend wurde der *E. coli* Stamm DSM 6601ΔpMUT1/2 mit diesen Plasmiden transformiert.

Um nun zu überprüfen, ob das Adhäsins Intimin von den rekombinanten *E. coli* Stämmen DSM 6601ΔpMUT1/2(pMUT1-Tc-Eae) und DSM 6601ΔpMUT1/2(pMUT2-Kn-Eae) exprimiert wird, wurde eine “Western Blot”-Analyse mit einem Intimin-spezifischen polyklonalen Antikörper (α RIHisEae, Kaninchen, 1:2500 verdünnt) durchgeführt. Hierzu wurden die Bakterien durch Ultraschall aufgeschlossen und die dadurch gewonnenen Proteine auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Wie Abb. 19 zeigt, konnte die Expression von Intimin (97 kDa),

das auf den Plasmiden pMUT1-Tc-Eae und pMUT2-Kn-Eae kodiert ist, eindeutig nachgewiesen werden.

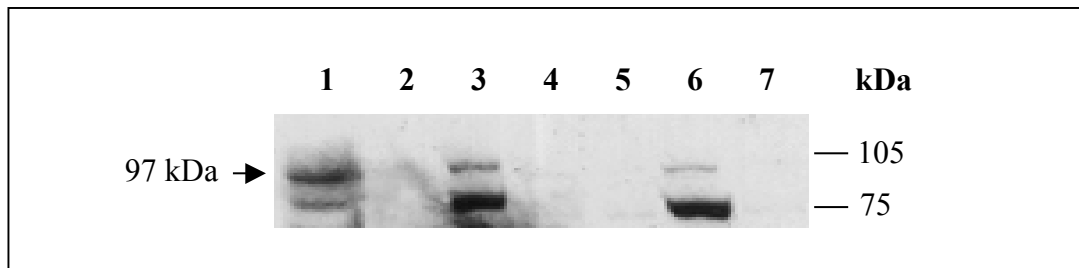


Abb. 19: “Western Blot”-Analyse mit einem Intimin-spezifischen polyklonalen Antikörper (α RIHisEae, 1:2500 verdünnt): Die Intimin-spezifische 97 kDa-Bande ist mit einem Pfeil markiert; bei der unteren ca. 75 kDa-Bande handelt es sich wahrscheinlich um ein Abbauprodukt von Intimin.

(1) O157:H7 Stamm 86-24, (2) O157:H7 Stamm 86-24 Δ eae,
 (3) DSM 6601 Δ pMUT1/2(pMUT1-Tc-Eae), (4) DSM 6601 Δ pMUT1/2(pMUT1-Tc),
 (5) DSM 6601 Δ pMUT1/2, (6) DSM 6601 Δ pMUT1/2(pMUT2-Kn-Eae),
 (7) DSM 6601 Δ pMUT1/2(pMUT2-Kn).

5.3.5 Erste tierexperimentelle Untersuchungen zur Induktion einer Immunantwort

Diese Versuche wurden im Labor von Prof. Dr. L. Emödy (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie, Universität Pécs, Ungarn) durchgeführt.

Um zu untersuchen, ob durch die von dem *E. coli* Stamm DSM 6601 Δ pMUT1/2 exprimierten Antigene Intimin, K88ab- und K99-Fimbrien im Tiermodell eine Immunantwort in Form einer spezifischen IgG-Produktion induziert werden kann, wurden erste Immunisierungsexperimente durchgeführt (siehe 4.38.2). Für diese Untersuchungen wurden die rekombinanten *E. coli* Stämme DSM 6601 Δ pMUT1/2(pMUT2-Kn-Eae), DSM 6601 Δ pMUT1/2(pMUT2-Kn-K88), DSM 6601 Δ pMUT1/2(pMUT2-Kn-K99) und DSM 6601 Δ pMUT1/2(pMUT2-Kn) als Kontrolle verwendet.

Nach 14 Tagen wurde der Immunisierungserfolg überprüft. Hierzu wurde mit Hilfe von “Western Blot”-Analysen untersucht, ob das Serum der immunisierten Mäuse spezifische IgG-Antikörper gegen die exprimierten Fremdantigene enthält. Es konnte jedoch keine Induktion einer Immunantwort in Form von spezifischen IgG-Antikörpern nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassung der Ergebnisse des Abschnitts 5.3:

- Untersuchungen zur Stabilität der Plasmide pMUT1-Tc und pMUT2-Kn haben gezeigt, dass die beiden kryptischen Plasmide des *E. coli* Stammes DSM 6601 auch nach Insertion von Fremd-DNA stabil beibehalten werden und sich somit als Klonierungsvektoren eignen.
- Das Plasmid pMUT2-Kn kann durch das Helferplasmid RP4 Δ kn mobilisiert werden, wodurch bestätigt wird, dass dieses Plasmid über ein funktionelles Mobilisationssystem verfügt.
- Die fluoreszierenden Proteine GFP und DsRed konnten nach Insertion der entsprechenden Gene in die Plasmide pMUT1-Tc und pMUT2-Kn in dem *E. coli* Stamm DSM 6601 stabil exprimiert werden. Dadurch wird der visuelle Nachweis dieses Stammes bei *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen ermöglicht.
- Die fimbriellen Adhäsine K88ab und K99 sowie der Adhärenzfaktor Intimin konnten durch die Verwendung der Plasmide pMUT1-Tc bzw. pMUT2-Kn als Klonierungsvektoren in dem *E. coli* Stamm DSM 6601 Δ pMUT1/2 erfolgreich exprimiert werden.
- Die Expression der Antigene Intimin, K88ab- und K99-Fimbrien in dem *E. coli* Stamm DSM 6601 Δ pMUT1/2 führte in ersten tierexperimentellen Untersuchungen nicht zur Induktion einer Immunantwort in Form einer spezifischen IgG-Produktion.

5.4 Untersuchungen zur inhibitorischen Wirkung des *E. coli* Stammes DSM 6601

5.4.1 Bedeutung der Fimbrienadhäsine des *E. coli* Stammes DSM 6601 für die inhibitorischen Effekte *in vitro*

Von Boudeau *et al.* (2003) konnte gezeigt werden, dass der probiotische *E. coli* Stamm DSM 6601 einen inhibitorischen Effekt auf die Adhärenz und Invasion von adhärenz-invasiven *E. coli* Stämmen bei *in vitro* Untersuchungen mit intestinalen Epithelzellen ausübt. Zudem inhibiert dieser Bakterienstamm deutlich die Invasion von Bakterien wie *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, *Yersinia enterocolitica*, *Legionella pneumophila* und *Listeria monocytogenes* in die intestinale Zelllinie INT407 (Altenhoefer *et al.*, 2004).

Die Adhärenz an Epithelzellen stellt einen wichtigen Schritt bei der Infektion durch *Salmonella* Stämme dar. Fimbrien vermitteln die Adhärenz von Serovar Typhimurium Stämmen an verschiedene Epithelzelllinien *in vitro*, was für die Invasion der Zellen erforderlich ist (Humphries *et al.*, 2001).

Der probiotische *E. coli* Stamm DSM 6601 exprimiert drei verschiedene Adhäsine: Typ 1-, F1C- und Curli-Fimbrien (Grozdanov *et al.*, 2004). Um festzustellen, ob durch eine Typ 1- und F1C-Fimbrien vermittelte Adhärenz der inhibitorische Effekt dieses Stammes auf die Invasivität von Salmonellen in Epithelzellen erklärt werden kann, wurde eine Typ 1- und F1C-Fimbrien-negative isogene Mutante des *E. coli* Stammes DSM 6601 hergestellt. Mit dieser Mutante sollte untersucht werden, ob Typ 1- und F1C-Fimbrien die Adhärenz an Epithelzellen beeinflussen und ob diese Fimbrien eine Rolle bei dem inhibitorischen Effekt auf die Invasivität von Salmonellen spielen.

5.4.1.1 Herstellung der Fimbriendeletionsmutanten

Alle chromosomalen Deletionsmutanten wurden mit Hilfe der einstufigen Allelaustauschmethode (Datsenko & Wanner, 2000) hergestellt, durch die chromosomale Gene in *E. coli* Stämmen unter Verwendung von PCR-Produkten inaktiviert werden können. Hierbei liefern die PCR-Primer die Homologien zu den Zielgenen. Diese Methode ist unter 4.18 detailliert beschrieben.

Um eine F1C-Fimbriendeletionsmutante des *E. coli* Stammes DSM 6601 herzustellen, wurde mit den Primern Foc 1 und Foc 2 ein 1112 bp großes DNA-Fragment aus dem Templateplasmid pKD3 amplifiziert. Dieses DNA-Fragment enthält ein Chloramphenicol-Resistenzgen (*cat*), das von FLP-Erkennungssequenzen (FRT) flankiert wird, sowie die von den Primern gelieferten homologen Sequenzen zu den Randbereichen des *foc*-Genklusters. So besitzt der Primer Foc 1 eine 55 Nukleotide lange homologe Sequenz zu dem 5'-"upstream"-Bereich von *focA* und der Primer Foc 2 einen 43 Nukleotide großen homologen Bereich zu der 3'-"downstream"-Region von *focH* (Abb. 20).

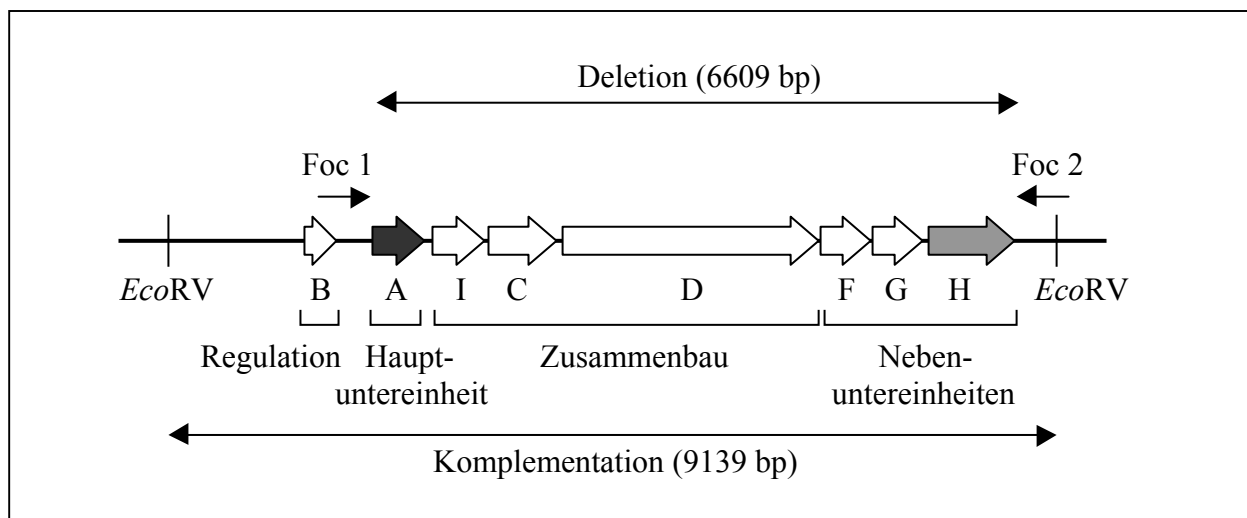


Abb. 20: Graphische Darstellung der genetischen Organisation der F1C-Fimbriendeterminante (*foc*) aus *E. coli* DSM 6601. Die Funktion der einzelnen Gene ist angegeben. Die Hauptuntereinheit und das eigentliche Adhäsins sind hervorgehoben. Bindungsstellen der für die Deletion verwendeten Primer und die für die Komplementation verwendeten *EcoRV*-Schnittstellen sind eingezeichnet.

Nach Transformation des *E. coli* Stammes DSM 6601(pKD46) mit diesem PCR-Fragment erfolgte durch die Aktivität der λ -Red-Rekombinase die Integration des Chloramphenicol-Resistenzgens (*cat*) einschließlich der flankierenden FLP-Erkennungssequenzen (FRT) in das Chromosom. Durch diese Integration wurde das gesamte *foc*-Gencluster (6609 bp) mit Ausnahme von *focB* deletiert. Anschließend wurde das *cat*-Gen aus dem entstandenen *E. coli* Stamm DSM 6601 Δ *foc*::*cat* eliminiert. Die auf dem Helferplasmid pCP20 kodierte FLP-Rekombinase erkennt die FRT-Sequenzen und schneidet das *cat*-Gen aus, jedoch verbleibt ein 85 bp großes DNA-Fragment mit einer FLP-Erkennungssequenz (FRT) im Chromosom (Abb. 21). Die resultierende F1C-Fimbriendeletionsmutante des *E. coli* Stammes DSM 6601 erhielt die Bezeichnung DSM 6601 Δ *foc*.

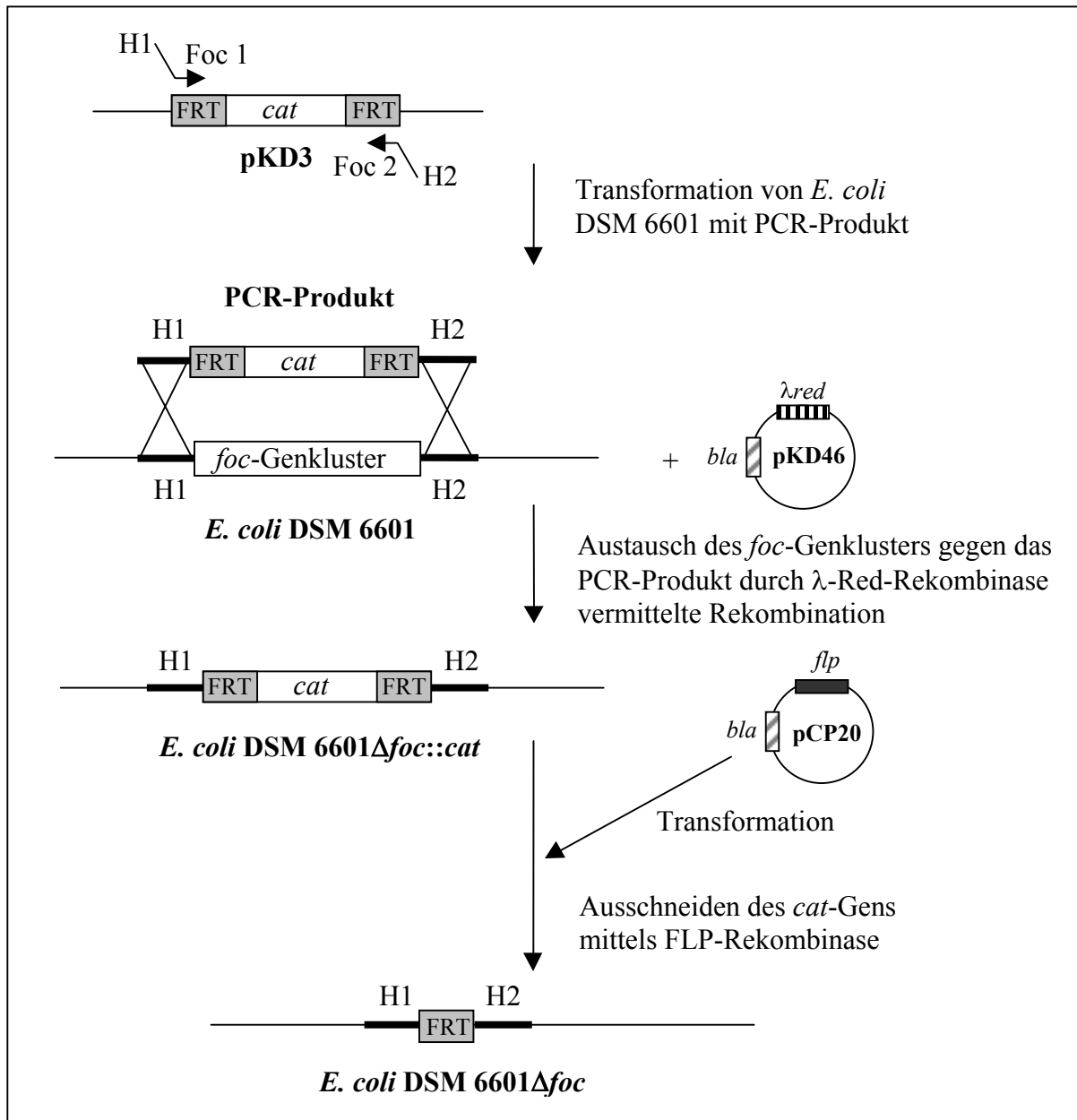


Abb. 21: Schematische Darstellung der Deletion des *foc*-Genklusters. Die Strategie ist im Text detailliert erklärt (H1, H2: Sequenzhomologie der Primer zu den Randbereichen der Zielgene).

Für die Herstellung einer Typ 1-Fimbriendeletionsmutante und einer Typ 1- und F1C-Fimbriendoppelmutante des *E. coli* Stammes DSM 6601 wurde mit den Primern Fim 1 und Fim 2 ein 1124 bp DNA-Fragment aus dem Plasmid pKD3 amplifiziert. Dieses DNA-Fragment enthält ein Chloramphenicol-Resistenzgen (*cat*), das von FLP-Erkennungssequenzen flankiert wird, und die von den Primern gelieferten homologen Sequenzen zu den Randbereichen des *fim*-Genklusters. So besitzt der Primer Fim 1 eine 55 Nukleotide lange homologe Sequenz zu dem 5'-"upstream"-Bereich von *fimB* und der Primer Fim 2 einen ebenfalls 55 Nukleotide großen homologen Bereich zu der 3'-"downstream"-Region von *fimH* (Abb. 22).

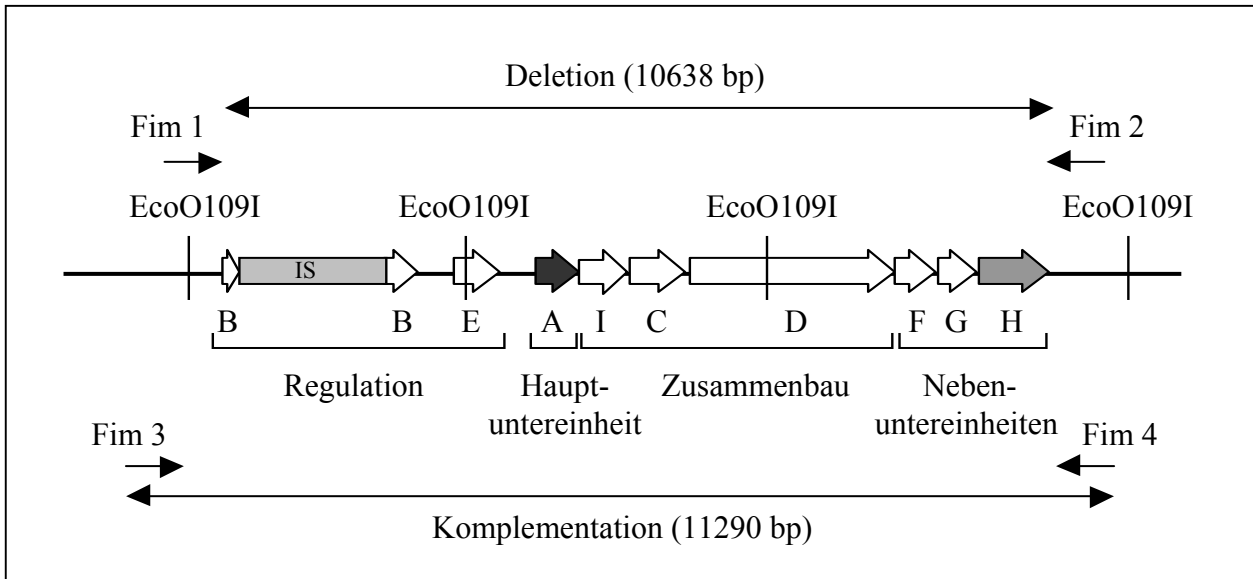


Abb. 22: Graphische Darstellung der genetischen Organisation der Typ 1-Fimbriendeterminante (*fim*) aus *E. coli* DSM 6601. Die Funktion der einzelnen Gene ist angegeben. Die Hauptuntereinheit und das eigentliche Adhäsin sind hervorgehoben. Bindungsstellen der für die Deletion und Komplementation verwendeten Primer sind eingezeichnet.

Die Deletion des *fim*-Genklusters erfolgte analog zu der eben beschriebenen Deletion des *foc*-Genklusters. Hierzu wurden die *E. coli* Stämme DSM 6601 und DSM 6601 Δ *foc* als Ausgangsstämme verwendet. Die entstandene Typ 1-Fimbriendeletionsmutante erhielt die Bezeichnung DSM 6601 Δ *fim*, die Typ 1- und F1C-Fimbriendoppelmutante wurde DSM 6601 Δ *foc/fim* genannt. Die Fimbriendeletionsmutanten wurden mit Hilfe einer “Southern Blot”-Analyse überprüft (Abb. 23).

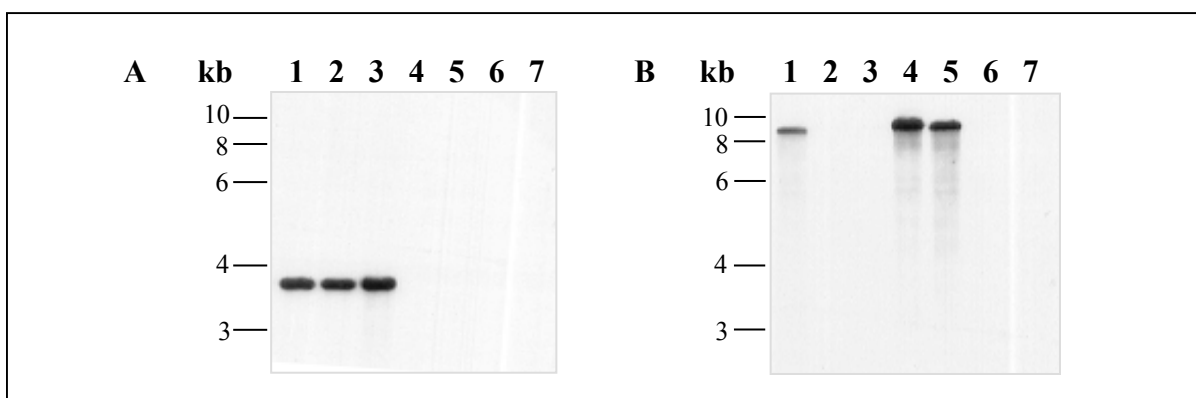


Abb. 23: “Southern Blot”-Analysen von *EcoO109I* (A) und *EcoRV* (B) gespalteener chromosomaler DNA des *E. coli* Stammes DSM 6601 und seiner Fimbriendeletionsmutanten.

(1) DSM 6601, (2) DSM 6601 Δ *foc::cat*, (3) DSM 6601 Δ *foc*, (4) DSM 6601 Δ *fim::cat*, (5) DSM 6601 Δ *fim*, (6) DSM 6601 Δ *foc/fim::cat*, (7) DSM 6601 Δ *foc/fim*. Für die Hybridisierung wurden folgende Sonden eingesetzt: 253 bp *fimA*-spezifische Sonde (PCR-Produkt, Muta 1/2) (A), 441 bp *focA*-spezifische Sonde (PCR-Produkt, Muta 3/4) (B).

5.4.1.2 Komplementation der Fimbriendeletionsmutanten

Um die Deletion der F1C- und Typ 1-Fimbriendeterminanten in dem Stamm DSM 6601 Δ *foc/fim* wieder zu komplementieren, wurden die Plasmide pGEM-Typ1 und pACYC184-F1C hergestellt.

Zur Herstellung des Plasmids pACYC184-F1C wurde ein 9139 bp großes DNA-Fragment, welches das *foc*-Gencluster enthält, mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* aus dem Cosmid pCos3YE4 geschnitten und in die dephosphorylierte *EcoRV*-Restriktionsschnittstelle des Vektors pACYC184 ligiert. Anschließend wurde die F1C-Fimbriendeletionsmutante DSM 6601 Δ *foc* mit diesem Plasmid transformiert.

Der Nachweis einer Expression der F1C-Fimbrien erfolgte durch Serumagglutination mit polyklonalem Kaninchen-Antiserum gegen F1C-Fimbrien (α -F1C, 1:100 verdünnt). Während die Bakterienzellen des Stammes DH5 α (pACYC184-F1C) deutlich agglutinierten, konnte für die Komplementante DSM 6601 Δ *foc*(pACYC184-F1C) kein eindeutiges Ergebnis erhalten werden. Daher wurde eine "Western Blot"-Analyse mit isolierten Fimbrien durchgeführt (Abb. 24).

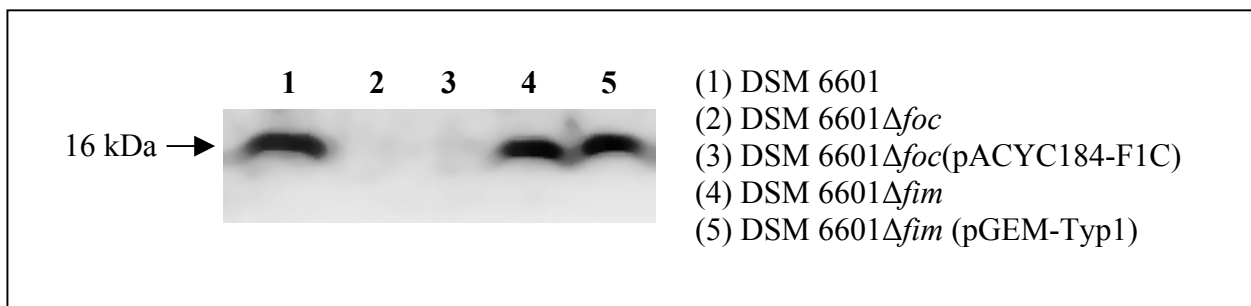


Abb. 24: "Western Blot"-Analyse der F1C-Fimbriendeletionsmutante und der Komplementante des Stammes DSM 6601 Δ *foc* mit einem FocA-spezifischen polyklonalem Kaninchen-Antiserum (α -F1C, 1:1000 verdünnt).

