

Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
Fakultät für Biologie  
Institut für Molekulare Infektionsbiologie

**Funktionale Charakterisierung an der Biofilmbildung  
beteiligter Faktoren pathogener und kommensaler  
*Escherichia coli***

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

vorgelegt von

**Sebastian Reidl**

aus Blankenburg (Harz)

---

Würzburg, Januar 2009

**Eingereicht am:**

**Mitglieder der Promotionskommission**

Vorsitzender:

Erstgutachten: Prof. Dr. Drs. h.c. Jörg Hacker (*Robert Koch-Institut, Berlin*)

Zweitgutachten: Prof. Dr. M. Alexander Schmidt (*Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung, Institut für Infektiologie, Münster*)

**Tag des Promotionskolloquiums:**

**Doktorurkunde ausgehändigt am:**

## Erklärung

Gemäß § 4 Abs. 3 Ziff. 3, 5 und 8 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der *Julius-Maximilians-Universität Würzburg* vom 15. März 1999

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen sowie Hilfsmittel benutzt habe. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Des weiteren erkläre ich, daß ich – neben dem Titel *Diplom-Biologe* (Univ.) – bisher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Juli 2004 bis März 2008 am Lehrstuhl für *Molekulare Infektionsbiologie* der *Julius-Maximilians-Universität Würzburg*. An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank an den (ehemaligen) Leiter des Instituts, Herrn Prof. Dr. Drs. h.c. Jörg Hacker, aussprechen, da er es mir ermöglichte, dieses interessante Thema zu bearbeiten. Herrn Prof. Dr. M. Alexander Schmidt von der *Westfälischen Wilhelms-Universität Münster* danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Meinem Betreuer und Mentor, PD Dr. Ulrich Dobrindt, bin ich zu großem Dank verpflichtet, da seine kostbare Zeit, immerwährende Geduld und Motivation wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ich danke ihm gleichermaßen für sein unermüdliches Fordern und Fördern.

Ein großes Dankeschön gilt Frau Dr. Dörte Becher (*Institut für Mikrobiologie, Ernst Moritz Arndt-Universität Greifswald*), die für mich die massenspektrometrischen Analysen durchführte.

Ich bedanke mich außerdem bei Herrn Prof. Dr. Georg Krohne und seinen Mitarbeiterinnen Daniela Bunsen, Elisabeth Meyer-Natus sowie Eva-Maria Muth vom *Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften* (Universität Würzburg), die mir am Rasterelektronenmikroskop hilfreich zur Seite standen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei der gesamten „Besatzung“ des Labors A109, der *E. coli*-Arbeitsgruppe sowie allen anderen Mitarbeitern und Kollegen des *ZINF/IMIB* für die nette Zusammenarbeit und große Hilfsbereitschaft bedanken.

Ein herzliches Dankeschön richte ich hierbei an PD Dr. Heike Bruhn für das gemeinsame Bezwingen so mancher Antigen 43-Moleküle sowie an Dr. A. Salam Khan für seine methodische Unterstützung nebst Antikörper. Dr. Gabriele Blum-Oehler und Dr. Andreas Demuth vom *Network of Excellence "EuroPathoGenomics"* möchte ich für die Finanzierung meiner Dienstreisen und die mir damit ermöglichte Teilnahme an Kongressen sowie den ausgezeichneten *NoE*-Workshops danken.

Meiner Kollegin und treuen Weggefährtin Barbara Plaschke gebührt außerordentlicher Dank. Während der gesamten Zeit begleitete sie mich und meine Arbeit und war mir dabei eine wertvolle Hilfe. Ich danke Barbara herzlich fürs „Mitfiebern & Mitforschen“, für die Motivierung sowie für die vielen, lehrreichen und praktischen Erfahrungen, die ich in humorvoller Atmo-

sphäre sammeln konnte. Dank ihr erhielt ich zudem noch Einblicke in die unterfränkische Mund- und Lebensart inklusive landwirtschaftlichem Arbeiten. Obwohl Barbara permanent über ihre Hälfte der Laborbank hinaus gearbeitet hat, leistete sie einen nicht unerheblichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit. Ich konnte mich glücklich schätzen, neben einer solch kompetenten und aufrichtigen Kollegin arbeiten zu dürfen.

Zuletzt möchte ich meiner engsten Familie und Freundin danken, ohne deren finanzielle sowie moralische Unterstützung mein Promotionsstudium und das Anfertigen dieser Dissertation nicht möglich gewesen wären.

*„Vergessen wir nicht, daß auch uns die Bakterien – von der anderen  
Seite des Mikroskops – betrachten.“*

Stanisław Jerzy Lec  
(1909-1966)



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>Seite V</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>1. Zusammenfassung / Summary</b>	<b>1 / 3</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>5</b>
2.1. Bakterielle Biofilme	5
2.2. Uropathogene <i>Escherichia coli</i> (UPEC) und Harnwegsinfektionen	7
2.3. Adhäsine als Virulenzfaktoren uropathogener <i>Escherichia coli</i>	8
2.4. Das Autoporterprotein Antigen 43 (Ag43)	11
2.4.1. Prozessierung von Antigen 43	11
2.4.2. Regulation der <i>agn43</i> -Expression	13
2.5. Posttranslationale Glykosylierung	15
2.6. Der uropathogene <i>Escherichia coli</i> Stamm 536	17
2.7. Der kommensale <i>Escherichia coli</i> Stamm Nissle 1917	18
2.8. Aufgabenstellung und Zielsetzung	19
<b>3. Material</b>	<b>21</b>
3.1. Mikroorganismen	21
3.2. Plasmide	23
3.3. Oligonukleotide	24
3.4. FISH-Sonden	25
3.5. Antikörper	26
3.6. Größen- & Molekulargewichtsmarker	27
3.7. Eukaryontische Zellen	28
3.8. Kultivierung von Mikroorganismen	28
3.8.1. Medien & Nährböden	28
3.8.2. Medienzusätze	29
3.9. Zellkulturmedien	30
3.10. Puffer & Lösungen	31
<b>4. Methoden</b>	<b>37</b>
4.1. Isolierung von Plasmid-DNA	37
4.1.1. Mini-Präparation	37
4.1.2. Midi-Präparation	37
4.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38
4.3. Agarosegel-Elektrophorese	39
4.4. Aufreinigung von DNA	39
4.4.1. Extraktion mit Phenol/Chloroform	39
4.4.2. Ethanolfällung	39
4.4.3. Geextraktion	40

4.5. DNA-Restriktion	40
4.6. Ligation von DNA-Fragmenten (Klonierung)	40
4.7. Transformation von Bakterien	41
4.7.1. Präparation kompetenter Bakterienzellen	41
4.7.1.1. CaCl <sub>2</sub> -Methode	41
4.7.1.2. Elektrokompente Zellen	41
4.7.2. Transformation	41
4.7.2.1. Hitzeschock	41
4.7.2.2. Elektroporation	42
4.8. DNA-Sequenzierung	42
4.9. Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH)	43
4.9.1. Fixierung	43
4.9.2. <i>in situ</i> -Hybridisierung	43
4.10. <i>in silico</i> -Analysen	44
4.11. Isolierung von Proteinen	45
4.11.1. Gesamtzellextrakt	45
4.11.2. Hitzeextraktion	45
4.11.3. Überexpression rekombinanter Proteine	45
4.12. Aufreinigung von Proteinen	46
4.12.1. Fällung mit Trichloressigsäure	46
4.12.2. Chromatographische Proteinaufreinigungen	46
4.12.2.1. Metallchelate-Affinitätschromatographie	46
4.12.2.1.1. Ni <sup>2+</sup> -Affinitätschromatographie mit Protino® Ni 2000-Säulen	46
4.12.2.1.2. Ni <sup>2+</sup> -Affinitätschromatographie mit Profinity™ IMAC-Säulen	47
4.12.2.1.3. Ni <sup>2+</sup> -Affinitätschromatographie mit HisTrap FF-Säulen	47
4.12.2.2. Ionenaustausch-Chromatographie	48
4.13. Aufkonzentrierung von Proteinen	48
4.14. Dialyse	49
4.15. Quantitative Proteinbestimmung	49
4.16. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
4.17. Färbung von Polyacrylamidgelen	50
4.18. Herstellung von Antikörpern	50
4.19. Immunnachweisverfahren	51
4.19.1. <i>Western Blot</i>	51
4.19.1.1. Proteintransfer (' <i>Semidry Blot</i> ')	51
4.19.1.2. Immundetektion	52
4.19.2. Detektion von Glykokonjugaten	52
4.20. Zellkultur	53
4.21. Mikroskopie	53
4.21.1. Lichtmikroskopische Färbungen	53

4.21.2. Elektronenmikroskopie	53
4.21.2.1. Präparation der Proben (Fixierung, Entwässerung)	53
4.21.2.2. Kritischer Punkt-Trocknung	54
4.21.2.3. <i>Sputtern</i>	54
4.21.2.4. Rasterelektronenmikroskopie	54
4.22. Bindungsstudien	54
4.22.1. Autoaggregation	55
4.22.2. Zelladhäsionstest	55
4.22.3. <i>Overlay assay</i>	56
4.22.3.1. Präparation eukaryontischer Zellmembranen	56
4.22.3.2. Biotinylierung von Membranproteinen	56
4.22.3.3. Bakterieller <i>Overlay</i>	57
4.22.3.4. Protein- <i>Overlay</i>	57
4.22.3.5. Detektion von Protein-Protein-Interaktionen	57
4.22.3.6. Proteinidentifizierung durch Massenspektrometrie	58
4.22.4. Anreicherung von Ag43 <sup>α</sup> -Liganden durch Affinitätschromatographie	58
4.22.4.1. Präparation Oberflächen-assoziiertes Proteine von Epithelzellen	58
4.22.4.2. Kopplung des Liganden an eine Affinitätssäule	59
4.22.4.3. Anreicherung von Ag43a-536 <sup>α</sup> -Interaktionspartnern	59
4.22.5. Nachweis von Ag43 <sup>α</sup> -Interaktionspartnern durch ELISA	60
4.23. Polymerisation von Autotransporterproteinen	61
<b>5. Ergebnisse</b>	<b>62</b>
5.1. Vergleich der Aminosäuresequenzen der Antigen 43 <sup>α</sup> -Varianten	62
5.2. Herstellung rekombinanten Antigen 43	65
5.3. Funktionale Charakterisierung der Antigen 43-Varianten	68
5.3.1. Expression verschiedener <i>agn43</i> -Allele	68
5.3.2. Antigen 43-vermittelte Autoaggregation	70
5.3.3. Adhäsion an eukaryontische Zellen	72
5.4. Identifizierung möglicher eukaryontischer Rezeptoren von Antigen 43	76
5.4.1. <i>Overlay assays</i>	76
5.4.2. Bindung von Antigen 43 an Proteine der extrazellulären Matrix	78
5.5. Untersuchungen zur Immunogenität von Antigen 43	81
5.6. Polymerisation von Autotransporterproteinen	83
5.7. rRNA-gerichtete Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung zur Differenzierung von Harnwegserregern	85
5.8. Biofilmbildung auf Kathetern	87
<b>6. Diskussion</b>	<b>89</b>
6.1. Strukturelle Untersuchungen der Antigen 43 <sup>α</sup> -Varianten	89
6.1.1. Primärstruktur	89
6.1.2. Sekundärstruktur	91
6.1.3. Posttranslationale Modifikationen	91

6.2. Überexpression rekombinanten Antigen 43 <sup>α</sup>	92
6.3. Funktionale Charakterisierung von Antigen 43	93
6.3.1. Klonierung und Expression der <i>agn43</i> -Allele	94
6.3.2. Autoaggregation von <i>Escherichia coli</i> MG1655 $\Delta fim\Delta flu$	95
6.3.3. Antigen 43-vermittelte Adhäsion von <i>Escherichia coli</i> MG1655 $\Delta fim\Delta flu$ an eukaryontische Zellen	96
6.3.4. Die Bedeutung des Antigen 43 als autoaggregativer Faktor und als Adhäsion	98
6.4. Identifizierung eukaryontischer Interaktionspartner von Antigen 43	99
6.4.1. Interaktion des Antigen 43 mit epithelialen Membranproteinen in 'overlay assays'	99
6.4.2. Antigen 43-vermittelte Adhäsion von <i>Escherichia coli</i> MG1655 $\Delta fim\Delta flu$ an extrazelluläre Matrixproteine	100
6.5. Immunogenität von Antigen 43	102
6.6. Polymerisation von Antigen 43 <sup>α</sup>	103
6.7. Differenzierung uropathogener Mikroorganismen mittels rRNA-gerichteter Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	104
6.8. Biofilmbildung	105
6.9. Antigen 43 – Virulenz- oder Fitneßfaktor bei <i>Escherichia coli</i> ?	106
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>108</b>
<b>8. Anhang</b>	<b>121</b>
8.1. Abkürzungsverzeichnis	121
8.2. Sequenzen	126
8.2.1. Ag43a-536	126
8.3. Plasmidkarten	129
8.3.1. pASK75-6xhis-agn43a-536 <sup>α</sup>	129
8.3.2. pET-28a-6xhis-agn43a-536 <sup>α</sup>	130
8.3.3. pANL1	130
8.3.4. pANL2	131
8.3.5. pANL4	131
8.4. Publikationsliste	132
8.4.1. Veröffentlichungen	132
8.4.2. Posterpräsentationen	132
8.4.2.1. Tagungsbeiträge	132
8.4.2.2. Workshops	133
8.5. Lebenslauf	134

## Abbildungsverzeichnis

2.1:	Die fünf Phasen der Biofilmentwicklung.	Seite 6
2.2:	Prozessierung des Autotransporterproteins Antigen 43 (Ag43).	12
2.3:	Phasenvariable Expression von <i>agn43</i> .	14
2.4:	Virulenzfaktoren des uropathogenen <i>Escherichia coli</i> Stammes 536.	17
2.5:	Fitneßfaktoren des kommensalen <i>Escherichia coli</i> Stammes Nissle 1917.	19
3.1:	Elektrophorese-Marker.	27
5.1:	Ableich der primären Aminosäuresequenzen der Ag43 <sup>α</sup> -Varianten.	64
5.2:	Reinigung der α-Domäne von Antigen 43a-536.	67
5.3:	Expression verschiedener <i>agn43</i> -Allele durch <i>E. coli</i> K-12-Stamm MG1655 $\Delta fim\Delta flu$ .	69
5.4:	Beitrag verschiedener Antigen 43-Varianten zur Autoaggregation von <i>E. coli</i> K-12-Stamm MG1655 $\Delta fim\Delta flu$ .	70
5.5:	Antigen 43-vermittelte Autoaggregation.	71
5.6:	Antigen 43-vermittelte Adhäsion an eukaryontische Zelllinien.	73
5.7:	Beitrag verschiedener Antigen 43-Varianten zur Adhäsion von <i>E. coli</i> K-12-Stamm MG1655 $\Delta fim\Delta flu$ an eukaryontische Zellen.	75
5.8:	Detektion von Rezeptoren bei der Ag43-vermittelten Adhäsion an Strukturen eukaryontischer Zellmembranen.	77
5.9:	Nachweis der Expression von YadA in <i>E. coli</i> K-12-Stamm MG1655 $\Delta fim\Delta flu$ ( <i>Western Blot</i> ).	79
5.10:	Ag43-vermittelte Adhäsion an Komponenten der extrazellulären Matrix.	80
5.11:	Nachweis von α-Ag43 <sup>α</sup> IgG im Serum von Patienten, die an einer UPEC-assoziierten Harnwegsinfektion litten.	82
5.12:	Nachweis sekretierter Autotransporterproteine.	84
5.13:	rRNA-gerichtete Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH).	86
5.14:	<i>In vitro</i> -Biofilmbildung verschiedener, pathogener Mikroorganismen auf Harnwegskathetern.	88
6.1:	Interzelluläre Ag43-Ag43-Interaktion.	95
8.1:	pASK75-6xhis-agn43a-536 <sup>α</sup> .	129
8.2:	pET-28a-6xhis-agn43a-536 <sup>α</sup> .	130
8.3:	pANL1.	130
8.4:	pANL2.	131
8.5:	pANL4.	131

## Tabellenverzeichnis

2.1:	Adhärenzfaktoren uropathogener <i>Escherichia coli</i>	Seite 9
2.2:	Mechanismen der Phasen- und Antigenvariation bei <i>Escherichia coli</i>	13
2.3:	Virulenz-assoziierte Glykoproteine von humanpathogenen Erregern	16
2.4:	Antigen 43-Varianten	20
3.1:	<i>Escherichia coli</i> -Stämme	21
3.2:	Mikroorganismen (Teststämme) zur Untersuchung der Biofilmbildung und zur Testung rRNA-spezifischer Oligonukleotidsonden	22
3.3:	Plasmide und Vektoren	23
3.4:	Oligonukleotide	24
3.5:	FISH-Sonden	25
3.6:	Antikörper und Seren	26
3.7:	Zelllinien	28
4.1:	NaCl-Konzentration des FISH-Waschpuffers	44
4.2:	HisTrap FF, Aufreinigungsprotokoll	47
4.3:	UNO™ Q-1, Aufreinigungsprotokoll	48
4.4:	PAA-Gele, Zusammensetzung	50
4.5:	Proteintransfer im 'Semidry Blot'-Verfahren, Aufbau	51
4.6:	Arbeitsschritte bei der Proteintrennung durch HiTrap NHS-aktivierte HP-Säulenchromatographie	59
4.7:	Immunabsorptionstest, getestete Proteine	61
6.1:	Vergleich der Primärstruktur der Ag43 <sup>α</sup> -Varianten, Identitäten in Prozent	90
6.2:	Grad der Ag43-vermittelten Autoaggregation von <i>E. coli</i> MG1655 $\Delta fim \Delta flu$ während 24 Stunden im Vergleich zur AIDA-I-Positivkontrolle	96

# 1. Zusammenfassung

Multizelluläre Gemeinschaften in Form bakterieller Biofilme stellen aus medizinischer Sicht ein großes klinisches Problem dar. Häufig lassen sich chronische oder rezidivierende Erkrankungen aber auch nosokomiale Infektionen auf die multizelluläre Lebensweise von humanpathogenen Erregern zurückführen. Sowohl fakultativ als auch obligat pathogene *Escherichia coli*-Stämme besitzen eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren, die die Biofilmbildung beeinflussen. Daran beteiligt sind unter anderem Flagellen, extrazelluläre polymere Substanzen, Adhäsine oder Oberflächen-assoziierte Proteine wie Autotransporter.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die funktionale Charakterisierung des Proteins Antigen 43 (Ag43). Aufgrund seiner Autoaggregation-vermittelnden Eigenschaft trägt Ag43 ebenfalls zur Mikrokoloniebildung und Biofilmreifung bei. Antigen 43 ist ein Autotransporterprotein, welches innerhalb der Bakterienspezies *Escherichia coli* weit verbreitet ist. Interessanterweise besitzen viele *E. coli*-Isolate gleich mehrere identische oder ähnliche Kopien von *agn43*, die in der Regel von variablen Genombereichen (genomische Inseln, Plasmide) kodiert werden. Am Beispiel der Antigen 43-Varianten des uropathogenen *Escherichia coli* (UPEC)-Stammes 536 (O6:K15:H31), des kommensalen *E. coli* Isolats Nissle 1917 (O6:K5:H1) sowie des *E. coli* K-12-Laborstammes MG1655 (OR:H48:K-) ist die Bedeutung des Autotransporterproteins im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht worden. Hierfür wurden die verschiedenen *agn43*-Allele in ein geeignetes Vektorsystem kloniert und im Adhäsin-freien *Escherichia coli* K-12-Stamm MG1655  $\Delta fim \Delta flu$  exprimiert. Da Antigen 43 in Wildtypstämmen posttranslational glykosyliert vorliegt, sind die Experimente zusätzlich unter Einfluß der heterologen, AIDA-I-spezifischen Heptosyltransferase Aah (*'Autotransporter Adhesin Heptosyltransferase'*) durchgeführt worden.

Anhand von Bindungsstudien (intermolekulare Autoaggregation, Zelladhäsionstests) wurde gezeigt, daß sich einzelne Ag43-Varianten teilweise in ihren Eigenschaften unterscheiden. Im direkten Vergleich mit AIDA-I (*'Adhesin Involved in Diffuse Adherence'*) enteropathogener *Escherichia coli* (EPEC) konnte für Ag43 nur eine Funktion als schwaches Adhäsिन nachgewiesen werden. Die heterologe O-Glykosylierung beeinflusste die Funktionalität des Antigen 43 in unterschiedlichem Ausmaß. Je nach Autotransporter-Variante führte die Heptosylierung entweder zu signifikant reduzierten Affinitäten, oder sie hatte keinen Effekt auf die Bindungskapazität des Ag43.

Antigen 43 weist zudem strukturelle Homologien zu vergleichbaren Domänen anderer Autotransporter auf. Für viele dieser Proteine konnte bereits eine adhäsive oder invasive Funktion nachgewiesen werden. Eine mögliche Interaktion von Ag43 mit eukaryontischen Rezeptoren ist hingegen noch nicht bzw. nur unvollständig untersucht worden. In *Overlay assays* und ELISAs wurde für Antigen 43 hier erstmals die spezifische Bindung an die

extrazellulären Matrixkomponenten Kollagen und Laminin gezeigt.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, daß das *Escherichia coli*-spezifische Autoporterprotein Antigen 43 nicht nur an der bakteriellen Biofilmbildung, sondern auch an der Besiedlung epithelialer Gewebe beteiligt sein kann. Seine Expression verschafft Bakterien einen Kolonisationsvorteil, der mit erhöhter Fitness einhergeht. Die Aah-vermittelte O-Glykosylierung scheint für die Funktionalität von Ag43 nicht zwingend erforderlich zu sein.

Des Weiteren ist im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Testsystem entwickelt worden, das auf der Basis von Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen (FISH) die Differenzierung von verschiedenen (uro-)pathogenen Mikroorganismen ermöglicht. Das etablierte Protokoll eignet sich nicht nur für die diagnostische Erregeridentifizierung, sondern auch in Abhängigkeit des Probenmaterials zur Untersuchung von (Multispezies-)Biofilmen.

## 1. Summary

Bacteria living in multicellular communities, i.e. biofilms, have evolved into a major health problem. Most chronic or recurrent diseases including nosocomial infections can be traced back to the multicellular lifestyle of pathogenic agents. Both facultative and obligate pathogenic strains of *Escherichia coli* express a multitude of diverse factors contributing to biofilm formation like flagella, extracellular polymeric substances, adhesins, or surface-exposed proteins, e.g. autotransporters.

This work presents the functional characterization of the surface-associated protein antigen 43 (Ag43). Due to its autoaggregating phenotype, Ag43 is also involved in the formation of microcolonies and biofilms. Antigen 43 represents an autotransporter protein frequently expressed by all *Escherichia coli* pathotypes. Interestingly, many *E. coli* isolates encode multiple identical or orthologous copies of *agn43* which are usually associated with mobile genetic elements (genomic islands, plasmids). Here, the antigen 43 variants of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strain 536 (O6:K15:H31), commensal isolate *E. coli* Nissle 1917 (O6:K5:H1), and *E. coli* K-12 strain MG1655 (OR:H48:K-) have been analyzed. For this purpose, the different *agn43*-alleles were cloned into a capable vector system and subsequently expressed in *Escherichia coli* K-12 strain MG1655  $\Delta fim \Delta flu$  lacking the genes encoding type 1-fimbrial adhesins (*fim*) and antigen 43 (*flu*). Due to the occurrence of posttranslational glycosylation of Ag43 in wild type strains, experiments were additionally carried out upon co-expression of the heterologous AIDA-I-specific heptosyl transferase Aah (*Autotransporter Adhesin Heptosyltransferase*).

On the basis of binding studies (intermolecular autoaggregation, adhesion to eukaryotic cells) individual properties could be detected for each Ag43-variant. However, compared to AIDA-I (*Adhesin Involved in Diffuse Adherence*) of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) strains, antigen 43 was shown to act as a weak adhesin. Additionally, O-glycosylation partly influenced protein functions. Depending on the variant tested, posttranslational modification by Aah either resulted in significantly reduced affinities or had no effect on the binding capacity of Ag43. Furthermore, antigen 43 exhibits structural homologies compared to certain domains of related autotransporters. For many of these proteins, an adhesion- or invasion-mediating function could be demonstrated. To date, the interaction of Ag43 with a putative eukaryotic receptor has not been determined, yet. Here, it is shown for the first time that antigen 43 specifically binds to components of the extracellular matrix. Overlay assays and ELISAs identified collagen and laminin as epithelial receptors for Ag43.

Taken together, the results obtained in this study confirm the functional role of antigen 43 in biofilm formation as well as its effect during bacterial colonization of epithelial tissues. Expression of the *Escherichia coli*-specific autotransporter protein is directly correlated to the

improved fitness of bacteria infecting the human host. Aah-mediated *O*-glycosylation seems not to be strictly required for the function of Ag43.

The second aim of this work was the design and development of a test system which can be used for the differentiation of (uro-)pathogenic microorganisms in biofilms. For this purpose, the FISH (Fluorescence-*in-situ*-Hybridization)-technique has been optimized for diagnostic applications. Depending on the specimen, the protocol can also be adapted to the analysis of (multispecies) biofilms.

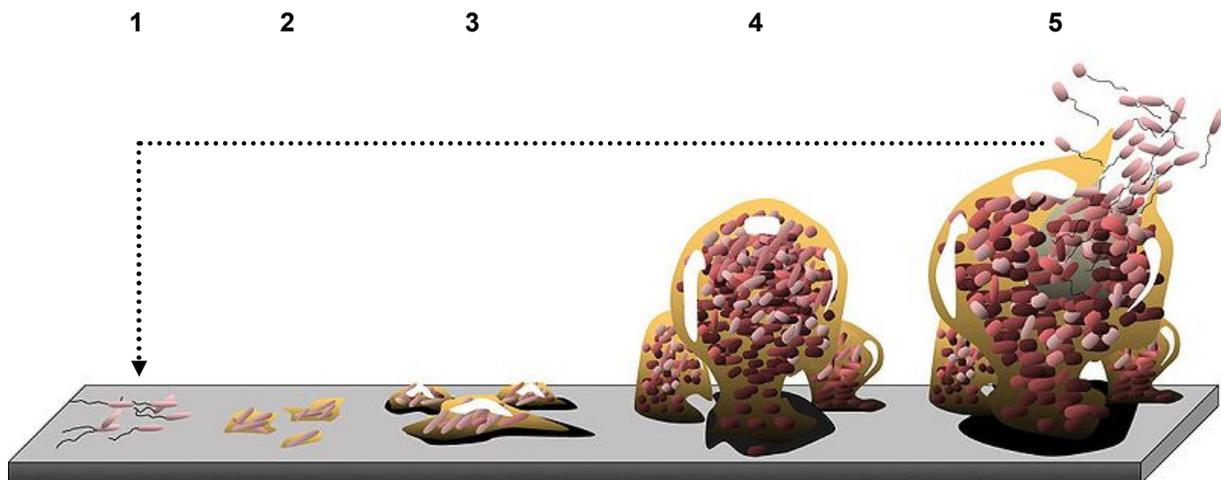
## 2. Einleitung

### 2.1. Bakterielle Biofilme

Bakterielle Biofilme werden definiert als eine multizelluläre Gemeinschaft sessiler Mikroorganismen, die an (a-)biotischen Oberflächen adhären und von einer polymeren Matrix umgeben sind (Costerton *et al.*, 1995). Hierbei kann es sich um Gemeinschaften aus einer oder sogar mehreren Spezies handeln (Davey & O'Toole, 2000). Die extrazelluläre Matrix besteht aus einer komplexen Mischung unterschiedlicher, langkettiger Makromoleküle wie Exopolysaccharide, Proteine oder DNA, aber auch nichtzelluläre Komponenten (mineralische Kristalle, Bodenpartikel, Blutbestandteile) sind je nach Umgebung enthalten und tragen zur Struktur des Biofilms bei (Donlan, 2002).

Biofilme kommen ubiquitär auf fast allen natürlichen Oberflächen vor und besitzen eine große ökologische, industrielle sowie medizinische Bedeutung. Sie sind unter anderem am *Biofouling*, Biokorrosionen, (globalen) Stoffkreisläufen oder biotechnologischen Fermentationsprozessen beteiligt (Davey & O'Toole, 2000). Bakteriengemeinschaften, die unmittelbar eine interspezifische Wechselbeziehung mit dem Menschen eingehen, bilden die physiologische Normalflora in unterschiedlichen Körperbereichen und nehmen dort wichtige kommensale oder mutuelle Funktionen wahr (Hacker & Heesemann, 2000).

Der Übergang von der planktonischen in die sessile bzw. Biofilm-assoziierte Lebensweise ist mit weitreichenden, genotypischen und phänotypischen Veränderungen verbunden. Um sich den neuen Ansprüchen einer synergistischen Koexistenz mit anderen Mikroorganismen anzupassen, werden relevante Gene der Zellmorphologie, des Stoffwechsels und des *Quorum sensings* exprimiert (Watnick & Kolter, 2000). Prinzipiell kann die Biofilmbildung in fünf aufeinanderfolgende Phasen unterteilt werden (Abb. 2.1). In der ersten Phase kommt es zu einer reversiblen Anlagerung an (an-)organische Oberflächen. Anschließend erfolgt durch die Produktion von Exopolysacchariden die Konditionierung des anzuhaftenden Substrats, auf dem sich infolge erhöhter Zellteilungsrate und der Expression von Adhäsinen Mikrokolonien bilden. Im weiteren Verlauf reifen die Mikrokolonien zu komplexen, dreidimensionalen (pilzförmigen) Strukturen heran, die von wassergefüllten Kanälen durchzogen sind. Das Kanalsystem gewährleistet unter anderem die Versorgung tiefliegender Zellen mit Nährstoffen und den Transport von Stoffwechselmetaboliten. Die Einbettung der Mikroorganismen in die extrazelluläre Matrix verleiht dem Biofilm zugleich eine erhöhte Resistenz gegenüber äußeren Umwelteinflüssen. Verschiedene, größtenteils unbekanntes Signale führen zum Herauslösen einzelner Bakterien aus dem Zellverband und ermöglichen durch deren Rückkehr in die planktonische Lebensweise die Ausbreitung und Etablierung neuer Biofilme. Während des gesamten Prozesses der Biofilmmreifung sind intermolekulare Zell-



**Abb. 2.1: Die fünf Phasen der Biofilmentwicklung.** [1] Initiale Anhaftungsphase; [2] irreversible Bindung an die Oberfläche; [3] Bildung von Mikrokolonien; [4] Biofilmreifung unter Bildung der extrazellulären Matrix; [5] Biofilmstreuung durch Herauslösen einzelner Mikroorganismen oder Biofilmteile (Bildnachweis: Monroe, 2007; verändert vom Autor der vorliegenden Arbeit).

interaktionen auf der Grundlage von Adhäsinen von entscheidender Bedeutung (O'Toole *et al.*, 2000; Stanley & Lazazzera, 2004; Lazazzera, 2005).

Die Fähigkeit von Bakterien, Biofilme zu bilden, geht mit der Erhöhung ihrer Virulenz einher. So werden humanpathogene Erreger in multizellulären Gemeinschaften von den humoralen und zellulären Abwehrmechanismen des Immunsystems kaum erkannt. Zudem besteht eine erhöhte Unempfindlichkeit gegenüber Antibiotika. Ursachen für die schlechte Wirkung von antimikrobiellen Substanzen in Biofilmen sind die geringen Replikationsraten der Bakterien, ihr verminderter Stoffwechsel und die Adsorption der Antibiotika durch die katalytisch wirkende, extrazelluläre Matrix (Fux *et al.*, 2005). Typische Krankheitsbilder, die von Biofilm-assoziierten Erregern hervorgerufen werden, sind Otitis media, Pneumonie, Endokarditis oder Parodontitis (Costerton *et al.*, 1999). Hinzukommt, daß mehr als 60 % der nosokomialen Infektionen auf mikrobielle Biofilme zurückgeführt werden können (O'Toole *et al.*, 2000).

In diesem Zusammenhang stellt die Kolonisierung medizinischer Produkte und Instrumente durch Bakterien ein großes, klinisches Problem dar. Synthetische Materialien, wie sie für Implantate, Prothesen, Katheter oder Kontaktlinsen verwendet werden, bieten ideale Voraussetzungen für die Etablierung mikrobieller Gemeinschaften und verursachen dadurch sogenannte Fremdkörper-assoziierten Infektionen. Darüber hinaus werden (intrazelluläre) Biofilme für das Auftreten chronischer oder rezidivierender Erkrankungen des Urogenitaltrakts (Prostatitis, Zystitis) verantwortlich gemacht (Donlan & Costerton, 2002; Anderson *et al.*, 2004b).

## 2.2. Uropathogene *Escherichia coli* (UPEC) und Harnwegsinfektionen

Erregerbedingte, entzündliche Erkrankungen der Nieren und der ableitenden Harnwege zählen zu den häufigsten Infektionskrankheiten der Industrieländer. Die meisten dieser Erkrankungen sind auf einen Infekt mit Bakterien (Enterobakterien, Gram-positive Kokken), seltener auf Pilze, Chlamydien, Mykoplasmen oder Protozoen, zurückzuführen (Hautmann & Huland, 2006; Gerok *et al.*, 2007). Harnwegsentzündungen sind oft aufsteigende (aszendierende) Infektionen, bei denen die Erreger spontan oder durch Katheterisierung transurethral in die Harnblase gelangen. Je nach betroffener Region wird zwischen einer Urethritis, Zystitis bzw. Pyelonephritis unterschieden, die von schmerzhaften Symptomen begleitet werden. Harnwegsinfekte können jedoch auch asymptomatischer Natur sein (Bakteriurie) und bedürfen dann in der Regel keiner speziellen Antibiotikatherapie. In seltenen Fällen kommt es infolge einer Urosepsis oder Niereninsuffizienz zu besonders schweren, potentiell lebensgefährlichen Verläufen (Hahn *et al.*, 2005).

Aufgrund der Anatomie des weiblichen Urogenitaltrakts (kürzere Urethra) und der Hormonzyklen sind weit mehr Frauen aller Altersstufen von Harnwegsinfektionen betroffen als Männer. Über die Hälfte der Frauen leidet mindestens einmal im Leben an einer Zystitis. Infektionen der Harnwege gelten weltweit als die primäre Morbiditätsursache im ambulanten sowie stationären Pflegebereich. So schätzt man die Zahl der ärztlich zu behandelnden Fälle allein in Deutschland auf ungefähr zwei Millionen pro Jahr (Barnett & Stephens, 1997; Hacker & Heesemann, 2000). Damit stellen die erregerbedingten (nosokomialen) Harnwegserkrankungen die häufigste Indikation für eine antimikrobielle Chemotherapie dar. Begünstigt werden Harnwegsinfektionen unter anderem durch Anomalien der Harnwege, intraluminale Nieren- oder Blasensteine, Urinreflux, Prostatavergrößerungen, Tumore, Schwangerschaft, Blasenkatheter aber auch Diabetes mellitus (Hahn *et al.*, 2005).

Die Erreger von Harnwegsinfektionen entstammen in den meisten Fällen der körpereigenen Flora, insbesondere dem Darm oder einer mit Darmflora fehlbesiedelten Vagina. Etwa 80 % aller unkomplizierten und 40 % der kompliziert verlaufenden Harnwegsentzündungen werden von uropathogenen *Escherichia coli* (UPEC) verursacht. Im Unterschied zu apathogenen fäkalen *E. coli*-Stämmen exprimieren sie spezifische Virulenzfaktoren. Die Ansiedlung und das Aufsteigen uropathogener *E. coli* in die oberen Harnwegsorgane wird durch Faktoren wie Flagellen, Adhäsine, Zytotoxine, extrazelluläre Polysaccharidstrukturen sowie Eisenaufnahmesysteme erreicht (Hacker & Heesemann, 2000; Hahn *et al.*, 2005). Der wohl entscheidendste Schritt bei der Etablierung einer (persistierenden) Harnwegsinfektion ist die Anhaftung und Kolonisierung des Urothels. Hierbei sind interzelluläre Wechselwirkungen auf der Grundlage von Adhäsinen von zentraler Bedeutung. Adhärenz-vermittelnde Fimbrien und Nicht-Fimbrienadhäsine (NFAs) ermöglichen es UPEC-Stämmen, an distinkte Rezeptoren

der Wirtszelle zu binden, und anschließend zu Mikrokolonien auszureifen. Bei fortschreitendem Infektionsverlauf kommt es unter Umständen sogar zur Bildung intrazellulärer Biofilme (IBC; Mulvey *et al.*, 2001). Die Besiedlung epithelialer Gewebe und medizinischer Instrumente (z. B. Blasenkatheter) durch bakterielle Biofilme steht demzufolge im direkten Zusammenhang mit rezidivierenden bzw. chronisch verlaufenden Harnwegsinfektionen (Kau *et al.*, 2005).

### 2.3. Adhäsine als Virulenzfaktoren uropathogener *Escherichia coli*

Mikroorganismen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche eine Vielzahl unterschiedlicher Adhärenzfaktoren, die über spezifische Wechselwirkungen mit Molekülen (Rezeptoren) der Wirtszelle interagieren. Bakterien binden hauptsächlich an die membranständigen Glykokonjugate von Epithelzellen. Durch die Adhäsine und deren Spezifität für bestimmte Rezeptoren läßt sich unter anderem der Organotropismus mancher Erreger erklären. Die Anhaftung an (epitheliale) Gewebe verhindert zum einen das Ausschwemmen der Bakterien durch körpereigene Flüssigkeiten wie Blut, Urin oder Sekrete, zum anderen ermöglicht sie die zielgerichtete Sekretion von Toxinen und fördert die Invasion der Erreger in die Zelle bzw. in tieferliegende Gewebsschichten. Gleichzeitig wird auf der Seite des Wirtes eine Entzündungsreaktion ausgelöst, die mit den typischen Symptomen einer Infektion einhergeht. Somit stellt die Expression von Adhäsinen den wohl bedeutendsten Virulenzfaktor bei der frühen Pathogenese bakterieller Infektionskrankheiten dar (Virkola *et al.*, 1988; Mulvey *et al.*, 2000; Mulvey, 2002).

Zu den wichtigsten und am besten untersuchten Adhärenzfaktoren von Enterobakterien gehören die Fimbrien pathogener *Escherichia coli*. Fimbrien (Pili) sind filamentöse Organellen mit einer häufig distalen, Adhäsion-vermittelnden Untereinheit. Neben verschiedenen Fimbrientypen werden jedoch auch eine Reihe sogenannter Nicht-Fimbrienadhäsine (NFAs) exprimiert, die ebenfalls spezifisch mit unterschiedlichen Wirtszellrezeptoren interagieren. Für uropathogene *Escherichia coli*-Stämme konnte gezeigt werden, daß für die Etablierung einer Harnwegsinfektion Typ 1-, P-, S- sowie Dr-Fimbrien von entscheidender Bedeutung sind (Virkola *et al.*, 1988; Mulvey *et al.*, 2000; Mulvey, 2002). In der Tabelle 2.1 sind hierzu die wichtigsten Adhärenzfaktoren, die häufig mit UPEC-Isolaten assoziiert werden, zusammengefaßt.

Sowohl Fimbrien als auch Nicht-Fimbrienadhäsine tragen in unterschiedlichem Ausmaß zur Biofilmbildung bei. Bakterielle Gemeinschaften entstehen auf der Grundlage einer Anhaftung an (an-)organische Substratoberflächen und der sukzessiven Aneinanderlagerung weiterer Bakterienzellen unterstützt durch aggregative Faktoren (s. 2.1.). In diesem Zusammenhang

**Tabelle 2.1** Adhärenzfaktoren uropathogener *Escherichia coli*

	<b>Adhäsion</b>	<b>Bedeutung</b>	<b>kodierende Gene</b>	<b>Rezeptor</b>	<b>Zellspezifität</b>	<b>Klinik</b>	<b>Referenz</b>
<b>Fimbrienadhäsine</b>							
Typ 1-Fimbrien	FimH	Adhäsion, Invasion, Autoaggregation, Biofilmbildung	<i>fim</i>	$\alpha$ -D-Mannose, THP, Plasminogen, sigA, Kollagen I und IV, Laminin, Fibronektin	Blasen- und Nierenepithelzellen, Erythrozyten, Leukozyten, Bakterien, Implantate	Zystitis, Sepsis, Meningitis	1, 2, 3
P-(Pap/Prf)-Fimbrien	PapG	Adhäsion, Cytokin-Induktion	<i>pap</i>	$\alpha$ -D-Galaktopyranosyl-(1-4)- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (P-Antigen), Fibronektin	Nierenepithelzellen, Erythrozyten	Pyelonephritis	1, 2
S-(Sfa/Sfr)-Fimbrien*	SfaS	Adhäsion	<i>sfa</i>	Sialyl( $\alpha$ 2-3)galaktoside, Glykophorin, Plasminogenaktivator tPA	Blasen- und Nierenepithelzellen, Erythrozyten, Endothelzellen	aszendierende HWI, Pyelonephritis, Sepsis, Meningitis	1, 2, 5
F1C-Fimbrien*	FocH	Adhäsion	<i>foc</i>	GalNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$	Blasen- und Nierenepithelzellen, Endothelzellen	aszendierende HWI	1, 2, 5, 7
M-Fimbrien	BmaE	Adhäsion	<i>bma</i>	Glykophorin	Erythrozyten	Sepsis	2, 12
G-Fimbrien	GafD	Adhäsion	<i>gaf</i> , ( <i>uca</i> )	N-Acetyl-D-glukosamin, Laminin, Plasminogen	Epithelzellen, Erythrozyten	Sepsis	5, 6, 11

Fortsetzung

O75(Dr)-Fimbrien <sup>#</sup>	DraE	Adhäsion, Persistenz	<i>dra</i>	DAF (CD55), Kollagen IV	Blasen- und Nierenepithelzellen, Erythrozyten, neutrophile Granulozyten, interstitielle Nierenkompartimente	Zystitis, Pyelonephritis, Sepsis	1, 2, 9
Curli	CsgA	Adhäsion, Invasion	<i>csg</i>	Fibronektin, Laminin, Plasminogen, MHC-I	Mukosa-Epithel		2, 10

**Nicht-Fimbrienadhäsine (NFA)**

AFA-I-IV <sup>#</sup>	AfaE	Adhäsion,	<i>afa</i>	DAF (CD55), karzinoembryonales Antigen (CD66e), $\alpha_5\beta_1$ -Integrin	Urothel, Erythrozyten	Zystitis, Pyelonephritis, chronische interstitielle Infektionen, (Diarrhö)	1, 8, 9
Nfa-I <sup>#</sup>	NfaA	Persistenz					
Dr-II <sup>#</sup>	DraE2						
Antigen 43 (Ag43)	Ag43 <sup>u</sup>	Adhäsion, Autoaggregation, Biofilmbildung	<i>agn43</i>	Kollagen, Laminin	Epithelzellen, (HEp-2-Zellen)		(4), 13

\* zur Familie der S-Fimbrien gehörend, <sup>#</sup> zur Familie der Dr-Adhäsine gehörend; **Referenzen:** **1** Mulvey (2002); **2** Hacker & Heesemann (2000); **3** Schembri *et al.* (2001); **4** Owen *et al.* (1996); **5** Virkola *et al.* (1988); **6** Khan *et al.* (2000a); **7** Khan *et al.* (2000b); **8** Mulvey *et al.* (2000); **9** Nowicki *et al.* (2001); **10** Gophna *et al.* (2002); **11** Kukkonen *et al.* (1998); **12** Rhen *et al.* (1986); **13** diese Arbeit.

scheint die Expression von Typ 1-Fimbrien und des Autotransporterproteins Antigen 43 (Ag43) die Biofilmbildung von uropathogenen *Escherichia coli*-Stämmen zu begünstigen (Danese *et al.*, 2000; Schembri *et al.*, 2001). Darüber hinaus wird Adhärenzfaktoren bei der Etablierung persistierender Infektionen eine weitere, bislang unterschätzte Bedeutung zuteil. So kann die intrazelluläre Aggregation bzw. Biofilmmreifung von FimH- und Ag43-exprimierenden Bakterien an der Ausbildung von IBCs (*'Intracellular Bacterial Communities'*) und somit an rezidivierenden oder chronischen Harnwegserkrankungen beteiligt sein (Justice *et al.*, 2004).

## 2.4. Das Autotransporterprotein Antigen 43 (Ag43)

Ein wichtiger Faktor bei der Etablierung von Biofilmen ist das Oberflächenprotein Antigen 43 (Ag43), das von den meisten *Escherichia coli*-Stämmen aller Pathotypen gebildet wird (Danese *et al.*, 2000). Während der initialen Anhaftungsphase adhären Ag43-exprimierende Bakterien an Epithelzellen und aggregieren infolge intermolekularer Wechselwirkungen zu Mikrokolonien (Owen *et al.*, 1996; Kjærsgaard *et al.*, 2000).

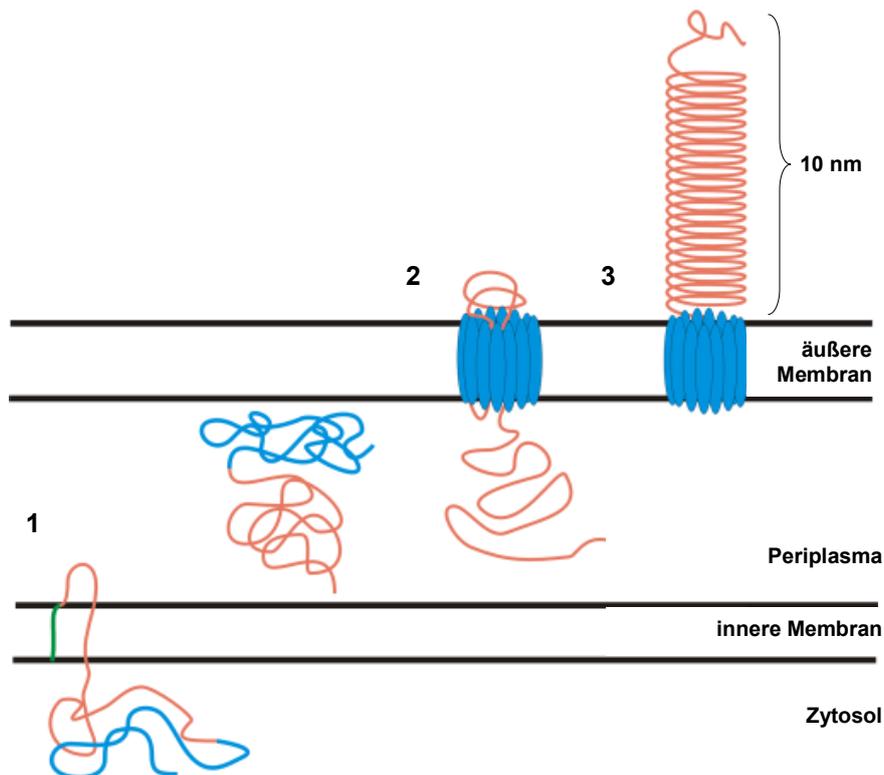
1980 identifizierte Diderichsen (1980) erstmals das Gen *flu*. Er beschrieb seine phänotypischen Beobachtungen mit dem Ausflocken (*'fluffing'*) von *flu*-exprimierenden *Escherichia coli* K-12-Stämmen in stehenden Flüssigkulturen und deren krause (*'frizzy'*) Koloniemorphologie auf Agarplatten. Später stellte sich dann heraus, daß das Außenmembran-assoziierte Antigen 43 das Produkt des Gens *flu* ist (Owen *et al.*, 1987; Henderson *et al.*, 1997). Ag43 kommt in  $\approx 50.000$  Kopien pro Zelle vor und wird speziesspezifisch ausschließlich von *E. coli* exprimiert (Henderson & Owen, 1999). Etwa 60 % der uropathogenen und 70 % aller enteropathogenen Isolate besitzen mindestens eine Kopie des *agn43*-Gens (Klemm *et al.*, 2004).

### 2.4.1. Prozessierung von Antigen 43

Antigen 43 gehört ebenfalls wie die als Adhäsin bzw. Invasine charakterisierten homologen Proteine AIDA-I (*'Adhesin Involved in Diffuse Adherence'*) und TibA (*'Enterotoxigenic Invasion Locus B'-A'*) zur Gruppe der Autotransporter (Henderson & Nataro, 2001; Klemm *et al.*, 2006). Die Translokation durch die Zellmembran erfolgt bei Autotransporterproteinen durch einen Mechanismus, der als Typ V-Sekretion bezeichnet wird: Alle benötigten Informationen für das Passieren der äußeren Membran sind in der Primärstruktur des Proteins determiniert (Henderson *et al.*, 1998).

Der N-terminale Bereich des Ag43-Präproteins kodiert ein Signalpeptid (Met<sup>1</sup>-Ala<sup>52</sup>), welches

nach dem Transport durch die innere Zytoplasmamembran abgespalten wird ( $V^{50}$ LA/AD, Sec-abhängiges Typ II-System). Im Periplasma befindlich bildet die C-terminal-kodierte Autotransporterdomäne ( $\beta$ -Untereinheit,  $Ag43^\beta$ ) eine Pore in der äußeren Membran, durch welche die 'passenger'-Domäne ( $\alpha$ -Untereinheit,  $Ag43^\alpha$ ) an die Zelloberfläche gelangt. Die  $\beta$ -Untereinheit besitzt die Form eines ' $\beta$ -barrels' und ist bei allen Autotransporterproteinen hoch konserviert. Nach einer autokatalytischen Spaltung bleibt die  $\alpha$ -Untereinheit des Antigen 43 über nichtkovalente Bindungen mit der integralen Transporterdomäne verbunden (Wells *et al.*, 2007). Das vollständig prozessierte Protein bildet somit einen heterooligomeren Komplex bestehend aus  $Ag43^\alpha$  und  $Ag43^\beta$  in der Stöchiometrie 1:1 (Owen *et al.*, 1996). Eine schematische Darstellung der Prozessierung von Autotransporterproteinen des Nicht-Protease-Typs ist für Antigen 43 in Abbildung 2.2 veranschaulicht.



