

Studien zur Verbreitung und genetischen Struktur des Colibactin-Genclusters in *Enterobacteriaceae*

Dissertation

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

vorgelegt von

Johannes Putze
aus Limburg an der Lahn

Würzburg, 2009

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Jörg Hacker

2. Gutachter: Prof. Dr. Klaus Brehm

Betreuer: Dr. Tobias Ölschläger

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt.

Weiterhin erkläre ich, dass die Dissertation bisher nicht in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat, und ich bisher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, November 2009

Johannes Putze

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die durch ihre Unterstützung diese Arbeit überhaupt erst möglich gemacht haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Jörg Hacker für die Bereitstellung von Thema und Arbeitsplatz sowie für sein Interesse am Fortschritt meiner Arbeit, seine Anregungen und stete Diskussionsbereitschaft

Herrn Prof. Dr. Rapp in seiner Funktion als Leiter des deutsch-französischen Graduiertenkollegs Würzburg-Nizza „Signal Transduction: Where Cancer and Infection Converge“ für die freundliche Aufnahme in das Kolleg

Herrn Dr. Tobias Ölschläger für seine kompetente Anleitung und Betreuung, seine Anregungen und konstruktive Kritik, seine Hilfsbereitschaft sowie seine Gastfreundschaft während verschiedener Feierlichkeiten

Herrn Prof. Dr. Klaus Brehm für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens

Herrn PD Dr. Ulrich Dobrindt für die kompetente Hilfestellung in wissenschaftlichen Fragen, seine Diskussionsbereitschaft und fachliche Unterstützung

allen Mitgliedern des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie und des Zentrums für Infektionsforschung für ihre stete Hilfsbereitschaft und die gute Atmosphäre

den Mitgliedern des Graduiertenkollegs Würzburg-Nizza für die nicht nur wissenschaftlichen Exkurse

der gesamten *E. coli* Arbeitsgruppe für das allzeit freundliche Miteinander und die gute Stimmung, besonders Marita, Anja, Grit und Stefan für die gute Zeit und gegenseitige Hilfe und Unterstützung bei der täglichen Arbeit

meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung und Aufmunterung in schwierigen Phasen

WHEN REASON SLEEPS OUR MINDS WILL CHANGE

Haste

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	1
Summary	3
1 Einleitung	5
1.1 Die bakterielle Darmflora des Menschen	5
1.2 Die Familie der <i>Enterobacteriaceae</i>	6
1.3 Die Spezies <i>Escherichia coli</i>	7
1.3.1 <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	8
1.4 Bakterielle Fitness und Virulenz	9
1.5 Horizontaler Gentransfer und Genom-Plastizität	12
1.6 Das Colibactin-Gencluster	17
1.7 Polyketide und nichtribosomale Peptide	20
1.8 Aufgabenstellung und Zielsetzung	25
2 Materialien	26
2.1 Bakterienstämme	26
2.2 Plasmide und Vektoren	30
2.3 Oligonukleotide	30
2.4 Chemikalien, Enzyme und Fertigkits	30
2.5 Medien und Zusätze	32
2.6 Puffer und Lösungen	33
2.7 Geräte und Verbrauchsmaterialien	34
3 Methoden	37
3.1 Kultur von Bakterien	37
3.1.1 Anzucht und Stammhaltung	37
3.1.2 Bestimmung des Wachstums in Flüssigkulturen	37
3.1.3 Phänotypische Charakterisierung.....	38
3.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden	39
3.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Bakterien	39
3.2.2 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA	39
3.2.3 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)	40
3.2.4 Enzymatische Hydrolyse von DNA	41
3.2.5 Ligation von DNA.....	41
3.2.6 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel	41
3.2.7 DNA-Sequenzierung.....	41

3.3	Computergestützte Analysen	42
3.4	Darstellung des bakteriellen Lipopolysaccharids (LPS)	42
3.5	Zellkulturmethoden	43
3.5.1	Einfrieren und Auftauen von Zellen	43
3.5.2	Propagation von Zelllinien	44
3.5.3	Kokultur von HeLa-Zellen mit Bakterienstämmen.....	44
3.6	Kolonisierungsexperimente im Mausmodell	45
4	Ergebnisse	46
4.1	Untersuchungen zur Präsenz des Colibactin-Genclusters in verschiedenen Gattungen der <i>Enterobacteriaceae</i>	46
4.1.1	Einordnung der Fäkalisolate in phylogenetische Gruppen anhand der <i>Escherichia coli</i> Reference Collection (ECOR).....	49
4.1.2	Weiterführende Charakterisierung der Colibactin-Gencluster positiven Bakterienstämme.....	50
4.2	Der chromosomale Kontext des Colibactin-Genclusters in <i>Citrobacter koseri</i> Frederiksen ATCC BAA-895	53
4.2.1	Nachweis des ICE <i>Ck1</i> aus <i>Citrobacter koseri</i> Frederiksen in weiteren Bakterienstämmen der Art <i>Citrobacter koseri</i>	54
4.3	Bestimmung der chromosomalen Integrationsstellen des Colibactin-Genclusters in verschiedenen Bakterienstämmen der Familie <i>Enterobacteriaceae</i>	57
4.3.1	Variable chromosomale Integration des ICE <i>Ck1</i> in <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	60
4.3.2	Alternative Integrationsstelle des Colibactin-Genclusters in <i>Escherichia coli</i>	62
4.4	Untersuchungen zur Exzision und extrachromosomalen Zirkularisation des ICE<i>Ck1</i>	63
4.5	Molekulare und phänotypische Charakterisierung verschiedener Mutanten des <i>Escherichia coli</i> Stammes Nissle 1917	65
4.6	Kolonisierungsstudien im Mausmodell	72
4.6.1	Nicht-kompetitive Kolonisierungsstudie im Tiermodell.....	73
4.6.2	Kompetitive Kolonisierungsstudie im Tiermodell	76
5	Diskussion	83
5.1	Untersuchungen zur Verbreitung, genetischen Struktur, Integration und Übertragung des Colibactin-Genclusters	84
5.1.1	Verbreitung des Colibactin-Genclusters innerhalb der <i>Enterobacteriaceae</i>	84
5.1.2	Genetische Struktur des integrativen und konjugativen Elements (ICE <i>Ck1</i>) aus <i>Citrobacter koseri</i> Frederiksen	87
5.1.3	Chromosomale Integrationsstellen des Colibactin-Genclusters	88
5.1.4	Übertragung des Colibactin-Genclusters.....	90
5.2	Effekt des Colibactin-Genclusters während der Kolonisierung des murinen Intestinaltrakts	95

5.3	Schlussfolgerung und Fazit.....	98
5.4	Ausblick.....	100
6	Literaturverzeichnis	102
7	Anhang	118
7.1	Abkürzungsverzeichnis	118
7.2	Oligonukleotide.....	119
7.3	Screening des Colibactin-Genclusters	130
7.4	Vergleichende Wachstumskurven verschiedener Mutanten von <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	131
7.5	Colibactin-Gencluster-Screening: Übersicht der untersuchten Bakterienstämme.....	134
7.6	Einteilung der Fäkalisolate „Maria Souladaki“-Sammlung in phylogenetische Gruppen (ECOR-Bestimmung).....	154
7.7	Geno- und phänotypische Charakterisierung der Colibactin-positiven Fäkalisolate der „Maria Souladaki“-Sammlung	159
7.8	Publikationen und Tagungsbeiträge.....	160
7.9	Lebenslauf.....	161

ZUSAMMENFASSUNG

Horizontaler Gentransfer zwischen Bakterien – sogar zwischen verschiedenen Spezies – ist ein wichtiger Mechanismus für den Austausch genetischer Information. Dies kann dem Rezipienten einen selektiven Vorteil verleihen, z. B. durch die schnelle Aneignung von Genclustern, die für Pathogenitäts- oder Fitnessfaktoren kodieren. Die Variabilität bakterieller Genome durch Aneignung und Inkorporation genetischen Materials in das Genom trägt somit erheblich zur Evolution von Bakterien bei. Bakterielle Genome neigen allerdings dazu, nutzlose genetische Information zu verlieren und daher kann horizontal erworbener DNA häufig eine distinkte biologische Funktion zugeordnet werden.

Das Colibactin-Gencluster, welches zuerst in *Escherichia coli* gefunden wurde, weist mehrere Charakteristika einer horizontal erworbenen genomischen Insel auf. Die Größe dieser genomischen Insel beträgt 54 kb und sie umfasst 20 offene Leseraster (ORFs), von denen acht für putative Polyketidsynthasen (PKS), nichtribosomale Peptidsynthasen (NRPS) und Hybride dieser kodieren. Colibactin übt einen zytopathischen Effekt (CPE) auf eukaryotische Zellen *in vitro* aus. Nach Kokultivierung Colibactin-Gencluster-positiven Bakterien mit eukaryotischen Zellen kommt es zu DNA Doppelstrang Brüchen, Zellzyklus-Arrest in der G₂-Phase, Megalozytose und schließlich zum Zelltod. Diese Effekte sind mit denen des Zyklomodulins „Cytolethal Distending Toxin“ (CDT) vergleichbar, allerdings konnte die biologische Funktion des Colibactins *in vivo* bisher nicht aufgeklärt werden.

Das Colibactin-Gencluster wurde bisher nur in *Escherichia coli* Stämmen der phylogenetischen Gruppe B2 als individuelle genomische Insel, integriert im *tRNA-asnW*-Gen, vorgefunden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte das Colibactin-Gencluster auch in *E. coli* der phylogenetischen Gruppe B1 und in *Citrobacter koseri*, *Enterobacter aerogenes* und *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* nachgewiesen werden. In diesen Bakterienstämmen ist das Colibactin-Gencluster Teil eines genetischen Elements, das Ähnlichkeit zu integrativen und konjugativen Elementen (ICE) aus *E. coli* und *K. pneumoniae* aufweist. Im Gegensatz zur hochkonservierten Integrationsstelle des Colibactin-Genclusters in *tRNA-asnW* in *E. coli* der phylogenetischen Gruppe B2 konnte die Integrationsstelle dieses ICE in *E. coli* der Gruppe B1 in *tRNA-asnU* bestimmt werden. In Bakterienstämmen der

Spezies *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* wurden vier verschiedene Integrationsstellen in fünf analysierten Stämmen identifiziert.

Neben der Studien zur Verbreitung und chromosomalen Integration des Colibactin-Genclusters wurden Kolonisierungsstudien im murinen streptomycinbehandelten Intestinaltrakt mit *E. coli* Stamm Nissle 1917 durchgeführt, um eine mögliche Funktion des Colibactins im Darmtrakt näher zu untersuchen. Weder in nicht-kompetitiven noch in kompetitiven Versuchsdurchführungen konnte dabei ein Kolonisierungsvorteil durch Colibactin nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass das Colibactin-Gencluster in verschiedenen Spezies der *Enterobacteriaceae* vorhanden und funktional ist. Das Auftreten dieses sowohl als individuelle genomische Insel als auch als Teil eines ICE veranschaulicht die genetische Plastizität dieses Elements und die Bedeutung des horizontalen Transfers genetischen Materials. Die biologische Funktion des Colibactins *in vivo* bleibt weiterhin unklar und könnte sowohl die bakterielle Fitness als auch die Virulenz beeinflussen.

SUMMARY

Horizontal gene transfer between bacteria – even between different species – has been shown to be an important mechanism for exchange of genetic material. This may confer a selective advantage to the recipient, e. g. the rapid acquisition of gene clusters coding for pathogenicity or fitness factors. The variability of bacterial genomes enabled by acquisition and incorporation of genetic material into their genome contributes considerably to bacterial evolution. Bacterial genomes tend to lose useless genetic information and therefore horizontally acquired DNA can most frequently be connected to a distinct biological function.

The colibactin gene cluster initially discovered in *Escherichia coli* displays several features of a horizontally acquired genomic island. This genomic island is approximately 54 kb in size and consists of 20 open reading frames (ORFs), of which eight code for putative polyketide synthases (PKS), non-ribosomal peptide synthases (NRPS) and hybrids thereof. The synthesized hybrid non-ribosomal peptide-polyketide colibactin exerts a cytopathic effect (CPE) on eukaryotic cells, DNA double strand breaks are induced, the cells are arrested in the G₂-phase of the cell cycle and exhibit megalocytosis and cell death. These effects are comparable to the effects of the cyclomodulin cytolethal distending toxin (CDT), but the biological function of colibactin *in vivo* is still unknown.

So far the colibactin gene cluster has only been found in *Escherichia coli* strains of the phylogenetic lineage B2 as an individual genomic island integrated at the *tRNA-asnW* gene. In context of this thesis the colibactin gene cluster could be identified in *E. coli* strains of the phylogenetic group B1 as well as in *Citrobacter koseri*, *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*. In those bacterial strains the colibactin gene cluster is part of a genetic element, which exhibits similarities to integrative and conjugative elements (ICE) previously described in *E. coli* and *K. pneumoniae*. In contrast to the highly conserved integration site of the colibactin gene cluster at *tRNA-asnW* in *E. coli* of the phylogenetic lineage B2, integration at *tRNA-asnU* was determined in *E. coli* of group B1. In bacterial strains of the species *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* four different integration sites in a total of five strains were identified.

Besides the surveys concerning the distribution and chromosomal integration of the colibactin gene cluster colonization studies of the murine streptomycin-treated intestinal tract were conducted using *E. coli* strain Nissle 1917 to examine a possible effect of colibactin in this context. However, there was no evidence providing a colibactin-related advantage during colonization neither in non-competitive nor in competitive experimental setups.

In this thesis the existence and functionality of the colibactin gene cluster within different species of the *Enterobacteriaceae* was shown. Its occurrence as an individual genomic island as well as a part of an ICE demonstrates the genetic plasticity of this element and the impact of horizontally transferred genetic material. The biological function of colibactin *in vivo* remains to be elucidated and may affect both bacterial fitness and virulence.

1 EINLEITUNG

1.1 Die bakterielle Darmflora des Menschen

Die bakterielle Flora des Gastrointestinaltrakts von Tieren ist im Vergleich zu anderen Körperregionen die am eingehendst untersuchte. Die Zusammensetzung unterscheidet sich sowohl zwischen verschiedenen Spezies als auch innerhalb derselben Spezies. In Menschen wird die Zusammensetzung der bakteriellen Darmflora durch verschiedene Faktoren wie Alter, Ernährungsweise, kulturelle Bedingungen und der Verwendung von Antibiotika beeinflusst (Todar 2006).

Während im Magen von Menschen aufgrund des stark sauren Milieus nur wenige Bakterien gefunden werden können, beherbergt der proximale Teil des Dünndarms $10^5 - 10^7$ Bakterien pro Milliliter Inhalt. Die Anzahl der Bakterien steigt im distalen Dünndarm auf ca. 10^8 Bakterien pro Milliliter an (Todar 2006). Die höchste Anzahl an Bakterien findet sich im menschlichen Dickdarm. Das menschliche Colon ist mit einer dichten und komplexen Gemeinschaft hauptsächlich anaerober Bakterien besiedelt, deren Zellzahlen 10^{11} Bakterien pro Gramm überschreiten können (Flint *et al.* 2007). Der Gastrointestinaltrakt eines Erwachsenen beherbergt mindestens 17 bakterielle Familien, welche zwischen 400 und 500 verschiedene Arten beinhalten. Die Stoffwechselaktivitäten dieser Mikroorganismen haben einen großen Einfluss auf Ihren menschlichen Wirt. Diesem werden dadurch zusätzliche Nährstoffe zur Verfügung gestellt, die er nicht selbst synthetisieren kann, aber auch vorhandene Stoffwechselprodukte weiter umgewandelt. Zusätzlich wird durch die Interaktion kommensaler Mikroorganismen mit Zellen des Gastrointestinaltrakts das Immunsystem positiv beeinflusst (Yan & Polk 2004; Flint *et al.* 2007).

Der größte Teil der im menschlichen Colon vorhandenen Bakterien besteht aus Gram-positiven mit niedrigem GC-Gehalt (*Firmicutes*) und Gram-negativen *Bacteroidetes*. Insgesamt gehört die Mehrheit von 98 % aller Bakterien der menschlichen Gastrointestinalflora zu nur vier verschiedenen Phyla: *Firmicutes* (64 %), *Bacteroidetes* (23 %), *Proteobacteria* (8 %) und *Actinobacteria* (3 %). Andere

taxonomische Phyla sind unterdessen in Ihrem Vorkommen sehr unterschiedlich vertreten (Hattori & Taylor 2009).

1.2 Die Familie der *Enterobacteriaceae*

Die Familie der *Enterobacteriaceae* umschreibt eine große, biochemisch und genetisch verwandte Gruppe von Mikroorganismen. Diese weisen eine beachtliche Heterogenität bezüglich ihrer Ökologie, ihres Wirtsspektrums, und Ihrer Pathogenität gegenüber Menschen, Säugetieren, Insekten und Pflanzen auf. Phylogenetisch gehört die Familie der *Enterobacteriaceae* zu den Gammaproteobakterien. Die phylogenetische Verwandtschaft der Gattungen innerhalb der *Enterobacteriaceae*, ermittelt anhand 16S-rRNA-Sequenzierung verschiedener Bakterienstämme, ist in Abbildung 1.1 dargestellt (Brenner *et al.* 1984).

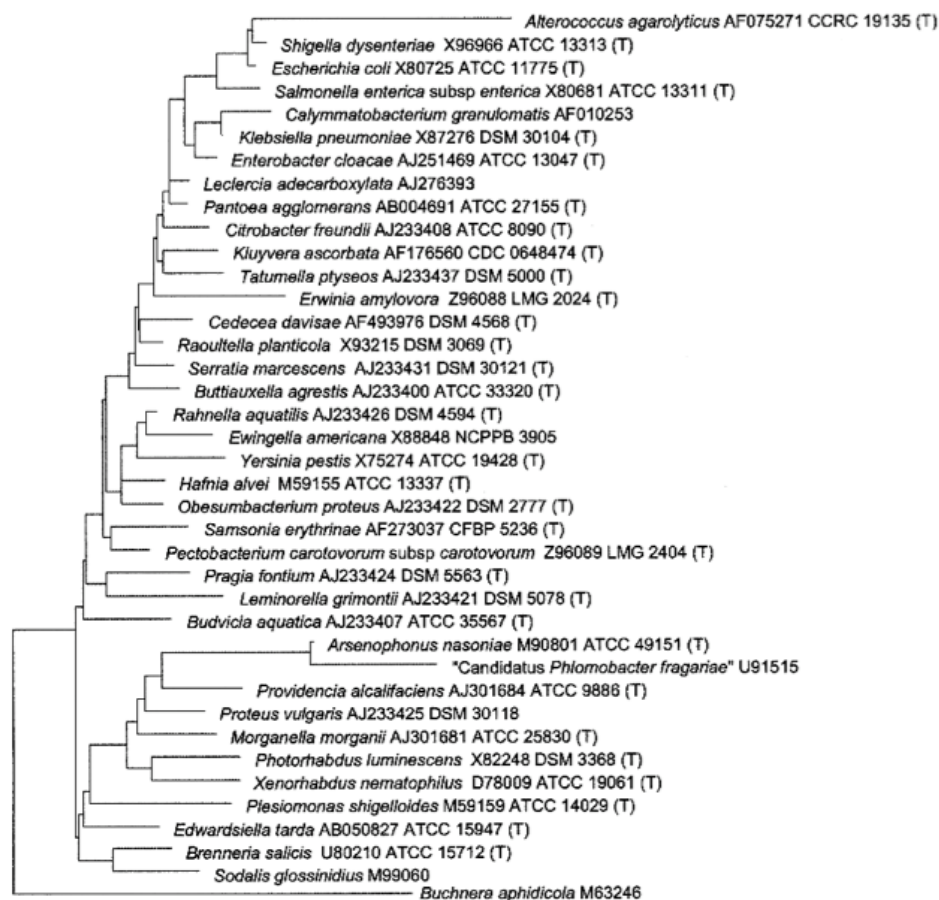


Abbildung 1.1: Phylogenetischer Verwandtschaftsgrad der Gattungen der Familie *Enterobacteriaceae* ermittelt anhand 16S-rRNA-Sequenzierung. Aus: Brenner *et al.* 1984

Enterobakterien sind Gram-negative Stäbchen, die meist aufgrund peritricher Flagellen bewegungsfähig sind. Sie bilden keine Endosporen oder Mikrozysten und sind nicht säure-beständig. Aufgrund des Vorhandenseins sowohl eines respiratorischen als auch fermentativen Metabolismus wachsen Enterobakterien sowohl aerob als auch anaerob. Der GC-Gehalt innerhalb der Familie der *Enterobacteriaceae* liegt bei 38 - 60 % (Brenner *et al.* 1984).

1.3 Die Spezies *Escherichia coli*

Escherichia coli gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae* und ist eng verwandt mit der Gattung *Shigella*. Nahe Verwandtschaft besteht zu den Gattungen *Citrobacter*, *Salmonella* und *Klebsiella*. *E. coli* Bakterien sind Gram-negative, fakultativ anaerobe Stäbchen von etwa 1,1 - 1,5 µm Dicke und 2,0 - 6,0 µm Länge. Sie sind größtenteils harmlose, kommensale Bewohner des menschlichen Intestinaltrakts und machen etwa 0,1 - 0,01 % der gesamten Darmflora aus (Todar 2006). Erstmals beschrieben wurde die Spezies *E. coli* 1885 von Theodor Escherich unter dem Namen *Bacterium coli commune* (Escherich 1886).

E. coli Bakterien besitzen einen hohen Grad an morphologischer Vielfalt bezüglich der Kolonieformen. Anhand serologischer Einteilung lassen sich diese Bakterien noch detaillierter unterscheiden. Diese Klassifizierung unterschiedlicher *E. coli* Stämme wird durch die Serotypisierung ihrer O- (LPS), K- (Kapsel) und H- (Flagelle) Antigene möglich. Durch Kombination dieser Antigenstrukturen ergeben sich verschiedene Serovare (Kauffmann 1965). Verschieden Serotypen von *E. coli* können bestimmten Erkrankungen zugeordnet werden. Allerdings wird die Pathogenität dieser Bakterienstämme nicht den Oberflächenantigenen selbst zugeschrieben. Vielmehr handelt es dabei um klonale Abstammungslinien, welche als „Wirte“ für horizontal übertragene Virulenzgene dienen und somit pathogene Eigenschaften erlangten (Zingler *et al.* 1992).

Pathogene *E. coli* können anhand der Erkrankungen, die sie auslösen, in verschiedene Gruppen eingeteilt werden: Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC), enterotoxische *E. coli* (ETEC), enteropathogene *E. coli* (EPEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), diffus adhärente *E. coli* (DAEC),

uropathogene *E. coli* (UPEC), Neugeborenen-Meningitis auslösende *E. coli* (NMEC) und Sepsis auslösende *E. coli* (SEPEC) (Kaper *et al.* 2004).

Gegenwärtig ist das Bakterium *E. coli* einer der am besten untersuchten Mikroorganismen und hat sich außerdem bei seiner Verwendung in molekularbiologischen Laboratorien als unverzichtbares Werkzeug erwiesen.

1.3.1 *Escherichia coli* Nissle 1917

Der *E. coli* Stamm Nissle 1917 (O6:K5:H1) ist ein nicht-pathogenes, kommensales Isolat, das im Jahr 1917 von Prof. Dr. med. Alfred Nissle aus dem Stuhl eines deutschen Soldaten angereichert wurde, der als einziger seiner Einheit nicht an einer grassierenden Durchfall-Epidemie erkrankt war (Nissle 1918). Heute wird der Stamm unter der Markenbezeichnung Mutaflor® zur Behandlung von Obstipation, Dyspepsie, Kolitis, Enteritis, Gastroenteritis, Fällen von Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüren sowie zur Vorbeugung von Infektionen mit *Candida albicans* nach Antibiotika-Therapien eingesetzt (Mollenbrink & Bruckschen 1994; Lodinova-Zadnikova & Sonnenborn 1997; Malchow 1997; Rembacken *et al.* 1999; Kruis 2001).

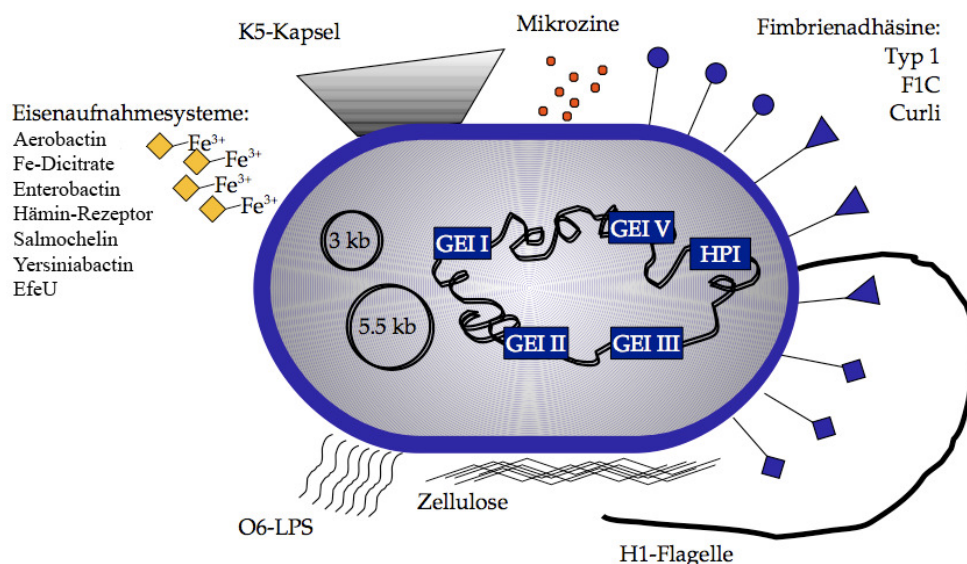


Abbildung 1.2: Eigenschaften von *E. coli* Nissle 1917. Schematische Darstellung der wichtigsten Oberflächenstrukturen und anderer Faktoren, die zur Fitness des Stammes beitragen. Modifiziert nach J. Hacker.