Mit dem verwendeten Antiserum konnte das 16 kDa-Protein FocA bei der F1C-Fimbriendeletionsmutante DSM 6601 Δ *foc* und der Komplementante DSM 6601 Δ *foc*(pACYC184-F1C) nicht nachgewiesen werden. Dieses Resultat zeigt, dass durch das Komplementationsplasmid pACYC184-F1C die Expression der F1C-Fimbrien in dem *E. coli* Stamm DSM 6601 Δ *foc* nicht wiederhergestellt werden konnte.

Zur Herstellung des Plasmids pGEM-Typ1 wurde durch “long distance”-PCR mit der Primerkombination Fim 3/4 das komplette *fim*-Genkluster amplifiziert und als 11290 bp großes PCR-Fragment in den Vektor pGEM[®]-T Easy kloniert. Das so erhaltene Plasmid wurde für die Komplementation der Typ 1-Fimbriendeletion des Stammes DSM 6601 Δ *fim* eingesetzt.

Der Nachweis der Typ 1-Fimbrien erfolgte durch Mannose-sensitive Hefeagglutination. Auch hier zeigte sich, dass die Expression von Typ 1-Fimbrien in dem rekombinanten *E. coli* Stamm DSM 6601 Δ *fim*(pGEM-Typ1) nicht nachgewiesen werden konnte, während mit Bakterienzellen des Stammes AAEC189(pGEM-Typ1) ein positives Ergebnis erhalten wurde.

Weitere Untersuchungen der mit den Plasmiden pACYC184-F1C und pGEM-Typ1 komplementierten DSM 6601-Fimbriendeletionsmutanten haben gezeigt, dass die Gene *focA* bzw. *fimA* in “Southern Blot”-Analysen mit spezifischen Sonden gegen diese Gene nicht detektiert werden konnten, obwohl die transformierten Stämme die dem jeweiligen Plasmid entsprechende Resistenz aufwiesen. Auch mit den für *fimA* bzw. *focA* spezifischen PCR-Reaktionen (Primer Muta 1/2 bzw. Muta 3/4) konnten die entsprechenden Gene in den rekombinanten *E. coli* Stämmen DSM 6601 Δ *fim*(pGEM-Typ1) und DSM 6601 Δ *foc*(pACYC184-F1C) nicht nachgewiesen werden, während mit DH5 α oder AAEC189 als Stammhintergrund ein positives Ergebnis erhalten wurde. Ebenso unterschieden sich die Restriktionsmuster der aus den komplementierten Stämmen reisolierten Plasmide von dem der ursprünglich transformierten Plasmide (Daten nicht gezeigt). Hieraus lässt sich folgern, dass die auf den Klonierungsvektoren pACYC184 und pGEM[®]-T Easy basierenden Plasmide nicht stabil in dem *E. coli* Stamm DSM 6601 beibehalten werden können.

5.4.1.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Um Unterschiede in der Expression von Typ 1- und F1C-Fimbrien in dem wildtypischen *E. coli* Stamm DSM 6601 und der Fimbriendeletionsmutante DSM 6601 Δ *foc/fim* nachzuweisen, wurden transelektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Die Bakterien wurden ohne Fixierung mit wässriger Uranylacetat-Lösung negativ kontrastiert und im Elektronenmikroskop betrachtet.

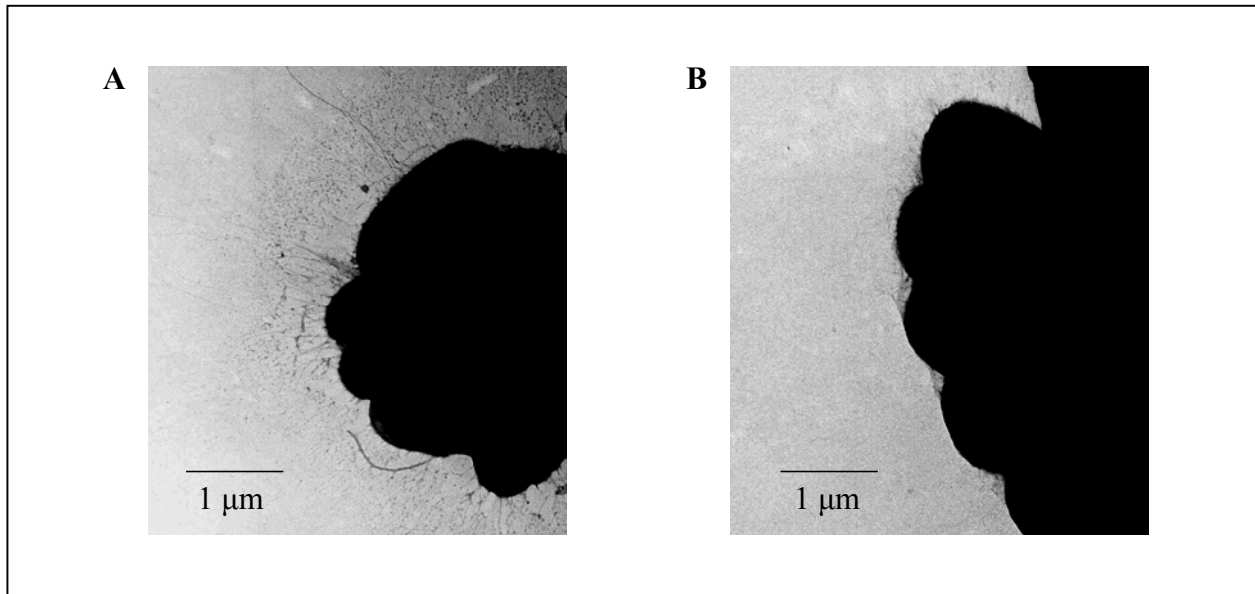


Abb. 25: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der *E. coli* Stämme DSM 6601 (A) und DSM 6601 Δ *foc/fim* (B). Die Bakterien wurden mit Uranylacetat kontrastiert. Als Größenmaßstab ist ein schwarzer Balken eingezeichnet.

Auf der elektronenmikroskopischen Aufnahme (Abb. 25) des Wildstammes *E. coli* DSM 6601 sind deutlich mehr Fimbrien als bei der Fimbriendeletionsmutante DSM 6601 Δ *foc/fim* zu erkennen, die als haarförmige Strukturen die Bakterienzellen umgeben. Auf der Aufnahme der Fimbriendeletionsmutante DSM 6601 Δ *foc/fim* sind ebenso Fimbrienstrukturen zu sehen, jedoch in geringerem Ausmaß. Dies ist darauf zurückzuführen, dass *E. coli* DSM 6601 neben Typ 1- und F1C-Fimbrien auch Curli-Fimbrien exprimiert.

5.4.1.4 Einfluss der Fimbrien auf die Adhärenz an INT407-Zellen

Um zu untersuchen, ob F1C- und Typ 1-Fimbrien an der Adhärenz des *E. coli* Stammes DSM 6601 an die humane embryonale intestinale Zelllinie INT407 beteiligt sind, wurden Adhäsionsassays mit einer Inkubationsdauer von 2 Stunden durchgeführt.

Zunächst wurde mittels Serumagglutination (F1C-Fimbrien, α -F1C, 1:100 verdünnt) und Hefeagglutination (Typ 1-Fimbrien, siehe 4.28.3) überprüft, ob der wildtypische *E. coli* Stamm DSM 6601 unter den für diesen Versuch verwendeten Anzuchtbedingungen in Zellkulturmedium diese Fimbrien exprimiert. Hierbei zeigte sich, dass eine Expression von Typ 1-Fimbrien nicht nachweisbar war, während F1C-Fimbrien exprimiert wurden.

Bei den Adhäsionsassays konnte kein Unterschied in der Adhärenz zwischen dem *E. coli* Wildtypstamm DSM 6601 und der isogenen Fimbriendeletionsmutante DSM 6601 Δ *foc/fim* fest-

gestellt werden. Jedoch konnte bei beiden getesteten Stämmen nur eine geringe Anzahl adhärenter Bakterien beobachtet werden, was auf die fehlende Expression der Typ 1-Fimbrien unter den verwendeten Anzuchtbedingungen in Zellkulturmedium zurückgeführt werden könnte (Abb. 26). Mit diesem Ergebnis konnte gezeigt werden, dass die Adhärenz des *E. coli* Stammes DSM 6601 an INT407-Zellen nicht durch F1C-Fimbrien vermittelt wird.

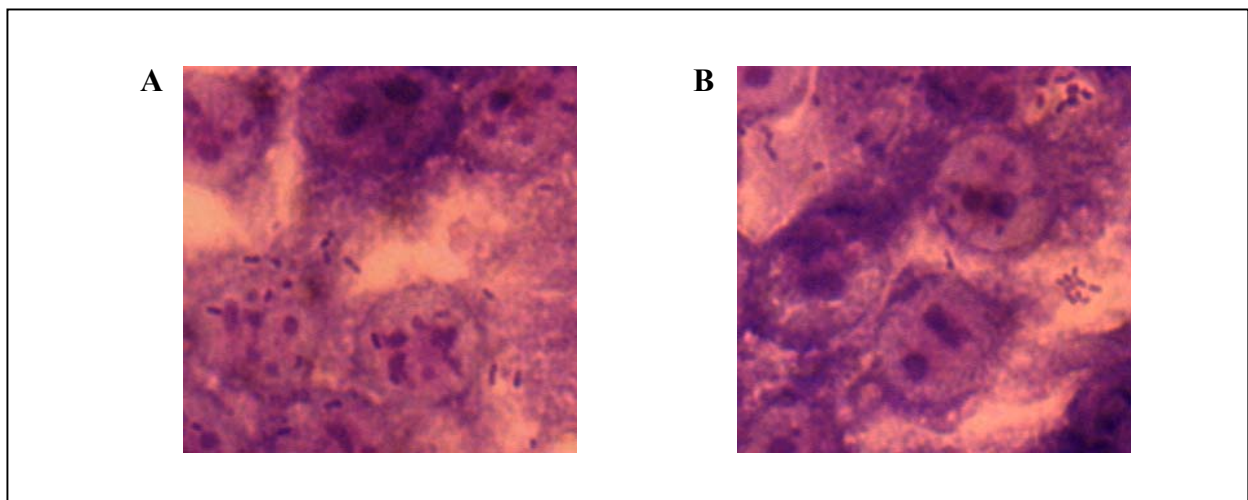


Abb. 26: Mikroskopische Aufnahmen der Adhärenz des *E. coli* Stammes DSM 6601 (A) und der isogenen Fimbriendeletionsmutante DSM 6601 Δ foc/fim (B) an humane embryonale intestinale INT407-Zellen.

5.4.1.5 Bedeutung der Fimbrien für den inhibitorischen Effekt von *E. coli* DSM 6601 auf die Invasivität von Salmonellen

Obwohl die Ergebnisse der Adhärenzuntersuchungen zeigten, dass die F1C-Fimbrien bei der Adhärenz an INT407-Zellen keine Rolle spielen, wurde getestet, ob dennoch eine Beziehung zwischen der Expression von F1C- sowie Typ 1-Fimbrien und dem inhibitorischen Effekt von *E. coli* DSM 6601 auf die Invasivität von Salmonellen zu beobachten ist. Daher wurden Koinfektions-Invasionsassays mit dem invasiven *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Stamm SL1344 und dem *E. coli* Stamm DSM 6601 sowie den isogenen Fimbriendeletionsmutanten durchgeführt.

Zunächst wurde ebenfalls überprüft, ob die *E. coli* Stämme unter den für diesen Versuch verwendeten Anzuchtbedingungen in Zellkulturmedium Typ 1- und F1C-Fimbrien exprimieren (siehe 5.4.1.4). Hierbei zeigte sich ebenso, dass eine Expression von Typ 1-Fimbrien nicht nachweisbar war, während F1C-Fimbrien exprimiert wurden.

Die Resultate des Koinfektions-Invasionsassays sind in Abb. 27 dargestellt. Die Fimbrien-deletionsmutanten des *E. coli* Stammes DSM 6601 reduzieren die Invasivität von *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Stamm SL1344 ebenso wie der Wildtyp. Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden ($p = 0,4-0,9$). Hierdurch konnte gezeigt werden, dass weder die Typ 1-Fimbrien noch die F1C-Fimbrien eine Bedeutung für den inhibitorischen Effekt des *E. coli* Stammes DSM 6601 auf die Invasivität von Salmonellen haben.

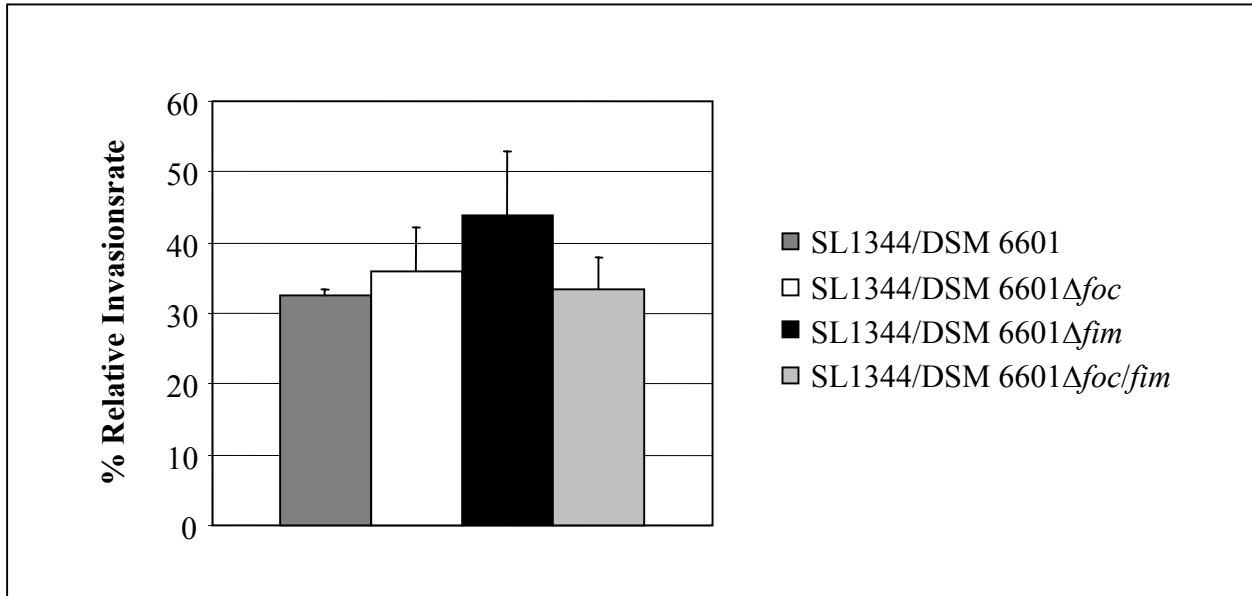


Abb. 27: Vergleich der relativen Invasionsraten von *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Stamm SL1344 in Anwesenheit von *E. coli* DSM 6601 und den verschiedenen Fimbrien-deletionsmutanten. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichungen von drei Koinfektions-Invasionsassays.

5.4.2 Untersuchungen zur inhibitorischen Wirkung des *E. coli* Stammes DSM 6601 *in vivo*

Sowohl die Vermehrung von *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium als auch die Kolonisierung gnotobiotischer Ferkel kann durch den probiotischen *E. coli* Stamm DSM 6601 inhibiert werden (Schulze *et al.*, 1992).

Um festzustellen, ob diese inhibitorischen Effekte auch bei konventionellen Tieren, die eine normale Darmflora besitzen, nachzuweisen sind und durch den probiotischen *E. coli* Stamm DSM 6601 daher ein Schutz vor einer Salmonellen-Infektion erreicht werden kann, wurden Schutzexperimente in konventionellen Balb/c-Mäusen durchgeführt (siehe 4.38.1).

Diese Versuche wurden im Labor von Prof. Dr. L. Emödy (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie, Universität Pécs, Ungarn) durchgeführt.

Eine Gruppe der Mäuse erhielt nur den *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Stamm SL1344 (Positivkontrolle), während den anderen Gruppen zusätzlich zu dem *Salmonella* Stamm entweder der wildtypische *E. coli* Stamm DSM 6601, die plasmidfreie isogene Variante DSM 6601 Δ pMUT1/2, die F1C- und Typ 1-Fimbriendoppelmutante DSM 6601 Δ foc/fim oder der *E. coli* Stamm PZ915 (Negativkontrolle) verabreicht wurde.

Durch die verwendeten *E. coli* Stämme konnten die Mäuse jedoch nicht effizient kolonisiert werden. Die Anzahl der Bakterien der einzelnen *E. coli* Stämme in den Fäzes lag zwischen 10^5 und 10^{10} Bakterien pro Gramm Fäzes, wobei im Stuhl von wenigen Mäusen die *E. coli* Stämme trotz täglicher Verabreichung nicht permanent nachgewiesen werden konnten. Des Weiteren konnte keine inhibitorische Wirkung auf die Vermehrung des *Salmonella* Stammes und die Kolonisierung der Mäuse festgestellt werden. Die Anzahl lebender Bakterien des *Salmonella* Stammes in den Fäzes bei den einzelnen Gruppen, die entweder nur mit dem *Salmonella* Stamm alleine oder in Kombination mit den verschiedenen *E. coli* Stämmen behandelt wurden, wies keinen signifikanten Unterschied auf. Durch die Applikation des *E. coli* Stammes DSM 6601 und seiner verschiedenen Derivate DSM 6601 Δ pMUT1/2 und DSM 6601 Δ foc/fim konnte somit kein Schutz vor einer Infektion durch den *Salmonella* Stamm erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassung der Ergebnisse des Abschnitts 5.4:

- Die Typ 1-Fimbriendeterminante (*fim*) sowie die F1C-Fimbriendeterminante (*foc*) wurde in dem Stamm *E. coli* DSM 6601 deletiert.
- Die Komplementation der Fimbriendeletionsmutanten des Stammes DSM 6601 mit den Plasmiden pGEM-Typ1 und pACYC184-F1C war nicht möglich. Die Komplementationsplasmide wurden nicht stabil in diesem Stamm beibehalten.
- Die Expression von F1C-Fimbrien beeinflusst nicht die Adhärenz von *E. coli* DSM 6601 an die humane embryonale intestinale Zelllinie INT407.
- Typ 1- und F1C-Fimbrien haben keine Bedeutung für den inhibitorischen Effekt von *E. coli* DSM 6601 auf die Invasivität von Salmonellen.
- Konventionelle Mäuse konnten nicht effizient mit den *E. coli* Stämmen DSM 6601, DSM 6601 Δ pMUT1/2, DSM 6601 Δ *foc/fim* und PZ915 kolonisiert werden.
- Sowohl eine Inhibierung der Kolonisierung und der Vermehrung von Salmonellen als auch ein Schutz vor einer *Salmonella*-Infektion konnte durch die Applikation des *E. coli* Stammes DSM 6601 und seiner Derivate DSM 6601 Δ pMUT1/2 und DSM 6601 Δ *foc/fim* in konventionellen Mäusen nicht erreicht werden.

6 Diskussion

Der apathogene *E. coli* Stamm DSM 6601 (*E. coli* Nissle 1917) kann als Modellorganismus für die Verwendung eines kommensalen Gram-negativen Bakterienstammes als Probiotikum betrachtet werden. Der *E. coli* Stamm DSM 6601 wurde in den vergangenen Jahren intensiv erforscht und seine phänotypischen und genotypischen Eigenschaften sind daher gut charakterisiert. Der probiotische Charakter dieses Bakterienstammes wird auf gute Kolonisierungseigenschaften des menschlichen Darms, immunmodulatorische Effekte und antagonistische Wirkungen zurückgeführt. Dieser Stamm bildet die Grundlage für das Medikament Mutaflor[®], das bei der Behandlung von verschiedenen gastrointestinalen Erkrankungen eingesetzt wird und dessen therapeutische Wirksamkeit durch anerkannte klinische Studien inzwischen wissenschaftlich bewiesen ist (siehe Einleitung 2.4). Auf Grund der langjährigen Erfahrungen, der biologischen Sicherheit und der probiotischen Eigenschaften eignet sich dieser Stamm als Modellstamm für die Entwicklung eines oral applizierbaren Lebendvektors, der für mukosale Immunisierungen oder die zielgerichtete Lieferung von therapeutischen Molekülen in den Darm eingesetzt werden könnte.

6.1 Entwicklung von stabilen Klonierungsvektoren für den probiotischen *E. coli* Stamm DSM 6601

Seit einigen Jahren wird mit großem Einsatz daran gearbeitet, oral applizierbare bakterielle Lebendvakzine auf der Basis von kommensalen und probiotischen Bakterien zu entwickeln, die zur aktiven oder passiven Immunisierung, aber auch zur Induktion von oraler Toleranz sowie zur Übertragung von therapeutischen Molekülen verwendet werden können.

Für die Expression von heterologen Proteinen in Bakterien werden üblicherweise Klonierungsvektoren verwendet, die Antibiotika-Resistenzgene besitzen, um die stabile Beibehaltung eines Plasmids während des Bakterienwachstums zu gewährleisten und eine Selektion von rekombinanten Bakterienstämmen zu ermöglichen (Dunstan *et al.*, 2003). Jedoch wird die Verwendung von plasmidkodierten Antibiotika-Resistenzmarkern für die Selektion und Beibehaltung von rekombinanten Plasmiden in Hybrid-Vakzinstämmen von Regulierungsbehörden wie z. B. der "U. S. Food and Drug Administration" nicht zugelassen, da die meisten dieser zur Selektion verwendeten Antibiotika im klinischen Gebrauch sind und der Einsatz von Antibiotika-resistenten Organismen die Ausbreitung von Resistenzen fördern kann. Dadurch wird die

Auswahl an Antibiotika, die für die Behandlung von Infektionen zur Verfügung stehen, eingeschränkt (Morona *et al.*, 1991). Aus diesem Grund müssen für die stabile Expression von heterologen Proteinen in Lebendvakzinstämmen alternative Möglichkeiten genutzt werden, die nicht auf der Selektion durch Antibiotika beruhen.

Die Integration von Genen in das Chromosom des bakteriellen Lebendvektors ist eine mögliche Lösung, um das Problem der Antigenexpression von rekombinanten Plasmiden aus, die für die Beibehaltung Antibiotika-Selektion erfordern, zu umgehen. Im Vergleich zur Expression einzelner Kopien des Gens im Chromosom der Bakterien werden jedoch stärkere Immunantworten gegen heterologe Proteine induziert, wenn diese von "multicopy"-Plasmiden aus exprimiert werden (McNeill *et al.*, 2000; Garmory *et al.*, 2003; Kotton & Hohmann, 2004).

Eine Möglichkeit für die stabile Expression von heterologen Proteinen, für die keine Selektion durch Antibiotika notwendig ist, bietet die Verwendung von letal-balancierten Plasmid-Stabilisationssystemen. Diese Systeme beruhen meistens auf Plasmiden, die ein Gen besitzen, durch das die Deletion eines essentiellen Stoffwechselfgens im Chromosom des bakteriellen Lebendvektors komplementiert wird. In diese Plasmide können für heterologe Proteine kodierende Gene inseriert werden. Da der Verlust des Plasmids für den Trägerstamm letal ist, können nur Bakterien überleben, die dieses rekombinante Plasmid besitzen (Garmory *et al.*, 2003; Kotton & Hohmann, 2004). Letal-balancierte Plasmid-Stabilisationssysteme wurden bereits für verschiedene Bakterienstämme wie z. B. *Salmonella* spp. (Galán *et al.*, 1990; Morona *et al.*, 1991), *Listeria monocytogenes* (Verch *et al.*, 2004) und *Vibrio cholerae* (Ryan *et al.*, 2000) entwickelt.

Eine weitere Möglichkeit für die Konstruktion von stabilen Vektoren besteht darin, die Replikons von kleinen kryptischen Plasmiden zu verwenden und Selektionsmarker zu integrieren (Shareck *et al.*, 2004). Kleine kryptische Plasmide tragen nur wenig genetische Information und werden nur auf Grund ihrer Replikationsfähigkeit und Stabilität in hohen Kopienzahlen beibehalten, ohne detektierbaren Nutzen für den Wirtsorganismus (Burian *et al.*, 1997). Zahlreiche kryptische Plasmide wurden aus verschiedenen Bakterienstämmen isoliert, charakterisiert und für die Herstellung von Klonierungsvektoren verwendet. Stabile Klonierungsvektoren wurden beispielsweise auf der Basis von kryptischen Plasmiden aus *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus* spp., *Streptococcus thermophilus* (Pavlova *et al.*, 2002; Shareck *et al.*, 2004), *Corynebacterium callunae* (Venkova-Canova *et al.*, 2004), *Enterococcus faecium* (Wyckoff *et al.*, 1996) und *Propionibacterium acidipropionici* (Kiatpapan *et al.*, 2000) entwickelt, die für die Klonierung und Expression von heterologen Genen eingesetzt werden können.

Der in dieser Arbeit verwendete *E. coli* Stamm DSM 6601 besitzt zwei kleine kryptische “high-copy”-Plasmide, pMUT1 und pMUT2, die sehr stabil in diesem Stamm beibehalten werden. Die Stabilität der Plasmide wurde durch Subkultivierung (1 x/Woche) des Stammes DSM 6601 auf Agarplatten über einen Zeitraum von 28 Monaten hinweg gezeigt. Das Plasmidprofil des Stammes blieb in diesem Zeitraum stabil (Hawkey & Snelling, 1998). Auf Grund dieser Stabilität könnten sich diese Plasmide als Basis für die Entwicklung von Klonierungsvektoren für die Expression von heterologen Genen in diesem Stamm eignen, ohne dass ein Selektionsdruck von Außen notwendig ist.