**Abb. 2.2: Prozessierung des Autotransporterproteins Antigen 43 (Ag43).** [1] Aufgrund des Signalpeptids (grün) wird das Ag43-Präprotein durch die Zytoplasmamembran in das Periplasma transportiert (Sec-abhängige Typ II-Sekretion). [2] Die Autotransporterdomäne  $Ag43^\beta$  (blau) integriert sich anschließend in die äußere Membran und bildet dort eine Pore (' $\beta$ -barrel'), durch die die ungefaltete 'passenger'-Domäne  $Ag43^\alpha$  (rot) an die Zelloberfläche transloziert wird (Typ V-Sekretionssystem). [3] Nach einer autokatalytischen Spaltung bildet  $Ag43^\alpha$  seine aktive Konformation ( $\beta$ -Helix-Struktur) und bleibt extrazellulär mit der transmembranen verbunden.

Ag43<sup>β</sup>-Transporterdomäne über nichtkovalente Bindungen assoziiert (Bildnachweis: Wells *et al.*, 2007; verändert vom Autor der vorliegenden Arbeit).

## 2.4.2. Regulation der *agn43*-Expression

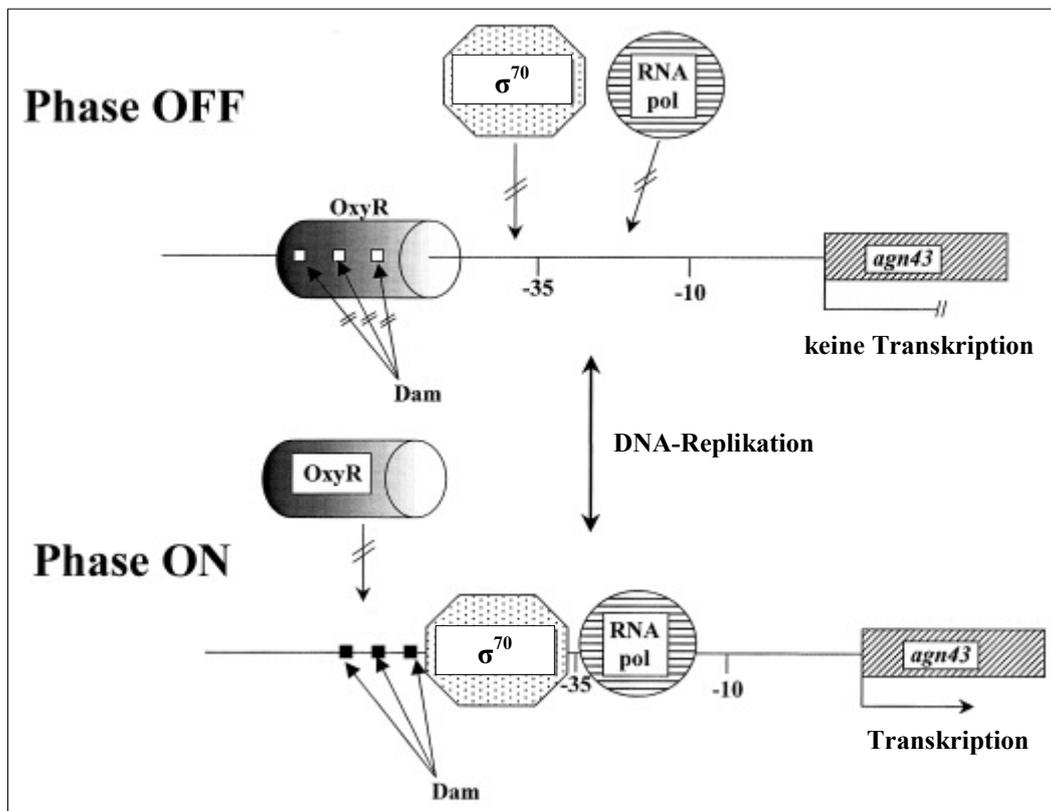
Viele bakterielle Oberflächenantigene und Virulenzfaktoren unterliegen den regulatorischen Mechanismen der Phasen- bzw. Antigenvariation (Tab. 2.2). Phasenvariationen sind epigenetische Ereignisse, die mit einer gewissen Frequenz zum Teil reversible Veränderungen in der Expression bestimmter Gene hervorrufen. Sie sind zufallsbedingt oder werden durch äußere Umwelteinflüsse verursacht. Die phänotypische Expression von zum Beispiel Flagellen, Fimbrien, Kapseln, Lipopolysacchariden (LPS) oder OMPs nach dem „Alles-oder-Nichts“-Prinzip scheint einzelnen Bakterienzellen während des Infektionsverlaufs einen Selektionsvorteil zu verschaffen. Auf diese Weise kann sich das Bakterium veränderten Umweltbedingungen schnell anpassen oder die wirtsspezifische Immunabwehr umgehen (Owen *et al.*, 1996; Henderson *et al.*, 1999).

**Tabelle 2.2** Mechanismen der Phasen- und Antigenvariation bei *Escherichia coli*

allgemeiner Mechanismus	Antigen	Frequenz (ON-OFF)	spezifischer Mechanismus	Referenz
site-spezifische Rekombination	Typ 1-Fimbrien	1,05 x 10 <sup>-3</sup>	Lrp (IHF): Inversion des Promotors	1, 2, 3
	P-Fimbrien	2,6 x 10 <sup>-3</sup>		
	S-Fimbrien CS31A	2,6 x 10 <sup>-3</sup>		
DNA-Modifikation	Typ 1-Fimbrien	1,05 x 10 <sup>-3</sup>	Dam: differentielle DNA-Methylierung	1, 2, 3
	P-Fimbrien	2,6 x 10 <sup>-3</sup>		
	S-Fimbrien CS31A	2,6 x 10 <sup>-3</sup>		
	Antigen 43 (Ag43)	10 <sup>-3</sup>	Dam: differentielle DNA-Methylierung; OxyR: Transkriptionskontrolle	3, 4
irreversible Deletion	P-Fimbrien Hämolyisin		Verlust von Genen (PAI-Deletion)	1
unbekannt	987P-Fimbrien	2,7 x 10 <sup>-3</sup>	unbekannt	2

**Referenzen:** 1 Hacker & Heesemann (2000); 2 Owen *et al.* (1996); 3 Henderson *et al.* (1999); 4 Schembri *et al.* (2003).

Im Gegensatz zu AIDA-I und TibA erfolgt die Expression von Antigen 43 phasenvariabel. Seine Transkription wird über ein spezifisches DNA-Methylierungsmuster in der Sigma-70 ( $\sigma^{70}$ )-abhängigen Promotorregion reguliert: Der Promotor von *agn43* weist drei GATC-Sequenzen auf, welche von der DNA-Methyltransferase Dam modifiziert werden. Methylierte GATC-Bereiche verhindern die Bindung des Repressors OxyR an den Promotor und ermöglichen dadurch die Initiation der mRNA-Synthese. Sowohl die Methylierung durch Dam (positive Regulation) als auch die Bindung von OxyR (negative Regulation) ist nicht reversibel. Somit kann die Phasenvariation nur nach einer erneuten DNA-Replikation (Zellteilung) erfolgen. Der hemimethylierte bzw. nichtmethylierte *agn43*-Promotor wird dann entweder von Dam modifiziert oder von OxyR blockiert (Wallecha *et al.*, 2002; Wallecha *et al.*, 2003). In Abbildung 2.3 ist hierzu die Regulation der *agn43*-Expression schematisch dargestellt.



**Abb. 2.3: Phasenvariable Expression von *agn43*.** Die kompetitive Bindung von Dam und OxyR an unmethylierte GATC-Sequenzen führt zur phasenabhängigen Genregulation: **[Phase ON]** Dam-methylierte GATC-Sequenzen (schwarze Kästchen) inhibieren die Bindung des Repressors OxyR an die Promotorregion und ermöglichen die Transkription von *agn43*. **[Phase OFF]** Die Bindung von OxyR an die drei nichtmethylierten GATC-Sequenzen (weiße Kästchen) verhindert die Initiation der Transkription durch sterische Hinderung der RNA-Polymerase (RNA pol) bzw. des Sigmafaktors-70 ( $\sigma^{70}$ ). Erst im Verlauf einer Zellteilung (DNA-Replikation) erfolgt die Deregelung des Systems (Bildnachweis: Henderson *et al.*, 1999; verändert vom Autor der vorliegenden Arbeit).

OxyR ist ein globaler Transkriptionsregulator, der in Gegenwart von Peroxiden ( $O_2^{2-}$ ) oxidiert wird und daraufhin die entsprechenden Gene der oxidativen Stressantwort aktiviert (Schembri *et al.*, 2003). Bindungsstudien haben jedoch ergeben, daß OxyR unabhängig von seinem Redoxstatus ( $OxyR^{Red}/OxyR^{Ox}$ ) an die *agn43*-Promotorregion binden kann (Correnti *et al.*, 2002; Wallecha *et al.*, 2003). Darüber hinaus zeigten Waldron *et al.* (2002), daß die Transkription des *agn43* vom Methylierungsstatus von mindestens zwei GATC-Sequenzen abhängt, wobei lediglich die beiden stromabwärts gelegenen GATC-Positionen für die Bindung des Repressors OxyR von Bedeutung sind.

Neben der krausen Koloniemorphologie, der Autoaggregation, Mikrokoloniebildung und Biofilmmreifung beeinflusst die Expression des Autotransporterproteins Antigen 43 auch die Adsorption von Bakteriophagen. Im OFF-Zustand des *agn43*-Promotors ist die Infektion von *Escherichia coli* durch lambdaoide Phagen stark beeinträchtigt und dient zugleich dem Schutz vor einer Lysogenisierung (Gabig *et al.*, 2002; Węgrzyn & Thomas, 2002).

## 2.5. Posttranslationale Glykosylierung

Die Proteine Antigen 43, AIDA-I und TibA bilden gemeinsam eine auf Sequenzhomologien und repetitiven Aminosäuremotiven basierende Familie von Autotransportern des Nicht-Protease-Typs (Henderson & Nataro, 2001). AIDA-I wird von den meisten enteropathogenen *Escherichia coli* (EPEC)-Stämmen exprimiert, wohingegen TibA bei enterotoxischen *E. coli* (ETEC) zu finden ist (Benz & Schmidt, 1992; Sherlock *et al.*, 2005). Strukturanalysen haben ergeben, daß die primäre Aminosäuresequenz des Ag43<sup>a</sup> mit der  $\alpha$ -Domäne von AIDA-I zu 31 % identisch und zu 62 % ähnlich ist (Henderson & Owen, 1999).

Sowohl bei AIDA-I als auch bei TibA wurde jedoch eine zusätzliche Proteinmodifikation beobachtet. Beide Autotransporter werden durch die stromaufwärts von *aidA* und *tibA* kodierte Heptosyltransferase Aah ('Autotransporter Adhesin Heptosyltransferase') bzw. TibC ('Enterotoxigenic Invasion Locus B'-C) O-glykosyliert. Diese Modifikation ist für die Funktionalität beider Adhärenz-/Invasionsfaktoren essentiell, auf das Autoaggregationsverhalten hat sie jedoch keinen Einfluß (Benz & Schmidt, 2001; Lindenthal & Elsinghorst, 1999). Obwohl Antigen 43 in Wildtypstämmen ebenfalls posttranslational heptosyliert wird, konnte für dieses Autotransporterprotein bislang keine Glykosyltransferase identifiziert werden (Sherlock *et al.*, 2006; Charbonneau *et al.*, 2007).

Posttranslationale Prozessierungen sind wichtige regulatorische Elemente. Über kovalente Modifizierungen (Acetylierung, Hydroxylierung, Methylierung, Nukleotidylierung, Phosphorylierung, ADP-Ribosylierung) kann der funktionelle Zustand von Proteinen oder deren Abbau (Proteolyse) genau gesteuert werden (Hennig, 1998). Oligosaccharid-Modifikationen (Glyko-

sylierungen) dienen in der Regel als Erkennungssignal für die zelluläre Lokalisation von Glykokonjugaten. Darüber hinaus verändern übertragene Kohlenhydrat-Reste die Proteinstruktur und bilden Marker für Zell-Zell-Wechselwirkungen (Voet & Voet, 1994).

Im Gegensatz zu  $\beta$ -*N*-gekoppelten Oligosacchariden, die auf ein Asparagin (Asn) in der spezifischen Aminosäuresequenz Asn-Xaa-Ser bzw. Asn-Xaa-Thr übertragen werden, sind  $\alpha$ -*O*-glykosylierte Serine (Ser) und Threonine (Thr) nicht Teil einer definierten Akzeptorsequenz. Man vermutet, daß die *O*-Glykosylierungsstellen nur durch die Sekundär- oder Tertiärstruktur des Polypeptids bestimmt werden (Voet & Voet, 1994).

Noch bis vor wenigen Jahren nahm man an, daß der Mechanismus der Glykosylierung von Proteinen ausschließlich in Eukaryonten und Archaeen vorkommt (Moormann *et al.*, 2002). Viele Eubakterien synthetisieren jedoch unterschiedliche Glykoproteine, die häufig Virulenzfaktoren darstellen (Tab. 2.3). Inwiefern Oligosaccharid-Modifikationen die Funktion des Autotransporterproteins Antigen 43 beeinflussen, soll durch Koexpression der heterologen, AIDA-I-spezifischen Heptosyltransferase Aah in dieser Arbeit näher untersucht werden.

**Tabelle 2.3** Virulenz-assoziierte Glykoproteine von humanpathogenen Erregern

Glykoprotein	Spezies	Funktion	Referenz
<i>S</i> -Layer Proteine	Eubakterien	Schutz vor Phagozytose	5, 8
Antigen 43 (Ag43)	<i>Escherichia coli</i>	Adhäsion, Autoaggregation, Biofilmbildung	1, 2
AIDA-I	<i>Escherichia coli</i> (EPEC)	Adhäsion, Autoaggregation	3
TibA	<i>Escherichia coli</i> (ETEC)	Adhäsion, Invasion	4
Typ 4-Pili	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Neisseria</i> spp.	Adhäsion	5, 8 7
Flagellin	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Campylobacter</i> spp.	Flagellen-Untereinheit	5 10
MOMP	<i>Chlamydia trachomatis</i>	Adhäsion	6
PAAP	<i>Streptococcus sanguis</i>	Aggregation von Thrombozyten	9
45-kDa Protein	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Adhäsion	8

**Referenzen:** 1 Sherlock *et al.* (2006); 2 Charbonneau *et al.* (2007); 3 Benz & Schmidt (2001); 4 Lindenthal & Elsinghorst (1999); 5 Szymanski *et al.* (1999); 6 Kuo *et al.* (1996); 7 Stimson *et al.* (1995); 8 Dobos *et al.* (1995); 9 Erickson & Herzberg (1993); 10 Doig *et al.* (1996).

## 2.6. Der uropathogene *Escherichia coli* Stamm 536

Der uropathogene *Escherichia coli* Stamm 536 (O6:K15:H31) wurde vor etwa 25 Jahren aus einem Patienten mit akuter Pyelonephritis isoliert (Berger *et al.*, 1982). Seither gilt er als ein Modellorganismus für Analysen zur Genomstruktur und Evolution uropathogener Erreger.

Die Virulenz des *E. coli* Stammes 536 beruht auf der Expression von chromosomal und PAI-kodierten Determinanten (Abb. 2.4). Pathogenitätsinseln (PAIs) sind genomische Bereiche von 10-200 kbp Größe, die am 3'-Ende von tRNA-Genen integriert sind, von gleichgerichteten Wiederholungs- ('direct repeats', DRs) oder Insertions- (IS) Sequenzen flankiert werden, häufig mit (kryptischen) Fragmenten von mobilen genetischen Elementen (Integrasen, Transposasen) assoziiert sind und einen vom übrigen Genom abweichenden G+C-Gehalt besitzen. Im Gegensatz zu genomischen Inseln (GEIs) kodieren PAIs mindestens einen Virulenzfaktor (Hacker & Kaper, 2000). Aufgrund ihrer Eigenschaft, instabil zu sein und aus dem Kernchromosom zu deletieren, gehören GEIs und PAIs genauso wie Plasmide, Prophagen, Transposons, Integrons oder IS-Elemente zum flexiblen Genpool von Mikroorganismen (Dobrindt *et al.*, 2002; Hochhut *et al.*, 2005).

Neben einer Reihe unterschiedlicher Fimbrien und Curli produziert *Escherichia coli* 536 zwei Orthologe des Autotransporterproteins Antigen 43, die von den PAI III<sub>536</sub> (ORF52, *agn43a-536*) und PAI V<sub>536</sub> (ORF48, *agn43b-536*) kodiert werden. Die funktionale  $\alpha$ -Untereinheit beider Autotransportervarianten sind zu etwa 60 % identisch. Sowohl Ag43a-536 als

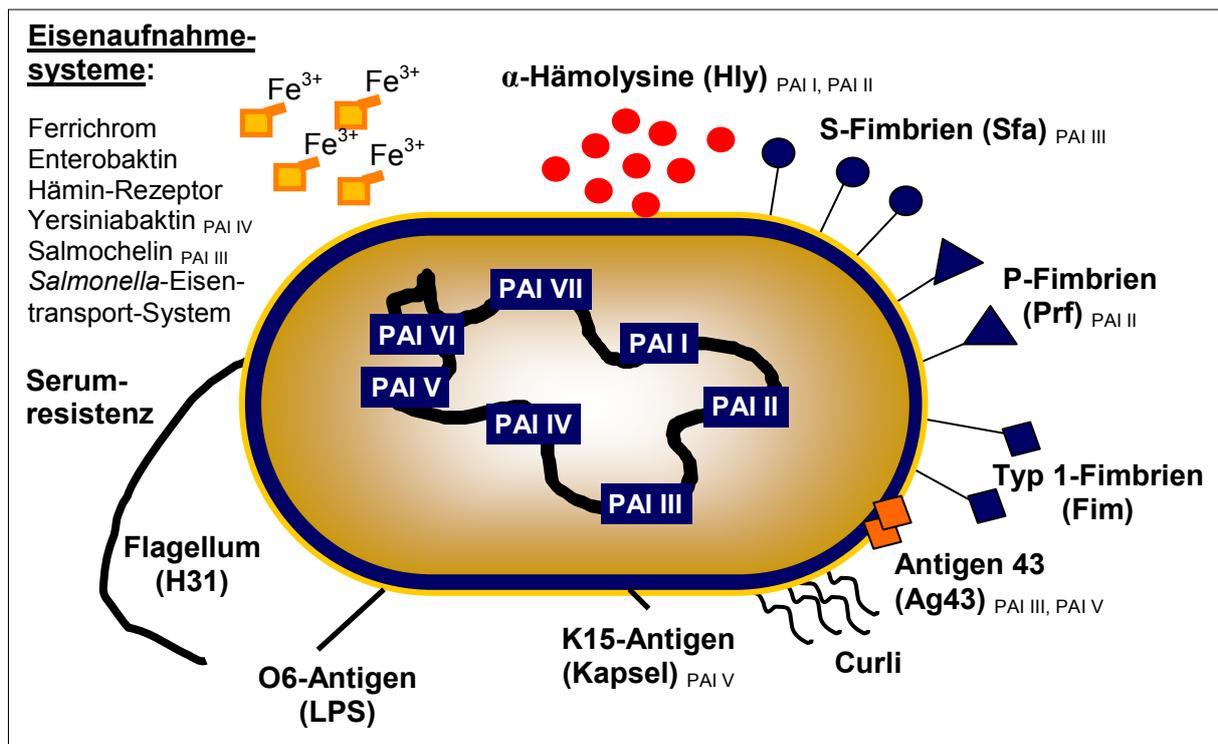


Abb. 2.4: Virulenzfaktoren des uropathogenen *E. coli* Stammes 536. (Bildnachweis: J. Hacker; verändert vom Autor der vorliegenden Arbeit)

auch Ag43b-536 fördern die Autoaggregation dieses Stammes und tragen zur Biofilmbildung bei (Beloin *et al.*, 2006). Weitere wichtige Virulenzfaktoren, die es dem UPEC-Stamm 536 ermöglichen, die menschlichen Harnwegsorgane zu infizieren, sind Flagellen,  $\alpha$ -Hämolsine, die Lipopolysaccharidschicht (Serumresistenz), das K15-Kapselantigen sowie verschiedene Eisenaufnahmesysteme (Abb. 2.4; Hacker *et al.*, 1992). Aufgrund der koordinierten Expression seiner Virulenz-assoziierten Gene, gelingt es *E. coli* 536 die Epithelien des Urogenitaltrakts zu besiedeln, die unspezifischen sowie adaptiven Mechanismen der Immunabwehr erfolgreich zu umgehen und sich in einer nährstoffarmen Umgebung (Eisenmangel) zu vermehren, um dadurch den menschlichen Organismus effizient kolonisieren zu können.

## 2.7. Der kommensale *Escherichia coli* Stamm Nissle 1917

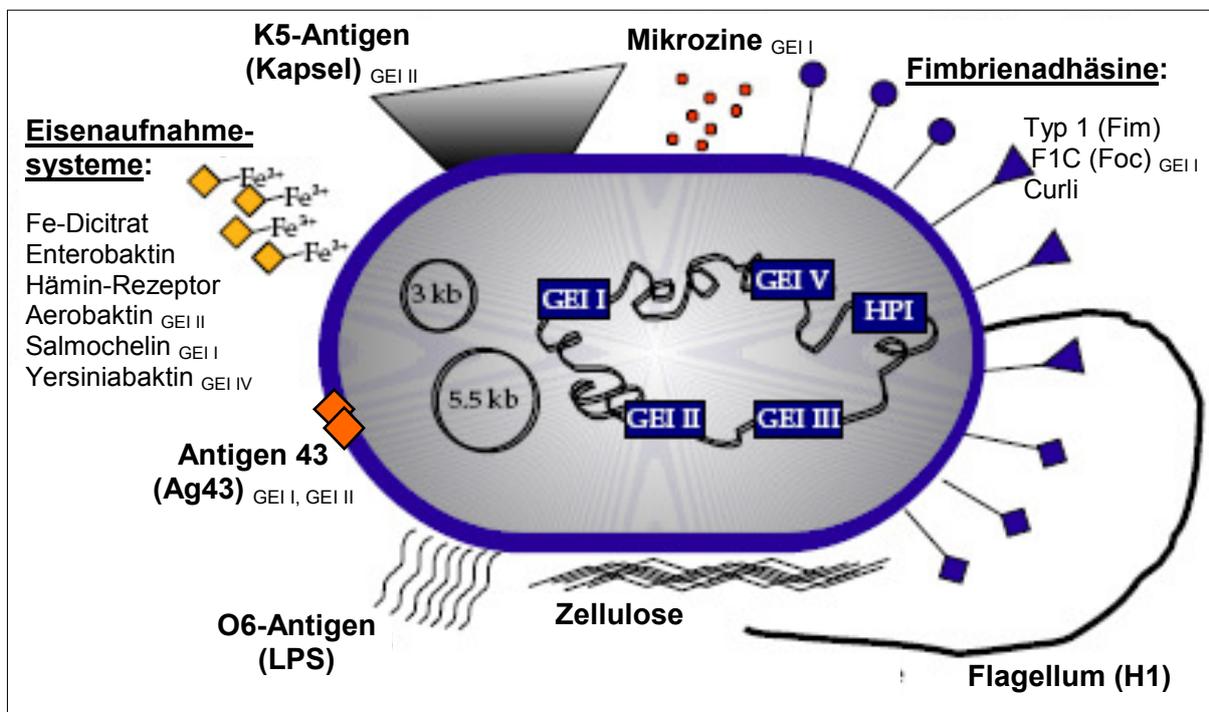
Genomische Inseln (GEIs) sind nicht nur pathogenen Bakterien vorbehalten. Auch weniger pathogene oder avirulente Stämme kodieren häufig GEIs, deren Determinanten mit erhöhter Fitneß, Resistenzen sowie metabolischen oder symbiontischen Eigenschaften einhergehen können (Dobrindt *et al.*, 2004). Für den kommensalen *E. coli* Stamm Nissle 1917 (EcN) sind bisher fünf genomische Inseln beschrieben worden. Zwei von ihnen enthalten ebenfalls je ein orthologes Gen für das Autotransporterprotein Antigen 43: Ag43a-EcN (GEI I<sub>Nissle 1917</sub>, ORF80) und Ag43b-EcN (GEI II<sub>Nissle 1917</sub>, ORF54). Strukturanalysen zufolge sind die primären Aminosäuresequenzen dieser Antigen 43<sup>a</sup>-Varianten zu 88 % identisch (Grozdanov *et al.*, 2004).

*E. coli* Nissle 1917 (O6:K5:H1) zeichnet sich durch effektive Kolonisierungseigenschaften und seine antagonistische Wirkung gegenüber enteroinvasiven, pathogenen Erregern aus (Malchow *et al.*, 1995; Altenhoefer *et al.*, 2004). Darüber hinaus stimuliert er das menschliche Immunsystem zur Produktion antimikrobieller Peptide (hBD-2) und proinflammatorischer Moleküle (MCP-1, MIP-2 $\alpha$ , MIP-2 $\beta$ ; Wehkamp *et al.*, 2004; Ukena *et al.*, 2005). Mehrere Studien haben zudem ergeben, daß die Verabreichung des *E. coli* Stammes Nissle 1917 bei der Behandlung gastrointestinaler Beschwerden (Infektionen, chronische Erkrankungen, Ulzerationen) die Regeneration der natürlichen Darmflora unterstützt (Malchow, 1997; Schlee *et al.*, 2007). Aus diesem Grund wird der Stamm unter dem pharmazeutischen Namen *Mutaflor*<sup>®</sup> als probiotisch wirksames Therapeutikum erfolgreich eingesetzt.

Interessanterweise stellte sich in vergleichenden Genomanalysen heraus, daß *E. coli* Stamm Nissle 1917 charakteristische Merkmale uropathogener *E. coli* aufweist und auf DNA-Ebene dem UPEC-Stamm CFT073 (O6:K2:H1) sehr ähnlich ist (Welch *et al.*, 2002). So besitzt EcN

eine semirauhe Lipopolysaccharidschicht (Serumsensitivität), Typ 1- und F1C-Fimbrienadhäsine, Mikrozine sowie eine ungewöhnlich hohe Anzahl von Eisenaufnahmesystemen (Abb. 2.5). Viele dieser Determinanten sind ebenfalls auf genomischen Inseln lokalisiert (Grozdanov *et al.*, 2004). Die Koexpression von Curli und Zellulose (extrazelluläre Matrixkomponente) verursacht das multizelluläre (biofilmähnliche) Erscheinungsbild des *E. coli* Nissle 1917 (*rdar*-Morphotyp; Römling *et al.*, 1998a; Römling *et al.*, 1998b; Zogaj *et al.*, 2001).

Aufgrund der vielen Fitneßfaktoren und dem Fehlen Virulenz-assoziiierter Toxine stellt der kommensale *E. coli* Stamm Nissle 1917 eine Besonderheit dar. Inwiefern die GEI-kodierten Antigen 43-Varianten zur effektiven Kolonisierung epithelialer Gewebe beitragen, wird in der vorliegenden Arbeit näher untersucht.



**Abb. 2.5:** Fitneßfaktoren des kommensalen *E. coli* Stammes Nissle 1917. (Bildnachweis: J. Hacker; verändert vom Autor der vorliegenden Arbeit)

## 2.8. Aufgabenstellung und Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die funktionale Charakterisierung der unterschiedlichen Antigen 43 (Ag43)-Varianten des uropathogenen *E. coli* Stammes 536, des kommensalen Isolats *E. coli* Nissle 1917 sowie des *E. coli* K-12-Laborstammes MG1655 (Tab. 2.4). Beobachtungen zufolge ist Antigen 43 an der bakteriellen Autoaggregation, Mikrokoloniebildung und Etablierung von Biofilmen beteiligt (Kjærsgaard *et al.*, 2000). Zu diesem Zweck

**Tabelle 2.4** Antigen 43-Varianten

Variante	Stamm	Gen	Locus	Referenz
<b>Ag43a-536</b> (1040 AS)	<i>E. coli</i> 536	<i>agn43a-536</i> (ORF52 <sub>PAI III</sub> )	PAI III <sub>536</sub>	Dobrindt <i>et al.</i> (2002)
<b>Ag43b-536</b> (948 AS)	<i>E. coli</i> 536	<i>agn43b-536</i> (ORF48 <sub>PAI V</sub> )	PAI V <sub>536</sub>	Schneider <i>et al.</i> (2004)
<b>Ag43a-EcN</b> (1041 AS)	<i>E. coli</i> Nissle 1917	<i>agn43a-EcN</i> (ORF80 <sub>GEI I</sub> )	GEI I <sub>Nissle 1917</sub>	Grozdanov <i>et al.</i> (2004)
<b>Ag43b-EcN</b> (1040 AS)	<i>E. coli</i> Nissle 1917	<i>agn43b-EcN</i> (ORF54 <sub>GEI II</sub> )	GEI II <sub>Nissle 1917</sub>	Grozdanov <i>et al.</i> (2004)
<b>Flu</b> (1039 AS)	<i>E. coli</i> K-12 MG1655	<i>flu</i>	44,6-44,8 min	Henderson & Owen (1999)

sollten die verschiedenen Autotransportervarianten im Adhäsion-negativen *E. coli* K-12 Stamm MG1655  $\Delta fim\Delta flu$  exprimiert werden, um ihre Rolle als potentielle Virulenzfaktoren bei der Ag43-vermittelten Autoaggregation und Adhäsion an eukaryontische Zelllinien zu analysieren.

Bislang ist die Bedeutung des Antigen 43 während der Kolonisierung von Wirtsorganismen noch nicht näher untersucht worden. Das Autotransporterprotein zeigt jedoch strukturelle Ähnlichkeit zu den Adhäsinen Pertactin von *Bordetella pertussis* und AIDA-I vieler EPEC-Stämme sowie zum Invasin TibA enterotoxischer *Escherichia coli* (ETEC; Klemm *et al.*, 2006). Allerdings wurde bisher nur für AIDA-I ein eukaryontischer Rezeptor beschrieben, an dem die glykosylierte Form des Proteins bindet (Laarmann & Schmidt, 2003). Somit ist für Ag43 die Funktion eines putativen Virulenzfaktors anzunehmen, der ebenfalls die Adhäsion an epitheliale Membranstrukturen vermitteln könnte. Aus diesem Grund sollten in Bindungsstudien (*Overlay assays*, ELISA) mögliche Interaktionspartner von Antigen 43 identifiziert werden. In diesem Zusammenhang wurden auch andere Eigenschaften (Immunogenizität, Polymerisationsverhalten) des Ag43 näher untersucht.

Darüber hinaus sollte in Kooperation mit der *Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie* des Universitätsklinikum Würzburgs ein auf Fluoreszenz-basierendes Testsystem entwickelt werden, das mittels rRNA-gerichteter *in situ*-Hybridisierung (FISH) die Differenzierung von Harnwegserregern in Biofilmen erlaubt. Hierbei standen die Anwendbarkeit der Methode für diagnostische Zwecke sowie die Möglichkeit zur Untersuchung von Patientmaterial (z. B. Katheter) im Vordergrund. In diesem Zusammenhang wurde die Biofilmbildung von verschiedenen, (uro-)pathogenen Mikroorganismen auf Blasenkathe tern aus unterschiedlichen Kunststoffen elektronenmikroskopisch analysiert.

### 3. Material

#### 3.1. Mikroorganismen

Die nachfolgend beschriebenen Experimente sind mit den in der Tabelle 3.1 zusammengefaßten *Escherichia coli*-Stämmen durchgeführt worden. Tabelle 3.2 beinhaltet jene Mikroorganismen (Teststämme), die zur Untersuchung der Biofilmbildung und zur Testung von rRNA-spezifischen Oligonukleotidsonden verwendet wurden.

**Tabelle 3.1** *Escherichia coli*-Stämme

Stamm	Eigenschaften	Referenz
536	Wildtyp, Pyelonephritis-Isolat, O6:K15:H31, <i>agn43a-536</i> <sup>+</sup> (ECP0332, ORF52 <sub>PAI III</sub> ), <i>agn43b-536</i> <sup>+</sup> (ECP3009, ORF48 <sub>PAI V</sub> )	Berger <i>et al.</i> (1982)
Nissle 1917 (DSM6601, EcN)	Wildtyp, Fäkalisolat, O6:K5:H1, <i>agn43a-EcN</i> <sup>+</sup> (ORF80 <sub>GEI I</sub> ), <i>agn43b-EcN</i> <sup>+</sup> (ORF54 <sub>GEI II</sub> )	Nissle (1918)
HB101	K-12 x B -Hybrid, F <sup>-</sup> , λ <sup>-</sup> , <i>ara-14</i> , <i>galK2</i> , <i>hsdS20</i> ( <i>hsr</i> <sup>-</sup> , <i>hsm</i> <sup>-</sup> ), <i>recA13</i> , <i>supE44</i> , <i>lacZ4</i> , <i>leuB6</i> , <i>proA2</i> , <i>thi-1</i> , <i>rpsL20</i> (Sm <sup>r</sup> ), <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>merB</i> , <i>endA</i> , <i>flu</i> <sup>+</sup>	Boyer & Roulland-Dussoix (1969)
M15	K-12-Isolat, Expressionsstamm, <i>lac</i> <sup>-</sup> , <i>ara</i> <sup>-</sup> , <i>gal</i> <sup>-</sup> , <i>mtf</i> <sup>-</sup> , F <sup>-</sup> , <i>recA</i> <sup>+</sup> , <i>uvr</i> <sup>+</sup>	Villarejo & Zabin (1974)
M15 Δ <i>b2000</i>	<i>flu</i> - bzw. <i>b2000</i> -Deletionsmutante von M15	Dobrindt (Würzburg)
BL21	Expressionsstamm, λDE3-Lysogen (T7 RNA-Polymerase), <i>ompT</i> <sup>-</sup> , <i>lon</i> <sup>-</sup>	Novagen® (Madison, USA)
MG1655	K-12-Isolat, OR:H48:K-, F <sup>-</sup> , λ <sup>-</sup> , <i>ilvG</i> <sup>-</sup> , <i>rfb-50</i> , <i>rph-1</i>	Blattner <i>et al.</i> (1997)
MG1655 Δ <i>fim</i> Δ <i>flu</i>	<i>fimBH</i> - u. <i>flu</i> -Deletionsmutante von MG1655; <i>kan</i>	Dobrindt (Würzburg)
EDL933	EHEC O157:H7, Sorbit-negativ, <i>agn43</i> <sup>+</sup> , <i>espP</i> <sup>+</sup>	Riley <i>et al.</i> (1983)
5720/96	Wildtyp, EHEC O26:H11, <i>agn43</i> <sup>+</sup> , <i>espP</i> <sup>-</sup>	Stammsammlung IMIB
1639/77	Wildtyp, EHEC O111:H-, <i>agn43</i> <sup>+</sup> , <i>espP</i> <sup>-</sup>	Stammsammlung IMIB
493bi/89	Wildtyp, EHEC O157:H-, Sorbit-positiv, <i>agn43</i> <sup>-</sup> , <i>espP</i> <sup>-</sup>	Stammsammlung IMIB

**Tabelle 3.2** Mikroorganismen (Teststämme) zur Untersuchung der Biofilmbildung und zur Testung rRNA-spezifischer Oligonukleotidsonden

<b>Spezies/Stamm</b>	<b>Eigenschaften</b>	<b>Kultivierung</b>	<b>Referenz</b>
<i>Candida albicans</i> SC5314	Wildtyp	YPD, 30 °C	Gillum <i>et al.</i> (1984)
<i>Citrobacter freundii</i> 3009	Wildtyp, Harnwegsisolat	LB, 37 °C	Oelschlaeger <i>et al.</i> (1993)
<i>Enterobacter cloacae</i> 687	Wildtyp	LB, 37 °C	Stammsammlung <i>IMIB</i>
<i>Enterococcus faecalis</i> JH2-2		BHI, 37 °C	Jacob & Hobbs (1974)
<i>Enterococcus faecium</i> 64/3	Wildtyp	BHI, 37 °C	<i>Robert Koch-Institut</i> (Wernigerode)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 375	Wildtyp, Nierenpunktat- Isolat, unbekapselt	LB, 37 °C	Stammsammlung <i>IMIB</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 625	Wildtyp, Dauerkatheter- Isolat	LB, 37 °C	Stammsammlung <i>IMIB</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 3091	Wildtyp, Harnwegsisolat	LB, 37 °C	Oelschlaeger & Tall (1997)
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> NM17	Wildtyp	LB, 37 °C	<i>Robert Koch-Institut</i> (Wernigerode)
<i>Proteus mirabilis</i> 532	Wildtyp	LB, 37 °C	Dobrindt (Würzburg)
<i>Salmonella</i> Typhimurium LT2	Wildtyp	LB, 37 °C	Stammsammlung <i>IMIB</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> N315	Wildtyp, MRSA	BHI, 37 °C	Kuroda <i>et al.</i> (2001)
<i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i> RP62A	Wildtyp, Blutkultur-Isolat, starker Biofilmbildner	BHI, 37 °C	Gill <i>et al.</i> (2005)

### 3.2. Plasmide

Tabelle 3.3 enthält aufgelistet alle verwendeten Klonierungsvektoren und Plasmidkonstrukte.

**Tabelle 3.3** Plasmide und Vektoren

Plasmid	Vektor	Beschreibung	Referenz
12f4		Cosmid, <i>agn43a-536</i> , <i>bla</i>	Dobrindt (Würzburg)
pGEM <sup>®</sup> -T Easy		T/A-Klonierungsvektor, <i>lacZ</i> (Blau-Weiß-Selektion), <i>bla</i>	Promega (Mannheim)
pASK75		Expressionsvektor, <i>bla</i> , <i>tetR</i> , <i>tet<sup>D/O</sup></i>	Skerra (1994)
pET-28a		Expressionsvektor, T7 <i>lac</i> -Promotor, <i>kan</i>	Novagen <sup>®</sup> (Madison, USA)
pANG1	pGEM <sup>®</sup> -T Easy	<i>lacZ::agn43a-EcN</i> , <i>bla</i>	Lehmann (2005)
pANG2	pGEM <sup>®</sup> -T Easy	<i>lacZ::agn43b-EcN</i> , <i>bla</i>	Lehmann (2005)
pANG4	pGEM <sup>®</sup> -T Easy	<i>lacZ::flu</i> , <i>bla</i>	Lehmann (2005)
pLDR11		Klonierungsvektor, $\lambda$ - <i>attP</i> , <i>bla</i> , <i>tet</i>	Diederich <i>et al.</i> (1992)
pANL1	pLDR11	$\lambda$ - <i>attP::agn43a-EcN</i> , <i>bla</i>	diese Arbeit
pANL2	pLDR11	$\lambda$ - <i>attP::agn43b-EcN</i> , <i>bla</i>	diese Arbeit
pANL3	pLDR11	$\lambda$ - <i>attP::agn43a-536</i> , <i>bla</i>	Lehmann (2005)
pANL4	pLDR11	$\lambda$ - <i>attP::flu</i> , <i>bla</i>	diese Arbeit
pANL5	pLDR11	$\lambda$ - <i>attP::agn43b-536</i> , <i>bla</i>	Lehmann (2005)
pBR322		Klonierungsvektor, <i>bla</i> , <i>tet</i>	Bolivar <i>et al.</i> (1977)
piB6	pBR322	kodiert u.a. <i>aidA</i> und <i>aah</i> ; <i>bla</i> , <i>tet</i>	Benz & Schmidt (1989)
piB264	pBR322	kloniertes <i>SphI/ClaI</i> -Fragment (6 kbp) von piB6, kodiert <i>aidA</i> und <i>aah</i> ; <i>bla</i>	Benz & Schmidt (1989)
pACYC184		Klonierungsvektor, <i>cat</i> , <i>tet</i>	Chang & Cohen (1978)
pAAH	pACYC184	<i>SphI/EcoRV</i> -verdauter pACYC184 mit kloniertem <i>SphI/StuI</i> -Fragment (2 kbp) von piB264, kodiert <i>aah</i> ; <i>cat</i>	Dobrindt (Würzburg)
pUC-A-1	pUC13	kloniertes <i>yadA</i> von <i>Y. enterocolitica</i> WA-314; <i>bla</i>	Roggenkamp <i>et al.</i> (1995)
pB8-5	pRK290B	klonierter <i>yadA</i> -Transkriptionsaktivator <i>virF</i> ; <i>tet</i>	Roggenkamp <i>et al.</i> (1996)

### 3.3. Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von den Firmen *Sigma*<sup>®</sup>-*Genosys* (Steinheim) oder *MWG Biotech AG* (Ebersberg) synthetisiert und sind in der Tabelle 3.4 mit Angaben zu ihrer Verwendung zusammengestellt.

**Tabelle 3.4** Oligonukleotide

Bezeichnung	5'-3'-Sequenz	Bedeutung	Referenz
AgIII puri-forward (=BP277)	TGCTCTAGATAGTAAA GGAAAACTATGcatc accatcaccatcacGC TGACATCGTTGTGCAC	Amplifikation von 6xhis-agn43a-536 <sup>a</sup>	Dobrindt (Würzburg)
rev-Ag43IIIalpha (=P3)	CCC[AAGCTT]GGAGCCT GCCAGAAT	Amplifikation von 6xhis-agn43a-536 <sup>a</sup>	diese Arbeit
tet <sup>p/o</sup>	CCATCGAATGGCCAGA TGAT	Sequenzierung von pASK75-Inserts	Skerra (1994)
ASK3	TGACGCAGTAGCGGTA AACG	Sequenzierung von pASK75-Inserts	Skerra (1994)
SP6	TATTTAGGTGACACTA TAG	Sequenzierung von pGEM <sup>®</sup> -T Easy-Inserts	Promega (Mannheim)
T7	TAATACGACTCACTAT AGGG	Sequenzierung von pGEM <sup>®</sup> -T Easy-Inserts	Promega (Mannheim)
pET upstream	ATGCGTCCGGCGTAGA	Sequenzierung von pET-28a-Inserts	Novagen <sup>®</sup> (Madison, USA)
T7 Terminator	GCTAGTTATTGCTCAG CGG	Sequenzierung von pET-28a-Inserts	Novagen <sup>®</sup> (Madison, USA)
agn43	CTGGAAACCGGTCTGC CCTT, CCTGAACGCCAGGGT GATA	Nachweis von agn43 (433 bp)	Restieri <i>et al.</i> (2007)
espP	GTCCATGCAGGGACAT GCCA, TCACATCAGCACCGTT CTCTAT	Nachweis von espP (547 bp)	Restieri <i>et al.</i> (2007)

XbaI- und HindIII-Schnittstelle, Shine-Dalgarno-Sequenz, Start-Codon, n: Hexa-Histidin-Peptid (6xHis)-kodierende Sequenz

Die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) eines Primers berechnet sich nach untenstehender Formel. Sie betrug jedoch nicht mehr als 65 °C, für Sequenzierungen  $\leq 60$  °C.

$$T_m [^\circ\text{C}] = 4 (n_C + n_G) + 2 (n_A + n_T) - 5$$

### 3.4. FISH-Sonden

Mit Carbocyanin 3 (Cy3) markierte Oligonukleotide für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) wurden ausschließlich von der *MWG Biotech AG* (Ebersberg) bezogen (Tab. 3.5).

**Tabelle 3.5** FISH-Sonden

Bezeichnung	5'-3'-Sequenz	Spezifität	rRNA	Referenz
EUK516	<b>Cy3</b> -ACCAGACTTG CCCTCC	Eukaryonten	18S	Amann <i>et al.</i> (1990)
EUB338	<b>Cy3</b> -GCTGCCTCCC GTAGGAGT	Eubakterien	16S	Amann <i>et al.</i> (1990)
Sta	<b>Cy3</b> -TCCTCCATAT CTCTGCGC	<i>Staphylococcus</i> spp.	16S	diese Arbeit
Sau	<b>Cy3</b> -GAAGCAAGCT TCTCGTCCG	<i>Staphylococcus aureus</i>	16S	Kempf <i>et al.</i> (2000)
GAM42a	<b>Cy3</b> -GCCTTCCCAC ATCGTTT	$\gamma$ -Proteobakterien	23S	Manz <i>et al.</i> (1992)
PseaerA	<b>Cy3</b> -TCTCGGCCTT GAAACCCC	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23S	Hogardt <i>et al.</i> (2000)
Ent	<b>Cy3</b> -CCCCWCTTT GGTCTTGC	<i>Enterobacteriaceae</i> (außer <i>Proteus</i> spp.)	16S	Kempf <i>et al.</i> (2000)
coli IX	<b>Cy3</b> -TCGACTGATT TCAGC	<i>Escherichia coli</i>	23S	diese Arbeit
Klebs IV	<b>Cy3</b> -TCGACTGGTC TCAGC	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	23S	diese Arbeit

Die Schmelztemperatur der Oligonukleotidsonden berechnete sich wie folgt:

$$T_m [^\circ\text{C}] = 81,5 + 16,6 \log M + 0,41 \times \text{GC} [\%] - 820 / n$$

M entspricht der Anzahl an Na<sup>+</sup>-Ionen (aus physiologischen Gründen: M = 0,9)  
n = Anzahl der Nukleotide

### 3.5. Antikörper

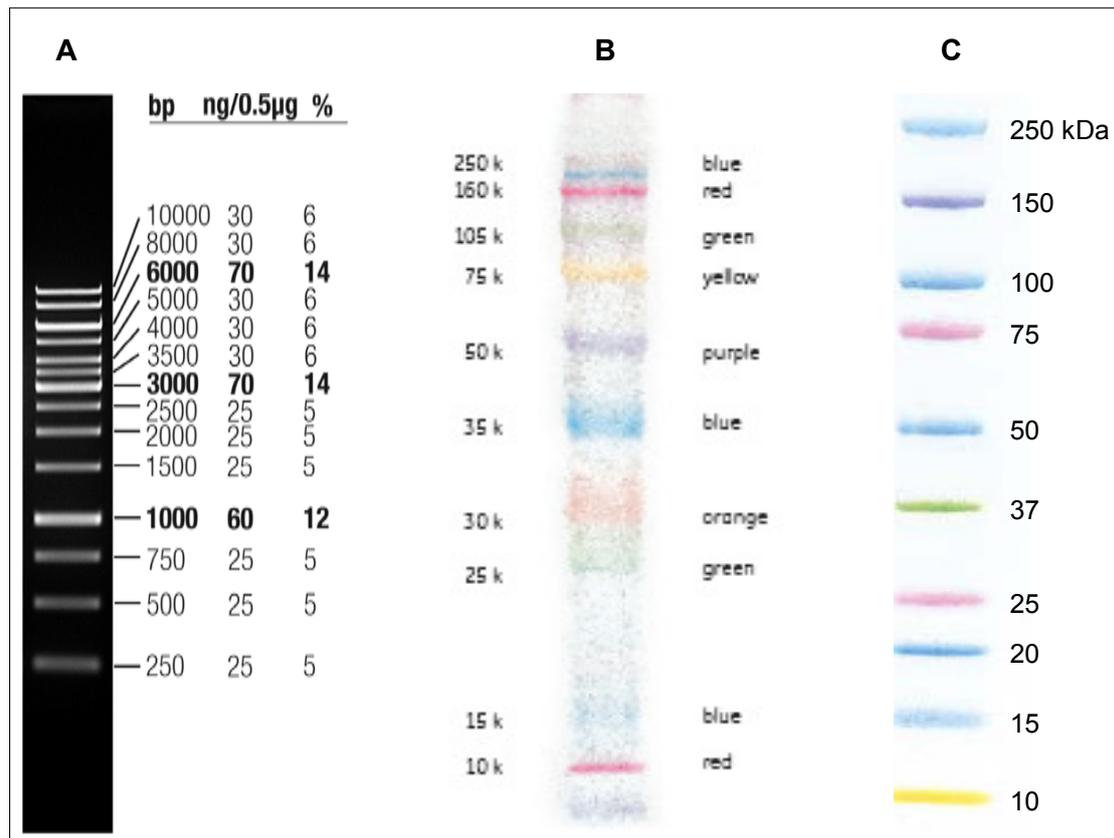
Folgende Antikörper und Seren (Tabelle 3.6) wurden in immunologischen Nachweisverfahren verwendet.

**Tabelle 3.6** Antikörper und Seren

<b>Antikörper (Spezifität)</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Bemerkung</b>	<b>Referenz</b>
$\alpha$ -Ag43 IgG	Kaninchen	polyklonales Serum, Reaktion jeder Ag43 <sup>α</sup> -Variante	Klemm (Lyngby, Dänemark)
$\alpha$ -Ag43a-536 <sup>α</sup> IgG	Kaninchen	polyklonales Serum, Kreuzreaktion mit Ag43a-EcN <sup>α</sup> u. Flu <sup>α</sup>	diese Arbeit
$\alpha$ -Ag43b-536 <sup>α</sup> IgG	Kaninchen	polyklonales Serum, Kreuzreaktion mit Ag43b-EcN <sup>α</sup>	Dobrindt (Würzburg)
$\alpha$ -AIDA-I IgG	Kaninchen	polyklonales Serum	Schmidt (Münster)
$\alpha$ -DIG IgG-AP	Schaf	polyklonal, AP-Konjugat	<i>Roche Applied Science</i> (Penzberg)
$\alpha$ - <i>E. coli</i> IgG	Kaninchen	polyklonal	<i>Biodesign International</i> (Saco, USA)
$\alpha$ -Human F(ab') <sub>2</sub> IgG	Kaninchen	polyklonal	<i>Dianova GmbH</i> (Hamburg)
$\alpha$ -Kaninchen IgG-HRP	Ziege	polyklonal, Sekundär-/Tertiärantikörper, HRP-Konjugat	<i>Dianova GmbH</i> (Hamburg)
$\alpha$ -YadA IgG	Kaninchen	polyklonales Serum	Ackermann (München)
Patientenseren 1-4	human	polyklonale Patientenseren nach Harnwegsinfektion mit UPEC	<i>Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie</i> (Würzburg)

### 3.6. Größen- & Molekulargewichtsmarker

Zur Abschätzung von Molekülgrößen wurden jeweils 5  $\mu\text{l}$  eines DNA-Längenstandards oder 7  $\mu\text{l}$  eines Protein-Größenmarker (Abb. 3.1) in Agarosegel-Elektrophoresen (s. 4.3.) bzw. SDS-PAGEs (s. 4.16.) mit auf das jeweilige Gel aufgetragen.