Der *E. coli* Stamm Nissle 1917 – auch SK22 oder DSM6601 genannt – weist einige außergewöhnliche Charakteristika auf. Zu diesen zählen die Präsenz von sieben Eisenaufnahmesystemen (Grozdanov *et al.* 2004, Grosse *et al.* 2006), die Produktion von zwei Mikrozininen (Patzner *et al.* 2003), das Vorhandensein zweier Plasmide unbekannter Funktion (Blum-Oehler *et al.* 2003) und die Bildung von Biofilmen bei 37 °C (siehe Abbildung 1.2). Des Weiteren besitzt *E. coli* Nissle 1917 keine Virulenzgene, ist serumsensitiv aufgrund der Ausbildung eines semi-rauhen Lipopolysaccharids (Grozdanov *et al.* 2002) und kann den menschlichen Darm effektiv kolonisieren (Malchow 1995).

In weiterführenden Studien mit *E. coli* Nissle 1917 konnte die Induktion zellulärer Abwehrmechanismen in Form der Expression des antimikrobiellen Peptids hBD-2 (humanes beta-Defensin-2) in Caco-2-Zellen nachgewiesen werden (Wehkamp *et al.* 2004) sowie die erhöhte Expression von Genen, die für die proinflammatorischen Moleküle MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), MIP-2 α (Macrophage Inflammatory Protein-2 alpha) und MIP-2 β (Macrophage Inflammatory Protein-2 beta) kodieren (Ukena *et al.* 2005). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit *E. coli* Nissle 1917 keinen Effekt auf die Migration, die klonale Ausbreitung und den Aktivierungsstatus spezifischer CD4⁺-T-Zellen ausübt (Westendorf *et al.* 2005).

In seiner Eigenschaft als nicht-pathogener, kommensaler Bakterienstamm ist *E. coli* Nissle 1917 in den letzten 20 Jahren von verschiedenen Forschergruppen näher untersucht worden. Die Anhäufung von Fitnessfaktoren, die diesen Bakterienstamm auszeichnet, und seine probiotischen Eigenschaften machen *E. coli* Nissle 1917 zu einem beliebten Modellorganismus in Wissenschaft und Forschung.

1.4 Bakterielle Fitness und Virulenz

Die erfolgreiche Besiedelung verschiedener Lebensräume setzt bei allen Organismen eine entsprechende Anpassung an die gegebenen Umweltfaktoren voraus. So sind auch verschiedene Bakterienstämme an bestimmte ökologische Nischen angepasst und sind somit in der Lage sich dort erfolgreich etablieren zu

können. Diese Anpassung geschieht im Allgemeinen auf mehreren Ebenen. Die grundlegendste Voraussetzung für die erfolgreiche Besetzung einer ökologischen Nische ist das Vorhandensein geeigneter Stoffwechselfähigkeiten. Die optimale Verwertung der gegebenen Nahrungs- und Energiequellen gewährleistet eine effektive Kolonisierung. Um die dauerhafte Kolonisierung einer ökologischen Nische zu erreichen, besteht die Notwendigkeit, adäquat auf Veränderungen der Umwelteinflüsse reagieren zu können, indem z. B. auch alternative Energiequellen als Folge eines veränderten Nahrungsangebots verwertet werden können. Eine andere Möglichkeit auf Veränderungen der Umwelt zu reagieren ist das Ausweichen auf andere Habitate. Zusätzlich wird sich ein Organismus auch nach erfolgreicher Anpassung an bestimmte Umweltgegebenheiten in Konkurrenz zu anderen Organismen befinden, die denselben Lebensraum einnehmen. Die Konkurrenzfähigkeit kann in einer solchen Situation durch die Produktion sekundärer Stoffwechselprodukte erhöht werden, die in der Lage sind andere konkurrierende Mikroorganismen zu hemmen (z. B. durch die Produktion von Siderophoren zur Aufnahme limitierender Wachstumsfaktoren) oder sogar abzutöten. Zu solchen sekundären Stoffwechselprodukten gehören z. B. Antibiotika (Waksman & Woodruff 1940) aber auch Substanzen mit einem engeren Wirkungsspektrum wie Colicine und Mikroazine (Gillor *et al.* 2004). Eigenschaften, die das Überleben und die Verbreitung eines Organismus in einer speziellen ökologischen Nische fördern, werden im Allgemeinen als Fitnessfaktoren bezeichnet (Preston *et al.* 1998). Die Fitness eines Organismus trägt somit maßgeblich zu dessen Etablierung unter bestimmten Umweltbedingungen bei und ist ein Ergebnis seiner Evolution („Survival of the fittest“ – Charles Darwin).

Die oben genannten Fitnessfaktoren von Mikroorganismen tragen hauptsächlich zu deren Überleben und Persistenz in einer ökologischen Nische bei, ohne den (menschlichen) Wirt zu schädigen. Im Gegensatz zu solch kommensalen und probiotischen Mikroorganismen, die die Gesundheit ihres Wirts nicht beeinträchtigen bzw. sogar einen gesundheitsfördernden Effekt auf ihren Wirt ausüben können, stehen pathogene Mikroorganismen, die während der Besiedelung und ihrer Vermehrung dem Wirt Schaden zufügen. Um erfolgreich eine Infektion, also eine effektive Besiedelung des entsprechenden Wirts, auslösen zu können, besitzen pathogene Bakterien bestimmte Faktoren, die die anfängliche Kolonisierung und im Folgenden die Schädigung des Wirts ermöglichen. Nach einer erfolgten Besiedelung

eines Gewebes oder Organs des Wirts kann es zur teilweisen oder sogar vollständigen Zerstörung desselben kommen, was dem Bakterium meist der Nahrungsbeschaffung und -aufnahme (z. B. durch Zerstörung von Gewebe) oder der Verbreitung (Durchfall, Husten) dient (Wassenaar & Gaastra 2001).

Die initiale Kolonisierung von Geweben und Organen wird häufig durch Adhäsine wie z. B. Fimbrien und Pili vermittelt. Diesen wird eine wichtige Funktion bei der Adhärenz an extrazelluläre Matrixproteine von Säugern zugesprochen (Korhonen 2000). Bakterielle Toxine wie z. B. Hämolsine sind in der Lage, eukaryotische Zellen zu schädigen. Im Falle des α -Hämolsins kommt es durch die membranschädigende Wirkung zur Lyse der eukaryotischen Zelle (Tilley & Saibil 2006). Sekretionssysteme werden dabei von Bakterien genutzt um Effektormoleküle über die Membran und Zellwand ins umgebende Milieu zu sezernieren oder direkt in eukaryotische Wirtszellen zu transferieren (Tseng *et al.* 2009).

Ein weiterer für das Wachstum von Bakterien essentieller Faktor ist die Verfügbarkeit von Eisen. Eisen ist ein essentielles Spurenelement in fast allen Lebewesen und ist in Tieren vor allem wichtig für die Blutbildung. Im Körper liegt Eisen oxidiert als Fe(II) oder Fe(III) vor. Da Eisen in zu hohen Konzentrationen toxisch ist, ist die Verfügbarkeit von freiem Eisen im menschlichen Körper streng limitiert. Daher benötigen Bakterien, die den menschlichen Körper besiedeln, bestimmte Faktoren, um ihren Eisenbedarf decken zu können. Es sind verschiedene bakterielle Eisenaufnahmesysteme bekannt, die mit Hilfe von Siderophoren die Eisenversorgung der Bakterien garantieren können (Guerinot 1994; Krewulak & Vogel 2008).

Solche Eisenaufnahmesysteme konnten bereits in einigen Fällen als Virulenzfaktoren identifiziert werden. Allerdings kann bei der Unterscheidung zwischen einem Fitnessfaktor und einem Virulenzfaktor nicht immer eine klare Grenze gezogen werden. Ein Beispiel hierfür ist das Siderophor Yersiniabactin, welches auf der „High Pathogenicity Island“ (HPI) von *Yersinia* spp. kodiert ist (Carniel *et al.* 1996). Für dieses Eisenaufnahmesystem konnte gezeigt werden, dass es für die Virulenz von *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* Serotyp O1 und *Y. enterocolitica* Biotyp 1B im Mausmodell notwendig ist (Carniel 1999) und auch die Virulenz anderer pathogener *Enterobacteriaceae* erhöht (Bach *et al.* 2000; Schubert *et al.* 2002; Oelschlaeger *et al.* 2003). Im Gegensatz dazu konnte dem Siderophor Yersiniabactin in *E. coli* 536 keine Erhöhung der Virulenz zugeschrieben werden (Brzuszkiewicz *et al.* 2006). Da

auch der nicht-pathogene *E. coli* Stamm Nissle 1917 die HPI besitzt und Yersiniabactin exprimiert, kann dieses nicht als absoluter Virulenzfaktor bezeichnet werden, sondern vielmehr als Fitnessfaktor. Bei der Unterscheidung zwischen Virulenz- und Fitnessfaktor muss auch immer der ökologische Kontext in Betracht gezogen werden, da viele Faktoren, die die Virulenz von Pathogenen erhöhen auch in nicht-pathogenen Mikroorganismen zu finden sind. Diese Faktoren erhöhen also die Fitness eines Mikroorganismus und sind nicht zwangsläufig für erhöhte Pathogenität verantwortlich (Dobrindt *et al.* 2003).

1.5 Horizontaler Gentransfer und Genom-Plastizität

Bakterielle Genome können sich durch verschiedene Prozesse wie Mutationen, Reorganisation und horizontalen Gentransfer verändern und weiterentwickeln. Die rapide Zunahme an verfügbaren sequenzierten Genomen während der letzten Jahre hat gezeigt, dass bakterielle Genome neben den essentiellen Genen, die für metabolische Funktionen kodieren, auch unterschiedlich viele Gene durch horizontalen Gentransfer erworben haben. Diese zusätzlichen Gene kodieren meist für adaptive Eigenschaften, die unter bestimmten Wachstums- und Umweltbedingungen für das Bakterium von Vorteil sein können (Schmidt & Hensel 2004). Der laterale Genaustausch befähigt gewisse Bakterien, vollkommen neue ökologische Nischen zu besetzen (Burrus & Waldor 2004).

Der horizontale Gentransfer, also die Übertragung von genetischer Information von einem Bakterium zum anderen durch Mechanismen wie Transformation, Konjugation und Transduktion, trägt nicht nur maßgeblich zur Variabilität des Genoms bei, sondern spielt auch eine bedeutende Rolle während der Evolution von Bakterien (Hacker & Carniel 2001). Das Genom von Bakterien kann in zwei Bereiche aufgeteilt werden: Den konservierten Bereich (core gene pool), der zum größten Teil allen Vertretern einer Spezies gemein ist, und den flexiblen Bereich (flexible gene pool), der auch innerhalb einer Spezies variieren kann (Dobrindt & Hacker 2001). Während die Gene des konservierten Bereichs für grundlegende zelluläre Prozesse kodieren, können die Gene des flexiblen Bereichs ganz unterschiedliche Funktionen besitzen. Dabei handelt es sich meist um Eigenschaften, die es einem Bakterium ermöglichen

sich an einen bestimmten Lebensraum besonders gut anzupassen und in diesem zu überleben. Diese Faktoren können beispielsweise der Symbiose dienen, aber auch allgemeine Wirt-Interaktionen determinieren bis hin zur Ausbildung von Pathogenität (Hentschel *et al.* 2000). Der Anteil an horizontal erworbener genetischer Information am Gesamtgenom kann je nach Organismus zwischen null und 17 Prozent betragen (Abbildung 1.3) (Ochman *et al.* 2000). Die durch horizontalen Gentransfer erworbenen DNA-Abschnitte können meist aufgrund eines abweichenden GC-Gehalts im Vergleich zum Kerngenom des jeweiligen Bakteriums identifiziert werden. Zudem weicht auch die Codonverwendung solcher DNA-Abschnitte von dem des Kerngenoms ab (Lawrence & Ochman 1998). Auch die Integration solcher horizontal erworbener DNA-Abschnitte scheint nicht willkürlich an beliebiger Stelle im bakteriellen Chromosom zu erfolgen, sondern an bevorzugten Stellen. Als eine solche bevorzugte Integrationsstelle für horizontale DNA konnten tRNA-Gene identifiziert werden (Hou 1999). So wurde beispielsweise für die „High Pathogenicity Island“ (HPI) von *Yersinia* spp. gezeigt, dass diese in *Enterobacteriaceae* typischerweise in dem *asnT-tRNA*-Gen inseriert ist (Carniel *et al.* 1996). Neben tRNA-Genen existieren aber auch noch andere mögliche Integrationsstellen wie z. B. *galF* von *E. coli* (Tarr *et al.* 2000).

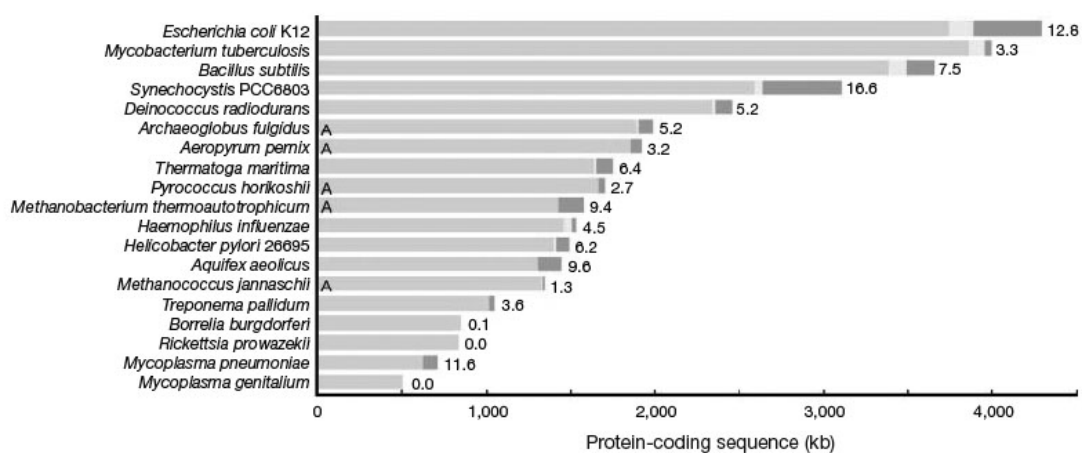


Abbildung 1.3: Verteilung horizontal erworbener DNA in sequenzierten bakteriellen Genomen. Das Kerngenom ist grau, mobile Elemente (Transposons, Bakteriophagen) hellgrau und Fremd-DNA dunkelgrau dargestellt. Der prozentuale Anteil an Fremd-DNA ist rechts am Balken angegeben. A: Archaeen-Genome. Ochman *et al.* 2000

Oftmals ist horizontal erworbenes genetisches Material in Form von größeren DNA-Blöcken im Genom vorzufinden. Diese DNA-Bereiche werden je nach Größe als kleine genomische Inseln („genomic islet“ < 10 kb) oder als genomische Inseln („genomic island“ > 10 kb) bezeichnet (Hacker & Kaper 2000). Der Großteil der bekannten genomischen Inseln (GEIs) besitzt die folgenden Merkmale: **(1)** Die Größe reicht von 10 kb bis zu 200 kb. **(2)** Abweichender GC-Gehalt und Codonverwendung im Vergleich zum restlichen Chromosom. **(3)** Insertion in das Chromosom findet oft in tRNA-Genen statt. **(4)** GEIs sind häufig von 16-20 bp direkten Wiederholungs-sequenzen (DR) flankiert, die bei der Integration entstehen und auch als Erkennungssequenz für die enzymatische Exzision aus dem Chromosom dienen können. **(5)** GEIs beinhalten häufig funktionelle oder kryptische Gene, welche für Integrasen oder andere Faktoren kodieren, die mit Konjugationssystemen oder Phagen in Verbindung stehen. **(6)** GEIs tragen häufig Insertionselemente oder Transposons (Buchrieser *et al.* 1998; Gal-Mor & Finlay 2006). **(7)** GEIs tragen häufig Gene, welche dem Wirtsbakterium einen selektiven Vorteil verleihen (Abbildung 1.4). Entsprechend der vorhandenen Gene werden diese genomischen Inseln als Pathogenitäts-, Symbiose-, metabolische, Fitness- oder Resistenz-Inseln bezeichnet (Dobrindt *et al.* 2004; Schmidt & Hensel 2004).

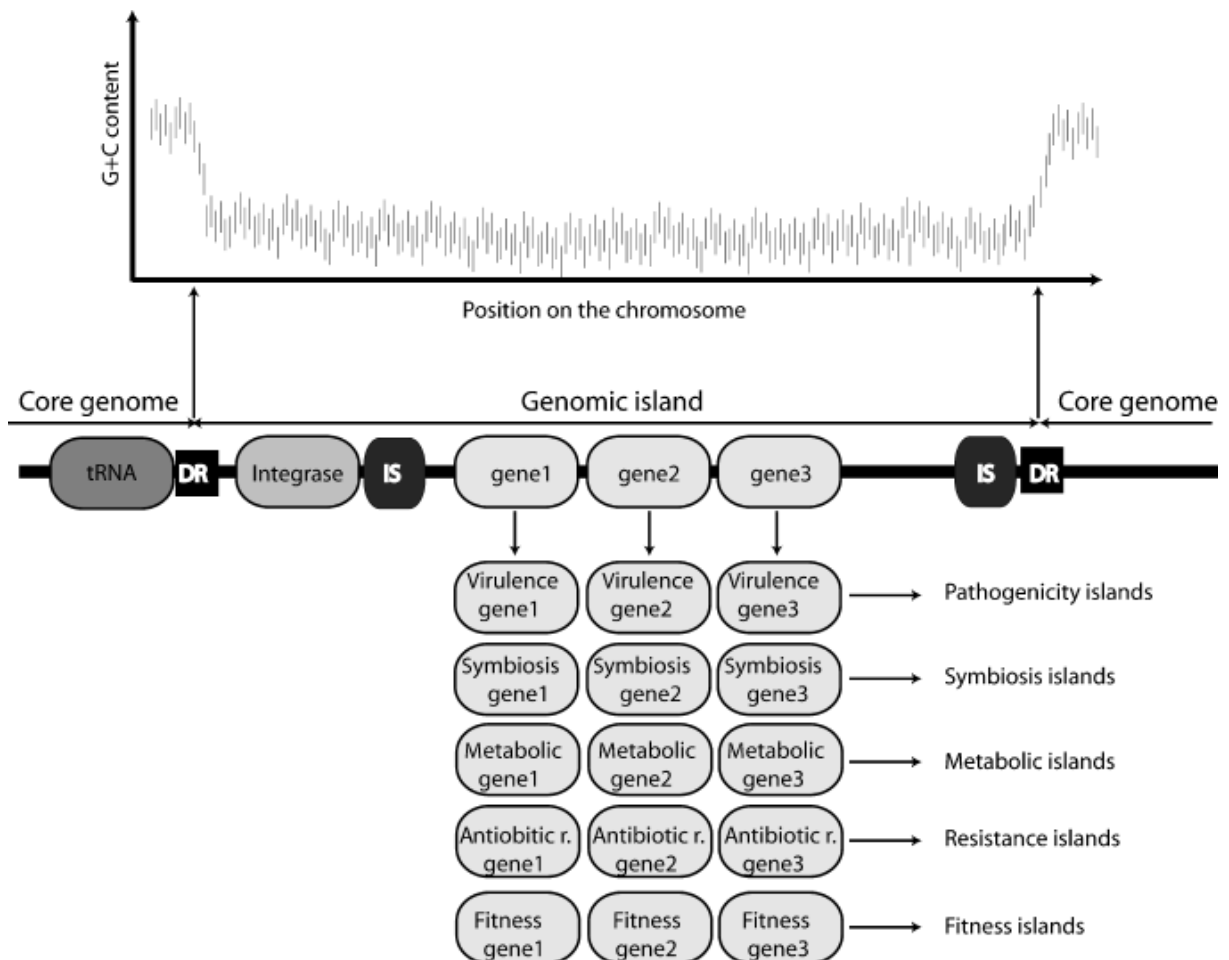


Abbildung 1.4: Merkmale genomischer Inseln (GEIs). GEIs sind relativ große DNA Bereiche, die sich in der Nukleotidcharakteristik vom restlichen Chromosom unterscheiden. Sie sind oft in tRNA-Genen inseriert und von direkten Wiederholungssequenzen (DR) flankiert. Je nach ihrem Gen-Gehalt können GEIs als Pathogenitäts-, Symbiose-, metabolische, Fitness- oder Resistenz-Inseln bezeichnet werden. Aus Juhas *et al.* 2009

Neben genomischen Inseln, die zwar durch horizontalen Gentransfer erworben wurden, aber nicht mehr selbst übertragbar sind oder es nie waren (Hentschel & Hacker 2001), gibt es eine Gruppe mobiler genetische Elemente, die als integrative und konjugative Elemente bezeichnet werden. Unter einem „Integrative and Conjugative Element (ICE)“ versteht man ein mobiles genetischen Element, welches integrative und konjugative Eigenschaften aufweist (Burrus *et al.* 2002). Diese selbst übertragbaren Elemente besitzen weiterhin plasmid- oder phagenähnliche Merkmale und haben die Fähigkeit sich in das bakterielle Chromosom zu integrieren. Ihre Übertragung erfolgt durch Konjugation. Die allgemeine Struktur eines ICE ist relativ einfach und besteht aus drei individuellen funktionalen Modulen: (1) ein Modul zur

Erhaltung des ICE, (2) eines zur Verbreitung und (Blattner *et al.*) eines zur Regulation (Burrus & Waldor 2004). ICEs integrieren im Gegensatz zu Plasmiden, die autonom replizieren, in ein Replicon des Wirts (Plasmid oder Chromosom) mittels einer Rekombinase (oft als *Int* bezeichnet). Diese Rekombinase katalysiert die Integration eines zirkulären Intermediats des ICE in das bakterielle Chromosom durch Rekombination zwischen den Erkennungssequenzen *attP* und *attB* wodurch zwei Verbindungssequenzen zwischen ICE und Chromosom entstehen, *attL* und *attR*. Die Erkennungssequenz *attB* im Chromosom des Wirts kann dabei sehr variabel sein wie beispielsweise für Tn916, welches an AT-reichen Regionen im natürlichen Wirt *Enterococcus faecalis* integriert (Scott *et al.* 1994). Alternativ kann es auch nur eine sehr spezifische Erkennungssequenz geben, wie bei ICE SXT von *Vibrio cholerae*, welches an dem 5'-Ende des Gens *prfC* integriert (Hochhut & Waldor 1999). Allerdings kann ICE SXT bei Fehlen von *prfC* auch an abweichenden Stellen integrieren (Burrus & Waldor 2003). Ein weiterer Faktor, der oft als *Xis* bezeichnet wird (für Exzisionase), wird für die Exzision des ICE benötigt. Diese vielfältigen Proteine katalysieren die Rekombination zwischen linker und rechter ICE-Chromosom- Verbindungssequenz (*attL* und *attR*) und erlauben somit die Exzision des Elements (Lewis & Hatfull 2001). Es wird vermutet, dass es noch andere Faktoren gibt, die den Verlust von extrachromosomalen, also aus dem Chromosom wieder ausgeschnittenen ICEs, verhindern, da ein Verlust verschiedener ICEs während der Zellteilung nicht beobachtet werden konnte (Burrus & Waldor 2004).

Die Verbreitung von ICEs erfolgt wie auch bei konjugativen Plasmiden durch Konjugation. Die erforderlichen Gene für die Ausbildung der Konjugations-Paarung sind auf dem ICE selbst vorhanden. Die Module zur Verbreitung der ICEs sind, wie auch die für deren Erhaltung, sehr mannigfaltig. Es wird allerdings angenommen, dass die ICEs in den meisten Fällen als einzelsträngige DNA transferiert werden (Grohmann *et al.* 2003).

Die Gene und Mechanismen, welche den Transfers von ICEs regulieren, sind bisher noch nicht gut untersucht und verstanden. Es ist aber schon jetzt abzusehen, dass diese Mechanismen sehr unterschiedlich sind. Anhand einiger Untersuchungen zum Transfer verschiedener ICEs wurde beobachtet, dass z. B. subinhibitorische Konzentrationen von Tetrazyklin den Transfer von bestimmten ICEs induzieren können (Salyers *et al.* 1995). Für ein weiteres ICE wurde gezeigt, dass die Anwesenheit von 3-Chlorbenzoat im Medium die Expression der Rekombinase

stimuliert, wohingegen weder eine hohe Zelldichte, Hitzeschock, osmotischer Schock, UV-Bestrahlung noch Ethanol-Stress einen Effekt ausübten (Sentchilo *et al.* 2003).

Genauso wie im Falle der genomischen Inseln können auf ICEs ganz unterschiedliche Eigenschaften kodiert sein. Dies reicht von der Fähigkeit bestimmte Stoffe zu verwerfen über Resistenz gegen bestimmte Antibiotika bis hin zu Virulenzfaktoren (Burrus & Waldor 2004).