Ein Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines stabilen Klonierungssystems auf Basis der beiden kryptischen Plasmide pMUT1 und pMUT2 für die Expression von heterologen Proteinen in dem probiotischen *E. coli* Stamm DSM 6601, um diesen Stamm als Lebendvakzinvektor einsetzen zu können.

Daher wurden zunächst die Sequenzdaten der beiden kryptischen Plasmide pMUT1 und pMUT2, deren DNA-Sequenzen bereits bestimmt wurden und unter den GenBank-Nummern A84793 (pMUT1) und A95448 (pMUT2) veröffentlicht sind, überprüft und verifiziert. Durch Analysen der DNA-Sequenzen und der abgeleiteten Aminosäuresequenzen sollten anschließend nähere Informationen über die Replikationsmechanismen, Stabilität und eventuell kodierte Funktionen dieser Plasmide erlangt werden sowie geeignete Restriktionsschnittstellen für die Integration von Fremd-DNA gefunden werden.

Durch die Analyse der DNA-Sequenz und der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des Plasmids pMUT1 (3173 bp) konnte ein Replikationssystem (*oriV*, Rom), eine Plasmid-Stabilisierungsregion (*cer*) und ein Mobilisierungslokus (*oriT*, MobA) identifiziert werden. Vier weiteren ermittelten ORFs konnten keine Funktionen zugeordnet werden, jedoch bestehen Homologien zu anderen hypothetischen Proteinen (siehe Abb. 4 und Tab. 8).

Die Homologie zu dem Rom-Protein (58 % Identität) sowie zu dem vegetativen Replikationsursprung (*oriV*, 93 % Identität) des Plasmids ColE1 lässt vermuten, dass das Plasmid pMUT1 ein Replikationssystem vom ColE1-Typ besitzt. Jedoch unterscheiden sich die Sequenzen der Plasmide pMUT1 und ColE1 in dem Bereich, der das Plasmid-Replikationskontrollsystem, bestehend aus RNA I und RNA II, umfasst. Die Replikation des Plasmids ColE1 erfolgt nach dem Theta-Mechanismus (Del Solar *et al.*, 1998). Plasmide, die nach diesem Mechanismus replizieren, bilden während der Replikation keine einzelsträngigen Intermediate und weisen eine hohe Struktur- und Segregationsstabilität auf. Außerdem können diese Plasmide große heterologe

DNA-Inserts stabil beibehalten und sind daher für die Konstruktion von Klonierungsvektoren geeignet (Shareck *et al.*, 2004).

Die beschriebene Stabilität des Plasmids pMUT1 kann zudem auf die Anwesenheit einer DNA-Sequenz (*cer*) in diesem Plasmid zurückgeführt werden, die Ähnlichkeit (64 % Identität) zu der “ColE1 resolution”-Sequenz (*cer*) des Plasmids ColE1 aufweist. Alle funktionell wichtigen Merkmale von *cer* konnten in der Sequenz des Plasmids pMUT1 identifiziert werden. ColE1- und ColE1-ähnliche Plasmide werden bei der Zellteilung zufällig auf die Tochterzellen verteilt. Zellen, die Plasmid-Multimere enthalten, segregieren plasmidfreie Zellen, da Multimere in einer niedrigeren Kopienzahl als Monomere in Bakterienzellen beibehalten werden (Summers & Sherratt, 1984). Plasmid-Multimere, die durch homologe Rekombinationsereignisse entstehen, werden in ColE1-Plasmiden durch eine sequenzspezifische Rekombination innerhalb der *cer*-Region effizient zu Monomeren umgewandelt. Diese Rekombinationsreaktion wird durch mehrere *trans*-wirkende Faktoren vermittelt, die auf dem Chromosom des Wirtsbakteriums kodiert sind (Zakova & Szatmari, 1995).

Die hohe Homologie zu dem Transfer-Replikationsursprung (*oriT*, 92 % Identität) und zu dem Mobilisierungsprotein MobA (99 % Identität) des Plasmids NTP16 deutet darauf hin, dass das Plasmid pMUT1 ein funktionelles Mobilisierungssystem besitzt und ebenso wie das nicht-konjugative Plasmid NTP16 durch Interaktion mit Konjugationssystemen von verschiedenen konjugativen Plasmiden mobilisierbar ist (Cannon & Strike, 1992). Die Funktionalität des Mobilisierungssystems des Plasmids pMUT1 wurde jedoch nicht überprüft, da das Vorkommen der fast identischen Plasmide (98 % Identität) pCRP3 in *Citrobacter rodentium* Stamm DBS100 und p9705 in *Escherichia coli* O157:H7 Stamm 9705 vermuten lässt, dass ein Gentransfer zwischen *E. coli* und *Citrobacter rodentium* stattgefunden hat, woraus gefolgert wird, dass dieser Mobilisierungsloкус funktionell ist.

Die signifikanten Ähnlichkeiten des Plasmids pMUT1 zu dem “low molecular weight” Plasmid I aus *Salmonella enteritidis* (95 % Identität), zu dem Plasmid NTP16 aus *Salmonella typhimurium* (94 % Identität) sowie zu den Plasmiden p4821 aus *Escherichia coli* O157:H7 Stamm 4821 und pOSAK1 aus *Escherichia coli* O157:H7 Stamm RIMD 0509952 (93 % Identität) in einem Bereich, der den größten Teil des Replikationssystems, das Mobilisierungssystem und teilweise die Stabilitätsregion *cer* umfasst, deuten darauf hin, dass diese Plasmide wahrscheinlich aus einem gemeinsamen Ursprungsplasmid durch Insertion und bzw. oder Deletion von heterologen DNA-Sequenzen entstanden sind. Diese Vermutung wird auch durch die Analyse des G+C-Gehalts des Plasmids pMUT1 unterstützt, die zeigt, dass der G+C-Gehalt in diesen homologen

Bereichen bei 52,1 % liegt, während die restliche DNA-Sequenz einen wesentlich niedrigeren G+C-Gehalt von 41,5 % aufweist.

Durch die Analyse der DNA-Sequenz und der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des Plasmids pMUT2 (5520 bp) konnte ein Replikationssystem (*oriV*, Rep) und ein Mobilisierungssystem (*oriT*, MobABCD) identifiziert werden. Zwei weiteren ermittelten ORFs konnten keine Funktionen zugeordnet werden und es bestehen auch keine Homologien zu bekannten Proteinen (siehe Abb. 6 und Tab. 9). Außerdem konnten keine Regionen gefunden werden, die für die Stabilität des Plasmids eine Rolle spielen könnten.

Die Homologie zu verschiedenen Rep-Proteinen (58 % und 63 % Identität) sowie zu vegetativen Replikationsursprüngen (*oriV*, 95 % Identität) von ColE2-verwandten Plasmiden lässt vermuten, dass das Plasmid pMUT2 ein Replikationssystem vom ColE2-Typ besitzt. ColE2-Plasmide replizieren ebenso wie ColE1-Plasmide nach dem Theta-Mechanismus (Del Solar *et al.*, 1998) und sind daher ebenfalls für die Konstruktion von stabilen Vektoren geeignet (Shareck *et al.*, 2004).

Die Ähnlichkeit zu dem Transfer-Replikationsursprung (*oriT*, 64 % Identität) und zu den Mobilisierungsproteinen MobA (41 % Identität), MobB (27 % Identität), MobC (47 % Identität) und MobD (45 % Identität) des Plasmids ColE1 deutet darauf hin, dass das Plasmid pMUT2 ebenfalls ein Mobilisierungssystem besitzt. Die *mob*-Gene bilden wie in dem Plasmid ColE1 ein Operon, *mobCABD*, und überlappen einander (Boyd *et al.*, 1989). Auf Grund der geringen Homologien konnte jedoch keine Erkenntnis über die Funktionalität dieses Mobilisierungssystems erlangt werden. Daher wurden Konjugationsexperimente durchgeführt, um die Funktionalität zu überprüfen. Da das Plasmid pMUT2 jedoch keine eigenen *tra*-Gene beinhaltet, die für die Ausbildung eines Pilus und andere konjugationsspezifische Funktionen verantwortlich sind, kann eine Übertragung des Plasmids pMUT2 nur mittels eines konjugativen Helferplasmids erfolgen. Aus diesem Grund wurde bei den Untersuchungen das *IncP*-Helferplasmid RP4 verwendet, von dem bekannt ist, dass es ColE1-Plasmide mobilisiert (Pansegrau *et al.*, 1994; Cabezón *et al.*, 1997). In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass das Plasmid pMUT2 durch das Helferplasmid RP4 mobilisiert werden kann und somit ein funktionelles Mobilisierungssystem kodiert.

Die Analyse des G+C-Gehalts des Plasmids pMUT2 ergab, dass dieses Plasmid zwischen Position 1939 und 3736 eine 1798 bp große AT-reiche Sequenz mit einem G+C-Gehalt von 34,4 % enthält, während die restliche DNA-Sequenz einen G+C-Gehalt von 51,5 % aufweist.

Die Homologiesuche auf DNA-Ebene zeigte, dass das Plasmid pMUT2 über eine Distanz von 3529 bp nahezu identisch (97 % Identität) mit dem ColE2-ähnlichen kryptischen Plasmid pUB6060 aus *Plesiomonas shigelloides* Isolat 11184 ist. Die Identität umfasst einen Bereich, der in beiden Plasmiden den Transfer-Replikationsursprung, die *mob*-Gene und ein *rep*-Gen enthält. In dem Plasmid pUB6060 ist ebenso wie in pMUT2 nach dem *rep*-Gen eine AT-reiche Sequenz inseriert (Avison *et al.*, 2001). Dies lässt vermuten, dass die Plasmide pMUT2 und pUB6060 durch die Insertion einer unterschiedlichen AT-reichen Sequenz in ein gemeinsames ColE2-ähnliches Ursprungsplasmid entstanden sind.

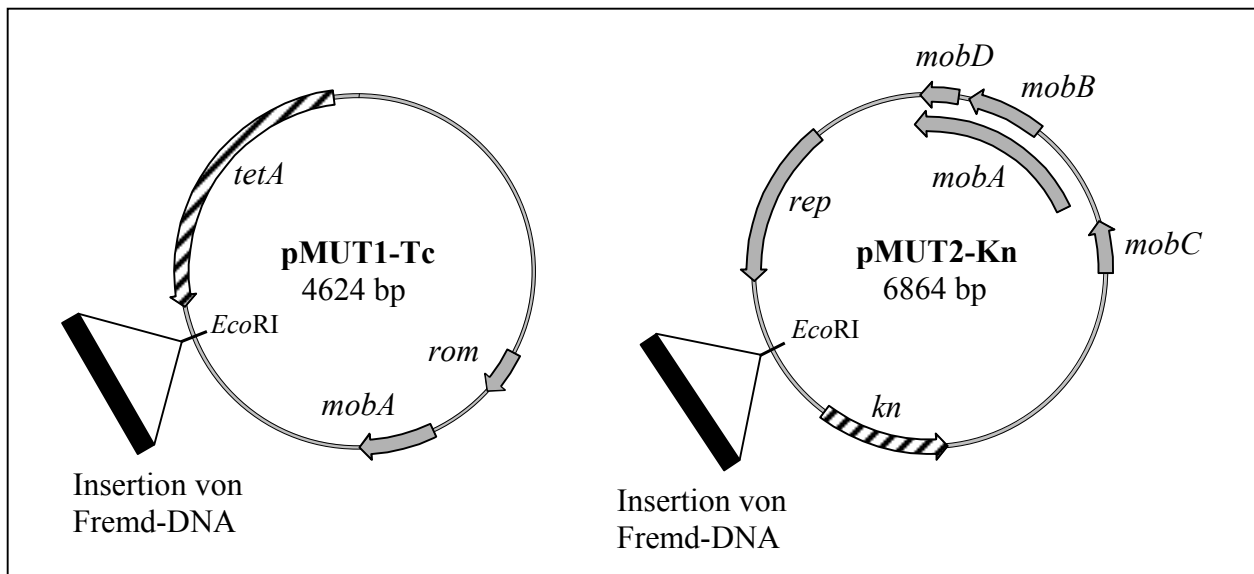


Abb. 28: Graphische Darstellung der Klonierungsvektoren pMUT1-Tc und pMUT2-Kn.

Auf Grund der Ergebnisse der Sequenzanalysen konnten in den Plasmiden pMUT1 und pMUT2 singularär vorkommende Restriktionsschnittstellen identifiziert werden, die nicht in funktionellen ORFs oder anderen funktionellen Regionen dieser Plasmide liegen und somit für die Insertion von heterologen DNA-Sequenzen geeignet sind. Für die Herstellung von Klonierungsvektoren auf der Basis der Plasmide pMUT1 und pMUT2 wurden zunächst Antibiotika-Resistenzkassetten in diese Plasmide eingeführt, um die Selektion von rekombinanten Plasmiden bei der praktischen Arbeit zu erleichtern. Durch Insertion einer Tetrazyklin-Resistenzkassette in die *NdeI*-Restriktionsschnittstelle des Plasmids pMUT1 wurde der Klonierungsvektor pMUT1-Tc hergestellt. Analog wurde durch Insertion einer Kanamycin-Resistenzkassette in die *BglIII*-Restriktionsschnittstelle des Plasmids pMUT2 der Klonierungsvektor pMUT2-Kn generiert. Durch Untersuchungen zur Stabilität dieser Klonierungsvektoren konnte gezeigt werden, dass die Insertion von Fremd-DNA in die verwendeten Restriktionsschnittstellen keinen Einfluss auf die Stabilität

dieser Plasmide hat. Für die Insertion von weiteren DNA-Fragmenten wurde in beiden Klonierungsvektoren eine singular vorkommende *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle ausgewählt (Abb. 28), die bei dem Klonierungsvektor pMUT1-Tc gleichzeitig mit der Insertion der Tetrazyklin-Resistenzkassette eingeführt wurde. Auch für die Verwendung dieser Restriktionsschnittstellen zur Insertion von heterologen DNA-Fragmenten konnte mittels der Plasmide pMUT1-Tc-Red und pMUT2-Kn-Gfp demonstriert werden, dass die Stabilität dieser Plasmide nicht beeinträchtigt wird.

Mittlerweile wurde in die Klonierungsvektoren pMUT1-Tc und pMUT2-Kn eine “multiple cloning site” inseriert, wodurch weitere singular vorkommende Restriktionsschnittstellen für die Insertion von heterologen DNA-Fragmenten zur Verfügung stehen. Darüber hinaus konnte in den Klonierungsvektor pMUT1-Tc eine Hämolyisin-Sekretionsdeterminante integriert werden. Dadurch wird die Sekretion von heterologen Proteinen in rekombinanten Bakterienstämmen ermöglicht (Ums, 2004).

Für die Verwendung als Klonierungsvektoren in einem Lebendvakzin sollten die Plasmide pMUT1-Tc und pMUT2-Kn jedoch in Zukunft modifiziert werden. Da die beiden kryptischen Plasmide pMUT1 und pMUT2 funktionelle Mobilisierungssysteme kodieren, sollten diese Regionen in den Klonierungsvektoren pMUT1-Tc und pMUT2-Kn deletiert werden, um einen möglichen horizontalen Gentransfer von rekombinanten Plasmiden zu verhindern. Zudem sollten die Antibiotika-Resistenzmarker durch andere Selektionsmarker ersetzt werden, da der Einsatz von plasmidkodierten Antibiotika-Resistenzmarkern in einem Lebendvakzin, das für den menschlichen Gebrauch bestimmt ist, nicht zulässig ist. Hierzu könnten Marker wie z. B. ein Herbizid-, Quecksilberionen- oder Cadmium-Resistenzgen verwendet werden, um die Selektion von rekombinanten Stämmen zu ermöglichen (McNeill *et al.*, 2000; Sharek *et al.*, 2004).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Herstellung einer plasmidfreien Variante des probiotischen *E. coli* Stammes DSM 6601, die zum einen als Trägerorganismus für die entwickelten Klonierungsvektoren und zum anderen bei Untersuchungen zu einer möglichen Funktion der kryptischen Plasmide verwendet werden kann. Die plasmidfreie Variante *E. coli* DSM 6601 Δ pMUT1/2 wurde mit Hilfe der Suizidplasmide pMUT1-Tc-Sac und pMUT2-Kn-Sac hergestellt.

Da bei der Analyse der Basensequenzen und der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der beiden Plasmide pMUT1 und pMUT2 des *E. coli* Stammes DSM 6601 keine Erkenntnisse zu deren Funktion erlangt werden konnten, wurde überprüft, ob der Verlust der Plasmide einen Einfluss

auf das Bakterienwachstum und auf weitere bekannte Eigenschaften dieses Stammes wie die Inhibition einer *Salmonella*-Invasion, die Phagenresistenz, die Biofilmbildung und die Serumresistenz hat. Bei diesen Untersuchungen konnte jedoch kein Unterschied zwischen dem plasmidfreien Stamm DSM 6601 Δ pMUT1/2 und dem wildtypischen *E. coli* Stamm DSM 6601 festgestellt werden. Dadurch wird bestätigt, dass es sich bei den Plasmiden pMUT1 und pMUT2 um kryptische Plasmide handelt, die keinen offensichtlichen, nachweisbaren Nutzen für den Wirtsorganismus besitzen.

Von Grozdanov *et al.* (2002) konnte gezeigt werden, dass die Serumsensitivität des *E. coli* Stammes DSM 6601 auf einer Punktmutation im *wzy*-Gen basiert, das für die O6-Antigenpolymerase kodiert. Aus dem nichtfunktionellen *wzy*-Gen resultiert ein semirauer O6-Lipopolysaccharid-Phänotyp, der für die Serumsensitivität verantwortlich ist. Aus diesem Grund können die Plasmide keinen Einfluss auf die Serumresistenz haben.

Inzwischen wurde festgestellt, dass der plasmidfreie Stamm DSM 6601 Δ pMUT1/2 einen Defekt in der Polyketidsynthese aufweist. Dieser Defekt ist jedoch nicht auf die Plasmide zurückzuführen, sondern beruht auf einer Mutation im Chromosom dieses Stammes (S. Homburg, persönliche Mitteilung).

6.2 Etablierung von Nachweissystemen für den *E. coli* Stamm DSM 6601

Der Nachweis eines Bakterienstammes durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) stellt eine zeitsparende Methode dar, die zudem eine große Sensitivität und Spezifität besitzt. Für den schnellen und spezifischen Nachweis des *E. coli* Stammes DSM 6601 wurden bereits fünf verschiedene PCR-Reaktionen etabliert, die auf den chromosomal kodierten Typ 1 (*fim*)- und F1C (*foc*)-Fimbriengenklustern (Primer Muta 1-4) sowie auf den beiden kryptischen Plasmiden pMUT1 und pMUT2 (Primer Muta 5-10) basieren. Die Spezifität dieser PCR-Reaktionen war bereits durch die Untersuchung verschiedener *E. coli* Stämme überprüft worden (Blum-Oehler *et al.*, 2003). Da jedoch bei der Sequenzanalyse der Plasmide pMUT1 und pMUT2 signifikante Homologien zu Plasmiden aus enterohämorrhagischen *E. coli*- (EHEC), *Citrobacter*- und *Plesiomonas* Stämmen gefunden wurden, war ein Ziel dieser Arbeit, die Spezifität der verschiedenen PCR-Reaktionen durch die Untersuchung von weiteren Bakterienstämmen (*Citrobacter*- und *Plesiomonas* Stämme, *E. coli* K-12-Stämme, weitere *E. coli* Fäkal-Isolate, extraintestinale *E. coli* Stämme und intestinale *E. coli* Stämme) zu überprüfen (siehe Tab. 10 und 11).

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass die auf den chromosomal kodierten *fimA*- und *focA*-Genen basierenden Primerpaare für den spezifischen Nachweis des *E. coli* Stammes DSM 6601 nicht geeignet sind. Durch die Verwendung dieser Primerkombinationen kann der *E. coli* Stamm DSM 6601 nur eindeutig von *E. coli* K-12-Stämmen unterschieden werden, während eine Unterscheidung von den anderen getesteten *E. coli* Gruppen nicht möglich ist.

Im Gegensatz dazu weisen die auf den Plasmiden pMUT1 und pMUT2 basierenden Primerpaare eine große Spezifität auf. Es wurden zwar für drei extraintestinale *E. coli* Stämme sowie für einen *Citrobacter* Stamm und einen *Plesiomonas* Stamm mit einzelnen Primerpaaren positive PCR-Ergebnisse erhalten, jedoch waren nie alle drei plasmidspezifischen PCR-Reaktionen positiv. Auf Grund dieser Spezifität und der Tatsache, dass die Plasmide pMUT1 und pMUT2 sehr stabil in dem *E. coli* Stamm DSM 6601 beibehalten werden (Hawkey & Snelling, 1998), sind die auf den Plasmiden pMUT1 (Muta 5/6) und pMUT2 (Muta 7/8, 9/10) basierenden Primerkombinationen für die spezifische Detektion des *E. coli* Stammes DSM 6601 geeignet.

Für die PCR-Reaktionen wurden bisher einzelne Bakterienkolonien oder reine Bakterienkulturen verwendet, so dass eine Zwischenzüchtung der zu untersuchenden Bakterien erforderlich war. Die Kultivierung von Bakterien aus Stuhlproben kann jedoch ein Problem darstellen, wenn diese Proben wiederholt eingefroren und aufgetaut wurden oder für eine längere Zeit eingefroren waren (Caeiro *et al.*, 1999). Daher sollte in der vorliegenden Arbeit ein auf den Plasmiden basierendes spezifisches PCR-Nachweissystem etabliert werden, mit dem der *E. coli* Stamm DSM 6601 direkt in Humanstuhl detektiert werden kann.

Es wurde ein Protokoll für die direkte Isolierung bakterieller DNA aus Stuhlproben etabliert, das auf der Bindung von DNA an Silikatmaterial in Gegenwart des chaotropen Agens Guanidinthiocyanat beruht (Boom *et al.*, 1990). Durch zusätzliche Optimierung der PCR-Bedingungen konnte so für die spezifischen Primerkombinationen Muta 5/6 und Muta 7/8 eine Nachweisgrenze von 10^4 Bakterien/0,1 g Stuhl und für das Primerpaar Muta 9/10 sogar eine Nachweisgrenze von 10^3 Bakterien/0,1 g Stuhl erreicht werden. Die Sensitivität dieser PCR-Reaktionen lässt sich wahrscheinlich darauf zurückführen, dass die verwendeten Primerpaare plasmidspezifisch sind und die Plasmide in höherer Kopienzahl in dem *E. coli* Stamm DSM 6601 vorliegen. Des Weiteren wurde die Spezifität und der diagnostische Nutzen dieses PCR-Nachweissystems durch Analysen von Patientenstuhlproben bestätigt.

Die durch dieses Nachweissystem erreichte Sensitivität der PCR-Reaktionen ist mit anderen beschriebenen Sensitivitäten von direkten PCR-Nachweissystemen aus Stuhlproben vergleichbar.

So liegt beispielsweise die Nachweisgrenze für enterotoxische *E. coli* Stämme bei 10^2 bis 10^3 Bakterien/1 g Stuhl (Caeiro *et al.*, 1999), für Verotoxin 1 (Stx1)-produzierende *E. coli* bei 10^2 - 10^4 Bakterien/0,1 g Stuhl und für Verotoxin 2 (Stx2)-produzierende *E. coli* sogar nur bei 10^7 Bakterien/0,1 g Stuhl (Ramotar *et al.*, 1995).

Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die Nachweisgrenze des *E. coli* Stammes DSM 6601 nach der DNA-Isolierung ohne Stuhlzusatz um etwa eine 10-er Potenz niedriger liegt als nach der DNA-Isolierung aus Stuhlproben. Dies lässt sich vermutlich auf im Stuhl vorhandene PCR-Inhibitoren wie z. B. Bilirubin, Gallensalze oder Polysaccharide zurückführen (Ramotar *et al.*, 1995; Monteiro *et al.*, 1997), die mit der hier angewendeten Aufreinigungsmethode nicht vollständig eliminiert werden können.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Entwicklung eines stabilen visuellen Nachweises für den probiotischen *E. coli* Stamm DSM 6601. Durch Insertion der für das grün fluoreszierende Protein (GFP) und für das rot fluoreszierende Protein (DsRed) kodierenden Gene in die Klonierungsvektoren pMUT1-Tc bzw. pMUT2-Kn konnten diese visuellen Marker ohne Antibiotika-Selektionsdruck *in vitro* stabil in dem *E. coli* Stamm DSM 6601 exprimiert werden. Dadurch wird die Detektion von einzelnen Kolonien, aber auch von einzelnen Bakterienzellen des *E. coli* Stammes DSM 6601 ermöglicht. Durch weiterführende Untersuchungen in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Ölschläger konnte zudem die Stabilität des rekombinanten Plasmids pMUT2-Kn-Gfp *in vivo* nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung).

Die stabile Expression von visuellen Markern in dem *E. coli* Stamm DSM 6601 bietet die Möglichkeit, diesen Stamm bei *in vivo* Untersuchungen quantitativ zu detektieren sowie die Lokalisierung dieses Stammes während der Passage durch den Gastrointestinaltrakt zu verfolgen. Dadurch könnten Erkenntnisse über Kolonisierungseigenschaften, aber auch über Interaktionen dieses Stammes mit endogenen Mikroorganismen und Zellen des Darmimmunsystems gewonnen werden. Dies könnte hilfreich bei der Aufklärung der Wirkungsmechanismen sein, die diesem probiotischen Stamm zu Grunde liegen.