**Abb. 3.1: Elektrophorese-Marker.** **A:** GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot); **B:** Full Range Rainbow Molecular Weight Marker (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg); **C:** Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards (Bio-Rad Laboratories GmbH, München).

### 3.7. Eukaryontische Zellen

Zellkulturexperimente wurden mit den in Tabelle 3.7 aufgelisteten Zelllinien durchgeführt. Die verwendeten Medien sind unter 3.9. erwähnt.

**Tabelle 3.7** Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Referenz
HEp-2	human, Zervix-Karzinom, HeLa-Derivat, epithelial	ATCC (Manassas, USA)
IHKE	human, Niere, transformiert, epithelial (proximaler Tubulus)	Khan (Würzburg)
J774.1	murin, Makrophagen	ATCC (Manassas, USA)
T24	human, Blasen-Karzinom, epithelial	ATCC (Manassas, USA)
T84	human, Colon-Karzinom als Lungenmetastase isoliert, epithelial	ATCC (Manassas, USA)

### 3.8. Kultivierung von Mikroorganismen

#### 3.8.1. Medien & Nährböden

Die verwendeten Medien wurden bei 121 °C und 1 bar für 20 min autoklaviert. Hitzeinstabile Zusätze (s. 3.8.2.) wurden durch Filtration (0,22 µm) sterilisiert und den abgekühlten Kulturmedien zugegeben.

#### Lysogeny Broth (LB)-Lennox (pH 7)

	5	g	NaCl
	5	g	Hefeextrakt
	10	g	Trypton
	(20	g	Agar für feste Medien)
ad	1	l	dH <sub>2</sub> O

#### IPTG/X-Gal-Platten

LB-Agar mit			
	0,5	mM	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
	80	µg/ml	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

## M63B1-Minimalmedium (pH 7)

0,001	‰	FeSO <sub>4</sub>
0,5	‰	Thiamin (Vitamin B <sub>1</sub> )
10	‰	MgSO <sub>4</sub>
0,4	%	D-Glucose
1	%	Casaminosäuren
3	mM	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
20	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
65	mM	KOH

## Brain Heart Infusion (BHI)-Medium

3,7	%	BHI-Broth
(2	%	Agar für feste Medien)

## YPD-Medium

1	%	Hefeextrakt
2	%	Pepton
2	%	D-Glucose
(2	%	Agar für feste Medien)

**3.8.2. Medienzusätze**

## Antibiotika (verwendete Endkonzentrationen)

Ampicillin (100 µg/ml)  
 Anhydrotetracyclin (0,4 ng/ml)  
 Chloramphenicol (20 µg/ml)  
 Kanamycin (50 µg/ml)  
 Tetracyclin (12,5 µg/ml)

### 3.9. Zellkulturmedien

Medien, Seren und Wachstumsfaktoren für die Zellkultur wurden von (\*) *PAA Laboratories GmbH* (Cölbe), (#) *Sigma-Aldrich Chemie GmbH* (Taufkirchen) und (†) *c.c.pro* (Oberdorla) bezogen. Nachfolgend sind die einzelnen Komplettmedien aufgelistet.

#### HEp-2-Medium

MEM with Earle's Salts\*

1	x	neAA*
2	mM	L-Glutamin*
10	%	FKS*

#### IHKE-Medium

DMEM / Ham's F-12\*

1	x	ITS-Supplement#
10	µg/l	EGF#
36	µg/l	Hydrocortison#
15	mM	HEPES*
10	%	FKS*

#### J774.1-Medium

DMEM, high Glucose (4,5 g/l)\*

2	mM	L-Glutamin*
10	%	FKS*

#### T24-Medium

McCoy's 5A†

2	mM	L-Glutamin*
10	%	FKS*

#### T84-Medium

DMEM / Ham's F-12\*

1	x	neAA*
2	mM	L-Glutamin*
10	%	FKS*

### 3.10. Puffer & Lösungen

#### Abscherpuffer (pH 7,4)

0,5	mM	Tris
75	mM	NaCl

#### Anodenpuffer I

0,3	M	Tris
0,1	%	Tween 20
20	%	Methanol

#### Anodenpuffer II

25	mM	Tris
20	%	Methanol

#### Binding Puffer (pH 7,4)

20	mM	Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
30	mM	Imidazol
500	mM	NaCl

#### Blockierungslösung

5	%	Magermilchpulver in TBS-T
---	---	---------------------------

#### Coomassie-Brillant-Blau Färbelösung

0,25	%	Coomassie-Brillant-Blau G-250
0,25	%	Coomassie-Brillant-Blau R-250
10	%	Essigsäure
30	%	Ethanol

#### Coupling Puffer (pH 8,3)

200	mM	NaHCO <sub>3</sub>
500	mM	NaCl

## 10x DNA-Ladepuffer

	125	mg	Bromphenolblau
	125	mg	Xylencyanol
	12,5	g	Ficoll® 400
ad	50	ml	1x TE (pH 8)

## 1x EB-Puffer (pH 8)

	50	mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	250	mM	Imidazol
	300	mM	NaCl

## EBSS-Puffer (500 ml, pH 7,4)

Lösung I)	375	ml	dH <sub>2</sub> O
Lösung II)	1,06	g	CaCl <sub>2</sub>
	1,6	g	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
	400	ml	dH <sub>2</sub> O
Lösung III)	0,72	g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
	1,58	g	KCl
	27,35	g	NaCl
	400	ml	dH <sub>2</sub> O
Lösung IV)	50	%	D-Glucose
Lösung V)	7,5	%	NaHCO <sub>3</sub>
Lösung VI)	375	ml	Lösung I
	50	ml	Lösung II
	50	ml	Lösung III
	4	ml	Lösung IV
	15	ml	Lösung V

## Elutionspuffer I (pH 7,4)

	20	mM	Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
	500	mM	Imidazol
	500	mM	NaCl

## Elutionspuffer II (pH 8)

50	mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
300	mM	NaCl
500	mM	Imidazol

## Entfärber I

10	%	Essigsäure
50	%	Ethanol

## Entfärber II

7,5	%	Essigsäure
5	%	Ethanol

## FISH-Hybridisierungspuffer (2000 µl)

	2	µl	10 % SDS
	40	µl	1 M Tris (pH 8)
	362	µl	5 M NaCl
	x	µl	Formamid (s. 4.9.2.)
ad	2000	µl	ddH <sub>2</sub> O

## FISH-Waschpuffer (50 ml)

	0,05	ml	10 % SDS
	0,75	ml	0,5 M EDTA (pH 8)
	1	ml	1 M Tris (pH 8)
	x	ml	5 M NaCl (s. 4.9.2., Tab. 4.1)
ad	50	ml	ddH <sub>2</sub> O

## Fixierungslösung (pH 7,2)

0,2	M	Natriumcacodylat
6,25	%	Glutaraldehyd

## Hochsalzpuffer (pH 8,2)

20	mM	Tris
1	M	NaCl

## Kathodenpuffer

25	mM	Tris
40	mM	$\epsilon$ -Aminocapronsäure
20	%	Methanol

## 5x Laemmli-Puffer (100 ml, pH 7,2)

Lösung I)	0,85	g	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
	2,05	g	EDTA
	5,5	g	SDS
	5,5	ml	$\beta$ -Mercaptoethanol
	50	ml	dH <sub>2</sub> O
Lösung II)	100	mg	Bromphenolblau
	34,5	ml	87 % Glycerin
	15,5	ml	dH <sub>2</sub> O
Lösung III)	50	ml	Lösung I
	50	ml	Lösung II

## 1x LEW-Puffer (pH 8)

50	mM	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$
300	mM	NaCl

## Niedrigsalzpuffer (pH 8,2)

20	mM	Tris
----	----	------

## 10x PBS (pH 7,4)

	2	g	KCl
	2,4	g	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
	17,8	g	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
	80	g	NaCl
ad	1	l	dH <sub>2</sub> O

## Puffer A (pH 8,3)

500	mM	Ethanolamin
500	mM	NaCl

## Puffer B (pH 4)

100	mM	CH <sub>3</sub> COONa
500	mM	NaCl

## 10x Restriktionspuffer

1	mg/ml	BSA
5	mM	DTT
100	mM	(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Mg
220	mM	Tris-Acetat (pH 7,9)
660	mM	CH <sub>3</sub> COOK

## 10x SDS-Laufpuffer

	10	g	SDS
	30,3	g	Tris
	144,1	g	Glycin
ad	1	l	dH <sub>2</sub> O

## Storage Solution (pH 7)

0,1	%	NaN <sub>3</sub>
50	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

## 50x TAE

	57,1	ml	99,7 % CH <sub>3</sub> COOH
	100	ml	0,5 M EDTA (pH 8)
	242	g	Tris
ad	1	l	dH <sub>2</sub> O

## 10x TBS-T (pH 8,5)

0,5	M	Tris
1,5	M	NaCl
1	%	Tween 20

## TE-Puffer (pH 8)

1	mM	EDTA
10	mM	Tris

Waschpuffer (pH 8)

5	mM	Imidazol
50	mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
300	mM	NaCl

## 4. Methoden

### 4.1. Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung niedermolekularer DNA aus Bakterien wurde das Prinzip der alkalischen Lyse angewandt. Durch Zugabe von Chelatoren wird die bakterielle Zellwand zunächst destabilisiert und danach durch Detergenzien vollständig lysiert. Im basischen Milieu denaturieren chromosomale DNA, Plasmid-DNA als auch Proteine, wobei die hochmolekularen Komponenten nach der Neutralisation nicht wieder renaturieren und zusammen mit dem Zelldebris über Salzkomplexe präzipitieren. Die Qualität der Plasmide ist bereits nach ihrer Aufreinigung für viele Anwendungen ausreichend.

#### 4.1.1. Mini-Präparation

Für die Isolierung von Plasmiden im kleinen Maßstab wurden die Puffer 1-3 des QIAGEN Plasmid Midi Kits (QIAGEN, Hilden) verwendet. Hierfür wurden 4 ml einer Übernachtskultur mittels Zentrifugation (5 min, 18.000 x g) geerntet und das Zellsediment in 150 µl Puffer 1 mit 1 mg/ml Lysozym resuspendiert. Nach 10minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Bakterien durch Zugabe von 300 µl Puffer 2 und vorsichtigem Invertieren lysiert (5 min). Zur Neutralisation wurden 225 µl Puffer 3 unter dreimaligem Invertieren hinzugegeben (10 min, auf Eis). Die Probe wurde nun mit 200 µl Phenol/Chloroform (1:1; Roti<sup>®</sup>-Phenol, CARL ROTH GmbH + Co. KG, Karlsruhe) versetzt, gründlich durchmischt und 10 min bei 18.000 x g abgetrennt. Die sich in der oberen Phase befindliche niedermolekulare DNA wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluß erfolgte das Fällen der Plasmide in 2 ½ Vol. Ethanol (reinst) für 30 min, um sie hinterher in 1,5 ml 70 % p. a. Ethanol zu waschen (10 min, 18.000 x g). Nach dem Trocknen (37 °C) wurde die gewonnene Plasmid-DNA in 25 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### 4.1.2. Midi-Präparation

Die Isolierung von 'low copy'-Vektoren, Cosmiden und Plasmiden größeren Maßstabs erfolgte aus 120 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Midi Kits (QIAGEN, Hilden). Abweichend vom Herstellerprotokoll wurden die Reaktionsschritte unter Verwendung der Puffer 1, 2 und 3 mit jeweils 6 ml durchgeführt. Für die Aufreinigung der

Plasmid-DNA wurde sich der mitgelieferten QIAGEN-tip 100 Anionenaustausch-Säulen bedient. Die Plasmide ließen sich hinterher mit 0,7 Vol. Isopropanol fällen (10 min, 18.000 x g, 4 °C), in 70 % p. a. Ethanol waschen (10 min, 18.000 x g) und abschließend lufttrocknen.

#### 4.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR; Saiki *et al.*, 1988) ist ein molekulargenetisches Verfahren, bei dem selektiv bestimmte DNA-Sequenzen *in vitro* amplifiziert werden. Die Neusynthese eines Nukleinsäureabschnittes erfolgt mittels DNA-Polymerase und zweier synthetischer, die Sequenz einrahmender Oligonukleotiden (Primern). Ausgehend von geringsten DNA-Mengen ( $\geq 10^{-15}$  g) können durch exponentielle, zyklische Anreicherung innerhalb weniger Stunden bis zu  $10^{12}$  identische Kopien hergestellt werden (Lottspeich & Zorbas, 1998).

PCRs fanden in dieser Arbeit Anwendung unter anderem zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen und Sequenzierungen sowie zur Überprüfung der Insertion und Orientierung von DNA-Konstrukten.

Als Ausgangsmaterial (*'template'*) für einen 20-50  $\mu$ l-Ansatz diente entweder 50 ng Plasmid-DNA oder 1  $\mu$ l eines Zelllysats, das durch Resuspendieren von wenigen Bakterienzellen einer Einzelkolonie in 20  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O hergestellt wurde. Standardansätze enthielten zudem 1x Reaktionspuffer, 200  $\mu$ M dNTPs, 0,75-4 mM MgCl<sub>2</sub>, jeweils 100 pmol jeden Oligonukleotids und 0,04 U DAp GoldStar<sup>®</sup> DNA-Polymerase (*Eurogentec*, Köln) bzw. 1x Q-Solution bei Verwendung von 0,03 U *Taq* DNA-Polymerase (*QIAGEN*, Hilden).

Die Amplifikation der DNA-Fragmente wurde im Thermocycler T3 (*Biometra*, Göttingen) durchgeführt. Einem ersten Denaturierungsschritt (3 min, 94 °C) folgten 30-40 Zyklen bestehend aus Denaturierung (40 s, 94 °C), *Annealing* (45 s,  $T_{m[\text{Primer}]}$ ; s. 3.3.) und Elongation (60 s / 1 kbp, 72 °C), danach schloß sich eine terminale Elongationsphase (10 min, 72 °C) an.

Das Ergebnis der PCR ließ sich anhand einer Agarosegel-Elektrophorese (s. 4.3.) darstellen. Je nach Anwendung (Klonierung, Sequenzierung) wurden die PCR-Produkte mittels QIAquick PCR Purification Kit (*QIAGEN*, Hilden; s. 4.4.3.) oder in einer Ethanol-fällung (s. 4.4.2.) aufgereinigt.

### 4.3. Agarosegel-Elektrophorese

Die Größenbestimmung von Nukleinsäuren und DNA-Fragmenten bzw. Analyse der Restriktionsmuster erfolgte in horizontalen Agarosegel-Elektrophoresen. Hiernach wandern DNA-Moleküle aufgrund ihrer negativen Ladung von der Kathode zur Anode, wobei sie entsprechend ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt werden. Die Konzentration des Agarosegels (0,8-1,5 %) richtet sich dabei nach den zu erwartenden Fragmentgrößen.

Die Proben wurden mit 10x DNA-Ladepuffer versetzt und bei konstanter Spannung (140 V) im Agarosegel (peqGOLD Universal-Agarose, *PEQLAB Biotechnologie GmbH*, Erlangen) elektrophoretisch aufgetrennt (Sub-Cell GT, *Bio-Rad Laboratories GmbH*, München; Laufpuffer: 1x TAE). Abschließend wurde das Gel in einer Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) 15 min gefärbt und unter UV-Licht (Gel iX Imager, *Intas*, Göttingen) ausgewertet.

### 4.4. Aufreinigung von DNA

Um DNA für ihre weitere Verwendung zu präparieren, mußte sie zunächst von störenden Salzen und anderen Kontaminationen (Proteine, Primer, Nukleotide, etc.) befreit und aufgereinigt werden.

#### 4.4.1. Extraktion mit Phenol/Chloroform

DNA in wässriger Lösung wurde auf ein Endvolumen von 100 µl aufgefüllt, mit 40 µl Phenol/Chloroform (1:1; Roti<sup>®</sup>-Phenol, *CARL ROTH GmbH + Co. KG*, Karlsruhe) versetzt und der Ansatz für 5 min bei 18.000 x g zentrifugiert. Die klare obere Phase (kurze DNA, Plasmide, RNA) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 40 µl Chloroform gemischt und erneut zentrifugiert. Abschließend wurde die sich im Überstand befindliche DNA mit Ethanol gefällt (s. 4.4.2.).

#### 4.4.2. Ethanolfällung

DNA-enhaltende Lösungen wurden mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 4,8) sowie 2 ½ Vol. Ethanol (reinst) versetzt und mittels Zentrifugation (30 min, 18.000 x g) gefällt. Das Präzipitat wurde sogleich in 2 ½ Vol. 70 % p. a. Ethanol gewaschen (5 min, 18.000 x g), anschließend

luftgetrocknet und in 25 µl dH<sub>2</sub>O bzw. für nachfolgende Sequenzierungen in Hi-Di™ Formamid (*Applied Biosystems*, Darmstadt) aufgenommen.

#### 4.4.3. Gelextraktion

Alternativ zur Phenol/Chloroform-Extraktion (s. 4.4.1.) mit anschließender Ethanolfällung (s. 4.4.2.) wurden DNA-Fragmente aus PCR- (s. 4.2.) und Restriktionsansätzen (s. 4.5.) mit dem QIAquick PCR Purification Kit (*QIAGEN*, Hilden) aufgereinigt. Hierfür wurden die DNA-Proben in einer Agarosegel-Elektrophorese (s. 4.3.) aufgetrennt, so daß die gewünschte Bande unter UV-Licht mit einem Skalpell sauber ausgeschnitten werden konnte. Die Elution der DNA aus dem Gel folgte dem vom Hersteller mitgelieferten Standardprotokoll.

#### 4.5. DNA-Restriktion

0,5-2 µg DNA wurden jeweils mit 1 U Restriktionsendonuklease (*NEB*, Frankfurt/M.) versetzt und in 20-50 µl-Ansätzen in 1x Restriktionspuffer für 2 h bei 37 °C gespalten. Die Reaktion ließ sich gegebenenfalls durch Hitzeinaktivierung des Enzyms (20 min, 65 °C) stoppen. Wenn nötig wurde die DNA nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion gefällt (s. 4.4.1. und 4.4.2.) oder mittels QIAquick PCR Purification Kit (*QIAGEN*, Hilden; s. 4.4.3.) gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Entstandene Restriktionsfragmente ließen sich im Agarosegel (s. 4.3.) analysieren.

#### 4.6. Ligation von DNA-Fragmenten (Klonierung)

Mit Restriktionsenzymen verdaute (s. 4.5.) Vektor- und Insert-DNA wurden für nachfolgende Ligationen aufgereinigt. Je nach Anwendung kamen auch kommerzielle und bereits linearierte Vektoren (s. 3.2.) mit 3'-terminalen Thymidin-Überhängen, die eine Ligation von PCR-Produkten mit Desoxyadenosin-Resten an den 3'-Enden ermöglicht, zum Einsatz (T/A-Klonierung). Ein Ligationsansatz (max. 20 µl) enthielt 25 U T4 DNA-Ligase (*NEB*, Frankfurt/M.), 1x Reaktionspuffer (*NEB*, Frankfurt/M.) sowie Vektor- und Insert-DNA im Verhältnis 1:3. Die Reaktion fand über Nacht bei 16 °C statt.

## 4.7. Transformation von Bakterien

Zur Aufnahme exogener DNA (Transformation) müssen *E. coli*-Zellen auf *artifizielle* Weise erst kompetent gemacht werden. Erreicht wird eine Permeabilität der Zellmembran zur Absorption von Makromolekülen entweder durch die Behandlung suspendierter Bakterien mit Calciumchlorid in Kombination mit einem Hitzeschock oder durch kurze Elektroimpulse hoher Feldstärke (Madigan *et al.*, 2000).

### 4.7.1. Präparation kompetenter Bakterienzellen

#### 4.7.1.1. CaCl<sub>2</sub>-Methode

Frisches LB-Medium wurde 1:100 mit Bakterien einer Übernachtskultur beimpft und bis zum Erreichen der frühen logarithmischen Wachstumsphase ( $OD_{600\text{ nm}} \approx 0,6$ ) schüttelnd inkubiert (37 °C). Danach wurden die Zellen geerntet (6.000 x g, 10 min, 4 °C) und in ½ Vol. sterilem, eisgekühltem 0,1 M CaCl<sub>2</sub> gewaschen. Das Sediment wurde in 1/40 Vol. 0,1 M CaCl<sub>2</sub> aufgenommen und auf Eis inkubiert. Nach 30-60 min wurde der Zellsuspension steriles Glycerin (25 % v/v) zugegeben und bis auf weiteres bei -80 °C in 150 µl-Aliquots aufbewahrt.

#### 4.7.1.2. Elektrokompente Zellen

Bakterien einer Übernachtskultur wurden in frischem LB-Medium bis zum Erreichen der  $OD_{600\text{ nm}} = 0,5-0,8$  aerob angezogen (37 °C), anschließend auf Eis gekühlt und abzentrifugiert (6.000 x g, 10 min, 4 °C). Das Zellsediment mußte nacheinander erst in 1 Vol. dann in ½ Vol. sterilem, eisgekühltem dH<sub>2</sub>O und schließlich in 1/40 Vol. sterilem, 10 %igem Glycerin gewaschen werden. Die elektrokompenten Bakterienzellen wurden in 1/250 des Ausgangsvolumens Glycerin (10 %ig) resuspendiert und in Aliquots zu 40 µl bei -80 °C eingefroren ( $c \approx 10^{10}$  Zellen/ml).

### 4.7.2. Transformation

#### 4.7.2.1. Hitzeschock

Aliquots CaCl<sub>2</sub>-kompetenter Zellen (s. 4.7.1.1.) wurden 0,5-2 µg DNA oder 10 µl eines

Ligationsansatzes (s. 4.6.) zugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Transformation durch Hitzeschock (3 min, 43 °C) mit sofortiger Kühlung auf Eis (3 min). Der Ansatz wurde in 1 ml sterilem LB-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Transformierte Bakterien ließen sich durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungen auf Antibiotika- und/oder Metabolit-haltigem LB-Agar selektionieren und nach Inkubation über Nacht bei 37 °C isolieren, reinigen sowie molekularbiologisch untersuchen.

#### 4.7.2.2. Elektroporation

Aliquots elektrokompenter Bakterienzellen (s. 4.7.1.2.) wurden aufgetaut und zusammen mit maximal 2 µl aufgereinigter DNA auf Eis aufbewahrt (20 min). Elektroporationen fanden stets in vorgekühlten 2 mm-Küvetten des Gene Pulser Xcells (*Bio-Rad Laboratories GmbH*, München) bei  $C=25 \mu\text{F}$ ,  $R=200 \Omega$  und  $U=2,5 \text{ kV}$  statt. Unmittelbar nach der Reaktion wurden die Bakterien in 1 ml LB-Medium aufgenommen und 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Selektion transformierter Zellen erfolgte auf entsprechenden Medien (Antibiotika- und/oder Metabolit-haltiger LB-Agar, 37 °C, über Nacht). Am Folgetag wurden die Kolonien vereinzelt und auf erfolgreiche Transformation hin überprüft.

#### 4.8. DNA-Sequenzierung

Die Analyse von DNA-Sequenzen erfolgte nach einer Modifizierung der von Sanger *et al.* (1977) entwickelten Kettenabbruchreaktion und wurde zur Überprüfung klonierter Plasmid-Inserts verwendet. Hierfür mußten in vereinfachten PCRs (s. 4.2.) zunächst Primer-spezifische DNA-Fragmente amplifiziert werden. Die Reaktionen wurden mit dem BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (*Applied Biosystems*, Darmstadt) und jeweils nur einem Oligonukleotid (s. Tab. 3.4) durchgeführt. Ein Reaktionsansatz enthielt 2 µl Ready Reaction Premix, 1x BigDye<sup>®</sup> Sequencing Puffer, 30 pmol Primer, 1 µl 'template'-Plasmid-DNA sowie dH<sub>2</sub>O (ad 10 µl) und wurde im T3 Thermocycler (*Biometra*, Göttingen) wie folgt inkubiert: 3 min bei 94 °C, 25x (30 s, 94 °C / 15 s,  $T_m$  [Primer] / 4 min, 60 °C). Die Sequenzierproben wurden mittels Ethanol-fällung (s. 4.4.2.) aufgereinigt und im ABI PRISM<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*, Darmstadt) analysiert.

## 4.9. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

Die *in-situ*-Hybridisierung ist eine Technik, mit der spezifische Nukleinsäuren direkt in fixierten Präparaten von Geweben, Zellen oder subzellulären Komponenten lokalisiert werden können (Lottspeich & Zorbas, 1998). In der vorliegenden Arbeit wurden sog. Ganzzellhybridisierungen vorgenommen, um anhand Fluoreszenz-markierter Oligonukleotidsonden komplementäre bakterielle rRNA-Sequenzen nachzuweisen.

### 4.9.1. Fixierung

Die Fixierung des Untersuchungsmaterials (Katheterproben, bakterielle Zellen der logarithmischen Wachstumsphase [s. Tab. 3.2]) erfolgte nach dreimaligem Waschen mit PBS in 4 % Paraformaldehyd/PBS für 4-6 h auf Eis. Danach wurde das Material erneut gewaschen, in PBS aufgenommen und 1:1 mit Ethanol (reinst) versetzt. Gegebenenfalls konnten die Proben bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C konserviert werden. Das Untersuchungsmaterial wurde auf mikroskopische Objektträger aufgebracht und bei 37 °C luftgetrocknet. Anschließend erfolgte die Entwässerung der Proben in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (50, 70, 80, 96 %) für jeweils 5 min. Zum Schluß wurden die Präparate entweder bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C getrocknet.

### 4.9.2. *in situ*-Hybridisierung

200 ng einer Fluoreszenz-markierten Oligonukleotidsonde (s. 3.4.) wurden in 100 µl FISH-Hybridisierungspuffer verdünnt und auf die Proben aufgetragen (30-50 µl). Um das biologische Material nicht zu schädigen, mußten für Sonden mit einer höheren Schmelztemperatur ( $T_m$ ) als 46 °C die Reaktionsbedingungen durch Zugabe von Formamid (Erhöhung der Stringenz) angepaßt werden. Allgemein gilt: Um die Schmelztemperatur zu senken, wird pro 0,5 °C die Konzentration des Formamids um 1 % im Puffer erhöht. Hybridisierungen fanden in einer feuchten Kammer für 3 h bei 46 °C statt.

Nach der Reaktion wurden die Proben im vorgewärmten FISH-Waschpuffer für 20 min bei 43 °C inkubiert. Die Ionenstärke des Waschpuffers richtete sich hierbei nach der Konzentration des Formamids (Stringenz) während der Hybridisierung und ist der Tabelle 4.1 zu entnehmen. Abschließend wurden die Objekte in ddH<sub>2</sub>O gespült und über Nacht bei 4 °C getrocknet. Nach dem Eindecken der Objektträger mit Citifluor (*Citifluor Ltd.*, London, UK) konnten die Proben am Epifluoreszenzmikroskop (Axiolab, *Carl Zeiss MicroImaging GmbH*,

Göttingen) ausgewertet werden.

**Tabelle 4.1** NaCl-Konzentration des FISH-Waschpuffers (50 ml)

Stringenz c <sub>Formamid</sub> [%]	c <sub>NaCl</sub> [mol/l]	5 M NaCl [ $\mu$ l]
0	0,900	9.000
5	0,636	6.300
10	0,450	4.500
15	0,318	3.180
20	0,225	2.150
25	0,159	1.490
30	0,112	1.020
35	0,080	700
40	0,056	460
45	0,040	300
50	0,028	180
55	0,020	100
60	0,008	40
70	0,000	0

#### 4.10. *in silico*-Analysen

Nukleotid-, Aminosäuresequenz- und Datenbankvergleiche wurden mit Hilfe des 'Basic Local Alignment Search Tools' (BLAST; Altschul *et al.*, 1990) unter <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> vorgenommen. Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind unter Eingabe der DNA-Sequenzen bei 'NEBcutter V2.0' (Vincze *et al.*, 2003; <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) ermittelt worden. Bei graphischen Darstellungen und Primer-Design half die Vector NTI<sup>®</sup> V.10-Software (Invitrogen, Carlsbad, USA). Proteinanalytische Datenbanken und Programme standen auf dem 'ExpASY Proteomics Server' (Expert Protein Analysis System) des Schweizerischen Instituts für Bioinformatik (SIB) unter <http://expasy.org> zur Verfügung. Oligonukleotidsonden für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) wurden mit 'probeBase' (<http://microbial-ecology.de/probebase/>) und der 'European ribosomal RNA database' (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/rRNA/index.html>) erstellt.

## 4.11. Isolierung von Proteinen

### 4.11.1. Gesamtzellextrakt

Für die Isolierung von Gesamtzellproteinen wurde 1 ml einer Bakterienkultur der  $OD_{600\text{ nm}}=1$  sedimentiert (10 min, 18.000 x g), in 80  $\mu$ l TE-Puffer aufgenommen und mit 20  $\mu$ l 5x Laemmli-Puffer (Laemmli, 1970) versetzt. Der Ansatz wurde 10 min bei 100 °C gekocht und anschließend kurz anzentrifugiert. Von diesem Extrakt wurden 10  $\mu$ l auf ein SDS-Polyacrylamidgel (s. 4.16.) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

### 4.11.2. Hitzeextraktion

Antigen 43 wird nach seiner Translokation autokatalytisch gespalten und bildet einen heterooligomeren Komplex bestehend aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit (Kjærgaard *et al.*, 2002). Während die  $\beta$ -Untereinheit in der äußeren Zellmembran verbleibt, interagiert die extrazelluläre  $\alpha$ -Domäne über nichtkovalente Bindungen mit dem integralen Ag43 <sup>$\beta$</sup>  und kann durch kurzes Erhitzen von der Zelloberfläche wieder gelöst werden (Henderson & Owen, 1999).

Bakterien einer 50 ml-Übernachtskultur wurden durch Zentrifugation (10 min, 6.000 x g) geerntet, zweimal mit 0,85 % NaCl gewaschen sowie hinterher in 5 ml Abscherpuffer aufgenommen. Die Zellsuspension wurde für 20 min bei 60 °C im Wasserbad schüttelnd inkubiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Durch intensives Schütteln (1 min) ließen sich angelagerte Proteine der äußeren Membran von der Zelloberfläche gewinnen. Die Suspension wurde mittels Zentrifugation (15 min, 18.000 x g) geklärt und die sich im Überstand befindlichen Proteine mit Trichloressigsäure gefällt sowie gereinigt (s. 4.12.1.).

### 4.11.3. Überexpression rekombinanter Proteine

500 ml frisches Medium wurden 1:100 mit einer Übernachtskultur beimpft und bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Nach 1 h wurde die Kultur je nach Expressionssystem mit 0,4  $\mu$ g/l Anhydrotetracyclin (pASK75) oder mit 1 mM IPTG (pET-28a) induziert. In der Regel erreichten die Schüttelkulturen nach insgesamt siebenständiger Inkubation bei 37 °C eine  $OD_{600\text{ nm}}$  von 0,8 und wurden geerntet (20 min, 17.700 x g, 4 °C). Die sedimentierten Bakterien ließen sich in 5 ml Puffer (s. 4.12.2.1.) resuspendieren und wurden entweder durch Hochdruckdispersion (French<sup>®</sup> Pressure Cell Press; SLM-Aminco, Urbana, USA) in sechs

Zyklen aufgeschlossen oder mit Ultraschall (Sonopuls HD 70, UW 70; *Bandelin GmbH & Co. KG*, Berlin) auf Eis in zehn Intervallen à 20 s lysiert. Das Zelllysate wurde sofort bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren und nach 15 min im  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Wasserbad wieder aufgetaut. Abschließend wurde die Suspension zweimal zentrifugiert ( $18.000 \times g$ , 30 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) und die sich im Überstand befindlichen Proteine weiter aufgereinigt (s. 4.12.2.).

## **4.12. Aufreinigung von Proteinen**

### **4.12.1. Fällung mit Trichloressigsäure**

Proteinlösungen wurden mit Trichloressigsäure ( $c=10\%$ , w/v) versetzt und über Nacht bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  gefällt. Die Präzipitate wurden bei  $18.000 \times g$  für 15 min sedimentiert, dreimal mit 100 %igem Ethanol gewaschen, anschließend luftgetrocknet und in geeigneten Volumina TE-Puffer gelöst.

### **4.12.2. Chromatographische Proteinaufreinigungen**

#### **4.12.2.1. Metallchelate-Affinitätschromatographie**

Die Aufreinigung poly-Histidin-markierter Proteine erfolgte in mehreren Schritten, um einen anwendungsbedingt hohen Reinheitsgrad der rekombinanten Proteine zu erreichen. Dabei kamen im Folgenden drei verschiedene Systeme zum Einsatz, die das Prinzip einer immobilisierten Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) gemein haben: Matrixgebundene  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen dienen als immobilisierte Liganden, die spezifisch basische Gruppen von Proteinen – in diesem Fall terminale poly-Histidin-Reste – reversibel binden. Die Interaktion mit dem Liganden wird demnach genutzt, um poly-Histidin-markierte Proteine selektiv aus einer komplexen Lösung herauszuadsorbieren. Durch kompetitive Verdrängung, z. B. mit Imidazol, kann dann das poly-Histidin-markierte Protein aus der Bindung letztlich wieder gelöst und eluiert werden.

##### **4.12.2.1.1. $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie mit Protino<sup>®</sup> Ni 2000-Säulen**

Die aus einer induzierten Bakterienkultur gewonnenen Proteine (s. 4.11.3.) wurden auf eine mit 1x LEW-Puffer äquilibrierte Protino<sup>®</sup> Ni 2000-Fertigsäule (*MACHEY-NAGEL GmbH &*

Co. KG, Düren) gegeben. Der Durchfluß beruht hierbei auf der Gravitationskraft. Nach dem Waschen mit 8 ml 1x LEW wurden poly-Histidin-markierte Proteine mit 9 ml 1x EB-Puffer von der Säule eluiert.

#### 4.12.2.1.2. Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie mit Profinity™ IMAC-Säulen

Micro Bio-Spin™-Säulchen (*Bio-Rad Laboratories GmbH*, München) wurden mit 200 µl Profinity™ IMAC Nickel-geladener Gelmatrix (*Bio-Rad Laboratories GmbH*, München) beladen, anschließend mit 500 µl dH<sub>2</sub>O gewaschen und für die sofortige Benutzung mit 1 ml Waschpuffer äquilibriert. Sämtliche Zentrifugationsschritte wurden zu diesem Zweck für 1 min bei maximal 1.000 x g durchgeführt. Die aus den induzierten Bakterienkulturen extrahierten Proteine (s. 4.11.3.) wurden nacheinander auf die Säulchen gegeben, 5 min mit der Gelmatrix inkubiert und sodann zentrifugiert. Ungebundene Proteine ließen sich nach zusätzlicher Inkubation (5 min) mit 1 ml Waschpuffer entfernen (1.000 x g). Die Rückgewinnung poly-Histidin-markierter Proteine erfolgte durch Resuspendieren der Gelmatrix in 1 ml Elutionspuffer II (5 min) und abschließender Zentrifugation (1.000 x g) in einem entsprechenden Auffangröhrchen.

#### 4.12.2.1.3. Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie mit HisTrap FF-Säulen

Eine nach der unter 4.12.2.1.1. oder 4.12.2.1.2. beschriebenen Anreicherung durchgeführte, zusätzliche Aufreinigung poly-Histidin-markierter Proteine folgte dem untenstehenden Programm (Tabelle 4.2). Hierfür wurde zunächst eine 1 ml HisTrap FF-Säule (*GE Healthcare*, München) an das BioLogic DuoFlow QuadTec 10-System (*Bio-Rad Laboratories GmbH*, München) angeschlossen ( $p \leq 3$  bar) und mit fünf Säulenvolumen ddH<sub>2</sub>O gewaschen.

**Tabelle 4.2** HisTrap FF, Aufreinigungsprotokoll

Schritt	Volumen [ml]	Lösung	Flußrate [ml/min]	Bemerkung
1	5	Binding Puffer	1	Äquilibrieren
2	1	Proteinlösung	1	Probenauftrag
3	5	Binding Puffer	1	Probenauftrag
4	15	Binding Puffer	1	Waschen
5	10	Elutionspuffer I	1	Elution

#### 4.12.2.2. Ionenaustausch-Chromatographie

Die Ionenaustausch-Chromatographie beruht auf der kompetitiven Wechselwirkung geladener Ionen (Lottspeich & Zorbas, 1998). Dabei bindet das Probenmolekül (Protein) zunächst an fixierte Ladungen einer stationären Phase und konkurriert in nachfolgenden Schritten mit Salz-Ionen um die geladenen Positionen der Ionenaustauscher-Matrix. Nach dem Waschen wird die Verdrängung und Elution des Proteins entweder durch eine ansteigende Salzkonzentration oder durch eine Änderung des pH-Wertes in der mobilen Phase erreicht.

Eine UNO™ Q-1-Anionenaustauschersäule (*Bio-Rad Laboratories GmbH*, München) wurde an das BioLogic DuoFlow QuadTec 10-System (*Bio-Rad Laboratories GmbH*, München) angeschlossen und gemäß den Angaben des Herstellers konditioniert: Waschen mit jeweils 5 Säulenvolumen (SV) ddH<sub>2</sub>O sowie Niedrigsalzpuffer, Reinigen mit 5 SV Hochsalzpuffer und Äquilibrieren mit 5 SV Niedrigsalzpuffer. Die sich anschließende Proteinaufreinigung folgte untenstehendem Protokoll (Tabelle 4.3).

**Tabelle 4.3** UNO™ Q-1\*, Aufreinigungsprotokoll

Schritt	Volumen [ml]	Lösung	Flußrate** [ml/min]	Bemerkung
1	6,5	Niedrigsalzpuffer	0,5	Äquilibrieren
2	1	Proteinlösung	0,5	Probenauftrag
3	5	Niedrigsalzpuffer	0,5	Probenauftrag
4	6,5	Niedrigsalzpuffer	0,5	Waschen
5	13	0-50 % Hochsalzpuffer	0,25	Gradientenelution
6	5,2	50-100 % Hochsalzpuffer	0,25	Gradientenelution
7	6,5	100 % Hochsalzpuffer	0,5	Elution

\*  $V_{\text{Säule}}=1,3 \text{ ml}$

\*\*  $p \leq 48 \text{ bar}$

#### 4.13. Aufkonzentrierung von Proteinen

Wenn eine Fällung mit Trichloressigsäure (s. 4.12.1.) ungeeignet war, wurden Proteinlösungen in Amicon® Ultra-15-Zentrifugeneinheiten (*Millipore GmbH*, Schwalbach) mit einer Molekulargewichtsabgrenzung von 50 kDa bei maximal 4.000 x g für 15-45 min und 4 °C

eingengt.

#### 4.14. Dialyse

Proteine wurden über Nacht bei 4 °C gegen 1 Liter der entsprechenden Pufferlösung in Visking-Schlauchmembranen (MWCO 14.000; *CARL ROTH GmbH + Co. KG*, Karlsruhe) dialysiert.

#### 4.15. Quantitative Proteinbestimmung

Quantitative Proteinnachweise erfolgten mit Hilfe chromogener Reagenzien, die zusammen mit den funktionellen Gruppen von Proteinen (Arg, Lys, His, Trp, Tyr, Phe) eine Farbreaktion hervorrufen. Dabei korreliert die Intensität des Farbstoffes direkt mit der Konzentration der reagierenden Gruppe und kann spektralphotometrisch gemessen werden.

Mit Roti<sup>®</sup>-Nanoquant (*CARL ROTH GmbH + Co. KG*, Karlsruhe) durchgeführte Konzentrationsmessungen beruhen auf einer Modifikation der Proteinbestimmung nach Bradford (1976). Hierfür wurden für eine Eichgerade definierte Mengen (0-100 µg/ml) bovinen Albumins Fraktion V (*CARL ROTH GmbH + Co. KG*, Karlsruhe) in Meßküvetten vorgelegt (Dreifachansatz). Zu den 200 µl der Standard- sowie Proteinproben wurden jeweils 800 µl 1x Roti<sup>®</sup>-Nanoquant gegeben, gemischt und deren Absorption gegen reines Wasser als Referenz bei 590 nm sowie 450 nm gemessen (Ultrospec<sup>™</sup> 3100 *pro*, *Amersham Biosciences*, Freiburg). Anhand der Eichgeraden, die sich aus dem Quotienten  $A_{590\text{ nm}}/A_{450\text{ nm}}$  aufgetragen gegen die eingesetzten Proteinmengen der Standardproben ergab, wurde die Konzentration der Proteinlösung abgelesen.

#### 4.16. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die denaturierende SDS-PAGE diente der Auftrennung isolierter Proteine gemäß ihrem Molekulargewicht. Dazu wurde zwischen zwei mit Ethanol gereinigten Glasplatten ein 1 mm dickes und ca. 5 cm hohes Trenngel (Tabelle 4.4) gegossen, das nach Überschichtung mit Isopropanol auspolymerisierte. Anschließend wurde das Trenngel mit einem etwa 1,5 cm hohen Sammelgel (Tabelle 4.4) überschichtet, so daß es nach dessen vollständiger Polymerisation in einer vertikalen Laufkammer (Mini-PROTEAN<sup>®</sup> 3 Cell, *Bio-Rad Laboratories*

*GmbH*, München) fixiert werden konnte. Das komplette Gel wurde mit 1x SDS-Laufpuffer überschichtet. Aufzutragende Proteinproben wurden zunächst mit 5x Laemmli-Puffer (Laemmli, 1970) versetzt und für 10 min bei 100 °C aufgekocht, um sie anschließend für 1 h bei konstanter Stromstärke (25 mA pro Gel) elektrophoretisch aufzutrennen (PowerPac Basic Power Supply, *Bio-Rad Laboratories GmbH*, München).

Im Anschluß an die Elektrophorese wurden die im Gel fixierten Proteine entweder mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbt (s. 4.17.) oder mit Hilfe des 'Semidry Blotting' auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (s. 4.19.1.1.).

**Tabelle 4.4** PAA-Gele, Zusammensetzung

	Trenngel (15%ig, 15 ml)	Sammelgel (5 %ig, 5 ml)
dH <sub>2</sub> O	3,4 ml	3,4 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	3,8 ml	
0,5 M Tris (pH 6,8)		0,63 ml
30 % Acryl-Bisacrylamid-Mix	7,5 ml	0,83 ml
10 % SDS	0,15 ml	50 µl
10 % APS	0,15 ml	50 µl
TEMED	6 µl	5 µl

#### 4.17. Färbung von Polyacrylamidgelen

Zum irreversiblen Anfärben der Proteine mit Coomassie-Brillant-Blau wurde das Trenngel nacheinander in Färbelösung (20 min), Entfärber I (zweimal 20 min) und Entfärber II (zweimal 20 min) geschwenkt bis das Bandenmuster gut sichtbar war. Zur Dokumentation wurde das Gel abschließend am Computer eingescannt.

#### 4.18. Herstellung von Antikörpern

Antikörper gegen Ag43a-536<sup>a</sup> wurden durch Immunisierung eines Kaninchens generiert. Hierfür wurden 1,9 mg rekombinantes 6xHisAg43a-536<sup>a</sup> der *immunoGlobe Antikörpertechnik GmbH* (Himmelstadt) zur Verfügung gestellt. Im Abstand von zwei und vier Wochen nach der Grundimmunisierung erfolgten erneute, intradermale Booster-Injektionen des Tieres, so daß nach insgesamt zehn Wochen dessen Serum gewonnen werden konnte. Die Spezifität des

polyklonalen Antikörperserums wurde in *Western Blot*-Analysen (s. 4.19.1.) und durch Agglutination Ag43-exprimierender Bakterien überprüft.

## 4.19. Immunnachweisverfahren

### 4.19.1. *Western Blot*

Der *Western Blot* ist eine Methode zum differentiellen Nachweis von Proteinen mittels Immundetektion (Lottspeich & Zorbas, 1998). Dazu werden die Proteine zunächst in einer denaturierenden Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt, anschließend über einen Elektrotransfer (*'Blotting'*) auf eine Trägermembran transferiert und dadurch zugleich immobilisiert. Der qualitative Proteinnachweis erfolgt mit Hilfe spezifischer Antikörper.

#### 4.19.1.1. Proteintransfer (*'Semidry Blot'*)

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten und zu einer Bande fokussierten Proteine wurden aus der Polyacrylamidmatrix über ein senkrecht zum Trenngel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf einen Nitrocellulose-Filter übertragen. Hierfür wurde sich dem sogenannten *'Semidry Blot'*-Verfahren bedient, das aus diskontinuierlichen, in Transferpuffern getränkten Blottpapieren (*'Sandwich'*) besteht (Kyhse-Andersen, 1984). Elektrotransfers wurden für 1 h bei konstanter Stromstärke (0,8 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche) in der Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (*Bio-Rad Laboratories GmbH*, München) durchgeführt. Die Tabelle 4.5 zeigt den schematischen Aufbau.

**Tabelle 4.5** Proteintransfer im *'Semidry Blot'*-Verfahren, Aufbau

Transfer	Anzahl	Komponente	Puffer	Bemerkung
	3	Blottpapier	Kathodenpuffer	Whatman <sup>®</sup> Gel Blot Paper*
	1	Proteingel (SDS-PAGE)		
	1	Nitrocellulose-Membran	Anodenpuffer II	Optitran <sup>®</sup> BA-S 85*
	3	Blottpapier	Anodenpuffer II	Whatman <sup>®</sup> Gel Blot Paper*
Anode	6	Blottpapier	Anodenpuffer I	Whatman <sup>®</sup> Gel Blot Paper*

\* *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Taufkirchen

#### 4.19.1.2. Immundetektion

Um unspezifische Bindungsstellen auf den Nitrocellulose-Membranen abzudecken, wurden diese nach dem Blotten für mindestens 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in der Blockierungslösung geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen für 5 min in TBS-T erfolgte die Hybridisierung mit einer geeigneten Verdünnung des primären Antikörpers (s. 3.5.) in 2,5 % Magermilchpulver/TBS-T ebenfalls für 1 h bei Raumtemperatur. Ungebundene Immunglobuline ließen sich hinterher in drei Waschschritten à 5 min mit TBS-T von den Membranen wieder entfernen. Das Konjugat, ein mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Sekundärantikörper (s. 3.5.), wurde 1:15.000 in 2,5 % Magermilchpulver/TBS-T verdünnt und unter gleichen Bedingungen wie zuvor beschrieben mit den Membranfiltern inkubiert. Mehrmaligem Waschen folgend wurden die Immunkomplexe durch Zugabe des Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrats (*Millipore GmbH*, Schwalbach) sichtbar. Eine hierbei von der Meerrettich-Peroxidase katalysierte Reaktion beruht auf der Oxidation von Luminol durch Wasserstoffperoxid, was als positives Signal die Emission von Licht zur Folge hat. Diese Chemilumineszenz wurde mit Hilfe eines lichtsensitiven Kamerasystems (*Chemilux Imager*, *Intas*, Göttingen) detektiert.

#### 4.19.2. Detektion von Glykokonjugaten

Um die posttranslationale Glykosylierung von Proteinen nachzuweisen, wurde auf eine von der Firma *Roche Applied Science* (Penzberg) entwickelte Methode zurückgegriffen, die als DIG Glycan Detection Kit kommerziell erhältlich ist. Hierbei werden immobilisierte Proteine über verschiedene Oxidations-, Markierungs- und Detektionsschritte auf das qualitative Vorhandensein von kovalent gebundenen Zuckerresten (Glykosylierungen) getestet.

Die zu untersuchenden Proteinproben wurden wie bereits unter 4.16. beschrieben in einer denaturierenden SDS-PAGE ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt und im 'Semidry Blot'-Verfahren (s. 4.19.1.1.) auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die weitere Vorgehensweise richtete sich nach den Angaben des Herstellers (Methode B): Als erstes wurden die freien Hydroxylgruppen der Zuckerreste in Glykokonjugaten zu Aldehyd-Resten oxidiert, um diese – über zusätzliche Einbringung einer Hydrazidgruppe – mit Digoxigenin markieren zu können. Gebundenes Digoxigenin wurde anschließend von spezifischen, mit Alkalischer Phosphatase (AP)-konjugierten Antikörpern (s. 3.5.) detektiert. Anhand einer AP-katalysierten Farbreaktion (Hydrolyse von X-Phosphat; Reduktion von NBT) ließen sich somit Glykoproteine auf den Nitrocellulose-Filtern nachweisen.

## 4.20. Zellkultur

Experimente mit eukaryontischen Zelllinien (s. 3.7.) wurden maximal bis zur 20sten Passage durchgeführt, um Mutationen auszuschließen (Whyte *et al.*, 2004). Hierfür wurden humane Epithelzellen und murine Makrophagen in 75 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflaschen (BD Falcon™, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) bei 37 °C in einer 5 %igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre angezogen. Kulturen, die zu etwa 80 % konfluent waren (i.d.R. nach 2-3 Tagen), wurden zur Subkultivierung je nach Zelllinie für 5-15 min mit 5 ml Trypsin-EDTA (PAA Laboratories GmbH, Cölbe) inkubiert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Die vom Flaschenboden abgelösten Zellen wurden sodann in 5 ml frischem Zellkulturmedium (s. 3.9.) aufgenommen und bei entsprechender Verdünnung in 20 ml Medium oder gegebenenfalls nach Auszählen in einer Neubauer-Kammer (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen) ausgesät.

## 4.21. Mikroskopie

### 4.21.1. Lichtmikroskopische Färbungen

Objektträger wurden zur Fixierung des Probenmaterials zunächst für 20 min in Methanol inkubiert und anschließend 45 min in 1x Giemsa-Lösung (CARL ROTH GmbH + Co KG, Karlsruhe) gefärbt. Überschüssige Färbelösung ließ sich hinterher mit dH<sub>2</sub>O abspülen. Die Objekte wurden unter einem Axiolab-Lichtmikroskop (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen) bei 400facher Vergrößerung betrachtet und fotografiert.