1.6 Das Colibactin-Gencluster

Das Colibactin-Gencluster ist ein ca. 54 kb großer genomischer Bereich, der ursprünglich in der Spezies *E. coli* gefunden wurde. Dieser Bereich kann als genomische Insel bezeichnet werden, da er mehrere typische Charakteristika für horizontal erworbene DNA aufweist. So konnte auf Nukleotidebene ein im Vergleich zum Kerngenom von *E. coli* Stamm CFT073 leicht erhöhter G+C-Gehalt des Colibactin-Genclusters von 52,97 % zu 50,5 % festgestellt werden. Des Weiteren ist diese genomische Insel in *E. coli* Stämmen der phylogenetischen Gruppe ECOR-B2 in einem tRNA-Gen (*asnW*) inseriert. Zusätzlich beinhaltet diese Insel eine P4-ähnliche Integrase und der gesamte DNA-Bereich wird von zwei 16 bp DR-Sequenzen flankiert. Das Colibactin-Gencluster selbst kodiert einen Apparat von Enzymen, der ein Peptid-Polyketid-Hybrid synthetisiert. Darunter befinden sich drei nichtribosomale Peptid Synthasen (NRPS), drei Polyketid Synthasen (PKS), zwei hybride NRP/PK Synthasen und neun weitere akzessorische und modifizierende Enzyme (Abbildung 1.5). Durch systematische Mutagenese der Gene des Colibactin-Genclusters konnte gezeigt werden, dass alle NRPS und PKS und acht der neun zusätzlichen Gene für die phänotypische Ausprägung notwendig sind. Einzig die Mutation einer putativen Efflux-Pumpe hatte keinen Effekt auf den Phänotyp, was möglicherweise auf die Übernahme dieser Funktion durch eine andere, chromosomal kodierte Efflux-Pumpe zurückzuführen ist (Nougayrede *et al.* 2006).

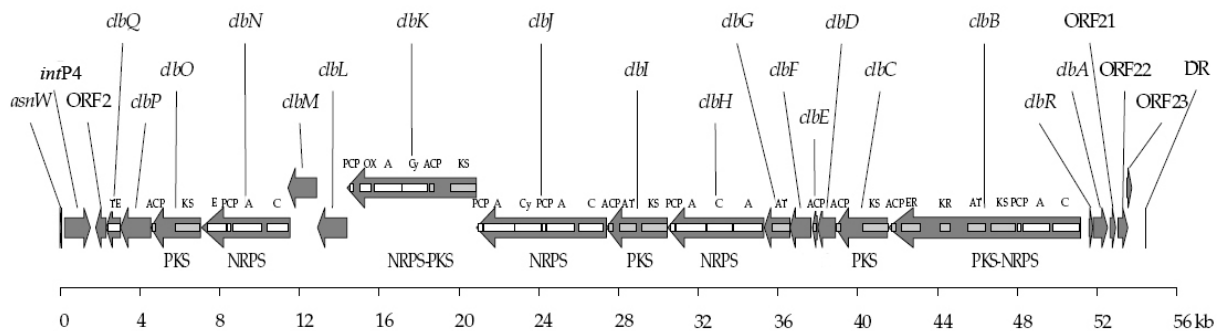


Abbildung 1.5: Das Colibactin-Gencluster aus *E. coli* IHE3034. Schematische Darstellung des Colibactin-Genclusters inklusive der Gene und ermittelter putativer PKS/NRPS-spezifischer Domänen der kodierten Proteine. DR: direct repeat; *asnW*: *asnW-tRNA*-Gen; *intP4*: P4-ähnliche Integrase; A: Adenylierung; ACP: Acyl-Carrier-Protein; AT: Acyltransferase; C: Kondensation; Cy: Zyklisierung; ER: Enoylreduktase; KR: Ketoacylreduktase; KS: Ketoacylsynthetase; OX: Oxidation; PCP: Peptidyl Carrier Protein. PKS-Domänen sind grau, NRPS-Domänen weiß als Rechtecke innerhalb der die ORFs kennzeichnenden Pfeile dargestellt. Aus: Homburg 2007

Eine vorübergehende *in vitro* Infektion verschiedener Säugerzelllinien mit Colibactin-positiven Bakterienstämmen resultiert in Megalozytose der eukaryotischen Zellen, deren Zellkörper und Nukleus sich fortschreitend vergrößern und die sich nicht mehr teilen (Abbildung 1.6). Dieser zytopathische Effekt (CPE) ist strikt kontaktabhängig und wird nur durch lebensfähige Bakterien ausgelöst. Räumliche Trennung der Bakterien von den eukaryotischen Zellen resultiert in der Aufhebung dieses CPE. Auch nach Hitzeinaktivierung oder Abtöten der Bakterien durch Gentamycin sowie bei Verwendung von bakteriellen Kulturüberständen oder Bakterienlysaten kann kein zytopathischer Effekt mehr beobachtet werden. Die Inhibition der Internalisierung von Bakterien seitens der eukaryotischen Zellen durch Cytochalasin-D hat hingegen keinen Effekt auf die Ausprägung des CPE. Nähere Analysen der eukaryotischen Zellen haben gezeigt, dass deren Nukleus einen DNA-Gehalt von 4n aufweist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der Zellzyklus in der G₂-Phase gestoppt wird, was auf die Schädigung der DNA durch DNA-Doppelstrangbrüche zurückzuführen ist (Nougayrede *et al.* 2006).

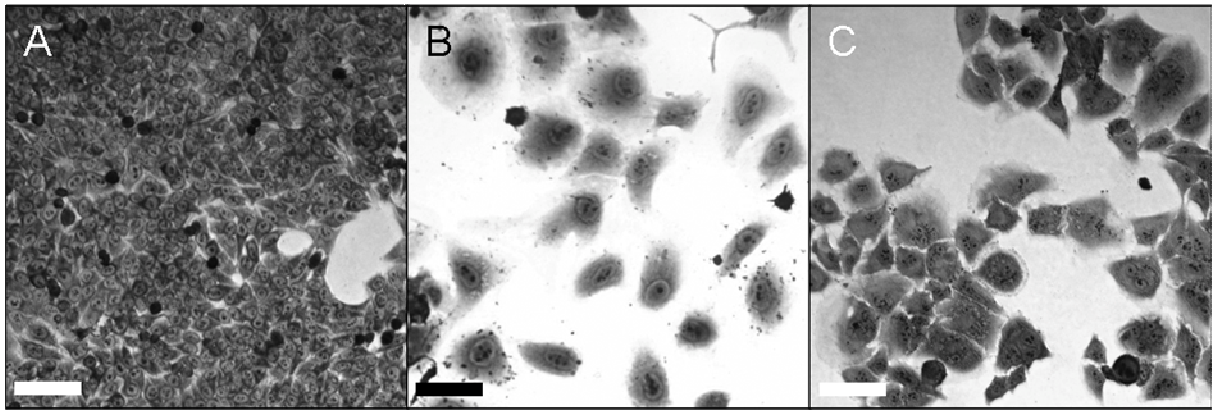


Abbildung 1.6: Zytopathischer Effekt von Colibactin. Dargestellt sind HeLa-Zellen bei gleicher Vergrößerung nach Inkubation mit A. *E. coli* K-12 DH10B pBeloBAC11, B. *E. coli* K-12 DH10B pBACpks und C. *E. coli* Stamm Nissle 1917. Durch Transformation des K-12 Stammes mit einem BAC, welches das Colibactin-Gencluster beinhaltet, sowie bei Verwendung des Stammes Nissle 1917, der natürlicher Träger des Colibactin-Genclusters ist, kann eine deutliche Vergrößerung der HeLa Zellen beobachtet werden. Maßstabsbalken: 100 μ m.

Der von Colibactin herbeigeführte Phänotyp auf Seiten eukaryotischer Zellen ist ausschließlich *in vitro* beobachtet worden. Bisher sind keine *in vivo* Daten zur biologischen Relevanz des Colibactin vorhanden. Der biologische Nutzen, welchen Colibactin-positive Bakterien gewinnen, ist somit noch nicht aufgeklärt. Auf der Basis phylogenetischer Analysen und der molekularen Epidemiologie konnte gezeigt werden, dass die Präsenz des Colibactin-Genclusters oft mit dem Vorhandensein weiterer Virulenzfaktoren korreliert. Im Rahmen dieser Studie wurden klinische Isolate von Patienten auf das Vorhandensein verschiedener Virulenz-assoziiertes Eigenschaften untersucht. Die so erhaltenen Daten zeigten, dass das Colibactin-Gencluster in *E. coli* der phylogenetischen Gruppe ECOR-B2 signifikant mit Bakteriämie und mehreren ExPEC typischen Virulenzgenen assoziiert ist (Johnson *et al.* 2008). Allerdings konnte bisher nicht geklärt werden, ob Colibactin selbst einen Virulenzfaktor darstellt.

1.7 Polyketide und nichtribosomale Peptide

Polyketide und nichtribosomale Peptide, zu denen auch das in Abschnitt 1.6 beschriebene Peptid-Polyketid-Hybrid Colibactin gehört, sind sekundäre Metabolite von Bakterien, Pilzen und Pflanzen. Diese Verbindungen sind strukturell sehr diverse Stoffklassen natürlicher Produkte, die extrem breit gefächerte biologische Wirkungen und pharmakologische Eigenschaften aufweisen (Staunton & Weissman 2001; Finking & Marahiel 2004). Auf pharmakologischer Seite können antibiotische, antimycotische, antitumorale und antiparasitische Wirkungen genannt werden. Daneben finden sich auch Substanzen, die andere potentiell therapeutische Wirkungen entfalten, wie z. B. das Polyketid Lovostatin aus *Aspergillus terreus*, welches cholesterinsenkende Eigenschaften besitzt oder das Makrolid FK506 aus *Streptomyces tsukubaensis*, das wegen seiner immunsupprimierenden Wirkung z. B. nach Organtransplantationen eingesetzt wird. Wichtige antibiotisch wirksame Polyketide sind unter anderem Erythromycin (Makrolidantibiotikum aus *Saccharopolyspora erythraea*) und Rifamycin (Antibiotikum aus *Amycolatopsis mediterranea*). Zu den antibiotisch wirksamen nichtribosomalen Peptiden zählen z. B. Penicillin (β -Lactam-Antibiotikum aus *Penicillium chrysogenum*) und Vancomycin (Glykopeptid-Antibiotikum aus *Streptomyces orientalis*). Ein weiteres nichtribosomales Peptid stellt der Eisenchelator Enterobactin aus *E. coli* dar, welcher von den Bakterien zur Eisenaufnahme genutzt wird. Neben den reinen Polyketiden und nichtribosomalen Peptiden existieren noch Kombinationen beider, die von hybriden PKS/NRPS-Systemen synthetisiert werden. Zu diesen Hybriden gehören z. B. Rapamycin (Immunsuppressivum aus *Streptomyces hygroscopicus*), Epothilon (Krebstherapeutikum aus *Sorangium cellulosum*), Cyclosporin (Immunsuppressivum aus *Hypocladium inflatum gams*) und Yersiniabactin (Eisenchelator aus *Yersinia* und *E. coli*). Eine exemplarische Übersicht bedeutender Polyketide, nichtribosomaler Peptide und Hybride ist in Abbildung 1.7 gegeben.

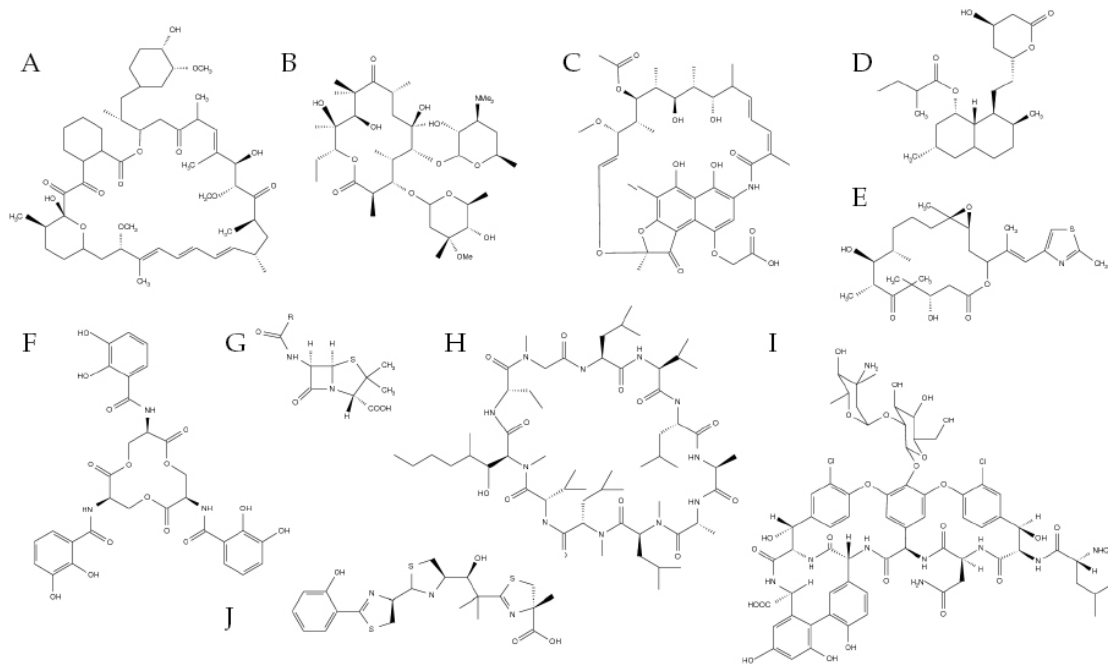


Abbildung 1.7: Beispiele für bedeutende Polyketide (PK), nichtribosomale Peptide (NRP) und Hybride (PK/NRP) dieser. A: Rapamycin (PK); B: Erythromycin A (PK); C: Rifamycin B (PK); D: Lovostatin (PK); E: Epothilon B (NRP); F: Enterobactin (NRP); G: Penicillin (NRP); H: Cyclosporin A (NRP); I: Vancomycin (NRP); J: Yersiniabactin (PK/NRP). Aus: Homburg 2007

Während der Biosynthese von Polyketiden werden einfache Carbonsäuren (Acyl-CoA-Derivate) durch Polyketidsynthasen (PKS) zu größeren Verbindungen verknüpft. Diese Art der Biosynthese erinnert stark an die Fettsäuresynthese und weist entsprechende Analogien auf (Katz & Donadio 1993). Ein Überblick über die grundlegenden Syntheseschritte ist in Abbildung 1.8a dargestellt. Zum jetzigen Zeitpunkt sind drei Typen von bakteriellen PKS bekannt. Typ I PKSs sind multifunktionale Enzyme, die in Modulen organisiert sind, von welchen jedes eine bestimmte, sich nicht wiederholende Funktion besitzt und für die Katalyse einer Kettenverlängerung während der Polyketid-Synthese verantwortlich ist (Staunton & Weissman 2001). Ein Beispiel für eine Typ I PKS ist die 6-Deoxyerythromycin B Synthase (DEBS), welche die Biosynthese von reduzierten Polyketiden wie z. B. Erythromycin A katalysiert (Abbildung 1.9a). Typ II PKS sind Multienzym-Komplexe, die im Gegensatz zu Typ I PKS wiederholende Funktionen besitzen und somit mehrere Kettenverlängerungen während der Polyketid-Synthese durchführen (Das & Khosla 2009). Im Falle der Tetracenomycin PKS führt dies zu aromatischen

Polyketiden (Abbildung 1.9b). Eine letzte Klasse von PKS stellen Typ III PKS dar, welche homodimere Enzyme sind, die hauptsächlich als wiederholende kondensierende Enzyme wirken (Moore & Hopke 2001). Dies führt im Fall der RppA-Synthase zu aromatischen Polyketiden wie z. B. Flavolin (Abbildung 1.9c). Typ I und II PKS aktivieren mit Hilfe von Acyl-Carrier-Proteinen (ACP) Carbonsäuren (Acyl-CoA-Derivate) während Typ III PKS unabhängig von ACP direkt Carbonsäuren als Substrate verwenden. Trotz der strukturellen und mechanistischen Unterschiede der verschiedenen PKS Typen werden alle Polyketide durch sequentielle decarboxylierende Kondensation der Carbonsäuren synthetisiert, wobei eine Ketoacyl Synthase (KS) Domäne (im Fall der Typ I PKS) oder eine Untereinheit (im Fall der Typ II und III PKS) die C-C-Bindung katalysiert (Shen 2003). Des Weiteren beinhalten PKSs noch Domänen mit Dehydratase- (DH) und Enoylreduktase- (ER) Aktivität, die für reduktive Prozesse während der Polyketid-Synthese verantwortlich sind. Letztendlich wird die Synthese durch eine Thioesterase beendet und somit das Produkt vom Multi-Enzym Komplex entlassen. Allerdings sind für die bioaktive Form des Polyketids nach der eigentlichen Kettensynthese häufig noch weitere Modifikationen nötig, die von weiteren Enzymen nach Abschluss der eigentlichen Synthese durchgeführt werden. (Weissman 2004).

Die Synthese von nichtribosomalen Peptiden ist im Vergleich zur Synthese der Polyketide zwar chemisch unterschiedlich, allerdings sind die strukturellen und mechanistischen Vorgänge beider Biosynthesen analog. Im Falle der NRP-Synthese werden statt C-C-Bindungen die typischen Peptidbindungen zwischen C-N hergestellt. So besteht eine funktionale Analogie zwischen der Acyltransferase (AT) in PKS-Systemen und der Adenylierungs-Domäne in NRPS-Systemen. Das Peptidyl-Carrier-Protein (PCP) in NRPS-Systemen ist vergleichbar mit dem Acyl-Carrier-Protein (ACP) von PKS. In NRPS-Systemen existiert eine Kondensierungs-Domäne (C), welche funktional mit der Ketosynthase vergleichbar ist (Cane & Walsh 1999). Eine Gegenüberstellung der wichtigsten PKS- und NRPS-Module ist in Abbildung 1.8 dargestellt. Wie auch bei PKS existieren auch in der Gruppe der NRPS verschiedene Typen, die sich im Aufbau unterscheiden (Finking & Marahiel 2004).

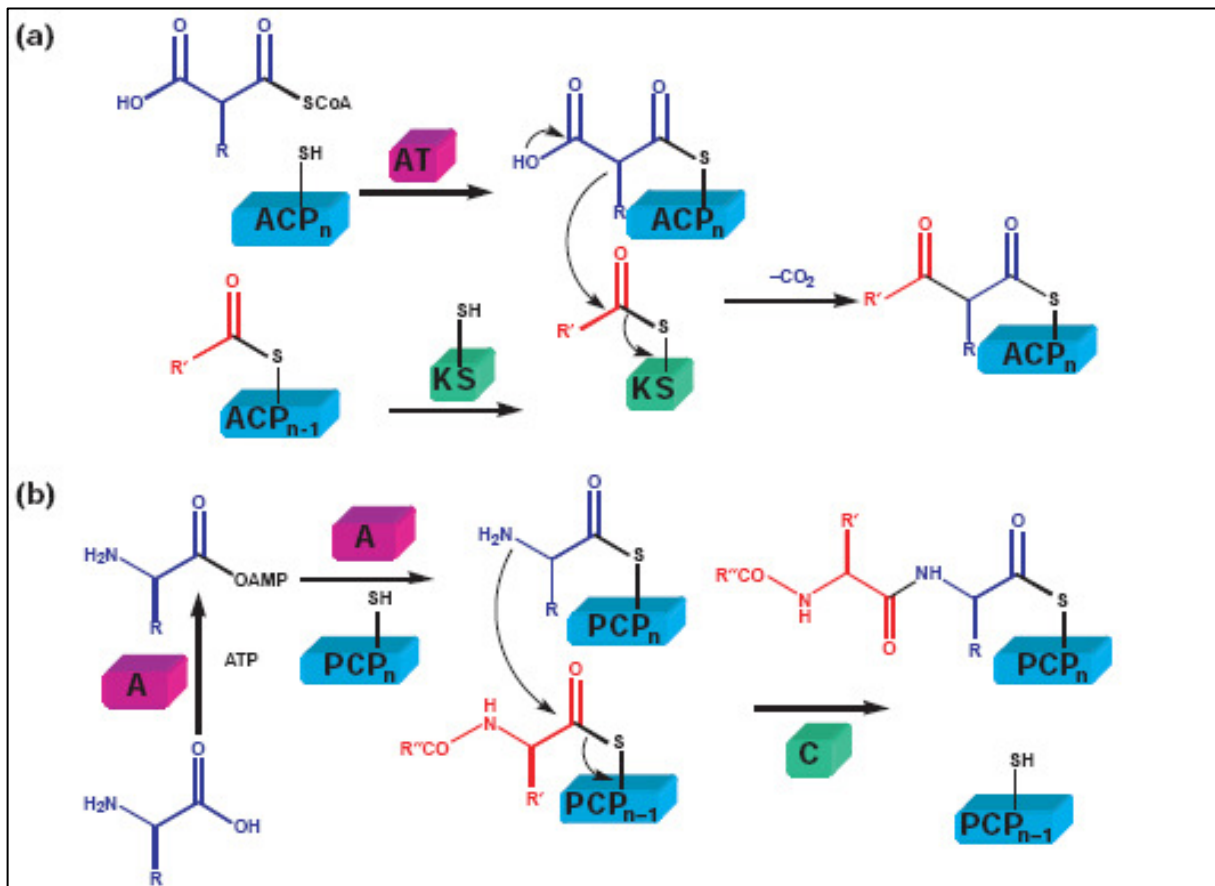


Abbildung 1.8: Funktion und Mechanismus der katalytischen und Träger-Domänen in PKS (a) und NRPS (b). (a) Die Acyltransferase (AT) Domäne des PKS verbindet den flexiblen Phosphopentetheinylarm der ACP-Domäne mit einem folgenden Kettenglied (Malonyl oder Methylmalonyl). Die Ketosynthase (KS) Domäne katalysiert darauf folgend eine decarboxylierende Acylierung bei der der Acyl-Rest auf das (Methyl-)Malonyl-S-ACP übertragen wird. (b) Während der NRPS-katalysierten Herstellung einer Peptidbindung wird zunächst ein Aminosäure-Kettenglied durch die Adenylierungsdomäne (A) aktiviert, welches dann auf den Phosphopantetheinylarm der PCP-Domäne übertragen wird. Die Kondensationsdomäne (C) katalysiert daraufhin einen nukleophilen Angriff des Amino-Stickstoffs des Akzeptors Aminoacyl-S-PCP aus der vorangegangenen Kettenverlängerung auf den Peptidylacylrest des Donors. Aus: Cane & Walsh 1999.

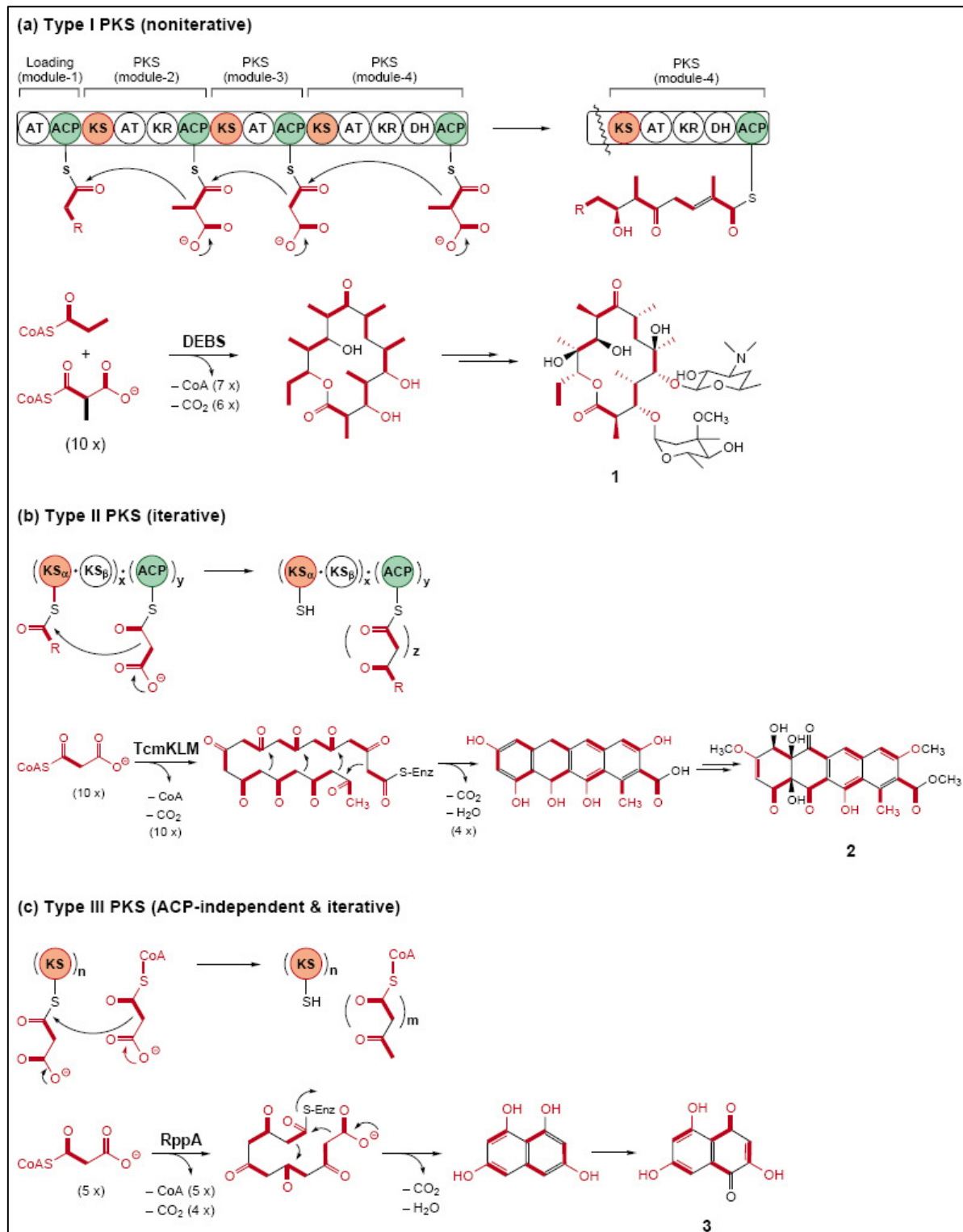


Abbildung 1.9: Strukturen und Mechanismen bakterieller PKS. (a) Typ I PKS, welche aus nicht-wiederholend wirkenden Domänen bestehen, sind am Beispiel der DEBS, welche Erythromycin (**1**) synthetisiert, dargestellt. (b) Typ II PKS, welche aus wiederholend wirkenden Untereinheiten bestehen sind am Beispiel der TcmKLM, welche Tetracenomycin (**2**) synthetisiert, dargestellt. (c) Typ III PKS, welche aus einer wiederholend wirkenden einzelnen Untereinheit bestehen, sind am Beispiel der RppA, welche Flavolin (**3**) synthetisiert, dargestellt. Aus: Shen 2003

Aufgrund der breit gefächerten Wirkungsweisen sind Polyketide und nichtribosomale Peptide wichtige Stoffklassen für therapeutische Ansätze. Die hohe Anzahl an antibiotisch, antimycotisch und antiparasitisch wirkenden Substanzen macht sie zum idealen Kandidaten für die Entwicklung neuer Medikamente, welche aufgrund der rasanten Resistenzentwicklung seitens der Mikroorganismen dringend erforderlich sind (Walsh 2000). Neben der Strategie, vorhandene Substanzen zu modifizieren, ist es dank der modularen Struktur der Biosynthese-Mechanismen auch denkbar, mit Hilfe verschiedener PKS- und NRPS-Domänen Substanzen *de novo* zu planen und zu synthetisieren (Menzella & Reeves 2007).