In ersten *in vivo* Untersuchungen in einem Ferkelmodell konnte durch die Verwendung des rekombinanten GFP-exprimierenden *E. coli* Stammes DSM 6601 Δ pMUT1/2(pMUT2-Kn-Gfp) gezeigt werden, dass der *E. coli* Stamm DSM 6601 im Darmlumen und in der Mukusschicht zu finden ist, jedoch konnte kein direkter Kontakt mit Epithelzellen beobachtet werden (A. Altenhöfer, persönliche Mitteilung). Durch von Schultz *et al.* (2005) durchgeführte

Untersuchungen mit einem GFP-exprimierenden DSM 6601 *E. coli* Stamm konnte nach oraler Verabreichung dieses Stammes die Darmpassage im Mausmodell verfolgt werden. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Stamm im Darmlumen zu finden ist, aber auch an die intestinale Epithelschicht adhärert. Darüber hinaus wurde die Translokation von lebenden *E. coli* DSM 6601-Bakterien in Peyer'sche Plaques und in intestinale mesenterische Lymphknoten nachgewiesen. Daher vermuten die Autoren, dass die immunmodulatorischen Eigenschaften dieses probiotischen Stammes durch den direkten Kontakt mit immunkompetenten Zellen des Darmimmunsystems vermittelt werden. Jedoch konnten auf Grund der *in vivo* Instabilität des für die GFP-Expression verwendeten Plasmids pUC-*gfp*, für dessen stabile Beibehaltung ein Selektionsdruck durch Ampicillin erforderlich ist, keine quantitativen Aussagen getroffen werden. Eine Verwendung der in dieser Arbeit konstruierten GFP- und DsRed-kodierenden stabilen Plasmide bei solchen Untersuchungen würde die quantitative Auswertung dieser Experimente ermöglichen.

Da der Transfer von Plasmiden zwischen Enterobakterien meistens in der intestinalen Mukusschicht erfolgt (Brunner & Karch, 2000), könnte durch die gleichzeitige Expression von GFP und DsRed in einer Bakterienzelle des *E. coli* Stammes DSM 6601 auch der mögliche Transfer der mobilisierbaren Plasmide pMUT1 und pMUT2 auf andere Darmbakterien *in vivo* untersucht werden.

Für den *E. coli* Stamm DSM 6601 stehen zwei verschiedene Klonierungsvektoren, pMUT1-Tc und pMUT2-Kn, sowie zwei unterschiedliche visuelle Marker, GFP und DsRed, zur Verfügung. Dadurch bietet sich die Möglichkeit, durch die gleichzeitige Expression eines fluoreszierenden Proteins und eines weiteren Proteins, z. B. eines Adhäsins, die Interaktionen von verschiedenen rekombinanten Stämmen mit anderen Bakterien oder mit intestinalen Epithelzellen zu untersuchen.

6.3 Verwendung des *E. coli* Stammes DSM 6601 als Modell für ein Lebendvakzin

Bisher werden zur aktiven Immunisierung häufig attenuierte pathogene Bakterien als Lebendvakzine eingesetzt (Ellis, 1999). Da attenuierte Bakterien jedoch immer noch virulente und invasive Eigenschaften besitzen, sollte der Einsatz solcher Vakzine bei immunsupprimierten Menschen und Kindern begrenzt werden (Nouaille *et al.*, 2003). Daher wird seit einigen Jahren zunehmend an der Entwicklung von Lebendimpfstoffen auf der Basis von kommensalen und

probiotischen Bakterien gearbeitet. In letzter Zeit wird auch die Möglichkeit untersucht, den probiotischen *E. coli* Stamm DSM 6601 als Trägerorganismus für die zielgerichtete Lieferung von therapeutischen Molekülen in den Darm einzusetzen (Westendorf *et al.*, 2005).

Im Hinblick auf eine mögliche Verwendung des *E. coli* Stammes DSM 6601 als oral applizierbares Lebendvakzin war ein Ziel dieser Arbeit, verschiedene Adhäsine von enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) und enterotoxischen *E. coli* (ETEC), die wichtige Virulenzfaktoren dieser Pathogene darstellen, in dem probiotischen *E. coli* Stamm DSM 6601 zu exprimieren. Durch die Expression von Adhäsinen könnte zum einen durch die Blockierung von Rezeptoren auf der Zelloberfläche die Adhärenz dieser Pathogene an Epithelzellen verhindert werden. Zum anderen könnte durch diese Antigene sowohl eine spezifische mukosale als auch eine systemische Immunantwort induziert werden, was zur Eliminierung der pathogenen Bakterien führen würde (Abb. 29).

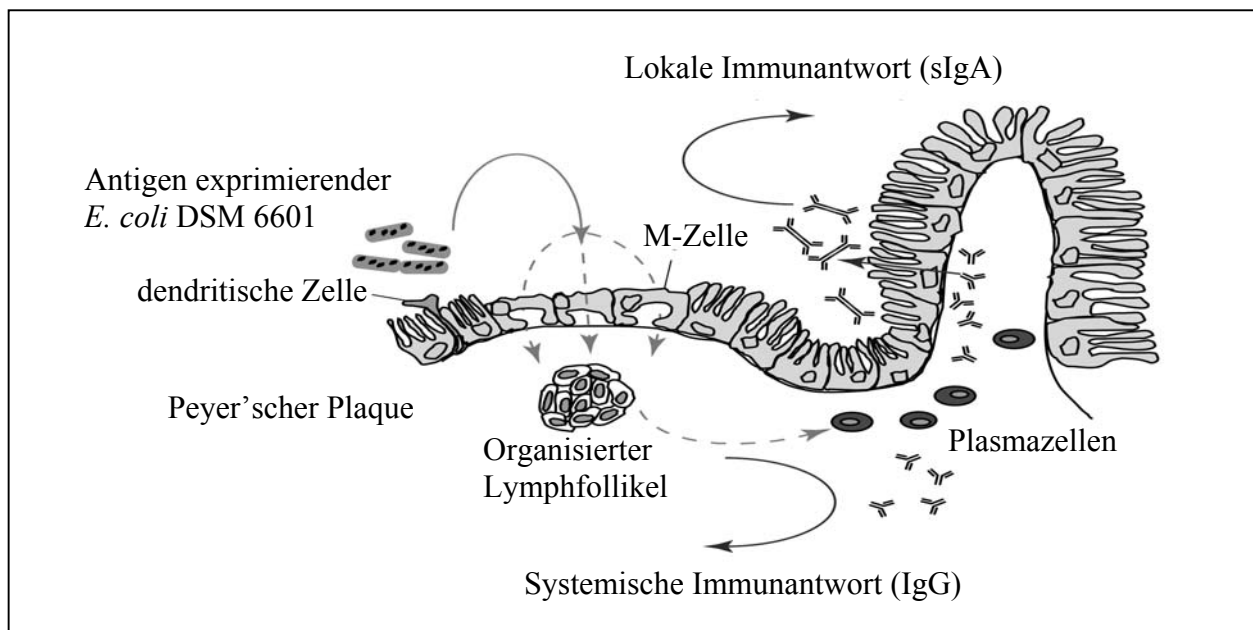


Abb. 29: Modell zur Induktion von lokalen mukosalen und systemischen Immunantworten durch einen Antigen-exprimierenden *E. coli* DSM 6601-Stamm (modifiziert nach Seegers, 2002).

Um zu untersuchen, ob durch den *E. coli* Stamm DSM 6601 als Träger von heterologen Antigenen eine spezifische Immunantwort induziert werden kann, wurden die K88ab- und K99-Fimbrien von tierpathogenen enterotoxischen *E. coli* und das Adhäsin Intimin von enterohämorrhagischen *E. coli* als Modellantigene ausgewählt, von denen gezeigt wurde, dass sie eine immunogene Wirkung besitzen (Morona *et al.*, 1994; Ascón *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2000).

Durch Integration der für K88ab- und K99-Fimbrien kodierenden Genkluster in den Klonierungsvektor pMUT2-Kn konnten diese Fimbrien erfolgreich auf der Zelloberfläche des *E. coli* Stammes DSM 6601 exprimiert werden. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass durch die Expression sowohl von K88-Fimbrien als auch von K99-Fimbrien die Adhärenz des *E. coli* Stammes DSM 6601 an unterschiedliche Schweine-Epithelzelllinien verbessert wird. Darüber hinaus konnte die Expression der K99-Fimbrien in diesem Stamm mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung auch *in vivo* nachgewiesen werden. Jedoch wurden diese Fimbrien nur schwach exprimiert und es wurden auch keine an Mukus oder Epithelzellen adhärierenden Bakterien gefunden. Ob dies auf die schwache Expression der K99-Fimbrien zurückzuführen ist, konnte nicht geklärt werden (A. Altenhöfer, persönliche Mitteilung). Da *in vivo* keine an Epithelzellen adhärierenden Bakterien des K99-Fimbrien exprimierenden rekombinanten Stammes detektiert werden konnten, kann eine Adhärenz des entsprechenden ETEC-Stammes wahrscheinlich nicht verhindert werden.

Das für Intimin kodierende *eaeA*-Gen wurde in beide zur Verfügung stehenden Klonierungsvektoren pMUT1-Tc und pMUT2-Kn integriert und die Expression in dem *E. coli* Stamm DSM 6601 durch eine “Western Blot”-Analyse bestätigt.

Im Tiermodell wurde getestet, ob durch die von dem *E. coli* Stamm DSM 6601 exprimierten Antigene Intimin, K88ab- und K99-Fimbrien eine spezifische Immunantwort induziert wird. Jedoch konnte keine Immunantwort in Form einer spezifischen IgG-Produktion nachgewiesen werden, was verschiedene Ursachen haben kann.

Zum einen wurde in diesem Experiment nur ein Immunisierungsschritt ohne anschließende “Booster”-Immunisierung durchgeführt. Dadurch könnte der Antikörpertiter im Serum zu gering für den Nachweis durch “Western Blot”-Analysen gewesen sein. Zum anderen könnte es aber auch sein, dass das Expressionsniveau der Antigene zu gering für die Induktion einer spezifischen Immunantwort war. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass der Darm der Mäuse eventuell nicht effizient mit den rekombinanten Bakterienstämmen kolonisiert werden konnte. Eine effiziente Besiedlung des Darms ist jedoch notwendig, da Antigene über einen ausreichenden Zeitraum dem mukosalen Immunsystem präsentiert werden müssen, um eine Immunantwort zu induzieren. Es könnte aber auch sein, dass durch den *E. coli* Stamm DSM 6601 als Lebendvakzin keine Immunantwort induziert werden kann.

In weiterführenden Experimenten mit zwei Immunisierungsphasen und durch Verwendung von einer sensitiveren Nachweismethode wie dem ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”)

sollte daher das immunogene Potential dieser rekombinanten *E. coli* Stämme nochmals getestet werden. Hierfür sollte ein Tiermodell verwendet werden, in dem eine effiziente Besiedlung des Darms durch die rekombinanten Bakterienstämme erreicht werden kann.

Kürzlich wurde beschrieben, dass intestinale rekombinante *E. coli* DSM 6601-Stämme keinen Einfluss auf die Migration, die klonale Expansion und den Aktivierungsstatus von spezifischen CD4⁺ T-Zellen *in vivo* ausüben (Westendorf *et al.*, 2005). Auf Grund dieser Tatsache besteht die Möglichkeit, dass die nicht nachweisbare spezifische Immunantwort gegen Intimin, K88ab- und K99-Fimbrien darauf zurückzuführen ist, dass durch die rekombinanten *E. coli* DSM 6601-Stämme tatsächlich keine Immunantwort induziert wurde. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der probiotische *E. coli* Stamm DSM 6601 sich möglicherweise nicht für die Verwendung als aktives Lebendvakzin eignet.

Dieser Stamm könnte jedoch auf Grund seiner Kolonisierungseigenschaften als Lebendvektor für die zielgerichtete Lieferung von therapeutischen Molekülen verwendet werden. Die in dieser Arbeit etablierten stabilen Klonierungsvektoren könnten hierbei für die Expression dieser Moleküle eingesetzt werden.

Durch einen rekombinanten *E. coli* DSM 6601-Stamm wurde bereits ein antivirales Peptid sekretiert, durch das die Fusion von HI-Viren und das Eindringen in Zielzellen blockiert werden kann (Rao *et al.*, 2005).

Aber auch die Expression von weiteren Molekülen, deren therapeutische Wirksamkeit bereits mit anderen rekombinanten Bakterienstämmen demonstriert wurde, ist durch den probiotischen *E. coli* Stamm DSM 6601 vorstellbar.

Klinische Studien zeigen vielversprechende Erfolge bei der Behandlung von entzündlichen Darmerkrankungen mit Interleukin-10 (IL-10). Die intragastrale Administration von IL-10-produzierenden *L. lactis* Stämmen reduzierte in verschiedenen Mausmodellen eine Kolitis etwa um die Hälfte oder verhinderte deren Auftreten (Steidler *et al.*, 2000).

Durch die Expression einer Lipase durch *Lactococcus lactis* konnte der Lipidverdau in Schweinen mit induzierter Pankreasinsuffizienz erhöht werden (Drouault *et al.*, 2002).

Paton *et al.* (2001, 2005) konnte durch die Expression von verschiedenen Transferasen in einem apathogenen *E. coli* Stamm das Lipopolysaccharid dieses Stammes soweit modifizieren, dass dieses als Rezeptor entweder für das hitzelabile Enterotoxin von enterotoxischen *E. coli* oder für verschiedene Shiga-Toxine von Shiga-Toxin-produzierenden *E. coli* fungiert. Dadurch können diese Toxine adsorbiert und neutralisiert werden.

6.4 Inhibitorische Wirkungen des *E. coli* Stammes DSM 6601

In verschiedenen *in vitro* Studien konnte bereits gezeigt werden, dass der probiotische *E. coli* Stamm DSM 6601 sowohl die Adhärenz von adhärenz-invasiven *E. coli* Stämmen an Epithelzellen als auch die Invasion von verschiedenen invasiven Bakterien in Epithelzellen inhibieren kann (Altenhoefer *et al.*, 2004; Boudeau *et al.*, 2003). Jedoch ist bisher nicht bekannt, welcher Wirkungsmechanismus diesem inhibitorischen Effekt zu Grunde liegt.

Eine mögliche Wirkungsweise könnte darin bestehen, dass der *E. coli* Stamm DSM 6601 Adhäsionsstellen von pathogenen Erregern auf Epithelzellen blockiert und dadurch die Adhärenz dieser Organismen verhindert. Daher war ein Ziel dieser Arbeit, zu untersuchen, ob eine durch Typ 1- und F1C-Fimbrien vermittelte Adhärenz an Epithelzellen einen Einfluss auf den inhibitorischen Effekt des *E. coli* Stammes DSM 6601 hat.

Verschiedene hergestellte Typ 1- und F1C-Fimbriendeletionsmutanten des Stammes DSM 6601 zeigten weder bei der Adhärenz an Epithelzellen noch bei dem inhibitorischen Effekt auf die Invasivität von Salmonellen einen Unterschied im Vergleich zum Wildtyp. Jedoch wurde festgestellt, dass Typ 1-Fimbrien unter den für diese Versuche verwendeten Anzuchtbedingungen in Zellkulturmedium nicht exprimiert werden. Aus diesen Ergebnissen kann dennoch gefolgert werden, dass die Adhärenz an Epithelzellen nicht durch F1C-Fimbrienadhäsine vermittelt wird und dass Typ 1- und F1C-Fimbrien keine Bedeutung für den inhibitorischen Effekt dieses Stammes *in vitro* haben.

Dass eine Fimbrien-vermittelte Adhärenz keine Rolle bei der antiinvasiven Wirkung dieses Stammes spielt, konnte von Altenhoefer *et al.* (2004) durch Untersuchungen mit einem "Transwell-System" bestätigt werden, wodurch nachgewiesen werden konnte, dass der inhibitorische Effekt des *E. coli* Stammes DSM 6601 nicht auf einem direkten Kontakt dieses Stammes mit den Epithelzellen oder den invasiven Bakterien beruht. Zudem konnten die antimikrobielle Wirkung der von diesem Stamm produzierten Mikroazine und eine Acidifizierung des Zellkulturmediums als Ursachen für den antiinvasiven Effekt des *E. coli* Stammes DSM 6601 ausgeschlossen werden. Die Autoren vermuten, dass der antiinvasive Effekt des *E. coli* Stammes DSM 6601 durch eine bisher unbekanntes sekretierte Komponente verursacht wird, die eine Wirkung auf die Epithelzellen und/oder die invasiven Bakterien ausübt.

Inhibitorische Wirkungen auf die Invasivität von Salmonellen *in vitro* sind auch für *Lactobacillus acidophilus* Stamm LA1 und *Lactobacillus casei* Stamm GG beschrieben. Für diese Stämme konnte im Gegensatz zu *E. coli* DSM 6601 gezeigt werden, dass eine antimikrobielle Substanz

für diesen Effekt verantwortlich ist. Die inhibitorische Wirkung von *Lactobacillus acidophilus* Stamm LA1 ist auf die Produktion einer unbekanntenen antimikrobiellen Substanz zurückzuführen (Bernet-Camard *et al.*, 1997). Auch die antiinvasive Wirkung von *Lactobacillus casei* Stamm GG wird durch die Produktion einer antimikrobiellen Substanz verursacht, deren Aktivität jedoch von der Acidifizierung des Mediums abhängig ist (Hudault *et al.*, 1997).

Bei weiteren *in vitro* Untersuchungen zur Wirkungsweise des *E. coli* Stammes DSM 6601 konnte von Wehkamp *et al.* (2004) festgestellt werden, dass durch Kontakt mit dem probiotischen *E. coli* Stamm DSM 6601 die Expression des humanen β -Defensins HBD-2 (Human β -Defensin-2) in intestinalen Epithelzellen induziert wird. Von den Autoren wird vermutet, dass diese Defensinproduktion eine Ursache für die antiinvasiven Effekte dieses Stammes *in vitro*, aber auch für die protektive Wirksamkeit bei Infektionen durch pathogene Bakterien sowie für die Reduzierung der Anzahl von Pathogenen *in vivo* sein könnte. Jedoch ist die Stimulation der HBD-2-Produktion kein spezifischer Effekt des *E. coli* Stammes DSM 6601, sondern wird auch durch andere probiotische Bakterien wie z. B. *Lactobacillus fermentum* sowie *Pediococcus pentosaceus* (Wehkamp *et al.*, 2004) und auch durch *Salmonella* spp. (Ogushi *et al.*, 2001) induziert.

Vor kurzem wurde ein 6 kb großes DNA-Fragment in dem *E. coli* Stamm DSM 6601 identifiziert, das die genetische Basis für den antiinvasiven Effekt darstellen könnte. Durch Klonierung dieses Fragments in den *E. coli* K-12-Stamm MG1655 konnte diesem Stamm eine antiinvasive Aktivität vermittelt werden. Zur Zeit wird an der näheren Charakterisierung dieses DNA-Fragments gearbeitet (A. Altenhöfer, persönliche Mitteilung).

Neben dem inhibitorischen Effekt auf die Invasivität von Salmonellen *in vitro*, besitzt der probiotische *E. coli* Stamm DSM 6601 auch die Fähigkeit, die Vermehrung und Kolonisierung von *Salmonella typhimurium* in gnotobiotischen Ferkeln zu inhibieren (Schulze *et al.*, 1992). Daher war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, zu untersuchen, ob durch den probiotischen *E. coli* Stamm DSM 6601 diese Effekte auch bei konventionellen Mäusen nachzuweisen sind und dadurch ein Schutz vor einer *Salmonella*-Infektion erreicht werden kann.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass durch orale Applikation des probiotischen *E. coli* Stammes DSM 6601 und verschiedener Derivate dieses Stammes bei konventionellen Mäusen weder die *Salmonella*-Belastung in den Fäzes dieser Tiere verringert noch ein Schutz vor einer Infektion durch Salmonellen aufgebaut wird.

Dies könnte eventuell auf die ineffiziente Besiedlung des Darms in Gegenwart einer etablierten Mikroflora zurückzuführen sein. Es wurde festgestellt, dass die antagonistischen Eigenschaften des probiotischen Stammes DSM 6601 während der Passage durch den Gastrointestinaltrakt zunächst abgeschwächt werden (Irrgang & Sonnenborn, 1988). Daher könnte eine effiziente Besiedlung des Darms durch diesen Stamm für die Entfaltung seiner antagonistischen Aktivität notwendig sein.

Es wird angenommen, dass die schützende Wirkung des *E. coli* Stammes DSM 6601 vor Infektionen mit *Listeria monocytogenes* und *Candida albicans* in keimfrei aufgezogenen Mäusen durch immunstimulierende Eigenschaften dieses Stammes hervorgerufen wird (Hockertz, 1997). Da in konventionellen Mäusen durch die etablierte Darmflora das Darmimmunsystem vollständig entwickelt ist, könnte eine weitere Erklärung für die nicht erreichte protektive Wirkung sein, dass dadurch die immunstimulierenden Eigenschaften des *E. coli* Stammes bei der Abwehr von pathogenen Mikroorganismen keine Rolle mehr spielen.

Bei von Hudault *et al.* (2001) durchgeführten Schutzexperimenten mit anderen *E. coli* Stämmen wurde ein ähnliches Ergebnis wie mit *E. coli* DSM 6601 erhalten. Durch die Etablierung des *E. coli* Stammes EM0 (Fäkal-Isolat) und sogar des *E. coli* K-12-Stammes JM105 im Darm von keimfreien Mäusen wurde ein Schutz vor einer Infektion mit Salmonellen erreicht, jedoch nicht in konventionellen Mäusen. Auch eine reduzierte Belastung der Fäzes mit *Salmonella* konnte in konventionellen Mäusen nicht festgestellt werden.

Im Gegensatz zu den *E. coli* Stämmen wurde durch *Lactobacillus acidophilus* Stamm LA1 (Bernet-Camard *et al.*, 1997) und *Lactobacillus casei* Stamm GG (Hudault *et al.*, 1997) ein Schutz in konventionellen Mäusen vor einer Infektion durch Salmonellen erreicht. Die Belastung der Fäzes mit *Salmonella* war dabei signifikant reduziert, was auf die Produktion von antimikrobiellen Substanzen zurückgeführt wird.

In zukünftigen Experimenten sollte in geeigneten Tiermodellen untersucht werden, ob die antagonistische Wirkung des *E. coli* Stammes DSM 6601 durch eine effiziente Besiedlung des Darms aktiviert und somit ein Schutz vor einer Salmonellen-Infektion erreicht werden kann.

Bisher durchgeführte Untersuchungen in der Arbeitsgruppe von Dr. Ölschläger haben gezeigt, dass der *E. coli* Stamm DSM 6601 den Darm Streptomycin-behandelter Mäuse, bei denen durch die Antibiotika-Behandlung die normale Darmflora stark reduziert ist, effizient kolonisiert. Bei

täglicher Applikation eines Streptomycin-resistenten Derivates des *E. coli* Stammes DSM 6601 konnte dieser Stamm täglich und in 100-fach höherer Konzentration in den Fäzes dieser Tiere nachgewiesen werden im Vergleich zu Streptomycin-unbehandelten Mäusen (persönliche Mitteilung). Streptomycin-behandelte Mäuse könnten sich daher für solche Schutzexperimente eignen.

6.5 Ausblick

Die in dieser Arbeit hergestellten Klonierungsvektoren bieten erstmals die Möglichkeit, heterologe Proteine stabil in dem probiotischen *E. coli* Stamm DSM 6601 zu exprimieren, ohne dass ein Selektionsdruck durch Antibiotika notwendig ist. Dadurch wurde die Basis für den Einsatz dieses Stammes als Lebendvektor geschaffen. In weiterführenden Experimenten sollte nun geklärt werden, ob dieser *E. coli* Stamm zur aktiven Immunisierung verwendet werden kann oder sich eher für die zielgerichtete Lieferung von therapeutischen Molekülen in den Darm eignet. Hierfür sollte das immunogene Potential der Antigen exprimierenden rekombinanten *E. coli* DSM 6601-Stämme in einem geeigneten Tiermodell wie z. B. Streptomycin-behandelten Mäusen nochmals getestet werden.

Durch die Etablierung von spezifischen Nachweissystemen, sowohl auf molekularbiologischer als auch auf visueller Ebene, kann der *E. coli* Stamm DSM 6601 bei *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen nun eindeutig und schnell identifiziert werden. Vor allem die stabile Expression von fluoreszierenden Proteinen bietet die Möglichkeit, diesen Stamm bei *in vivo* Experimenten zu detektieren. Dadurch könnten neue Erkenntnisse über die Kolonisierungseigenschaften sowie Interaktionen des *E. coli* Stammes DSM 6601 mit anderen endogenen Mikroorganismen und Zellen des Darmimmunsystems erlangt werden, was zur Aufklärung der Wirkungsmechanismen dieses Stammes beitragen könnte.