### 4.21.2. Elektronenmikroskopie

#### 4.21.2.1. Präparation der Proben (Fixierung, Entwässerung)

Eine Übernachtskultur des zu mikroskopierenden Stammes wurde 1:100 in frischem Medium (LB, BHI bzw. YPD) verdünnt und für 2 h bei 37 °C aerob angezogen. Kleine, durch Längs- und Querschnitte geteilte Katheterstückchen (UROMED-Silikon-Ballon-Katheter, UROMED Kurt Drews GmbH, Oststeinbek; SILKOLATEX® RÜSCH-GOLD®-Ballonkatheter, Willy Rüscher AG, Kernen) wurden in 2 ml der Kultur für weitere 24, 48 bzw. 72 h ohne Schütteln inkubiert (37 °C). Um nichtadhärente Mikroorganismen von der Kunststoffoberfläche zu entfernen, war es ausreichend, die Katheterstücke zweimal in 37 °C warmem Medium und danach in PBS zu spülen. Die Proben wurden über Nacht bei 4 °C in Fixierungslösung eingebettet und

hinterher für jeweils 5 min zweimal mit PBS und dreimal mit 0,2 M Natriumcacodylat (pH 7,2) gewaschen. Im Anschluß erfolgte die Entwässerung des Probenmaterials in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Aceton. Hierfür wurden die Katheterstückchen nacheinander für jeweils 20 min in 50, 70, 90, 96 und 100 % Aceton inkubiert.

#### **4.21.2.2. Kritischer Punkt-Trocknung**

Die entwässerten Präparate (s. 4.21.2.1.) wurden in eine mit Aceton gefüllte Druckkammer aus Edelstahl überführt. Im BAL-TEC Critical Point Dryer CPD 030 (*BAL-TEC GmbH*, Witten) erfolgte sodann ein sechsmaliger Austausch des flüssigen Acetons (40 °C, ≤85 bar) gegen CO<sub>2</sub> (4 °C) gefolgt von einer Kritischer Punkt-Trocknungsphase (ca. 3 h).

#### **4.21.2.3. Sputtern**

Die in 4.21.2.2. getrockneten Präparate wurden mit Hilfe von beidseitig klebenden Kohlefolien auf REM-Trägertischchen montiert und im Vakuum für 5 min bei 25 mA mit Platin/Palladium (Pt/Pd 80/20; *PLANO GmbH*, Wetzlar) bedampft (*BAL-TEC SCD 005*, *BAL-TEC GmbH*, Witten).

#### **4.21.2.4. Rasterelektronenmikroskopie**

Für die Rasterelektronenmikroskopie (REM) präparierte Objekte wurden bei 15 kV und bis zu einer 10.000fachen Vergrößerung im ZEISS DSM 962 (*Carl Zeiss AG*, Oberkochen) betrachtet sowie digital dokumentiert.

### **4.22. Bindungsstudien**

Nachfolgend aufgeführte Methoden dienen zur Aufklärung von Antigen 43-bedingten Proteininteraktionen.

#### 4.22.1. Autoaggregation

Mit Hilfe des 'autoaggregation assays' wurde die Fähigkeit Ag43<sup>α</sup>-präsentierender Bakterien untersucht, sich in einem bestimmten Zeitintervall aneinanderzulagern. Die sich dabei bildenden Aggregate sinken auf den Boden eines stehenden Reagenzglases, was zum Aufklaren der trüben Bakteriensuspension führt. Das Absinken der Bakterien wird über die Messung der optischen Dichte dokumentiert.

Eine in Selektiv-LB-Medium angezogene Tageskultur (37 °C, 225 U/min) wurde 1:50 in Selektiv-M63B1-Minimalmedium verdünnt und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. 5 ml der Übernachtskultur wurden auf eine Anfangs-OD<sub>600 nm</sub> ( $t_0$ ) von 3,0 eingestellt und anschließend in einem Reagenzglas bei Raumtemperatur stehen gelassen. Jede Stunde wurde etwa 1 cm unterhalb des Flüssigkeit-Meniskus' eine Probe entnommen und die Bakterienkonzentration anhand ihrer optischen Dichte ( $\lambda=600$  nm) bestimmt. In der quantitativen Auswertung wurde die OD<sub>600 nm</sub> gegenüber der Zeit aufgetragen sowie der Verlauf der Aggregationskinetik photographisch dokumentiert (PowerShot G3, Canon, Krefeld).

#### 4.22.2. Zelladhäsionstest

Eukaryontische Zellen (s. 3.7.) wurden durch Trypsinierung (s. 4.20.) geerntet und in frischem Zellkulturmedium in einer Endkonzentration von  $4,4 \times 10^5$  Zellen/ml aufgenommen. Anschließend wurden davon jeweils 500  $\mu$ l in die Kavitäten einer 24 Well-Zellkulturplatte (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) ausgesät und über Nacht bei 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Des weiteren wurden Bakterien einer Übernachtskultur anhand ihrer OD<sub>600 nm</sub> auf eine Konzentration von  $4 \times 10^8$  CFU/ml in PBS eingestellt. 25  $\mu$ l dieser Bakteriensuspension wurden daraufhin mit entsprechenden Antibiotika zu den eukaryontischen Zellen in die 24 Well-Platte gegeben. Nach zweistündiger Inkubation (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) ließen sich nicht-adhärenente Bakterien durch fünfmal dreiminütiges Waschen mit EBSS-Puffer (150 U/min; Titramax 101, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach) wieder entfernen. Eukaryontische Zellen wurden letztlich durch Zugabe von 200  $\mu$ l 1 % Triton X-100/PBS innerhalb 20 min lysiert. Das Lysat wurde in geeigneten Verdünnungen auf Selektiv-LB-Agar ausplattiert und zur Keimzahlbestimmung über Nacht bei 37 °C bebrütet.

Parallel dazu wurde der gleiche Versuch im 200  $\mu$ l-Maßstab in Kammerdeckgläsern (Lab-Tek™ Chamber Slide™ System; Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden) durchgeführt. Die eukaryontischen Zellen wurden nach dem Waschen jedoch nicht mit Detergenzien behandelt, sondern für die Mikroskopie angefärbt (s. 4.21.1.).

### 4.22.3. Overlay assay

'Overlay assays' ähneln in ihrem Aufbau und der Durchführung einem *Western Blot* (s. 4.19.1.). Bei der hier verwendeten Variante werden jedoch die auf einer Trägermembran fixierten Biomoleküle hinsichtlich ihrer Eigenschaft (Affinität) als putative Rezeptoren gegenüber einem bekannten Protein (Ligand) untersucht: In einem zusätzlichen Schritt werden Ag43-exprimierende Bakterien oder aufgereinigtes Ag43<sup>α</sup> aufgetragen (mobile Phase). Am Ende steht die Detektion von Protein- bzw. Zellkomplexen basierend auf der Spezifität verwendeter Antikörper.

#### 4.22.3.1. Präparation eukaryontischer Zellmembranen

Epithelzellen von mindestens zehn dicht bewachsenen Zellkulturflaschen (s. 4.20.) wurden in eiskaltem PBS gespült und mit einem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst. Um restliches Medium vollständig zu entfernen, wurden sie zusätzlich in kaltem PBS gewaschen (3x 10 min, 1.000 x g, 4 °C). Im Anschluß erfolgte die Lyse der Epithelzellen für 1 h bei Raumtemperatur in 20 ml einer 0,5 %igen Triton X-100/PBS-Lösung unter kontinuierlichem Schwenken. Danach wurde das Lysat 5-10 s lang mit Ultraschall (Sonopuls HD 70, UW 70; *Bandelin GmbH & Co. KG*, Berlin) behandelt und mittels Zentrifugation (10 min, 6.000 x g, 4 °C) geklärt. Die sich im Überstand befindlichen Membranproteine wurden bei 100.000 x g sedimentiert (1 h, 4 °C) und in 150 µl TE-Puffer aufgenommen.

#### 4.22.3.2. Biotinylierung von Membranproteinen

Die Biotinylierung von Membranproteinen folgte weitestgehend dem Protokoll zur Präparation eukaryontischer Zellmembranen (s. 4.22.3.1.). Nach der Ernte wurden die gewaschenen Epithelzellen jedoch in 0,5 mg/ml EZ-Link<sup>®</sup> Sulfo-NHS-LC-Biotin/PBS (*Pierce Biotechnology, Inc.*, Rockford, USA) aufgenommen und in einem Erlenmeyerkolben auf Eis leicht schwenkend inkubiert. Ungebundenes Biotin wurde nach Ablauf einer Stunde durch dreimaliges Waschen (10 min, 1.000 x g, 4 °C) in PBS wieder entfernt. Die abschließende Lyse der Zellen und Isolierung von Membranproteinen ist 4.22.3.1. zu entnehmen.

#### 4.22.3.3. Bakterieller Overlay

Die in 4.22.3.1. und 4.22.3.2. präparierten Membranproteine wurden in einer SDS-PAGE (s. 4.16.) aufgetrennt und nachfolgend im 'Semidry Blot'-Verfahren (s. 4.19.1.1.) auf Nitrocellulose-Filter (Optitran<sup>®</sup> BA-S 85, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Taufkirchen) übertragen. Unspezifische Bindungsstellen ließen sich durch Inkubation der Filtermembran in Blockierungslösung für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht (4 °C) absättigen. Parallel dazu wurden 50 ml einer Übernachtskultur des entsprechenden Bakterienstammes geerntet, in PBS gewaschen (3x 10 min, 6.000 x g, 4 °C) und anschließend zusammen mit der blockierten Nitrocellulose-Membran über Nacht langsam schwenkend bei 4 °C inkubiert. Ungebundene Bakterien sind hinterher durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt worden.

#### 4.22.3.4. Protein-Overlay

Das Prinzip des Protein-Overlays ist dem des Bakteriellen gleich (s. 4.22.3.3.). Er unterscheidet sich jedoch in der Verwendung hitzeextrahierten Ag43<sup>α</sup> (s. 4.11.2.) anstatt integrierender, *agn43*-exprimierender *E. coli*-Zellen. Demnach wurde die gesamte Proteinmenge aus einem Hitzeextraktionsansatz (50 ml-Übernachtskultur) für den jeweiligen Overlay eingesetzt.

#### 4.22.3.5. Detektion von Protein-Protein-Interaktionen

Auf den Filtermembranen adhärente Bakterien bzw. Ag43<sup>α</sup>-Moleküle wurden für 1 h bei Raumtemperatur mit  $\alpha$ -Ag43a/b-536<sup>α</sup> IgG, verdünnt in 2,5 % Magermilchpulver/PBS, markiert. Überschüssige Antikörper wurden hiernach in drei Waschschritten à 5 min mit PBS entfernt. Das  $\alpha$ -Kaninchen IgG-HRP-Konjugat (s. 3.5.) wurde 1:15.000 in 2,5 % Magermilchpulver/PBS verdünnt und unter gleichen Bedingungen wie zuvor beschrieben mit den Filtern inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden durch Zugabe des Immobilon<sup>™</sup> Western Chemiluminescent HRP Substrats (*Millipore GmbH*, Schwalbach) gebundene Bakterien bzw. Ag43<sup>α</sup>-Moleküle auf den Nitrocellulose-Membranen sichtbar. Ein positives Signal (Chemilumineszenz) beruhte hierbei im indirekten Nachweis des Komplexes bestehend aus epitheliale Membranprotein, Ag43-exprimierender Bakterienzelle bzw. Ag43<sup>α</sup> sowie primärem und sekundärem Immunglobulin.

Parallel aufgetragene Fraktionen biotinylierter Membranproteine wurden statt dessen mit Hilfe HRP-konjugiertem NeutrAvidin<sup>™</sup> (*Pierce Biotechnology, Inc.*, Rockford, USA) detektiert. NeutrAvidin<sup>™</sup> ist ein modifiziertes Avidin-Derivat, das hochspezifisch nur Biotin bindet.

Hierfür wurde 150.000fach in PBS verdünntes NeutrAvidin™-HRP mit den Nitrocellulose-Membranen für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssiges NeutrAvidin™-HRP wurde hinterher durch Waschen mit PBS (3x 5 min) wieder entfernt, so daß nach Zugabe des Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrats (*Millipore GmbH*, Schwalbach) Biotin-markierte Membranproteine sichtbar wurden.

Chemilumineszenz-emittierende Reaktionen wurden mit dem ChemiLux Imager (*Intas*, Göttingen) erfaßt und dokumentiert.

#### **4.22.3.6. Proteinidentifizierung durch Massenspektrometrie**

Coomassie-gefärbte Proteinbanden, die mit den Signalen aus den Bakteriellen *Overlays* und den Protein-*Overlays* (s. 4.22.3.3.-5.) kongruent waren, wurden mit einem Skalpell aus den PAA-Gelen ausgeschnitten und zur massenspektrometrischen Analyse (MS) eingeschickt. Die Auswertung am MALDI-TOF/TOF wurde freundlicherweise von Frau Dr. Dörte Becher (*Institut für Mikrobiologie*, Universität Greifswald) übernommen.

#### **4.22.4. Anreicherung von Ag43<sup>α</sup>-Liganden durch Affinitätschromatographie**

Affinitätschromatographien wurden zur Analyse möglicher Ag43<sup>α</sup>-Liganden verwendet. In einer komplexen Lösung vorliegende Liganden sollten über spezifische Interaktionen mit Ag43<sup>α</sup> selektiv abgetrennt werden. In diesem Fall wurden von der Oberfläche von Blasenepithelzellen abgescherte Proteine bzw. Peptide anhand ihrer Affinität zu immobilisiertem Ag43<sup>α</sup> isoliert.

##### **4.22.4.1. Präparation Oberflächen-assoziiertes Proteine von Epithelzellen**

Aus 20 bewachsenen Kulturflaschen mit T24-Zellen (s. 4.20.) wurde das Medium vollständig abgezogen und der eukaryontische Zellrasen anschließend dreimal mit 37 °C warmem PBS gespült. Um extrazelluläre Proteine bzw. Peptide von der Oberfläche der Epithelzellen abzuspalten, wurden die T24-Zellen mit der Serinprotease Trypsin behandelt. Zu diesem Zweck wurden jeweils 2 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung (*PAA Laboratories GmbH*, Cölbe) auf die konfluenten Zellen gegeben. Nach sechsminütiger Inkubation (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) ließ sich die endoproteolytische Aktivität des Trypsins durch Zugabe von 2 mM PMSF inhibieren. Die flüssige Fraktion wurde vorsichtig abgesaugt und zur Abtrennung der zellulären Bestandteile

zentrifugiert (3x 5 min, 1.000 x g, 4 °C) sowie zusätzlich durch eine proteinabweisende 0,22 µm PVDF-Membran (*Millipore GmbH*, Schwalbach) filtriert.

#### 4.22.4.2. Kopplung des Liganden an eine Affinitätssäule

Eine 1 ml HiTrap NHS-aktivierte HP-Säule (*GE Healthcare*, München) wurde an das BioLogic DuoFlow QuadTec 10-System (*Bio-Rad Laboratories GmbH*, München) angeschlossen. Dabei wurde stets darauf geachtet, daß bei einer Flußrate von 0,5 ml/min ein Druck von 3 bar nicht überschritten wurde. Nach dem Waschen mit sechs Säulenvolumen eiskalter 1 mM HCl wurde 1 mg aufgereinigtes und in Coupling Puffer gelöstes 6xHisAg43a-536<sup>α</sup>-Protein auf die Säule gegeben. Um ungebundene Ligandenmoleküle zu entfernen und gleichzeitig noch freie Bindungsstellen der Matrix zu deaktivieren, wurde die Säule nach 2 h gemäß Herstellerangaben abwechselnd mit Puffer A und Puffer B mehrfach gespült und bis auf weiteres in der 'Storage Solution' bei 4 °C aufbewahrt.

#### 4.22.4.3. Anreicherung von Ag43a-536<sup>α</sup>-Interaktionspartnern

Die in 4.22.4.1. präparierten, eukaryontischen Membran-/Oberflächen-assoziierten Proteinfragmente wurden über eine 6xHisAg43a-536<sup>α</sup>-spezifische Affinitätssäule (s. 4.22.4.2.) nach folgendem Protokoll (Tabelle 4.6) chromatographisch getrennt.

**Tabelle 4.6** Arbeitsschritte bei der Proteintrennung durch HiTrap NHS-aktivierte HP-Säulenchromatographie\*

Schritt	Volumen [ml]	Lösung	Flußrate** [ml/min]	Bemerkung
1	10	PBS	0,5	Äquilibrieren
2		Proteinlösung	0,5	Probenauftrag
3	10	PBS	0,5	Waschen
4	7,5	0-100 % 1 M NaCl/PBS	0,5	Gradientenelution
5	5	100 % 1 M NaCl/PBS	0,5	Elution

\* 6xHisAg43a-536<sup>α</sup>-gekoppelt

\*\*  $p \leq 3$  bar

#### 4.22.5. Nachweis von Ag43<sup>a</sup>-Interaktionspartnern durch ELISA

Der ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) repräsentiert eine der sensitivsten Methoden, Antigen-Antikörper-Reaktionen und deren Konzentrationen zu messen (Lottspeich & Zorbas, 1998). Beim indirekten Nachweisverfahren beruht das Prinzip des hier verwendeten nichtkompetitiven ELISAs auf der Bindung eines spezifischen Antikörpers an ein immobilisiertes Antigen. Die dabei stattfindende Immunreaktion kann über mehrere Erkennungs- und Amplifikationsschritte, in diesem Fall mit Hilfe Enzym-markierter, sekundärer Antikörper, detektiert werden. Durch enzymatische Katalyse eines zugegebenen chromogenen Substrates werden die Immunkomplexe sowohl sichtbar als auch quantifizierbar.

96 Well-Mikrotestplatten (Polystyrol; *Sarstedt*, Nümbrecht) wurden mit verschiedenen Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM) zu je 5 µg pro Kavität über Nacht bei 4 °C beschichtet. Zur Kontrolle wurden in gleichen Mengen BSA Fraktion V und/oder Fetuin aufgetragen (Tabelle 4.7). Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die einzelnen Wells der Mikrotiterplatten mit jeweils 200 µl einer 5 %igen Magermilchpulver/PBS-Lösung (w/v) für 2 h bei 37 °C geblockt und erneut gewaschen. In die Vertiefungen wurden anschließend 10<sup>6</sup> Bakterien einer in PBS gewaschenen Übernachtskultur gegeben, für 3 h bei 37 °C inkubiert und nichtadhärente Bakterienzellen durch wiederholtes Waschen mit PBS wieder entfernt. Gebundene Bakterien wurden zunächst mit 100 µl eines allgemeinen  $\alpha$ -*E. coli*-Antikörpers (s. 3.5.), der zuvor 1.500fach in 2,5 % Magermilchpulver/PBS verdünnt worden war, für 90 min bei 37 °C markiert und dann dreimal mit PBS gewaschen. Die nachfolgende Inkubation mit HRP-konjugierten  $\alpha$ -Kaninchen IgG (1:2.000; s. 3.5.) erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie zuvor beschrieben. Nach Zugabe von 100 µl TMB-Substratlösung (*Perbio Science Deutschland GmbH*, Bonn) pro Well erfolgte der Nachweis vorhandener Immunkomplexe durch einen Meerrettich-Peroxidase katalysierten Farbumschlag nach blau. Die Reaktion wurde nach 5-20 min mit je 100 µl 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt und bei  $\lambda=450$  nm im Multiskan Ascent (*Thermo Fisher Scientific*, Langenselbold) ausgelesen. Die gemessenen Absorptionen (Intensität) ließen hierbei Rückschlüsse auf die Antigenkonzentrationen zu.

**Tabelle 4.7** Immunabsorptionstest, getestete Proteine

<b>Protein</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Albumin Fraktion V (BSA)	bovin (Serum)	<i>CARL ROTH GmbH + Co. KG, Karlsruhe</i>
Fetuin	bovin (fötales Serum)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i>
Aktin	human (Thrombozyten)	<i>tebu-bio, Offenbach</i>
Kollagen I*	human (Plazenta)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i>
Kollagen I*	human (Lunge)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i>
Kollagen II*	bovin (Trachealknorpel)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i>
Kollagen II*	avian (Brustbeinknorpel)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i>
Kollagen III*	human (Plazenta)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i>
Kollagen IV*	human (Plazenta)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i>
Kollagen IV*	murin (EHS-Sarkom)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i>
Kollagen V*	human (Plazenta)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i>
Kollagen VI*	bovin (Plazenta)	<i>Millipore GmbH, Schwalbach</i>
Fibronektin	bovin (Plasma)	<i>Invitrogen GmbH, Karlsruhe</i>
Laminin	human (Plazenta)	<i>Millipore GmbH, Schwalbach</i>
Matrigel™-Basal-membranmatrix	murin (EHS-Sarkom)	<i>Becton Dickinson GmbH, Heidelberg</i>
Thrombospondin	human (Thrombozyten)	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Vitronektin	human (Plasma)	<i>Millipore GmbH, Schwalbach</i>

\* Klassifizierung nach Bornstein & Traub (1979)

#### 4.23. Polymerisation von Autotransporterproteinen

Eine in 5 ml Zellkulturmedium (MEM with Earle's Salts, 1x neAA, 2 mM L-Glutamin) angezogene Übernachtskultur des entsprechenden Bakterienstammes wurde sedimentiert (15 min, 18.000 x g) und der Überstand durch eine proteinabweisende PVDF-Membran (0,22 µm; *Millipore GmbH, Schwalbach*) filtriert. Das sterilisierte Medium ist anschließend für weitere 60 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert worden. Die kolloidale Lösung wurde erneut zentrifugiert (15 min, 18.000 x g) und das Sediment in 100 µl TE-Puffer aufgenommen.

## 5. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden die Funktion und Bedeutung des Autotransporterproteins Antigen 43 (Ag43) analysiert. Gegenstand der experimentellen Untersuchungen waren die von *Escherichia coli* K-12, *E. coli* Stamm Nissle 1917 und *E. coli* Stamm 536 kodierte Ag43-Varianten Flu, Ag43a-EcN, Ag43b-EcN, Ag43a-536 sowie Ag43b-536. In der Literatur sind bereits einige Funktionen für Flu aus *E. coli* K-12 beschrieben worden. Aus diesem Grund diente es hier unter anderem dem Vergleich mit den Ag43-Varianten eines kommensalen und eines uropathogenen *E. coli*-Isolats (s. 2.4.).

### 5.1. Vergleich der Aminosäuresequenzen der Antigen 43<sup>α</sup>-Varianten

Die Funktion eines Proteins wird unmittelbar von dessen Struktur bestimmt (Voet & Voet, 1994). Computergestützte Sequenzanalysen geben jedoch nur bedingt Aufschluß über die theoretische Struktur und die wahre Bedeutung eines Proteins. Aus diesem Grund werden im folgenden Abschnitt die Primär- und Sekundärstruktur der Ag43<sup>α</sup>-Varianten untereinander verglichen, um Rückschlüsse auf ihre funktionalen Eigenschaften (s. 5.3.) ziehen zu können.

Die Abbildung 5.1 veranschaulicht einen Abgleich der Primärstruktur der  $\alpha$ -Domäne von den Antigen 43-Varianten Flu, Ag43a/b-EcN und Ag43a/b-536. Beim Vergleich der Peptidlängen fiel auf, daß sich Ag43b-536<sup>α</sup> deutlich von den anderen Ag43<sup>α</sup>-Varianten unterscheidet: Zwischen den Aminosäurepositionen 385 und 450 sind mehrere, große Bereiche deletiert, was sein geringeres Molekulargewicht in den SDS-PAGEs erklärte (s. Abb. 5.3 A). So umfaßt das Ag43b-536-Präprotein insgesamt nur 948 Aminosäuren, wohingegen die anderen untersuchten Varianten von 1039 (*prä*-Flu), 1040 (*prä*-Ag43b-EcN, *prä*-Ag43a-536) bzw. 1041 (*prä*-Ag43a-EcN) Aminosäuren kodiert werden (s. Tab. 2.4).

Weitere Abweichungen in der primären Aminosäuresequenz von Ag43a/b-EcN<sup>α</sup> und Ag43a/b-536<sup>α</sup> im Vergleich zu Flu<sup>α</sup> betreffen meist identische Bereiche, wobei auch hier zwischen der  $\alpha$ -Domäne von Ag43b-536 und den von Ag43a/b-EcN sowie Ag43a-536 unterschieden werden kann. Oft ist bei Ag43a/b-EcN<sup>α</sup> und Ag43a-536<sup>α</sup> dieselbe Aminosäure ausgetauscht. Im Gegensatz dazu befindet sich bei Ag43b-536<sup>α</sup> die gleiche Aminosäure wie bei Flu<sup>α</sup> oder eine, die zu den anderen Varianten verschieden ist. Im C-terminalen Bereich verfügt Ag43b-536<sup>α</sup> als einzige Antigen 43-Variante über eine Vielzahl substituierter Aminosäuren.

Flu<sup>α</sup>: ADIVVHPGETVNGGTLANHDNQIVFGTTNGMTISTGLEYPDNEANTGGQWVQDGGTANK 60  
 Ag43a-EcN<sup>α</sup>: ADSVVPAGETVNGGTLINHDRQFVSGTADGMTVSTGLELGADSDNNTGGQOIARGGTARN 60  
 Ag43b-EcN<sup>α</sup>: ADIVVHPGETVNGGTLVNHDNQFVSGTADGVTVSTGLELGPDSSENTGGQWIKAGGTGRN 60  
 Ag43a-536<sup>α</sup>: ADIVVHPGETVNGGTLVNHDNQFVSGTADGVTVSTGLELGPDSSENTGGQWIKAGGTGRN 60  
 Ag43b-536<sup>α</sup>: ADTVVQAGETVNDIVLGTGTLTNHDNQANGMTISTGLEYPDNEANTGGQWIQNGGIANN 60

Flu<sup>α</sup>: TTVTSSGGLQRVNPPGSSVSDTVISAGGGQSLQGKRAVNTTL-NGGEQWMHEGAIATGTVIND 119  
 Ag43a-EcN<sup>α</sup>: TRVTANGLQDVMAGGSTSDTVISITGGGQNLRGKASCTVL-NGGDQWIHAGGRASGTVINQ 119  
 Ag43b-EcN<sup>α</sup>: TTVTANGRQIVQAGGTASDVTVIRDGGGQSLNGLAVNTTLDNRGEQWVHGGGKAAGTTINQ 120  
 Ag43a-536<sup>α</sup>: TTVTANGRQIVQAGGTASDVTVIRDGGGQSLNGLAVNTTLDNRGEQWVHGGGKAAGTTINQ 120  
 Ag43b-536<sup>α</sup>: TTVTGGGLQRVNAGGSSVSDTVISAGGGQSLQGQAVNTTL-NGGEQWVHEGGIATGTVINE 119

Flu<sup>α</sup>: KGWQVVKPGTVATDITVVNTGAEGGPDAEENGDTGQFVRCDAVRRTTINKNGRQIVRAEGTAN 179  
 Ag43a-EcN<sup>α</sup>: DGYQTIKHGGLVGTITVNTGAEGGPDSENVSTGQMVGGIAESTTINKNGRQIVWSSGIAR 179  
 Ag43b-EcN<sup>α</sup>: DGYQTIKHGGLATGTITVNTGAEGGPESENVSSGQMVGGTAESTTINKNGRQIVWSSGMAR 180  
 Ag43a-536<sup>α</sup>: DGYQTIKHGGLATGTITVNTGAEGGPESENVSTGQMVGGTAESTTINKNGRQIVWSSGVSR 180  
 Ag43b-536<sup>α</sup>: KGWQAVKSGAMATDITVVNTGAEGGPDAEENGDTGQFVRGNAVRTTINENGRQIVAAEGTAN 179

Flu<sup>α</sup>: TTVVYAGGDQTVHGHALDITLNGGYQYVHNGGTASDITVVNSDGWQIVKNGGVAGNTTVNQ 239  
 Ag43a-EcN<sup>α</sup>: DTLIYTTGGDQTVHGEAHNTRLEGGNQYVHKYGLALNTVINEGGWQVVKAGGTAGNTTINQ 239  
 Ag43b-EcN<sup>α</sup>: DTLIYTAGGDQTVHGEAHNTRLEGGNQYVHNGGTATETLINRDGWQVKEGGTAAHTTINQ 240  
 Ag43a-536<sup>α</sup>: DTLIYTTGGDQTVHGEAHNTRLEGGNQYVHKYGLALNTVINEGGWQVVKAGGTAGNTTINQ 240  
 Ag43b-536<sup>α</sup>: TTVVYAGGDQTVHGYALDITLNGGNQYVHNGGTASITVVNSDGWQIVKEGGLADF TTVNQ 239

Flu<sup>α</sup>: KGRQLQVDAGGTATNVTLKQGGALVTSSTAATVTGINRLGAFSSVVEGKADNVVLENGGRLDV 299  
 Ag43a-EcN<sup>α</sup>: NGELRVHAGGEASDVTQNTGGALVTSSTAATVTGTNRLGAFSSVVEGKADNVVLENGGRLDV 299  
 Ag43b-EcN<sup>α</sup>: KGKLVQVAGGKASDVTQNTGGALVTSSTAATVTGTNRLGAFSSVVEGKADNVVLENGGRLDV 300  
 Ag43a-536<sup>α</sup>: NGELRVHAGGEASDVTQNTGGALVTSSTAATVTGTNRLGAFSSVVEGKADNVVLENGGRLDV 300  
 Ag43b-536<sup>α</sup>: KGKLVQVAGGATATNVTLKQGGALVTSSTAATVTGSNRLGNFTIVENGADGVVLES GGRLDV 299

Flu<sup>α</sup>: LTGHTATNTRVDDGGTLDVNRNGTATTVSMGNGGVLLADSGAAVSGTRSDGKAFSIGG-- 357  
 Ag43a-EcN<sup>α</sup>: LSGHTATNTRTLVDDGGTLDVNRNGTATAVSMGNGGVLLADSGAAVSGTRSDGTAFRIGG-- 357  
 Ag43b-EcN<sup>α</sup>: LSGHTATNTRVDDGGTLDIRNGGATTVSMGNGGVLLADSGAAVSGTRSDGKAFSIGG-- 358  
 Ag43a-536<sup>α</sup>: LSGHTATNTRVDDGGTLDVNRNGTATTVSMGNGGVLLADSGAAVSGTRSDGTAFRIGG-- 358  
 Ag43b-536<sup>α</sup>: LEHGSAAWKTTLVDDGGTLAVSAGGKATDVTMTSGGALIADSGATVEGTNASGK-FSIDGIS 358

Flu<sup>α</sup>: GQADALMLEKGSFTLNAGDTATDITVNGGLFTARGGTLAGTTTTLNNGAII TLSSGKT VNN 417  
 Ag43a-EcN<sup>α</sup>: GQADALMLEKGSFTLNAGDTATDITVNGGLFTARGGSLAGTTTTLNNGAII TLSSGKT VNN 417  
 Ag43b-EcN<sup>α</sup>: GQADALMLEKGSFTLNAGDTATDITVNGGLFTARGGTLAGTTTTLNNGAII TLSSGKT VNN 418  
 Ag43a-536<sup>α</sup>: GQADALMLEKGSFTLNAGDTATDITVNGGLFTARGGSLAGTTTTLNNGAII TLSSGKT VNN 418  
 Ag43b-536<sup>α</sup>: GQASGLLLENGGSFTVNAGGQAGNTTVG-----HR 387

Flu<sup>α</sup>: DTLTIREGDALLQGGSLTGNNGSVEKGGGTLTVSNTTTLQKAVNLNEGTLTINDSTVTTD 477  
 Ag43a-EcN<sup>α</sup>: DTLTIREGDALLQGGALTGNRVEKGGGTLTVSNTTTLQKAVNLNEGTLTINDSTVTTD 477  
 Ag43b-EcN<sup>α</sup>: DTLTIREGDALLQGGALTGNNGSVEKGGGTLTVSNTTTLQKAVNLNEGTLTINDSTVTTD 478  
 Ag43a-536<sup>α</sup>: DTLTIREGDALLQGGSLTGNNGSVEKGGGTLTVSNTTTLQKAVNLNEGTLTINDSTVTTD 478  
 Ag43b-536<sup>α</sup>: GTLT-----LAAGGSLSGRTQLSKGAS-----MVLNGDVVS-- 418

Flu<sup>α</sup>: VIAQRGTALKLTGSTVLNGAIDPTNVTLASGATWNI PDNATVQSVVDDLSHAGQIHFTST 537  
 Ag43a-EcN<sup>α</sup>: IIAHRGTALKLTGSTVLNGAIDPTNVTLTSGATWNI PDNATVQSVVDDLSHAGQIHFTSA 537  
 Ag43b-EcN<sup>α</sup>: VIAQRGTALKLTGSTVLNGAIDPTNVTLTSGATWNI PDNATVQSVVDDLSHAGQIHFTSA 538  
 Ag43a-536<sup>α</sup>: VIAQRGTALKLTGSTVLNGAIDPTNVTLASGATWNI PDNATVQSVVDDLSHAGQIHFTST 538  
 Ag43b-536<sup>α</sup>: -----TGDIVNAGEIHFDNQI-----TPDAALSRAVAKGDS----- 449

Flu<sup>α</sup>: RTGKFPVAT---LKVKNLNGQNGTISLRVRPDMAQNNADRLVIDGGRATGKTIILNLVNAG 594  
 Ag43a-EcN<sup>α</sup>: RTGKFPVPTT---LQVKNLNGQNGTISLRVRPDMAQNNADRLVIDGGRATGKTIILNLVNAG 594  
 Ag43b-EcN<sup>α</sup>: RTGKFPVPTT---LQVKNLNGQNGTISLRVRPDMAQNNADRLVIDGGRATGKTIILNLVNAG 595  
 Ag43a-536<sup>α</sup>: RTGKFPVAT---LKVKNLNGQNGTISLRVRPDMAQNNADRLVIDGGRATGKTIILNLVNAG 595  
 Ag43b-536<sup>α</sup>: -----PVTFHKLTTSNLTGQGGTINMRVRLD-GSNTSDQLVINGGQATGKTWLAFTNVG 503

Flu<sup>α</sup>: NSASGLATSGKGIQVVEAINGATTEEGAFVQGNRLQAGAFNYSLNRDSESWYLRSEAY 654  
 Ag43a-EcN<sup>α</sup>: NSGTGLATTGKGIQVVEAINGATTEEGAFVQGNMLQAGAFNYTLNRDSESWYLRSEERY 654  
 Ag43b-EcN<sup>α</sup>: NSGTGLATTGKGIQVVEAINGATTEEGAFVQGNMLQAGAFNYTLNRDSESWYLRSEAY 655  
 Ag43a-536<sup>α</sup>: NSASGLATSGKGIQVVEAINGATTEEGAFVQGNRLQAGAFNYSLNRDSESWYLRSEAY 655  
 Ag43b-536<sup>α</sup>: NSNLGVATTGQGIRVVDAQNGATTEEGAFALSRPLQAGAFNYTLNRDSEDEWYLRSEAY 563

### Abb. 5.1: Abgleich der primären Aminosäuresequenzen der Ag43<sup>α</sup>-Varianten.

Legende: - von Flu<sup>α</sup> abweichende Sequenz (Mutation)

- Signalpeptidase-spezifische Sequenz (VLA/AD bzw. ALA/AD)
- Typ 1-, F1C, S-Fimbrien-Konsensusmotiv bzw. K88-Fimbrien (FaeG)-typische Sequenzen
- in Flu<sup>α</sup> (1-150) markierte **geladene Aminosäuren**, die an Ag43-Ag43-Interaktionen beteiligt sein könnten
- **RGD**-Motiv
- kursiv gedruckte *Aminosäuren* sind nicht an der Ausbildung der β-Helix-Struktur beteiligt; einzelne Windungen sind durch | voneinander abgetrennt
- **Leucin-Zipper**
- **P-loop**
- **Cystein**
- O-glykosylierte Serine (S) und Threonine (T) bei Koexpression von Aah oder TibC (Sherlock *et al.*, 2006)
- Serin- (S) und Threonin- (T) Reste, die laut Knudsen *et al.* (2008) von Aah O-glykosyliert werden
- Übereinstimmungen in O-glykosylierten Aminosäuren (S bzw. T) nach Sherlock *et al.* (2006) und Knudsen *et al.* (2008)
- **Glykosylierungsstellen** nach Henderson & Owen (1999)
- **Aspartat-Protease** erkennende Sequenz

Der N-Terminus von Ag43<sup>α</sup> weist eine hohe Ähnlichkeit zu verschiedenen Fimbrientypen bei Enterobakterien auf (Owen *et al.*, 1996). So liegt das in Typ 1-, F1C- und S-Fimbrien vorhandene Konsensusmotiv T<sup>10</sup>NVGGT in fast jeder Variante vollständig konserviert vor. Darüber hinaus kodieren Ala<sup>1</sup>-Gly<sup>26</sup> einzelne Sequenzbereiche, die mit K88-Fimbrien (FaeG) identisch sind (Caffrey & Owen, 1989).

An Aminosäureposition 156 befindet sich ein RGD-Motiv, das für eine Antigen 43-vermittelte Bindung an Integrine eukaryontischer Zellen verantwortlich sein könnte. Allerdings ist dieses Motiv nur in Flu<sup>α</sup> jedoch nicht in den α-Domänen der von *E. coli* Nissle 1917 und UPEC 536 kodierten Ag43-Varianten vorhanden.

Der größte Teil der Ag43<sup>α</sup>-Domänen wird von einer β-Helix-Struktur bestimmt. Die Aminosäuren von Position 50 bis 447 bilden zusammen eine aus 20 Windungen bestehende

Sekundärstruktur aus (Klemm *et al.*, 2004). Unmittelbar im Anschluß an die  $\beta$ -Helix folgt ein Leucin-Zipper-Motiv (Leu<sup>448</sup>-Leu<sup>469</sup>), das jedoch bei Ag43b-536 <sup>$\alpha$</sup>  gänzlich fehlt. Leucin-Zipper (bZIP-Domänen) bewirken unter anderem die Dimerisierung von Proteinen.

Am C-Terminus der Ag43 <sup>$\alpha$</sup> -Untereinheiten befindet sich eine Phosphat-Bindedomäne ('*P-loop*'), die die Aminosäuren Gly<sup>479</sup> bis Gly<sup>486</sup> einschließt. *P-loops* binden in der Regel das für enzymatische Spaltungen notwendige ATP oder GTP (Henderson & Owen, 1999).

Interessanterweise enthält die Aminosäuresequenz der Ag43 <sup>$\alpha$</sup> -Varianten kein Cystein (Ausnahme Ag43b-EcN <sup>$\alpha$</sup> : Cys<sup>8</sup>), das über Disulfidbrücken an der Ausbildung und am Erhalt von Tertiärstrukturen beteiligt sein könnte.

Insgesamt ist die teilweise hohe Übereinstimmung bestimmter Aminosäuresequenzen für die in dieser Arbeit untersuchten Antigen 43 <sup>$\alpha$</sup> -Varianten auffallend. So liegen das N-terminale Fimbrien-Konsensusmotiv, der Leucin-Zipper, die *P-loop*-Sequenz sowie die C-terminale Ag43 <sup>$\alpha$</sup> -Region hoch konserviert vor. Ungeachtet dessen zeichnet sich die  $\alpha$ -Untereinheit der vom *E. coli* Stamm 536 kodierten Variante Ag43b mit der höchsten Variabilität aus.

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß das gesamte Antigen 43 Protein aufgrund seines modularen Aufbaus und aufgrund der Sekundärstruktur seiner  $\alpha$ -Domäne charakteristische Merkmale zu den verwandten Autotransporterproteinen AIDA-I sowie TibA aufweist (Kajava *et al.*, 2001). Für beide Proteine wurde die Funktion eines bakteriellen Adhäsins beschrieben (Klemm *et al.*, 2006). Darüber hinaus kodiert Ag43 <sup>$\alpha$</sup>  potentielle Proteinbindedomänen (RGD-Motiv, bZIP-Domäne) und verfügt über strukturelle Gemeinsamkeiten mit verschiedenen Fimbrientypen (N-terminales Konsensusmotiv). Demzufolge ist für Antigen 43 die Bedeutung als Adhäsins anzunehmen.

## 5.2. Herstellung rekombinanten Antigen 43

Für mehrere Anwendungen und Versuche war eine Voraussetzung, aufgereinigtes Antigen 43 in größeren Mengen zur Verfügung zu haben. Hierbei wurde sich jedoch als Schwerpunkt auf die PAI III<sub>536</sub>-kodierte Ag43a-Variante des uropathogenen *Escherichia coli*-Stammes 536 beschränkt. Aufgrund der modularen Struktur des Antigen 43 sollte nur die für die Funktion bedeutsame  $\alpha$ -Untereinheit (Ag43a-536 <sup>$\alpha$</sup> ) rekombinant hergestellt werden.

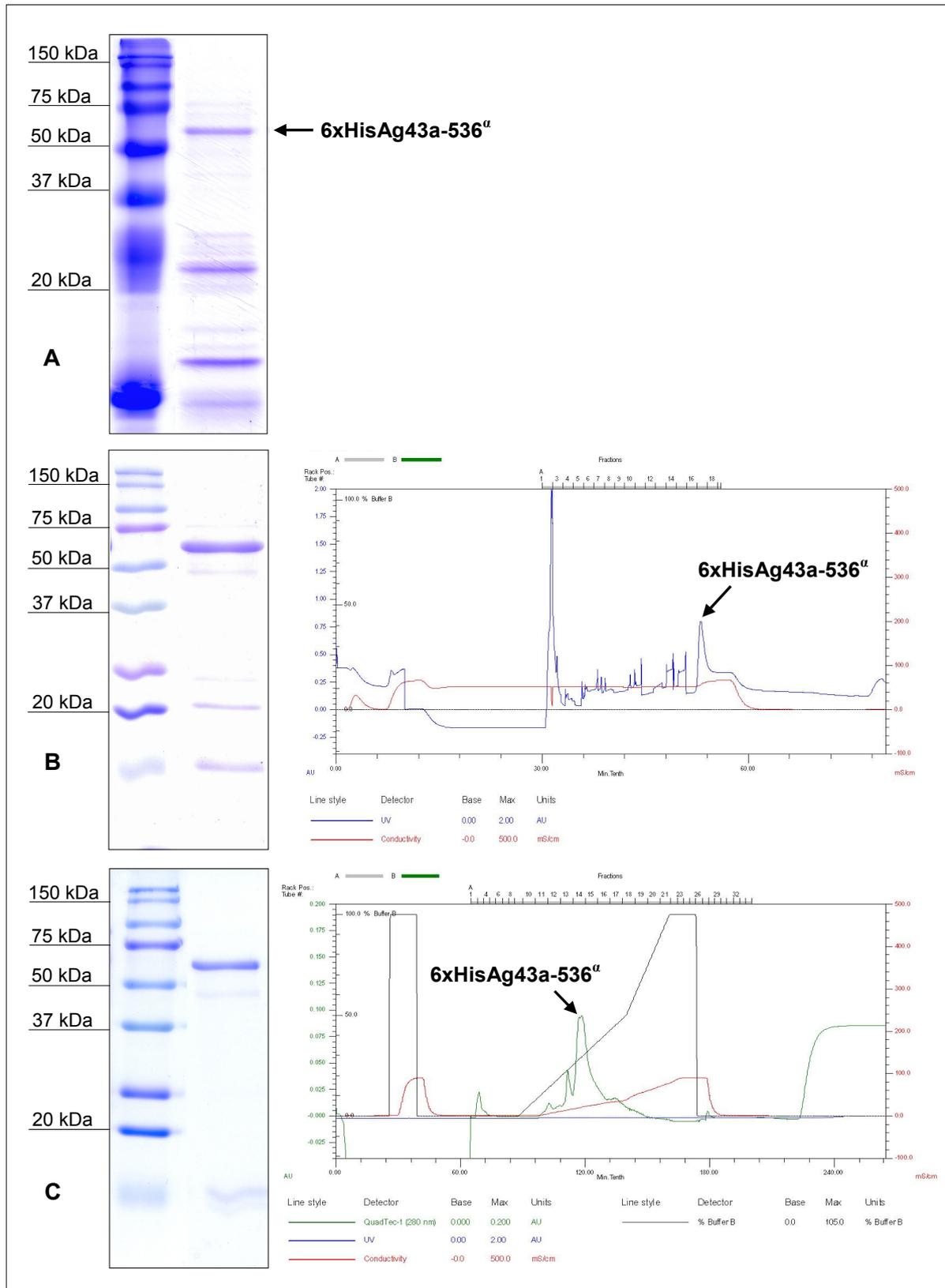
Zu diesem Zweck wurde *agn43a-536 <sup>$\alpha$</sup>*  in den Klonierungsvektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy eingebracht: Die Klonierung setzte zunächst die Amplifikation der kodierenden Gensequenz voraus, welche in einer PCR unter Verwendung von 12f4-Cosmid-DNA (s. Tab. 3.3) als '*template*' und dem Primerpaar BP277/P3 (s. Tab. 3.4) synthetisiert wurde. Beide Oligonukleotide

besitzen für spätere Ligationen relevante, terminale Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *Xba*I bzw. *Hind*III. Zusätzlich dazu verfügt BP277 neben einer Shine-Dalgarno-Sequenz sowie einem Start-Codon über 18 weitere Nukleotide, die für ein Hexa-Histidin-Peptid (6xHis) kodieren. Nach der Amplifikation des *6xhis-agn43a-536<sup>α</sup>* wurde das PCR-Produkt über seine 3'-Desoxyadenosin-Überhänge mit dem Vektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy ligiert (T/A-Klonierung) und in *E. coli* M15  $\Delta b2000$  transformiert. Der Erfolg der Klonierung konnte nach phänotypischer Analyse transformierter Bakterien in PCRs und durch Sequenzierungen bestätigt werden. *6xhis-agn43a-536<sup>α</sup>* wurde daraufhin über einen *Xba*I/*Hind*III-Verdau in die MCS der zur Proteinsynthese induzierbaren Vektoren pASK75 sowie pET-28a integriert (s. 8.5.). Nach der Transformation der Plasmide in *E. coli* M15  $\Delta b2000$  bzw. *E. coli* BL21 konnte die Integrität der generierten Klone molekularbiologisch nachgewiesen werden.

Auf diese Weise ließ sich rekombinantes 6xHisAg43a-536<sup>α</sup> in *E. coli* M15  $\Delta b2000$  bzw. *E. coli* BL21 durch Induktion überexprimieren (s. 4.11.3.). Mit Hilfe des *N*-terminalen Hexa-Histidin-Peptids (His-*tag*) war es zudem möglich, das Protein aus den Bakterienlysaten zu isolieren und anschließend aufzureinigen (s. 4.12.2.).

Während der Anreicherung des 6xHisAg43a-536<sup>α</sup> stellte sich heraus, daß seine Masse vom theoretischen Molekulargewicht (69,9 kDa; 686 Aminosäuren; pI=5,31) geringfügig abweicht. In denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophoresen wies das Protein indes eine Größe von nur etwa 58 kDa auf (Abb. 5.2). Anhand des Instabilitätsindex (II=8,82) wurde für die  $\alpha$ -Domäne des Ag43a-536 jedoch ein stabiles Molekül mit einer *in vivo*-Halbwertszeit von mehr als zehn Stunden in *E. coli* vorhergesagt. So ist anzunehmen, daß das Protein entweder unvollständig prozessiert oder posttranslational proteolytisch gespalten wird, zumal die klonierte *6xhis-agn43a-536<sup>α</sup>*-Sequenz auch die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit-verbindende '*linker*'-Region kodiert. Vergleicht man wiederum das Laufverhalten von 6xHisAg43a-536<sup>α</sup> und hitze-extrahiertem Ag43a-536<sup>α</sup> (s. Abb. 5.3 A) durch SDS-PAGE, stimmt bei beiden das Molekulargewicht überein ( $\approx 58$  kDa).

Ungeachtet dessen erfolgte die Aufreinigung des angereicherten 6xHisAg43a-536<sup>α</sup> schrittweise über Ni<sup>2+</sup>-Affinitäts- sowie Ionenaustausch-Chromatographie (s. 4.12.2.; Abb. 5.2). Die Reinheit des rekombinanten Proteins war hiernach ausreichend für die Applikation als Immunogen zur Generierung spezifischer Antikörper (s. 4.18.) oder als Ligand in der Affinitätschromatographie zur Proteintrennung (s. 4.22.4.).



**Abb. 5.2: Reinigung der  $\alpha$ -Domäne von Antigen 43a-536.** Die Aufreinigung rekombinanten 6xHisAg43a-536 <sup>$\alpha$</sup>  erfolgte nacheinander durch Ni<sup>2+</sup>-Affinitäts- und Anionenaustausch-Chromatographien. SDS-PAGE und Chromatogramme von **A:** Protino<sup>®</sup> Ni 2000; **B:** HisTrap FF; **C:** UNO<sup>™</sup> Q-1.

### 5.3. Funktionale Charakterisierung der Antigen 43-Varianten

Über die Bedeutung des Antigen 43 als putativer Virulenzfaktor (uro-)pathogener *Escherichia coli* ist bislang wenig bekannt. Um seine Rolle bei der Pathogenese von Harnwegsinfektionen aufzuklären, wurden in den nachfolgend aufgeführten Experimenten die Ag43-Varianten des *E. coli* K-12-Stammes MG1655, des kommensalen *E. coli*-Stammes Nissle 1917 und des UPEC-Isolats 536 funktional charakterisiert (s. Tab. 2.4). Im Mittelpunkt der Untersuchungen standen zum einen interzelluläre Ag43-Ag43-Wechselwirkungen und zum anderen intermolekulare Interaktionen von Antigen 43 mit dem Wirt. Weiterführende Analysen zielten auf die Identifizierung eines potentiellen Ag43-spezifischen, eukaryontischen Rezeptors ab, auf dessen Grundlage eine effektive Kolonisierung bzw. Infektion des Wirtes erfolgen könnte.

#### 5.3.1. Expression verschiedener *agn43*-Allele

Um die einzelnen Ag43-Varianten funktional zu charakterisieren, wurden sie zunächst in ein geeignetes Expressionssystem kloniert. Hierfür waren *agn43a-536* und *agn43b-536* bereits in die MCS des 'high copy'-Vektors pLDR11 integriert worden und lagen als pANL3 bzw. pANL5 vor (s. 3.2.). Die Varianten *flu*, *agn43a-EcN* und *agn43b-EcN* hingegen wurden nach einem *HindIII/XbaI*-Verdau von pANG1, pANG2 und pANG4 in pLDR11 umkloniert. Nach ihrer Transformation in den *E. coli* K-12-Stamm MG1655  $\Delta fim \Delta flu$  konnten die generierten Plasmide pANL1 bis 5 hinsichtlich der Expression von *agn43* untersucht werden.