1.8 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Das Colibactin-Gencluster konnte bislang nur in *E. coli* Stämmen der phylogenetischen Gruppe ECOR-B2 nachgewiesen werden. Da es sich bei diesem um eine genomische Insel handelt, die ihren Ursprung nicht in *E. coli* selbst hat, sollte die Verbreitung des Colibactin-Genclusters in ausgewählten Gattungen der Familie *Enterobacteriaceae* näher untersucht werden. Weiterführend sollte die genomische Struktur des Colibactin-Genclusters in möglichen anderen Bakterienarten analysiert werden.

Zusätzlich zu den molekularbiologischen Untersuchungen zur Verbreitung und der genomischen Struktur des Colibactin-Genclusters sollte ein möglicher biologischer Nutzen des Colibactin aufgeklärt werden. Hierbei lag der Fokus auf der Kolonisierung des Gastrointestinaltrakts von Mäusen. Der *E. coli* Stamm Nissle 1917 verfügt über exzellente Kolonisierungseigenschaften und ist natürlicher Colibactin Produzent. Unter Verwendung geeigneter Mutanten sollte der Effekt des Colibactins während der Kolonisierung des murinen Intestinaltrakts analysiert werden.

2 MATERIALIEN

2.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sowie ihre Eigenschaften sind – soweit bekannt – in Tabelle 2.1 einschließlich Herkunftsangaben aufgeführt.

Tabelle 2.1: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Beschreibung	Quelle/Referenz
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	Wildtyp, Fäkalisolat (O6:K5:H1)	Nissle, 1918
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 Sm ^r	streptomycinresistente Variante von <i>E. coli</i> Nissle 1917	Stammsammlung des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 ΔPKS	Deletion der Colibactin-Insel in Nissle 1917	S. Homburg, Würzburg
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 ΔPKS Sm ^r	streptomycinresistente Variante von <i>E. coli</i> Nissle 1917 ΔPKS	Stammsammlung des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 <i>rpsL</i> K42R <i>attB::cat</i>	definiert streptomycinresistente und chloramphenicolresistente Variante von <i>E. coli</i> Nissle 1917	Stammsammlung des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 <i>rpsL</i> K42R Δ <i>clbA::npt</i>	definiert streptomycinresistente, Neomycin-phosphotransferase-positive <i>clbA</i> -Deletionsmutante von <i>E. coli</i> Nissle 1917	Stammsammlung des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie

Tabelle 2.1: Verwendete Bakterienstämme (Fortsetzung)

Bakterienstamm	Beschreibung	Quelle/Referenz
<i>Escherichia coli</i> IHE3034	Wildtyp, Neugeborenen-Meningitis-Isolat (O18:K1:H7)	Korhonen, 1985
<i>Escherichia coli</i> CFT073	Wildtyp, Pyelonephritis-Isolat (O6:K2:H1)	Mobley, 1990
<i>Escherichia coli</i> 536	Wildtyp, Pyelonephritis-Isolat (O6:K15:H31)	Berger, 1982
<i>Escherichia coli</i> J96	Wildtyp (O4:K6)	Stammsammlung des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie
<i>Escherichia coli</i> MG1655	K-12-Isolat	Blattner, 1997
<i>Escherichia coli</i> DH10B	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 endA1 ara</i> Δ 139 Δ (<i>ara leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>nubG</i>	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 Δ pMUT1/2	<i>E. coli</i> Nissle 1917 kuriert von kryptischen Plasmiden	S. Oswald, Würzburg
<i>Citrobacter koseri</i> Frederiksen (ATCC BAA-895)	Patientenisolat, vollständig sequenziert (CP000822)	ATCC / Stammsammlung des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie
<i>Enterobacter aerogenes</i> 20	Keine Angaben	Stammsammlung des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie
<i>Enterobacter aerogenes</i> 50	Keine Angaben	Stammsammlung des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie
<i>Enterobacter aerogenes</i> 64	Keine Angaben	Stammsammlung des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie

Tabelle 2.1: Verwendete Bakterienstämme (Fortsetzung)

Bakterienstamm	Beschreibung	Quelle/Referenz
<i>Escherichia coli</i> 4471-03	UPEC-Isolat, ECOR-B2	Stammsammlung des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie
<i>Escherichia coli</i> 4483-03	UPEC-Isolat, ST73, ECOR-B2	Stammsammlung des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie
<i>Escherichia coli</i> 4526-03	UPEC-Isolat, ECOR-B2	Stammsammlung des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie
<i>Escherichia coli</i> U12633	Urinisolat, ESBL+, ECOR-B1, O153:H31	Stammsammlung des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie
<i>Escherichia coli</i> U15156	Urinisolat, ESBL+, ECOR-B1, O153:H31	Stammsammlung des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie
<i>Escherichia coli</i> U19010	Urinisolat, ESBL+, ECOR-B1, O153:H31, ST101	Stammsammlung des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 41	Patientenisolat	Stammsammlung des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CF 1	Patientenisolat	Stammsammlung des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CF 44	Patientenisolat	Stammsammlung des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie
<i>Klebsiella pneumoniae</i> Kp110	Avirulentes Derivat von <i>K. pneumoniae</i> Kp52145	Stammsammlung des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie

Tabelle 2.1: Verwendete Bakterienstämme (Fortsetzung)

Bakterienstamm	Beschreibung	Quelle/Referenz
<i>Klebsiella pneumoniae</i> Kp52145	pathogenes Isolat	Stammsammlung des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie
<i>Klebsiella pneumoniae</i> SB3431	pathogenes Isolat (Asien)	Stammsammlung des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie

2.2 Plasmide und Vektoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und Vektoren sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tabelle 2.2: Plasmide und Vektoren

Vektor/Plasmid	Beschreibung	Quelle/Referenz
pBeloBAC11	Klonierungsvektor; <i>cat lacZα repE sopABC cos loxP ori2</i>	New England Biolabs
pBACpks	pBeloBAC11 mit 67,9 kb Fragment des <i>E. coli</i> IHE3034 Chromosoms einschließlich der kompletten Colibactin-Insel	Buchrieser C., unveröffentlicht

2.3 Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide wurden von den Firmen Eurofins MWG Operon (Ebersberg) und Sigma-Genosys (Steinheim) bezogen. Oligonukleotidsequenzen, Verwendungszweck und Quellen/Referenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 7.2 im Anhang zusammengefasst.

2.4 Chemikalien, Enzyme und Fertigkits

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

Es kamen folgende Kits zum Einsatz:

- ABI Prism[®] Big Dye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Foster City (USA)
- QIAquick[®] PCR Purification/Gel Extraction Kit, QIAGEN, Hilden
- Genomic DNA Purification Genomic-tip 100/G Kit, QIAGEN, Hilden
- DNA Ligation Kit "Mighty Mix", Takara Bio Inc., Frankreich

Marker zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten nach Agarosegelelektrophorese wurden von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Roth) bezogen (Abb. 2.1).

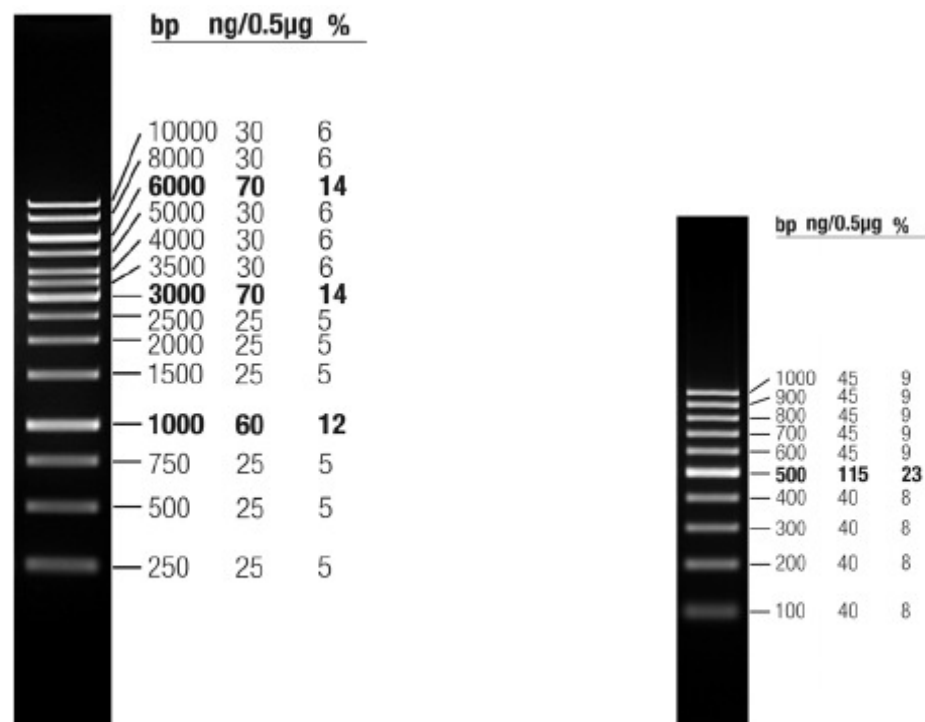


Abb. 2.1: Marker für die Agarosegelelektrophorese. Links: Generuler[™] 1 kb DNA Ladder (Fermentas); Rechts: Generuler[™] 100 bp DNA Ladder (Fermentas)

2.5 Medien und Zusätze

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

Lysogen Broth (LB)	Caseinhydrolysat (Pepton 140)	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
Kongorot-Medium	Caseinhydrolysat (Pepton 140)	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	Kongorot (0,4 mg/ml)	1 ml
	Coomassie Brilliant Blue (0,2 mg/ml)	1 ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
MacConkey-Platten	BBL™ MacConkey Agar	50 g
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
Antibiotika	Ampicillin (Amp)	100 mg/ml in H ₂ O _{dest.}
	Chloramphenicol (Cm)	20 mg/ml in 100 % EtOH
	Kanamycin (Kan)	15 mg/ml in H ₂ O _{dest.}
	Streptomycin (Sm)	100 mg/ml in H ₂ O _{dest.}
	Tetracyclin (Tc)	10 mg/ml in 70 % EtOH

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

Zellkulturmedium	MEM (Minimal Essential Medium)	500 ml
	FCS (Fetal Calf Serum), hitzeinaktiviert	50 ml
	L-Glutamin	5,5 ml
	Nicht-essentielle Aminosäuren	5,5 ml
Interaktionsmedium	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	500 ml
	FCS (Fetal Calf Serum)	25 ml
	L-Glutamin	5,5 ml

Nicht-essentielle Aminosäuren	5,5 ml
HEPES	15 mM

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

2.6 Puffer und Lösungen

DNA-Ladepuffer (6x)	50 % (v/v) TE 49,2 % (v/v) Glycerin 0,04 % (w/v) Xylencyanol 0,04 % (w/v) Bromphenolblau
EBSS (Earle's Balanced Salt Solution)	1,8 mM CaCl ₂ 0,8 mM MgSO ₄ 5,4 mM KCl 116,2 mM NaCl 1,0 mM NaH ₂ PO ₄ 5,6 mM Glukose 26,2 mM NaHCO ₃
Lämmli Puffer (5x)	14,4 mM Bromphenolblau 479,6 mM Glycerin 19,8 mM SDS 1 M Tris-HCl pH 6,8 0,358 mM β-Mercaptoethanol
LPS-Darstellung	
2x Fixierer	250 ml Isopropanol 70 ml Eisessig ad 500 ml H ₂ O _{bidest}
Perjodatlösung	0,7 g Natriumperjodat ad 100 ml Fixierer
Silbernitratlösung	70 ml H ₂ O _{bidest} 1,4 ml 1 M NaOH 1 ml konz. NH ₃ -Lösung

Entwicklerlösung	1,25 ml 20 %ige AgNO ₃ -Lösung 100 ml 2,5 %ige Na ₂ CO ₃ -Lösung (60 °C) 27 µl 40 % Formaldehyd
Natriumphosphatpuffer	Lösung A: 0,2 M NaH ₂ PO ₄ Lösung B: 0,2 M Na ₂ HPO ₄
PBS (Phosphate Buffered Saline)	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄
Saline	0,9 %ige NaCl-Lösung
TAE (50x)	2 M Tris 1 M Essigsäure 0,1 M EDTA pH 8,3
TE	10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA
TNE	10 mM Tris-HCl pH 8,0 10 mM NaCl 10 mM EDTA
TNEX	TNE 1 % Triton-X 100

2.7 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.3: Verwendete Geräte

Gerät	Typ/Hersteller
12-Kanal-Pipetten, 20 µl und 200 µl	Pipet-Lite LTS L12-20 und L12-200, Rainin
Autoklaven	Fedegari FOM/B50 Biomedis Tecnoclav H+P Varioclav
Analysenwaage	JL-180, Chyo
Brutschrank (37°C)	Heraeus Function Line

Tabelle 2.3: Verwendete Geräte (Fortsetzung)

Gerät	Typ/Hersteller
Elektrophoresekammern	Harnischmacher Midi-Large 640.000 Roth
DNA Sequenzierer	ABI Prism 310 Genetic Analyzer
Einfrierbehälter 5100 Cryo „Mr. Frosty“	Nalgene
Eismaschine	Scotsman AF30
Feinpipette	Gilson pipetman
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr
Gefrierschrank -80 °C	Nunc
Geldokumentation	BioRad Gel Doc 2000
Grobwaage	Kern 470
Heizblöcke	Peqlab Eppendorf Thermostat 5320
Kühlschrank	Privileg Öko
Kühlzentrifugen	Multifuge 1 L-R Megafuge 1.0R
Magnetrührer	Hotplate Stirrer Model L-81
Mikroskop	Zeiss (Axiolab)
Mikroskop für Zellkultur (invers)	Leica
Mikrowelle	Privileg 8017
Netzgeräte	Consort E455
PCR-Gerät	Biometra T3 Thermocycler
Photometer	Amersham Ultrospec 3100 Pro
Pipetten	Abimed HT Discovery starter kit
Pipettierhilfe	Brand Accu Jet Pro
pH-Meter	MultiLine P4, WTW

Tabelle 2.3: Verwendete Geräte (Fortsetzung)

Gerät	Typ/Hersteller
Schüttelinkubator	Certomat H und Certomat U
SDS-Page-Kammer	Mini-PROTEAN 3 Cell, Bio-Rad
Sicherheitswerkbank	NUAIRE Modell-Nr. NU-425-400E
Spectrophotometer	Ultrospec 3000 bzw. Ultrospec 3100 pro, Amersham Biosciences
Tischzentrifugen	Hettich Mirko 20, Heraeus Biofuge pico
Vortexer	Vortex Genie 2
Zentrifuge	J2-HC mit JA-10-, JA-20-Rotor, Beckman

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

3 METHODEN

3.1 Kultur von Bakterien

3.1.1 Anzucht und Stammhaltung

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme wurden, soweit nicht anders angegeben, in LB-Medium oder auf LB-Agar angezogen, dem gegebenenfalls die entsprechenden Antibiotika zugesetzt wurden. Die Inkubation erfolgte in der Regel bei 37 °C. Die Bakterienstämme wurden auf Festmedien bei 4 °C gelagert und regelmäßig auf frische Agarplatten überstrichen. Flüssigkulturen wurden entweder von Agarplatten oder direkt aus Glycerinkulturen beimpft und bei 180-220 Upm geschüttelt.

Für die längere Lagerung von Bakterienstämmen wurden Flüssigkulturen zunächst bei 2500 g für 5 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpräzipitat in 10 mM MgCl₂-Lösung resuspendiert. Nach Zugabe von sterilem Glycerin (Endkonzentration 30 %) wurden diese Suspensionen bei -20 °C bzw. bei -80 °C eingefroren.

3.1.2 Bestimmung des Wachstums in Flüssigkulturen

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

3.1.3 Phänotypische Charakterisierung

Nachweis des *rdar*-Morphotyps (Curli- und Zelluloseproduktion)

Zum Nachweis von Curli-Fimbrien und Zellulosesynthese (*rdar*-Morphotyp) wurden die zu testenden Stämme auf Kongorot-Agar (2.5) überimpft und bei 37 °C für 24-48 h inkubiert. Als Kontrollen dienten der *rdar*-positive Stamm *E. coli* Nissle 1917 sowie der bei 37 °C *rdar*-negative *E. coli* Stamm 536 und K-12-Isolat MG1655.

Nachweis der Lactose-Verwertung

Zum Nachweis der Lactose-Verwertung gram-negativer Bakterien wurden die zu testenden Stämme auf MacConkey-Agar überimpft und bei 37 °C für 24 h inkubiert.

Nachweis der Hämolyseproduktion

Zum Nachweis der Hämolyseproduktion wurden die zu testenden Stämme zunächst in LB-Medium bei 37 °C und 180-220 Upm für 18 h kultiviert und im folgenden 3 µl Bakteriensuspension auf Blutagarplatten aufgetropft. Nach erneuter Inkubation bei 37 °C wurde das Ergebnis anhand des Vorhandenseins eines Hämolysehofes ermittelt.

Mannose-abhängige Hefeagglutination zum Nachweis von Typ1-Pili

Zum Nachweis der Expression von Typ1-Pili wurden die zu testenden Stämme über Nacht in Standkultur bei 37 °C inkubiert. Die Mannose-abhängige Hefeagglutination wurde durchgeführt, indem 10 µl Bakterienkultur mit 10 µl Hefezellen-Suspension (1 mg/ml *Saccharomyces cerevisiae*) und entweder mit oder ohne Mannose-Lösung (Endkonzentration 100 mM) auf einem Objektträger gemischt werden. Der Nachweis von Typ1-Pili ist erbracht, wenn die Bakterienzellen mit den Hefezellen in Abwesenheit von Mannose aggregieren und in Anwesenheit von Mannose die Aggregation ausbleibt.

Motilitätstest zum Nachweis der Flagellenexpression

Zum Nachweis der Flagellenexpression wurden die zu testenden Stämme in der Mitte einer LB-Schwärmagarplatte (Agarkonzentration 0,3 %) punktförmig angeimpft. Im Folgenden wurden die Bakterien bei 37 °C für 14-16 h inkubiert. Der

Motilitätsnachweis war erbracht, wenn sich die Bakterien vom Schwärmagar-Mittelpunkt zum Rand hin ausbreiteten.

Nachweis von Colibactinproduktion

Die Colibactinproduktion wurde durch Kokultur der entsprechenden Bakterienstämme mit HeLa-Zellen nachgewiesen (2.5.3).

3.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden

3.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Bakterien

Die Isolierung genomischer DNA aus Bakterien erfolgte modifiziert nach Grimberg *et al.* (1989). Von einer Bakterienkultur wurden 2 ml in einem Reaktionsgefäß abzentrifugiert (5 min, 6000 g). Das Bakterienpräzipitat wurde einmal mit 1 ml TNE gewaschen und anschließend in 270 µl TNEX resuspendiert. Es wurden 15 µl Lysozymlösung (10 mg/ml in TNEX) zugegeben und die Bakteriensuspension für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 30 µl Proteinase K (20 mg/ml in H₂O_{dest}) folgte eine Inkubation für 2 h bei 60 °C bis die Bakteriensuspension aufklarte. Die klare Lösung wurde mit 15 µl 5 M NaCl und 500 µl kaltem 100 %igem EtOH versetzt, vorsichtig invertiert und für 10 min bei 16000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat nach einmaligen Waschen mit 70 %igem EtOH getrocknet und in 100 µl H₂O_{dest} aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank.

Die Isolierung von chromosomaler DNA zur direkten Sequenzierung erfolgte mithilfe des QIAGEN Genomic DNA Purification Kit gemäß Protokoll des Herstellers.

3.2.2 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA

Die Konzentrationsbestimmung genomischer DNA, PCR-Fragmenten und Plasmid-DNA erfolgte spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine Absorption von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg dsDNA/ml (Maniatis *et al.*, 1989). Die Reinheit der Präparate wurde über den Quotienten aus E_{260}/E_{280}

ermittelt. Reine Nukleinsäuren weisen einen Quotienten von 1,8 bis 2,0 auf. Diese Messungen wurden mithilfe des nanodrop™ von peqLab durchgeführt.

3.2.3 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde für folgende Zwecke angewandt:

- Nachweis von DNA-Abschnitten in verschiedenen Bakterienstämmen
- Amplifikation von DNA-Abschnitten zur Sequenzierung
- Bestimmung chromosomaler Insertionsstellen (inverse PCR, s.u.)

Standardansätze enthielten 1 x Reaktionspuffer, 0,4 µM jedes Oligonukleotids, 20 µM jedes dNTPs, 1,5-3 mM MgCl₂ sowie 0,02-0,04 U/µl Polymerase und variierten im Volumen je nach Anwendung von 25 µl bis 50 µl. Als Ausgangsmaterial (template) für die Amplifikation diente entweder Bakterienlysate (0,05 µl/µl Ansatz) oder isolierte genomische DNA (0,04-0,4 ng/µl Ansatz).

Als Polymerasen dienten für Standard-PCRs *Taq*-DNA-Polymerase (QUIAGEN) und für längere Amplifikate *Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase* (Finnzymes).

Die PCR-Protokolle variierten je nach verwendeter Polymerase, Schmelztemperaturen der eingesetzten Oligonukleotide sowie der erwarteten Produktlänge. Generell setzten sie sich zusammen aus einer initialen Denaturierung der Template-DNA (60-120 min, 94-98 °C), 25-35 Zyklen von Denaturierung (10-30 s, 94-98 °C), Annealing der Oligonukleotid-Primer (15-30 s, 50-65 °C) und Elongation (30-300 s, 72 °C) sowie einer abschließenden Elongation (180-600 s, 72 °C).

Der Erfolg der PCR-Reaktion wurde durch Elektrophorese eines 5-10 µl Aliquots in einem Agarosegel überprüft. Bei Bedarf wurden PCR-Produkte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (QUIAGEN, 2.4) gemäß Herstellerangaben für die direkte Sequenzierung gereinigt.

Inverse PCR (IPCR)

Die Methode der inversen PCR (IPCR) wurde nach Ochman *et al.* (1988) durchgeführt. Hierbei wird eine normale PCR durchgeführt, mit dem Unterschied, dass die verwendeten Oligonukleotid-Primer entgegengesetzt zur gewöhnlichen Orientierung angeordnet sind. Des Weiteren wird bei der IPCR ein Ligationprodukt von zuvor enzymatisch hydrolisierter genomischer DNA als Template verwendet. Das bedeutet, dass als Template für die IPCR ringförmige DNA verwendet wird. Mit dieser Methode ist es möglich, unbekannte DNA-Sequenzen, die an bekannte DNA-

Abschnitte angrenzen, zu bestimmen. Im Falle eines positiven Signals nach PCR-Reaktion wurde das PCR-Produkt gereinigt und sequenziert.

3.2.4 Enzymatische Hydrolyse von DNA

Für die enzymatische Hydrolyse von DNA wurden 0,5-2 µg genomische DNA in 1 x Restriktionspuffer mit 1-2 U/µg der entsprechenden Restriktionsendonuklease für 2-3 h bei der für das Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung des Enzyms (20 min, 65 °C) gestoppt. Das Reaktionsvolumen variierte zwischen 20-50 µl. Gegebenenfalls wurde zu analytischen Zwecken ein Aliquot des Reaktionsansatzes mittels Agarosegelelektrophorese auf erfolgreiche Hydrolyse überprüft.

3.2.5 Ligation von DNA

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mittels des DNA Ligation Kit „Mighty Mix“ nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Zirkularisierung einzelner DNA-Fragmente mit sich selbst wurden 100 ng enzymatisch hydrolysierter genomischer DNA bei 16 °C für 30 min inkubiert. Im Anschluss wurde die DNA mittels Ethanol-Fällung präzipitiert und in H₂O_{dest.} aufgenommen.