7 Literatur

- Achtman, M., Mercer, A., Kusecek, B., Pohl, A., Heuzenroeder, M., Aaronson, W., Sutton, A. & Silver, R. P.** (1983) Six widespread bacterial clones among *Escherichia coli* K1 isolates. *Infect. Immun.* **39**: 315-335.
- Adler, H. I., Fisher, W. D., Cohon, H. & Hardigree, A. A.** (1967) Miniature *Escherichia coli* cells deficient in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **57**: 321-326.
- Aggarwal, A., Kumar, S., Jaffe, R., Hone, D., Gross, M. & Sadoff, J.** (1990) Oral *Salmonella*: malaria circumsporozoite recombinants induce specific CD8⁺ cytotoxic T cells. *J. Exp. Med.* **172**: 1083-1090.
- Alexopoulou, L. & Kontoyiannis, D.** (2005) Contribution of microbial-associated molecules in innate mucosal responses. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**: 1349-1358.
- Al-Mariri, A., Tibor, A., Lestrade, P., Mertens, P., De Bolle, X. & Letesson, J. J.** (2002) *Yersinia enterocolitica* as a vehicle for a naked DNA vaccine encoding *Brucella abortus* bacterioferritin or P39 antigen. *Infect. Immun.* **70**: 1915-1923.
- Altboum, Z., Barry, E. M., Losonsky, G., Galen, J. E. & Levine, M. M.** (2001) Attenuated *Shigella flexneri* 2a Δ *guaBA* strain CVD 1204 expressing enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) CS2 and CS3 fimbriae as a live mucosal vaccine against *Shigella* and ETEC infection. *Infect. Immun.* **69**: 3150-3158.
- 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., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Andersen, J. B., Sternberg, C., Kongsbak-Poulsen, L., Petersen-Bjørn, S., Givskov, M. & Molin, S.** (1998) New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2240-2246.
- Appleyard, R. K.** (1954) Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from *E. coli* K-12. *Genetics* **39**: 440.
- Ascón, M. A., Hone, D. M., Walters, N. & Pascual, D. W.** (1998) Oral immunization with a *Salmonella typhimurium* vaccine vector expressing recombinant enterotoxigenic *Escherichia coli* K99 fimbriae elicits elevated antibody titers for protective immunity. *Infect. Immun.* **66**: 5470-5476.
- Avison, M. B., Bennett, P. M. & Walsh, T. R.** (2000) β -Lactamase expression in *Plesiomonas shigelloides*. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**: 877-880.
- Avison, M. B., Walsh, T. R. & Bennett, P. M.** (2001) pUB6060: a broad-host-range, DNA polymerase-I-independent ColE2-like plasmid. *Plasmid* **45**: 88-100.
- Babiuk, L. A.** (1999) Broadening the approaches to developing more effective vaccines. *Vaccine* **17**: 1587-1595.

- Bachmann, B. J.** (1987) Derivations and genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12. In: Neidhardt, F. C.: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* – cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington DC: 1190-1219.
- Baud, D., Ponci, F., Bobst, M., De Grandi, P. & Nardelli-Haeffliger, D.** (2004) Improved efficiency of a *Salmonella*-based vaccine against human papillomavirus type 16 virus-like particles achieved by using a codon-optimized version of L1. *J. Virol.* **78**: 12901-12909.
- Berg, R. D.** (1996) The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* **4**: 430-435.
- 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.
- Berlyn, M. K. B.** (1998) Linkage map of *Escherichia coli* K-12, ed. 10: The traditional map. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 814-984.
- Bermudez-Humaran, L. G., Langella, P., Cortes-Perez, N. G., Gruss, A., Tamez-Guerra, R. S., Oliveira, S. C., Saucedo-Cardenas, O., Montes de Oca-Luna, R. & Le Loir, Y.** (2003) Intranasal immunization with recombinant *Lactococcus lactis* secreting murine interleukin-12 enhances antigen-specific Th1 cytokine production. *Infect. Immun.* **71**: 1887-1896.
- Bernet-Camard, M.-F., Liévin, V., Brassart, D., Neeser, J.-R., Servin, A. L. & Hudault, S.** (1997) The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance(s) active *in vitro* and *in vivo*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2747-2753.
- Bethesda Research Laboratories** (1986) BRL pUC host *E. coli* DH5 α competent cells. Bethesda Res. Lab. Focus **8**: 9.
- Bleichner, G., Blehaut, H., Mentec, H. & Moyse, D.** (1997) *Saccharomyces boulardii* prevents diarrhea in critically ill tube-fed patients. A multicenter, randomized, double-blind placebo-controlled trial. *Intensive Care Med.* **23**: 517-523.
- Blomfield, I. C., McClain, M. S. & Eisenstein, B. I.** (1991) Type 1 fimbriae mutants of *Escherichia coli* K12: characterization of recognized afimbriate strains and construction of new *fim* deletion mutants. *Mol. Microbiol.* **5**: 1439-1445.
- Blum, G., Marre, R. & Hacker, J.** (1995) Properties of *Escherichia coli* strains of serotype O6. *Infection* **23**: 234-236.
- Blum-Oehler, G., Oswald, S., Eiteljörge, K., Sonnenborn, U., Schulze, J., Kruis, W. & Hacker, J.** (2003) Development of strain-specific PCR reactions for the detection of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 in fecal samples. *Res. Microbiol.* **154**: 59-66.
- Bokete, T. N., Whittam, T. S., Wilson, R. A., Clausen, C. R., O'Callahan, C. M., Moseley, S. L., Fritsche, T. R. & Tarr, P. I.** (1997) Genetic and phenotypic analysis of *Escherichia coli* with enteropathogenic characteristics isolated from Seattle children. *J. Infect. Dis.* **175**: 1382-1389.
- Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M. E. & van der Noordaa, J.** (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 495-503.
- Borck, K., Beggs, J. D., Brammar, W. J., Hopkins, A. S. & Murray, N. E.** (1976) The construction *in vitro* of transducing derivatives of phage lambda. *Mol. Gen. Genet.* **146**: 199-207.
- Boudeau, J., Glasser, A.-L., Julien, S., Colombel, J.-F. & Darfeuille-Michaud, A.** (2003) Inhibitory effect of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent-invasive *E. coli* strains isolated from patients with Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **18**: 45-56.

- Bourlioux, P., Koletzko, B., Guarner, F. & Braesco, V.** (2003) The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The intelligent intestine", held in Paris, June 14, 2002. *Am. J. Clin. Nutr.* **78**: 675-683.
- Boyd, A. C., Archer, J. A. K. & Sherratt, D. J.** (1989) Characterization of the ColE1 mobilization region and its protein products. *Mol. Gen. Genet.* **217**: 488-498.
- Boyer, H. W. & Roulland-Dussoix, D.** (1969) A complementary analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41**: 459-472.
- Brady, L. J., Gallaher, D. D. & Busta, F. F.** (2000) The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. *J. Nutr.* **130**: 410S-414S.
- Braun, V., Gross, R., Köster, W. & Zimmermann, L.** (1983) Plasmid and chromosomal mutants in the iron (III)-aerobactin transport system of *Escherichia coli*. Use of streptonigrin for selection. *Mol. Gen. Genet.* **192**: 131-139.
- Bruckschen, E. & Horosiewicz, H.** (1994) Chronische Obstipation. Vergleich von mikrobiologischer Therapie und Lactulose. *Münch. med. Wschr.* **16**: 241-245.
- Brunder, W. & Karch, H.** (2000) Genome plasticity in enterobacteriaceae. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**: 153-165.
- Burghoff, R. L., Pallesen, L., Krogfelt, K. A., Newman, J. V., Richardson, M., Bliss, J. L., Laux, D. C. & Cohen, P. S.** (1993) Utilization of the mouse large intestine to select an *Escherichia coli* F-18 DNA sequence that enhances colonizing ability and stimulates synthesis of type 1 fimbriae. *Infect. Immun.* **61**: 1293-1300.
- Burian, J., Guller, L., Mačor, M. & Kay, W. W.** (1997) Small cryptic plasmids of multiplasmid, clinical *Escherichia coli*. *Plasmid* **37**: 2-14.
- Cabezón, E., Sastre, J. I. & de la Cruz, F.** (1997) Genetic evidence of a coupling role for the TraG protein family in bacterial conjugation. *Mol. Gen. Genet.* **254**: 400-406.
- Caeiro, J.-P., Estrada-Garcia, M. T., Jiang, Z.-D., Mathewson, J. J., Adachi, J. A., Steffen, R. & DuPont, H. L.** (1999) Improved detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* among patients with travelers' diarrhea, by use of the polymerase chain reaction technique. *J. Infect. Dis.* **180**: 2053-2055.
- Campieri, C., Campieri, M., Bertuzzi, V., Swennen, E., Matteuzzi, D., Stefoni, S., Pirovano, F., Centi, C., Ulisse, S., Famularo, G. & De Simone, C.** (2001) Reduction of oxaluria after an oral course of lactic acid bacteria at high concentration. *Kidney Int.* **60**: 1097-1105.
- Cannon, P. M. & Strike, P.** (1992) Complete nucleotide sequence and gene organization of plasmid NTP16. *Plasmid* **27**: 220-230.
- Cano, F., Plotnicky-Gilquin, H., Nguyen, T. N., Liljeqvist, S., Samuelson, P., Bonnefoy, J., Stahl, S. & Robert, A.** (2000) Partial protection to respiratory syncytial virus (RSV) elicited in mice by intranasal immunization using live staphylococci with surface-displayed RSV-peptides. *Vaccine* **18**: 2743-2752.
- Chabalgoity, J. A., Khan, C. M., Nash, A. A. & Hormaeche, C. E.** (1996) A *Salmonella typhimurium htrA* live vaccine expressing multiple copies of a peptide comprising amino acids 8-23 of herpes simplex virus glycoprotein D as a genetic fusion to tetanus toxin fragment C protects mice from herpes simplex virus infection. *Mol. Microbiol.* **19**: 791-801.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. & Prasher, D. C.** (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**: 802-805.

- Cirillo, J. D., Stover, C. K., Bloom, B. R., Jacobs, W. R. Jr. & Barletta, R. G.** (1995) Bacterial vaccine vectors and *Bacillus Calmette-Guérin*. *Clin. Infect. Dis.* **20**: 1001-1009.
- Collier-Hyams, L. S. & Neish, A. S.** (2005) Innate immune relationship between commensal flora and the mammalian intestinal epithelium. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**: 1339-1348.
- Cormack, B. P., Valdivia, R. H. & Falkow, S.** (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**: 33-38.
- Cremonini, F., Canducci, F., Di Caro, S., Santarelli, L., Armuzzi, A., Gasbarrini, G. & Gasbarrini, A.** (2001) *Helicobacter pylori* treatment: a role for probiotics? *Dig. Dis.* **19**: 144-147.
- Cripps, A. W., Kyd, J. M. & Foxwell, A. R.** (2001) Vaccines and mucosal immunisation. *Vaccine* **19**: 2513-2515.
- Cross, M. L.** (2002) Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **34**: 245-253.
- Cukrowska, B., Lodínová-Žádníková, R., Enders, C., Sonnenborn, U., Schulze, J. & Tlaskalová-Hogenová, H.** (2002) Specific proliferative and antibody responses of premature infants to intestinal colonization with nonpathogenic probiotic *E. coli* strain Nissle 1917. *Scand. J. Immunol.* **55**: 204-209.
- Curtis, R. III & Kelly, S. M.** (1987) *Salmonella typhimurium* deletion mutants lacking adenylate cyclase and cyclic AMP receptor protein are avirulent and immunogenic. *Infect. Immun.* **55**: 3035-3043.
- Darji, A., Guzmán, C. A., Gerstel, B., Wachholz, P., Timmis, K. N., Wehland, J., Chakraborty, T. & Weiss, S.** (1997) Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. *Cell* **91**: 765-775.
- Darji, A., zur Lage, S., Garbe, A. I., Chakraborty, T. & Weiss, S.** (2000) Oral delivery of DNA vaccines using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **27**: 341-349.
- 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. USA* **97**: 6640-6645.
- Datz, M., Janetzki-Mittmann, C., Franke, S., Gunzer, F., Schmidt, H. & Karch, H.** (1996) Analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 DNA region containing lamdoid phage gene *p* and Shiga-like toxin structural genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 791-794.
- de Graaf, F. K., Krenn, B. E. & Klaasen, P.** (1984) Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of K99 fimbriae. *Infect. Immun.* **43**: 508-514.
- Del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarría, M. J., Espinosa, M. & Díaz-Orejas, R.** (1998) Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 434-464.
- Deng, W., Li, Y., Vallance, B. A. & Finlay, B. B.** (2001) Locus of enterocyte effacement from *Citrobacter rodentium*: Sequence analysis and evidence for horizontal transfer among attaching and effacing pathogens. *Infect. Immun.* **69**: 6323-6335.
- Deplancke, B. & Gaskins, H. R.** (2001) Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**: 1131S-1141S.
- Dieye, Y., Hoekman, A. J., Clier, F., Juillard, V., Boot, H. J. & Piard, J. C.** (2003) Ability of *Lactococcus lactis* to export viral capsid antigens: a crucial step for development of live vaccines. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 7281-7288.

- 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.
- Donnenberg, M. S., Tzipori, S., McKee, M. L., O'Brien, A. D., Alroy, J. & Kaper, J. B.** (1993) The role of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment *in vitro* and in a porcine model. *J. Clin. Invest.* **3**: 1418-1424.
- Drouault, S., Juste, C., Marteau, P., Renault, P. & Corthier, G.** (2002) Oral treatment with *Lactococcus lactis* expressing *Staphylococcus hyicus* lipase enhances lipid digestion in pigs with induced pancreatic insufficiency. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3166-3168.
- Dubois, B., Goubier, A., Joubert, G. & Kaiserlian, D.** (2005) Oral tolerance and regulation of mucosal immunity. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**: 1322-1332.
- Dunne, M., Al-Ramadi, B. K., Barthold, S. W., Flavell, R. A. & Fikrig, E.** (1995) Oral vaccination with an attenuated *Salmonella typhimurium* strain expressing *Borrelia burgdorferi* OspA prevents murine Lyme borreliosis. *Infect. Immun.* **63**: 1611-1614.
- Dunstan, S. J., Simmons, C. P. & Strugnell, R. A.** (2003) *In vitro* and *in vivo* stability of recombinant plasmids in a vaccine strain of *Salmonella enterica* var. Typhimurium. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **37**: 111-119.
- Ellis, R. W.** (1999) New technologies for making vaccines. *Vaccine* **17**: 1596-1604.
- Erickson, K. L. & Hubbard, N. E.** (2000) Probiotic immunomodulation in health and disease. *J. Nutr.* **130**: 403S-409S.
- FAO/WHO** (2001) Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a joint FAO/WHO expert consultation. http://www.fao.org/es/ESN/food/foodandfoo_probio_en.stm.
- Favre, D., Cryz, S. J. Jr. & Viret, J. F.** (1996) Development of *Shigella sonnei* live oral vaccines based on defined *rfbInaba* deletion mutants of *Vibrio cholerae* expressing the *Shigella* serotype D O polysaccharide. *Infect. Immun.* **64**: 576-584.
- Feldgarden, M., Golden, S., Wilson, H. & Riley, M. A.** (1995) Can phage defence maintain colicin plasmids in *Escherichia coli*? *Microbiology* **141**: 2977-2984.
- Felley, C. P., Corthesy-Theulaz, I., Rivero, J. L., Sipponen, P., Kaufmann, M., Bauerfeind, P., Wiesel, P. H., Brassart, D., Pfeifer, A., Blum, A. L. & Michetti, P.** (2001) Favourable effect of an acidified milk (LC-1) on *Helicobacter pylori* gastritis in man. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **13**: 25-29.
- Frankel, G., Phillips, A. D., Rosenshine, I., Dougan, G., Kaper, J. B. & Knutton, S.** (1998) Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol. Microbiol.* **30**: 911-921.
- Frič, P.** (2002) Probiotics in gastroenterology. *Z. Gastroenterol.* **40**: 197-201.
- Galán, J. E. & Curtiss, R. III** (1989) Virulence and vaccine potential of *phoP* mutants of *Salmonella typhimurium*. *Microb. Pathog.* **6**: 433-443.
- Galán, J. E., Nakayama, K. & Curtiss, R. III** (1990) Cloning and characterization of the *asd* gene of *Salmonella typhimurium*: use in stable maintenance of recombinant plasmids in *Salmonella* vaccine strains. *Gene* **94**: 29-35.
- Garmory, H. S., Leary, S. E. C., Griffin, K. F., Williamson, E. D., Brown, K. A. & Titball, R. W.** (2003) The use of live attenuated bacteria as a delivery system for heterologous antigens. *J. Drug Target.* **11**: 471-479.

- Ghigo, J.-M.** (2001) Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* **412**: 442-445.
- Gibson, G. R. & Fuller, R.** (2000) Aspects of *in vitro* and *in vivo* research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *J. Nutr.* **130**: 391S-395S.
- Gionchetti, P., Rizzello, F., Venturi, A., Brigidi, P., Matteuzzi, D., Bazzocchi, G., Poggioli, G., Miglioli, M. & Campieri, M.** (2000) Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* **119**: 305-309.
- Gonzalez, C. R., Noriega, F. R., Huerta, S., Santiago, A., Vega, M., Paniagua, J., Ortiz-Navarrete, V., Isibasi, A. & Levine, M. M.** (1998) Immunogenicity of a *Salmonella typhi* CVD 908 candidate vaccine strain expressing the major surface protein gp63 of *Leishmania mexicana mexicana*. *Vaccine* **16**: 1043-1052.
- Grandi, G.** (2003) Rational antibacterial vaccine design through genomic technologies. *Int. J. Parasitol.* **33**: 615-620.
- Grangette, C., Müller-Alouf, H., Goudercourt, D., Geoffroy, M., Turneer, M. & Mercenier, A.** (2001) Mucosal immune responses and protection against tetanus toxin after intranasal immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum*. *Infect. Immun.* **69**: 1547-1553.
- Grimberg, J., Maguire, S. & Belluscio, L.** (1989) A simple method for the preparation of plasmid and chromosomal DNA. *Nucleic Acids Res.* **17**: 8893.
- Grozdánov, 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.
- Grozdánov, L., Zähringer, U., Blum-Oehler, G., Brade, L., Henne, A., Knirel, Y. A., Schombel, U., Schulze, J., Sonnenborn, U., Gottschalk, G., Hacker, J., Rietschel, E. T. & 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.
- Gunzer, F., Hennig-Pauka, I., Waldmann, K. H., Sandhoff, R., Gröne, H. J., Kreipe, H. H., Matussek, A. & Mengel, M.** (2002) Gnotobiotic piglets develop thrombotic microangiopathy after oral infection with enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Am. J. Clin. Pathol.* **118**: 364-375.
- Guslandi, M., Mezzi, G., Sorghi, M. & Testoni, P. A.** (2000) *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.* **45**: 1462-1464.
- Hacker, J., Bender, L., Wingender, J., Lund, B., Marre, R. & Goebel, W.** (1990) Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur *in vitro* and *in vivo* in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microb. Pathog.* **8**: 213-225.
- Hallen, A., Jarstrand, C. & Pahlson, C.** (1992) Treatment of bacterial vaginosis with lactobacilli. *Sex. Transm. Dis.* **19**: 146-148.
- Harms, H. K., Bertele-Harms, R. M. & Bruer-Kleis, D.** (1987) Enzyme-substitution therapy with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in congenital sucrase-isomaltase deficiency. *N. Engl. J. Med.* **316**: 1306-1309.
- Hata, Y., Yamamoto, M., Ohni, M., Nakajima, K., Nakamura, Y. & Takano, T.** (1996) A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **64**: 767-771.

- Hawkey, P. M. & Snelling, A. M.** (1998) Statement regarding the stability of the plasmids of *E. coli* Nissle 1917 (DSM 6601, Mutaflor[®]), Internal Company Report; Pharma-Zentrale GmbH, Herdecke, Germany.
- Hayward, C. M. M., O'Gaora, P., Young, D. B., Griffin, G. E., Thole, J., Hirst, T. R., Castello-Branco, L. R. R. & Lewis, D. J. M.** (1999) Construction and murine immunogenicity of recombinant Bacille Calmette Guérin vaccines expressing the B subunit of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin. *Vaccine* **17**: 1272-1281.
- He, F., Tuomola, E., Arvilommi, H. & Salminen, S.** (2000) Modulation of humoral immune response through probiotic intake. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **29**: 47-52.
- Hess, J., Gentschev, I., Miko, D., Welzel, M., Ladel, C., Goebel, W. & Kaufmann, S. H. E.** (1996) Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 1458-1463.
- Hiraga, S.-I., Sugiyama, T. & Itoh, T.** (1994) Comparative analysis of the replicon regions of eleven ColE2-related plasmids. *J. Bacteriol.* **176**: 7233-7243.
- Hockertz, S.** (1991) Immunmodulierende Wirkung von abgetöteten apathogenen *Escherichia coli*, Stamm Nissle 1917, auf das Makrophagensystem. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **41 (II)**: 1108-1112.
- Hockertz, S.** (1997) Augmentation of host defence against bacterial and fungal infections of mice pretreated with the non-pathogenic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **47 (I)**: 793-796.
- Hoffmann, R. M. & Kruis, W.** (2002) Probiotika und Präbiotika - eine Renaissance? *Internist* **43**: 1400-1406.
- Hohmann, E. L., Oletta, C. A., Killeen, K. P. & Miller, S. I.** (1996) *phoP/phoQ*-deleted *Salmonella typhi* (Ty800) is a safe and immunogenic single-dose typhoid fever vaccine in volunteers. *J. Infect. Dis.* **173**: 1408-1414.
- Hoiseh, S. K. & Stocker, B. A.** (1981) Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* **291**: 238-239.
- Holmgren, J. & Czerkinsky, C.** (2005) Mucosal immunity and vaccines. *Nat. Med.* **11**: S45-S53.
- Holzappel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U. & Huis in't Veld, J. H. J.** (1998) Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* **41**: 85-101.
- Hudault, S., Guignot, J. & Servin, A. L.** (2001) *Escherichia coli* strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against *Salmonella typhimurium* infection. *Gut* **49**: 47-55.
- Hudault, S., Liévin, V., Bernet-Camard, M.-F. & Servin, A. L.** (1997) Antagonistic activity exerted *in vitro* and *in vivo* by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 513-518.
- Hull, R. A., Gill, E. R., Hsu, P., Minshew, B. H. & Falkow, S.** (1981) Construction and expression of recombinant plasmids encoding Type 1 or D-mannose-resistant pili from a urinary tract infection *Escherichia coli* isolate. *Infect. Immun.* **33**: 933-938.
- Humphries, A. D., Townsend, S. M., Kingsley R. A., Nicholson, T. L., Tsohis, R. M. & Bäumlér, A. J.** (2001) Role of fimbriae as antigens and intestinal colonization factors of *Salmonella* serovars. *FEMS Microbiol. Lett.* **201**: 121-125.

- Inouye, S., Sunshine, M. G., Six, E. W. & Inouye, M.** (1991) Retronphage phi R73: an *E. coli* phage that contains a retroelement and integrates into a tRNA gene. *Science* **252**: 969-971.
- Irrgang, K. & Sonnenborn, U.** (1988) Beziehungen zwischen Wirtsorganismus und Darmflora: Grundlagen der Mutaflor[®]-Therapie. Schattauer, Stuttgart-New York.
- Isolauri, E.** (2001) Probiotics in human disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**: 1142S-1146S.
- Isolauri, E., Arvola, T., Sutas, Y., Moilanen, E. & Salminen, S.** (2000) Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin. Exp. Allergy* **30**: 1604-1610.
- Isolauri, E., Salminen, S. & Ouwehand, A. C.** (2004) Microbial gut interactions in health and disease. *Probiotics. Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **18**: 299-313.
- Isolauri, E., Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H. & Salminen, S.** (2001) Probiotics: effects on immunity. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**: 444S-450S.
- John, M., Bridges, E. A., Miller, A. O., Calderwood, S. B. & Ryan, E. T.** (2002) Comparison of mucosal and systemic humoral immune responses after transcutaneous and oral immunization strategies. *Vaccine* **20**: 2720-2726.
- Jones, G. W. & Rutter, J. M.** (1974) The association of K88 antigen with hemagglutination activity in porcine strains of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **84**: 135-144.
- Kalliomäki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koskinen, P. & Isolauri, E.** (2001) Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **357**: 1076-1079.
- Kang, H. Y., Srinivasan, J. & Curtiss, R. III** (2002) Immune responses to recombinant pneumococcal PspA antigen delivered by live attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine. *Infect. Immun.* **70**: 1739-1749.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P. & Mobley, H. L. T.** (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 123-140.
- Karch, H., Böhm, H., Schmidt, H., Gunzer, F., Aleksic, S. & Heesemann, J.** (1993) Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like toxin-producing, sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H⁻. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 1200-1205.
- Kelly, D. & Conway, S.** (2005) Bacterial modulation of mucosal innate immunity. *Mol. Immunol.* **42**: 895-901.
- Khan, A. S. & Schifferli, D. M.** (1994) A minor 987P protein different from the structural fimbrial subunit is the adhesin. *Infect. Immun.* **62**: 4233-4243.
- Kiatpapan, P., Hashimoto, Y., Nakamura, H., Piao, Y.-Z., Ono, H., Yamashita, M. & Murooka, Y.** (2000) Characterization of pRGO1, a plasmid from *Propionibacterium acidipropionici*, and its use for development of a host-vector system in propionibacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4688-4695.
- Koesling, J., Lucas, B., Develioglou, L., Aebischer, T. & Meyer, T. F.** (2002) Vaccination of mice with live recombinant *Salmonella typhimurium aroA* against *H. pylori*: parameters associated with prophylactic and therapeutic vaccine efficacy. *Vaccine* **20**: 413-420.
- Korhonen, T. K., Valtonen, R. V., Parkkinen, J., Väisänen-Rhen, V., Finne, J., Ørskov, I., Ørskov, F., Svenson, S. B. & Mäkelä, P. H.** (1985) Serotype, hemolysin production and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis. *Infect. Immun.* **48**: 486-491.