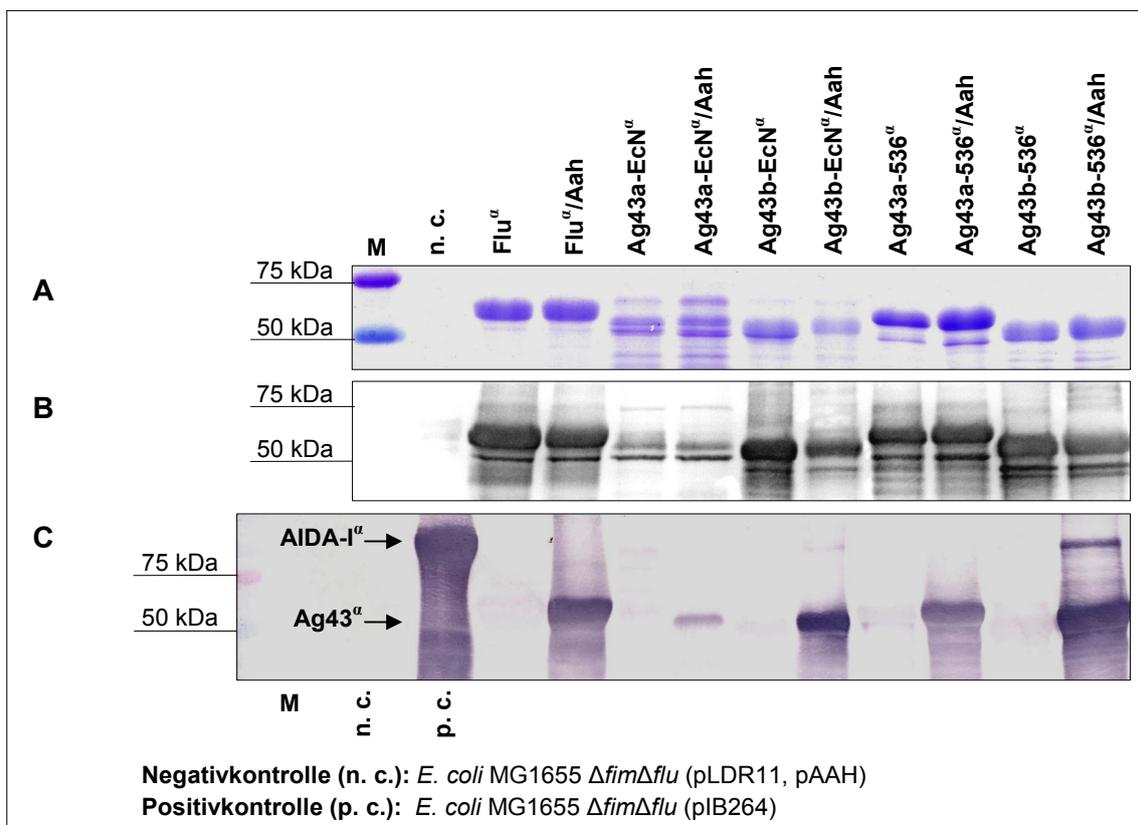
Obwohl die Transkription unter Kontrolle des *agn43*-eigenen, phasenvariablen Promotors steht, ließen sich alle Ag43<sup>α</sup>-Varianten aus Übernachtskulturen hitzeextrahieren (Abb. 5.3 A & B). Durch die Koexpression der pAAH-kodierten Heptosyltransferase Aah wurde zudem die Glykosylierung von Ag43<sup>α</sup> vermittelt (Abb. 5.3 C).

Wie sich herausstellte, wurden die verschiedenen Varianten des Antigen 43 unterschiedlich stark exprimiert. Um in etwa die gleiche Konzentration aller Ag43<sup>α</sup>-Varianten in einer SDS-PAGE aufzutragen, mußte von den Hitzepräparationen des Ag43a-EcN<sup>α</sup> und Ag43b-EcN<sup>α</sup> die fünffache Menge verwendet werden. Die Ursache hierfür könnte auf geringere Transkriptionsraten (Phasenvariation), die Proteinstabilität oder auf eine eingeschränkte Prozessierung des reifen Proteins zurückzuführen sein.

Im Gegensatz zu Flu in *E. coli* K-12 wird Antigen 43 in Wildtypstämmen posttranslational glykosyliert, das dafür verantwortliche Enzym ist bislang noch nicht identifiziert worden (Sherlock *et al.*, 2006). Eine heterologe O-Glykosylierung von Ag43<sup>α</sup> konnte jedoch durch Koexpression der AIDA-I-spezifischen Heptosyltransferase Aah erreicht werden (Abb. 5.3 C).

Das als Positivkontrolle verwendete Autotransporterprotein AIDA-I<sup>α</sup> (≈100 kDa; Laarmann & Schmidt, 2003) wies verglichen mit den Ag43<sup>α</sup>-Varianten ein deutlich stärkeres Signal im Glykoblott auf. Möglicherweise verfügt Ag43<sup>α</sup> aufgrund seiner Primär- und Tertiärstruktur über weniger Glykosylierungsstellen als AIDA-I<sup>α</sup>. Mitunter bedingte auch die Spezifität von Aah die schwächere Heptosylierung von Antigen 43. In Anbetracht dessen, daß für die Detektion von Glykokonjugaten stets gleiche Proteinmengen eingesetzt wurden, basieren die unterschiedlichen Signalstärken bei den Ag43<sup>α</sup>-Varianten untereinander allenfalls auf Abweichungen in den primären Aminosäuresequenzen.

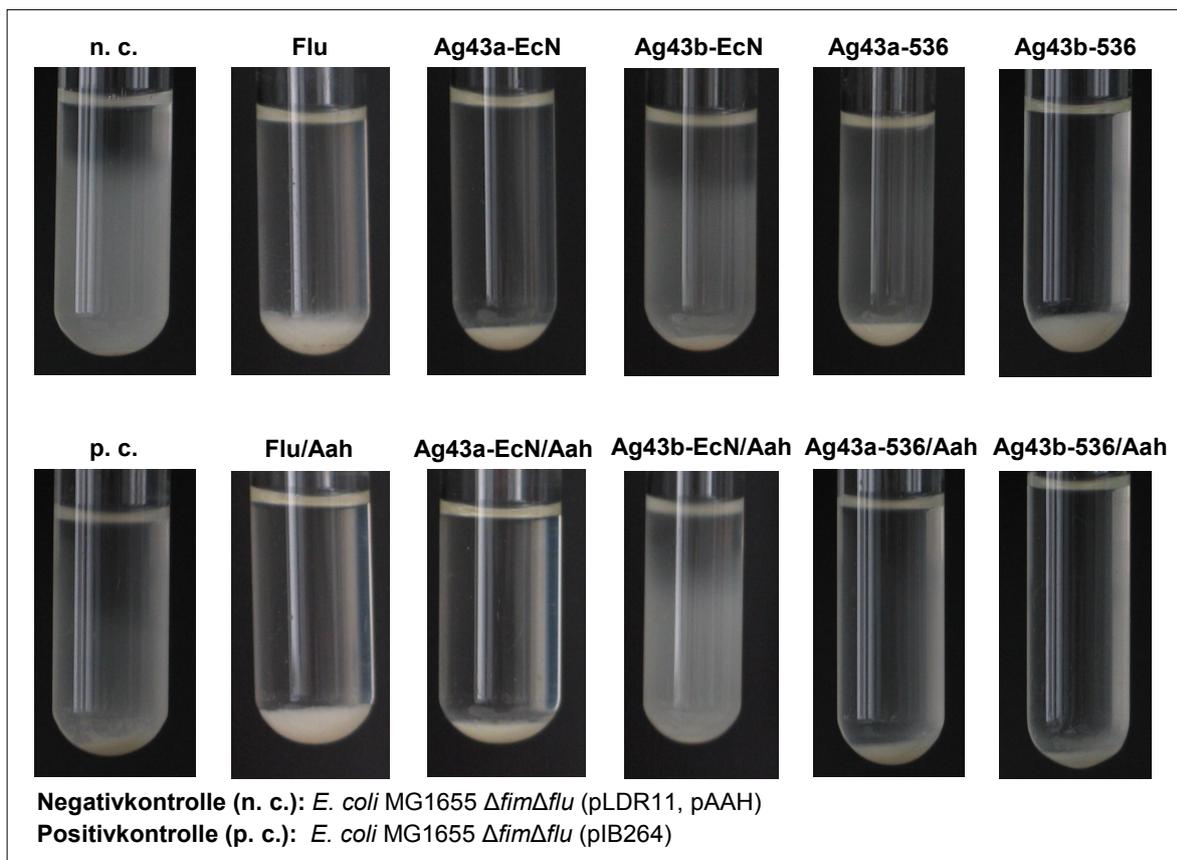
Obwohl die pANL1 bis 5-kodierten *agn43*-Allele in *E. coli* MG1655  $\Delta fim\Delta flu$  phasenvariabel exprimiert wurden, ließen sich die jeweiligen Ag43<sup>α</sup>-Varianten in hohen Konzentrationen auf der bakteriellen Zelloberfläche entsprechend nachweisen. Zudem vermittelte die Koexpression von Aah die heterologe O-Glykosylierung von Antigen 43, so daß im Folgenden die einzelnen Ag43-Varianten sowohl im nicht-glykosylierten als auch im glykosylierten Zustand funktional charakterisiert werden konnten.



**Abb. 5.3: Expression verschiedener *agn43*-Allele durch *E. coli* K-12-Stamm MG1655  $\Delta fim\Delta flu$ .** Nachweis der pANL1 bis 5-kodierten Ag43<sup>α</sup>-Varianten nach Hitzeextraktion durch **A**: SDS-PAGE und Coomassie-Färbung; **B**: *Western Blot* unter Verwendung von  $\alpha$ -Ag43a/b-536<sup>α</sup> IgG; **C**: Glykoblott.

### 5.3.2. Antigen 43-vermittelte Autoaggregation

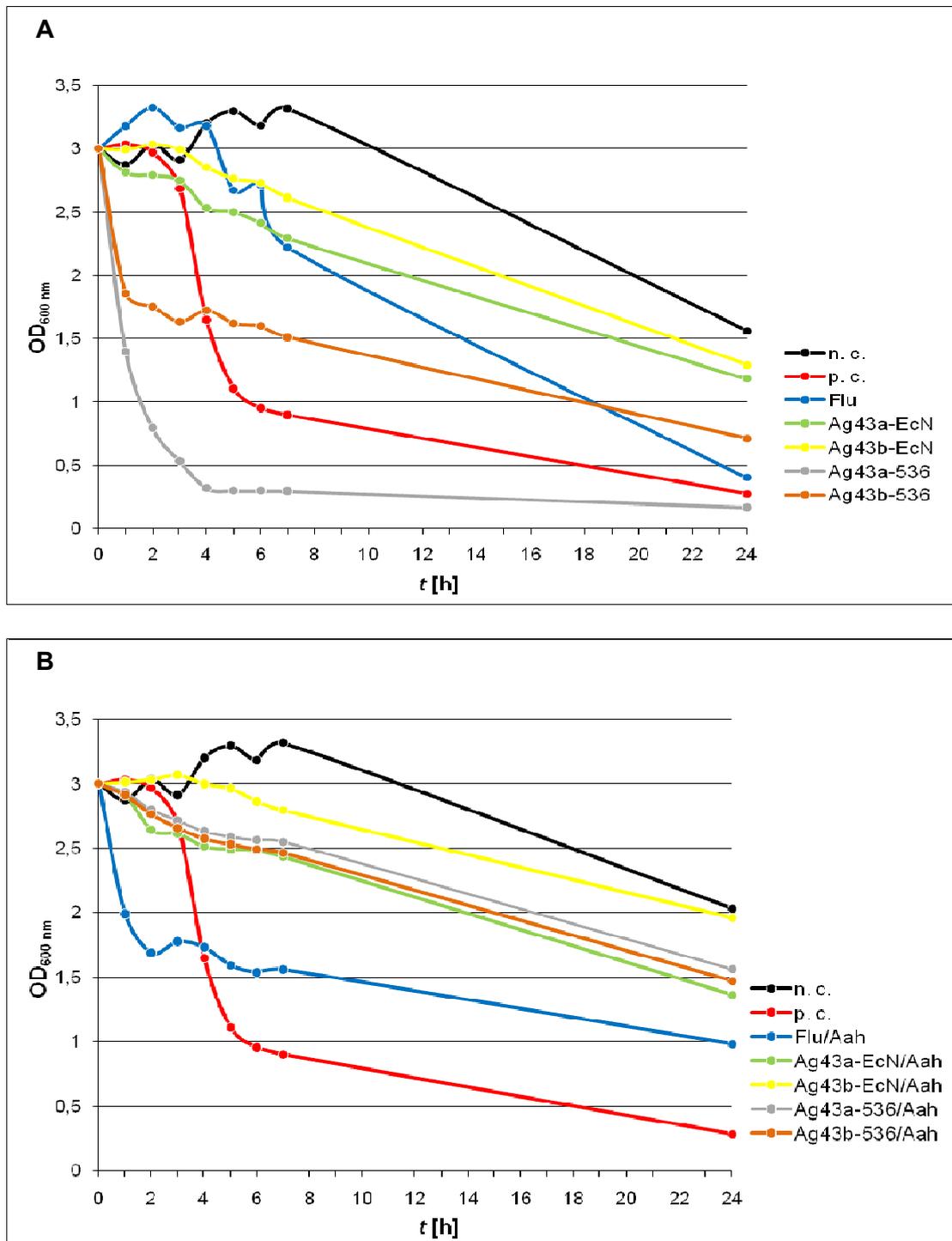
Über den definierten Zeitraum von 24 Stunden wurde in statischen Flüssigkulturen das Vermögen *agn43*-exprimierender Bakterien untersucht, sich aneinanderzulagern und dadurch zu sedimentieren (s. 4.22.1.). Die Experimente wurden mit dem *Escherichia coli* K-12-Stamm MG1655  $\Delta fim\Delta flu$  durchgeführt, der mit den jeweiligen Plasmiden pANL1 bis 5 transformiert und zuvor auf die Expression der verschiedenen Antigen 43-Varianten hin untersucht worden war (s. Abb. 5.3).



**Abb. 5.4: Beitrag verschiedener Antigen 43-Varianten zur Autoaggregation von *E. coli* K-12-Stamm MG1655  $\Delta fim\Delta flu$ .** Die Expression der verschiedenen nicht-glykosylierten Ag43-Varianten verursachte das Aufklaren statischer Bakterienkulturen innerhalb von 24 Stunden (oben). Das Sedimentationsverhalten bei Koexpression der pAAH-kodierten Glykosyltransferase Aah ist in der unteren Bildreihe dargestellt.

Abbildung 5.4 zeigt die Autoaggregation der Bakterienkulturen nach 24 Stunden. Es ist eindeutig zu erkennen, daß die Negativkontrolle nicht aggregierte, wohingegen die *aidA*-exprimierende Positivkontrolle durch Aneinanderlagerung der Bakterien sedimentierte, was das Aufklaren des Kulturmediums zur Folge hatte. Die einzelnen Ag43-Varianten vermittelten ebenfalls die Aggregation von Bakterien und dadurch bedingt deren Absinken auf den Boden

des Reagenzglases.



Negativkontrolle (n. c.): *E. coli* MG1655  $\Delta fim\Delta flu$  (pLDR11, pAAH)

Positivkontrolle (p. c.): *E. coli* MG1655  $\Delta fim\Delta flu$  (pB264)

**Abb. 5.5: Antigen 43-vermittelte Autoaggregation.** **A:** Kinetik der Autoaggregation bei Expression der verschiedenen Ag43-Varianten durch *E. coli* K-12-Stamm MG1655  $\Delta fim\Delta flu$ ; **B:** Einfluß der O-Glykosylierung von Ag43 auf das Aggregationsverhalten. Die Graphen geben die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten wieder.

Die Autoaggregation verlief jedoch in unterschiedlicher Geschwindigkeit, wie aus Abbildung 5.5 A hervorgeht. Während Ag43a-536- und Ag43b-536-präsentierende Bakterien ähnlich wie die AIDA-I-Positivkontrolle schon nach vier Stunden vergleichsweise schnell sedimentierten, verminderte sich die Trübung von Flu-, Ag43a-EcN- und Ag43b-EcN-exprimierenden Bakterienkulturen erst zum Versuchsende hin.

Die Koexpression von Aah und die damit verbundene *O*-Glykosylierung der Ag43-Varianten beeinflusste die Autoaggregation in unterschiedlichem Ausmaß (Abb. 5.5 B). Bei Ag43b-EcN, Ag43a-536 und Ag43b-536 führte sie zu einem deutlichen Verlust der Fähigkeit zur Autoaggregation bzw. zur Verlangsamung der Aggregationskinetik. Lediglich bei Flu und Ag43a-EcN war kein Effekt der *O*-Glykosylierung durch Aah auf das Sedimentationsverhalten der Bakterien erkennbar.

Somit konnte der autoaggregierende Phänotyp, wie er bereits für *flu*-positive *Escherichia coli* K-12-Stämme beschrieben wurde (Diderichsen, 1980), für die Antigen 43-Varianten der *E. coli*-Stämme Nissle 1917 und 536 bestätigt werden. Flu, Ag43a/b-EcN und Ag43a/b-536 vermittelten jedoch die Aneinanderlagerung und Sedimentation von *E. coli* MG1655  $\Delta fim \Delta flu$  in unterschiedlicher Geschwindigkeit. Insofern ein signifikanter Effekt von der Koexpression von Aah ausging, führte die *O*-Glykosylierung des Antigen 43 zu einer Verlangsamung der Aggregationskinetik.

### 5.3.3. Adhäsion an eukaryontische Zellen

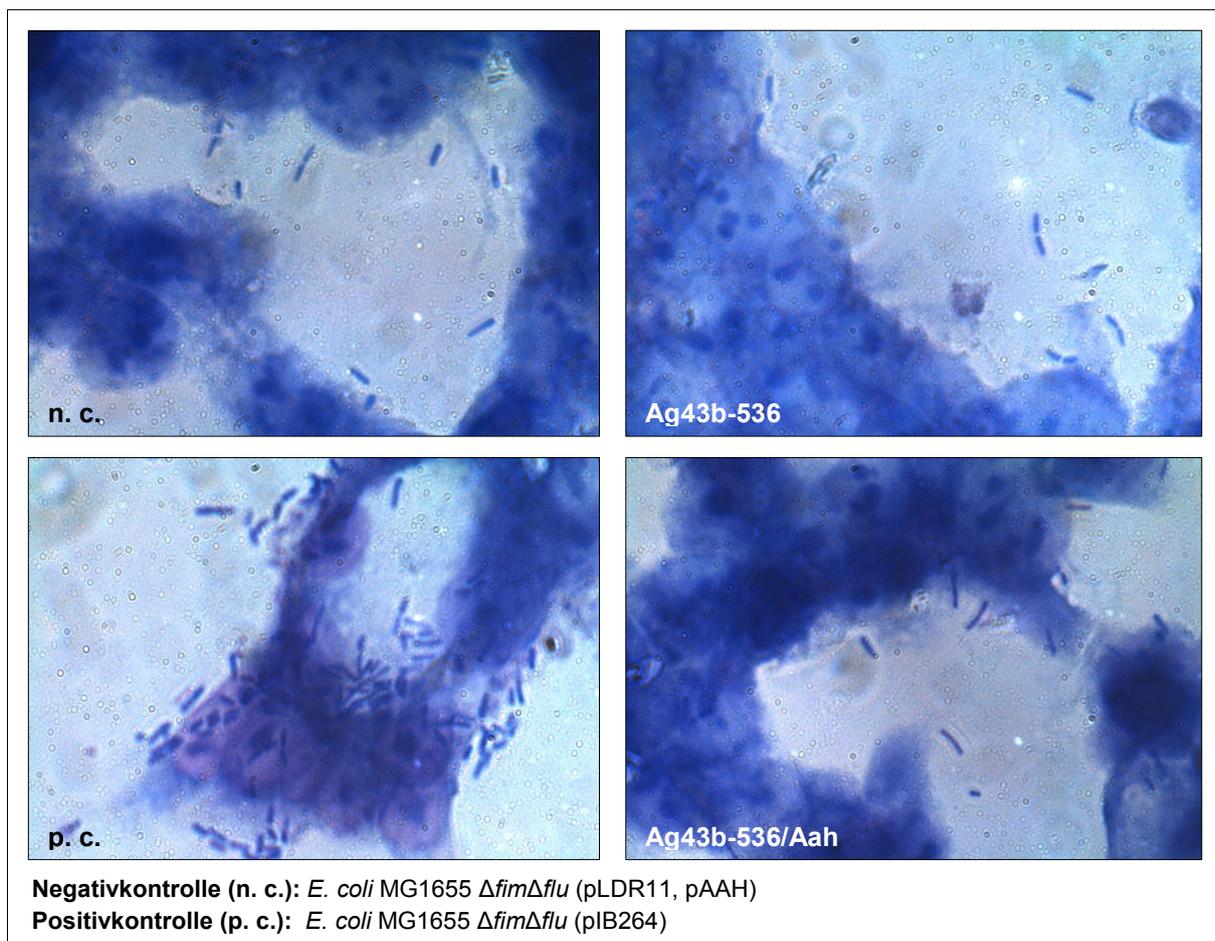
Dadurch daß mit Hilfe von 'autoaggregation assays' Ag43-Ag43-Wechselwirkungen eindeutig nachweisbar waren (s. 5.3.2.), stellte sich die Frage nach der Spezifität dieser intermolekularen Interaktionen. Owen *et al.* (1996) deuteten in diesem Zusammenhang auf eine Ag43- bzw. Flu-vermittelte Adhäsion von Bakterien an HEp-2-Zellen hin. Ihre Beobachtungen lassen sich möglicherweise auf das Vorhandensein zweier RGD-Motive in der Sequenz von Flu zurückführen, welche an der Bindung an Integrine beteiligt sein könnten (Henderson & Owen, 1999; Roche *et al.*, 2001). Darüber hinaus verfügt Antigen 43 über strukturelle Ähnlichkeiten zu den Autotransporterproteinen TibA und AIDA-I (Klemm *et al.*, 2006). Bei diesen Autotransportern handelt es sich um bakterielle Adhäsine, die unter anderem für die Bindung pathogener *Escherichia coli* an intestinale Epithelzellen verantwortlich sind (Elsinghorst & Weitz, 1994; Benz & Schmidt, 1989).

Um eine durch Antigen 43 vermittelte Bindung von Bakterien an eukaryontische Zellen zu untersuchen und um zu testen, ob verschiedene Ag43-Varianten unterschiedliche Bindungseigenschaften aufweisen, wurden Zelladhäsionstests (s. 4.22.2.) mit vier verschiedenen, humanen Epithelzelllinien und einer murinen Makrophagenzelllinie (s. 3.7.) durchgeführt. Für

die Experimente wurde der mit den Plasmiden pANL1 bis 5 transformierte *E. coli* K-12-Stamm MG1655  $\Delta fim\Delta flu$  (5.3.1.) eingesetzt. Die Bedeutung der Verwendung eines Typ 1-Fimbrien-negativen K-12-Laborstammes lag zum einen in dessen inhibierter Bindungskapazität an Mannose-haltige Rezeptoren der eukaryontischen Glykokalyx (Deletion von *fimH*) und zum anderen in seiner nichtinvasiven Eigenschaft.

Die bakterielle Adhäsion wurde durch Färbung mikroskopischer Präparate optisch dargestellt (s. 4.21.1.) und durch Auszählen ermittelt. Als Positivkontrolle diente das Autotransporterprotein AIDA-I. Durch zusätzliche Koexpression der pAAH-kodierten Heptosyltransferase sollte zudem ein möglicher Effekt der *O*-Glykosylierung von Ag43 auf dessen Affinität zu eukaryontischen Zellen analysiert werden.

In Abbildung 5.6 ist die Adhäsion am Beispiel des *agn43b-536*- und *agn43b-536/aah*-exprimierenden *E. coli*-Stammes MG1655  $\Delta fim\Delta flu$  in Kokultur mit IHKE-Zellen dargestellt. Stellvertretend für alle Antigen 43-Varianten und der dazu ausgewählten Zelllinien wird hier das einheitliche Bild, was sich bei mikroskopischer Betrachtung der jeweiligen Kammerdeck-

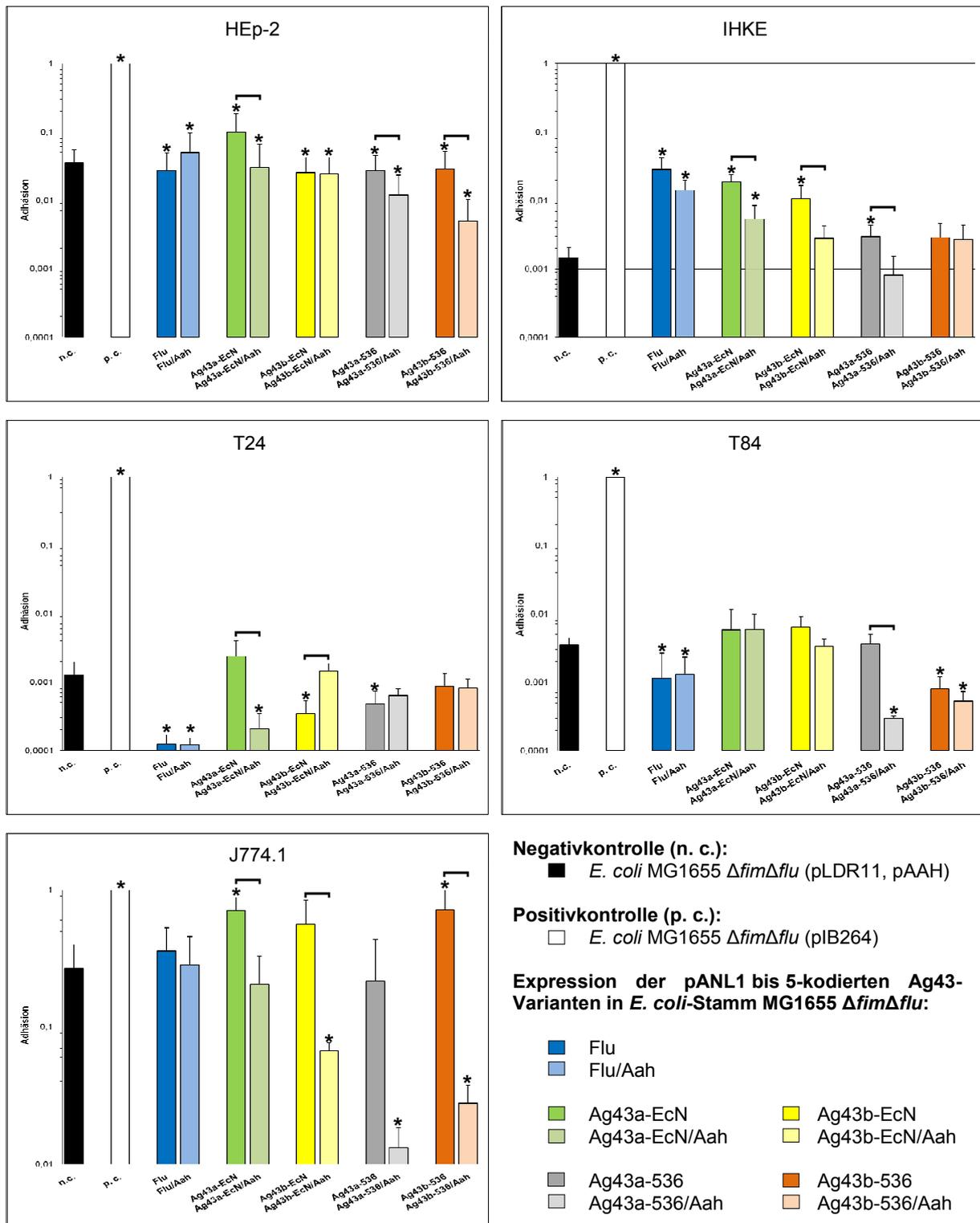


**Abb. 5.6: Antigen 43-vermittelte Adhäsion an eukaryontische Zelllinien.** Mikroskopische Darstellung der Ag43b-536- und Ag43b-536/Aah-vermittelten Adhäsion des Stammes *E. coli* MG1655  $\Delta fim\Delta flu$  an IHKE-Zellen bei 400facher Vergrößerung (Giemsa-Färbung).

gläser ergab, sichtbar: Im Vergleich zur Negativkontrolle resultierte weder die Expression von Ag43 noch von Ag43/Aah in einer verstärkten Adhäsion von Bakterien an Epithelzellen. Eine verbesserte Adhäsion von AIDA-I-präsentierenden Bakterien konnte eindeutig nachgewiesen werden.

In der quantitativen Auswertung bestätigten sich die mikroskopischen Beobachtungen nur teilweise. So unterschieden sich die jeweiligen Teststämme von der Negativkontrolle um das bis zu 20fache in ihrem Bindungsvermögen an eukaryontische Zellen (Abb. 5.7). Die Expression der verschiedenen Antigen 43-Varianten konnte in Abhängigkeit von der Zelllinie einen signifikant verstärkenden aber auch den gegenteiligen Effekt auf die Bindungseigenschaft von *E. coli* K-12-Stamm MG1655  $\Delta fim\Delta flu$  ausüben. Generell zeichnete sich die deutlichste Zunahme der Ag43-vermittelten Adhäsion in Kokultur mit Epithelzellen des proximalen Nierentubulus (IHKE) ab.

Die hier gewonnenen Ergebnisse ließen jedoch keine einheitliche Aussage über die Bedeutung von Antigen 43 für die Adhäsion an Eukaryonten zu. Alle Ag43-Varianten vermittelten ein uneinheitliches Bild hinsichtlich ihres Bindungsverhaltens an verschiedene eukaryontische Zellen und waren durch unterschiedliche Bindungseigenschaften gekennzeichnet. Die heterologe O-Glykosylierung von Antigen 43 durch Aah führte in der Regel zu einer teilweise deutlichen Verminderung der bakteriellen Adhäsion.



**Abb. 5.7: Beitrag verschiedener Antigen 43-Varianten zur Adhäsion von *E. coli* K-12-Stamm MG1655  $\Delta fim\Delta flu$  an eukaryontische Zellen.** Die Diagramme geben die Adhäsion im Verhältnis zur AIDA-I-Positivkontrolle (=1) wieder und repräsentieren die Ergebnisse aus mindestens drei Versuchsansätzen (\*  $p \leq 0,05$ ; — signifikante Abweichung zwischen der jeweiligen Ag43-Variante und Ag43/Aah).

## 5.4. Identifizierung möglicher eukaryontischer Rezeptoren von Antigen 43

Die Bindung eines bakteriellen Adhäsins an die Wirtszelle setzt das Vorhandensein eines homologen Rezeptors voraus (Hahn *et al.*, 2004). Für den Fall, daß Antigen 43 spezifisch mit molekularen Strukturen der in 5.3.3. getesteten Zellen interagiert, ließe sich demzufolge ein eukaryontischer Rezeptor identifizieren. Basierend auf dem Prinzip von Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen wurden die folgenden Versuche durchgeführt, die zur Charakterisierung eines vermeintlichen, Ag43-spezifischen Bindungspartners beitragen sollten.

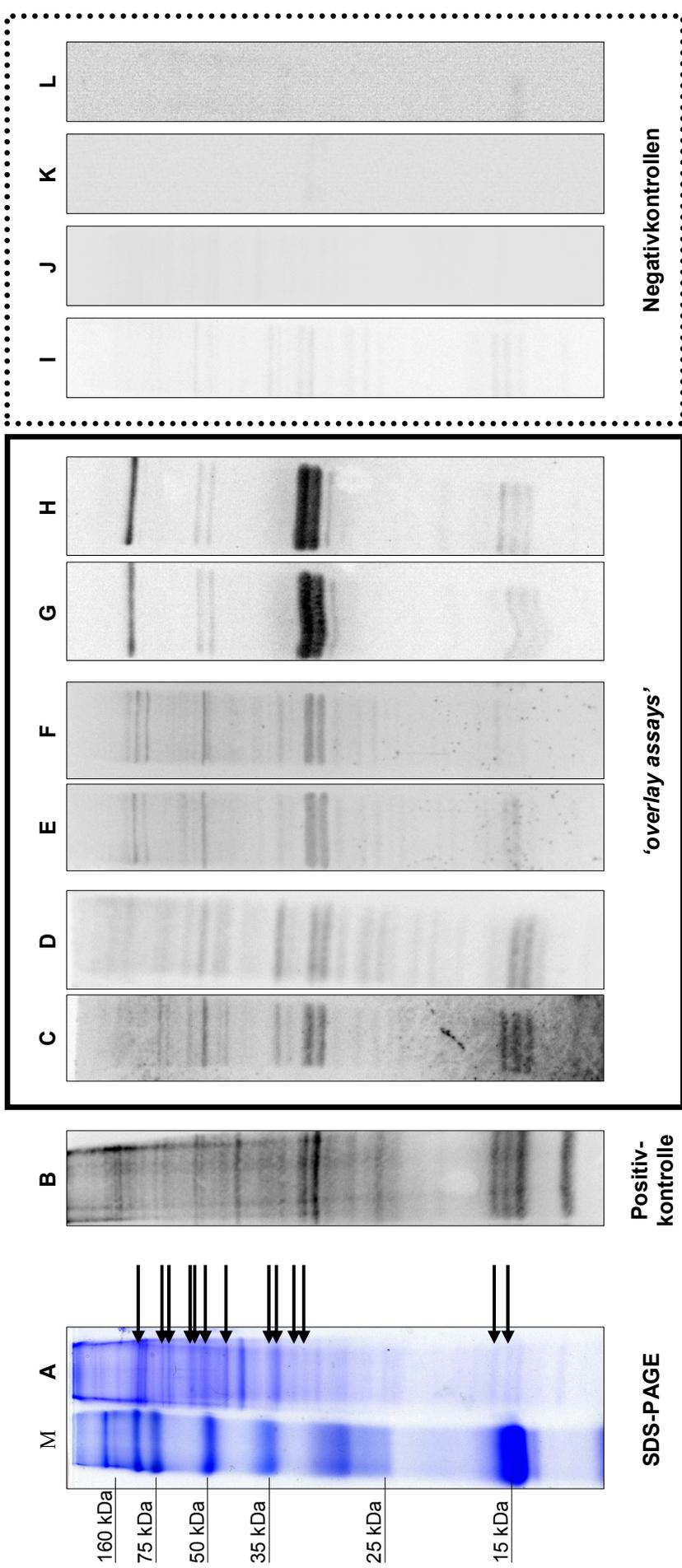
### 5.4.1. *Overlay assays*

In sog. '*overlay assays*' wurden zunächst aufgetrennte Fraktionen epithelialer Zellmembranen auf Nitrocellulose-Filter fixiert und anschließend entweder mit Ag43-exprimierenden *E. coli* MG1655  $\Delta fim \Delta flu$  oder mit aufgereinigtem Ag43<sup>α</sup> überschichtet (s. 4.22.3.). Mit Hilfe von Antikörperreaktionen war es hiernach möglich, spezifische Interaktionen von Antigen 43 mit anderen Molekülen direkt auf den Filtern zu detektieren. Die Durchführung der Experimente erfolgte jeweils mit Membranpräparationen aller in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien (s. 3.7.) und mit jeder Ag43-Variante, sowohl im nicht-glykosylierten als auch im glykosylierten Zustand.

Mit Ausnahme der J774.1-Makrophagen zeigten die '*overlay assays*' ein identisches Muster hinsichtlich der Bindung von Antigen 43 an distinkte, auf der Nitrocellulose fixierte Proteinbanden. Ein direkter Vergleich mit den entsprechenden Kontrollen verifizierte positive Signale. In Abbildung 5.8 ist dazu ein vollständiger '*overlay assay*' exemplarisch für alle Kombinationen dargestellt. Er zeigt die Bindung von Ag43b-536 an Membranpräparationen der Blasenzelllinie T24.

Dadurch daß sämtliche mit den Epithelzellen durchgeführten '*overlay assays*' untereinander identisch waren, wurden ausschließlich Proben von T24-Membranfraktionen zur massenspektroskopischen Analyse eingeschickt (in Abb. 5.8 mit Pfeilen markiert). Somit sollten mittels MALDI-TOF/TOF putative Kandidaten als Rezeptoren für Antigen 43 identifiziert werden.

Die Auswertung ergab, daß in den ausgewählten Proben eine Vielzahl membranständiger aber auch cytoplasmatische Proteine enthalten waren, letztere sind womöglich während der Präparation der Epithelzellen fälschlicherweise in die Membranfraktion gelangt. Des weiteren wurden nur die Proteine näher in Betracht gezogen, für die mindestens zwei Peptide massenspektrometrisch nachgewiesen werden konnten, als auch solche, deren Molekulargewicht mit den Proteinbanden im PAA-Gel übereinstimmten. Neben diversen Keratin-Unter-



**Abb. 5.8: Detektion von Rezeptoren bei der Ag43-vermittelten Adhäsion an Strukturen eukaryontischer Zellmembranen.** Membranpräparationen von T24-Blasenepithelzellen wurden durch SDS-PAGE [A] aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Filter übertragen [B-L]. Extrazelluläre T24-Membranproteine sind durch zusätzliche Biotinylierung einer zweiten Zellpräparation immunologisch nachweisbar [B]. Wie in C-H stets paarweise angeordnet, sind die hier abgebildeten 'overlay assays' mit nicht-glykosyliertem (jeweils links) und glykosyliertem Ag43b-536 (jeweils rechts) entwickelt: In C-D wurden *agn43b-536*-exprimierende Zellen des *E. coli*-K-12-Stammes MG1655  $\Delta$ *fim\Delta**flu*, in E-F aufgereinigtes Ag43b-536- $\alpha$ -Domänen aus Hitzeextraktionen und in G-H Biotin-markiertes Ag43b-536<sup>α</sup> aufgetragen. Zur Kontrolle wurden parallel dazu der Ag43-negative Expressionsstamm *E. coli* MG1655  $\Delta$ *fim\Delta**flu* [J] sowie dessen Hitzeextrakte [K] und Ag43-spezifisches Immunsereum [L] eingesetzt. Die in [A] mit Pfeilen markierten Proteine wurden als Banden aus PAA-Gelen ausgeschnitten und auf ihre Rezeptortauglichkeit gegenüber Ag43 im MALDI-TOF/TOF analysiert.

einheiten ließen sich vielversprechende Peptide dem Laminin A, GPI-verankerten Protein p137, Catenin und Coronin zuordnen. Diese eukaryontischen, Membran-/Oberflächen-assoziierten Proteine stellen durchaus potentielle Kandidaten eines Ag43-spezifischen Rezeptors dar.

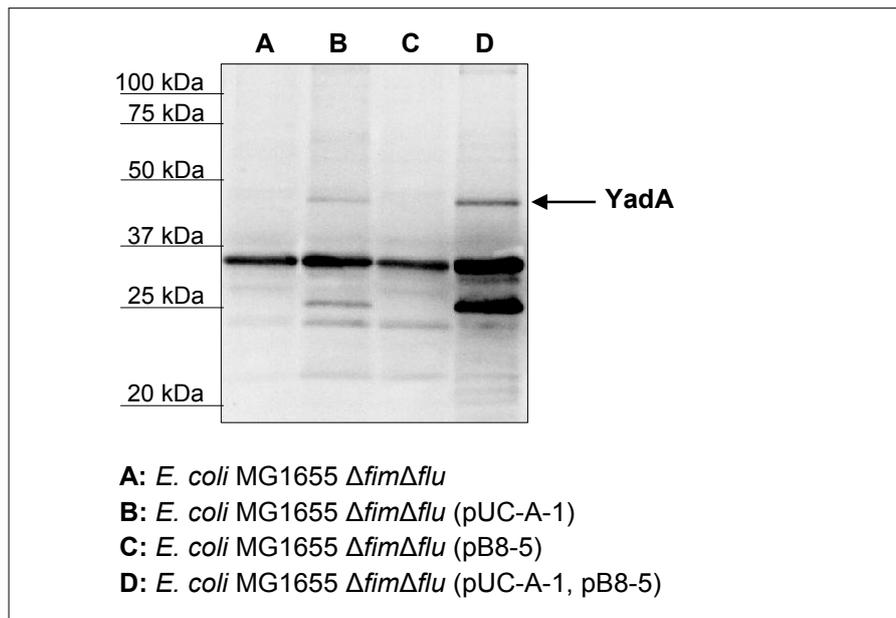
In Ergänzung dazu wurde sich eines zusätzlichen, chromatographischen Aufreinigungs- bzw. Trennverfahrens bedient, das sich die intermolekularen Wechselwirkungen (Affinität) zwischen Antigen 43 mit vermeintlichen Rezeptormolekülen zunutze macht (s. 4.22.4.). Hierbei konnten jedoch keine Proteine oder Peptide identifiziert werden, die Rückschlüsse auf putative Ag43<sup>a</sup>-spezifische Bindungspartner zuließen.

#### 5.4.2. Bindung von Antigen 43 an Proteine der extrazellulären Matrix

Die zuvor durchgeführten 'overlay assays' und Affinitätschromatographien schienen unter den hier gewählten Bedingungen ungeeignet für die Identifikation eines eukaryontischen Rezeptors für Antigen 43 zu sein. Aus diesem Grund wurde ein ELISA-System etabliert, in dem sich aufgereinigte Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) auf ihre „Rezeptortauglichkeit“ hin testen lassen (s. 4.22.5.).

Zu diesem Zweck wurden Mikrotiterplatten mit insgesamt 14 verschiedenen, kommerziell erhältlichen ECM-Proteinen und einer Basalmembranmatrix (Matrigel™) beschichtet (s. Tab. 4.7). Danach wurde in die einzelnen Kavitäten der Mikrotiterplatten jeweils die gleiche Anzahl an Ag43-exprimierenden *E. coli* K-12 MG1655  $\Delta fim\Delta flu$ -Bakterien (s. 5.3.1.) gegeben. Für diese Versuchsreihe war ebenso entscheidend, daß neben *flu* auch das Typ 1-Fimbrien-Gencluster (*fimBH*) deletiert worden war. Auf diese Weise konnte eine Adhäsion an extrazelluläre Matrix-/Glykoproteine, die nicht von den Plasmid-kodierten Ag43-Varianten verursacht wurde, ausgeschlossen werden. Bakterien, die somit an den immobilisierten Proteinmolekülen adhärirten, ließen sich über gerichtete Antikörperreaktionen detektieren und indirekt mittels Adsorptionsmessung quantifizieren.

Auch bei diesem Experiment wurde der Einfluß der Aah-vermittelten O-Glykosylierung auf jede Antigen 43-Variante hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften untersucht. Als Positivkontrolle diente das trimere Autotransporterprotein *Yersinia*-Adhäsion A (YadA) von *Y. enterocolitica*, das für die Bindung enteropathogener Yersinien an unterschiedliche Kollagene verantwortlich ist (Schulze-Koops *et al.*, 1992). Die Expression von YadA im *E. coli*-Stamm MG1655  $\Delta fim\Delta flu$  wurde zuvor mittels Immunoblot nachgewiesen (Abb. 5.9). In Abbildung 5.10 sind die Ergebnisse der ELISAs graphisch dargestellt. Die Auswertung der Daten erfolgte unter Berücksichtigung der Vektorkontrolle, dem *agn43*-negativen Stamm *E. coli* MG1655  $\Delta fim\Delta flu$  (pLDR11, pAAH).

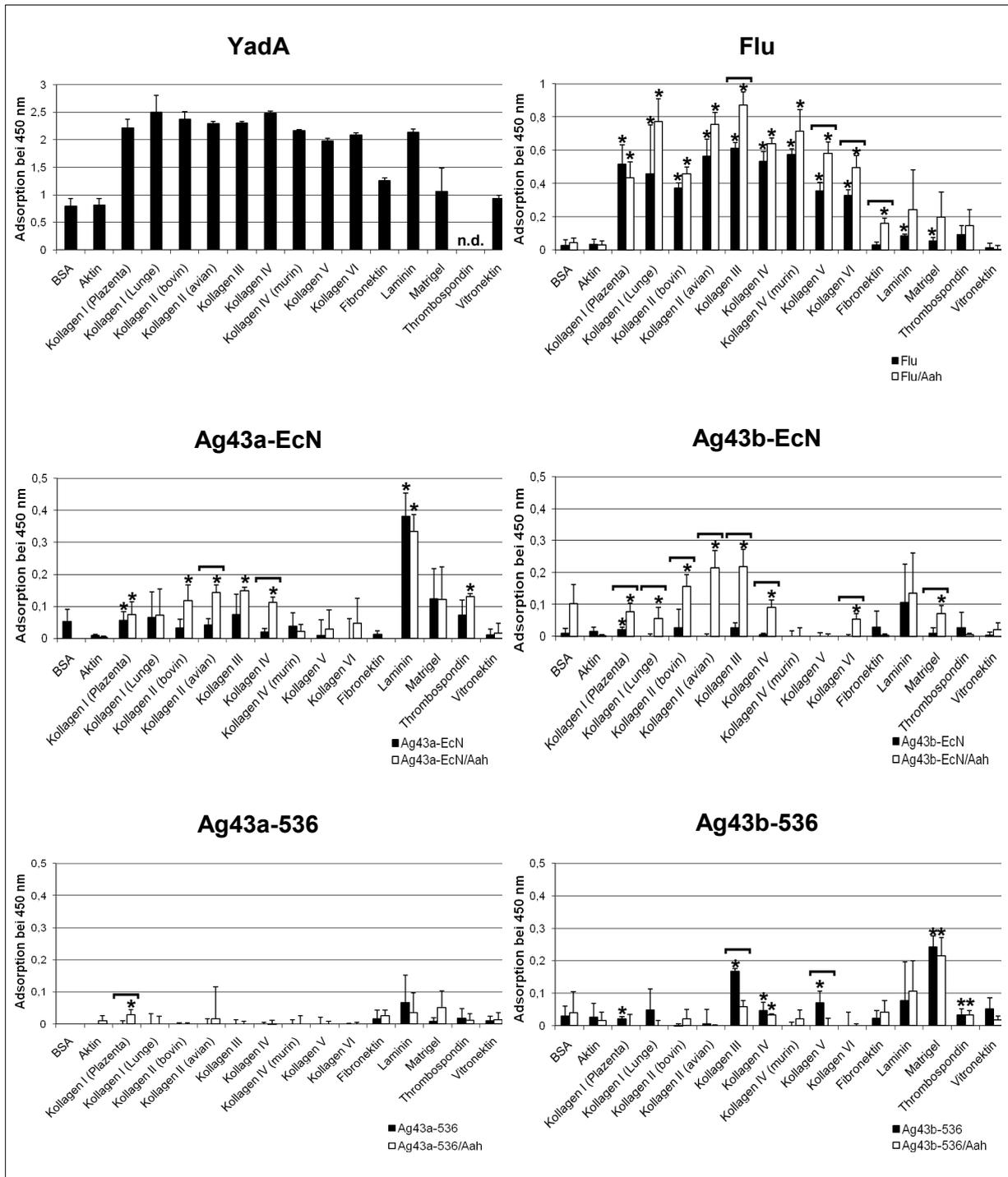


**Abb. 5.9: Nachweis der Expression von YadA in *E. coli* K-12-Stamm MG1655  $\Delta fim\Delta flu$  (Western Blot).** Immundetektion von monomerem YadA ( $\approx 43$  kDa) im Hitzeextrakt des *E. coli*-Stammes MG1655  $\Delta fim\Delta flu$  (pUC-A-1, pB8-5) [D]. Die Expression des pB8-5-kodierten Transkriptionsaktivators VirF ist für die Funktion von YadA essentiell.

Wie aus dem ersten Diagramm (Abb. 5.10, YadA) hervorgeht, bestätigten die durchgeführten Tests die Bindung YadA-exprimierender Bakterien an Kollagen. Somit war als Voraussetzung zur Etablierung des ELISA-Systems eine interne Kontrolle verfügbar, mit deren Hilfe die Ergebnisse weiterer Versuche verifiziert werden konnten. Darüber hinaus ist zu erkennen, daß YadA zusätzlich zu Kollagen auch an alle anderen getesteten Proteine adhärte. Molekulare Interaktionen des *Yersinia*-Adhäsins A mit Fibronectin und Laminin sind bekannt (Heise & Dersch, 2006). Dagegen ist die Bindung an Aktin und Vitronectin möglicherweise unspezifischer Natur, zumal in der Versuchsdurchführung etwa gleiche Adsorptionswerte auch für BSA gemessen worden sind.

Bis auf eine Ausnahme wies jede Variante des Antigen 43 eine signifikante Affinität zu plazentarem Kollagen I auf, und zwar unabhängig vom jeweiligen Bindungsvermögen. Des weiteren zeichnete sich Flu durch die Bindung an alle getesteten Kollagen-Typen aus. Im Vergleich mit den Ag43-Varianten der *E. coli* Stämme Nissle 1917 und 536 wird ebenso deutlich, daß Flu-exprimierende Bakterien mindestens dreimal effektiver als diese an die mit ECM-Proteinen beschichteten Mikrottestplatten adhärten.

Im Gegensatz dazu zeigten Ag43a/b-EcN und Ag43a/b-536 ein uneinheitliches Bild bezüglich der Autotransporter-vermittelten Adhäsion an Komponenten der extrazellulären Matrix, was unter anderem durch die teilweise hohen Standardabweichungen aus den Dia-



**Abb. 5.10: Ag43-vermittelte Adhäsion an Komponenten der extrazellulären Matrix.** Die Expression von Antigen 43 führt zur Bindung von *E. coli* MG1655  $\Delta fim \Delta flu$  an proteinbeschichtete Mikrotiterplatten. Adhärenente Bakterien werden über enzymgekoppelte Immunsorptionsmessungen (ELISA) detektiert. Die graphischen Darstellungen geben die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten unter Berücksichtigung (Subtraktion) der Negativkontrolle wieder (\*  $p \leq 0,05$ ; — signifikante Abweichung zwischen der jeweiligen Ag43-Variante und Ag43/Aah), für die YadA-Positivkontrolle gilt  $p \leq 0,02$ .

grammen hervorgeht. Auffällig ist die von Ag43a-EcN bevorzugte Bindung an Laminin und die des Ag43b-536 an humanes Kollagen III, IV, V sowie Matrigel™. Für Ag43b-EcN und Ag43a-536 konnte kaum eine durch diese vermittelte Bindung an Proteine der extrazellulären Matrix nachgewiesen werden.