3.2.6 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel

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

3.2.7 DNA-Sequenzierung

PCR-Produkte wurden mittels *Abi Prism[®] Big Dye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) gemäß Herstellerangaben in einer modifizierten PCR-Reaktion sequenziert. Die Aufreinigung erfolgte durch Ethanol-Fällung und die Auftrennung der PCR-Produkte und somit die Bestimmung der DNA-Sequenz erfolgte an einem *ABI Prism[®] 310 Genetic Analyzer* im Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg.

Genomische DNA wurde ebenfalls mittels *Abi Prism[®] Big Dye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) in einer modifizierten PCR-Reaktion sequenziert. Reaktionsansätze enthielten 0,5 x *ABI*-Sequenzierungspuffer, 1 µM des Oligonukleotids, 2 x *Big Dye[®] Terminator Ready Mix*, 0,25 M Betain und 2-6 µg der zu sequenzierenden DNA pro Reaktion. Das Reaktionsvolumen variierte je nach Notwendigkeit zwischen 20-40 µl. Das PCR-Protokoll wurde von normalerweise 25-30 Zyklen auf 100 Zyklen geändert. Die Aufreinigung erfolgte durch Ethanol-Fällung und die Auftrennung der PCR-Produkte und somit die Bestimmung der DNA-Sequenz erfolgte an einem *ABI Prism[®] 310 Genetic Analyzer* im Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg.

3.3 Computergestützte Analysen

Für standardmäßige Nukleotid- und Aminosäuresequenz- und Datenbankvergleiche wurde BLAST (*basic local alignment search tool*; Altschul *et al.*, 1990) unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> verwendet. Als weitere Datenbanken wurde EcoCyc (Keseler *et al.*, 2005; <http://ecocyc.org>) und KEGG (Ogata *et al.*, 1999; <http://www.genome.jp/kegg/>) genutzt. Zur graphischen Darstellung von DNA-Sequenzen kam VectorNTI™ v10 (Invitrogen) zum Einsatz. Primer-Design wurde mittels Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) oder PerlPrimer v1.1.14 (<http://perlprimer.sourceforge.net/>) durchgeführt. Restriktionsschnittstellen für DNA-Sequenzen wurden mit VectorNTI™ v10 (Invitrogen) ermittelt. Digitale Fotoverarbeitung erfolgte mit Adobe Photoshop CS.

3.4 Darstellung des bakteriellen Lipopolysaccharids (LPS)

Isolierung von Lipopolysaccharid (LPS)

Um LPS zu isolieren, wurden zunächst 3 mg Bakterienmaterial von einer Agarplatte entnommen, in 45 µl TE-Puffer aufgenommen, mit 45 µl 2 x Laemmli-Puffer versetzt und 15 min bei 100 °C inkubiert. Ein 30 µl-Aliquot dieses Bakterienlysats wurde mit 6

µl 5 x Laemmli-Puffer und 24 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml TE) gemischt und 1 bis 2 h bei 65 °C inkubiert. Zur Auftrennung der verschiedenen LPS Bestandteile wurden 5-10 µl der Lösung auf ein 12 %-iges SDS-Gel aufgetragen und einer vertikalen Gelelektrophorese unterzogen.

Darstellung des Lipopolysaccharids (LPS) mittels Silberfärbung

Nach der Gelelektrophorese wurde das LPS mittels Silberfärbung dargestellt. Alle dazu benötigten Gefäße wurden zunächst sorgfältig mit 70 %igem Ethanol gesäubert. Anschließend wurde das Gel über Nacht in 100 ml 1 x Fixierlösung fixiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Fixierlösung durch 100 ml 1 x Perjodatlösung ersetzt und das Gel darin für 5 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen des Gels mit H₂O_{bidest.} für jeweils 30 min wurde es für 10 min in Silbernitratlösung inkubiert. Nachdem das Gel dreimal mit H₂O_{bidest.} gewaschen wurde, folgte die Entwicklung in auf 60 °C vorgewärmter Entwicklerlösung. Sobald die Bandenintensität ausreichend war, wurde die Reaktion durch Waschen mit 50 mM EDTA-Lösung für 10 min abgestoppt.

3.5 Zellkulturmethoden

3.5.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Ansetzen neuer Zellkulturen wurden die eingefrorenen Zellen in einem 37 °C warmen Wasserbad angetaut. Nachdem sich die Zellsuspension wieder verflüssigt hatte, wurden die Zellen in eine 25 cm²-Zellkulturflasche mit 5 ml frischem Medium (MEM, 10 % FCS, neAA) überführt. Da das Einfriermedium das Zellgift DMSO enthielt, wurde ein Mediumwechsel durchgeführt sobald ein Großteil der Zellen adhärierte.

Zum Einfrieren wurden die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase verwendet. Für 2 ml einzufrierende Zellsuspension wurden Zellen einer zu 95 % konfluenten 75 cm²-Zellkulturflasche verwendet. Die Zellen wurden durch Behandlung mit 1 x Trypsin/EDTA Lösung vom Flaschenboden abgelöst, 6 min bei 700 g abzentrifugiert und in Einfriermedium (70% Zellkulturmedium, 20% FCS, 10% DMSO)

aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde in 1 ml-Aliquots in Kryoröhrchen gefüllt und sofort auf Eis gestellt. Dann wurden die Kryoröhrchen über Nacht bei -80°C in einem Einfrierbehälter 5100 Cryo „Mr. Frosty“ mit konstanter Temperaturniedrigung eingefroren. Am darauf folgenden Tag wurden die eingefrorenen Zellen zur längeren Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

3.5.2 Propagation von Zelllinien

Humane Cervixkarzinomepithelzellen (HeLa) wurden in Zellkulturmedium (MEM, 10 % FCS, neAA) bei 37°C mit CO_2 -Begasung (5 % CO_2 -Gehalt) und Wasserdampfsättigung kultiviert. Die HeLa-Zellen wurden standardmäßig in 75 cm^2 -Zellkulturflaschen kultiviert. Zum Ablösen der Zellen wurde eine Lösung aus Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben und bei 37°C inkubiert bis sich die Zellen leicht ablösen. Durch vorsichtiges Klopfen auf der Handfläche konnte das Ablösen der Zellen beschleunigt werden. Nachfolgend wurde Zellkulturmedium zugegeben, wodurch das Trypsin inaktiviert wurde. Von dieser Zellsuspension wurden 1 bzw. 2 ml in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Medium überführt. Die Zellen wurden alle 3-5 Tage subkultiviert.

3.5.3 Kokultur von HeLa-Zellen mit Bakterienstämmen

Für die Kokultur wurde das Zellkulturmedium gegen Interaktionsmedium (DMEM, 5 % FCS, 15 mM HEPES) ausgetauscht und mit 1/100 Volumen einer Bakterien-ÜNK beimpft. Nach Inkubation für 4-5 h bei 37°C und 5 % CO_2 wurde das Medium entfernt, die Zellen dreimal mit EBSS gewaschen und in Zellkulturmedium mit Gentamycin (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für weitere 72 h kultiviert. Für die Mikroskopie wurden die Zellen gemäß Standardprotokoll mit Giemsa-Lösung gefärbt.

3.6 Kolonisierungsexperimente im Mausmodell

Die Durchführung von Kolonisierungsexperimenten erfolgte modifiziert nach Myhal *et al.* (1982). 4-6 Wochen alte, weibliche BALB/c Mäuse wurden mit verschiedenen *E. coli* Nissle 1917 Stämmen kolonisiert. Die Mäuse erhielten Streptomycinsulfat-haltiges Trinkwasser (5 g/l), um die normale fakultative intestinale Bakterienflora zu reduzieren. Nach zwei Tagen Einzelhaltung der Tiere mit Streptomycinsulfat-haltigem Trinkwasser *ad libitum* wurden den Mäusen Bakteriensuspensionen oral verabreicht. Dazu wurden zunächst Bakterienkulturen nach Inkubation über Nacht abzentrifugiert und zweimal mit Natriumphosphat-Puffer pH 7,4 gewaschen. Das Bakterienpräzipitat wurde in einer Mischung aus einem Salzpuffer (Ardeypharm GmbH) und Natriumphosphat-Puffer aufgenommen und die Anzahl lebensfähiger Bakterien wurde mittels Ausplattieren geeigneter Verdünnungsstufen bestimmt. Den Tieren wurden an zwei aufeinander folgenden Tagen jeweils 10^8 Bakterien oral verabreicht und die Einzelhaltung unter Gabe von Streptomycinsulfat-haltigem Trinkwasser *ad libitum* fortgeführt. Ab dem Zeitpunkt der ersten Bakteriengabe wurden täglich Stuhlproben der Tiere gesammelt. Je nach Verlauf des Kolonisierungsexperiments wurden die Zeiträume zwischen den Stuhlproben auf alle 2-3 Tage verlängert. Die Stuhlproben wurden in Saline homogenisiert und zur Bestimmung der Anzahl lebensfähiger Bakterien geeignete Verdünnungsstufen auf Agarplatten mit geeigneten Antibiotika ausplattiert.

4 ERGEBNISSE

4.1 Untersuchungen zur Präsenz des Colibactin-Genclusters in verschiedenen Gattungen der *Enterobacteriaceae*

Aufgrund der in Kapitel 1.6 beschriebenen chromosomalen Eigenschaften des Colibactin-Genclusters, die eine Verbreitung durch horizontalen Gentransfer nahe legen, wurde eine Studie zur Präsenz des Colibactin-Genclusters in verschiedenen Enterobacteriaceen durchgeführt. Der Nachweis des Colibactin-Genclusters erfolgte mittels PCR. Zu diesem Zweck wurden die von Nougayrède (2006) beschriebenen Oligonukleotid-Primer (s.a. 7.2 Primerliste im Anhang) verwendet. Hierbei handelt es sich um insgesamt acht Oligonukleotid-Primerpaare, welche gleichmäßig über das gesamte Colibactin-Gencluster verteilt sind und sowohl zum Nachweis essentieller ORFs als auch für den Nachweis des *tRNA-asnW*-Gens geeignet sind (s.a. Abbildung 7.3 im Anhang). In folgenden Tabellen 4.1 und 4.2 sind die Ergebnisse dieser Studie für die Art *Escherichia coli* als auch für andere Gattungen der Familie der *Enterobacteriaceae* aufgeführt. Eine detaillierte Zusammenstellung aller untersuchten Bakterienstämme ist in Tabelle 7.4 im Anhang zu finden.

Tabelle 4.1: Präsenz des Colibactin-Genclusters in verschiedenen Bakterienstämmen der Art *Escherichia coli*

Variante	n	<i>pks</i> ⁺	% <i>pks</i> ⁺
Mastitis-Isolate	44	0	0
EHEC	6	0	0
EPEC (ECOR-B2)	5	0	0
„Exotische“ <i>E. coli</i>	7	0	0

Tabelle 4.1: Präsenz des Colibactin-Genclusters in verschiedenen Bakterienstämmen der Art *Escherichia coli* (Fortsetzung)

Variante		n	pk ^s ⁺	% pk ^s ⁺
Fäkalisolate		135	26	19
davon	ECOR-A	39	0	0
	ECOR-B1	12	0	0
	ECOR-B2	54	26	48
	ECOR-D	28	0	0
	n.d.	2	0	0
UPEC		3	3	100
Urinisolate	ECOR-B1	3	3	100
insgesamt		203	32	16

Tabelle 4.2: Präsenz des Colibactin-Genclusters in verschiedenen Gattungen der Familie *Enterobacteriaceae*

Gattung	Art	n	pk ^s ⁺	% pk ^s ⁺
<i>Citrobacter</i>		5	1	20
	<i>freundii</i>	4	0	0
	<i>koseri</i>	1	1	100
<i>Enterobacter</i>		4	3	75
	<i>aerogenes</i>	3	3	100
	<i>cloacae</i>	1	0	0
<i>Erwinia</i>	<i>herbicola</i>	1	0	0
<i>Escherichia</i>		2	0	0
	<i>fergusonii</i>	1	0	0
	<i>hermannii</i>	1	0	0
<i>Klebsiella</i>		148	5	3,4
	<i>edwardsii</i>	1	0	0
	<i>oxytoca</i>	27	0	0
	<i>planticola</i>	11	0	0
	<i>pneumoniae</i> subsp. <i>ozeanae</i>	1	0	0
	<i>pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	20	5	25
	<i>pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i>	1	0	0

Tabelle 4.2: Präsenz des Colibactin-Genclusters in verschiedenen Gattungen der Familie *Enterobacteriaceae* (Fortsetzung)

Gattung	Art	n	pks⁺	% pks⁺
<i>Klebsiella</i>	<i>terrigena</i>	14	0	0
	<i>spp.</i>	73	0	0
<i>Pantoeae</i>	<i>agglomerans</i>	2	0	0
<i>Photorhabdus</i>	<i>luminescens</i>	2	0	0
<i>Proteus</i>		33	0	0
	<i>mirabilis</i>	13	0	0
	<i>morganii</i>	4	0	0
	<i>penneri</i>	14	0	0
	<i>spp.</i>	2	0	0
<i>Providencia</i>	<i>sp.</i>	1	0	0
<i>Salmonella</i>	Salmonella Reference Collection (SARC)	16	0	0
<i>Serratia</i>		17	0	0
	<i>ficaria</i>	1	0	0
	<i>forticola</i>	2	0	0
	<i>grimesii</i>	2	0	0
	<i>kiliensis</i>	1	0	0
	<i>liquefaciens</i>	2	0	0
	<i>marcescens</i>	1	0	0
	<i>marinor</i>	1	0	0
	<i>odorifera</i>	2	0	0
	<i>plymuthica</i>	1	0	0
	<i>proteama</i>	2	0	0
	<i>rubidea</i>	2	0	0
	<i>Shigella</i>		10	0
<i>boydii</i>		2	0	0
<i>dysenteria</i>		4	0	0
<i>flexneri</i>		2	0	0
<i>sonnei</i>		2	0	0
<i>Xenorhabdus</i>		3	0	0
	<i>beddingii</i>	1	0	0

Tabelle 4.2: Präsenz des Colibactin-Genclusters in verschiedenen Gattungen der Familie *Enterobacteriaceae* (Fortsetzung)

Gattung	Art	n	<i>pks</i> ⁺	% <i>pks</i> ⁺
<i>Xenorhabdus</i>	<i>bovieni</i>	1	0	0
	<i>nematophila</i>	1	0	0
insgesamt		244	9	3,7

Die Ergebnisse dieser PCR-basierten Studie zeigen, dass das Colibactin-Gencluster nur in einer begrenzten Anzahl von Gattungen der Familie *Enterobacteriaceae* und innerhalb dieser auch nur in bestimmten Arten zu finden ist. Zu den Colibactin-Gencluster positiven Bakterienarten gehören vor allem Vertreter der Art *Escherichia coli*, wobei hier hauptsächlich Stämme der phylogenetischen Gruppe ECOR-B2 Träger sind. Allerdings konnte das Colibactin-Gencluster zu einem geringen Prozentsatz auch in Stämmen der phylogenetischen Gruppe ECOR-B1 gefunden werden. Neben *Escherichia coli* konnten auch *Citrobacter koseri*, *Enterobacter aerogenes* und *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* als Träger des Colibactin-Genclusters identifiziert werden.

4.1.1 Einordnung der Fäkalisolate in phylogenetische Gruppen anhand der *Escherichia coli* Reference Collection (ECOR)

Unter den auf Präsenz des Colibactin-Genclusters untersuchten Bakterienstämmen befanden sich 135 Fäkalisolate, die im Rahmen einer früheren Studie aus den Fäzes gesunder Freiwilliger isoliert wurden (siehe Tabelle 4.1). Diese Kollektion von Fäkalisolaten befindet sich in der Stammsammlung des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie und trägt den Namen „Maria Souladaki“. Da über diese Bakterienstämme nur begrenzte Informationen vorlagen, wurden sie auf die Präsenz des *Escherichia coli* Malat-Dehydrogenase-Gens (Hsu & Tsen 2001) überprüft und den vier verschiedenen phylogenetischen *Escherichia coli* Gruppen mittels PCR zugeordnet (Clermont *et al.* 2000). Bis auf zwei Fäkalisolate der „Maria Souladaki“-Sammlung konnten alle als *E. coli* identifiziert und den verschiedenen phylogenetischen Gruppen zugeordnet werden (siehe Tab. 4.1). Die Gattung der zwei verbleibenden Fäkalisolate konnte nicht abschließend geklärt werden. Die

detaillierten Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 7.6 im Anhang zusammengefasst.

4.1.2 Weiterführende Charakterisierung der Colibactin-Gencluster positiven Bakterienstämme

Genotypische Charakterisierung der Fäkalisolate

Da neben Colibactin noch andere bakterielle Toxine die Fähigkeit haben in den eukaryotischen Zellzyklus einzugreifen, wurden die nicht näher charakterisierten Fäkalisolate der „Maria Souladaki“-Sammlung auf die Präsenz von Genen überprüft, die für die bakteriellen Toxine CNF (*Cytotoxic Necrotizing Factor*) und CDT (*Cytolethal Distending Toxin*) kodieren. Das Vorhandensein solcher zusätzlicher Toxine kann phänotypische Untersuchungen bezüglich der Expression des Colibactin, welche in Zellkultur durchgeführt werden, beeinflussen und somit verfälschen. Zum Nachweis der *cnf*- und *cdt*-Gene wurden Oligonukleotid-Primer verwendet, die spezifisch die verschiedenen Varianten von *cnf*- und *cdt*-Genen nachweisen (Toth *et al.* 2003). Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind der Tabelle 4.3 unten zu entnehmen.

Phänotypische Untersuchungen der Colibactin-Gencluster positiven Bakterienstämme

Um die Expression des Colibactin in Colibactin-Gencluster positiven Bakterienstämmen nachzuweisen, wurden Koinkubationen der entsprechenden Bakterienstämme mit eukaryotischen HeLa-Zellen durchgeführt. Voraussetzung für den Einsatz von Bakterienstämmen in Zellkultur ist jedoch das Fehlen von membranschädigenden Produkten seitens der Bakterienstämme, wie z. B. die Expression von Hämolyisin. Um eine mögliche Hämolyisin-Produktion und damit einhergehende Schädigung der eukaryotischen Zellen im Vorfeld zu klären, wurden die entsprechenden Bakterienstämme auf Blutagarplatten getestet. Jegliche Colibactin-Gencluster positiven und Hämolyisin-negativen Bakterienstämme wurden nachfolgend auf Colibactin-Produktion in Zellkultur getestet. Es zeigte sich, dass alle genotypisch Colibactin-positiven Bakterienstämme auch phänotypisch positiv

getestet werden konnten. Eine Auswahl dieser Ergebnisse zeigt Abbildung 4.1. Eine Übersicht über alle phänotypisch Colibactin-positiven Bakterienstämme ist in Tabelle 4.3 unten enthalten.

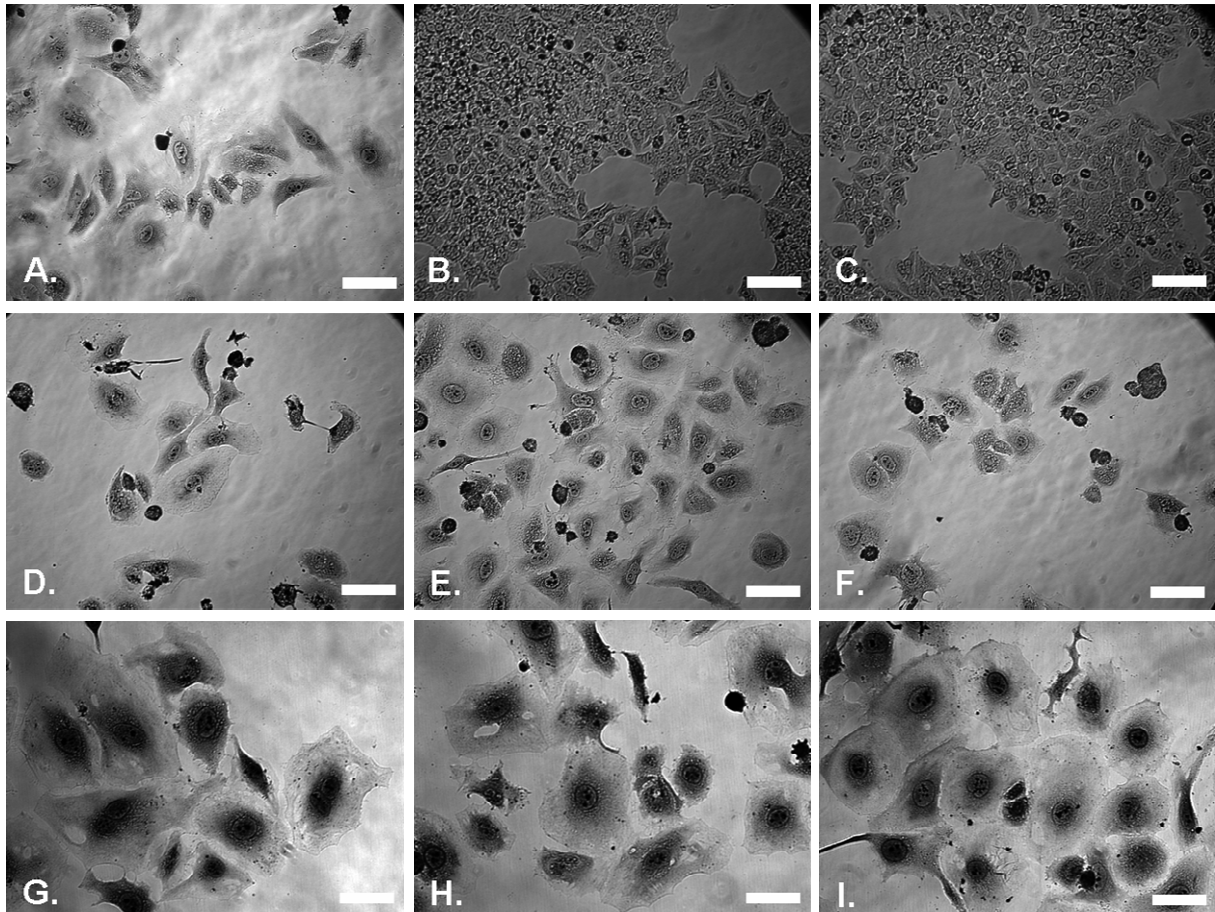


Abbildung 4.1: Nachweis des zytopathischen Effektes verschiedener Bakterienstämme. Morphologie von HeLa-Zellen 72 h nach Kokultur mit verschiedenen Bakterienstämmen (Giemsafärbung) bei gleicher Vergrößerung. A. *E. coli* Nissle 1917; B. *E. coli* Nissle 1917 Δ PKS; C. Kontrolle ohne Bakterien; D. *E. coli* Fäkalisolat 1/3; E. *E. coli* Fäkalisolat 2/44 (*cnf-1*⁺); F. *E. coli* Fäkalisolat 3/34; G. *K. pneumoniae* SB3431; H. *K. pneumoniae* Kp52145; I. *C. koseri* ATCC BAA-895. Maßstabsbalken: 100 μ m.

Tabelle 4.3: Geno- und phänotypische Charakterisierung der Colibactin-Gencluster positiven Fäkalisolate der „Maria Souladaki“-Sammlung. Untersuchung auf Hämolyse (Blutagar), CNF und CDT (Toth *et al.* 2003), und der Ausprägung des zytopathischen Effekts in Zellkultur (CPE). Alle hier aufgeführten Fäkalisolate konnten der phylogenetischen Gruppe B2 zugeordnet werden.