- Kotowska, M., Albrecht, P. & Szajewska, H.** (2005) *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **21**: 583-590.
- Kotton, C. N. & Hohmann, E. L.** (2004) Enteric pathogens as vaccine vectors for foreign antigen delivery. *Infect. Immun.* **72**: 5535-5547.
- Krüger, C., Hu, Y., Pan, Q., Marcotte, H., Hultberg, A., Delwar, D., van Dalen, P. J., Pouwels, P. H., Leer, R. J., Kelly, C. G., van Dollenweerd, C., Ma, J. K. & Hammarström, L.** (2002) *In situ* delivery of passive immunity by lactobacilli producing single-chain antibodies. *Nat. Biotechnol.* **20**: 702-706.
- Kruis, W., Frič, P., Pokrotnieks, J., Lukáš, M., Fixa, B., Kaščák, M., Kamm, M. A., Weismueller, J., Beglinger, C., Stolte, M., Wolff, C. & Schulze, J.** (2004) Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* **53**: 1617-1623.
- Kruis, W., Schütz, E., Frič, P., Fixa, B., Judmaier, G. & Stolte, M.** (1997) Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **11**: 853-858.
- Kuhnert, P., Nicolet, J. & Frey, J.** (1995) Rapid and accurate identification of *Escherichia coli* K-12 strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 4135-4139.
- Kunisawa, J. & Kiyono, H.** (2005) A marvel of mucosal T cells and secretory antibodies for the creation of first lines of defense. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**: 1308-1321.
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lane, D. J.** (1991) 16S/23S rRNA sequencing, in: Stackebrandt, E. & Goodfellow, M. (Eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, Wiley, Chichester, pp. 131-148.
- Levine, M. M., Bergquist, E. J., Nalin, D. R., Waterman, D. A., Hornick, R. B., Young, C. R., Scotman, S. & Row, B.** (1978) *Escherichia coli* strains that cause diarrhoe but do not produce heat labile or heat stabile enterotoxins and are not invasive. *Lancet* **I**: 1119-1122.
- Li, Y., Frey, E., MacKenzie, A. M. R. & Finlay, B. B.** (2000) Human response to *Escherichia coli* O157:H7 infection: antibodies to secreted virulence factors. *Infect. Immun.* **68**: 5090-5095.
- Lodinová-Žádníková, 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.
- Lodinová-Žádníková, R., Cukrowska, B. & Tlaskalova-Hogenova, H.** (2003) Oral administration of probiotic *Escherichia coli* after birth reduces frequency of allergies and repeated infections later in life (after 10 and 20 years). *Int. Arch. Allergy Immunol.* **131**: 209-211.
- Lodinová-Žádníková, R., Tlaskalová-Hogenová, H. & Sonnenborn, U.** (1992) Local and serum antibody response in full-term and premature infants after artificial colonization of the intestine with *E. coli* strain Nissle 1917 (Mutaflor®). *Pediatr. Allergy Immunol.* **3**: 43-48.
- Low, B.** (1968) Formation of merodiploids in matings with a class of Rec⁻ recipient strains of *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **60**: 160-167.
- Lu, L. & Walker, W. A.** (2001) Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**: 1124S-1130S.

- Maassen, C. B. M., Laman, J. D., van Holten-Neelen, C., Hoogteijling, L., Groenewegen, L., Visser, L., Schellekens, M. M., Boersma, W. J. A. & Claassen, E.** (2003) Reduced experimental autoimmune encephalomyelitis after intranasal and oral administration of recombinant lactobacilli expressing myelin antigens. *Vaccine* **21**: 4685-4693.
- Mack, D. R., Michail, S., Wei, S., McDougall, L. & Hollingsworth, M. A.** (1999) Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence *in vitro* by inducing intestinal mucin gene expression. *Am. J. Physiol.* **276**: G941-G950.
- Madden, J. A. & Hunter, J. O.** (2002) A review of the role of the gut microflora in irritable bowel syndrome and the effects of probiotics. *Br. J. Nutr.* **88**: S67-S72.
- Majamaa, H. & Isolauri, E.** (1997) Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **99**: 179-185.
- 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.
- Malchow, H., Sonnenborn, U., Greinwald, R. & Körner, A.** (1995) Colonization of adults by a non-pathogenic *Escherichia coli* strain. *Gastroenterology* **108** (Suppl.): A869.
- Malin, M., Verronen, P., Mykkanen, H., Salminen, S. & Isolauri, E.** (1996) Increased bacterial urease activity in faeces in juvenile chronic arthritis: evidence of altered intestinal microflora? *Br. J. Rheumatol.* **35**: 689-694.
- Marteau, P., Seksik, P. & Jian, R.** (2002) Probiotics and health: new facts and ideas. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**: 486-489.
- Matz, M. V., Fradkov, A. F., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Zaraisky, A. G., Markelov, M. L. & Lukyanov, S. A.** (1999) Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat. Biotechnol.* **17**: 969-973.
- McFarland, L. V., Surawicz, C. M., Greenberg, R. N., Fekety, R., Elmer, G. W., Moyer, K. A., Melcher, S. A., Bowen, K. E., Cox, J. L. & Noorani, Z.** (1994) A randomized placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease. *J. Am. Med. Assoc.* **271**: 1913-1918.
- McKee, M. L. & O'Brien, A. D.** (1996) Truncated enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 intimin (EaeA) fusion proteins promote adherence of EHEC strains to HEP-2 cells. *Infect. Immun.* **64**: 2225-2233.
- McNeill, H. V., Sinha, K. A., Hormaeche, C. E., Lee, J. J. & Khan, C. M. A.** (2000) Development of a nonantibiotic dominant marker for positively selecting expression plasmids in multivalent *Salmonella* vaccines. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1216-1219.
- Medaglini, D., Ciabattini, A., Spinosa, M. R., Maggi, T., Marcotte, H., Oggioni, M. R. & Pozzi, G.** (2001) Immunization with recombinant *Streptococcus gordonii* expressing tetanus toxin fragment C confers protection from lethal challenge in mice. *Vaccine* **19**: 1931-1939.
- Medina, E. & Guzmán, C. A.** (2000) Modulation of immune responses following antigen administration by mucosal route. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **27**: 305-311.
- Mercenier, A., Pavan, S. & Pot, B.** (2003) Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. *Curr. Pharm. Des.* **8**: 99-110.
- Middendorf, B.** (2005) Untersuchungen zur Instabilität von Pathogenitätsinseln des uropathogenen *Escherichia coli* Stammes 536: 'Island Probing' von PAI I₅₃₆-PAI V₅₃₆. Dissertation, Universität Würzburg.

- Miller, V. L. & Mekalanos, J. J.** (1988) A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutants: Osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J. Bacteriol.* **170**: 2575-2583.
- Möllenbrink, M. & Bruckschen, E.** (1994) Behandlung der chronischen Obstipation mit physiologischen *Escherichia-coli*-Bakterien. *Med. Klin.* **89**: 587-593.
- Montagne, L., Piel, C. & Lallès, J. P.** (2004) Effect of diet on mucin kinetics and composition: nutrition and health implications. *Nutr. Rev.* **62**: 105-114.
- Monteiro, L., Bonnemaïson, D., Vekris, A., Petry, K. G., Bonnet, J., Vidal, R., Cabrita, J. & Megraud, F.** (1997) Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 995-998.
- Mooi, F. R., de Graaf, F. K. & van Embden, J. D. A.** (1979) Cloning, mapping and expression of the genetic determinant that encodes for the K88ab antigen. *Nucleic Acids Res.* **6**: 849-865.
- Mooi, F. R., Wouters, C., Wijfjes, A. & de Graaf, F. K.** (1982) Construction and characterization of mutants impaired in the biosynthesis of K88ab antigen. *J. Bacteriol.* **150**: 512-521.
- Morona, R., Morona, J. K., Considine, A., Hackett, J. A., van den Bosch, L., Beyer, L. & Attridge, S. R.** (1994) Construction of K88- and K99-expressing clones of *Salmonella typhimurium* G30: immunogenicity following oral administration to pigs. *Vaccine* **12**: 513-517.
- Morona, R., Yeadon, J., Considine, A., Morona, J. K. & Manning, P. A.** (1991) Construction of plasmid vectors with a non-antibiotic selection system based on the *Escherichia coli thyA⁺* gene: application to cholera vaccine development. *Gene* **107**: 139-144.
- Müller, C. A., Autenrieth, I. B. & Peschel, A.** (2005) Innate defenses of the intestinal epithelial barrier. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**: 1297-1307.
- Nagy, G., Dobrindt, U., Kupfer, M., Emödy, L., Karch, H. & Hacker, J.** (2001) Expression of hemin receptor molecule ChuA is influenced by RfaH in uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect. Immun.* **69**: 1924-1928.
- Nanji, A. A., Khettry, U. & Sadrzadeh, S. M.** (1994) *Lactobacillus* feeding reduces endotoxemia and severity of experimental alcoholic liver (disease). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **205**: 243-247.
- Näse, L., Hatakka, K., Savilahti, E., Saxelin, M., Ponka, A., Poussa, T., Korpela, R. & Meurman, J. H.** (2001) Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. *Caries Res.* **35**: 412-420.
- Nataro, J. P. & Kaper, J. B.** (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**: 142-201.
- Neidhardt, F. C.** (1987) Molecular architecture and assembly of cell parts. In: Neidhardt, F. C.: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* – cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington DC: 3-6.
- Nissle, A.** (1918) Die antagonistische Behandlung chronischer Darmstörungen mit Colibakterien. *Med. Klin.* **2**: 29-30.
- Nissle, A.** (1925) Weiteres über Grundlagen und Praxis der Mutaflorbehandlung. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **44**: 1809-1813.
- Nouaille, S., Ribeiro, L. A., Miyoshi, A., Pontes, D., Le Loir, Y., Oliveira, S. C., Langella, P. & Azevedo, V.** (2003) Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genet. Mol. Res.* **2**: 102-111.

- Nowicki, B., Vuopio-Varkila, J., Viljanen, P., Korhonen, T. K. & Mäkelä, P. H.** (1986) Fimbrial phase variation and systemic *Escherichia coli* infection studied in the mouse peritonitis model. *Microb. Pathog.* **1**: 335-347.
- O'Callaghan, D., Maskell, D., Liew, F. Y., Easmon, C. S. & Dougan, G.** (1988) Characterization of aromatic- and purine-dependent *Salmonella typhimurium*: attenuation, persistence, and ability to induce protective immunity in BALB/c mice. *Infect. Immun.* **56**: 419-423.
- O'Gaora, P., Maskell, D., Coleman, D., Cafferkey, M. & Dougan, G.** (1989) Cloning and characterisation of the *serC* and *aroA* genes of *Yersinia enterocolitica*, and construction of an *aroA* mutant. *Gene* **84**: 23-30.
- Oberhelman, R. A., Gilman, R. H., Sheen, P., Taylor, D. N., Black, R. E., Cabrera, L., Lescano, A. G., Meza, R. & Madico, G.** (1999) A placebo-controlled trial of *Lactobacillus* GG to prevent diarrhea in undernourished Peruvian children. *J. Pediatr.* **134**: 15-20.
- Oelschlaeger, T. A. & Tall, B. D.** (1997) Invasion of cultured human epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae* isolated from the urinary tract. *Infect. Immun.* **65**: 2950-2958.
- Oelschlaeger, T. A., Guerry, P. & Kopecko, D.** (1993) Unusual microtubule-dependent endocytosis mechanisms triggered by *Campylobacter jejuni* and *Citrobacter freundii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 6884-6888.
- Ogawa, M., Shimizu, K., Nomoto, K., Takahashi, M., Watanuki, M., Tanaka, R., Tanaka, T., Hamabata, T., Yamasaki, S. & Takeda, Y.** (2001) Protective effect of *Lactobacillus casei* strain Shirota on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 infection in infant rabbits. *Infect. Immun.* **69**: 1101-1108.
- Oggioni, M. R., Medaglini, D., Romano, L., Peruzzi, F., Maggi, T., Lozzi, L., Bracci, L., Zazzi, M., Manca, F., Valensin, P. E. & Pozzi, G.** (1999) Antigenicity and immunogenicity of the V3 domain of HIV type 1 glycoprotein 120 expressed on the surface of *Streptococcus gordonii*. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **20**: 451-459.
- Ogra, P. L., Faden, H. & Welliver, R. C.** (2001) Vaccination strategies for mucosal immune responses. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**: 430-445.
- Ogushi, K., Wada, A., Niidome, T., Mori, N., Oishi, K., Nagatake, T., Takahashi, A., Asakura, H., Makino, S., Hojo, H., Nakahara, Y., Ohsaki, M., Hatakeyama, T., Aoyagi, H., Kurazono, H., Moss, J. & Hirayama, T.** (2001) *Salmonella enteritidis* FliC (flagella filament protein) induces human β -defensin-2 mRNA production by Caco-2 cells. *J. Biol. Chem.* **276**: 30521-30526.
- Ørskov, I. & Ørskov, F.** (1983) Serology of *Escherichia coli* fimbriae. *Proc. Allergy* **33**: 80-105.
- Oswald, S.** (1997) Einführung von Virulenz-assoziierten Antigenen in den *Escherichia coli*-Carrier-Stamm DSM 6601. Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- Ott, M., Hacker, J., Schmoll, T., Jarchau, T., Korhonen, T. & Goebel W.** (1986) Analysis of the genetic determinants coding for the S-fimbrial adhesin (*sfa*) in different *Escherichia coli* strains causing meningitis or urinary tract infection. *Infect. Immun.* **54**: 646-653.
- Paglia, P., Medina, E., Arioli, I., Guzmán, C. A. & Colombo, M. P.** (1998) Gene transfer in dendritic cells, induced by oral DNA vaccination with *Salmonella typhimurium*, results in protective immunity against a murine fibrosarcoma. *Blood* **92**: 3172-3176.

- Pansegrau, W., Lanka, E., Barth, P. T., Figurski, D. H., Guiney, D. G., Haas, D., Helinski, D. R., Schwab, H., Stanisich, V. A. & Thomas, C. M. (1994) Complete nucleotide sequence of Birmingham IncPa plasmids: compilation and comparative analysis. *J. Mol. Biol.* **239**: 623-663.
- Paton, A. W., Jennings, M. P., Morona, R., Wang, H., Focareta, A., Roddam, L. F. & Paton, J. C. (2005) Recombinant probiotics for treatment and prevention of enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea. *Gastroenterology* **128**: 1219-1228.
- Paton, J. C., Rogers, T. J., Morona, R. & Paton, A. W. (2001) Oral administration of formaldehyde-killed recombinant bacteria expressing a mimic of the Shiga toxin receptor protects mice from fatal challenge with Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **69**: 1389-1393.
- 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 catecholate siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and Iron. *Microbiology* **149**: 2557-2570.
- Pavlova, S. I., Kiliç, A. O., Topisirovic, L., Miladinov, N., Hatzos, C. & Tao, L. (2002) Characterization of a cryptic plasmid from *Lactobacillus fermentum* KC5b and its use for constructing a stable *Lactobacillus* cloning vector. *Plasmid* **47**: 182-192.
- Pelto, L., Isolauri, E., Lilius, E. M., Nuutila, J. & Salminen, S. (1998) Probiotic bacteria down-regulate the milk-induced inflammatory response in milk-hypersensitive subjects but have an immunostimulatory effect in healthy subjects. *Clin. Exp. Allergy* **28**: 1474-1479.
- Perna, N. T., Mayhew, G. F., Pósfai, G., Elliott, S., Donnenberg, M. S., Kaper, J. B. & Blattner, F. R. (1998) Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* **66**: 3810-3817.
- Peters, C., Peng, X., Douven, D., Pan, Z. K. & Paterson, Y. (2003) The induction of HIV Gag-specific CD8⁺ T cells in the spleen and gut-associated lymphoid tissue by parenteral or mucosal immunization with recombinant *Listeria monocytogenes* HIV Gag. *J. Immunol.* **170**: 5176-5187.
- Phalipon, A. & Sansonetti, P. (1995) Live attenuated *Shigella flexneri* mutants as vaccine candidates against shigellosis and vectors for antigen delivery. *Biologicals* **23**: 125-134.
- Pickard, K. M., Bremner, A. R., Gordon, J. N. & MacDonald, T. T. (2004) Immune responses. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **18**: 271-285.
- Pochapin, M. (2000) The effect of probiotics on *Clostridium difficile* diarrhea. *Am. J. Gastroenterol.* **95**: S11-S13.
- Rafter, J. (2002) Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective. *Br. J. Nutr.* **88**: S89-S94.
- Ramotar, K., Waldhart, B., Church, D., Szumski, R. & Louie, T. J. (1995) Direct detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* in stool samples by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 519-524.
- Rao, S., Hu, S., McHugh, L., Lueders, K., Henry, K., Zhao, Q., Fekete, R. A., Kar, S., Adhya, S. & Hamer, D. H. (2005) Toward a live microbial microbicide for HIV: commensal bacteria secreting an HIV fusion inhibitor peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 11993-11998.
- Rembacken, B. J., Snelling, A. M., Hawkey, P. M., Chalmers, D. M. & Axon, A. T. R. (1999) Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* **354**: 635-639.
- Reyrat, J. M., Pelicic, V., Gicquel, B. & Rappuoli, R. (1998) Counterselectable markers: untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis. *Infect. Immun.* **66**: 4011-4017.

- Robinson, K., Chamberlain, L. M., Schofield, K. M., Wells, J. M. & Le Page, R. W.** (1997) Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*. *Nat. Biotechnol.* **15**: 653-657.
- Rolfe, R. D.** (2000) The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J. Nutr.* **130**: 396S-402S.
- Rumbo, M. & Schiffrin, E. J.** (2005) Ontogeny of intestinal epithelium immune functions: developmental and environmental regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**: 1288-1296.
- Rüssmann, H., Kothe, E., Schmidt, H., Franke, S., Harmsen, D., Caprioli, A. & Karch, H.** (1995) Genotyping of Shiga-like toxin genes in non-O157 *Escherichia coli* strains associated with haemolytic uraemic syndrome. *J. Med. Microbiol.* **42**: 404-410.
- Ryan, E. T., Butterton, J. R., Smith, R. N., Carroll, P. A., Crean, T. I. & Calderwood, S. B.** (1997) Protective immunity against *Clostridium difficile* toxin A induced by oral immunization with a live, attenuated *Vibrio cholerae* vector strain. *Infect. Immun.* **65**: 2941-2949.
- Ryan, E. T., Crean, T. I., Kochi, S. K., John, M., Luciano, A. A., Killeen, K. P., Klose, K. E. & Calderwood, S. B.** (2000) Development of a $\Delta glnA$ balanced lethal plasmid system for expression of heterologous antigens by attenuated vaccine vector strains of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* **68**: 221-226.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J. & Mattila-Sandholm, T.** (2000) Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* **84**: 197-215.
- Saavedra, J. M.** (2001) Clinical applications of probiotic agents. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**: 1147S-1151S.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Ehrlich, H. A.** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T.** (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York.
- Sanders, M. E.** (2000) Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *J. Nutr.* **130**: 384S-390S.
- Sanders, M. E.** (2003) Probiotics: Considerations for human health. *Nutr. Rev.* **61**: 91-99.
- Sanger, F., Niklen, S. & Coulson, A. R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Scheppler, L., Vogel, M., Zuercher, A. W., Zuercher, M., Germond, J. E., Miescher, S. M. & Stadler, B. M.** (2002) Recombinant *Lactobacillus johnsonii* as a mucosal vaccine delivery vehicle. *Vaccine* **20**: 2913-2920.
- Schmidt, H., Geitz, C., Tarr, P. I., Frosch, M. & Karch, H.** (1999) Non-O157:H7 pathogenic Shiga-toxin producing *Escherichia coli*: phenotypic and genetic profiling of virulence traits and evidence for clonality. *J. Infect. Dis.* **179**: 115-123.
- Schriefer, A., Maltez, J. R., Silva, N., Stoeckle, M. Y., Barral-Netto, M. & Riley, L. W.** (1999) Expression of a pilin subunit BfpA of the bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* in an *aroA* live *salmonella* vaccine strain. *Vaccine* **17**: 770-778.
- Schultz, M., Strauch, U. G., Linde, H.-J., Watzl, S., Obermeier, F., Göttl, C., Dunger, N., Grunwald, N., Schölmerich, J. & Rath, H. C.** (2004) Preventive effects of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on acute and chronic intestinal inflammation in two different murine models of colitis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **11**: 372-378.

- 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.
- Schulze, J., Lorenz, A. & Mandel, L.** (1992) Colonisation of *Escherichia coli* in different gnotobiotic animal models. *Microb. Ecol. Health Dis.* **5**: i-xi.
- Seegers, J. F. M. L.** (2002) Lactobacilli as live vaccine delivery vectors: progress and prospects. *Trends Biotechnol.* **20**: 508-515.
- Shanahan, F.** (2002) The host-microbe interface within the gut. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **16**: 915-931.
- Shareck, J., Choi, Y., Lee, B. & Miguez, C. B.** (2004) Cloning vectors based on cryptic plasmids isolated from lactic acid bacteria: their characteristics and potential applications in biotechnology. *Crit. Rev. Biotechnol.* **24**: 155-208.
- Shermak, M. A., Saavedra, J. M., Jackson, T. L., Huang, S. S., Bayless, T. M. & Perman, J. A.** (1995) Effect of yogurt on symptoms and kinetics of hydrogen production in lactose-malabsorbing children. *Am. J. Clin. Nutr.* **62**: 1003-1006.
- Sizemore, D. R., Branstrom, A. A. & Sadoff, J. C.** (1997) Attenuated bacteria as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Vaccine* **15**: 804-807.
- Smith, C. L., Econome, J. G., Schutt, A., Klco, S. & Cantor, C. R.** (1987) A physical map of the *Escherichia coli* K12 genome. *Science* **236**: 1448-1453.
- Snelling, A. M.** (2005) Effects of probiotics on the gastrointestinal tract. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **18**: 420-426.
- Sory, M. P., Hermand, P., Vaerman, J. P. & Cornelis, G. R.** (1990) Oral immunization of mice with a live recombinant *Yersinia enterocolitica* O:9 strain that produces the cholera toxin B subunit. *Infect. Immun.* **58**: 2420-2428.
- Steidler, L., Hans, W., Schotte, L., Neiryneck, S., Obermeier, F., Falk, W., Fiers, W. & Remaut, E.** (2000) Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* **289**: 1352-1355.
- Steidler, L., Robinson, K., Chamberlain, L., Schofield, K. M., Remaut, E., Le Page, R. W. & Wells, J. M.** (1998) Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. *Infect. Immun.* **66**: 3183-3189.
- Steinmetz, M., Le Coq, D., Aymerich, S., Gonzy-Tréboul, G. & Gay, P.** (1985) The DNA sequence of the gene for the secreted *Bacillus subtilis* enzyme levansucrase and its genetic control sites. *Mol. Gen. Genet.* **200**: 220-228.
- Stevenson, A. & Roberts, M.** (2003) Use of *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis* as live vaccines and vectors for heterologous antigens. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **37**: 121-128.
- Strockbine, N. A., Marques, L. R. M., Newland, J. W., Williams-Smith, H., Holmes, R. K. & O'Brien, A. D.** (1986) Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect. Immun.* **53**: 135-140.
- Strugnell, R., Dougan, G., Chatfield, S., Charles, I., Fairweather, N., Tite, J., Li, J. L., Beesley, J. & Roberts, M.** (1992) Characterization of a *Salmonella typhimurium* aro vaccine strain expressing the P.69 antigen of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **60**: 3994-4002.

- Sturm, A., Rilling, K., Baumgart, D. C., Gargas, K., Abou-Ghazalé, T., Raupach, B., Eckert, J., Schumann, R. R., Enders, C., Sonnenborn, U., Wiedenmann, B. & Dignass, A. U.** (2005) *Escherichia coli* Nissle 1917 distinctively modulates T-cell cycling and expansion via toll-like receptor 2 signaling. *Infect. Immun.* **73**: 1452-1465.
- Summers, D. K. & Sherratt, D. J.** (1984) Multimerization of high copy number plasmids causes instability: ColE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell* **36**: 1097-1103.
- Sun, J., Gunzer, F., Westendorf, A. M., Buer, J., Scharfe, M., Jarek, M., Göbbling, 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.
- Surawicz, C. M., Elmer, G. W., Speelman, P., McFarland, L. V., Chinn, J. & van Belle, G.** (1989) Prevention of antibiotic-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii*: a prospective study. *Gastroenterology* **96**: 981-988.
- Svennerholm, A.-M.** (2004) Progress in enteric vaccine development. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **18**: 421-445.
- Taylor, P. W.** (1983) Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* **47**: 46-83.
- Thompson, R. J., Bouwer, H. G., Portnoy, D. A. & Frankel, F. R.** (1998) Pathogenicity and immunogenicity of a *Listeria monocytogenes* strain that requires D-alanine for growth. *Infect. Immun.* **66**: 3552-3561.
- Ums, M. M. K.** (2004) Heterologe Antigenexpression im probiotischen *Escherichia coli* Stamm Nissle 1917 mittels des Hämolysinsekretionssystems. Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- van Die, I., van Geffen, B., Hoekstra, W. & Bergmans, H.** (1984) Type 1C fimbriae of a uropathogenic *Escherichia coli* strain: cloning and characterisation of the genes involved in the expression of the 1C antigen and nucleotide sequence of the subunit gene. *Gene* **34**: 187-196.
- Vanderhoof, J. A., Young, R. J., Murray, N. & Kaufman, S. S.** (1998) Treatment strategies for small bowel bacterial overgrowth in short bowel syndrome. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **27**: 155-160.
- Venkova-Canova, T., Pátek, M. & Něsvera, J.** (2004) Characterization of the cryptic plasmid pCC1 from *Corynebacterium callunae* and its use for vector construction. *Plasmid* **51**: 54-60.
- Venturi, A., Gionchetti, P., Rizzello, F., Johansson, R., Zucconi, E., Brigidi, P., Matteuzzi, D. & Campieri, M.** (1999) Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: Preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **13**: 1103-1108.
- Verch, T., Pan, Z.-K. & Paterson, Y.** (2004) *Listeria monocytogenes*-based antibiotic resistance gene-free antigen delivery system applicable to other bacterial vectors and DNA vaccines. *Infect. Immun.* **72**: 6418-6425.
- Vesa, T. H., Marteau, P. & Korpela, R.** (2000) Lactose intolerance. *J. Am. Coll. Nutr.* **19**: 165S-175S.
- von Buenau, R., Jaekel, L., Schubotz, E., Schwarz, S., Stroff, T. & Krueger, M.** (2005) *Escherichia coli* strain Nissle 1917: significant reduction of neonatal calf diarrhea. *J. Dairy Sci.* **88**: 317-323.