Die *O*-Glykosylierung von Antigen 43 hatte zum Teil signifikanten Einfluß auf dessen Bindungseigenschaften (in Abb. 5.10 gekennzeichnet durch  $\blackrightarrow$ ). Bei den Varianten Flu und Ag43a/b-EcN führte die Koexpression von Aah zu einer deutlich verstärkten Adhäsion der Bakterien an einzelne ECM-Proteine. Ein einheitliches Muster war jedoch nicht erkennbar. Interessanterweise verhielt es sich bei glykosyliertem Ag43b-536 genau entgegengesetzt, so daß ein stark vermindertes Bindungsvermögen von Ag43b-536/Aah an Kollagen III und Kollagen V beobachtet werden konnte.

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß Antigen 43 über die Bindungskapazität an alle in dieser Arbeit getesteten Kollagen-Typen, vorrangig jedoch Kollagen I, verfügte und gewisse Affinitäten gegenüber anderen Proteinen der extrazellulären Matrix, insbesondere Laminin bestanden. Die heterologe *O*-Glykosylierung von Ag43 führte überwiegend zu einer deutlich vermehrten Adhäsion von Bakterien an Kollagene, wie z. B. im Fall von Flu und den beiden Antigen 43-Varianten des *E. coli*-Stammes Nissle 1917. Die Koexpression der Glykosyltransferase Aah hatte dagegen für Ag43b-536 eine Verringerung seines Bindungsvermögens zur Folge. Generell war eine Glykosylierung von Antigen 43 für dessen Bindung an ECM-Proteine jedoch nicht erforderlich.

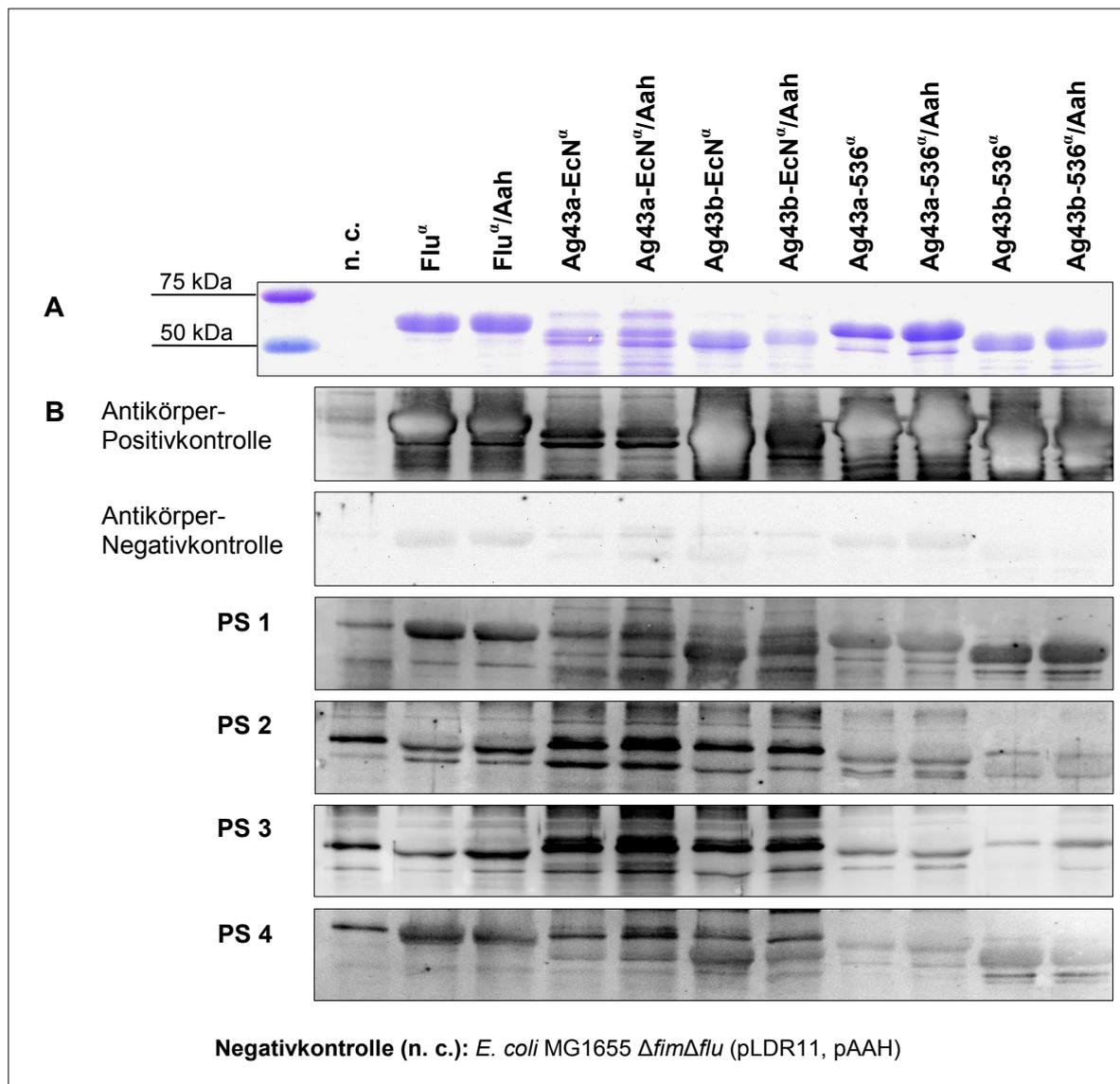
Im Vergleich zu YadA läßt sich Ag43 als ein Adhäsion mit schwächerer Affinität zu Kollagen und Laminin charakterisieren, wobei die Variante Flu die höchsten und Ag43a-536 die geringsten Bindungskapazitäten aufwies. Einzelne Antigen 43-Varianten unterschieden sich hinsichtlich ihrer Bindungsaffinitäten voneinander und sind darüber hinaus anhand vermeintlich individueller Spezifitäten gegenüber bestimmten Proteinen gekennzeichnet.

## 5.5. Untersuchungen zur Immunogenität von Antigen 43

Mehrere Modelle von Antigen 43 beschreiben seine  $\alpha$ -Domäne als eine dünne  $\beta$ -Helix mit einer Länge von nur 10 nm (Kajava *et al.*, 2001; Klemm *et al.*, 2004). Demnach ist Ag43 <sup>$\alpha$</sup>  ein vergleichsweise kleines, Oberflächen-exponiertes Protein, das kürzer ist als z. B. AIDA-I <sup>$\alpha$</sup>  (etwa 17 nm), Fimbrien (0,5-5  $\mu$ m) oder Flagellen (bis zu 20  $\mu$ m). Trotz einer räumlichen Abschirmung durch längere Oberflächen-assoziierte Strukturen führte die Präsentation von Antigen 43 an der Zelloberfläche nachweislich zu intermolekularen Ag43-Ag43-Wechselwirkungen (Autoaggregation; s. 5.3.2.). Zudem vermittelte es die bakterielle Adhäsion an

Epithelzellen (s. 5.3.3.) und vermag dadurch zur Biofilmbildung beizutragen (Danese *et al.*, 2000). Somit wäre eine gegen Antigen 43 gerichtete humorale Immunreaktion als Antwort auf eine Infektion mit pathogenen *Escherichia coli* denkbar.

Vor diesem Hintergrund wurde das Serum von vier Patienten, die an einer UPEC-assoziierten Harnwegsinfektion litten, auf das Vorhandensein Antigen 43-spezifischer Antikörper hin untersucht. Hierfür wurden in *Western Blots* immobilisierte Ag43<sup>α</sup>-Varianten mit den einzelnen Seren inkubiert. Gebundene Antikörper wurden mit F(ab')<sub>2</sub>-Fragment-erkennen-



**Abb. 5.11: Nachweis von  $\alpha$ -Ag43<sup>α</sup> IgG im Serum von Patienten, die an einer UPEC-assoziierten Harnwegsinfektion litten.** Sowohl nicht-glykosylierte als auch glykosylierte  $\alpha$ -Domänen des Ag43 dienten als Antigene zur Detektion spezifischer Antikörper. **A:** SDS-PAGE der hitzeextrahierten Ag43<sup>α</sup>-Varianten. **B:** *Western Blot*-Analyse unter Verwendung Ag43a/b-536<sup>α</sup>-spezifischen Serums (Positivkontrolle),  $\alpha$ -Human F(ab')<sub>2</sub> IgG (Negativkontrolle) und der vier Patientenserum (PS 1-4).

den Immunglobulinen hybridisiert und der gesamte Immunkomplex durch Zugabe tertiären IgG-HRP-Konjugats detektiert (s. 4.19.1.).

Wie in der Abbildung 5.11 deutlich zu erkennen ist, ließen sich Antigen 43-spezifische Immunglobuline in allen vier getesteten Patientenseren (PS) nachweisen. Jedes Serum reagierte mit jeder Ag43<sup>α</sup>-Variante – und zwar unabhängig von deren Glykosylierungsstatus. Vergleicht man dagegen die Intensität der Signale untereinander, reagierten α-Ag43a/b-536<sup>α</sup> IgGs (Antikörper-Positivkontrolle) aufgrund ihrer Spezifität wesentlich stärker. Selbst bei Verwendung des tertiären Antikörpers, der gleichzeitig eine Erhöhung der Sensitivität zur Folge hat, zeichnete sich bei den Patientenseren ein teilweise nur schwaches Detektionssignal vorhandener Immunkomplexe ab. Auffällig war die Reaktion von PS 1-4 mit offensichtlich immunogenen, etwa 60 kDa großen Molekülen im Hitzeextrakt der Negativkontrolle (n. c.), die sich mittels SDS-PAGE jedoch nicht darstellen ließen.

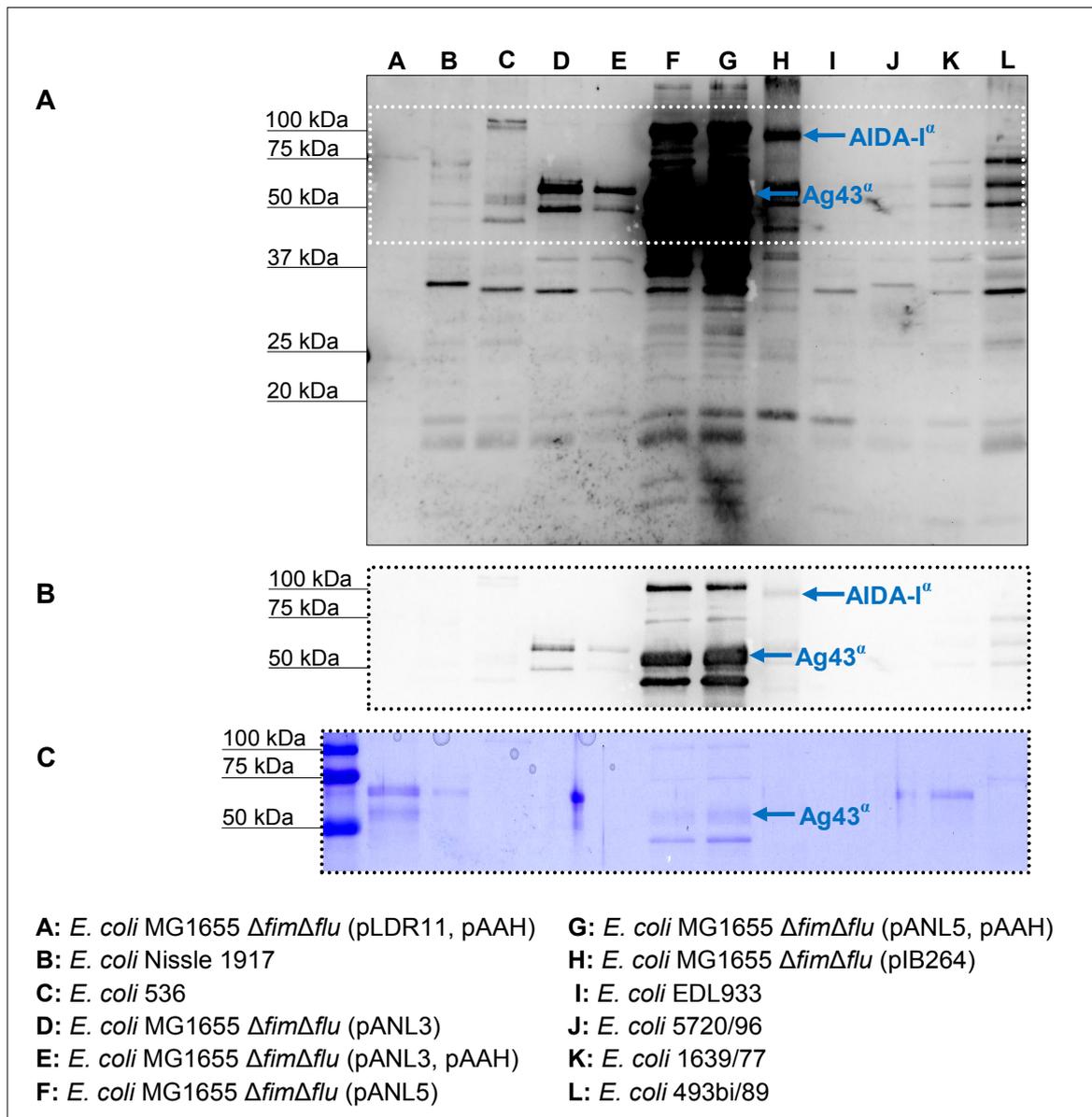
Ungeachtet dessen lag eine eindeutige Kreuzreaktivität der Testseren mit den hier verwendeten Ag43<sup>α</sup>-Varianten vor. Folglich stellt Antigen 43 ein Immunogen mit konservierten Epitopen dar.

## 5.6. Polymerisation von Autotransporterproteinen

Girón und Mitarbeiter (2007) beobachteten das Phänomen einer kettenförmigen Aneinanderlagerung sekretierter Autotransporterproteine im Kulturüberstand von EPEC- und EHEC-Stämmen (Tagungsbeitrag, nicht publizierte Daten). Selbst nach Abtrennung der Bakterien vom Flüssigmedium formierten sich unter Schütteln und bereits nach wenigen Stunden sichtbar sog. 'E. coli Ropes', die aus polymerisiertem EspC-Enterotoxin bzw. der Serin-Protease EspP bestanden.

In Anlehnung an diese Beobachtungen ist das gleiche Experiment mit den Autotransporterproteinen Antigen 43 und AIDA-I durchgeführt worden (s. 4.23.). Obwohl die Kulturüberstände der über Nacht angezogenen Bakterienstämme sterilfiltriert wurden, waren nach etwa 60 Stunden auch hier größere, freischwebende Partikel makroskopisch erkennbar. Der Überstand der Negativkontrolle blieb dagegen klar. Daraufhin wurde mit Hilfe spezifischer Antikörper die Zusammensetzung der Partikelstrukturen in *Western Blots* analysiert.

Wie aus Abbildung 5.12 [B-H] hervorgeht, enthielten die Kulturüberstände der getesteten Stämme die entsprechenden Autotransporterproteine. Ob Ag43<sup>α</sup> bzw. AIDA-I<sup>α</sup> jeweils als Bestandteil der Aggregate oder lediglich als Monomere vorlagen, konnte allein durch *Western*-Hybridisierungen und unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE) methodisch nicht nachgewiesen werden. Die Intensität des Detektionssignals im *Western Blot* korrelierte mit dem *agn43*- bzw. *aidA*-kodierenden Expressionssystem: Die wildtypischen



**Abb. 5.12: Nachweis sekretierter Autotransporterproteine.** Die Kulturüberstände der Stämme [A-L] wurden mittels Immundetektion auf das Vorhandensein von Ag43<sup>α</sup> bzw. AIDA-I<sup>α</sup> getestet. **A:** *Western Blot* unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen Ag43, Ag43a/b-536<sup>α</sup> und AIDA-I. **B:** Ausschnitt des in **A** markierten *Blots* bei kürzerer Belichtungszeit. **C:** SDS-PAGE der 50-100 kDa-Region.

Isolate *E. coli* 536 und *E. coli* Nissle 1917 mit jeweils zwei chromosomalen *agn43*-Orthologen synthetisierten erheblich weniger Ag43-Protein als der gentechnisch veränderte *E. coli* K-12-Stamm, in dem *agn43* von einem Expressionsvektor exprimiert wurde. In den Kulturüberständen der *agn43*-positiven EHEC-Stämme EDL933, 5720/96 und 1639/77 ließ sich kein Antigen 43 und für EDL933 kein EspP (104 kDa) nachweisen (Abb. 5.12 [I-K]). Somit konnten zwar (polymerisierte)  $\alpha$ -Domänen der bakteriellen Autotransporter Antigen 43 und AIDA-I in zellfreien Kulturüberständen nachgewiesen werden, eine Formierung der

Proteine zu 'E. coli Ropes' wurde jedoch nicht beobachtet. Statt dessen waren Ag43<sup>α</sup> sowie AIDA-I<sup>α</sup> Bestandteil von irregulär geformten Partikeln bzw. Aggregaten. Die Menge an sezernierten Autotransporterproteinen (Expressionsstärke) entsprach dabei der Expression chromosomal oder Plasmid-kodierter *agn43*-Varianten.

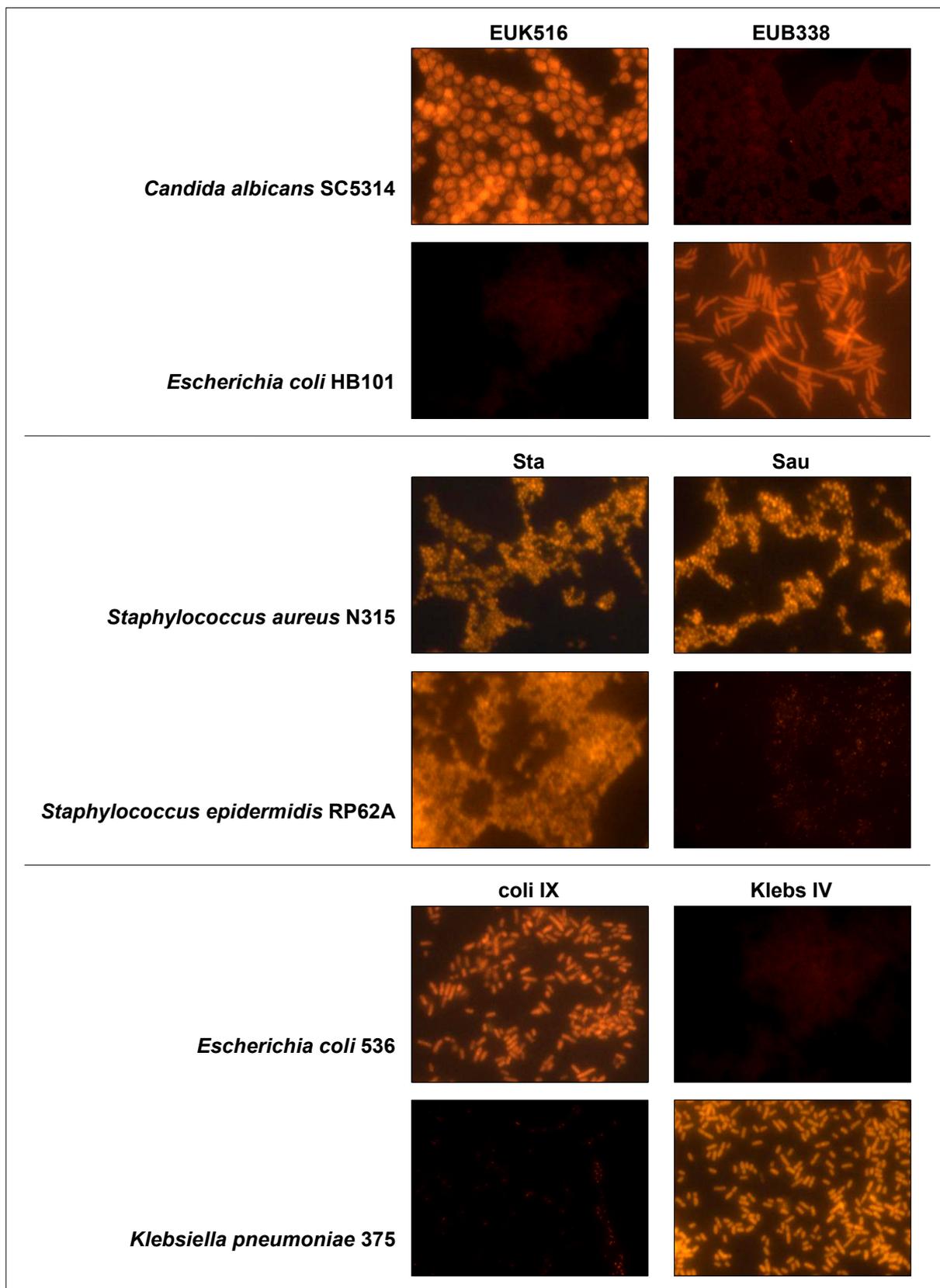
### **5.7. rRNA-gerichtete Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung zur Differenzierung von Harnwegserregern**

In Kooperation mit der *Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie* des Universitätsklinikum Würzburgs wurde ein auf Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) basierendes Testsystem entwickelt, mit dem uropathogene Mikroorganismen auf Harnblasenkathetern detektiert werden können. In der diagnostischen Anwendung sollte die FISH-Technik sowohl zur Identifizierung pathogener Spezies als auch zur Untersuchung von bakteriellen Biofilmen beitragen.

Insgesamt konnten neun rRNA-spezifische Oligonukleotide für die Applikation bei *in vivo* gewachsenen Biofilmen auf Kathetern etabliert werden (s. 4.9.). Hierfür wurden bereits publizierte sowie neue, anhand von Datenbanken erstellte rRNA-Sonden (s. Tab. 3.5; s. 4.10.) zunächst gegen verschiedene Teststämme (s. Tab. 3.2) geprüft, gegebenenfalls optimiert und anschließend auf Katheterproben angewandt. Die Abbildung 5.13 veranschaulicht hierzu die Spezifität ausgewählter FISH-Sonden.

Wie sich zeigte, ist die Oberfläche der aus Silikon und SILKOLATEX<sup>®</sup> hergestellten Blasen-katheter für die Mikroskopie nicht geeignet. So reflektieren die synthetischen Materialien das vom Mikroskop einfallende Licht und überstrahlen dadurch die Fluoreszenzsignale. Dennoch war es möglich, nach dem Abkratzen der Biofilme von den Katheterinnenseiten Fluoreszenz-markierte Mikroorganismen zu detektieren.

Das in der vorliegenden Arbeit etablierte Protokoll zur Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung ermöglicht somit den differentiellen Nachweis von (uro-)pathogenen Mikroorganismen. Die Spezifität der hier verwendeten rRNA-Oligonukleotidsonden ist von hoher Sensitivität und erlaubt zum Teil die Unterscheidung zwischen Bakterienspezies der gleichen Gattung. Des weiteren kann das Protokoll auch für Gram-positive Bakterien ohne eine vorherige Behandlung mit Lysozym oder Lysostaphin verwendet werden.



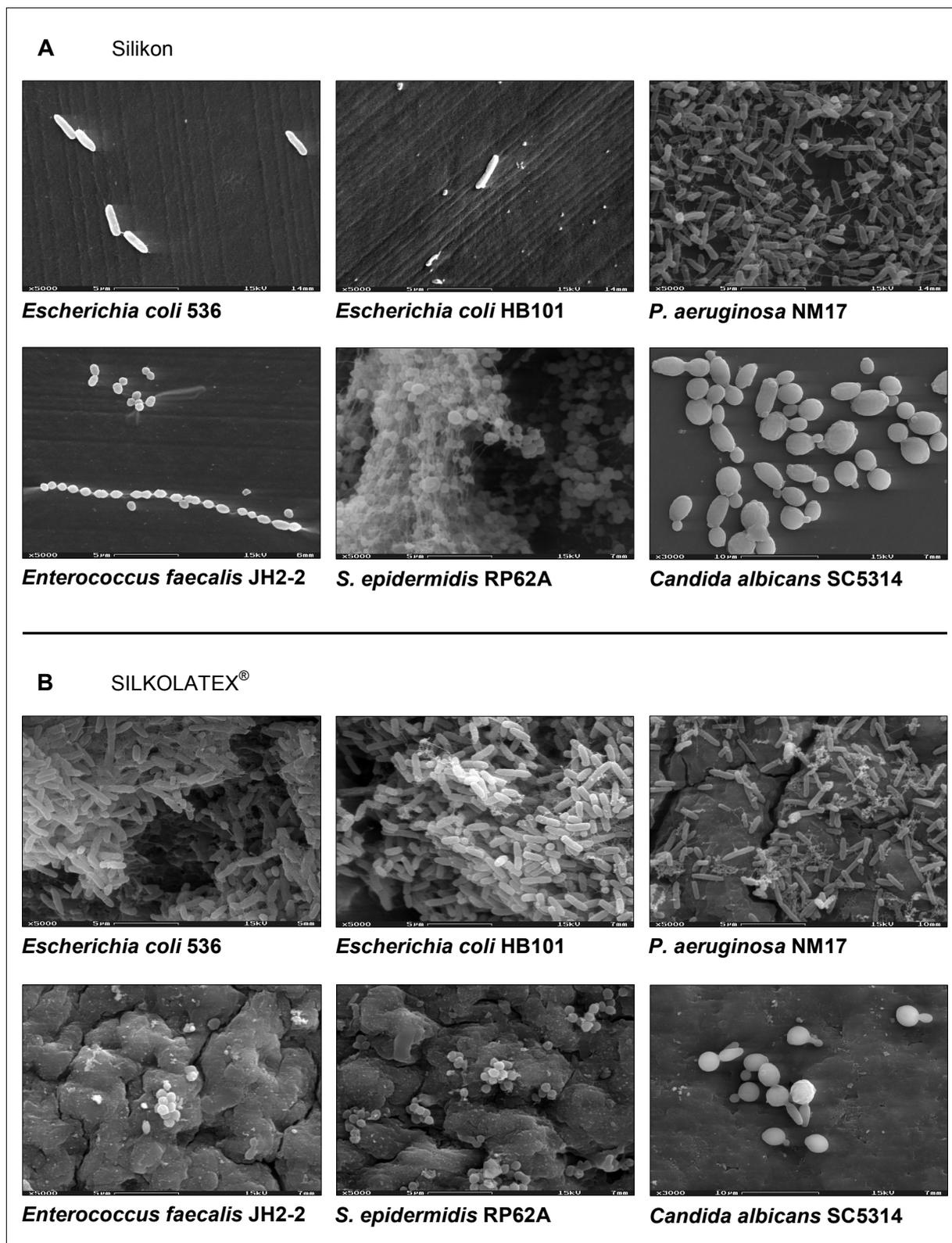
**Abb. 5.13: rRNA-gerichtete Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH).** Etablierung der FISH-Technik zum Nachweis (uro-)pathogener Mikroorganismen auf Harnblasenkathetern. Die mikroskopischen Aufnahmen veranschaulichen die Spezifität von verschiedenen Fluoreszenz (Cy3)-markierten rRNA-Oligonukleotidsonden (200-400fache Vergrößerung).

## 5.8. Biofilmbildung auf Kathetern

Laut einer internen Statistik der *Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie* des Universitätsklinikum Würzburgs aus dem Jahr 2003 waren mehr als die Hälfte (55 %) der bakteriell verursachten Harnwegserkrankungen in dieser Klinik auf eine Infektion mit Enterobakterien zurückzuführen. Allein bei 31 % der Patienten wurde *Escherichia coli* im Urin nachgewiesen. Auf der Suche nach der Ursache rezidivierender oder chronischer Erkrankungen des Urogenitaltrakts werden unter anderem mikrobielle Biofilme auf Harnblasenkathetern als Reservoir für (Re-)Infektionen bei hospitalisierten Patienten diskutiert, sog. Katheter-assoziierte Harnwegsinfektionen (Trautner *et al.*, 2005).

In diesem Zusammenhang wurde das Vermögen von *E. coli* Stamm 536 und anderen (uro-)pathogenen Mikroorganismen untersucht, in einem *in vitro*-System Biofilme zu bilden (s. 4.21.2.). Hierfür wurden die entsprechenden Stämme für 24, 48 bzw. 72 Stunden in Komplexmedium bei 37 °C bzw. 30 °C (s. Tab. 3.2) mit zwei verschiedenen Ballonkathetern unterschiedlichen Materials (Silikon, SILKOLATEX®) inkubiert.

Bei elektronenmikroskopischer Betrachtung der Katheterstückchen zeichnete sich ein einheitlicher Phänotyp ab: Alle getesteten Isolate, darunter auch die *E. coli* Stämme 536 und HB101, waren in der Lage, innerhalb von maximal 72 Stunden auf beiden Kunststoffoberflächen einen komplexen Biofilm zu etablieren. Die Kolonisierung der Katheter verlief jedoch unterschiedlich: Während Gram-positive Bakterien (*Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp.) sowie *Candida albicans* besser Biofilme auf einer Silikonoberfläche ausbildeten, erfolgte eine Biofilmbildung bei Gram-negativen Bakterien (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*) schneller auf SILKOLATEX®. In Abbildung 5.14 sind hierzu jeweils sechs Proben exemplarisch dargestellt. Anhand des 48 Stunden-Wertes läßt sich die Kolonisierung der synthetischen Materialien sowie die morphologische Beschaffenheit der Biofilme verdeutlichen. Darüber hinaus ist festzuhalten, daß die Harnwegsinfekt- und Endoplastitis-assoziierten Pathogenen wie Enterokokken, Staphylokokken, *P. aeruginosa*, *Proteus* spp., *E. coli* oder auch *C. albicans* im Vergleich zu den anderen getesteten Stämmen am effektivsten und teilweise schon nach 24 Stunden Biofilmstrukturen bildeten.



**Abb. 5.14:** *In vitro*-Biofilmbildung verschiedener, pathogener Mikroorganismen auf Harnwegskathetern. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen die Biofilmbildung verschiedener (uro-)pathogener Isolate nach 48stündiger Inkubation in Komplexmedium bei 37 °C bzw. 30 °C (s. Tab. 3.2) mit Blasenkathetern aus **A:** Silikon und **B:** SILKOLATEX®. (3.000-5.000fache Vergrößerung).

## 6. Diskussion

Sowohl die Pathogenität einer Spezies als auch die Virulenz von Bakterienstämmen beruht auf dem Besitz besonderer Eigenschaften (Faktoren), welche in Form von Strukturelementen oder Stoffwechselprodukten exprimiert werden (Hacker & Heesemann, 2000; Hahn *et al.*, 2004). Für das innerhalb von apathogenen, kommensalen und pathogenen *Escherichia coli*-Stämmen weit verbreitete Autotransporterprotein Antigen 43 (Ag43) wird die Funktion eines unspezifisch wirkenden Pathogenitätsfaktors angenommen, der zur Kolonisierung und/oder Biofilmbildung beiträgt (Henderson & Nataro, 2001; Schembri *et al.*, 2003). Aus diesem Grund lag der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf der funktionalen Charakterisierung mehrerer Antigen 43-Varianten, um seine Bedeutung während einer Infektion mit (uro-)pathogenen *E. coli* aufzuklären.

### 6.1. Strukturelle Untersuchungen der Antigen 43<sup>α</sup>-Varianten

#### 6.1.1. Primärstruktur

In Abschnitt 5.1. wurden die primären Aminosäuresequenzen der  $\alpha$ -Domäne von den Antigen 43-Varianten Flu (*Escherichia coli* K-12), Ag43a/b-EcN (*E. coli* Stamm Nissle 1917) und Ag43a/b-536 (*E. coli* Stamm 536) miteinander verglichen, um daraus funktionale Eigenschaften ableiten zu können. Wie sich herausstellte, ist der *N*-terminale Bereich der  $\alpha$ -Domäne sehr variabel, einzelne Sequenzmotive liegen jedoch hoch konserviert vor (s. Abb. 5.1).

Die  $\alpha$ -Domäne des vom *Escherichia coli* Stamm 536 kodierten Ag43b weicht hinsichtlich der Primärstruktur am stärksten von den anderen vier untersuchten Ag43<sup>α</sup>-Varianten ab. So zeichnet sich Ag43b-536<sup>α</sup> vor allem durch die Deletion von mehr als 90 Aminosäuren aus, was, wie in SDS-PAGEs zu erkennen war, die Verringerung seines Molekulargewichts zur Folge hat. Des Weiteren wurde deutlich, daß Ag43a/b-EcN<sup>α</sup> und Ag43a-536<sup>α</sup> untereinander zu etwa 90 % identisch sind (Tab. 6.1), im Vergleich zu Flu<sup>α</sup> und Ag43b-536<sup>α</sup> sind sie dagegen recht unterschiedlich. Während Ag43b-536<sup>α</sup> in denselben Sequenzbereichen dem Flu<sup>α</sup> von *E. coli* K-12 ähnlich ist, verfügt es darüber hinaus noch über eine Reihe weiterer Mutationen, die ausschließlich die  $\alpha$ -Domäne des UPEC 536-kodierten Ag43b betreffen. Aus phylogenetischer Sicht sind demnach Ag43a/b-EcN und Ag43a-536 näher miteinander verwandt als mit Flu oder Ag43b-536. Beide Antigen 43-Varianten des *E. coli*-Stammes 536 sind lediglich zu 52 % identisch (Tab. 6.1) und haben sich wahrscheinlich unabhängig

voneinander weiterentwickelt.

**Tabelle 6.1** Vergleich der Primärstruktur der Ag43<sup>α</sup>-Varianten, Identitäten in Prozent

	Flu <sup>α</sup>	Ag43a-EcN <sup>α</sup>	Ag43b-EcN <sup>α</sup>	Ag43a-536 <sup>α</sup>
<b>Ag43a-EcN<sup>α</sup></b>	80			
<b>Ag43b-EcN<sup>α</sup></b>	83	88		
<b>Ag43a-536<sup>α</sup></b>	84	90	93	
<b>Ag43b-536<sup>α</sup></b>	58	55	52	52

Eine weitere Besonderheit, die alle Ag43<sup>α</sup>-Varianten betraf, ist deren *N*-terminale Sequenz. Der Bereich zwischen Ala<sup>1</sup> und Gly<sup>26</sup> zeigt hohe Ähnlichkeit zu den *N*-Termini von Typ 1-, F1C-, S- und K88-Fimbrien verschiedener, pathogener Enterobakterien. Obwohl diese Fimbrientypen Adhäsine darstellen und serologisch unterschiedlich sind, konnte zum Beispiel für F1C-Pili bislang keine Rezeptorspezifität determiniert werden. So ist anzunehmen, daß sowohl die *N*-terminale Region der Fimbrien als auch die des Antigen 43<sup>α</sup> für die Translokation durch die äußere Zellmembran und/oder für die Erkennung eines spezifischen Rezeptors verantwortlich ist (Caffrey & Owen, 1989).

Das von Henderson & Owen (1999) beschriebene RGD-Motiv, das für eine Antigen 43-vermittelte Bindung an Integrine eukaryontischer Zellen verantwortlich sein könnte, ist lediglich in Flu<sup>α</sup> nicht jedoch in den α-Domänen der von *E. coli* Nissle 1917 und UPEC 536 kodierten Ag43-Varianten konserviert. Selbst die flankierenden Bereiche jenes Motivs sind recht divers, so daß an diesen Aminosäurepositionen eine spezifische Bindung an eukaryontische Membranproteine ausgeschlossen werden kann.

Sherlock *et al.* (2006) messen hinsichtlich Ag43-Ag43-Interaktionen den ersten 150 Aminosäuren in der α-Domäne besondere Bedeutung zu. Zwischen Ala<sup>1</sup> und Asp<sup>150</sup> befindet sich ein Bereich mit ungewöhnlich vielen, basischen und sauren Aminosäuren, die anscheinend an der Autoaggregation von Antigen 43-exprimierenden *Escherichia coli* beteiligt sind. Darüber hinaus beobachteten Klemm *et al.* (2004), daß die phänotypische Aggregation der Bakterien vom pH-Wert und der Salzkonzentration abhängig ist, was auf intermolekulare, ionische Wechselwirkungen jener geladenen Aminosäuren hindeutet.

### 6.1.2. Sekundärstruktur

Die Aminosäuren 50 bis 447 sind maßgeblich an der Ausbildung der 3-D-Struktur von Antigen 43<sup>α</sup> beteiligt. Mehrere, bioinformatische Modelle sagen für diesen Bereich ein β-Helixmotiv voraus. Demnach faltet sich die α-Domäne zu einer dünnen, helikalen und 10 nm langen Struktur, deren C-terminales Ende exakt in das 'β-barrel' der membranständigen Ag43<sup>β</sup>-Untereinheit paßt (Klemm *et al.*, 2004). Des weiteren bilden jeweils 16-19 Aminosäuren die aus 20 Windungen bestehende β-Helix, deren Konsensussequenz zu AIDA-I<sup>α</sup> ähnlich ist (Kajava *et al.*, 2001).

Interessanterweise befindet sich in der α-Domäne der vier Varianten Flu, Ag43a/b-EcN und Ag43a-536 an Position Leu<sup>448</sup>-Leu<sup>469</sup> ein hoch konserviertes Leucin-Zipper-Motiv, das jedoch in Ag43b-536<sup>α</sup> vollständig deletiert ist. Möglicherweise ist dieses Motiv für intermolekulare Wechselwirkungen des Antigen 43 verantwortlich, zumal bZIP-Domänen zur Dimerisierung von Proteinen beitragen (Roche *et al.*, 2001).

### 6.1.3. Posttranslationale Modifikationen

In der vorliegenden Arbeit konnten die Angaben aus der Literatur dahingehend bestätigt werden, daß Antigen 43<sup>α</sup> durch heterologe Expression der AIDA-I-spezifischen Heptosyltransferase Aah glykosyliert wird (s. 5.3.1.). Sherlock *et al.* (2006) identifizierten bei Koexpression von Aah O-glykosidisch gebundene Heptosen an insgesamt 44 bestimmten Serin- bzw. Threonin-Resten des Flu<sup>α</sup>, wohingegen Knudsen *et al.* (2008) ein davon abweichendes Glykosylierungsmuster an nur 16 Aminosäuren detektierten. Obwohl beide Arbeitsgruppen ähnliche Strategien zur Aufklärung der O-Glykosylierungsstellen verfolgten, stimmen die Heptosylierungen lediglich an sechs Positionen miteinander überein (Ser<sup>265</sup>, Ser<sup>280</sup>, Ser<sup>344</sup>, Thr<sup>435</sup>, Ser<sup>439</sup>, Ser<sup>451</sup>). Henderson & Owen (1999) schlagen dagegen ein sequenzspezifisches Glykosylierungsmotiv vor, das jedoch nur zweimal in der α-Domäne von Flu vorkommt: S<sup>443</sup>GSG, S<sup>603</sup>GKG. Die Konsensussequenz TV-NSGG-Q-V-SGG-A-, an der möglicherweise die Heptosylierung bei den Autotransporterproteinen AIDA-I und TibA stattfindet (Moormann *et al.*, 2002), ist in keiner Ag43<sup>α</sup>-Variante vorhanden. So bleibt gegenwärtig immer noch festzustellen, welche Serine und Threonine des Antigen 43<sup>α</sup> letztendlich modifiziert werden.

Unklar ist auch, welche Art der glykosidischen Bindung katalysiert wird. Roche *et al.* (2001) vermuten mehrere, potentielle N-Glykosylierungsstellen innerhalb Ag43<sup>α</sup> und Ag43<sup>β</sup>. Weiter-

führende Untersuchungen, die vor allem zur Identifizierung und Charakterisierung der endogenen, Ag43-spezifischen Heptosyltransferase in *Escherichia coli*-Wildtypstämmen beitragen, könnten Aufschluß über die posttranslationale Glykosylierung des gesamten Proteins Antigen 43 geben.

Die in allen Ag43<sup>α</sup>-Varianten kodierte Konsensussequenz für die Bindung einer Aspartat-Protease läßt hinsichtlich ihrer Bedeutung nur Vermutungen zu. Weder *in vivo* noch *in vitro* konnte bislang eine endoproteolytische Spaltung des Antigen 43 an dieser Stelle experimentell nachgewiesen werden. Möglicherweise findet hier eine endoproteolytische Modifikation während der Prozessierung von Antigen 43 und/oder eines anderen (wirtsspezifischen) Substrats statt. In diesem Zusammenhang könnte auch die C-terminale Phosphat-Bindedomäne ('P-loop'; G<sup>479</sup>-G<sup>486</sup>) von Bedeutung sein und das für enzymatische Reaktionen notwendige ATP oder GTP zur Verfügung stellen (Owen *et al.*, 1996; Henderson & Owen, 1999).

Das Vorhandensein einer Aspartat-Protease-spezifischen Bindestelle ist neben der C-terminalen β-Helix, den wenigen bzw. fehlenden Disulfidbrücken und der autokatalytischen Spaltung des Antigen 43 in seine α- und β-Untereinheit ein weiteres Strukturmerkmal IgA1-Protease-ähnlicher Autotransporter (Owen *et al.*, 1996). Zu dieser Gruppe von Proteinen gehören unter anderem die Virulenz-assoziierten Adhäsine von verschiedenen, Gram-negativen Bakterien wie AIDA-I (EPEC), TibA (ETEC), Tsh (*Shigella* spp.), Pertactin (*Bordetella pertussis*), Hap (*Haemophilus influenzae*) oder Hsr (*Helicobacter mustelae*; Benjelloun-Touimi *et al.*, 1995; Dozois *et al.*, 2000).

Inwiefern die Variabilität der primären Aminosäuresequenz signifikanten Einfluß auf die Funktionalität einzelner Antigen 43<sup>α</sup>-Varianten hat, bleibt nachfolgend festzustellen. Über die Einbringung punktgenauer Mutationen ließe sich die Bedeutung bestimmter Aminosäuren oder Sequenzbereiche mit Hinblick auf das gesamte Protein und seiner Struktur, der Funktion sowie posttranslationale Modifikationen bestimmen. Ungeachtet dessen wurde die strukturelle Ähnlichkeit des Antigen 43 zu anderen Adhäsinen, insbesondere zum Autotransporterprotein AIDA-I, deutlich, was ebenfalls auf seine Funktion als Adhäsine hindeutet.

## 6.2. Überexpression rekombinanten Antigen 43<sup>α</sup>

Für eine Reihe experimenteller Versuchsansätze wurde zunächst die α-Domäne der von UPEC 536 kodierten Ag43a-Variante rekombinant hergestellt. Hierfür war *agn43a-536<sup>α</sup>* unter Einbringung eines N-terminalen Hexa-Histidin-Peptids in zwei verschiedene Expressions-

vektoren kloniert und durch geeignete *Escherichia coli*-Stämme synthetisiert worden. Rekombinantes 6xHisAg43a-536<sup>α</sup> ließ sich somit über das His-*tag* aus den Bakterienlysaten isolieren und entsprechend aufreinigen (s. 5.2.). Aufgrund seines modularen Aufbaus ist es unwahrscheinlich, daß sich das *unvollständig* hergestellte Protein – ohne die dazugehörige β-Untereinheit – strukturell von nativem Ag43a-536<sup>α</sup> unterscheidet.

Wie sich jedoch herausstellte, wick das angereicherte Protein von seinem berechneten Molekulargewicht (69,9 kDa) geringfügig ab und entsprach dagegen der Masse von hitzeextrahiertem Ag43a-536<sup>α</sup> (≈58 kDa). Da mit Hilfe von DNA-Sequenzanalysen Mutationen ausgeschlossen werden konnten, ist das kleinere Molekulargewicht des 6xHisAg43a-536<sup>α</sup>, für das ein Instabilitätsindex von 8,82 vorhergesagt wird, allenfalls auf eine unvollständige Prozessierung oder auf posttranslationale Modifizierungsereignisse zurückzuführen. So ist zu vermuten, daß das reife Protein am C-Terminus proteolytisch gespalten wird, zumal seine klonierte Gensequenz auch die α- und β-Untereinheit-verbindende *'linker'*-Region kodiert. Zuverlässige Aussagen hinsichtlich der C-terminalen Primärstruktur von 6xHisAg43a-536<sup>α</sup> könnten lediglich anhand einer Proteinsequenzierung getroffen werden.

Darüber hinaus ist bislang nicht geklärt, inwiefern Polyhistidin-Peptide die Sekundär- bzw. Tertiärstruktur eines Proteins nachhaltig beeinflussen (Voet & Voet, 1994). Im Fall des Antigen 43 könnte das zusätzliche His-*tag* die Faltung der α-Domäne soweit verändern, daß gegen 6xHisAg43a-536<sup>α</sup> gerichtete Antikörper mit den Epitopen des nativen Proteins nicht reagieren. Im Hinblick auf Bindungsstudien bleibt ebenfalls unklar, ob die gentechnische Modifikation von Ag43<sup>α</sup> nicht nur eine strukturelle Veränderung sondern auch Einfluß auf dessen biologische Funktion zur Folge hätte. Aus diesem Grund wäre ein C-terminal eingefügter Hexa-Histidin-Rest durchaus vorteilhafter gewesen, wobei jedoch die genaue Aminosäureposition der Spaltstelle zwischen der α- und β-Untereinheit des Antigen 43 bisher nicht determiniert werden konnte.

Ungeachtet dessen ist rekombinantes Ag43a-536<sup>α</sup> für die Herstellung spezifischer Antikörper und als Ligand in Affinitätschromatographien verwendet worden.

### 6.3. Funktionale Charakterisierung von Antigen 43

Gegenstand der vergleichenden Untersuchungen zur Funktion des Antigen 43 bildeten die von *Escherichia coli* K-12, *E. coli* Stamm Nissle 1917 (EcN) und *E. coli* Stamm 536 kodierten Varianten Flu, Ag43a-EcN, Ag43b-EcN, Ag43a-536 sowie Ag43b-536 (s. Tab. 2.4). Im Gegensatz zu anderen Virulenzfaktoren, wie z. B. dem Adhäsion AIDA-I oder dem Invasin

TibA von diffus-adhärierenden bzw. enterotoxischen *Escherichia coli*, ist über die Bedeutung des strukturell verwandten Autotransporterproteins Antigen 43 nur wenig bekannt (Klemm *et al.*, 2006).

### 6.3.1. Klonierung und Expression der *agn43*-Allele

Voraussetzung für die Funktionsanalysen der Antigen 43-Varianten war deren Verfügbarkeit unter gleichbleibenden Bedingungen. Hierfür wurden die einzelnen *agn43*-Allele in die MCS des 'high copy'-Vektors pLDR11 kloniert und die generierten Plasmide in einen Fimbrien-adhäsion- sowie Antigen 43-freien Stammhintergrund transformiert. Nach Hitzeextraktion exponierter Ag43<sup>α</sup> von den Zelloberflächen und anhand von Immunoblots stellte sich jedoch heraus, daß die verschiedenen Varianten unterschiedlich stark im *Escherichia coli* K-12-Stamm MG1655  $\Delta fim \Delta flu$  exprimiert werden (s. 5.3.1.). Die Isolierung der entsprechenden  $\alpha$ -Domänen ergab eine bis zu fünffache Differenz in der Proteinmenge untereinander. Mit hoher Wahrscheinlichkeit sind die unterschiedlichen Proteinkonzentrationen auf ungleiche Transkriptionsraten zurückzuführen, zumal die klonierten Gene auch den *agn43*-eigenen, phasenvariablen Promotor kodieren, der unter dem regulatorischen Einfluß von Dam und OxyR steht (Haagmans & van der Woude, 2000). Möglicherweise spielen hierbei auch Abweichungen (Mutationen) in der jeweiligen Promotorsequenz während der Transkription, die Stabilität der mRNA oder die Prozessierung des reifen Proteins eine Rolle (Roche *et al.*, 2001). Aufgrund des Vorhandenseins von je zwei *agn43*-Allelen bei den *E. coli*-Stämmen Nissle 1917 und 536 ist generell davon auszugehen, daß orthologe Gene zwar auf gleiche Weise reguliert unter Umständen jedoch unterschiedlich exprimiert werden (Knippers, 2006). Demzufolge könnte die Transkription dieser klonierten *agn43*-Varianten im gleichen Verhältnis wie bei einer Expression im Wildtypstamm entsprechen.

Obwohl das gewählte Expressionssystem seine Einschränkung in der untereinander variierenden Kopienzahl von synthetisiertem Antigen 43 erfährt, eignete es sich dennoch zur verstärkten und konstitutiven Expression aller Ag43-Varianten. Hinsichtlich der vergleichenden Funktionsanalysen wären somit die auf der bakteriellen Zelloberfläche präsentierten Proteinmengen zu berücksichtigen.

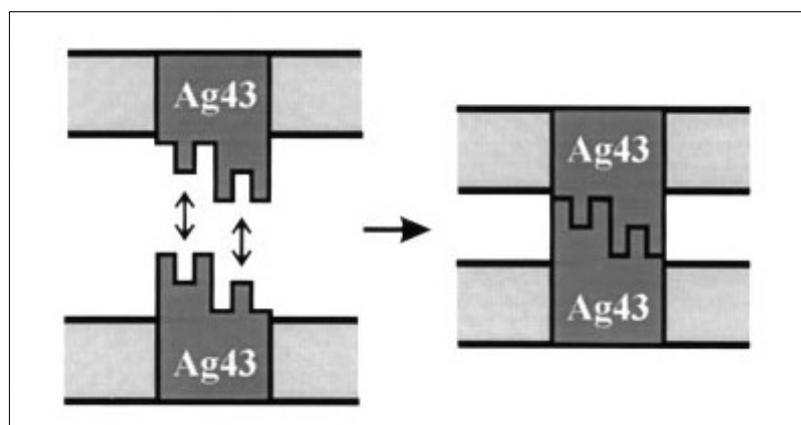
Im Gegensatz zu Flu in *Escherichia coli* K-12 werden beide Antigen 43-Orthologe der *Escherichia coli*-Stämme Nissle 1917 und 536 posttranslational glykosyliert (Reidl *et al.*, 2009), die dafür verantwortliche Heptosyltransferase konnte bislang noch nicht identifiziert werden (Sherlock *et al.*, 2006). Um eine heterologe O-Glykosylierung des Ag43 im Stammhintergrund *E. coli* MG1655  $\Delta fim \Delta flu$  zu erreichen, wurde die AIDA-I-spezifische Heptosyltransferase Aah koexprimiert (s. 5.3.1.). Dadurch war es ebenfalls möglich, die Antigen 43-

Varianten unter Einfluß ihres Glykosylierungsstatus' funktional zu charakterisieren.