Fäkalisolat	Hämolyse	<i>cnf</i>	<i>cdt</i>	CPE
„Maria Souladaki“ 1/2	-	-	-	+
„Maria Souladaki“ 1/3	-	-	-	+
„Maria Souladaki“ 1/5	-	-	-	+
„Maria Souladaki“ 1/10	-	-	-	+
„Maria Souladaki“ 1/18	-	-	-	+
„Maria Souladaki“ 1/20	+	<i>cnf-1</i>	-	n.b.
„Maria Souladaki“ 1/22	-	-	-	+
„Maria Souladaki“ 1/27	-	-	-	+
„Maria Souladaki“ 1/33	-	<i>cnf-1</i>	<i>cdt-IV</i>	+
„Maria Souladaki“ 1/40	-	<i>cnf-1</i>	<i>cdt-IV</i>	+
„Maria Souladaki“ 1/46	-	-	-	+
„Maria Souladaki“ 1/47	-	-	-	+
„Maria Souladaki“ 2/5	-	<i>cnf-1</i>	-	+
„Maria Souladaki“ 2/11	+	<i>cnf-1</i>	-	n.b.
„Maria Souladaki“ 2/19	-	-	-	+
„Maria Souladaki“ 2/29	-	-	-	+
„Maria Souladaki“ 2/33	-	-	-	+
„Maria Souladaki“ 2/38	+	<i>cnf-1</i>	-	n.b.
„Maria Souladaki“ 2/44	-	<i>cnf-1</i>	-	+
„Maria Souladaki“ 3/1	+	<i>cnf-1</i>	-	n.b.
„Maria Souladaki“ 3/3	-	-	<i>cdt-I</i>	+
„Maria Souladaki“ 3/4	-	-	-	+
„Maria Souladaki“ 3/14	+	<i>cnf-1</i>	<i>cdt-IV</i>	n.b.
„Maria Souladaki“ 3/24	+	-	-	n.b.
„Maria Souladaki“ 3/33	+	-	-	n.b.
„Maria Souladaki“ 3/34	-	-	-	+

n.b.: nicht bestimmbar aufgrund hämolytischer Aktivität

4.2 Der chromosomale Kontext des Colibactin-Genclusters in *Citrobacter koseri* Frederiksen ATCC BAA-895

Der Bakterienstamm *Citrobacter koseri* Frederiksen ATCC BAA-895 stellt für diese Arbeit insofern eine Besonderheit dar, da dieser Stamm durch *in silico* Analyse als Colibactin-Gencluster tragend identifiziert wurde. Das Genom dieses Bakterienstammes ist vollständig sequenziert und unter der Accession Number CP000822 in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) verfügbar. Ein Vergleich der Sequenzen des Colibactin-Genclusters abgeleitet aus *E. coli* Stamm IHE3034 und dem aus *Citrobacter koseri* Frederiksen zeigte eine Identität von mindestens 99% auf Nukleotidebene für jedes ORF. Eine nähere Betrachtung des chromosomalen Kontexts in *Citrobacter koseri* Frederiksen zeigte, dass das nächstgelegene *tRNA-asn*-Gen ca. 85 kb stromabwärts gelegen ist. Der Bereich zwischen dem Colibactin-Gencluster und diesem *tRNA-asn*-Gen kann in mehrere Bereiche gegliedert werden. So findet sich direkt angrenzend an das Colibactin-Gencluster ein Bereich, der vor allem Gene zur Mobilisierung und zum Transfer von DNA enthält. Diesem schließt sich ein Bereich an, der hohe Identität zur High Pathogenicity Island (HPI) aus *Yersinia pestis* aufzeigt und auch die Gene beinhaltet, die für Yersiniabactin kodieren. Ein sich daran anschließender dritter Bereich weist Identität zu einem Teil des großen Plasmids pLVPK (Chen *et al.* 2004) aus *Klebsiella pneumoniae* CG43 auf. Ein Vergleich dieses gesamten Genomabschnitts bestehend aus Colibactin-Gencluster, DNA Mobilisierungs- und Transferabschnitts und High Pathogenicity Island mit den Sequenzen der integrativen und konjugativen Elemente aus *Klebsiella pneumoniae* (ICEKp1) und *Escherichia coli* (ICEEc1) zeigt eine ähnliche Struktur (Abb. 4.2). Somit wurde dieser in *Citrobacter koseri* Frederiksen gefundene Genombereich analog zu ICEKp1 und ICEEc1 als integratives und konjugatives Element aus *Citrobacter koseri* (ICECk1) bezeichnet.

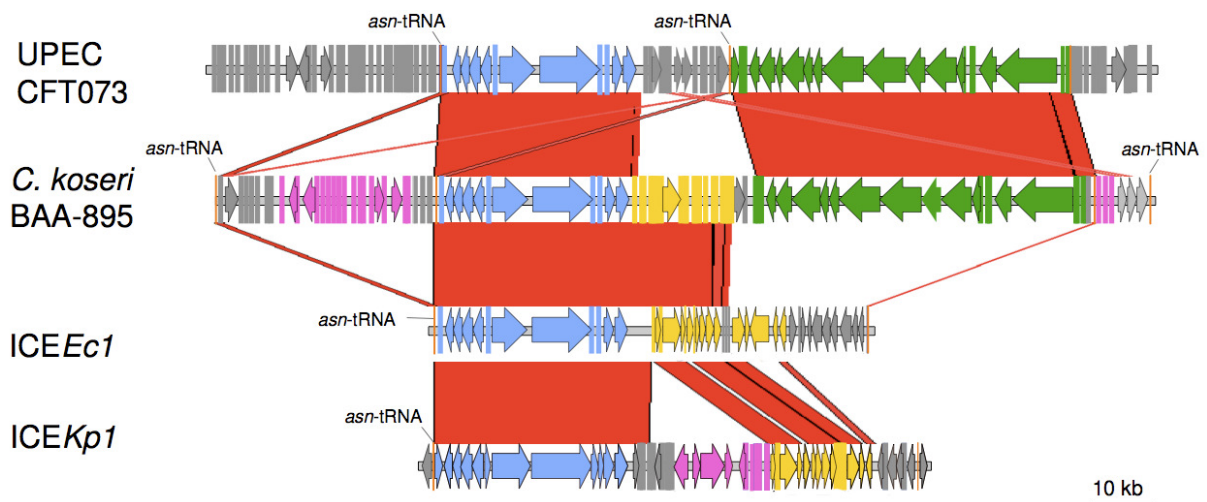


Abbildung 4.2: Die genetische Struktur des Colibactin-Genclusters innerhalb des integrativen und konjugativen Elements (ICE*Ck1*) aus *Citrobacter koseri* Frederiksen BAA-895 im Vergleich zu dem UPEC Stamm CFT073 und den integrativen und konjugativen Elementen aus *Klebsiella pneumoniae* (ICE*Kp1*) und *Escherichia coli* (ICE*Ec1*). Dargestellt sind die verschiedenen DNA-Bereiche (Colibactin: grün; DNA Transfer / Mobilisierung: gelb; Yersiniabactin (HPI): blau; pLVPK-ähnliche Bereiche: rosa). Homologe Nukleotid-Sequenzen sind rot markiert. Direkte Wiederholungssequenzen sind in orange dargestellt. Modifiziert nach Putze *et al.* 2009.

4.2.1 Nachweis des ICE*Ck1* aus *Citrobacter koseri* Frederiksen in weiteren Bakterienstämmen der Art *Citrobacter koseri*

Nachdem im Rahmen dieser Arbeit das Colibactin-Gencluster als Bestandteil des integrativen und konjugativen Elements aus *Citrobacter koseri* Frederiksen (ICE*Ck1*) identifiziert werden konnte, stellte sich die Frage inwieweit das Colibactin-Gencluster bzw. das ICE*Ck1* in der Art *Citrobacter koseri* verbreitet ist. Hauptaugenmerk lag dabei zunächst auf dem Vorhandensein des Colibactin-Genclusters in *C. koseri*. Die kooperierende Arbeitsgruppe von E. Oswald aus Toulouse, Frankreich, konnte unter einer Sammlung klinischer *C. koseri* Isolate 24 Colibactin-Gencluster tragende Bakterienstämme identifizieren. Die Präsenz des Colibactin-Genclusters konnte mittels PCR bestätigt werden. Anschließend sollte überprüft werden, ob neben dem Colibactin-Gencluster auch das gesamte ICE*Ck1* in diesen Bakterienstämmen vorhanden ist. Für diese Untersuchungen wurden Oligonukleotid-Primer verwendet,

die zur Detektion der drei zusätzlichen DNA-Regionen neben dem Colibactin-Gencluster geeignet sind. Diese Oligonukleotid-Primer sind dahingehend gestaltet, diese DNA-Regionen lückenlos nachweisen zu können. Dazu wurden insgesamt 102 Oligonukleotid-Paare entworfen, mit denen überlappende Fragmente von jeweils ca. 1 kb amplifiziert werden (siehe Anhang, Tabelle 7.2). Diese Oligonukleotid-Primer-Sammlung wurde schon für vorherige Untersuchungen verwendet (siehe folgenden Abschnitt 4.3). Aufgrund der hohen Anzahl zu untersuchender Bakterienstämme wurde auf eine weniger arbeitsintensive Screening-Strategie zurückgegriffen. Anstelle alle Oligonukleotid-Primer zu verwenden, wurden Oligonukleotid-Primerpaare verwendet, die es ermöglichen einen größeren Bereich abzudecken. Die verwendeten Primerpaare wurden nach folgendem Schema ausgewählt: Primer-Nr. $X_{\text{vorwärts}}$ wurde kombiniert mit Primer-Nr. $(X + 2)_{\text{rückwärts}}$. Die daraus resultierende erwartete Fragmentlänge liegt bei ungefähr 2,7 kb, was mit heutigen DNA-Polymerasen zuverlässig amplifiziert werden kann.

Auf diese Weise wurden die oben genannten 24 *C. koseri* Isolate untersucht. Entgegen der Erwartung, dass die chromosomale Organisation des ICECk1 dieser Isolate mit der des sequenzierten *C. koseri* Frederiksen überein stimmt, zeigte sich, dass dies nur für ein Isolat zutrifft. Für das *C. koseri* Isolat GHB4 konnte das Vorhandensein des gesamten ICECk1 in der bekannten Organisation gezeigt werden. Allerdings ist das ICECk1 des Isolats GHB4 nicht in demselben *tRNA-asn* Gen inseriert wie es in *C. koseri* Frederiksen der Fall ist. Eine Übersicht aller auf die Präsenz des ICECk1 untersuchten *C. koseri* Isolate ist in Abbildung 4.3 dargestellt. Es ist festzustellen, dass bei 23 von 24 untersuchten Isolaten das ICECk1 nicht in seiner postulierten Organisation vorhanden ist. Diese 23 Isolate zeigen jedoch dasselbe Muster. So ist bei allen ein Großteil der DNA-Mobilisierungs- und -Transfer Region nachweisbar. Auch kann bei allen 23 Isolaten ein Großteil der HPI (High Pathogenicity Island) nachgewiesen werden. Es war jedoch nicht möglich eine direkte Nachbarschaft zwischen DNA-Mobilisierungs- und -Transfer Region und der HPI zu belegen. In der Sequenz des ICECk1 umfasst der nicht nachweisbare DNA-Bereich ca. 15 kb. Auch mit leistungsfähigen Polymerasen war dieser DNA Bereich nicht amplifizierbar. Daher kann über die Größe des Bereichs zwischen HPI und DNA-Mobilisierung und -Transfer in den 23 *C. koseri* Isolaten keine Aussage getroffen werden.

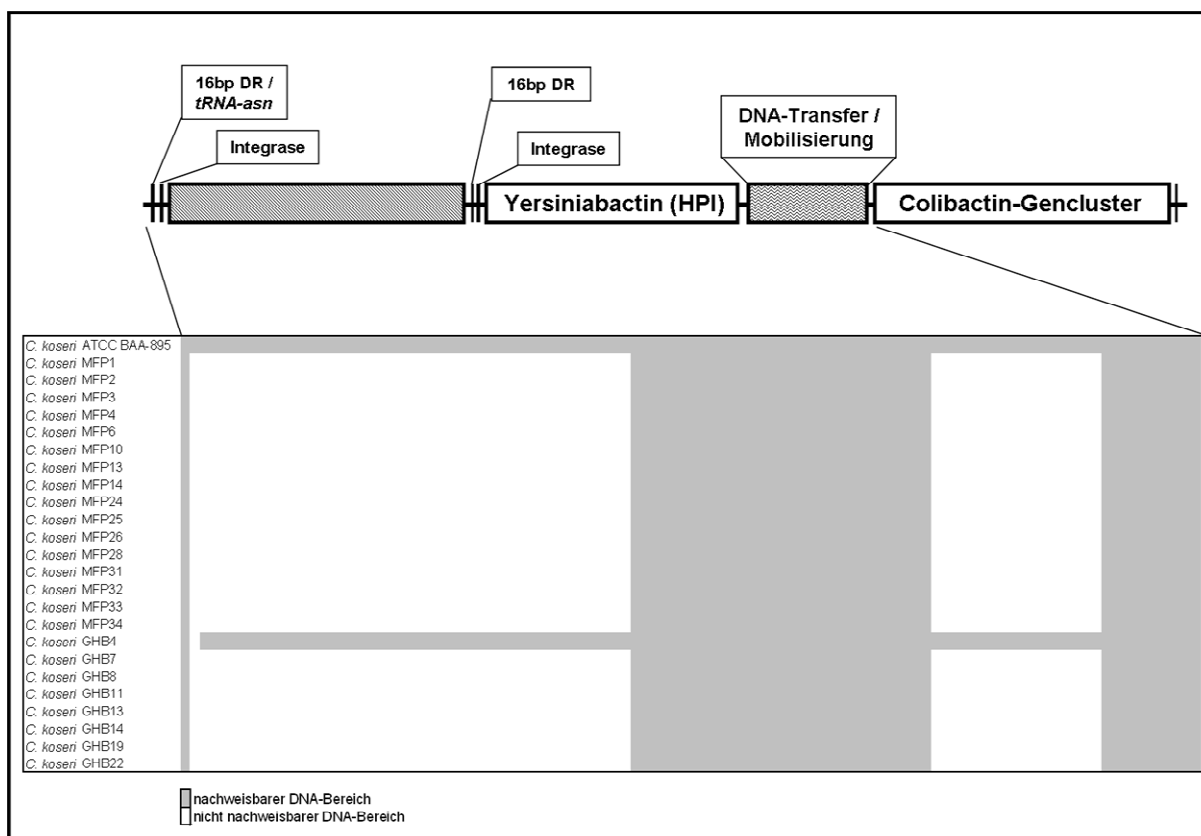


Abbildung 4.3: Untersuchung von 24 *C. koseri* Isolaten auf die Präsenz des ICECk1. Oben: Schematische Darstellung des ICECk1. Unten: Schematische Darstellung nachweisbarer (grau) und nicht nachweisbarer (weiß) DNA-Regionen. Als Positivkontrolle diente *C. koseri* Frederiksen ATCC BAA-895. DR: Direct Repeat

4.3 Bestimmung der chromosomalen Integrationsstellen des Colibactin-Genclusters in verschiedenen Bakterienstämmen der Familie *Enterobacteriaceae*

In vorangegangenen Arbeiten (Nougayrede *et al.* 2006; Homburg 2007) konnte das Colibactin-Gencluster nur in *E. coli* der phylogenetischen Gruppe ECOR-B2 detektiert werden und war stets im gleichen tRNA-Gen inseriert (s.a. Abschnitt 1.6). Hierbei handelt es sich um *tRNA-asnW*. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass das Colibactin-Gencluster auch in anderen Bakterienstämmen innerhalb der Familie der *Enterobacteriaceae* zu finden ist. In Folge dessen wurde auch offensichtlich, dass das Colibactin-Gencluster in diesen Bakterienstämmen an anderer Stelle im Chromosom inseriert ist. Die für *E. coli* spezifische Insertion des Colibactin-Genclusters im *tRNA-asnW* Gen konnte in diesen Stämmen mittels PCR nicht nachgewiesen werden. Um die chromosomale Insertionsstelle des Colibactin-Genclusters in *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* und in *E. coli* der phylogenetischen Gruppe ECOR-B1 zu bestimmen, wurde isolierte genomische DNA der jeweiligen Stämme direkt sequenziert. Die dazu verwendeten Oligonukleotid-Primer binden an bekannte DNA-Sequenzen in der Nähe von unbekanntem DNA-Bereichen und ermöglichen somit die Aufklärung dieser nachfolgenden unbekanntem DNA-Sequenzen. Die so erhaltenen Sequenzinformationen und daraus abgeleitete chromosomale Integrationsstellen wurden durch Standard-PCR und Sequenzierung dieser DNA-Fragmente verifiziert.

Detektion des integrativen und konjugativen Elements aus *Citrobacter koseri* Frederiksen in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* und *Enterobacter aerogenes*

Im Rahmen der Untersuchungen zur Bestimmung der chromosomalen Integrationsstelle des Colibactin-Genclusters in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* und *Enterobacter aerogenes* konnte eine Assoziation von Teilen des integrativen und konjugativen Elements aus *Citrobacter koseri* Frederiksen (*ICECk1*) nachgewiesen werden. Diese ersten Ergebnisse führten zu der Vermutung, dass in diesen Bakterienstämmen das gesamte *ICECk1* vorhanden ist. Um diese Vermutung

zu bestätigen, wurden Oligonukleotid-Primer entworfen, die zur Detektion der drei zusätzlichen DNA-Regionen neben dem Colibactin-Gencluster geeignet sind. Diese Oligonukleotid-Primer sind dahingehend gestaltet, diese DNA-Regionen lückenlos nachweisen zu können. Dazu wurden insgesamt 102 Oligonukleotid-Paare entworfen, mit denen überlappende Fragmente von jeweils ca. 1 kb amplifiziert werden (siehe Tabelle 7.2 im Anhang). Die nachfolgende Untersuchung der Colibactin-Gencluster positiven *Klebsiella pneumoniae*-, *Escherichia coli*- und *Enterobacter aerogenes*- Stämme zeigte, dass in diesen tatsächlich das gesamte ICE*Ck1* nachweisbar ist. Allerdings konnten auch einige DNA-Sequenzen mit leicht degenerierter Sequenz bzw. Insertionen gefunden werden. Eine Übersicht der getesteten Bakterienstämme ist in Abbildung 4.4 dargestellt.

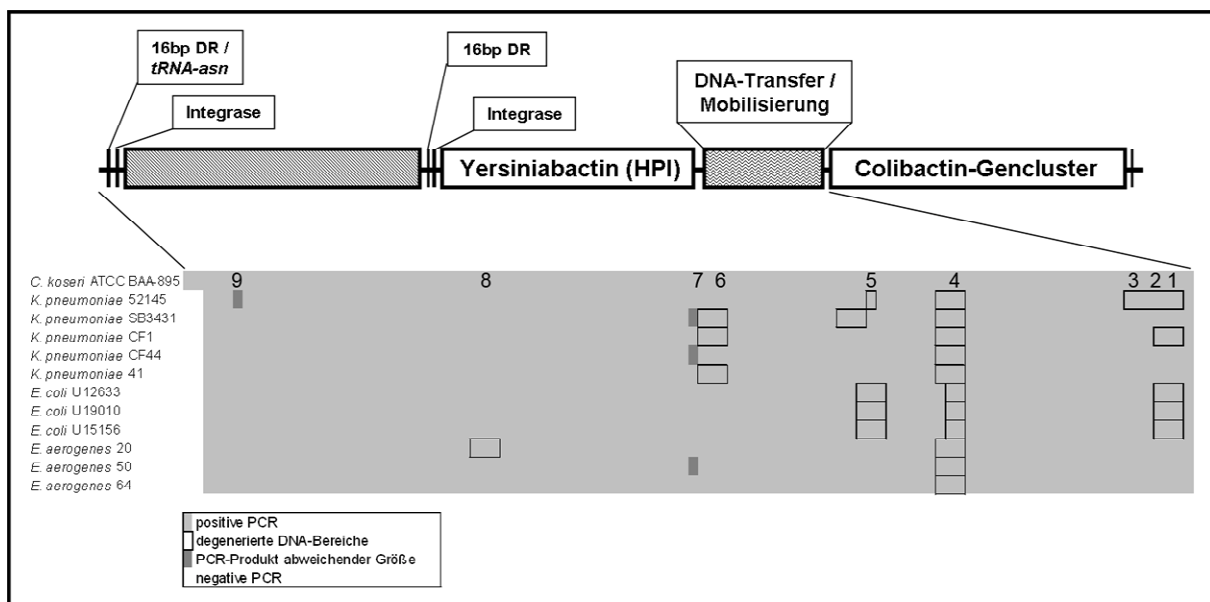


Abbildung 4.4: Detektion des ICE*Ck1* in *K. pneumoniae*, *E. coli* und *E. aerogenes* mittels PCR. Schematische Darstellung der 102 PCR-Fragmente für die jeweiligen zu untersuchenden Bakterienstämme. Hellgraue Bereiche: positive PCR; Schwarz umrahmte Bereiche: degenerierte DNA-Sequenz; Dunkelgraue Bereiche: PCR-Produkt abweichender Größe; Weiße Bereiche: negative PCR. DR: Direct Repeat. Nummer 1-9: vgl. Tab. 4.4

Die durchgeführten Untersuchungen zur Präsenz des ICE*Ck1* in *K. pneumoniae*, *E. coli* und *E. aerogenes* belegen eindeutig, dass das ICE*Ck1* in diesen Stämmen vorhanden ist. Die gefundenen Abweichungen innerhalb der Sequenz beruhen zum größten Teil auf Degenerationen verglichen zu der Genom-Sequenz von *C. koseri* Frederiksen ATCC BAA-895. Diese beeinflussen jedoch die Gesamtgröße der DNA-

Bereiche nicht stark genug, um sie mittels Gelelektrophorese nach vorangegangener PCR sichtbar zu machen. Zusätzlich konnten auch DNA-Bereiche identifiziert werden, an denen, erkenntlich durch eine abweichende Fragmentgröße, eine Insertion stattgefunden hat. In drei dieser Fälle handelt es sich um Insertionen von ca. 100 - 200 bp. Zusätzlich konnte in *K. pneumoniae* 52145 die Insertion einer 1.330 bp Insertionssequenz (IS2) identifiziert werden. Eine detaillierte Auflistung der gefundenen Sequenzvariabilitäten und betroffenen ORFs ist in Tabelle 4.3 zusammengestellt.

Tabelle 4.4: Übersicht der gefundenen Sequenzvariabilitäten des ICE*Ck1* in *K. pneumoniae*, *E. coli* und *E. aerogenes* Stämmen basierend auf der Genomsequenz von *C. koseri* Frederiksen ATCC BAA-895.

Chrom. Region (bp) / Nr. in Abb. 4.4	ORF	Protein
871.749 - 872.718 / 1	CKO_00880	putatives Mobilisierungs-Protein mobB, Refseq.: NP_995436 (<i>Y. pestis</i> biovar Microtus str. 91001)
873.448 - 874.420 / 2	CKO_00882	hypothetisches Protein
	CKO_00883	hypothetisches Protein (Psort location: zytoplasmatisch)
	CKO_00884	hypothetisches Protein, ähnlich zu YggA-like Protein (Arginin Exporter Protein)
	CKO_00885	hypothetisches Protein
875.140 - 876.138 / 3	CKO_00886	Typ IV Sekretionsweg; VirB11 Komponente
	CKO_00887	hypothetisches Protein
	CKO_00888	hypothetisches Protein
	CKO_00889	Typ IV Sekretionsweg; VirB10 Komponente
889.228 - 891.838 / 4	CKO_00905	hypothetisches Protein,
	CKO_00906	hypothetisches Protein, zytoplasmatisch
896.483 - 897.510 / 5	CKO_00909	hypothetisches Protein, NRPS/PKS (Thioesterase-Domänen von Typ I PKS oder NRPS)
909.271 - 910.313 / 6	CKO_00911	hypothetisches Protein, NRPS Module
910.971 - 912.006 / 7	CKO_00912	hypothetisches Protein, Zwei-Komponenten Transkriptions-Regulator, AraC Familie
	CKO_00913	hypothetisches Protein, ABC Transporter
	CKO_00927	hypothetisches Protein, Fe ²⁺ Transport-System-Protein
926.069 - 927.069 / 8	CKO_00928	hypothetisches Protein, Thioredoxin-Transferase

Chrom. Region (bp)	ORF	Protein
949.741 - 950.779 / 9	CKO_00952	hypothetisches Protein, COG: COG3211 erwartete Phosphatase, Insertion der Insertionssequenz IS2 bei Base 950500 (Größe: 1.330bp)

Für die degenerierten DNA-Bereiche kann festgehalten werden, dass es sich neben hypothetischen Proteinen auch um Gene handelt, die an DNA- Mobilisierung und - Transfer beteiligt sein können.

4.3.1 Variable chromosomale Integration des ICECk1 in *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*

Die vorherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass in *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* nicht nur das Colibactin-Gencluster vorhanden ist, sondern dieses als Teil des gesamten integrativen und konjugativen Elementes aus *Citrobacter koseri* Frederiksen (ICECk1) nachgewiesen werden kann. Um die chromosomale Integrationsstelle des ICECk1 in verschiedenen *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* Stämmen zu bestimmen, wurde wie unter 3.2 beschrieben vorgegangen: Nach Isolation genomischer DNA der zu untersuchenden Stämme war es möglich zunächst durch direkte Sequenzierung der genomischen DNA unbekannte DNA-Sequenz aufzuklären. Durch Vergleich der so erhaltenen DNA-Sequenz mittels BLAST-Analyse konnte die Identität dieser ermittelt werden. Als letztendliche Referenz für die Bestimmung der chromosomalen Integrationsstelle des ICECk1 in *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* diente die vollständige Genomsequenz von *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* Stamm MGH 78578 unter der Accession Number CP000647. Sobald anhand der Ergebnisse der direkten Sequenzierung von genomischer DNA der Übergang von ICECk1 ins Kerngenom ermittelt werden konnte, wurde dies durch Standard-PCR mit Oligonukleotid-Primer-Paaren verifiziert. Diese Oligonukleotid-Primer waren so konzipiert, dass der Übergang von ICECk1 in das Kerngenom amplifiziert wurde. Das erhaltene PCR-Amplifikat wurde zusätzlich sequenziert und somit die Integrationsstelle verifiziert. Diese Strategie konnte für folgende Stämme erfolgreich durchgeführt werden: *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* Stamm 52145, Stamm SB3431, Stamm

CF1 und Stamm 41. Es stellte sich heraus, dass die chromosomale Integrationsstelle des ICECk1 nicht in allen untersuchten Bakterienstämmen gleich ist. So konnte gezeigt werden, dass das ICECk1 im Falle der Stämme CF1 und 41 in dem *tRNA-asn1* Gen bezogen auf die Referenz-Genomsequenz von *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* MGH 78578 inseriert ist. Eine zweite Insertionsstelle in dem *tRNA-asn2* Gen konnte für den Stamm 52145 nachgewiesen werden. In Stamm SB3431 konnte die Insertion des ICECk1 in *tRNA-asn3* lokalisiert werden (Abbildung 4.5). Die Integrationsbestimmung erfolgte durch direkte Sequenzierung genomischer DNA und anschließender Verifizierung mittels PCR unter Verwendung von Oligonukleotid-Primern, die links und rechts des entsprechenden tRNA Gens und an den Enden des ICECk1 binden.