- Waidmann, M., Bechtold, O., Frick, J. S., Lehr, H. A., Schubert, S., Dobrindt, U., Löffler, J., Bohn, E. & Autenrieth, I. B. (2003) *Bacteroides vulgatus* protects against *Escherichia coli*-induced colitis in gnotobiotic interleukin-2-deficient mice. *Gastroenterology* **125**: 162-177.
- Wehkamp, J., Harder, J., Wehkamp, K., Wehkamp-von Meissner, B., 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.
- Weiskirch, L. M. & Paterson, Y. (1997) *Listeria monocytogenes*: a potent vaccine vector for neoplastic and infectious disease. *Immunol. Rev.* **158**: 159-169.
- Weizman, Z., Asli, G. & Alsheikh, A. (2005) Effect of a probiotic infant formula on infections in child care centers: comparison of two probiotic agents. *Pediatrics* **115**: 5-9.
- 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.
- Wollowski, I., Rechkemmer, G. & Pool-Zobel, B. L. (2001) Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**: 451S-455S.
- Wyckoff, H. A., Barnes, M., Gillies, K. O. & Sandine, W. E. (1996) Characterization and sequence analysis of a stable cryptic plasmid from *Enterococcus faecium* 226 and development of a stable cloning vector. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1481-1486.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 102-119.
- Zakova, N. & Szatmari, G. B. (1995) Site-specific recombination between ColE1 *cer* and NTP16 *nmr* sites *in vivo*. *Mol. Gen. Genet.* **247**: 509-514.
- Zell, R. & Fritz, H. J. (1987) DNA mismatch-repair in *Escherichia coli* counteracting the hydrolytic deamination of 5-methyl-cytosine residues. *EMBO J.* **6**: 1809-1815.
- Zhang, W.-L., Bielasewska, A., Liesegang, H., Tschäpe, H., Schmidt, H., Bitzan, M. & Karch, H. (2000) Molecular characteristics and epidemiological significance of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26 strains. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 2134-2140.
- Zheng, J. P., Zhang, Z. S., Li, S. Q., Liu, X. X., Yuan, S. L., Wang, P., Zhan, D. W., Wang, L. C. & Huang, C. F. (2005) Construction of a novel *Shigella* live-vector strain co-expressing CS3 and LTB/STm of enterotoxigenic *E. coli*. *World J. Gastroenterol.* **11**: 3411-3418.

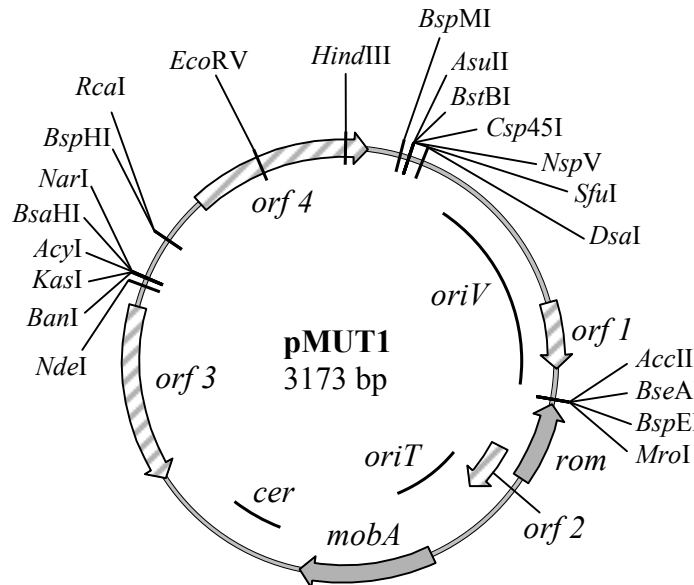
8 Anhang

8.1 Restriktionskarten der in dieser Arbeit konstruierten Plasmide

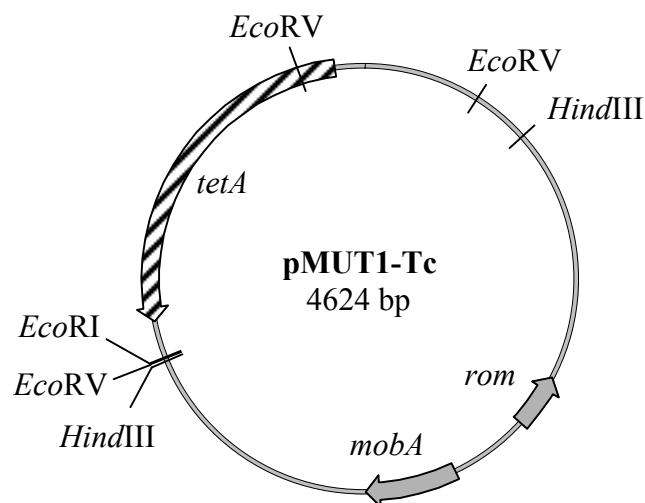
Im Folgenden sind maßstabsgetreue Karten der Plasmide dargestellt, die im Verlauf der vorliegenden Arbeit hergestellt wurden. Die Größe der Plasmide, die jeweiligen Vektoren sowie die einzelnen Inserts sind angegeben. Alle für die entsprechenden Klonierungen und für die Feststellung der Orientierung der Inserts notwendigen Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet. Bei weiteren Schnittstellen des Vektors wird auf die Originalliteratur verwiesen. Die Transkriptionsrichtung der Gene bzw. Inserts in den Plasmiden ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die angegebenen Fragmentgrößen der Inserts beziehen sich auf die durch den Restriktionsverdau und anschließende Modifizierungen erhaltenen Fragmentgrößen. Die DNA-Fragmente wurden, falls für die Klonierung notwendig, zur Erzeugung von "blunt ends" durch Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden oder Abdauen von 3'-überhängenden DNA-Enden mittels Klenow-Enzym modifiziert.

Die für die Klonierung von DNA-Fragmenten verwendeten Vektoren wurden mit den angegebenen Restriktionsenzymen linearisiert und die DNA-Enden der Schnittstellen, falls nötig, ebenso modifiziert. Alle Vektoren wurden dephosphoryliert, um eine Religation zu verhindern.

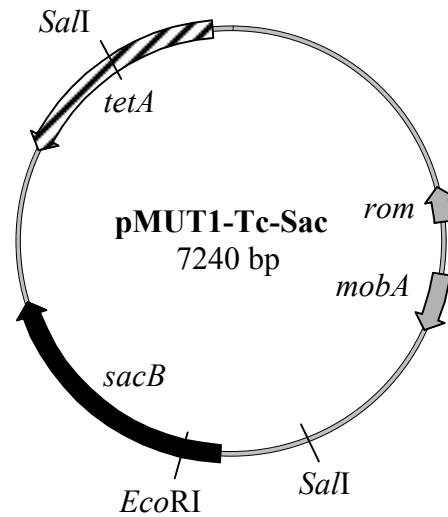
pMUT1: Restriktionskarte des Plasmids pMUT1; mit Ausnahme der *EcoRV*- und *HindIII*-Schnittstellen sind nur singuläre Restriktionsschnittstellen angegeben, die außerhalb von ORFs und funktionellen Regionen liegen.



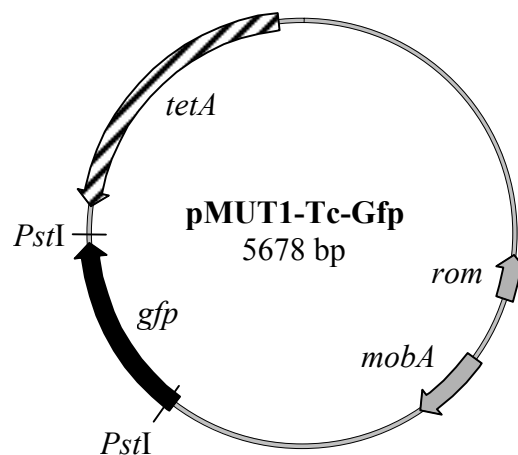
pMUT1-Tc: 1449 bp Fragment (*tetA*-Resistenzkassette) aus pKS-*tetA* mit *HindIII/XbaI* ausgeschnitten und in *NdeI*-Schnittstelle von pMUT1 ligiert ("blunt end"-Ligation).



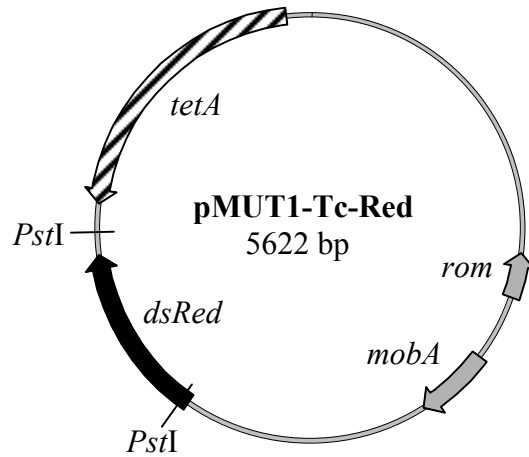
pMUT1-Tc-Sac: 2612 bp Fragment (*sacB*-Gen) aus pCVD442 mit *Pst*I ausgeschnitten und in *Eco*RI-Schnittstelle von pMUT1-Tc ligiert ("blunt end"-Ligation).



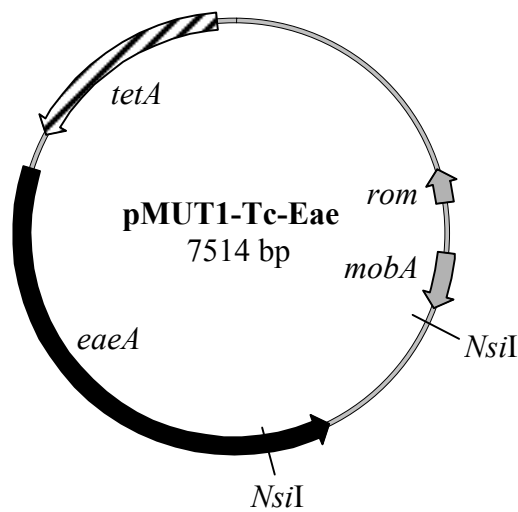
pMUT1-Tc-Gfp: 1050 bp Fragment (*gfp*-Gen) aus pGFPmut3.1 mit *Sap*I/*Spe*I ausgeschnitten und in *Eco*RI-Schnittstelle von pMUT1-Tc ligiert ("blunt end"-Ligation).



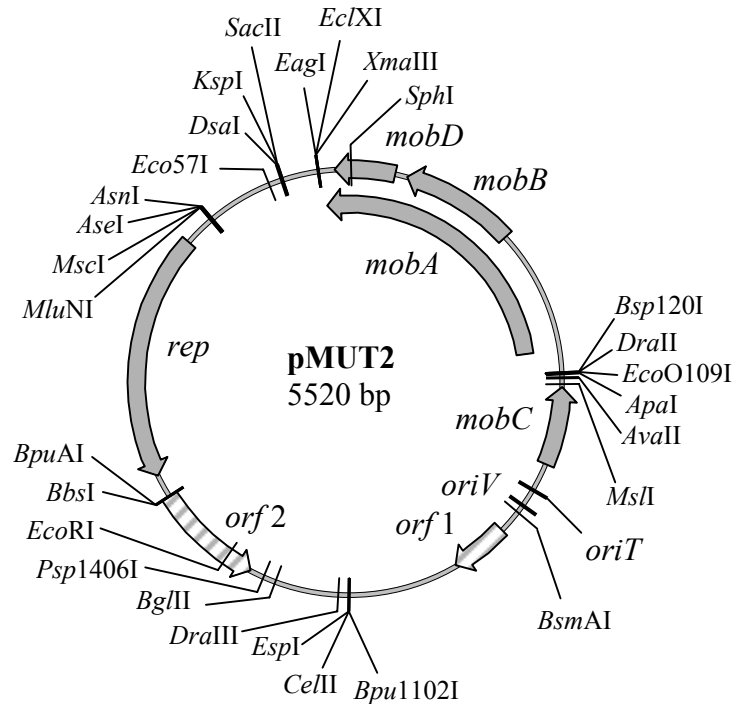
pMUT1-Tc-Red: 994 bp Fragment (*dsRed*-Gen) aus pDsRed mit *Pvu*II/*Spe*I ausgeschnitten und in *Eco*RI-Schnittstelle von pMUT1-Tc ligiert (“blunt end”-Ligation).



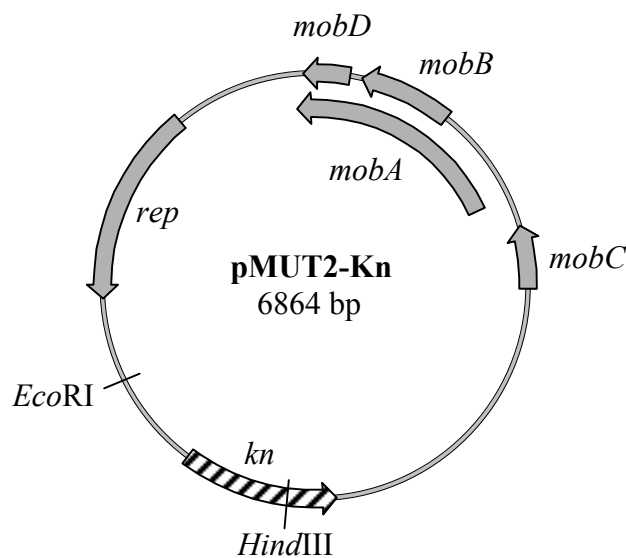
pMUT1-Tc-Eae: 2886 bp Fragment (*eaeA*-Gen aus *E. coli* O157:H7 Stamm 86-24) aus pOSeaeI mit *Bam*HI/*Kpn*I ausgeschnitten und in *Eco*RI-Schnittstelle von pMUT1-Tc ligiert (“blunt end”-Ligation).



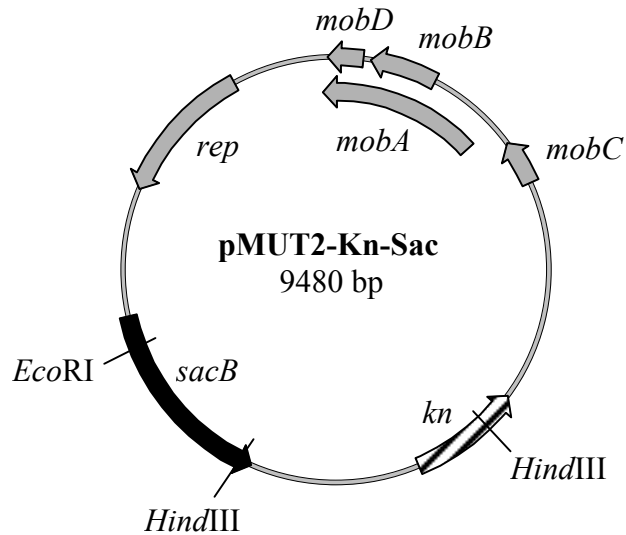
pMUT2: Restriktionskarte des Plasmids pMUT2; mit Ausnahme der *EcoRI*- und *SphI*-Schnittstellen sind nur singuläre Restriktionsschnittstellen angegeben, die außerhalb von ORFs und funktionellen Regionen liegen.



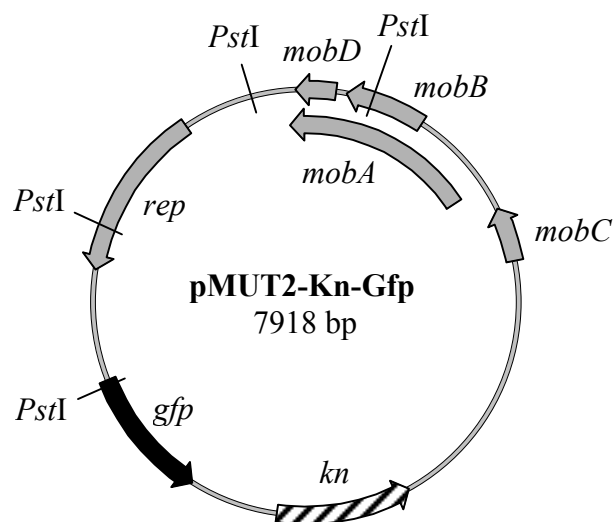
pMUT2-Kn: 1340 bp Fragment (*kn*-Resistenzkassette) aus pACYC177 mit *StuI* ausgeschnitten und in *BglII*-Schnittstelle von pMUT2 ligiert ("blunt end"-Ligation).



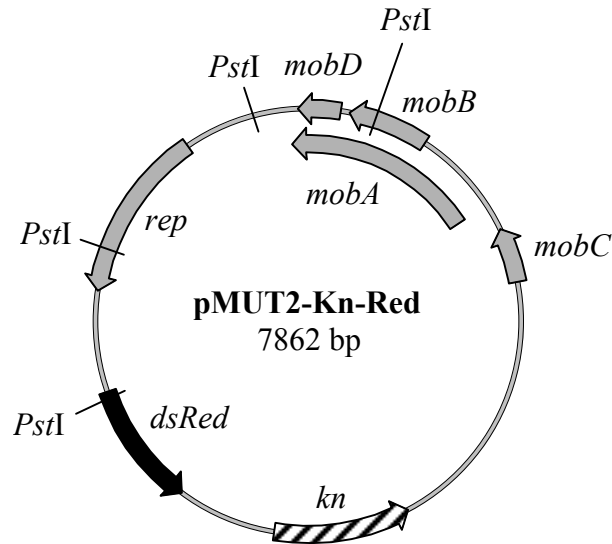
pMUT2-Kn-Sac: 2612 bp Fragment (*sacB*-Gen) aus pCVD442 mit *Pst*I ausgeschnitten und in *Eco*RI-Schnittstelle von pMUT2-Kn ligiert ("blunt end"-Ligation).



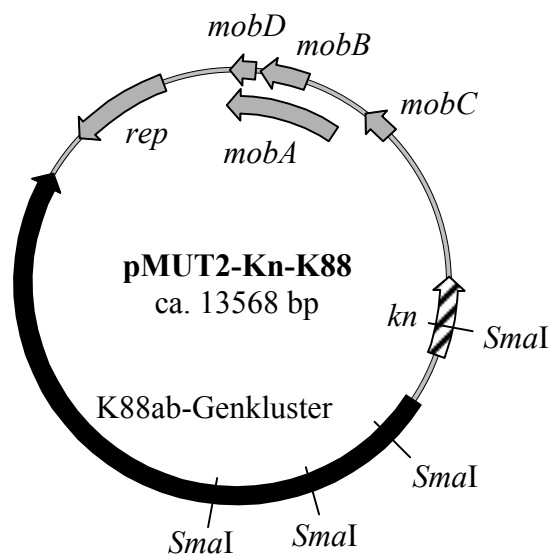
pMUT2-Kn-Gfp: 1050 bp Fragment (*gfp*-Gen) aus pGFPmut3.1 mit *Sap*I/*Spe*I ausgeschnitten und in *Eco*RI-Schnittstelle von pMUT2-Kn ligiert ("blunt end"-Ligation).



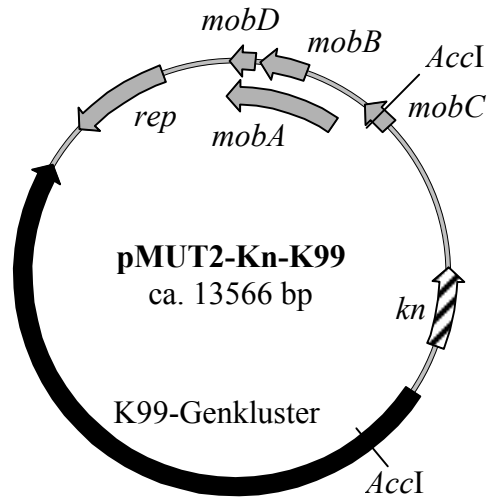
pMUT2-Kn-Red: 994 bp Fragment (*dsRed*-Gen) aus pDsRed mit *PvuII/SpeI* ausgeschnitten und in *EcoRI*-Schnittstelle von pMUT2-Kn ligiert (“blunt end”-Ligation).



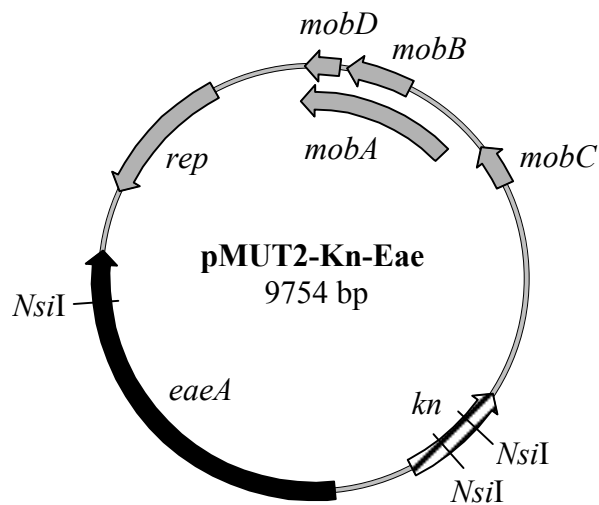
pMUT2-Kn-K88: Ca. 6700 bp Fragment (K88ab-Genkluster aus *E. coli* Stamm G7) aus pFM205 mit *Sau3AI* ausgeschnitten und in *EcoRI*-Schnittstelle von pMUT2-Kn ligiert (“blunt end”-Ligation).



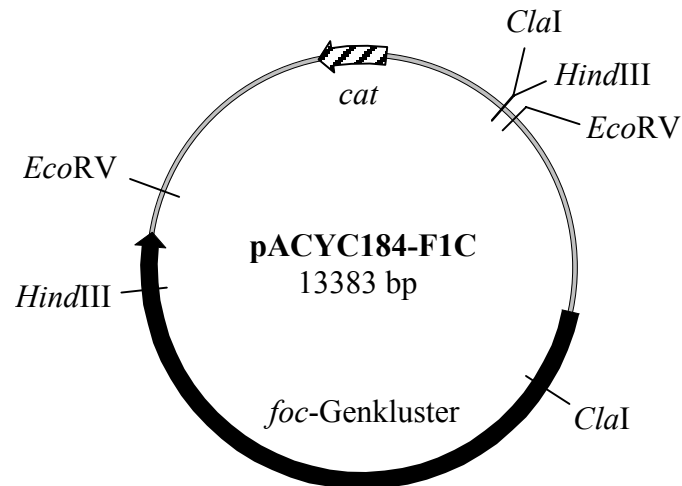
pMUT2-Kn-K99: Ca. 6698 bp Fragment (K99-Gencluster aus *E. coli* B41) aus pFK99 mit *Bam*HI ausgeschnitten und in *Eco*RI-Schnittstelle von pMUT2-Kn ligiert (“blunt end”-Ligation).



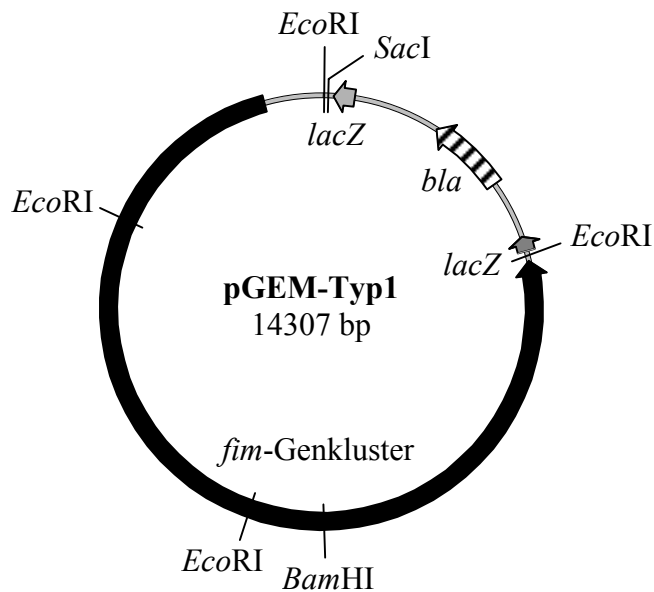
pMUT2-Kn-Eae: 2886 bp Fragment (*eaeA*-Gen aus *E. coli* O157:H7 Stamm 86-24) aus pOSeae1 mit *Bam*HI/*Kpn*I ausgeschnitten und in *Eco*RI-Schnittstelle von pMUT2-Kn ligiert (“blunt end”-Ligation).



pACYC184-F1C: 9139 bp Fragment (*foc*-Genkluster aus *E. coli* DSM 6601) aus Cosmid pCos3YE4 mit *EcoRV* ausgeschnitten und in *EcoRV*-Schnittstelle von pACYC184 ligiert.



pGEM-Typ1: 11290 bp PCR-Fragment (Primer Fim 3/4, *fim*-Genkluster aus *E. coli* DSM 6601) in pGEM[®]-T Easy ligiert.