Wie sich jedoch herausstellte, werden die  $\alpha$ -Domänen der verschiedenen Ag43-Varianten mit einer ungleichen Anzahl an Heptosyl-Resten modifiziert: Obwohl für den immunologischen Nachweis von Glykokonjugaten stets gleiche Proteinmengen verwendet wurden, zeigten die hitzeextrahierten Ag43<sup>a</sup>/Aah-Varianten in Glykoblots jeweils unterschiedliche Signalstärken (s. 5.3.1., Abb. 5.3 C). Die Ursachen hierfür liegen wahrscheinlich entweder in der Spezifität von Aah oder in Abweichungen in den primären Aminosäuresequenzen. Mitunter verhindert die tertiäre Faltung der  $\alpha$ -Domäne eine Übertragung von Heptosylgruppen.

### 6.3.2. Autoaggregation von *Escherichia coli* MG1655 $\Delta fim\Delta flu$

Die bakterielle Autoaggregation beschreibt die Aneinanderlagerung planktonischer Zellen, die durch ein Verklumpen in stehenden Flüssigkulturen absinken. Makroskopisch ist die Sedimentation der Bakterien anhand des damit verbundenen Aufklarens des Kulturmediums zu erkennen, mikroskopisch sind dagegen Zellaggregate (Mikrokolonien) sichtbar. Verschiedene *Escherichia coli*-Pathovaren exprimieren eine Reihe unterschiedlicher Oberflächenstrukturen, die nachweislich in der Lage sind, Autoaggregation zu vermitteln. In diesem Zusammenhang sind vor allem Curli sowie diverse Fimbrien (FimH, AAF/I, AAF/II, BFP) als autoaggregative Faktoren bekannt (Schembri *et al.*, 2001; Klemm *et al.*, 2004). Aufgrund der Vermutung, daß Antigen 43 ein selbsterkennendes Adhäsion ist, geht man davon aus, daß seine intermolekularen Interaktionen einem 'handshake'-Mechanismus gleichen (Abb. 6.1),



**Abb. 6.1: Interzelluläre Ag43-Ag43-Interaktion.** Die Exposition von Antigenen 43 auf der äußeren Zellmembran führt nach dem 'handshake'-Prinzip zu intermolekularen Wechselwirkungen mit anderen Bakterien, die ebenfalls Ag43 exprimieren (Kjærsgaard *et al.*, 2000).

und es somit an der Ausprägung des autoaggregativen Phänotyps beteiligt ist (Kjærsgaard *et al.*, 2000).

Die in Abschnitt 5.3.2. durchgeführten Versuchsreihen bestätigten eindeutig die Antigen 43-vermittelte Autoaggregation, wie sie auch schon für *flu*-positive *Escherichia coli* K-12-Stämme beschrieben wurde (Diderichsen, 1980). Obwohl die Expression der jeweiligen Ag43-Varianten eine Aneinanderlagerung und Sedimentation von *E. coli* MG1655  $\Delta fim\Delta flu$  hervorrief, lief die Reaktion in unterschiedlicher Geschwindigkeit ab. Darüber hinaus führte die heterologe O-Glykosylierung bei Ag43b-EcN, Ag43a-536 sowie Ag43b-536 zu einer deutlichen Verlangsamung dieses phänotypischen Effekts.

So stellt sich die Frage, ob das unterschiedliche Aggregationsverhalten der einzelnen Antigen 43-Varianten auf eventuell ungleiche Transkriptionsraten zurückzuführen oder vielmehr als qualitative Eigenschaft für jedes Ag43 individuell zu bewerten ist (Tab. 6.2). Hinzukommt, daß die Glykosylierung von Antigen 43 negative Auswirkungen auf die Autoaggregation hat und damit einer möglichen Biofilmbildung Ag43-exprimierender *Escherichia coli* entgegenwirkt. Die Modifizierung des Antigen 43 mit zusätzlichen Heptosylgruppen könnte nicht nur die räumliche Distanz zwischen komplementären Antigen 43-Molekülen vergrößern sondern auch durch Maskierung an der Interaktion beteiligter Aminosäuren die intermolekularen Ag43-Ag43-Wechselwirkungen abschwächen oder gar inhibieren.

Im Gegensatz zum Adhäsin AIDA-I, für dessen biologische Funktion die Expression der Heptosyltransferase Aah essentiell ist (Laarmann & Schmidt, 2003; Sherlock *et al.*, 2004), hat die Glykosylierung des Antigen 43 für die Autoaggregation somit keine Bedeutung.

**Tabelle 6.2** Grad der Ag43-vermittelten Autoaggregation von *E. coli* MG1655  $\Delta fim\Delta flu$  während 24 Stunden im Vergleich zur AIDA-I-Positivkontrolle

	AIDA-I	Flu	Ag43a-EcN	Ag43b-EcN	Ag43a-536	Ag43b-536
nicht-glykosyliert	n.d.	++	+	+	++	++
O-glykosyliert	++	++	+	-	+	+

Starke (++) , schwache (+) , keine (-) Autoaggregation.

### 6.3.3. Antigen 43-vermittelte Adhäsion von *Escherichia coli* MG1655 $\Delta fim\Delta flu$ an eukaryontische Zellen

Der initiale Schritt zur Etablierung einer Infektion ist die Anhaftung von Mikroorganismen auf epithelialen Oberflächen (Hahn *et al.*, 2004). So konnte bereits für die Autotransporterproteine AIDA-I und TibA die Adhäsion enteropathogener bzw. enterotoxischer *Escherichia coli*

an unterschiedliche Epithelzellen des Intestinaltrakts nachgewiesen werden (Lindenthal & Elsinghorst, 2001; Laarmann & Schmidt, 2003). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des Antigen 43 ist unter 5.3.3. seine Eigenschaft als Adhäsine auf ähnliche Weise untersucht worden. Hierfür wurden verschiedene, eukaryontische Zelllinien mit nichtinvasiven *E. coli* MG1655  $\Delta fim\Delta flu$ , die jeweils eine der fünf Ag43-Varianten exprimieren, kokultiviert.

Die quantitative Auswertung adhärenter Bakterien ergab ein uneinheitliches Bild bezüglich des Bindungsvermögens von *E. coli* K-12-Stamm MG1655  $\Delta fim\Delta flu$ . Teilweise führte die Expression von unterschiedlichen Antigen 43-Varianten zu einer wesentlich verbesserten, stark abgeschwächten oder gar unveränderten Bindungseigenschaft des Teststammes. Zudem hatte bei 48 % der Experimente die *O*-Glykosylierung signifikanten Einfluß auf die Ag43-vermittelte Adhäsion von *E. coli* MG1655  $\Delta fim\Delta flu$  an eukaryontische Zellen (s. Abb. 5.6). Abgesehen von einer Ausnahme (Ag43b-EcN x T24) führte die Koexpression von Aah zu teilweise drastisch – etwa um den Faktor 10 – verringerten Bindungskapazitäten von Antigen 43. Interessanterweise war die Variante Flu davon stets ausgenommen. Möglicherweise bedingen die strukturellen Unterschiede in der  $\alpha$ -Domäne einzelner Ag43-Varianten nicht nur deren Glykosylierungsstatus sondern auch deren Affinität eukaryontischen Membranstrukturen gegenüber. Demzufolge wirken sich auch hier die übertragenen Heptosyl-Reste durch zusätzliche Abschirmung von an der Interaktion beteiligter Aminosäuren negativ auf die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen Ag43 <sup>$\alpha$</sup>  und putativen Rezeptormolekülen aus. Ungeachtet dessen konnten die Angaben von Owen *et al.* (1996) bestätigt werden, die ebenfalls eine schwach adhäsive Wirkung des Antigen 43 an epitheliale Zervixkarzinomzellen (HEp-2) beobachteten.

Da die hier verwendeten Epithelzelllinien unterschiedlicher Herkunft sind, ist davon auszugehen, daß sie neben einer Reihe identischer, Oberflächen-assoziierten Membranstrukturen auch gewebsspezifische Markermoleküle präsentieren, die als extrazelluläre Rezeptoren – mitunter in ungleicher Anzahl – für die Bindung von Antigen 43 bedeutsam sein könnten. In diesem Zusammenhang sollte auch die Vitalität und Integrität der Makrophagen nicht außer acht gelassen werden, denn nur so lassen sich die stark voneinander abweichenden und dennoch hohen Bindungskapazitäten der Ag43-Varianten erklären (s. Abb. 5.6). Demzufolge erschweren unvollständig charakterisierte Zelllinien und intrazellulär überlebende Bakterien in den Leukozyten die Auswertung der Experimente.

Ein weiterer Aspekt, unter dem die Zelladhäsionstests zu betrachten sind, ist die Transkription der verschiedenen *agn43*-Allele unter Einfluß ihres natürlichen, phasenvariablen Promotors. Obwohl für das gewählte Expressionssystem eine verstärkte Proteinsynthese nachgewiesen wurde (s. 5.3.1.), ließe sich womöglich unter konstitutiver *agn43*-Expression die biologisch relevante Bedeutung des Antigen 43 als Adhäsine genauer untersuchen. Hierzu müßte jedoch die Transkription der *agn43*-Varianten unter der Kontrolle eines induzierbaren

Promotors stehen. Darüber hinaus sollte dann auch sichergestellt sein, daß Ag43 jeweils in vergleichbaren Mengen auf der bakteriellen Zelloberfläche exponiert wird. Auf den direkten Vergleich der einzelnen Ag43-Varianten in ihrem nicht-glykosylierten und glykosylierten Zustand hat die unterschiedliche Expression der verschiedenen Varianten jedoch keinen Einfluß. In weiterführenden Versuchen wären ebenfalls auf Zellkultur basierende Bindungsstudien sowie Competitionstests mit definierten Mengen an aufgereinigtem Protein Antigen 43 vorstellbar.

Anhand der Ergebnisse aus diesen Versuchsreihen ließ sich für Antigen 43 die Funktion eines schwachen Adhäsins ableiten. Die Eigenschaft von Ag43, an eukaryontische Membranstrukturen (Rezeptoren) zu binden, ist verglichen mit der Negativkontrolle bis zu zehnmal besser. Im Vergleich zu AIDA-I (Positivkontrolle) ist die Bindungskapazität des Antigen 43 jedoch um mindestens zwei Zehnerpotenzen reduziert. Für jede einzeln getestete Ag43-Variante existieren Unterschiede bezüglich ihrer Affinität und Bindungsqualität epithelialen Zellen gegenüber. Insofern die Aah-vermittelte *O*-Glykosylierung einen signifikanten Einfluß hatte, wirkte sie sich allenfalls negativ auf die Bindungskapazität der Antigen 43-Varianten aus. Lediglich bei IHKE-Zellen zeichnete sich eine deutliche Zunahme der bakteriellen Adhäsion durch Expression von nicht-glykosyliertem und teilweise auch glykosyliertem Ag43 ab. Demzufolge kann hier von einer Zelllinien-spezifisch verbesserten Interaktion ausgegangen werden.

#### **6.3.4. Die Bedeutung des Antigen 43 als autoaggregativer Faktor und als Adhäsın**

Sowohl für die mikrobielle Besiedlung eines Habitats als auch bei der Etablierung von Biofilmen sind aggregative Faktoren und Adhäsine von zentraler Bedeutung. Sie vermitteln nicht nur die Haftung von Bakterien an (anorganische) Substratoberflächen sondern auch deren Bindung an andere Zellen (Hacker & Heesemann, 2000; Hahn *et al.*, 2004).

In der Literatur wurde bereits mehrfach beschrieben, daß die Expression von Antigen 43 zu einer verstärkten Biofilmbildung führt (O'Toole *et al.*, 2000; Schembri & Klemm, 2001; Reisner *et al.*, 2003). Demzufolge ist Ag43 – wenn auch nur mit vergleichsweise schwacher Affinität – an der Ausprägung interzellulärer Interaktionen beteiligt. Die durch Antigen 43 verursachten Biofilmstrukturen gehen allerdings nicht über das Stadium der Mikrokoloniebildung hinaus, komplexe, dreidimensionale Strukturen werden kaum ausgebildet (Danese *et al.*, 2000; Kjærsgaard *et al.*, 2000).

Intermolekulare Wechselwirkungen von Autoporterproteinen führen zu viel engeren Zellkontakten, als sie von polymeren Strukturen wie z. B. Fimbrien, die weit über die Zellober-

fläche herausragen, hervorgerufen werden. Die interagierende  $\alpha$ -Untereinheit des Antigen 43 reicht dagegen nur 10 nm in die extrazelluläre Matrix hinein (Klemm *et al.*, 2004).

Die Ag43-vermittelte Autoaggregation von Bakterien geht zwangsläufig mit dem Verlust der Motilität einher (Ulett *et al.*, 2006). Gleichzeitig werden jedoch größere Zellkomplexe vor dem Ausschwemmen und anderen, äußeren Umwelteinflüssen bewahrt. Grundvoraussetzung für das Auslösen einer Infektion ist zudem die erforderliche Mindestanzahl (ID) an pathogenen Mikroorganismen. Somit können (übertragene) Erreger ihre Infektiosität in Form von Zellaggregaten erhöhen.

Möglicherweise wird Antigen 43 während eines späteren Infektionsstadiums eine weitere Bedeutung als Adhäsion zuteil. Die menschlichen Schleimhäute sezernieren als Schutz vor extrazellulären Erregern Fimbrien-spezifische IgA-Moleküle (Hahn *et al.*, 2004). Demzufolge ließe sich durch Expression von Ag43 eine gegen Pili gerichtete, humorale Immunabwehr umgehen und zugleich die Kolonisierung des Wirtes voranschreiten.

#### **6.4. Identifizierung eukaryontischer Interaktionspartner von Antigen 43**

##### **6.4.1. Interaktion des Antigen 43 mit epithelialen Membranproteinen in 'overlay assays'**

Die unter 5.4.1. durchgeführten 'overlay assays' bestätigten die Bindung des Antigen 43 an extrazelluläre Membranstrukturen eukaryontischer Zellen. Hierfür waren aufgetrennte und auf Nitrocellulose-Filter fixierte Fraktionen epithelialer Zellmembranen mit Ag43-exprimierenden *Escherichia coli* MG1655  $\Delta fim \Delta flu$  oder mit aufgereinigtem Ag43<sup>α</sup> überschichtet worden. Interessanterweise zeichnete sich bei allen Antigen 43-Varianten in Kombination mit jeder Epithelzelllinie ein identisches Bindungsmuster an distinkte Proteinbanden ab. Mit Hilfe massenspektroskopischer Analysen konnten putative Kandidaten als Rezeptoren für Ag43 identifiziert werden. Die im Anschluß daran durchgeführten Affinitätschromatographischen Proteintrennungen ließen jedoch keine weitere Eingrenzung potentieller Interaktionspartner zu.

Die Auswertung der MS-Analysen deutete auf Peptide von diversen Keratin-Untereinheiten, Laminin A, p137, Catenin sowie Coronin hin.  $\alpha$ -Keratine (Cytokeratine) werden verstärkt in Epithelgeweben bei Vertebraten synthetisiert und sind unter anderem als Intermediärfilamente an der Ausbildung des Cytoskeletts eukaryontischer Zellen beteiligt (Mehlhorn, 1995). Laminine gehören zur Gruppe der Glykoproteine und sind typischer Bestandteil der extrazellulären Matrix (ECM). Sie kommen in allen Basallaminae vor und weisen Bindungsstellen für Zelloberflächenrezeptoren auf (Wewer *et al.*, 1983; Spessotto *et al.*,

2001). GPI-verankertes p137 ist ebenfalls ein membranständiges Protein, das an der bidirektionalen Transcytose in Epithelzellen beteiligt ist (Ellis & Luzio, 1995). Für Catenin wurde die Funktion eines Ankerproteins beschrieben, das Zelladhäsionsmoleküle mit dem Cytoskelett verbindet. Solche Adhäsionsverbindungen (*Adherens Junctions*) stellen den engen Kontakt zwischen angrenzenden Epithelzellen her (Alberts *et al.*, 2002). Coronin ist ein multifunktionales, regulatorisches Protein, welches ebenfalls mit dem Cytoskelett assoziiert und darüber hinaus am sekretorischen Vesikeltransport des Golgi-Apparates beteiligt ist (Rybakin & Clemen, 2005).

Darüber hinaus isolierten Fang *et al.* (2008) auf ähnliche Weise wie hier dargestellt putative Rezeptormoleküle für das Autotransporterprotein und Adhäsin AIDA-I: Mit Hilfe von *in vitro*-Adhäsionstests ('*Overlay Western Blots*', ELISAs) und Affinitätschromatographischen Aufreinigerungsverfahren identifizierten sie in der intestinalen Schleimschicht von neonatalen Ferkeln zwei Proteine, die mit hoher Affinität spezifisch mit AIDA-I interagieren. Beide Komponenten, p65 ( $m=65$  kDa) und p120 ( $m=120$  kDa, IgG Fc-Bindeprotein), werden im Mucus von Becherzellen (Zottenepithel) sezerniert und begünstigen offenbar die Kolonisation von *aidA*-exprimierenden enteropathogenen *Escherichia coli*. Ebenso identifizierten Laarmann & Schmidt (2003) ein 119 kDa integrales, Membran-assoziiertes Glykoprotein (gp119) auf HeLa-Zellen, welches als Rezeptor (AIDAR) für AIDA-I dient.

Interessanterweise zeigen die von Fang *et al.* (2008) durchgeführten massenspektroskopischen Analysen auch die Bedeutung verschiedener Cytokeratine als mögliche Rezeptoren für AIDA-I auf. Somit stellen die in der vorliegenden Arbeit identifizierten eukaryontischen, Membran-/Oberflächen-assoziierten Proteine – einschließlich  $\alpha$ -Keratin – durchaus potentielle Kandidaten eines Antigen 43-spezifischen Rezeptors dar. Nachfolgende Bindungsstudien konzentrierten sich jedoch auf die Komponenten der extrazellulären Matrix.

#### **6.4.2. Antigen 43-vermittelte Adhäsion von *Escherichia coli* MG1655 $\Delta fim \Delta flu$ an extrazelluläre Matrixproteine**

Zusätzlich zur Bindung an Fraktionen eukaryontischer Zellmembranen wurde die Ag43-vermittelte Adhäsion von *Escherichia coli* MG1655  $\Delta fim \Delta flu$  an einzelne Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) untersucht. In enzymgekoppelten Immunadsorptionstests (ELISA) konnte gezeigt werden, daß alle Antigen 43-Varianten über die Bindungskapazität an verschiedene Kollagen-Typen – vorrangig Kollagen I – verfügen (s. 5.4.2.). Darüber hinaus wurden die Ergebnisse der '*overlay assays*' dahingehend bestätigt, daß Ag43 auch mit Laminin interagiert (s. 5.4.1.). Die Affinität der einzelnen Autotransporter-Varianten war gegenüber den getesteten ECM-Proteinen jedoch unterschiedlich und von einer vermeintlich

individuellen Spezifität geprägt.

Die quantitative Auswertung der ELISA ergab, daß Antigen 43 im Gegensatz zum *Yersinia*-Adhäsion A (YadA; Positivkontrolle) ein vergleichsweise schwaches Adhäsion ist: YadA adhärierte mindestens dreimal effektiver an Proteine der extrazellulären Matrix als Ag43. Das Ag43a des UPEC-Stammes 536 wies von allen getesteten Varianten die geringsten und Flu die höchsten Bindungskapazitäten auf. Entgegen der Beobachtungen in Zelladhäsionstests (s. 5.3.3.) führte die Aah-vermittelte O-Glykosylierung von Antigen 43 überwiegend zu einer deutlichen Verbesserung seines Bindungsvermögens an die ECM-Proteine, nur die Variante Ag43b-536 war davon stets ausgenommen. Generell war die Glykosylierung von Antigen 43 für dessen Adhäsion an Matrixproteine jedoch nicht erforderlich.

Für die Testreihen waren hochaufgereinigte Kollagene verschiedener Spezies- und Gewebeherkunft verwendet worden. So sind die Unterschiede im Bindungsverhalten der Antigen 43-Varianten an Kollagen möglicherweise auf Organismus- bzw. Organ-spezifische Differenzen zurückzuführen. Die Ergebnisse für Matrigel™ wurden bei der Auswertung der ELISA-Tests nicht berücksichtigt. Der Vorteil bei Verwendung einer solchen artifiziellen Gelmatrix besteht zwar in der definierten Zusammensetzung diverser ECM-Proteine, als Nachteil könnte sich jedoch die heterogene Verteilung der unterschiedlichen Komponenten erweisen. Aus diesem Grund sind verlässliche Ergebnisse nur schwer zu reproduzieren.

Mit Hilfe von enzymgekoppelten Immunadsorptionstests wurde somit für das *Escherichia coli*-Autotransporterprotein Antigen 43 zum ersten Mal gezeigt, daß es an eukaryontische Komponenten (Rezeptoren) der extrazellulären Matrix adhäriert. Die Bindung an Kollagen und Laminin erfolgte unabhängig vom Glykosylierungsstatus des Ag43. Es bleibt jedoch offen, ob es sich bei den Interaktionen mit Laminin und Kollagen um reine Protein-Protein-Wechselwirkungen oder um eine Bindung an die Kohlenhydratseitenketten der Glykoproteine handelt. Da beide Komponenten hauptsächlich in Epithelien und Basalmembranen vorkommen (Ayad *et al.*, 1998), ist die Antigen 43-vermittelte Adhäsion von *Escherichia coli* an diese ECM-Proteine vermutlich ein bedeutender Faktor bei der Kolonisierung epithelialer Gewebe.

In weiterführenden Versuchen könnten die Bindungseigenschaften der einzelnen Ag43-Varianten in Dosis-abhängigen sowie in kompetitiven ELISAs (*'competition assays'*) näher charakterisiert werden. Darüber hinaus ließe sich das in dieser Arbeit etablierte System zur Untersuchung von Interaktionspartnern auch auf andere immunologische oder Antigen-quantifizierende Bindungstests übertragen.

## 6.5. Immunogenität von Antigen 43

In der Regel weisen Proteine aufgrund ihrer Größe ( $m \geq 5$  kDa) und der komplexen Struktur eine hohe Immunogenität auf (Janeway & Travers, 1997). Daß rekombinantes Antigen 43<sup>α</sup> mit einem Molekulargewicht von  $\approx 58$  kDa eine humorale Immunantwort hervorruft, zeigte sich unter anderem bei der Generierung von Ag43a-536<sup>α</sup>-spezifischen Antikörpern (s. 4.18.). Ob jedoch auch natives, an der Zelloberfläche von *Escherichia coli* exponiertes Ag43<sup>α</sup> in der Lage ist, ein Immunogen darzustellen, wurde in Abschnitt 5.5. untersucht. Hierbei stellte sich die Frage, ob Antigen 43<sup>α</sup> trotz einer vermeintlichen, physikalischen Abschirmung durch andere Oberflächen-assoziierte Strukturen (Fimbrien, Flagellen) am Auslösen einer Immunreaktion bei der Infektion mit uropathogenen *E. coli* beteiligt sein könnte. Wie bereits in 'autoaggregation assays' (s. 5.3.2.) und Zelladhäsionstests (s. 5.3.3.) gezeigt wurde, interagieren Ag43-exprimierende Bakterien über intermolekulare Wechselwirkungen mit anderen Zellen. Somit ließe sich durch Freisetzung Antigen 43-spezifischer Immunglobuline oder durch eine Immunisierung die Kolonisierung des Wirtes mit pathogenen *Escherichia coli* verhindern.

In diesem Zusammenhang wurde das Serum von hospitalisierten Patienten, die an einer UPEC-assoziierten Harnwegsinfektion litten, auf das Vorhandensein Antigen 43<sup>α</sup>-spezifischer Antikörper in *Western Blots* analysiert (s. 5.5.). Wie sich herausstellte, konnten in allen Patientenserumproben gegen Ag43<sup>α</sup> gerichtete, kreuzreaktive Immunglobuline nachgewiesen werden.

In Anbetracht der Tatsache, daß die meisten *Escherichia coli* – sowohl apathogene (kommensale) als auch pathogene Stämme – Antigen 43 exprimieren, sind die detektierten Antikörper wahrscheinlich eher auf in der natürlichen Darmflora vorkommende *E. coli* als auf eine Infektion mit UPEC zurückzuführen. Des Weiteren kann nicht ausgeschlossen werden, ob die spezifischen Immunglobuline bereits aus einer eventuell vorherigen (asymptomatischen) Harnwegsinfektion hervorgingen. Da eine nachträgliche Titerbestimmung vor bzw. während des Infektionsverlaufs nicht mehr möglich ist, läßt die Konzentration Ag43-spezifischer Antikörper weder auf eine (frühere) humorale Abwehrreaktion gegen UPEC noch auf die *Toleranz* gegenüber kommensalen, *agn43*-positiven *Escherichia coli* schließen.

Die Detektion Ag43-spezifischer Immunglobuline im *Western Blot* beruhte außerdem auf der Verwendung F(ab')<sub>2</sub>-Fragment-erkennender IgG, die nicht zwischen den C<sub>H</sub>1-Domänen der einzelnen Immunglobulin-Isotypen unterscheiden können. Eine für den Infektionsverlauf relevante Differenzierung zwischen IgM und IgG war somit nicht zu erreichen. Vergleichbare Studien ließen sich lediglich in einem entsprechenden Tierversuch experimentell durchführen. Als Voraussetzung für ein geeignetes Infektionsmodell wären Versuchstiere einzusetzen.

zen, die zuvor nicht von *agn43*-positiven *E. coli*-Stämmen kolonisiert wurden.

Allein das Vorhandensein kreuzreaktiver  $\alpha$ -Ag43-Antikörper im Serum der Patienten deutet jedoch darauf hin, daß Antigen 43 trotz seiner Variabilität ein Immunogen mit konservierten Epitopen darstellt.

## 6.6. Polymerisation von Antigen 43 <sup>$\alpha$</sup>

Girón und Mitarbeiter (2007) beobachteten in sterilisierten Kulturüberständen von EPEC- und EHEC-Stämmen linear polymerisierte EspC- bzw. EspP-Proteine in Form sogenannter '*E. coli* Ropes' (Tagungsbeitrag, nicht publizierte Daten). Das gleiche Phänomen konnte in einem ähnlich durchgeführten Experiment für die Autotransporterproteine Antigen 43 und AIDA-I bestätigt werden (s. 5.6.). Hierbei waren freischwebende Partikel jedoch als irregulär geformte Aggregate makroskopisch sichtbar und nicht in kettenförmiger Anordnung aneinandergelagert. Ein immunologischer Nachweis identifizierte Ag43 <sup>$\alpha$</sup>  bzw. AIDA-I <sup>$\alpha$</sup>  als Bestandteil jener Partikel. Ob Ag43 <sup>$\alpha$</sup>  und AIDA-I <sup>$\alpha$</sup>  allerdings polymerisiert oder einzeln als Monomere zusammen mit anderen Komponenten in den Aggregaten vorlagen, ließ sich unter den vorgegebenen Bedingungen methodisch nicht nachweisen.

Das Vorhandensein freier Ag43 <sup>$\alpha$</sup> - bzw. AIDA-I <sup>$\alpha$</sup> -Peptide in den Kulturüberständen der entsprechenden Stämme ist auf die modulare Struktur der Autotransporter zurückzuführen. Dadurch daß die  $\alpha$ -Untereinheit nach ihrer Translokation an die Zelloberfläche mit der Transporter-Domäne ( $\beta$ -Untereinheit) über nichtkovalente Interaktionen verbunden bleibt, lassen sich Ag43 <sup>$\alpha$</sup>  und AIDA-I <sup>$\alpha$</sup>  durch kurze Hitzebehandlung leicht isolieren (s. 5.3.1.). So ist durchaus denkbar, daß die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Domänen infolge der mechanischen Einwirkung während des Schüttelns der Bakterienkulturen ebenfalls voneinander getrennt werden. Eine anschließende Di- oder Polymerisierung von  $\alpha$ -Untereinheiten entspräche somit der phänotypischen Aggregation, wie sie bei *agn43*- bzw. *aidA*-exprimierenden Bakterien zu beobachten ist (s. 5.3.2.). Grundlage für die Polymerisation und Autoaggregation sind abermals die intermolekularen Wechselwirkungen der  $\alpha$ -Domänen untereinander.

Über die Bedeutung freigesetzter, von der Zelloberfläche abgelöster Proteinuntereinheiten während einer Infektion mit pathogenen *Escherichia coli* läßt sich nur spekulieren. Im Fall der Serinproteasen EspC oder EspP wäre vorstellbar, daß deren sezernierte  $\alpha$ -Domänen auch ohne einen direkten Kontakt mit dem wirtseigenen Epithel in der Lage sind, ihre gewebeschädigende Wirkung zu entfalten. Dahingegen könnten sezerniertes Ag43 <sup>$\alpha$</sup>  oder AIDA-I <sup>$\alpha$</sup>  vorab an eukaryontische Rezeptoren binden, um hinterher als Brückenmolekül die Adhäsion des Bakteriums über die membranständige  $\beta$ -Untereinheit zu vermitteln (Owen

*et al.*, 1996). Alternativ dazu ließen sich durch Abspaltung der  $\alpha$ -Domäne auch bereits bestehende Interaktionen wieder aufheben. In diesem Zusammenhang wäre das Herauslösen einzelner Klone oder Zellgruppen aus einem bakteriellen Biofilm denkbar, die so zu dessen Ausbreitung beitragen.

### **6.7. Differenzierung uropathogener Mikroorganismen mittels rRNA-gerichteter Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung**

*In-situ*-Hybridisierungen ermöglichen es, Nukleinsäuren nachzuweisen, genomische Sequenzbereiche physikalisch zu kartieren oder chromosomale Veränderungen darzustellen (Lottspeich & Zorbas, 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde ein auf Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) basierendes Testsystem entwickelt, das die Detektion und Identifizierung von Harnwegserregern auf Blasenkathetern erlaubt. Die Differenzierung der Mikroorganismen beruht dabei auf dem Nachweis bestimmter 16S, 23S bzw. 18S rRNA-Sequenzen mittels neun spezifischer Oligonukleotidsonden (s. 5.7.).

Der Vorteil von molekularbiologischen Untersuchungsmethoden auf rRNA-Ebene liegt eindeutig in der hohen Sensitivität. Aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens, der hohen Kopienzahl ( $10^3$ - $10^5$  Moleküle/Zelle) sowie der starken Konservierung bestimmter Sequenzabschnitte sind ribosomale RNA-Moleküle besser geeignet als DNA (Amann *et al.*, 1995). Die durch gruppenspezifische Bereiche (Signaturen) gekennzeichneten rRNA-Sonden ermöglichen zudem die phylogenetische Klassifizierung der untersuchten Harnwegserreger bis auf die Ebene der Spezies. Darüber hinaus entfällt bei der Anwendung von FISH die Anzucht und Isolierung von Mikroorganismen in Reinkulturen, was für eine schnelle Erregerdiagnostik von großem Vorteil sein kann. Daneben können zur Untersuchung von Biofilmen zeitgleich mehrere Sonden mit unterschiedlicher Spezifität und Fluoreszenzmarkierung eingesetzt werden, um die multizelluläre Zusammensetzung bakterieller Gemeinschaften zu analysieren.

Als Nachteile erwiesen sich jedoch der zeitliche Aufwand zur Präparation des Untersuchungsmaterials sowie die Handhabbarkeit der Katheterproben während der mikroskopischen Auswertung. Die Inkubationszeit für die Fixierung der Objekte mit anschließender Sonden-Hybridisierung würde in der Routinediagnostik mindestens neun Stunden in Anspruch nehmen. Dadurch daß die synthetischen Oberflächen das vom Mikroskop einfallende Licht stark reflektierten, mußte das biologische Material von den Katheterinnenseiten abgekratzt und auf Objektträger aufgebracht werden. Nur auf diese Weise ließen sich Fluoreszenz-markierte Zellen detektieren. Die optische Darstellung von bakteriellen Biofilmstrukturen war hiernach nicht mehr möglich.

Somit sind zwar die rRNA-spezifischen Oligonukleotidsonden und das vorliegende Protokoll zur Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung für den differentiellen Nachweis von (uro-)pathogenen Mikroorganismen geeignet, für die klinische Anwendung in der mikrobiologischen Labor-diagnostik fehlen jedoch validierende Testreihen und Vergleichsstudien. Aus diesem Grund sollte die FISH-Technik in Kombination mit konventionellen Methoden (biochemische, serologische, molekularbiologische Erreger-Typisierungen) angewendet bzw. ergänzt werden.

## 6.8. Biofilmbildung

Synthetische Materialien finden in der Medizintechnik immer häufigere Anwendung. Gleichzeitig steigt jedoch damit verbunden das Risiko rezidivierender oder chronischer Infektionen, zumal verabreichte bzw. implantierte Kontaktlinsen, chirurgische Wundnähte, Katheter, Peritonealdialysesysteme, künstliche Blutgefäße oder Prothesen von Bakterien in Form von Biofilmen kolonisiert werden können (Nickel & McLean, 1998; Fux *et al.*, 2005). Vor diesem Hintergrund wurde das Vermögen (uro-)pathogener Mikroorganismen untersucht, auf Harnblasenkathetern aus unterschiedlichen Materialien *in vitro* Biofilme zu bilden.

Wie sich herausstellte, dauert es maximal 72 Stunden, bis die getesteten Pathogenen sowie der Laborstamm *Escherichia coli* HB101 die Katheterproben mit einem komplexen Biofilm überziehen (s. 5.8.). Hierbei kolonisierten die Harnwegsinfekt- und Endoplastitis-assoziierten Erreger die Kunststoffmaterialien am effektivsten (<24 h). Der zu beobachtende Effekt, daß Gram-positive Bakterien einschließlich *Candida albicans* die Silikonoberfläche und die Gramnegativen im Gegensatz dazu scheinbar SILKOLATEX® bevorzugen, könnte indes auf die Ladung der Kunststoffpolymere zurückzuführen sein.

Obwohl diese Versuchsreihe lediglich die Ergebnisse eines *in vitro*-Experiments unter vereinfachten Bedingungen wiedergibt, verdeutlichte sie das Potential (nosokomialer) humanpathogener Mikroorganismen, ihre Persistenz in Form eines Biofilms zu sichern. Hinzu kommt, daß Bakterien in Biofilmen eine erhöhte Resistenz gegenüber Bakteriziden, Antibiotika und dem Immunsystem aufweisen, was aus medizinischer Sicht ein großes, klinisches Problem darstellt (Prigent-Combaret *et al.*, 2000). Darüber hinaus können von Biofilmen ausgehend Septikämien, Embolien oder erhöhte Endotoxinkonzentrationen ausgelöst werden (Donlan, 2002). Uropathogene *Escherichia coli* sind unter Umständen sogar in der Lage, intrazelluläre Biofilme (IBCs) zu bilden, um so ein stilles Reservoir im Körper für chronische Harnwegsinfektionen zu etablieren (Anderson *et al.*, 2004a; Garofalo *et al.*, 2007). Unter populationsgenetischen Gesichtspunkten bilden bakterielle Biofilme eine Gemeinschaft, die über horizontalen Gentransfer zur Verbreitung von Antibiotikaresistenzen und anderer, an der Virulenz beteiligter Faktoren beiträgt (Donlan, 2002).

Somit unterstreichen das in dieser Arbeit durchgeführte Experiment zur Biofilmbildung sowie die heutigen Erkenntnisse der modernen Medizin abermals die dringende Notwendigkeit einer adäquaten Hygiene und Nachbehandlung von Patienten, die mit medizintechnischen Produkten versorgt wurden.

### 6.9. Antigen 43 – Virulenz- oder Fitneßfaktor bei *Escherichia coli*?

Der erste und entscheidendste Schritt in der Pathogenese einer Infektion ist die Anhaftung von Mikroorganismen auf Oberflächen wie die Haut oder Schleimhäute (Hahn *et al.*, 2004). Die Kolonisation von Geweben beginnt meistens mit einer unspezifischen Aggregation der Krankheitserreger bis diese über spezifische Wechselwirkungen an distinkte, homologe Wirtszellrezeptoren adhäreren. Zu der wohl bedeutendsten Gruppe von Adhäsinen zählen Fimbrien (Pili), die es vor allem Enterobakterien ermöglichen, Epithelzellen des Intestinal- sowie Urogenitaltrakts anzuhafte. Daneben werden von unterschiedlichen *Escherichia coli*-Pathotypen eine Reihe weiterer Nicht-Fimbrienadhäsine (NFAs) exprimiert, welche als integrale oder aufgelagerte Membranproteine Adhärenz vermitteln können (Hacker & Heesemann, 2000). So konnte unter anderem die erhöhte Virulenz von EPEC- und ETEC-Stämmen auf die Expression der NFA-Proteine AIDA-I bzw. TibA zurückgeführt werden (Wells *et al.*, 2007). Aufgrund der in dieser Arbeit veranschaulichten Gemeinsamkeiten zwischen den Autotransporterproteinen AIDA-I und Ag43 hinsichtlich ihrer Struktur und Funktion ist Antigen 43 eindeutig die Bedeutung eines Autoaggregation-vermittelnden Faktors und eines Adhäsins anzuerkennen.

Dadurch daß Antigen 43 sowohl von kommensalen als auch von pathogenen *Escherichia coli*-Stämmen exprimiert wird, kann für Ag43 lediglich die Funktion eines unspezifisch wirkenden Virulenzfaktors angenommen werden, der zu einer effektiveren Kolonisierung des Wirtes beiträgt. Möglicherweise ist die Expression von Antigen 43 während eines späteren Infektionsstadiums von einer bislang unterschätzten Bedeutung. Anderson *et al.* (2003) beobachteten in diesem Zusammenhang die Bildung intrazellulärer Biofilme (IBCs) in der Harnblase von C3H/HeJ-Mäusen (TLR4<sup>-/-</sup>), die mit dem UPEC-Stamm UTI89 infiziert worden waren. IBCs könnten demzufolge die Ursache für rezidivierende oder chronische Harnwegsinfektionen sein. Fexby *et al.* (2007) demonstrierten das Überleben von Ag43-exprimierenden *Escherichia coli* in humanen Granulozyten (PMNs). Indem die phagozytierten Bakterien aggregieren, entziehen sie sich der intrazellulären Eliminierung durch lysosomale Wirkstoffe und reaktive Sauerstoff- sowie Stickstoffmetabolite. Unter diesem Aspekt sollte Antigen 43 als ein Etablin betrachtet werden, das nicht nur dazu beiträgt, die immanente Immunabwehr des Wirtes zu umgehen, sondern auch die Ausbreitung von pathogenen *E. coli* und somit die

Manifestation von (systemischen) Infektionen begünstigt.

Der in der vorliegenden Arbeit dargestellte Beitrag des Antigen 43 zur Virulenz (uro-)pathogener *Escherichia coli* veranschaulicht seine Bedeutung als Autoaggregation-vermittelnder Faktor und als Adhäsion. Aufgrund dieser funktionalen Eigenschaften ist das Autoaggregation-vermittelnde Protein Ag43 unmittelbar an der Entstehung bakterieller Biofilme beteiligt, die eine effektive Besiedlung unterschiedlicher Habitate ermöglicht. Die verschiedenen Antigen 43-Varianten der *E. coli*-Stämme K-12, Nissle 1917 und 536 (s. Tab. 2.4) zeichnen sich zwar strukturell durch individuelle Eigenschaften aus, ihre Expression geht jedoch stets mit einer erhöhten Fitness (Kolonisationsvorteil) der Bakterien einher. Die spezifische Bindung des Ag43 an eukaryontische Rezeptoren der extrazellulären Matrix gewährt einen tieferen Einblick in die komplexen Mechanismen, die zur Etablierung einer Infektion mit pathogenen *Escherichia coli* führen.

## 7. Literaturverzeichnis

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2002).** Molecular biology of the cell, 4<sup>th</sup> edition. *Taylor & Francis*, New York, USA.
- 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**(3), 223-229.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990).** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R. & Stahl, D. A. (1990).** Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* **56**(6), 1919-1925.
- Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K. H. (1995).** Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**(1), 143-169.
- Anderson, G. G., Dodson, K. W., Hooton, T. M. & Hultgren, S. J. (2004a).** Intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Trends Microbiol* **12**(9), 424-430.
- Anderson, G. G., Martin, S. M. & Hultgren, S. J. (2004b).** Host subversion by formation of intracellular bacterial communities in the urinary tract. *Microbes Infect* **6**(12), 1094-1101.
- Anderson, G. G., Palermo, J. J., Schilling, J. D., Roth, R., Heuser, J. & Hultgren, S. J. (2003).** Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science* **301**(5629), 105-107.
- Ayad, S., Boot-Hanford, R. P., Humphries, M. J., Kadler, K. E. & Shuttleworth, C. A. (1998).** The extracellular matrix (Facts Book), 2<sup>nd</sup> edition. *Academic Press Inc*, Oxford, UK.
- Barnett, B. J. & Stephens, D. S. (1997).** Urinary tract infection: an overview. *Am J Med Sci* **314**(4), 245-249.
- Beloin, C., Michaelis, K., Lindner, K., Landini, P., Hacker, J., Ghigo, J. M. & Dobrindt, U. (2006).** The transcriptional antiterminator RfaH represses biofilm formation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**(4), 1316-1331.
- Benjelloun-Touimi, Z., Sansonetti, P. J. & Parsot, C. (1995).** SepA, the major extracellular protein of *Shigella flexneri*: autonomous secretion and involvement in tissue invasion.

- Mol Microbiol* **17**(1), 123-135.
- Benz, I. & Schmidt, M. A. (1989).** Cloning and expression of an Adhesin (AIDA-I) Involved in Diffuse Adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **57**(5), 1506-1511.
- Benz, I. & Schmidt, M. A. (1992).** AIDA-I, the adhesin involved in diffuse adherence of the diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule. *Mol Microbiol* **6**(11), 1539-1546.
- Benz, I. & Schmidt, M. A. (2001).** Glycosylation with heptose residues mediated by the *aah* gene product is essential for adherence of the AIDA-I adhesin. *Mol Microbiol* **40**(6), 1403-1413.
- 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.
- Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. & Shao, Y. (1997).** The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**, 1453-1474.
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L. & Boyer, H. W. (1977).** Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**(2), 95-113.
- Bornstein, P. & Traub, W. (1979).** *The Proteins* **4**, 411-605.
- Boyer, H. W. & Roulland-Dussoix, D. (1969).** A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **41**(3), 459-472.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Caffrey, P. & Owen, P. (1989).** Purification and *N*-terminal sequence of the  $\alpha$  subunit of antigen 43, a unique protein complex associated with the outer membrane of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **171**(7), 3634-3640.
- Chang, A. C. & Cohen, S. N. (1978).** Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* **134**(3), 1141-1156.
- Charbonneau, M.-È., Girard, V., Nikolakakis, A., Campos, M., Berthiaume, F., Dumas, F., Lépine, F. & Mourez, M. (2007).** *O*-linked glycosylation ensures the normal conformation of the autotransporter Adhesion Involved in Diffuse Adherence. *J Bacteriol* **189**(24), 8880-8889.

- Correnti, J., Munster, V., Chan, T. & Woude, M. (2002).** Dam-dependent phase variation of Ag43 in *Escherichia coli* is altered in a *seqA* mutant. *Mol Microbiol* **44**(2), 521-532.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. & Lappin-Scott, H. M. (1995).** Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49**, 711-745.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999).** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**(5418), 1318-1322.
- Danese, P. N., Pratt, L. A., Dove, S. L. & Kolter, R. (2000).** The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol* **37**(2), 424-432.
- Davey, M. E. & O'Toole, G. A. (2000).** Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(4), 847-867.
- Diderichsen, B. (1980).** *flu*, a metastable gene controlling surface properties of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **141**(2), 858-867.
- Diederich, L., Rasmussen, L. J. & Messer, W. (1992).** New cloning vectors for integration into the  $\lambda$  attachment site *attB* of the *Escherichia coli* chromosome. *Plasmid* **28**, 14-24.
- Dobos, K. M., Swiderek, K., Khoo, K. H., Brennan, P. J. & Belisle, J. T. (1995).** Evidence for glycosylation sites on the 45-kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **63**(8), 2846-2853.
- Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Nagy, G., Schneider, G., Johann, A., Gottschalk, G. & Hacker, J. (2002).** Genetic structure and distribution of four pathogenicity islands (PAI I<sub>536</sub> to PAI IV<sub>536</sub>) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect Immun* **70**(11), 6365-6372.
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U. & Hacker, J. (2004).** Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **2**(5), 414-424.
- Doig, P., Kinsella, N., Guerry, P. & Trust, T. J. (1996).** Characterization of a post-translational modification of *Campylobacter* flagellin: identification of a sero-specific glycosyl moiety. *Mol Microbiol* **19**(2), 379-387.
- Donlan, R. M. (2002).** Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* **8**(9), 881-890.
- Donlan, R. M. & Costerton, J. W. (2002).** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* **15**(2), 167-193.
- Dozois, C. M., Dho-Moulin, M., Brée, A., Fairbrother, J. M., Desautels, C. & Curtiss, R. III (2000).** Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infect Immun* **68**(7), 4145-4154.

- Ellis, J. A. & Luzio, J. P. (1995).** Identification and characterization of a novel protein (p137) which transcytoses bidirectionally in Caco-2 cells. *J Biol Chem* **270**(35), 20717-20723.
- Elsinghorst, E. A. & Weitz, J. A. (1994).** Epithelial cell invasion and adherence directed by the enterotoxigenic *Escherichia coli* *tib* locus is associated with a 104-Kilodalton outer membrane protein. *Infect Immun* **62**(8), 3463-3471.
- Erickson, P. R. & Herzberg, M. C. (1993).** Evidence for the covalent linkage of carbohydrate polymers to a glycoprotein from *Streptococcus sanguis*. *J Biol Chem* **268**(32), 23780-23783.
- Fang, Y., Ngeleka, M., Middleton, D. M. & Simko, E. (2008).** Isolation and identification of AIDA-I receptors in porcine intestinal mucus. *Vet Microbiol* **126**(4), 345-355.
- Fexby, S., Bjarnsholt, T., Jensen, P. Ø., Roos, V., Høiby, N., Givskov, M. & Klemm, P. (2007).** Biological Trojan horse: antigen 43 provides specific bacterial uptake and survival in human neutrophils. *Infect Immun* **75**(1), 30-34.
- Fux, C. A., Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Stoodley, P. (2005).** Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* **13**(1), 34-40.
- Gabig, M., Herman-Antosiewicz, A., Kwiatkowska, M., Los, M., Thomas, M. S. & Węgrzyn, G. (2002).** The cell surface protein Ag43 facilitates phage infection of *Escherichia coli* in the presence of bile salts and carbohydrates. *Microbiol* **148**(5), 1533-1542.
- Garofalo, C. K., Hooton, T. M., Martin, S. M., Stamm, W. E., Palermo, J. J., Gordon, J. I. & Hultgren, S. J. (2007).** *Escherichia coli* from urine of female patients with urinary tract infections is competent for intracellular bacterial community formation. *Infect Immun* **75**(1), 52-60.
- Gerok, W., Huber, C., Meinertz, T. & Zeidler, H. (2007).** Die innere Medizin, 11. Auflage. Schattauer GmbH, Stuttgart.
- Gill, S. R., Fouts, D. E., Archer, G. L., Mongodin, E. F., Deboy, R. T., Ravel, J., Paulsen, I. T., Kolonay, J. F., Brinkac, L., Beanan, M., Dodson, R. J., Daugherty, S. C., Madupu, R., Angiuoli, S. V., Durkin, A. S., Haft, D. H., Vamathevan, J., Khouri, H., Utterback, T., Lee, C., Dimitrov, G., Jiang, L., Qin, H., Weidman, J., Tran, K., Kang, K., Hance, I. R., Nelson, K. E. & Fraser, C. M. (2005).** Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J Bacteriol* **187**(7), 2426-2438.
- Gillum, A. M., Tsay, E. Y. & Kirsch, D. R. (1984).** Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* **198**(1), 179-182.

- Girón, J. A., Xicohtencatl, J., Puente, J. L. & Monteiro-Neto, V. (2007).** Tagungsbeitrag: *E. coli* ropes. *EMBO-FEMS-LEOPOLDINA Symposium "Escherichia coli – Facets of a Versatile Pathogen"*, 09.-12. Oktober 2007, Bildungszentrum Kloster Banz, Bad Staffelstein.
- Gophna, U., Oelschlaeger, T. A., Hacker, J. & Ron, E. Z. (2002).** Role of fibronectin in curli-mediated internalization. *FEMS Microbiol Lett* **212**(1), 55-58.
- Grozdanov, L., Raasch, C., Schulze, J., Sonnenborn, U., Gottschalk, G., Hacker, J. & Dobrindt, U. (2004).** Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J Bacteriol* **186**(16), 5432-5441.
- Haagmans, W. & van der Woude, M. (2000).** Phase variation of Ag43 in *Escherichia coli*: Dam-dependent methylation abrogates OxyR binding and OxyR-mediated repression of transcription. *Mol Microbiol* **35**(4), 877-887.
- Hacker, J. & Heesemann, J. (2000).** Molekulare Infektionsbiologie. *Spektrum, Akademischer Verlag GmbH*, Heidelberg.
- Hacker, J. & Kaper, J. B. (2000).** Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* **54**, 641-679.
- Hacker, J., Ott, M., Blum, G., Marre, R., Heesemann, J., Tschäpe, H. & Goebel, W. (1992).** Genetics of *Escherichia coli* uropathogenicity: analysis of the O6:K15:H31 isolate 536. *Zentralbl Bakteriologie* **276**(2), 165-175.
- Hahn, H., Falke, D., Kaufmann, S. H. E. & Ullmann, U. (2004).** Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, 5. Auflage. *Springer-Verlag*, Heidelberg.
- Hautmann, R. & Huland, H. (2006).** Urologie, 3. Auflage. *Springer-Verlag*, Berlin.
- Heise, T. & Dersch, P. (2006).** Identification of a domain in *Yersinia* virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**(9), 3375-3380.
- Henderson, I. R., Meehan, M. & Owen, P. (1997).** Antigen 43, a phase-variable bipartite outer membrane protein, determines colony morphology and autoaggregation in *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol Lett* **149**(1), 115-120.
- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F. & Nataro, J. P. (1998).** The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol* **6**(9), 370-378.
- Henderson, I. R. & Nataro, J. P. (2001).** Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun* **69**(3), 1231-1243.
- Henderson, I. R. & Owen, P. (1999).** The major phase-variable outer membrane protein of *Escherichia coli* structurally resembles the immunoglobulin A1 protease class of exported protein and is regulated by a novel mechanism involving Dam and OxyR. *J Bacteriol* **181**(7), 2132-2141.