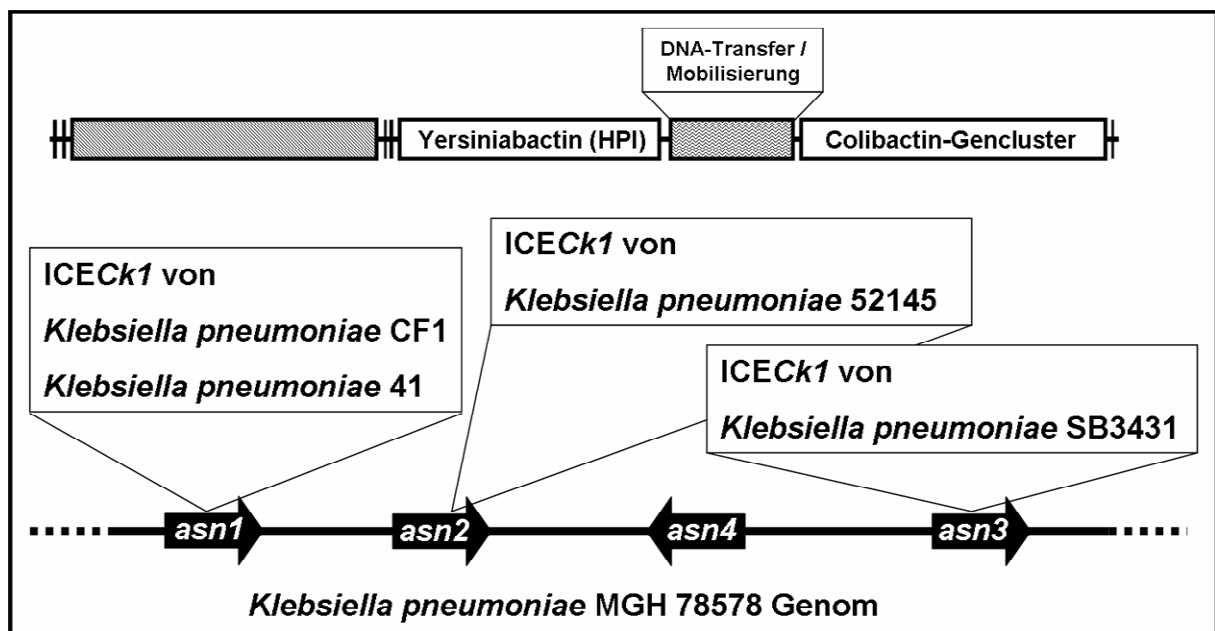


Abbildung 4.5: Variable Integration des ICECk1 in *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* Stämmen. Oben: Struktur und Integrationsorientierung des ICECk1. Unten: Innerhalb der vier Stämme CF1, 41, 52145 und SB3431 konnten drei verschiedene Integrationsstellen des ICECk1 bestimmt werden. Als Referenz dient die Sequenz von *Klebsiella pneumoniae* MGH 78578.

Für einen weiteren ICECk1 tragenden *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* Stamm CF44 war es nicht möglich die chromosomale Integrationsstelle einem der vier *tRNA-asn* Gene zuzuordnen. So konnte in diesem Fall weder eines der schon

als mögliche Integrationsstelle identifizierten *tRNA-asn1*, 2 oder 3 Gene noch das verbleibende *tRNA-asn4* Gen als Integrationsstelle bestätigt werden.

4.3.2 Alternative Integrationsstelle des Colibactin-Genclusters in *Escherichia coli*

Das Colibactin-Gencluster wurde ursprünglich ausschließlich in *Escherichia coli* der phylogenetischen Gruppe ECOR-B2 gefunden. Ein weiteres Merkmal war die konservierte Insertion dieser genomischen Insel im *tRNA-asnW* Locus. Im Rahmen dieser Arbeit konnte das Colibactin-Gencluster jedoch auch zu einem geringen Prozentsatz in *E. coli* Stämmen der phylogenetischen Gruppe ECOR-B1 identifiziert werden. Es stellte sich zudem heraus, dass diese *E. coli* Stämme nicht nur das Colibactin-Gencluster, sondern dieses als Bestandteil des integrativen und konjugativen Elementes aus *C. koseri* Frederiksen (ICE*Ck1*) beherbergen. Allerdings konnte die Insertion des ICE*Ck1* im *tRNA-asnW* Locus in diesen Stämmen nicht bestätigt werden. Daher wurden Untersuchungen zur chromosomalen Integration des ICE*Ck1* in diesen Stämmen, wie schon oben beschrieben, durchgeführt. Durch direkte Sequenzierung genomischer DNA dieser *E. coli* Stämme und anschließender Verifizierung mittels Standard-PCR konnte der *tRNA-asnU* Locus als Integrationsstelle identifiziert werden. Als Referenz diente bei diesen Untersuchungen die vollständige Genomsequenz des *E. coli* K-12 Stammes MG1655 (Accession Number: U00096).

Variabilität der Integration und Organisation des Colibactin-Genclusters innerhalb der Art *Escherichia coli*

Obwohl für die bedeutende Mehrheit (ca. 97 %) der Colibactin-Gencluster tragenden *E. coli* Stämme die nahezu konservierte Integration des Colibactin-Genclusters am *tRNA-asnW* Locus beschrieben wurde, können doch Stämme gefunden werden, die eine abweichende chromosomale Struktur zeigen. Neben den oben beschriebenen *E. coli* Urinisolaten der phylogenetischen Gruppe ECOR-B1, welche sowohl das gesamte ICE*Ck1* beherbergen als auch eine abweichende chromosomale Insertionsstelle am *tRNA-asnU* Locus zeigen, konnten zusätzlich drei uropathogene *E. coli* identifiziert werden, die von der mehrheitlichen Genomstruktur abweichen.

Diese uropathogenen *E. coli* konnten zwar der phylogenetischen Gruppe ECOR-B2 zugeordnet werden, allerdings kann die Insertion des Colibactin-Genclusters an dem *tRNA-asnW* Locus nicht bestätigt werden. Für diese Stämme ist noch nicht geklärt, ob das Colibactin-Gencluster alleine vorliegt, oder mit anderer genetischer Information assoziiert ist analog zur Struktur des ICECk1, welches selbst nicht nachgewiesen werden konnte. Auch bleibt die chromosomale Integrationsstelle des Colibactin-Genclusters für diese Stämme offen. Die geringe Ausbeute und schlechte Qualität der von diesen Stämmen isolierten genomischen DNA, welche auf unvollständige Lyse der Bakterien während der Isolation zurückzuführen ist, führte zu wenig aussagekräftigen Daten nach Sequenzierung. Hier sind weitere Anstrengungen nötig, um die genetische Struktur und Integrationsstelle des Colibactin-Genclusters in diesen Stämmen aufzuklären.

4.4 Untersuchungen zur Exzision und extrachromosomalen Zirkularisation des ICECk1

Das integrative und konjugative Element aus *Citrobacter koseri* (ICECk1) weist mehrere Charakteristika auf, die eine mögliche extrachromosomale Verbreitung durch horizontalen Gentransfer nahe legen. Zu diesen zählt das Vorhandensein zweier P4-ähnlicher Integrasen, die Flankierung des ICECk1 seitens 16 bp direkter Wiederholungssequenzen und die Integration in einem tRNA-Gen (siehe auch Abschnitt 1.6). Des Weiteren beinhaltet das ICECk1 einen DNA-Abschnitt, welcher Gene trägt, die hohe Homologie zu DNA-Transfer und -Mobilisierungs Genen aufweisen. Die Tatsache, dass das ICECk1 in vier verschiedenen Bakterienarten gefunden wurde, unterstreicht die Möglichkeit einer extrachromosomalen Verbreitung zusätzlich.

Um eine mögliche Exzision und extrachromosomale Zirkularisation des ICECk1 nachzuweisen, bediente man sich einer Methodenkombination aus inverser und „Nested PCR“. Die „Nested PCR“ ist weitaus sensitiver als eine Standard-PCR und somit für die durchgeführten Untersuchungen gut geeignet. Dazu wurden Oligonukleotid-Primer verwendet (siehe Tabelle 7.2 im Anhang), die bei chromosomal integriertem und linearem ICECk1 in die entgegengesetzte Richtung

(invers) zeigen wie bei einer Standard-PCR. Nach theoretischer Exzision und Zirkularisierung des ICE*Ck1* zeigen diese Primer dann zueinander. Um die Sensitivität zu erhöhen, wurden weitere Oligonukleotid-Primer entworfen, die im PCR-Produkt der vorherigen Oligonukleotid-Primer binden („Nested PCR). Somit ist es möglich auch geringe Mengen von DNA nachzuweisen, da durch die Durchführung zweier getrennter Amplifikationsreaktionen das Signal erheblich verstärkt wird. Bei diesen Untersuchungen wurden sämtliche 16 bp direkte Wiederholungssequenzen, die das ICE*Ck1* flankieren bzw. in diesem enthalten sind als mögliche Exzisionsstellen in Betracht gezogen (Abb. 4.6). Als Proben dienten Übernachtskulturen von *Citrobacter koseri* Frederiksen und verschiedene das ICE*Ck1* tragende *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* Stämme. Als Negativ-Kontrolle verwendete man den Colibactin- und ICE*Ck1*-negativen *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* Stamm MGH 78578. Allerdings gelang der Nachweis einer Exzision und extrachromosomalen Zirkularisation des ICE*Ck1* mit dieser Methode nicht.

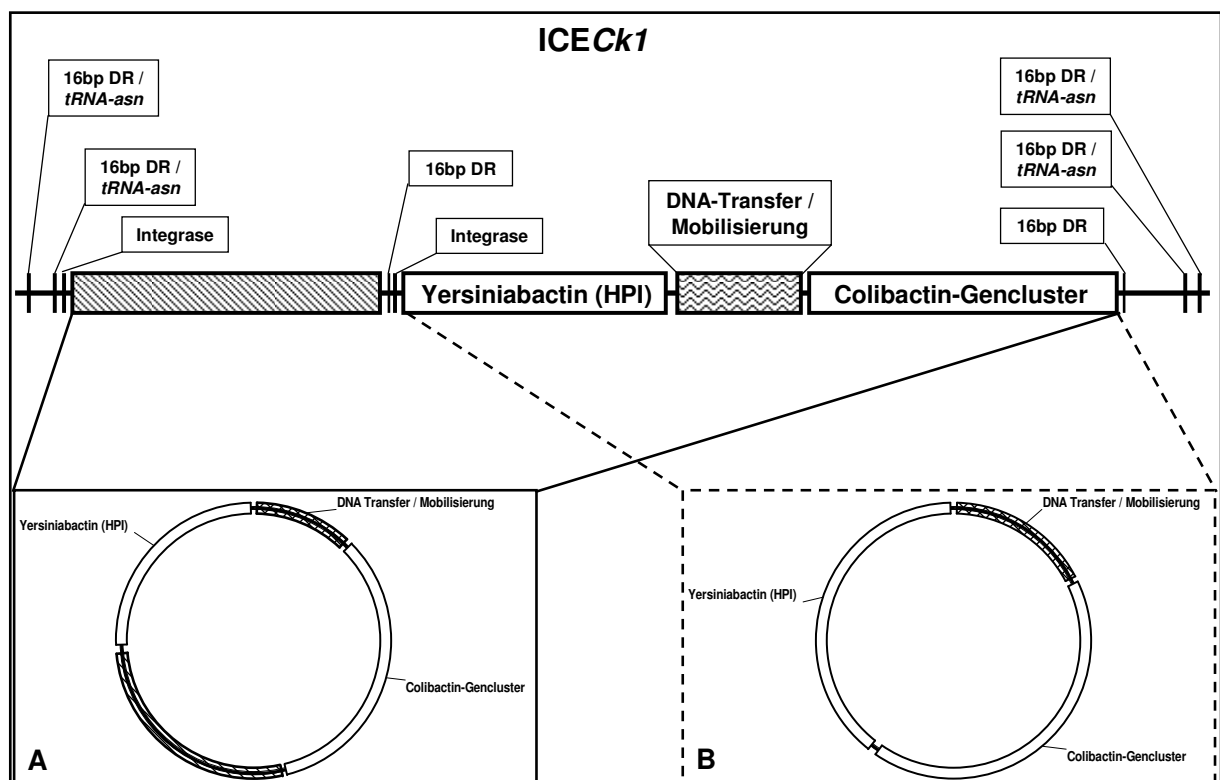


Abbildung 4.6: Schematische Darstellung des ICE*Ck1* bestehend aus dem Colibactin-Gencluster, der DNA-Transfer und Mobilisierungs Region, der HPI und der Region 4. Dargestellt sind zusätzlich die Lokalisation der identischen 16 bp direkten Wiederholungssequenzen (16bp DR), Lage von tRNA-asn-Genen und die für P4-ähnliche Integrasen kodierende Gene. In Teil A und B in der unteren Hälfte der Abbildung sind zwei mögliche zirkuläre extrachromosomale Strukturen des ICE*Ck1* abgebildet.

4.5 Molekulare und phänotypische Charakterisierung verschiedener Mutanten des *Escherichia coli* Stammes Nissle 1917

Neben den Studien zur Verbreitung des Colibactin-Genclusters und der molekularen Analysen zur genomischen Organisation in verschiedenen Bakterienarten war ein Teil dieser Arbeit die Untersuchung eines möglicherweise biologisch relevanten Effektes des Colibactins. Im Vordergrund standen hierbei Untersuchungen eines möglichen Kolonisierungsvorteils im murinen Intestinaltrakt. Um diese Untersuchungen durchführen zu können, bedarf es bestimmter gentechnisch veränderter Bakterienstämme. In folgender Tabelle 4.4 ist eine Übersicht aller verwendeten Mutanten des *E. coli* Stammes Nissle 1917 mit Eigenschaften und Verwendungszweck aufgeführt.

Tabelle 4.4: In dieser Arbeit verwendete Mutanten des *E. coli* Stammes Nissle 1917 zur Untersuchung der biologischen Relevanz des Colibactins

Bakterienstamm	Eigenschaften	Verwendungszweck
<i>E. coli</i> Nissle 1917 Sm ^r	Streptomycinresistente Spontanmutante des Stammes Nissle 1917	Kolonisierungsfähigkeit im murinen Intestinaltrakt
<i>E. coli</i> Nissle 1917 ΔPKS Sm ^r	Streptomycinresistente Spontanmutante des Colibactin-Gencluster-negativen Stammes Nissle 1917	Kolonisierungsfähigkeit im murinen Intestinaltrakt
<i>E. coli</i> Nissle 1917 <i>rpsL</i> K42R <i>attB::cat</i>	Definiert streptomycinresistente und chloramphenicolresistente Mutante des Stammes Nissle 1917	Kompetitive Kolonisierungsfähigkeit im murinen Intestinaltrakt
<i>E. coli</i> Nissle 1917 <i>rpsL</i> K42R <i>clbA::npt</i>	Definiert streptomycinresistente, kanamycinresistente und Colibactin-negative Mutante des Stammes Nissle 1917	Kompetitive Kolonisierungsfähigkeit im murinen Intestinaltrakt

Vor der Verwendung der oben aufgeführten *E. coli* Nissle 1917 Mutanten wurden diese auf verschiedene phänotypische Eigenschaften untersucht.

Nachweis der Colibactinproduktion in Zellkultur

Höchste Priorität für die Verwendung der verschiedenen *E. coli* Nissle 1917 Mutanten im Mausmodell hat die vorhandene bzw. nicht vorhandene Produktion des Colibactins. Da eben der Effekt dieser Verbindung untersucht werden sollte, war es von höchster Bedeutung, dass die entsprechenden Stämme einmal weiterhin das Colibactin produzieren und im anderen Fall die Colibactin-negativen Mutanten tatsächlich keine Colibactinproduktion mehr zeigen. Dazu wurden die verschiedenen Stämme in Zellkultur mit humanen Cervixepithelzellen (HeLa) koinkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 4-5 h wurden die Epithelzellen mehrmals gewaschen und unter Zugabe von 100 µg/ml Gentamycin für drei Tage weiter kultiviert. Im Falle einer Colibactinproduktion konnte eine deutliche Vergrößerung der Epithelzellen im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Zur besseren Visualisierung wurden die Zellen zunächst fixiert und vor der mikroskopischen Betrachtung mit Giemsa-Lösung gefärbt (Abbildung 4.7).

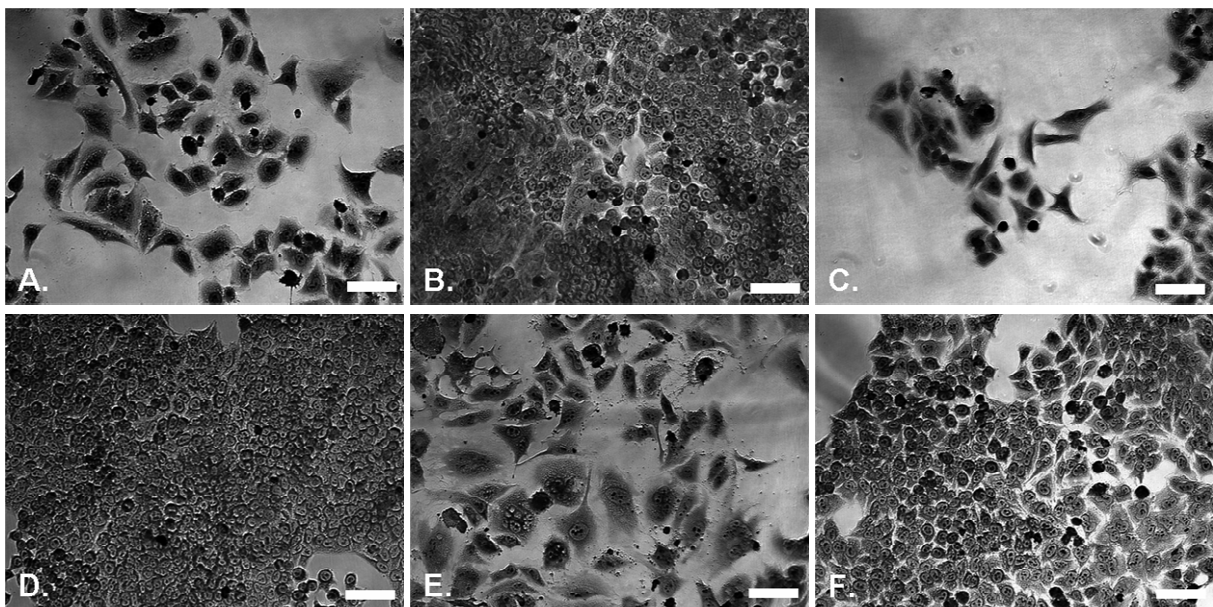


Abbildung 4.7: Dargestellt sind HeLa-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Bakterien und Giemsa-Färbung bei gleicher Vergrößerung zum Nachweis des zytopathischen Effektes. Überprüfung der Colibactin-Produktion verschiedener *E. coli* Nissle 1917 Mutanten. A. Nissle 1917; B. Kontrolle ohne Bakterien; C. Nissle 1917 Sm^r; D. Nissle 1917 ΔPKS Sm^r; E. Nissle 1917 *rpsL* K42R *attB*::*cat*; F. Nissle 1917 *rpsL* K42R *clbA*::*npt*. Maßstabsbalken: 100 µm.

Die Überprüfung der verschiedenen *E. coli* Nissle 1917 Mutanten ergab, dass die einzelnen Mutanten erwartungsgemäß Colibactin produzieren bzw. diese Fähigkeit

verloren haben. Somit war in dieser Hinsicht die Verwendung im murinen Intestinalmodell möglich.

Überprüfung des Wachstums in Flüssigkulturen

Ein weiteres wichtiges Kriterium für die Verwendung von gentechnisch veränderten Bakterien im Tiermodell ist unbeeinflusstes Wachstum der Mutanten. Um dies zu überprüfen, wurde das Wachstum der jeweilig zu verwendenden Stammpaare miteinander verglichen. Dies wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- LB-Medium, 37 °C, schüttelnd, 100 µg/ml Streptomycinsulfat
- LB-Medium, 37 °C, statisch, 100 µg/ml Streptomycinsulfat
- Zellkulturmedium, 37 °C, schüttelnd, 100 µg/ml Streptomycinsulfat
- Zellkulturmedium, 37 °C, statisch, 100 µg/ml Streptomycinsulfat

Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte kein signifikanter Unterschied im Wachstum festgestellt werden. Die Wachstumskurven der Stämme, die während der kompetitiven Studie verwendet wurden, sind in den Abbildungen 4.8 A und 4.8 B unten dargestellt. Die Wachstumskurven der Stämme, die während der nicht-kompetitiven Studie verwendet wurden, wurden nicht persönlich durchgeführt und sind in Abbildung 7.4 im Anhang zu finden.

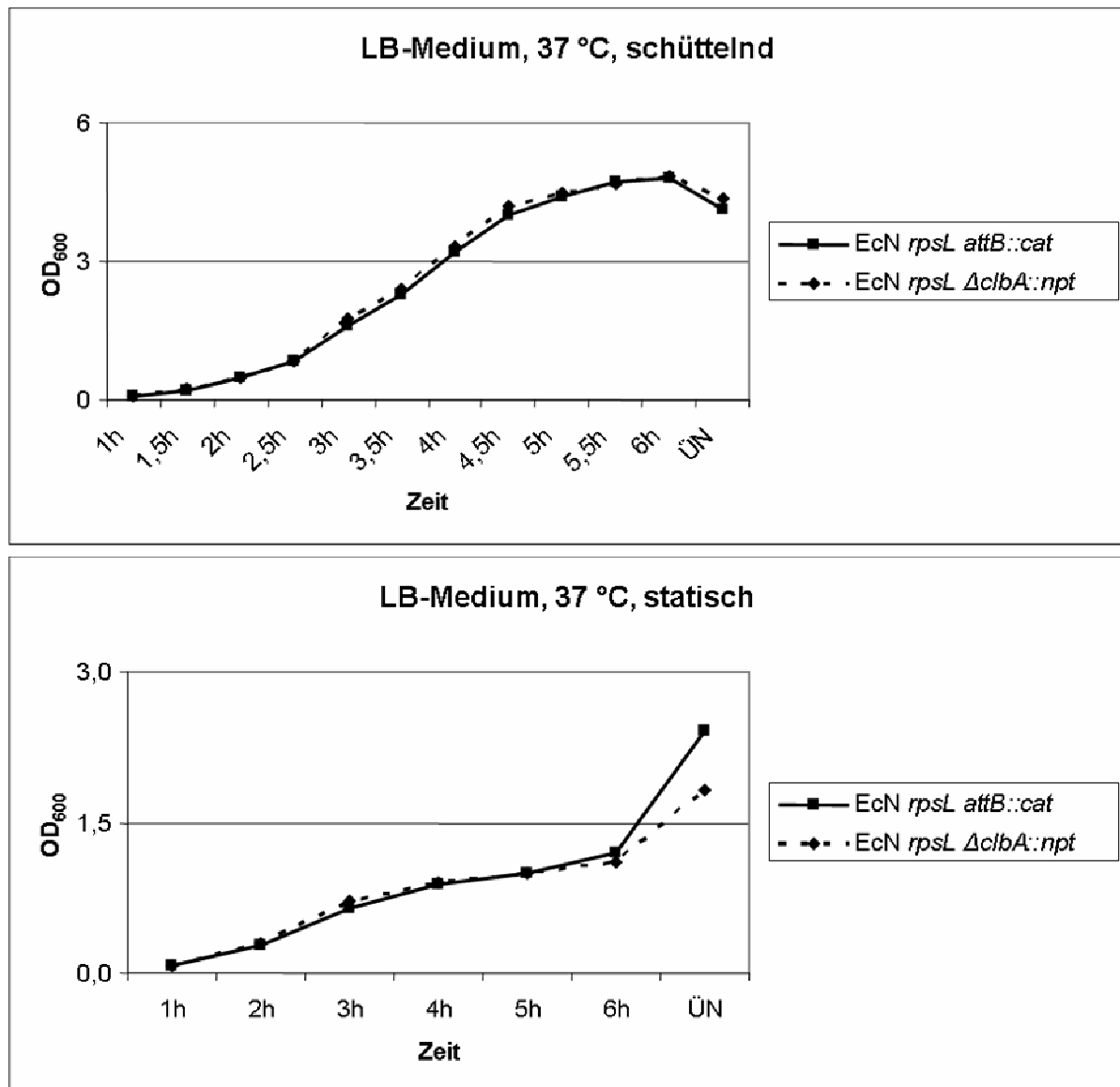


Abbildung 4.8 A: Vergleichende Wachstumskurven von *E. coli* Nissle 1917 *rpsL* K42R *attB::cat* und *E. coli* Nissle 1917 *rpsL* K42R *clbA::npt* in LB-Medium mit 100 µg/ml Streptomycin. Wachstum von *E. coli* Nissle 1917 Mutanten unter aeroben (schüttelnd) und anaeroben (statisch) Bedingungen vor Verwendung im kompetitiven murinen Intestinalmodell. Anhand der Wachstumskurven ist zu erkennen, dass sich die Wachstumskinetik beider Mutanten äquivalent verhält. EcN: *E. coli* Nissle 1917; ÜN: über Nacht