8.2 Sequenzen

Sequenz des Plasmids pMUT1 (3173 bp)

Die für die Ermittlung der DNA-Sequenz und den spezifischen Nachweis des Plasmids pMUT1 verwendeten Primer sind eingezeichnet. Die dazugehörigen Nukleotide sind in Großbuchstaben und Fettdruck hervorgehoben.

```

1 agcttttaga gcttggatac catgacccaa tgaagctacc tcaaaacttt gaatgatcga
61 gcggcaggct aaatgaaatc ttgagattca ttcagtctcg tcgtaatctc actattgtaa
121 aaacgaaaaa accaccctgg caggtgggtt ttcgaagggt agttaatcct ggcagattct
181 ctaaccgtgg taacagtctt gtgcgagaca tgtcaccaaa tactgtcctt tcagtgtagc
241 ctcagtttag ccgccacttc aagaactctc gttacatctc tcgcacatcc tgcttaccaG

    †Micuni 1
301 TGGCCGTTGC CAGTGGCggt aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac
361 cggataaggc gcagcggctg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc aGCTTGGAGC
421 GAACGACCTA Caccgaaccg agataccaac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc

    Mutrev 1↓
481 ccgaagggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaaca ggagagcgca

                †Micuni 3
541 cgagggagct tccagggGGA AACGCCTGGT ATCTTTAtag tctgtctggg tttcggcacc
601 tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg ggggagccta tggaaaaacg
661 cctcccgcgc gcccttcttc tgggtctttg tcttttgctc acatgttctt tccggtttta
721 tcccccgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgacac cgctcgccgc
781 agtcgaacga ccgagcgtag cgagtcagtg agcgaggaag cggaaagagcg ccttatgtga
841 cattttctcc ttacgtcctt ctatgccgtt ctgcatcctg tccggatgcg ttatatcccc
901 gtaagattht ccgcttcaaa gcgtgtctgt atgctgttct ggagttcttc tgcgagttcg
961 tgcagtttCT CACACATGGC GGCCTGttcg tcggcattga gtgcgtccag tttttcgagc

                Micrev 6↓                †Mutuni 1
1021 agcgtcaggc tctgactttt tatgaatccc gccatgthGA GTACGGCTTG CTGCTGCtta
1081 ttcattcttt cgthttctcc gttctgtctg tcatctgcgt tgtgtgatta tatcgcgtac
1141 cacttttcga ctgttttgct gccgctattc tgccgcttgg cthtttgacg ggcatttctg
1201 tcagacaaca ctgtcactgc caaaaaactg ccgtgccttt GTCGGTAATT CGAGCTTGct

                Hincrev 2↓
1261 gacaggacag gatgtgcaat tgttataccg cgcatacatg cacgctatta caattgcctt
1321 ggtcagggct ttgccccgac acccatgtca gatacggagc catgtthttat gacaaaacga
1381 agtggaaagta atacgcgcag gcgggctatc agtcgccctg ttcgtctgac ggcagaagaa
1441 gaccaggaaa tcagaaaaag ggctgctgaa tgcggcaaga ccgthttccgg tthtttacgg

                †Mutuni 2
1501 gcggcagctc tcggtaagaa agthaacTCA CTGACTGATG ATCGGgtact gaaagaagtt

                Micrev 5↓
1561 atgagactgg gggcgttaca gaaaaaactc thttatcgac gcaagcgtgt cggggacagg
1621 gagtatgcgg aggtgctgat cgctattacg gagtatcacc gtgcccctgtt atccaggctt
1681 atggcagatt agcttcccgg agagaaaact gtcgaaaact gacggatga acaccgtaag
1741 ctcccaaagt gatcaccatt cgctttcatg catagctatg cagcagctg aaaacgatcc
1801 tgacgcatcc thctgttht tccggggtaa aacatctctt thtgcggtgt ctgcgtcaga
1861 atcgcgttca gcgcgtttca gtgggtgcgta caattaaggg attatggtaa ataTATGAGC

                †Muta 5
1921 TATGCGATAA CthtAACTGT GAAGCGATGA ACCCattaca ggcaaagcca attactcctg

                Micrev 4↓
1981 acagtggtht agccagaagc agggctacca agaccaatgc aataagtaat atatcgthtt
2041 gctatcgtgc atcgtcgcg ctcahtcca thgtgcttht thagctgtc gthtttctta
2101 cggatatatac cggthtttht tggcgtggth tctthacttg thcagctact gatggacca

```

Fortsetzung Sequenz Plasmid pMUT1

2161 ttgtatctag gtagtcaact agctttgtta gatcataaat att**GCGACCA** **CCATATCGGC**
 Micrev 3↓

2221 **GAT**cactcctt cgatgttggt ttcttgtcca agagattagc tttttcaaga tcatt**GATAG**
 †Mutuni 3

2281 **CTCTCTGAAC** **AGTCC**gtaca gaaacccccca tacgtatggt tagactttcc attgacggat
 Muta 6↓

2341 gcggccactc ttgcaaaact caccagttaa cgatcagggt aagtagtggt ttaaaggcca
 2401 ctgaagtttag ctttttctcg ttttgtataa aaaacaatac ggtaggcact gctgtccagc
 2461 caagagacaa accgccagct ttccatttat tcttaacgga gtaagtcatt gattttccta
 2521 agccccaaaa tatttaaagt atatattata tggatatattc atatgaatag ggtgacactg
 2581 **gCGCCATTAT** **TGTGCAACC**a aaaaagacta ctctgaaaac gaggaaaaga ttttttctcg
 Micrev 2↓

2641 cctgaattag atacggagtt agcgatatga aaaccgaaca acgtcatgat cttgttaaag
 2701 atattgaggt ttttggcgta tccttgtctc tgttgatttc cagagcgaat gagaagtctg
 2761 ttacaatgcc atctgggtcta agtcgggagc agagaagagc atgggcagcg gaggaggcgc
 2821 gcaaaatcca caattgaata ttgtctcatt ctctgagacc ttcaaccttt attacacatc
 2881 cagatattct gcaaaaacac tcgataaaat cgatgatttc attgagcatt ttgaaa**AATA**
 2941 **CAATCTCTTT** **GGCG**atcctt taaaaggata tccagcttgg actggcaaag tatcgccatc
 Micrev 1↓

3001 gtggaaagtg cctgatcatt acgaaaacaa agaagctatt gagaagtatg ctagagctaa
 3061 caaattatgg catgctcatt taggcgatcc ggtttttaa gatacgtttc atgggaaata
 3121 caaggtttct gactgggtta ttcattttcca gcggctgaca ccgaaccata taa

Sequenz des Plasmids pMUT2 (5520 bp)

Die für den spezifischen Nachweis des Plasmids pMUT2 verwendeten Primer sind eingezeichnet.
 Die dazugehörigen Nukleotide sind in Großbuchstaben und Fettdruck hervorgehoben.

†Muta 9

1 gcatgctcaa ggcctgacaa accctgtcgt ttttgcgcaa ctct**GCGAG** **GTAACCTCGA**
 61 **ACATG**cgctg taagttggcg tagctgtcct gccacgcttg ctgctggtgt tcgtagtgcc
 121 tctgtaagct ctctaagcgc ctccagaagct gctgctccat ttoggatcatg aatctcttca
 181 ccctgataga taaaaccgcc cagaatcgat tctgtggcgt ctgatgaggt tatttggcgc
 241 tgtacttgat gacctgacga tgttgagcgt tcttgtactc gtcgatcttc ttgcgccccct
 301 gcggaaggat caggttaatac acgctcctgt tcttggaaat**C** **GTGAATTATC** **GATACGCCGg**

Muta 10↓

361 ctccgggtctg gctctttaag tcctgcagga tctggctctg ctogctgatt tcggtctggtg
 421 gttcgaccac gatagtcccg agataccaag ctactccaat caatatcgca aacaggatcc
 481 cacttaatgc caggctgtac agccatgtca ttccgactaa gcggtgtatc tgttttagct
 541 ggctgtcgtt ctcttcttgg atagcggctc gtatgttccc tgagcttaat ttcaaggcct
 601 cggtgatagc tttctcgtgc ttctcgaatg cgttcgcgac gctcgttgcg gtagtcttgg
 661 cttgctgctt cgatttgctc tcgaaactccc gcgctaaatt taaaatctcg ctacacagc
 721 actcctttta agcgaatatt cgggccacct gccggatcag caatactgat actggatttg
 781 gtttcccgta cgaccgacaa tccggcatcg gtaagggtggg aatcaccccc ttacgatcc
 841 gtaatttctc cctgctcaat caagctgatt agccctttgg taatggcttc cgctgcctgc
 901 tgtttgttgc gaggaaggtc attagagggg gttaatgctc ggcgattagc agggctcattc
 961 gggtcgctga acccaagccg gtcattgggtg agggtttgc atgcgttaac acgaggccgg
 1021 tcagcccgat caaagtaagg ttgtagccgt tttccgctct gcaattcgat gttcgggata
 1081 acaaaattca attcaagacg ccctttgtcc tgatgttgaa ccagaggca ggcatactgg
 1141 tctttatcta gaccggtcat caatgtctgc tcccattcat ccatcaatcg ctgcttttgc
 1201 ccttcgggta aatcactctc ctgaaaagag agcacgccag aggtataagt tcgggcaaat
 1261 tcgcagcatc aatcagctct ttgacgtgct cagggttacc ccgtaacacc gtcgcttgtt

Fortsetzung Sequenz Plasmid pMUT2

```

1321 cgcgctgacg atcagggccc agaaggtaat cgacaggacc actcccgcca ccggcaccac
1381 gaccatgaat ccttaacgat cacgatgttg ctccagcagt tcggcaagat gttggtaaat
1441 gctattgagc accgctaaca acgacacccg ttcttgccggc ggtaagccat gctgattcaa
1501 gtaacgggct atttgattga ggttattacc gatcccgcctg acctgacgta acaaggctcg
1561 gtctacggta aggttagcgg acgacgcccg agctgtacgc gattcgccca agccaacggc
1621 tcgtaaccac tcggccaaat gcttacggtc acagcgttca agtagccgct gatgctccgc
1681 ttcggtgagt ctgattttga tctctttggt gcgcttttcc atgagaatcc gctgagaaag
1741 tttcgcaccc aaagtgcgaa ttttcgcagt ggatgcaagg ggtttcgggg ggccggcagc
1801 cccctgaaac agtcacagac ggcacctcga agaggggacg ctggtgtgtac tgrcttagta
1861 cagcatctat cgtacatcga ggtcgcacga cgcacaaaaca aaaagccccg caaaagcagg
1921 gctgttatct gatatagggt gttttgtctc acacggcagc ggaagaggaa tccgaagtgg
1981 tactggtagt agtattggat gctgctgacg atattttccg ctttgaccca aggcttaaat
2041 aatcaatgcc tgtaataaac gatctcaata cgccttcgga taccatagcg ataaacgtat
2101 cttgctgggt atggcttgcg atgcaaactg tagcatcacc ttttttatac tttaaaacac
2161 ctgctaaata tccattttca tctagaacac tcttaagatg ttcatttggt attgtttgta
2221 gcgtttgctt tgtttcgctt cgagcatacg ccttagctag cttccgagaa aaagcatccg
2281 catcatgact atctttatct actcgcctca taaatttgct taagtcaaca aatcccttaa
2341 aacgagtgga catattgtta acaaaatcag tggcagcatt ttttatccat gctttatagc
2401 caaaaaaacg ctcgaaaaca ttttggtcgt agataaatac cgtatcgcca gcaaaaacaa
2461 gagatgcctt accatcaata gaaatcatat cttgatctac tcgagatagt tcttttttgc
2521 taaaccata aaaattatct tcttttcttg ataagttttg aactggatat tgcttcttgt
2581 atatggttat acaattgtcg tcattattct tactcaaac gaaaatgatt gagtcaactt
2641 ttgatattag atccacactg tcaaaatcaa caattgggat attttcattg ccatcaccac
2701 caaaccagc atcaaacaca atgccagtc gaaacttcat ttgctcatta tcatactgct
2761 cagcatcatt taaaaatgaa atgggtgttg tgccgctcact tagtgtatta acatctgata
2821 ctatcacaac ccgattttct aaatcagata tagttttctt tatcacatta tcaataatgg
2881 actgttttag ctactgtca tttttaagga tggcaatttt atagctaaaa gagtccttag
2941 caccgcctt acctttatct ttaaagttaa agtaagtgtg caatgtaaca tcgttaatat
3001 cacaatcaaa atgcttatac agttctaaaa gctcttgtgc tttttcttca ttttgcctca
3061 aagcatcaag atcttaaggc atcgtcactc atcatcttc ctctatgatt tttttcgcga
3121 acgttaaata atcatcatga tttataactc tgataaaatc attttctttt attaaatctt
3181 tagataaaac tatcaaacct accgtcttgc gttttttccc ttccattagc taccacactg
3241 taagtaatct tataggcaga aacattaat atgacaatg ttgggttgca gtgaattctt
3301 tttgttttga tgtgcaaaaa accgacgata atcaaaaaca acaaaaaatt aactatattt
3361 gatggtttgc ttaaactcagt aaagaccaac ggcattatgt acgttgataa aaaagaaaga
3421 tactcaccgg attctttttt acatgaaacg acctttaact ttcttgacac cgcaccggag
3481 tctaagttt tcaaaaccca tcgataccaa atgtatgtat aagaacaagt taaaatcaaa
3541 gccccgcaga tcaactgacct caatacagaa aatgttaatc tgctatttga atagtcgagt
3601 acgcattgaa attttccatc cgcgccagaa cacgaagaca tggccttacc taaaacagac
3661 catacgttat caataccaga aaaatatatt gttatcggta taaaataaaa acaacattga
3721 taagagatac attctaattt tcatttttgt aaaatttcc gtaccacggt gatctactta
3781 ttccataaaga aatccattct ccatctctaa ctttcggcct tccaccacca gagctttttt
3841 ttccacgctg acgctgaatt tcagaagtat gtgtttgttt aacatactct tcaaagccaa
3901 gctctgtaag gttcttactt gtccacttag ccacactttt agcaattccc atgacttctg
3961 tctcgtctaa aggtgcggag aactgcaggt tgtaggcttt agcgcgttca atgcaggctt
4021 gtagccattg gtcatactgc ggcagcctt ggcggatagc gcggtaaagc cacttgcggg
4081 ttttatcgaa gaggtgcag ttaccgccta aaccgtagtc cggcaggatt cgcggtcac
4141 tggctgcgcc aaggtcgagg taatcggcta accagtcaag ggtatagagc tctggctgcc
4201 agacggtgat ctgccagtc aggtggttcg gattcttgca aattagccct gaataccccg
4261 catctgcgcc caatttttta cgcagcgcac tctcgatggc ggccggcgtat ttaagggggg
4321 cagctcgacc atccggcgcg gtacgtaccg ccgtatgcaa ggcatacaac aggtgagcat
4381 gtccgttctc ggggtttttg atggtgagtg tgggocgagg tgccccaga tcggcccaat
4441 caatcgccgc tccggctctg tccacgtcaa agcaaagcca gtacatggcg tgaggctgat
4501 taaactggat gtattttgcg aggagagcac gctctttacc ggcaatgcga acaccaact
4561 gtaaatcacc ggagaagtac ggcttgtggg gtaaccggtc gttaaaaagc gttaaagcct
4621 gattatccaa ggctcccagc cttatggcgg ggctgttggt ttgcacgctg catgtgctaa
4681 taccctttct aggtttcgac ctagccctga atgtcatgtc cgctcgccaa agtagagcat
4741 gatttcgggg ctttgttttt tctgccacta agttacacct caacaacggg ttttgtcatc
4801 cccgacaatc cgttattcct gcttgttctc gcacggcttt acgctcatac tacttcttgt

```


Fortsetzung Sequenz Plasmid pMUT2

↑Muta 8

```

4861 agatacactt gtcactacat caagagGTGA GATGATGGCC ACGATTaata ttcggatcga
4921 tgacgagctg aaaagccgct cttatgccgc actggaaaag ctggggcgtaa cgccgtccga
4981 ggttctgctg caaacactgg aatatgtggc ccaaagcgga cgtttgccgt tccagcaggt
5041 tttgctgacc gaggatgatg ccgatttgat ggctatcggt cgggatcgtc tggaaaaccc
5101 acaggcgggc gtaaaggtgt cactggatga gctataacct tgaatttgat ccccgagccc
5161 tgaaggaatg gcgcaagctc ggggatgatg tccgtctgca gttcaagaaa aaactcgagc
5221 aggttctaca acaccgcgg atcgataaaa atcgctctgc agagctgcat gactgctaca
5281 aatcaagct ccgtgCATCC GGGTATCGCT TGGTCatca ggttcgcgat caaacatta

Muta 7↓
5341 cggatttcgt ggtggcggtc ggtaagcgcg agcgttctgc cgcttacgat gcggccgata
5401 aacgcttata aactcatgcc gtgaccgcga gaataccgct gttcgtgccc cttggctaata
5461 tgctcaagcg gcgcactggt ctgtttaagc tctcgacttg ctgcgccaag ccggtgactt

```

8.3 Abkürzungen

A	Ampere
Abb.	Abbildung
Ap/Ap ^R	Ampicillin/Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
c	centi (10 ⁻²)
ca.	zirka
<i>cat</i>	Chloramphenicol-Acetyltransferase (Gen)
Cm/Cm ^R	Chloramphenicol/Chloramphenicol-Resistenz
d	Tag
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-5'-Triphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosid-5'-Triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-5'-Triphosphat
DsRed	rot fluoreszierendes Protein
dTTP	Desoxythymidin-5'-Triphosphat
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EAEC	enteroaggregative <i>E. coli</i>
EBSS	“Earle's balanced salt solution”

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EIEC	enteroinvasive <i>E. coli</i>
EPEC	enteropathogene <i>E. coli</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
ETEC	enterotoxische <i>E. coli</i>
EtOH	Ethanol
FAE	Follikel-assoziiertes Epithel
FCS	fötales Kälberserum
FRT	FLP-Erkennungssequenz
g	Gramm
GEI	Genomische Insel
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
H ₂ O _{bidest.}	zweifach destilliertes Wasser
H ₂ O _{dest.}	destilliertes Wasser
IgA, IgG, IgM	Immunglobulin A, G, M
IL	Interleukin
IMIB	Institut für Molekulare Infektionsbiologie
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid
k	kilo (10 ³)
kb	Kilobasen
KBE	koloniebildende Einheiten
Kn/Kn ^R	Kanamycin/Kanamycin-Resistenz
l	Liter
LB	Luria Bertani
LGT-Agarose	“low-melting“-Agarose
LPS	Lipopolysaccharid
m	Meter; milli (10 ⁻³)
μ	mikro (10 ⁻⁶)
M	molar
MALT	“mucosa-associated lymphoid tissue”
MENEC	meningitisauslösende <i>E. coli</i>
min	Minute
n	nano (10 ⁻⁹); Anzahl
Nal/Nal ^R	Nalidixin/Nalidixin-Resistenz
NBM	Neugeborenenmeningitis
OD...	optische Dichte bei ... nm
ORF	offener Leserahmen (“open reading frame”)

p	piko (10^{-12})
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI	Pathogenitätsinsel
PAMPs	“pathogen associated molecular patterns”
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	“polymerase chain reaction”
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
pIgR	Poly-Immunglobulin-Rezeptor
Rif/Rif ^R	Rifampicin/Rifampicin-Resistenz
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEPEC	sepsis auslösende <i>E. coli</i>
Sm/Sm ^R	Streptomycin/Streptomycin-Resistenz
spp.	Spezies
SSC	Standard-Saline-Citrat
Stx	Shiga-Toxin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris gepufferte Saline
Tc/Tc ^R	Tetrazyklin/Tetrazyklin-Resistenz
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TPE	Tris-Phosphat-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN/ÜNK	Übernacht/Übernachtkultur
UPEC	uropathogene <i>E. coli</i>
UTI	Urogenitaltraktinfektion
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
x g	fache Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactosid
z. B.	zum Beispiel

8.4 Publikationen

8.4.1 Originalarbeiten

1. **Donohue-Rolfe, A., Kondova, I., Oswald, S., Hutto, D. and Tzipori, S.** (2000) *Escherichia coli* O157:H7 strains that express Shiga toxin (Stx) 2 alone are more neurotropic for gnotobiotic piglets than are isotypes producing only Stx1 or both Stx1 and Stx2. *J. Infect. Dis.* **181**: 1825-1829.
2. **Blum-Oehler, G.*, Oswald, S.*, Eiteljörge, K., Sonnenborn, U., Schulze, J., Kruis, W. and Hacker, J.** (2003) Development of strain-specific PCR reactions for the detection of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 in fecal samples. *Res. Microbiol.* **154**: 59-66.
* Diese Autoren sind gleichberechtigt
3. **Altenhoefer, A., Oswald, S., Sonnenborn, U., Enders, C., Schulze, J., Hacker, J. and 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.

8.4.2 Tagungsbeiträge

Die Kurzfassungen sind in den jeweiligen Tagungsbänden abgedruckt.

1. **Oswald, S., Ölschläger, T. A., Mühldorfer, I., Fuchs, S. and Hacker, J.** (2000) Construction and expression of truncated and detoxified antigens from enterohemorrhagic *E. coli* serogroup O157:H7. FORGEN-Symposium: "Genes for Therapy and Prevention of Disease" vom 12.-14.10.2000 in Wildbad Kreuth.
2. **Dobrindt, U., Fuchs, S., Oswald, S., Emödy, L., Uhlin, B.-E., Goebel, W. and Hacker J.** (2001) Influence of the *leuX*-encoded tRNA_{5^{Leu}} on toxin gene expression in pathogenic *Escherichia coli*. ETOX 10-Meeting vom 24.-29.06.2001 in Barvaux, Belgien.
3. **Oswald, S., Blum-Oehler, G., Ölschläger, T. A. and Hacker, J.** (2002) Indigenous plasmids of the probiotic *Escherichia coli* strain DSM 6601: detection of DSM 6601 and expression of foreign antigens. FORGEN-Symposium: "Genes for Therapy and Prevention of Disease" vom 21.-23.02.2002 auf Kloster Banz, Staffelstein.
4. **Blum-Oehler, G., Oswald, S., Eiteljörge, K., Enders, C., Sonnenborn, U., Kruis, W. and Hacker, J.** (2003) Specific detection of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 in fecal samples. "Digestive Disease Week" vom 17.-22.05.2003 in Orlando, USA.

5. **Oswald, S., Altenhoefer, A., Blum-Oehler, G., Enders, C., Sonnenborn, U., Oswald, I., Hacker, J. and Oelschlaeger, T.** (2003) Development of a live vaccine carrier based on the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917: Employment of its own cryptic plasmids as cloning vectors. 55. DGHM-Tagung vom 29.09.-01.10.2003 in Dresden.
6. **Blum-Oehler, G., Oswald, S., Eiteljörge, K., Enders, C., Sonnenborn, U., Kruis, W. and Hacker, J.** (2003) Specific detection of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 in fecal samples. 55. DGHM-Tagung vom 29.09.-01.10.2003 in Dresden.
7. **Altenhoefer, A., Oswald, S., Sonnenborn, U., Enders, C., Schulze, J., Hacker, J. and Oelschlaeger, T. A.** (2004) The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens. “2nd International Conference: Strategies for Immune Therapy” vom 29.02.-03.03.2004 in Würzburg.
8. **Altenhoefer, A., Oswald, S., Homburg, S., Grozdanov, L., Sonnenborn, U., Enders, C., Schulze, J., Hacker, J. and Oelschlaeger, T. A.** (2004) Characteristics and applications of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. “2nd International Conference: Strategies for Immune Therapy” vom 29.02.-03.03.2004 in Würzburg.
9. **Altenhoefer, A., Buchrieser, C., Oswald, S., Sonnenborn, U., Enders, C., Schulze, J., Hacker, J. and Oelschlaeger, T. A.** (2005) Identification of the genetic determinant of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 responsible for interference with invasion of gut epithelial cells by various pathogenic bacteria. 2. Gemeinsamer Kongress der DGHM und VAAM vom 25.-28.09.2005 in Göttingen.
10. **Altenhöfer, A., Buchrieser, C., Oswald, S., Hacker, J. and Ölschläger, T. A.** (2005) Identification of the genetic determinant of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 responsible for interference with invasion of gut epithelial cells by various pathogenic bacteria. “forimmun-Symposium: Advances in Immunotherapy” vom 03.-05.10.2005 in Feldkirchen-Westerham.

8.4.3 Patent

Patentnummer: 103 28 669

Patentbezeichnung: Plasmidfreier Klon des *E. coli* Stammes DSM 6601

IPC: C12N 1/00

Patentinhaber: Pharma-Zentrale GmbH, Herdecke

Erfinder: Hacker, J., Oelschlaeger, T., Oswald, S., Sonnenborn, U., Proppert, H.

8.5 Lebenslauf

Name: Sibylle Irmgard Oswald

Geburtsdatum: 10.08.1971

Geburtsort: Würzburg

Ausbildung:

1977 - 1981 Grundschule in Würzburg

1981 - 1990 Riemenschneider-Gymnasium in Würzburg

1990 Allgemeine Hochschulreife

1991 - 1997 **Studium der Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

1994 Diplomvorprüfung im wissenschaftlichen Studiengang Biologie in den Fächern Botanik, Zoologie, Anorganische Chemie und Mathematik

1996 Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Zoologie (mit Schwerpunkt Zell- und Entwicklungsbiologie) und Humangenetik

1996 - 1997 Experimentelle Diplomarbeit am Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg in der Abteilung von Prof. Dr. J. Hacker unter der Anleitung von Dr. I. Mühldorfer (Titel: "Einführung von Virulenz-assoziierten Antigenen in den *Escherichia coli*-Carrier-Stamm DSM 6601")

1997 - 1998 Forschungsaufenthalt an der TUFTS University School of Veterinary Medicine, North Grafton, Massachusetts, USA, bei Prof. Dr. A. Donohue-Rolfe

seit Juni 1998 **Dissertation am Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

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

Krankheitsbedingte Unterbrechung der Dissertation (von November 2002 bis Mai 2005)