- Henderson, I. R., Owen, P. & Nataro, J. P. (1999).** Molecular switches – the ON and OFF of bacterial phase variation. *Mol Microbiol* **33**(5), 919-932.
- Hennig, W. (1998).** Genetik, 2. Auflage. Springer-Verlag, Berlin.
- Hochhut, B., Dobrindt, U. & Hacker, J. (2005).** Pathogenicity islands and their role in bacterial virulence and survival. *Contrib Microbiol* **12**, 234-254.
- Hogardt, M., Trebesius, K., Geiger, A. M., Hornef, M., Rosenecker, J. & Heesemann, J. (2000).** Specific and rapid detection by fluorescent *in situ* hybridization of bacteria in clinical samples obtained from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* **38**(2), 818-825.
- Jacob, A. E. & Hobbs, S. J. (1974).** Conjugal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*. *J Bacteriol* **117**(2), 360-372.
- Janeway, C. A. & Travers, P. (1997).** Immunologie, 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
- Justice, S. S., Hung, C., Theriot, J. A., Fletcher, D. A., Anderson, G. G., Footer, M. J. & Hultgren, S. J. (2004).** Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**(5), 1333-1338.
- Kajava, A. V., Cheng, N., Cleaver, R., Kessel, M., Simon, M. N., Willery, E., Jacob-Dubuisson, F., Locht, C. & Steven, A. C. (2001).** Beta-helix model for the filamentous haemagglutinin adhesion of *Bordetella pertussis* and related bacterial secretory proteins. *Mol Microbiol* **42**(2), 279-292.
- Kau, A. L., Hunstad, D. A. & Hultgren, S. J. (2005).** Interaction of uropathogenic *Escherichia coli* with host uroepithelium. *Curr Opin Microbiol* **8**(1), 54-59.
- Kempf, V. A., Trebesius, K. & Autenrieth, I. B. (2000).** Fluorescent *In Situ* Hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. *J Clin Microbiol* **38**(2), 830-838.
- Khan, A. S., Kniep, B., Oelschlaeger, T. A., Van Die, I., Korhonen, T. & Hacker, J. (2000b).** Receptor structure for F1C fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **68**(6), 3541-3547.
- Khan, A. S., Mühldorfer, I., Demuth, V., Wallner, U., Korhonen, T. K. & Hacker, J. (2000a).** Functional analysis of the minor subunits of S fimbrial adhesin (Sfal) in pathogenic *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **263**(1), 96-105.
- Kjærgaard, K., Hasman, H., Schembri, M. A. & Klemm, P. (2002).** Antigen 43-mediated autotransporter display, a versatile bacterial cell surface presentation system. *J Bacteriol* **184**(15), 4197-4201.
- Kjærgaard, K., Schembri, M. A., Ramos, C., Molin, S. & Klemm, P. (2000).** Antigen 43 facilitates formation of multispecies biofilms. *Environ Microbiol* **2**(6), 695-702.

- Klemm, P., Hjerrild, L., Gjermansen, M. & Schembri, M. A. (2004).** Structure-function analysis of the self-recognizing antigen 43 autotransporter protein from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **51**(1), 283-296.
- Klemm, P., Vejborg, R. M. & Sherlock, O. (2006).** Self-associating autotransporters, SAATs: functional and structural similarities. *Int J Med Microbiol* **296**(4-5), 187-195.
- Knippers, R. (2006).** Molekulare Genetik, 9. Auflage. *Georg Thieme Verlag GmbH*, Stuttgart.
- Knudsen, S. K., Stensballe, A., Franzmann, M., Westergaard, U. B. & Otzen, D. E. (2008).** Effect of glycosylation on the extracellular domain of the Ag43 bacterial autotransporter: enhanced stability and reduced cellular aggregation. *Biochem J* **412**(3), 563-577.
- Kukkonen, M., Saarela, S., Lähteenmäki, K., Hynönen, U., Westerlund-Wikström, B., Rhen, M. & Korhonen, T. K. (1998).** Identification of two laminin-binding fimbriae, the type 1 fimbria of *Salmonella enterica* serovar typhimurium and the G fimbria of *Escherichia coli*, as plasminogen receptors. *Infect Immun* **66**(10), 4965-4970.
- Kuo, C., Takahashi, N., Swanson, A. F., Ozeki, Y. & Hakomori, S. (1996).** An *N*-linked high-mannose type oligosaccharide, expressed at the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*, mediates attachment and infectivity of the microorganism to HeLa cells. *J Clin Invest* **98**(12), 2813-2818.
- Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K., Nagai, Y., Lian, J., Ito, T., Kanamori, M., Matsumaru, H., Maruyama, A., Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., Takahashi, N. K., Sawano, T., Inoue, R., Kaito, C., Sekimizu, K., Hirakawa, H., Kuhara, S., Goto, S., Yabuzaki, J., Kanehisa, M., Yamashita, A., Oshima, K., Furuya, K., Yoshino, C., Shiba, T., Hattori, M., Ogasawara, N., Hayashi, H. & Hiramatsu, K. (2001).** Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **357**(9264), 1225-1240.
- Kyhse-Andersen, J. (1984).** Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**, 203-209.
- Laarmann, S. & Schmidt, M. A. (2003).** The *Escherichia coli* AIDA autotransporter adhesion recognizes an integral membrane glycoprotein as receptor. *Microbiol* **149**(7), 1871-1882.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259), 680-685.
- Lazazzera, B. A. (2005).** Lessons from DNA microarray analysis: the gene expression profile of biofilms. *Curr Opin Microbiol* **8**(2), 222-227.
- Lehmann, A. (2005).** Diplomarbeit: Untersuchungen zur Struktur und Funktion des Autotransporterproteins Antigen 43 von *Escherichia coli*. *Friedrich-Schiller-Universität Jena*,

Jena.

- Lindenthal, C. & Elsinghorst, E. A. (1999).** Identification of a glycoprotein produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **67**(8), 4084-4091.
- Lindenthal, C. & Elsinghorst, E. A. (2001).** Enterotoxigenic *Escherichia coli* TibA glycoprotein adheres to human intestine epithelial cells. *Infect Immun* **69**(1), 52-57.
- Lottspeich, F. & Zorbas, H. (1998).** Bioanalytik. *Spektrum, Akademischer Verlag GmbH*, Heidelberg.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J. (2000).** BROCK, Biology of microorganisms, 9<sup>th</sup> edition. *Prentice-Hall, Inc.*, Upper Saddle River, USA.
- 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**(4), 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.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. & Schleifer, K.-H. (1992).** Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Syst Appl Microbiol* **15**, 593-600.
- Mehlhorn, H. (1995).** Grundriß der Zoologie, 2. Auflage. *Gustav Fischer Verlag*, Stuttgart.
- Monroe, D. (2007).** Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS Biol* **5**(11), 2458-2461.
- Moormann, C., Benz, I. & Schmidt, M. A. (2002).** Functional substitution of the TibC protein of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains for the autotransporter adhesion heptosyltransferase of the AIDA system. *Infect Immun* **70**(5), 2264-2270.
- Mulvey, M. A. (2002).** Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **4**(5), 257-271.
- Mulvey, M. A., Schilling, J. D. & Hultgren, S. J. (2001).** Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infect Immun* **69**(7), 4572-4579.
- Mulvey, M. A., Schilling, J. D., Martinez, J. J. & Hultgren, S. J. (2000).** Bad bugs and beleaguered bladders: interplay between uropathogenic *Escherichia coli* and innate host defenses. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**(16), 8829-8835.
- Nickel, J. C. & McLean, R. J. C. (1998).** Bacterial biofilms in urology. *Infect Urol* **11**(6), 169-175.
- Nissle, A. (1918).** Die antagonistische Behandlung chronischer Darmstörungen mit Kolibakterien. *Med Klein* **2**, 29-30.

- Nowicki, B., Selvarangan, R. & Nowicki, S. (2001).** Family of *Escherichia coli* Dr adhesins: decay-accelerating factor receptor recognition and invasiveness. *J Infect Dis* **183**(1), 24-27.
- Oelschlaeger, T. A., Guerry, P. & Kopecko, D. J. (1993).** Unusual microtubule-dependent endocytosis mechanisms triggered by *Campylobacter jejuni* and *Citrobacter freundii*. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**(14), 6884-6888.
- Oelschlaeger, T. A. & Tall, B. D. (1997).** Invasion of cultured human epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae* isolated from the urinary tract. *Infect Immun* **65**(7), 2950-2958.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B. & Kolter, R. (2000).** Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* **54**, 49-79.
- Owen, P., Caffrey, P. & Josefsson, L. G. (1987).** Identification and partial characterization of a novel bipartite protein antigen associated with the outer membrane of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**(8), 3770-3777.
- Owen, P., Meehan, M., de Loughry-Doherty, H. & Henderson, I. (1996).** Phase-variable outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **16**(2), 63-76.
- Prigent-Combaret, C., Prensier, G., Le Thi, T. T., Vidal, O., Lejeune, P. & Dorel, C. (2000).** Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environ Microbiol* **2**(4), 450-464.
- Reidl, S., Lehmann, A., Schiller, R., Khan, A. S. & Dobrindt, U. (2009).** Impact of *O*-glycosylation on the molecular and cellular adhesion properties of the *Escherichia coli* autotransporter protein Ag43. *Int J Med Microbiol*, akzeptiert.
- Reisner, A., Haagensen, J. A., Schembri, M. A., Zechner, E. L. & Molin, S. (2003).** Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Mol Microbiol* **48**(4), 933-946.
- Restieri, C., Garriss, G., Locas, M. C. & Dozois, C. M. (2007).** Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. *Appl Environ Microbiol* **73**(5), 1553-1562.
- Rhen, M., Väisänen-Rhen, V., Saraste, M. & Korhonen, T. K. (1986).** Organization of genes expressing the blood-group-M-specific hemagglutinin of *Escherichia coli*: identification and nucleotide sequence of the M-agglutinin subunit gene. *Gene* **49**(3), 351-360.
- Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Hebert, R. J., Olcott, E. S., Johnson, L. M., Hargrett, N. T., Blake, P. A. & Cohen, M. L. (1983).** Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* **308**(12), 681-685.

- Roche, A., McFadden, J. P. & Owen, P. (2001).** Antigen 43, the major phase-variable protein of the *Escherichia coli* outer membrane, can exist as a family of proteins encoded by multiple alleles. *Microbiol* **147**(1), 161-169.
- Roggenkamp, A., Neuberger, H. R., Flügel, A., Schmoll, T. & Heesemann, J. (1995).** Substitution of two histidine residues in YadA protein of *Yersinia enterocolitica* abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. *Mol Microbiol* **16**(6), 1207-1219.
- Roggenkamp, A., Ruckdeschel, K., Leitritz, L., Schmitt, R. & Heesemann, J. (1996).** Deletion of amino acids 29 to 81 in adhesion protein YadA of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 results in selective abrogation of adherence to neutrophils. *Infect Immun* **64**(7), 2506-2514.
- Römling, U., Bian, Z., Hammar, M., Sierralta, W. D. & Normark, S. (1998a).** Curli fibers are highly conserved between *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. *J Bacteriol* **180**(3), 722-731.
- Römling, U., Sierralta, W. D., Eriksson, K. & Normark, S. (1998b).** Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella* Typhimurium strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Mol Microbiol* **28**(2), 249-264.
- Rybakin, V. & Clemen, C. S. (2005).** Coronin proteins as multifunctional regulators of the cytoskeleton and membrane trafficking. *Bioessays* **27**(6), 625-632.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA-polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5463-5467.
- Schembri, M. A., Christiansen, G. & Klemm, P. (2001).** FimH-mediated autoaggregation of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **41**(6), 1419-1430.
- Schembri, M. A., Hjerrild, L., Gjermansen, M. & Klemm, P. (2003).** Differential expression of the *Escherichia coli* autoaggregation factor antigen 43. *J Bacteriol* **185**(7), 2236-2242.
- Schembri, M. A. & Klemm, P. (2001).** Coordinate gene regulation by fimbriae-induced signal transduction. *EMBO J* **20**(12), 3074-3081.
- Schlee, M., Wehkamp, J., Altenhoefer, A., Oelschlaeger, T. A., Stange, E. F. & Fellermann, K. (2007).** Induction of human beta-defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infect Immun* **75**(5), 2399-2407.
- Schneider, G., Dobrindt, U., Brüggemann, H., Nagy, G., Janke, B., Blum-Oehler, G.,**

- Buchrieser, C., Gottschalk, G., Emödy, L. & Hacker, J. (2004).** The pathogenicity island-associated K15 capsule determinant exhibits a novel genetic structure and correlates with virulence in uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect Immun* **72**(10), 5993-6001.
- Schulze-Koops, H., Burkhardt, H., Heesemann, J., von der Mark, K. & Emmrich, F. (1992).** Plasmid-encoded outer membrane protein YadA mediates specific binding of enteropathogenic *Yersiniae* to various types of collagen. *Infect Immun* **60**(6), 2153-2159.
- Sherlock, O., Dobrindt, U., Jensen, J. B., Vejborg, R. M. & Klemm, P. (2006).** Glycosylation of the self-recognizing *Escherichia coli* Ag43 autotransporter protein. *J Bacteriol* **188**(5), 1798-1807.
- Sherlock, O., Schembri, M. A., Reisner, A. & Klemm, P. (2004).** Novel roles for the AIDA adhesin from diarrheagenic *Escherichia coli*: cell aggregation and biofilm formation. *J Bacteriol* **186**(23), 8058-8065.
- Sherlock, O., Vejborg, R. M. & Klemm, P. (2005).** The TibA adhesin/invasin from enterotoxigenic *Escherichia coli* is self recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation. *Infect Immun* **73**(4), 1954-1963.
- Skerra, A. (1994).** Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* **151**, 131-135.
- Spessotto, P., Yin, Z., Magro, G., Deutzmann, R., Chiu, A., Colombatti, A. & Perris, R. (2001).** Laminin isoforms 8 and 10 are primary components of the subendothelial basement membrane promoting interaction with neoplastic lymphocytes. *Cancer Res* **61**(1), 339-347.
- Stanley, N. R. & Lazizzera, B. A. (2004).** Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol Microbiol* **52**(4), 917-924.
- Stimson, E., Virji, M., Makepeace, K., Dell, A., Morris, H. R., Payne, G., Saunders, J. R., Jennings, M. P., Barker, S. & Panico, M. (1995).** Meningococcal pilin: a glycoprotein substituted with digalactosyl 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxyhexose. *Mol Microbiol* **17**(6), 1201-1214.
- Szymanski, C. M., Yao, R., Ewing, C. P., Trust, T. J. & Guerry, P. (1999).** Evidence for a system of general protein glycosylation in *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol* **32**(5), 1022-1030.
- Trautner, B. W., Hull, R. A. & Darouiche, R. O. (2005).** Prevention of catheter-associated urinary tract infection. *Curr Opin Infect Dis* **18**(1), 37-41.
- Ukena, S. N., Westendorf, A. M., Hansen, W., Rohde, M., Geffers, R., Coldewey, S., Suerbaum, S., Buer, J. & Gunzer, F. (2005).** The host response to the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917: specific up-regulation of the proinflammatory chemokine MCP-1. *BMC Med Genet* **6**, 43-55.

- Ulett, G. C., Webb, R. I. & Schembri, M. A. (2006).** Antigen 43-mediated autoaggregation impairs motility in *Escherichia coli*. *Microbiology* **152**(7), 2101-2110.
- Villarejo, M. R. & Zabin, I. (1974).** Beta-galactosidase from termination and deletion mutant strains. *J Bacteriol* **120**(1), 466-474.
- Vincze, T., Posfai, J. & Roberts, R. J. (2003).** NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res* **31**(13), 3688-3691.
- Virkola, R., Westerlund, B., Holthöfer, H., Parkkinen, J., Kekomäki, M. & Korhonen, T. K. (1988).** Binding characteristics of *Escherichia coli* adhesins in human urinary bladder. *Infect Immun* **56**(10), 2615-2622.
- Voet, D. & Voet, J. G. (1994).** Biochemie. *VCH Verlagsgesellschaft mbH*, Weinheim.
- Waldron, D. E., Owen, P. & Dorman, C. J. (2002).** Competitive interaction of the OxyR DNA-binding protein and the Dam methylase at the antigen 43 gene regulatory region in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **44**(2), 509-520.
- Wallecha, A., Correnti, J., Munster, V. & van der Woude, M. (2003).** Phase variation of Ag43 is independent of the oxidation state of OxyR. *J Bacteriol* **185**(7), 2203-2209.
- Wallecha, A., Munster, V., Correnti, J., Chan, T. & van der Woude, M. (2002).** Dam- and OxyR-dependent phase variation of *agn43*: essential elements and evidence for a new role of DNA methylation. *J Bacteriol* **184**(12), 3338-3347.
- Watnick, P. & Kolter, R. (2000).** Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* **182**(10), 2675-2679.
- Węgrzyn, G. & Thomas, M. S. (2002).** Modulation of the susceptibility of intestinal bacteria to bacteriophages in response to Ag43 phase variation – a hypothesis. *Med Sci Monit* **8**(6), HY15-HY18.
- 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- $\kappa$ 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**(10), 5750-5758.
- Welch, R. A., Burland, V., Plunkett, G. 3<sup>rd</sup>, Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., Buckles, E. L., Liou, S. R., Boutin, A., Hackett, J., Stroud, D., Mayhew, G. F., Rose, D. J., Zhou, S., Schwartz, D. C., Perna, N. T., Mobley, H. L., Sonnenberg, M. S. & Blattner, F. R. (2002).** Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**(26), 17020-17024.
- Wells, T. J., Tree, J. J., Ulett, G. C. & Schembri, M. A. (2007).** Autotransporter proteins: novel targets at the bacterial cell surface. *FEMS Microbiol Lett* **274**(2), 163-172.

- Wewer, U., Albrechtsen, R., Manthorpe, M., Varon, S., Engvall, E. & Ruoslahti, E. (1983).** Human laminin isolated in a nearly intact, biologically active form from placenta by limited proteolysis. *J Biol Chem* **258**(20), 12654-12660.
- Whyte, J. J., Schmitt, C. J. & Tillitt, D. E. (2004).** The H4IIE cell bioassay as an indicator of dioxin-like chemicals in wildlife and the environment. *Crit Rev Toxicol* **34**(1), 1-83.
- Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W. & Römling, U. (2001).** The multicellular morphotypes of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol* **39**(6), 1452-1463.

## 8. Anhang

### 8.1. Abkürzungsverzeichnis

In dieser Arbeit wurden unter anderem nicht SI-konforme Einheiten, davon abgeleitete Einheiten und folgende Abkürzungen, die nicht im Duden in seiner 22. Auflage aufgeführt sind, verwendet.

A	Absorption; Adeninnukleotid
AAF	' <i>Aggregative Adherence Fimbriae</i> '
Aah ( <i>aah</i> )	' <i>Autotransporter Adhesin Heptosyltransferase</i> '
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AFA	' <i>Afimbrial Adhesin</i> '
Ag43 ( <i>agn43</i> )	Antigen 43
AIDA ( <i>aidA</i> )	' <i>Adhesin Involved in Diffuse Adherence</i> '
AIDAR	AIDA-I-Rezeptor
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BFP	' <i>Bundle-forming Pili</i> '
<i>Bgl</i>	<i>Bacillus globigii</i> (ATCC 49760)
BHI	' <i>brain heart infusion</i> '
<i>bla</i>	$\beta$ -Laktamase
BMA	Blutgruppe M-spezifisches Agglutinin
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovines Serumalbumin
bZIP	' <i>Basic Leucine Zipper</i> '
°C	Grad Celsius
C	Cytosinnukleotid; elektrische Kapazität
c	Konzentration
c'	Endkonzentration
CD	' <i>Cluster of Differentiation</i> '
CFU	' <i>colony forming unit</i> ' (Kolonie-bildende Einheit)
C <sub>H</sub> 1	' <i>constant heavy chain domain 1</i> ' (konstante Domäne 1 der schweren Kette)
<i>Cla</i>	<i>Caryophanon latum</i> L
Cy3	Carbocyanin 3
d	' <i>destillata</i> ' (destilliert)
Da	Dalton
DAF	' <i>Decay-accelerating Factor</i> '

Dam	Desoxyadenosinmethyltransferase
dd	' <i>bidestillata</i> ' (doppelt destilliert)
DIG	Digoxigenin
DMEM	' <i>Dulbecco's MEM</i> ' (s. MEM)
dNTPs	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphate
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DTT	Dithiothreitol
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EBSS	' <i>Earl's balanced salts solution</i> ' ( <i>Earls</i> abgestimmte Salzlösung)
ECM	' <i>extracellular matrix</i> ' (extrazelluläre Matrix)
EcN	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917
<i>EcoR</i>	<i>Escherichia coli</i> J62 (pLG74); <i>Escherichia coli</i> RY13
ECP	<i>Escherichia coli</i> -Protein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	' <i>Epidermal Growth Factor</i> ' (epidermaler Wachstumsfaktor)
EHEC	enterohämorrhagisches <i>Escherichia coli</i>
EHS	<i>Engelbreth-Holm-Swarm</i>
ELISA	' <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> ' (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
EPEC	enteropathogenes <i>Escherichia coli</i>
EspC	' <i>EPEC-secreted Protein C</i> '
EspP	extrazelluläre Serinprotease P
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FKS	fötales Kälberserum
Flu ( <i>flu</i> )	' <i>Fluffing factor</i> ' (Synonym zu Ag43)
G	Guaninnukleotid
GEI	genomische Insel
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
Hap	' <i>Haemophilus Adhesion and Penetration</i> '
hBD	humanes $\beta$ -Defensin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<i>Hind</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> R <sub>d</sub>
6xHis	Hexa-Histidin-Peptid
His	Histidin
HPI	' <i>High Pathogenicity Island</i> '
HRP	' <i>Horseradish Peroxidase</i> ' (Meerrettich-Peroxidase)
Hsr	' <i>Helicobacter Surface Ring</i> '
HWI	Harnwegsinfektion(en)
<i>IBC</i>	' <i>intracellular bacterial community</i> ' (intrazelluläre Bakteriengemeinschaft)
ID	(minimale) infektiösauslösende Dosis
<i>IG</i>	intergenische Region
IgA	Immunglobulin des Isotyps A
IgG	Immunglobulin des Isotyps G

IgM	Immunglobulin des Isotyps M
IHF	<i>'Integration Host Factor'</i>
IHKE	<i>'immortalized human kidney epithelium'</i> (immortalisiertes humanes Nierenepithel)
II	Instabilitätsindex
IMAC	immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie
<i>IMIB</i>	Institut für Molekulare Infektionsbiologie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IS	Insertionssequenz
ITS	<i>'insulin-transferrin-sodium selenite'</i> (Insulin-Transferrin-Natriumselenit)
<i>kan</i>	Kanamycin
<i>lac</i>	Laktose
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LPS	Lipopolysaccharid
Lrp	<i>'Leucine Response Protein'</i>
M	Marker; Mol (Stoffmenge); molar
<i>m</i>	Molekülmasse
$\mu$	Mikro ( $10^{-6}$ )
MALDI	<i>'matrix-assisted laser desorption/ionisation'</i> (Matrix-unterstützte Laser-desorption/-ionisation)
MCP	<i>'Monocyte Chemoattractant Protein'</i>
MCS	<i>'multiple cloning site'</i> (multiple Klonierungsstelle)
MEM	<i>'minimal essential medium'</i> (minimales essentielles Medium)
MHC	<i>'major histocompatibility complex'</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MIP	<i>'Macrophage Inflammatory Protein'</i>
MOMP	<i>'Major Outer Membrane Protein'</i>
mRNA	<i>'messenger RNA'</i> (Boten-RNA)
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Massenspektrometrie
MWCO	<i>'molecular weight cut off'</i> (Molekulargewichtstrennschärfe)
n	Anzahl; Nano ( $10^{-9}$ )
n	2'-Desoxynukleosid-5'-monophosphat (Nukleotid)
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
n. c.	Negativkontrolle
n.d.	nicht determiniert
neAA	<i>'non essential amino acids'</i> (nichtessentielle Aminosäuren)
NFA (Nfa)	Nicht-Fimbrienadhäsion
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
<i>Not</i>	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i> (ATCC 14630)
OD	optische Dichte
OMP	<i>'Outer Membrane Protein'</i> (Außenmembranprotein)
ORF	<i>'open reading frame'</i> (offener Leserahmen)
<i>p</i>	Druck
p	p-Wert (Signifikanzniveau)

<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
p. a.	' <i>pro analysi</i> ' (für die Analyse)
PAA	Polyacrylamid
PAAP	' <i>Platelet Aggregation-associated Protein</i> '
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAI	Pathogenitätsinsel
Pap	Pyelonephritis-assoziierte Pili
PBS	' <i>phosphate-buffered saline</i> ' (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
p. c.	Positivkontrolle
PCR	' <i>polymerase chain reaction</i> ' (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	' <i>potentia Hydrogenii</i> ' (negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen- bzw. Oxoniumkonzentration)
pl	isoelektrischer Punkt
PMN	' <i>polymorphonuclear neutrophil</i> ' (neutrophiler Granulozyt)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Prf	' <i>Pap-related Fimbriae</i> '
PS	Patientenserum
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	elektrischer Widerstand
<i>rdar</i>	' <i>red, dry, and rough</i> '
REM	Rasterelektronenmikroskop(ie)
rRNA	ribosomale RNA
S	Svedberg (Sedimentationskoeffizient)
s	sekretorisch
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Sac</i>	<i>Streptomyces achromogenes</i> (ATCC 12767)
SDS	' <i>sodium dodecyl sulfate</i> ' (Natriumdodecylsulfat)
Sfa	' <i>S-fimbrial Adhesin</i> '
<i>S-Layer</i>	' <i>surface layer</i> '
Sm	Streptomycin
<i>Sph</i>	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>
<i>Stu</i>	<i>Streptomyces tubercidicus</i>
SV	Säulenvolumen
T	Thyminnukleotid
<i>t</i>	Zeit
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS-T	' <i>Tris-buffered saline</i> ' (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)-Tween 20
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
<i>tet</i> (R)	Tetracyclin(-Repressor)
THP	Tamm-Horsfall Protein
Tib	' <i>Enterotoxigenic Invasion Locus B</i> '
TLR	Toll-like Rezeptor

---

TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TOF/TOF	' <i>tandem time-of-flight</i> ' (Tandem-Flugzeitanalysator)
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
Tsh	Temperatur-sensitives Hämagglutinin
U	elektrische Spannung; Umdrehung(en); ' <i>unit</i> ' (Einheit)
UPEC	uropathogenes <i>Escherichia coli</i>
v	' <i>volume</i> ' (Volumen)
w	' <i>weight</i> ' (Gewicht)
<i>Xba</i>	<i>Xanthomonas badrii</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
Y.	<i>Yersinia</i>
YadA ( <i>yadA</i> )	<i>Yersinia</i> -Adhäsion A
ZINF	Zentrum für Infektionsforschung

## 8.2. Sequenzen

### 8.2.1. Ag43a-536

In der nachfolgend aufgeführten Nukleotid- und Aminosäuresequenz ist das von pANL3 kodierte *agn43a-536* (ORF52, PAI III<sub>536</sub>) dargestellt. Die terminalen **XbaI**- und **HindIII**-Klonierungsschnittstellen sind durch Einrahmungen markiert. Des weiteren sind die Sequenzen der Primer **BP277** und **P3** eingezeichnet, die zur Amplifikation und Klonierung von **6xhis-agn43a-536<sup>u</sup>** dienen. **Shine-Dalgarno-Sequenzen**, das *Signalpeptid* sowie die Start-/Stop-Codons sind ebenfalls entsprechend hervorgehoben.

```

ctagactgagtctgctcacaaaagcgctgttttcggtactgtctctcttgtccgtgcaat
agcttgataatagaataaaacgatcgatacctatttcaccgatcgtaatatcgatcgtt
atgctaataataactcatgtagcaacgtgcgagatacacacagtcagagattcaggg
aacaacagagccacacgtcagaaacttccgctcagccggacctccggcactgtaacccttt
acctgcccgtatccacatctgtggataccggcttttttattcaccctcactctgattaag
gaatgctgatgaaacgacatctgaatacctgctacaggctggatggaatcacattacg
      M K R H L N T C Y R L V W N H I T
ggcgctttcgtgggtgcctccgaactggcccgcgcacggggtaaactggcggtgtggcg
  G A F V V A S E L A R A R G K R G G V A
gttgcaactgtctcttgcgcggtcacgtcactcccgggtgctggct-ctagatagtaaagga
  V A L S L A A V T S L P V L A
aaaactatgcatcaccatcaccatcac-gctgacatcgttgtgcaccgggtgaaacagtg
      M H H H H H H A D I V V H P G E T V
aatggcggaaactggtaaaccatgacaaccagtttgtatccggaacagctgatggcgtg
  N G G T L V N H D N Q F V S G T A D G V
actgtcagtaccgggcttgagctggggccggacagtgacgaaaacaccggcgggcaatgg
  T V S T G L E L G P D S D E N T G G Q W
ataaaagcgggtggcacaggcagaaacaccactgtcaccgcaaattggtcgtcagattgtg
  I K A G G T G R N T T V T A N G R Q I V
caggcaggaggaactgccagtgatacggttattcgtgatggcggagggcagagcctaac
  Q A G G T A S D T V I R D G G G Q S L N
ggactggcgggtgaacaccacgctggataacagaggtgagcagtggttacacgggggaggg
  G L A V N T T L D N R G E Q W V H G G G
aaagctccggtacaattattaaccaggatggttaccagaccataaaacatggcggactg
  K A A G T I I N Q D G Y Q T I K H G G L
gcaaccggaaccatcgtcaacaccgggtgcagaaggtggtccggagtctgaaaatgtgtcc
  A T G T I V N T G A E G P E S E N V S
actggtcagatggtcgggggactgctgaatccaccaccatcaacaacaatggccgacag
  T G Q M V G G T A E S T T I N N N G R Q
gttatctggtcttcgggggtatcccgggacactctcatttacacaggcgggtgaccagacg
  V I W S S G V S R D T L I Y T G G D Q T
gtacacggagaggcacataaccccggctggagggaggaaccagtatgtgcacaaatac
  V H G E A H N T R L E G G N Q Y V H K Y

```

ggacttgcgctgaacacggtaattaacgaggggggctggcaggttgtaaggcaggtggt  
G L A L N T V I N E G G W Q V V K A G G  
actgccggcaacaccaccataaatcagaacggcgagctgaaggttcatgccggcgagaa  
T A G N T T I N Q N G E L K V H A G G E  
gcgtctgatgtcaccagaacacgggaggtgactggttaccagcacagcagcaaccgtc  
A S D V T Q N T G G A L V T S T A A T V  
accggtacaaaccgcctgggagcattctccgttgggagggtaaggctgataatgctgta  
T G T N R L G A F S V V E G K A D N V V  
ctggaaaatggtggacgtctggatgtgctgagcggacacacagccactaataccgcgtg  
L E N G G R L D V L S G H T A T N T R V  
gatgatggcggaacgctggatgtccgcaatgggtgggtaccgccaccaccgtatccatggg  
D D G G T L D V R N G G T A T T V S M G  
aatggcggggactgctggccgattccggggcctgctcagtgggtaccgggagcgacgga  
N G G V L L A D S G A A V S G T R S D G  
acggcattccgtatcggggcggtcaggcggatgccctgatgctggaaaaggcagttca  
T A F R I G G G Q A D A L M L E K G S S  
ttcacgctgaacgccggtgatacggccacggataaccaggtaaatggcggactggtcact  
F T L N A G D T A T D T T V N G G L F T  
gccagagggggctcgctggcgggcaccaccagctgaataacggcgcataacttaccctt  
A R G G S L A G T T T L N N G A I L T L  
tccgggaagacggtgaacaacgataccctgaccatccgtgaaggcgatgcactcctgcag  
S G K T V N N D T L T I R E G D A L L Q  
ggaggctctctaccggtaacggcagcgtggaaaatcaggaagtggcacactcactgtc  
G G S L T G N G S V E K S G S G T L T V  
agcaacaccacactcaccagaaagccgtcaacctgaatgaaggcacgctgacgctgac  
S N T T L T Q K A V N L N E G T L T L N  
gacagtaccgtcaccacggatgtcattgctcagcgcggtacagccctgaagctgaccggc  
D S T V T T D V I A Q R G T A L K L T G  
agcactgtgctgaacggtgccattgaccccacgaatgtcactctcgctccggtgccacc  
S T V L N G A I D P T N V T L A S G A T  
tggaatatccccgataacgccacgggtgcagtcgggtgggtggatgacctcagccatgccgga  
W N I P D N A T V Q S V V D D L S H A G  
cagattcatttcacctccaccgcacaggggaagttcgtaccggcaaccctgaaagtgaaa  
Q I H F T S T R T G K F V P A T L K V K  
aacctgaacggacagaatggcaccatcagcctgcgtgtacgcccggatatggcacagaac  
N L N G Q N G T I S L R V R P D M A Q N  
aatgctgacagactgggtcattgacggcggcagggcaaccggaaaaaccatcctgaaactg  
N A D R L V I D G G R A T G K T I L N L  
gtgaacgccggcaacagtgctcggggctggcgaccagcggtaagggtattcaggtgggt  
V N A G N S A S G L A T S G K G I Q V V  
gaagccattaacggtgccaccacggaggaagggcctttgtccaggggaacaggctgcag  
E A I N G A T T E E G A F V Q G N R L Q  
gccggtgcctttaactactccctcaaccgggacagtgatgagagctggtatctgcgcagt  
A G A F N Y S L N R D S D E S W Y L R S  
gaaaatgcttatcgtgcagaagtccccctgtatgcctccatgctgacacaggcaatggac  
E N A Y R A E V P L Y A S M L T Q A M D  
tatgaccggattctggcaggtcc-a-cgcagccatcagaccggtgtaaactgtaaaaat  
Y D R I L A G S R S H Q T G V N V K N  
aacagcgtccgtctcagcattcagggcggatcctcggtcacgataacaacggcggatt  
N S V R L S I Q G G H L G H D N N G G I  
gcccgtggggccacgccgaaagcagcggcagctatggcttcgtccgtctggagggggac  
A R G A T P E S S G S Y G F V R L E G D  
ctgctgagaacagaggttgccggtatgtctgtgaccgcgggggtatatggcgtgcaggc  
L L R T E V A G M S V T A G V Y G A A G  
cattcttccgttgatgtaaggatgatgacggctcccgtgccggcaggtccgggatgat  
H S S V D V K D D D G S R A G T V R D D

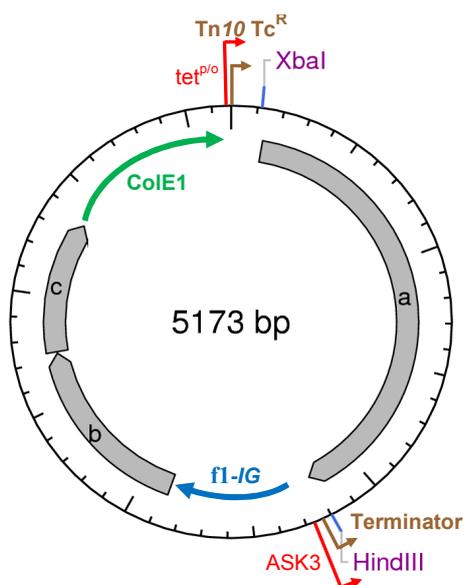
gccggcagcctggggcggatacctgaatctgacacacacgctcctccggcctgtgggctgac  
A G S L G G Y L N L T H T S S G L W A D  
attgtggcccaggggaacccgccacagcatgaaagcgtcatcggacaataacgacttccgc  
I V A Q G T R H S M K A S S D N N D F R  
gccccgggctggggctggctgggctcactggaaaccggctctgcccttcagtatcactgac  
A R G W G W L G S L E T G L P F S I T D  
aatctgatgctggagccacaactgcagtacacctggcagggactctccctggatgacggc  
N L M L E P Q L Q Y T W Q G L S L D D G  
caggataacgccggttatgtgaagttcgggcatggcagtgacacaacatgtgcgtgccggt  
Q D N A G Y V K F G H G S A Q H V R A G  
ttccgctctgggcagtcacagcgatatgacctttggtgaaggcacctcatcccgtgacacc  
F R L G S H S D M T F G E G T S S R D T  
ctgcgtgacagtgcaaacacagtgctgcgtgaactgccggtgaactggtgggtacagcct  
L R D S A K H S V R E L P V N W W V Q P  
tccgttatccgcaccttcagctcccggggtgacatgagcatggggacagccgcagccggc  
S V I R T F S S R G D M S M G T A A A G  
agtaacatgacgttctcaccgtcacagaatggcagctcactggacctgcaggccggactg  
S N M T F S P S Q N G T S L D L Q A G L  
gaagcccgtgtccgggaaaatataccctgggcggttcaggccgggttatgccacagcgtc  
E A R V R E N I T L G V Q A G Y A H S V  
agcggcagcagcgtgaaggctataacggctcaggccacgctgaatgtgactttctgataa  
S G S S A E G Y N G Q A T L N V T F - -  
tcaggctcactccccttcaggccccgggtcatcatgaccggggctttttacttttcaggggagc  
  
aacagatatgccggggtgtacagcacgtttattgccgaaggctcttttgctgccaaatgg  
  
catctgaatagatcacagtctggccgggttattaccgatcccgatgggggttattgggtga  
  
tctccttcataaaaatacgcagctcgccagtgaaaggcttctcagacaataaacgtcat  
  
tcatttcccccatcaggccg-a

### 8.3. Plasmidkarten

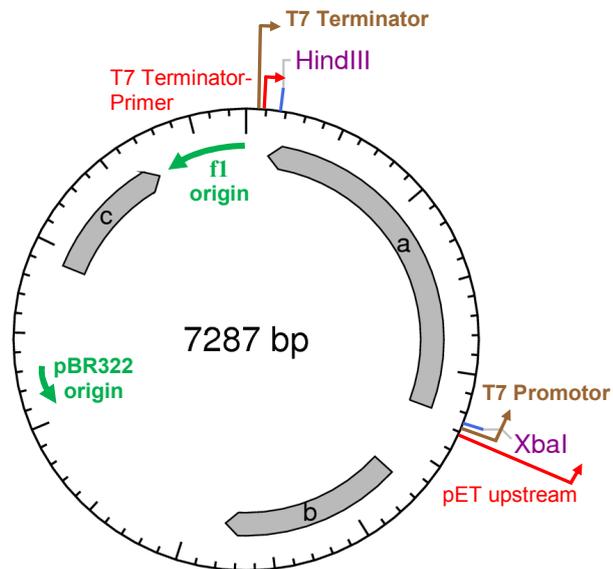
In dieser Arbeit sind folgende Plasmide zur induzierbaren Überexpression von 6xHisAg43a-536<sup>α</sup> konstruiert worden (Abb. 8.1 & Abb. 8.2). Die Klonierung der mittels PCR generierten Sequenz von 6xhis-agn43a-536<sup>α</sup> (s. 8.2.1.) erfolgte nach einer T/A-Ligation mit pGEM<sup>®</sup>-T Easy über die *Xba*I- und *Hind*III-Schnittstellen in die MCS der Vektoren pASK75 sowie pET-28a.

Die Plasmide zur konstitutiven Expression von Ag43a-EcN (pANL1), Ag43b-EcN (pANL2) und Flu (pANL4) entstanden wie folgt: Nach einem *Xba*I/*Hind*III-Verdau von pANG1, pANG2 bzw. pANG4 wurden die jeweiligen *agn43*-kodierenden Restriktionsfragmente in die MCS des 'high copy'-Vektors pLDR11 subkloniert (Abb. 8.3-5).

#### 8.3.1. pASK75-6xhis-agn43a-536<sup>α</sup>

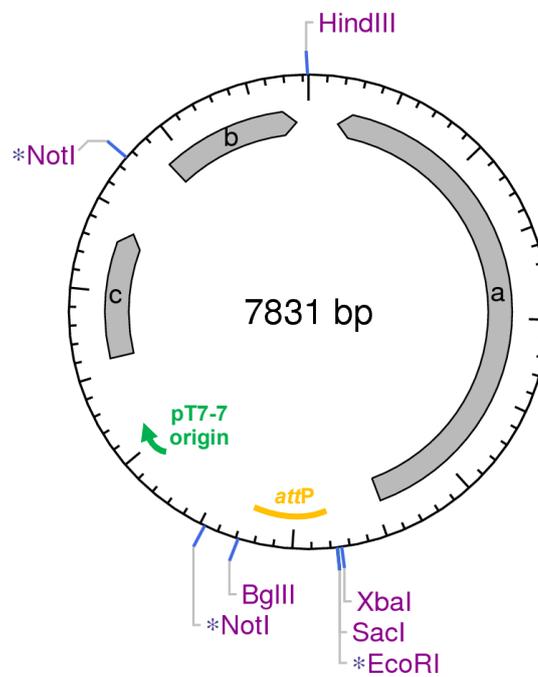


**Abb. 8.1:** pASK75-6xhis-agn43a-536<sup>α</sup>.  
**a:** 6xhis-agn43a-536<sup>α</sup>; **b:** bla; **c:** tetR.

8.3.2. pET-28a-6xhis-agn43a-536<sup>a</sup>

**Abb. 8.2:** pET-28a-6xhis-agn43a-536<sup>a</sup>.  
 a: 6xhis-agn43a-536<sup>a</sup>; b: lacI; c: kan.

## 8.3.3. pANL1



**Abb. 8.3:** pANL1. a: agn43a-EcN;  
 b: bla; c: tet.

## 8.3.4. pANL2

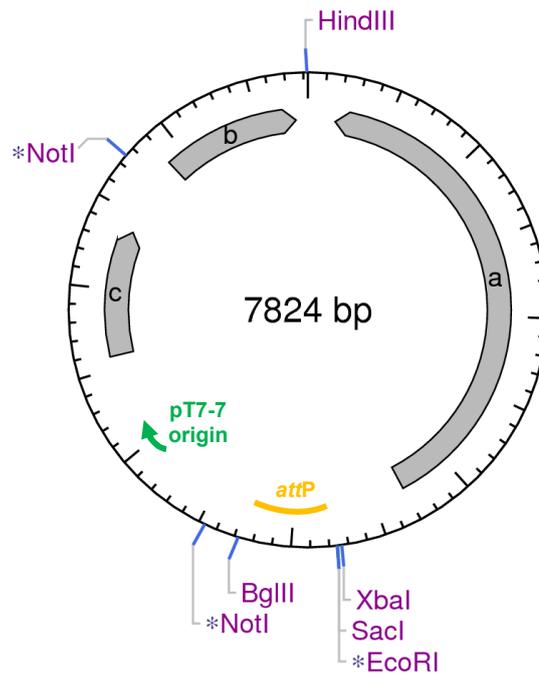


Abb. 8.4: pANL2. a: *agn43b-EcN*; b: *bla*; c: *tet*.

## 8.3.5. pANL4

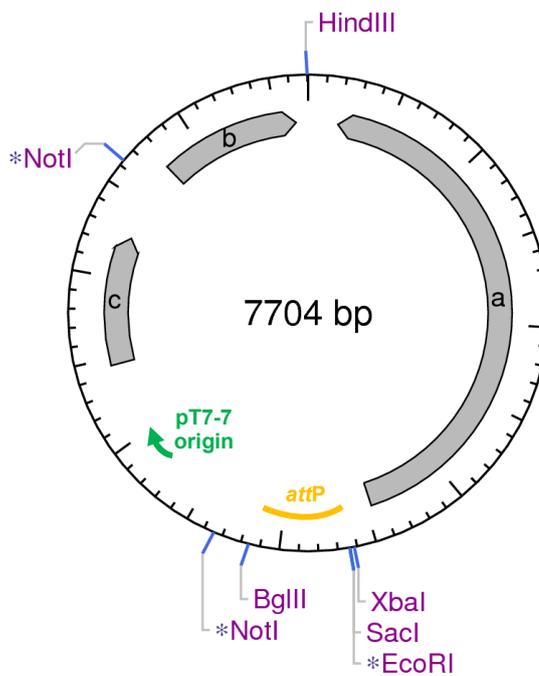


Abb. 8.5: pANL4. a: *flu*; b: *bla*; c: *tet*.

## 8.4. Publikationsliste

### 8.4.1. Veröffentlichungen

Dobrindt, U., Zdziarski, J., Bauchart, P., Reidl, S., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., Svanborg, C. & Hacker, J. (2009)

**Genome fluidity and its impact on virulence gene expression and evolution of extraintestinal pathogenic *E. coli*.**

*Nova Acta Leopoldina* NF **98**(359), 97-103; in Vorbereitung.

Reidl, S., Lehmann, A., Schiller, R., Khan, A. S. & Dobrindt, U. (2009)

**Impact of *O*-glycosylation on the molecular and cellular adhesion properties of the *Escherichia coli* autotransporter protein Ag43.**

*Int J Med Microbiol*, akzeptiert.

### 8.4.2. Posterpräsentationen

#### 8.4.2.1. Tagungsbeiträge

Sebastian Reidl, Annika Lehmann, A. Salam Khan, Jörg Hacker, Ulrich Dobrindt

**Role of *Escherichia coli* antigen 43 in host-bacterium interaction.**

2<sup>nd</sup> FEMS Congress of European Microbiologists, 04.-08. Juli 2006, Madrid, Spanien

Sebastian Reidl, Annika Lehmann, A. Salam Khan, Jörg Hacker, Ulrich Dobrindt

**Role of *Escherichia coli* antigen 43 in host-bacterium interaction.**

58. Jahrestagung der DGHM, 01.-04. Oktober 2006, Würzburg

Sebastian Reidl, Annika Lehmann, A. Salam Khan, Jörg Hacker & Ulrich Dobrindt

**Role of *Escherichia coli* antigen 43 in host-bacterium interaction.**

32<sup>nd</sup> FEBS Congress "Molecular Machines", 07.-12. Juli 2007, Wien, Österreich

Sebastian Reidl, Annika Lehmann, A. Salam Khan, Jörg Hacker & Ulrich Dobrindt

**Role of *Escherichia coli* antigen 43 in host-bacterium interaction.**

EMBO-FEMS-LEOPOLDINA Symposium "Escherichia coli – Facets of a Versatile Pathogen", 09.-12. Oktober 2007, Bildungszentrum Kloster Banz, Bad Staffelstein

#### 8.4.2.2. Workshops

Sebastian Reidl, A. Salam Khan, Jörg Hacker, Ulrich Dobrindt

**Antigen 43 – a virulence-associated factor of uropathogenic *Escherichia coli*?**

*The EuroPathoGenomics Graduate Academy Course and Workshop*, 10.-17. Mai 2006, Umeå University, Umeå, Schweden

Roswitha Schiller, Sebastian Reidl, A. Salam Khan, Ulrich Dobrindt

**Characterization of protein glycosylation pathways in *Escherichia coli* and its impact on host-pathogen interaction.**

*The International Graduate School (GRK 1409) “Molecular Interactions of Pathogens with Biotic and Abiotic Surfaces”, Summer School ‘08: Pathogen-Host Interactions at Cellular Barriers*, 04.-06. Juni 2008, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Münster

## 8.5. Lebenslauf

<b>Persönliche Daten</b>	Sebastian Reidl, geboren am 14. Dezember 1978 in Blankenburg (Harz)
<b>Schulbildung</b>	
08/1985 – 08/1991	Polytechnische Oberschule „Am Regenstein“, Blankenburg (Harz)
09/1991 – 07/1997	Gymnasium „Am Thie“, Blankenburg (Harz) <u>Abschluß</u> : Allgemeine Hochschulreife
<b>Grundwehrdienst</b>	
09/1997 – 06/1998	3./Panzer Grenadierlehrbataillon 92, Munster
<b>Diplomstudium</b>	
10/1998 – 11/2003	Studium der Biologie, <i>Universität Rostock</i>
09/2000	Vordiplom
11/2002	Diplom-Prüfung im Hauptfach Mikrobiologie und den Nebenfächern Molekularbiologie/Genetik, Immunbiologie sowie Medizinische Mikrobiologie
12/2002 – 10/2003	Diplomarbeit am <i>Robert Koch-Institut</i> , Bereich Wernigerode Betreuung durch Prof. Dr. Helmut Tschäpe: „Isolierung und molekulare Charakterisierung von SopE-kodierenden Bakteriophagen von <i>Salmonella enterica</i> “
11/2003	<u>Abschluß</u> : Diplom-Biologe (Gesamtnote: sehr gut)
<b>Promotionsstudium</b>	
07/2004 – 03/2008	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am <i>Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg</i> Anfertigung der Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. Drs. h.c. Jörg Hacker und PD Dr. Ulrich Dobrindt
	SFB 479 „Erregervariabilität und Wirtsreaktion bei infektiösen Krankheitsprozessen“; Teilprojekt A1 „Struktur, Funktion und Ausbreitung von Pathogenitätsinseln bei pathogenen Enterobakterien“ (Leitung: Prof. Dr. Drs. h.c. Jörg Hacker, PD Dr. Ulrich Dobrindt)
	Assoziiertes Mitglied des Network of Excellence „EuroPatho-Genomics“ (NoE „EPG“)
	Doktorandenkolleg „Infektionsforschung“, Teil der <i>Graduate School of Life Sciences (GSLs), Universität Würzburg</i>