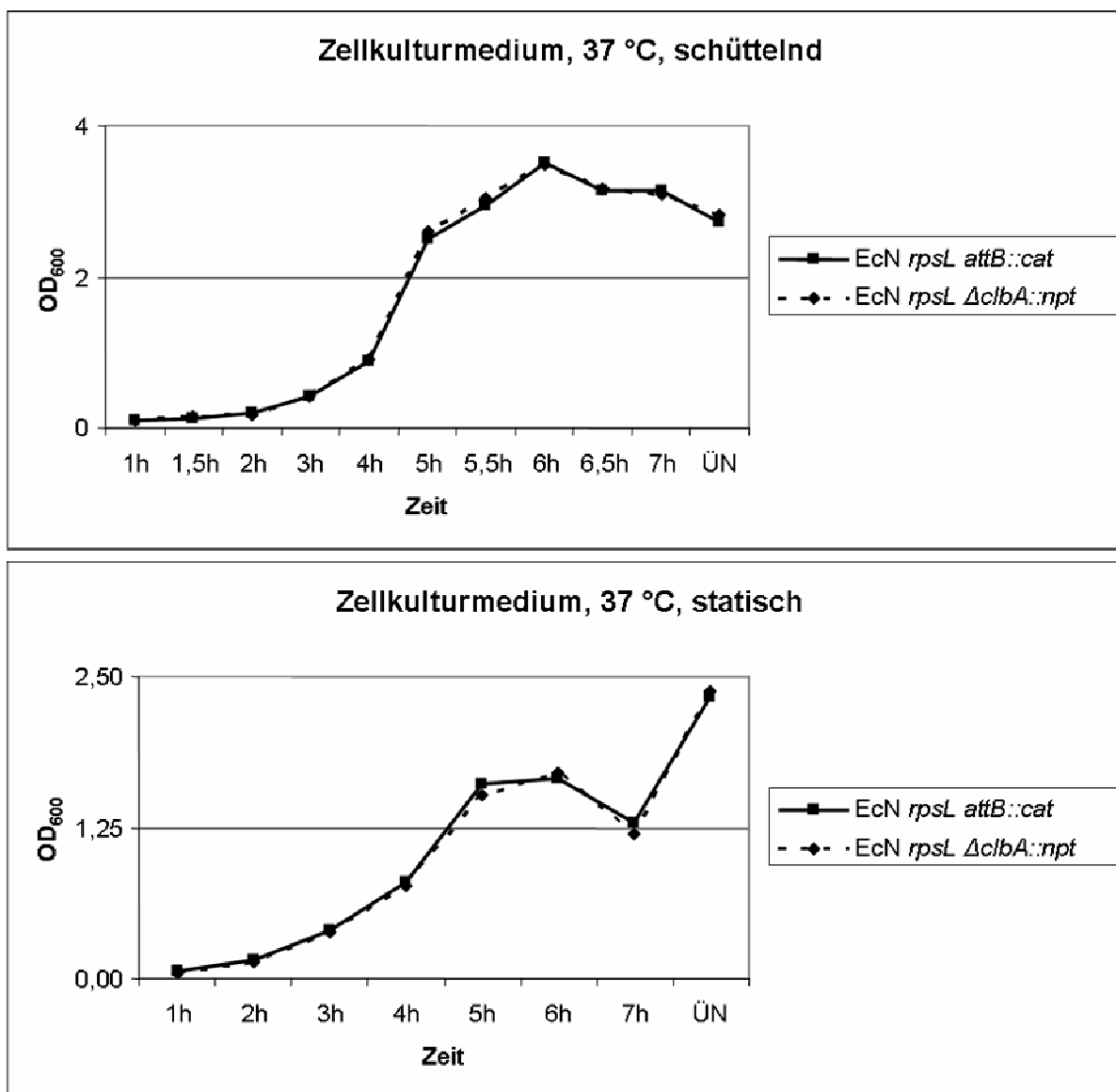


Abbildung 4.8 B: Vergleichende Wachstumskurven von *E. coli* Nissle 1917 *rpsL* K42R *attB::cat* und *E. coli* Nissle 1917 *rpsL* K42R *clbA::npt* in Zellkulturmedium mit 100 µg/ml Streptomycin. Wachstum von *E. coli* Nissle 1917 Mutanten unter aeroben (schüttelnd) und anaeroben (statisch) Bedingungen vor Verwendung im kompetitiven murinen Intestinalmodell. Anhand der Wachstumskurven ist zu erkennen, dass sich die Wachstumskinetik beider Mutanten äquivalent verhält. EcN: *E. coli* Nissle 1917; ÜN: über Nacht

Nachweis der Typ 1 Pili Expression

Zum Nachweis der Expression von Typ 1 Pili wurde die Mannose-abhängige Hefeagglutination durchgeführt. Mit dieser Methode ist es möglich auf einfache Weise das Vorhandensein von Typ 1 Pili nachzuweisen. Diese Untersuchungen wurden in LB-Medium sowie in Zellkulturmedium, schüttelnd sowie stehend bei 37 °C durchgeführt. Es waren keine signifikanten Unterschiede in der Mannose-abhängigen Hefeagglutination zu beobachten.

Nachweis von Curli-Fimbrien und Zelluloseproduktion bei 37 °C

E. coli Nissle 1917 hat die Eigenschaft auch bei 37 °C Curli-Fimbrien auszubilden und Zellulose zu produzieren. Um diese Eigenschaft bei den jeweiligen Mutanten nachzuweisen, wurden diese auf Kongorot-Agar bei 37 °C für 48 h kultiviert. Bilden die getesteten Stämme Curli-Fimbrien aus und produzieren Zellulose, kann man den sogenannten *rdar*-Morphotyp (red dry and rough) bei Wachstum auf Kongorot-Agar beobachten.

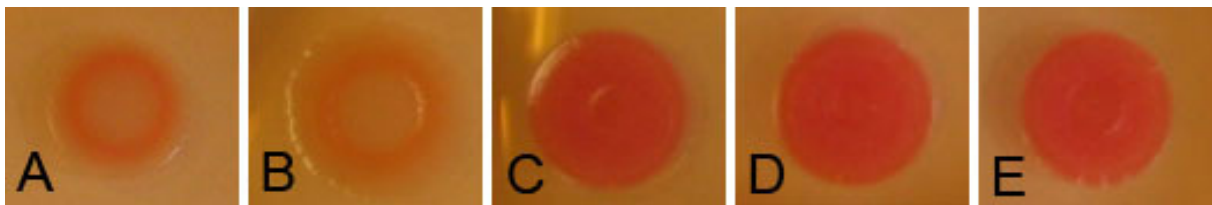


Abbildung 4.9: Ausbildung des *rdar*-Morphotyps verschiedener *E. coli* Stämme auf Kongorot-Agar nach Inkubation bei 37 °C für 48 h. A. 536; B. K-12 MG1655; C. Nissle 1917; D. Nissle 1917 *rpsL* K42R *attB::cat*; E. Nissle 1917 *rpsL* K42R *clbA::npt*

In Abbildung 4.9 ist zu erkennen, dass die zwei *E. coli* Nissle 1917 Mutanten – Nissle 1917 *rpsL* K42R *attB::cat* und Nissle 1917 *rpsL* K42R *clbA::npt* – weiterhin Curli-Fimbrien und Zellulose während des Wachstums bei 37 °C exprimieren wie der Elternstamm *E. coli* Nissle1917 (C).

Nachweis der Expression einer funktionellen Flagelle

Da auch die Flagelle von Bakterien ein wichtiger zellulärer Bestandteil dieser ist, sollte überprüft werden, ob die verschiedenen *E. coli* Nissle 1917 Mutanten über eine funktionelle Flagelle verfügen. Dazu wurden Motilitätstests durchgeführt, indem man

die Bakterien auf Schwärmagarplatten aufimpfte. Nach Inkubation bei 37 °C für 14 h kann die Motilität der Bakterien anhand des Schwärmsradius beurteilt werden.

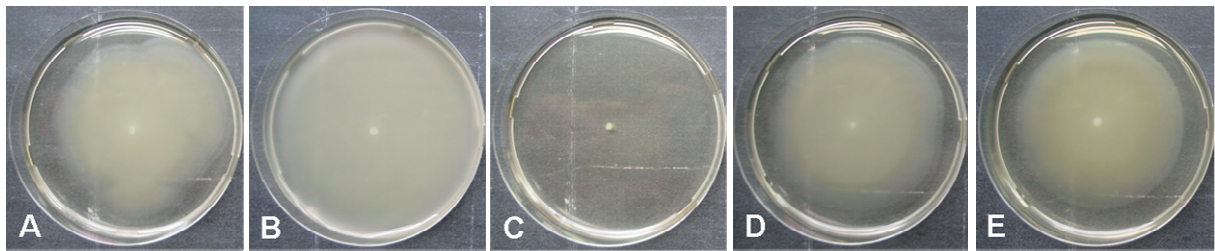


Abbildung 4.10: Bestimmung der Motilität verschiedener *E. coli* Stämme auf Schwärmagar. A. Nissle 1917; B. 536; C. K-12 HB101; D. Nissle 1917 *rpsL* K42R *attB::cat*; E. Nissle 1917 *rpsL* K42R *clbA::npt*

Anhand Abbildung 4.10 ist zu erkennen, dass alle getesteten *E. coli* Stämme, mit Ausnahme der Negativkontrolle *E. coli* K-12 HB101, in der Lage sind eine funktionelle Flagelle auszubilden und somit beweglich sind.

Charakterisierung des Lipopolysaccharids (LPS)

E. coli Nissle 1917 weist ein semi-raues Lipopolysaccharid (LPS) auf. Die Ursache hierfür ist ein Einzelnukleotidaustausch im *wzy*-Gen (Grozdanov *et al.* 2002). Daher ist *E. coli* Nissle 1917 serumsensitiv. Das Vorhandensein des semi-rauen LPS ist ein weiteres wichtiges Charakteristikum, welches im Vorfeld der Tierversuche für die verwendeten *E. coli* Nissle 1917 Mutanten geklärt werden sollte. Dazu wurde eine Silberfärbung des LPS verschiedener Stämme nach Auftrennung im Polyacrylamid-Gel durchgeführt. Als Kontrolle für glattes LPS wurde der *E. coli* Stamm 536 verwendet. Neben diesem wurden der *E. coli* Stamm Nissle 1917 mit den entsprechenden Mutanten verglichen (siehe Abbildung 4.11 unten).

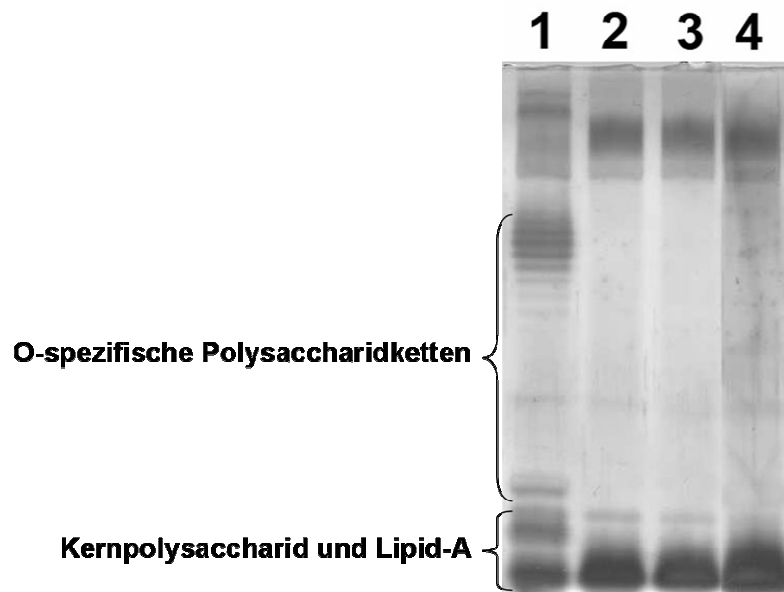


Abbildung 4.11: Darstellung des Lipopolysaccharids (LPS) mittels Silberfärbung von 1. *E. coli* 536; 2. *E. coli* Nissle 1917; 3. *E. coli* Nissle 1917 *rpsL* K42R *attB::cat*; 4. *E. coli* Nissle 1917 *rpsL* K42R *clbA::npt*

Die Charakterisierung des LPS ergab, dass die *E. coli* Nissle 1917 Mutanten weiterhin ein semi-raues LPS aufweisen.

Nachweis der *E. coli* Nissle 1917 spezifischen kryptischen Plasmide

Der *E. coli* Stamm Nissle 1917 beherbergt zwei für diesen Stamm charakteristische Plasmide unbekannter Funktion. Die Einzigartigkeit der Kombination dieser Plasmide wird unter anderem für den Nachweis dieses Stammes genutzt (Blum-Oehler *et al.* 2003). Zu diesem Zweck wird das Vorhandensein der zwei Plasmide unter Zuhilfenahme der Polymerase-Kettenreaktion und Verwendung von drei Oligonukleotid-Primerpaaren nachgewiesen. Im Falle der entsprechenden *E. coli* Nissle 1917 Mutanten konnten beide Plasmide nachgewiesen werden.

4.6 Kolonisierungsstudien im Mausmodell

Da bis zum bisherigen Zeitpunkt noch keine Daten zur *in vivo* Relevanz des Colibactin vorlagen, wurden Kolonisierungsstudien im murinen Intestinalmodell durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde das „streptomycin-treated murine large intestine“-Modell angewendet. Dieses beinhaltet die Gabe von streptomycinhaltigem

Trinkwasser (5 g/l) *ad libitum*, um die fakultative intestinale Bakterienflora zu reduzieren. Damit wird eine möglichst effiziente Kolonisierung des murinen Intestinaltrakts seitens der verwendeten Bakterienstämme gewährleistet. Die Experimente im murinen Tiermodell sollten Aufschluss über einen möglichen Kolonisierungsvorteil von Colibactin-produzierenden *E. coli* Nissle 1917 gegenüber Colibactin-negativen *E. coli* Nissle 1917 geben.

Im Rahmen der Kolonisierungsexperimente wurden die Tiere in Einzelhaltung überführt. Zwei Tage vor der ersten Gabe von Bakterien erhielten die Versuchstiere bis zur Beendigung des Experiments streptomycinhaltiges Trinkwasser. Nachdem eine erfolgreiche Reduzierung der intestinalen Bakterienflora durch Streptomycin gegeben war, erfolgte die erste von insgesamt zwei Applikationen von Bakterien. Dazu wurden die Bakterien in einem speziellen Puffer auf die gewünschte Lebendzellzahl verdünnt und oral appliziert. Am darauf folgenden Tag wurde die orale Gabe von Bakterien wiederholt und gleichzeitig erste Stuhlproben zur Analyse der Anzahl wieder ausgeschiedener Bakterien gesammelt. Die Analyse der Stuhlproben erfolgte zunächst täglich und im weiteren Verlauf der Experimente in größeren zeitlichen Abständen. Die Bestimmung der Anzahl lebensfähiger *E. coli* Nissle 1917 in den gesammelten Stuhlproben wurde durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungen bestimmt. Für diesen Zweck wurden Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika verwendet, um auf die anfänglich applizierten *E. coli* Nissle 1917 Stämme zu selektieren. Zur Verifizierung der reisolierten Bakterien wurde in regelmäßigen Abständen zusätzlich ein molekularer Fingerabdruck mittels PCR von zufällig gewählten Bakterienkolonien erstellt (Rademaker & De Bruijn 1992). Bei dieser Methode werden repetitive chromosomale Sequenzen, die in verschiedener Anzahl je nach Bakterienstamm vorkommen, amplifiziert und das nach Gelelektrophorese erhaltene Bandenmuster verglichen. Zu Versuchsende wurden die Versuchstiere euthanasiert und der Intestinaltrakt zur weiteren Analyse präpariert.

4.6.1 Nicht-kompetitive Kolonisierungsstudie im Tiermodell

Zur Überprüfung eines möglichen Kolonisierungsvorteils Colibactin-positiver *E. coli* Nissle 1917 im murinen Intestinalmodell wurden die streptomycinresistenten *E. coli* Stämme Nissle 1917 Sm^r und Nissle 1917 ΔPKS Sm^r Gruppen von je acht Versuchstieren getrennt verabreicht. Dabei enthielt eine Einzeldosis 10⁸ Bakterien des entsprechenden Stammes. Die Versuchsdurchführung entsprach wie in Punkt

4.6 oben beschrieben. Die reisolierten Bakterien wurden auf streptomycinhaltigem MacConkey[®]-Agar kultiviert und die Identität dieser in regelmäßigen Abständen molekular verifiziert. Die Analyse der Stuhlproben erfolgte täglich bis zum neunten Versuchstag. Nach 15 Tagen wurde die letzte Stuhlprobe entnommen und das Experiment beendet. Zusätzlich wurden die Caeca der Versuchstiere präpariert und anschließend Paraffinschnitte zur mikroskopischen Analyse nach Färbung hergestellt.

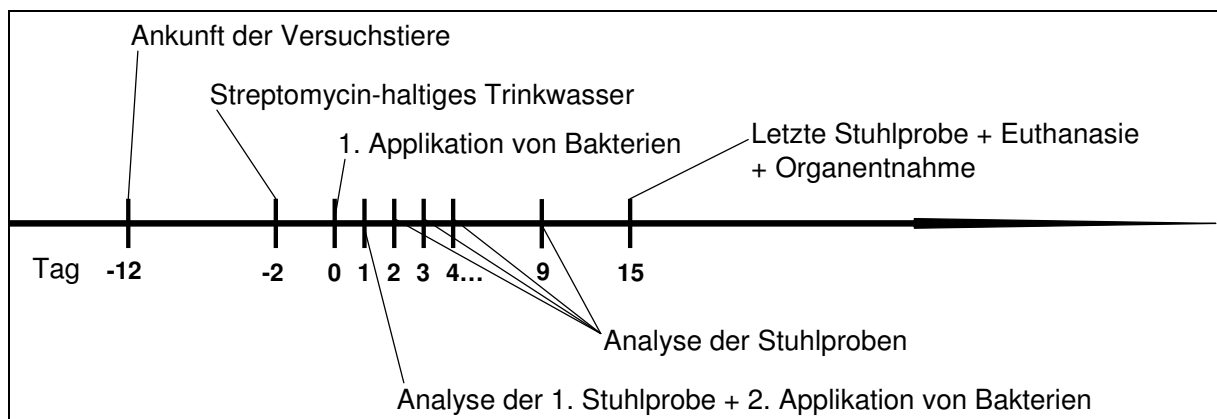


Abbildung 4.12: Zeittafel des nicht-kompetitiven Kolonisierungsexperiments im murinen Intestinalmodell. Übersicht der zeitlichen Abläufe für diesen durchgeführten Versuch.

Die Bestimmung der Anzahl lebensfähiger, aus dem Stuhl der Versuchstiere reisolierter Bakterien zeigte folgendes: Die Anzahl reisolierter Colibactin-positiver *E. coli* Nissle 1917 Sm^r lag im gesamten Versuchszeitraum unter der der reisolierten *E. coli* Nissle 1917 ΔPKS Sm^r. Während der ersten Tage des Versuchs konnte eine bis zu achtfach größere Anzahl von *E. coli* Nissle 1917 ΔPKS Sm^r als *E. coli* Nissle 1917 Sm^r aus dem Stuhl der jeweiligen Versuchstiergruppe isoliert werden. Des Weiteren war eine voranschreitende Kolonisierung des murinen Intestinaltrakts seitens beider Bakterienstämme zu beobachten, da die Anzahl reisolierter Bakterien im Laufe des Versuchs stetig anstieg. Dieser Anstieg ging gleichzeitig mit einer Annäherung der Zahlen reisolierter Bakterien vonstatten. Zum Versuchsende hin an Tag 15 zeigte sich dann ein nahezu ausgeglichenes Verhältnis reisolierter Bakterienstämme (siehe auch Abbildung 4.13 unten).

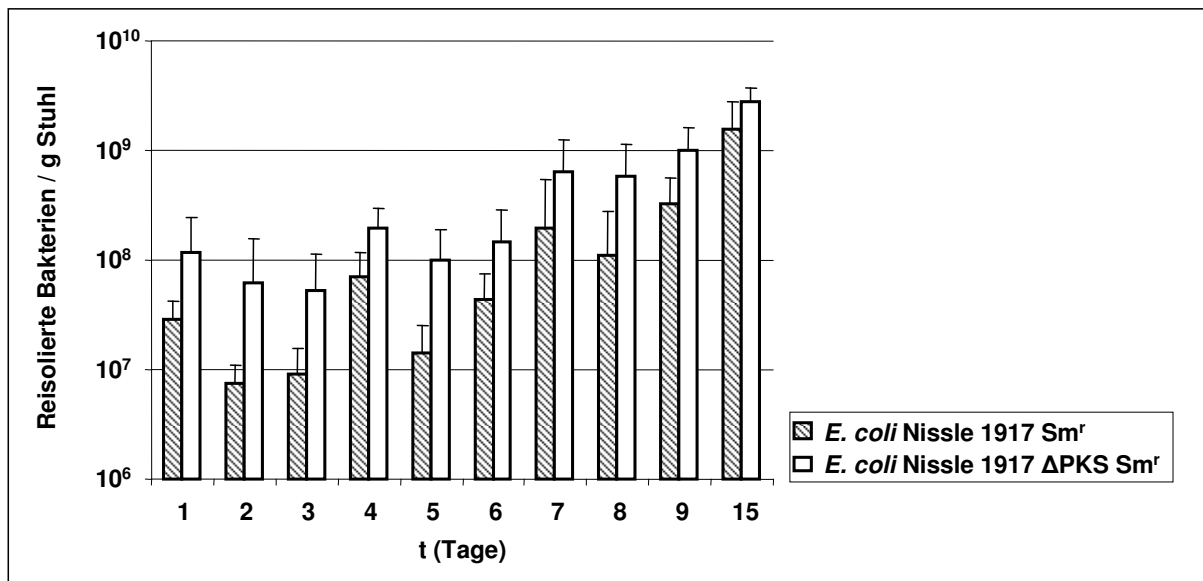


Abbildung 4.13: Mittelwerte und Standardabweichung der reisolierten Bakterien pro Gramm Stuhl für die Versuchstiergruppen *E. coli* Nissle 1917 Sm^r und *E. coli* Nissle 1917 ΔPKS Sm^r über den gesamten Versuchszeitraum. Die Versuchstiergruppen bestanden aus je acht Einzelindividuen. Die Ergebnisse zeigen zunächst eine um bis zu achtfach erhöhte Bakterienanzahl für *E. coli* Nissle 1917 ΔPKS Sm^r, welche sich aber im Laufe des Versuchs nahezu relativiert. Zusätzlich konnte ein Anstieg der reisolierten Bakterien über die Zeit für beide Versuchstiergruppen festgestellt werden.

Aufgrund der Versuchsergebnisse kann festgestellt werden, dass sowohl der Colibactin-positive *E. coli* Nissle 1917 als auch der Colibactin-negative *E. coli* Nissle 1917 ΔPKS in der Lage sind den streptomycinbehandelten murinen Intestinaltrakt erfolgreich zu kolonisieren. Auch wenn zunächst die Zahlen für den Colibactin-negativen Stamm höher waren, konnte über die gesamte Dauer des Experiments kein wesentlicher Unterschied in der Kolonisierungsfähigkeit festgestellt werden.

Neben der Bestimmung der Bakterienzahl der Stuhlproben wurden nach Versuchsende zusätzlich Gewebeschnitte der präparierten Caeca der Versuchstiere angefertigt. Diese wurden nach Färbung auf mögliche Veränderungen der Gewebestruktur mikroskopisch untersucht. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte ebenso kein signifikanter Unterschied zwischen den Caeca der zwei Versuchstiergruppen festgestellt werden.

4.6.2 Kompetitive Kolonisierungsstudie im Tiermodell

Nachdem in der nicht-kompetitiven Kolonisierungsstudie im Tiermodell keine signifikanten Unterschiede zwischen Colibactin-positiven und -negativen *E. coli* Nissle 1917 Stämmen beobachtet werden konnten, sollte zusätzlich geprüft werden, ob ein Colibactin-abhängiger Effekt während eines kompetitiven Versuchsablaufs auftritt. Da beim nicht-kompetitiven Kolonisierungsexperiment ein großer Teil der natürlichen Darmflora durch die Applikation von Streptomycin beseitigt wurde, besteht die Möglichkeit, dass ein Colibactin-abhängiger Kolonisierungsvorteil durch fehlende Konkurrenzbesiedelung des Intestinaltrakts nicht zum Tragen kommt. Die Versuchsdurchführung änderte sich dabei vor allem in dem Aspekt, dass nun sowohl Colibactin-positive *E. coli* Nissle 1917 *rpsL* K42R *attB::cat* als auch -negative *E. coli* Nissle 1917 *rpsL* K42R *clbA::npt* Stämme den Versuchstieren gleichzeitig verabreicht wurden. So war es möglich die Kolonisierungseigenschaften der Bakterien zu überprüfen, die sich nur in der Produktion bzw. dem Fehlen des Colibactin unterscheiden. Um die zwei verschiedenen *E. coli* Nissle Stämme bei der Reisolierung voneinander trennen zu können, wurden Stämme verwendet, die neben der gemeinsamen Streptomycinresistenz zusätzlich verschiedene chromosomale Antibiotikaresistenzgene besitzen. Somit war es durch Verwendung entsprechender Antibiotika-haltiger Agarplatten möglich auf den einen oder anderen Stamm zu selektieren. Zusätzlich wurden die so reisolierten Bakterien in regelmäßigen Abständen stichprobenartig molekular verifiziert.

Die Versuchsdurchführung erfolgte wie in Punkt 4.6 beschrieben. Die Anzahl der verwendeten Versuchstiere belief sich auf acht Tiere, denen jeweils eine homogene Mischung aus 5×10^7 Colibactin-positiven und 5×10^7 Colibactin-negativen *E. coli* Nissle 1917 Stämmen oral verabreicht wurde. Die Anzahl der Bakterien je Applikation betrug somit analog zur nicht-kompetitiven Kolonisierungsstudie 10^8 Bakterien. Die Bakterien wurden auf LB-Agar mit den geeigneten Antibiotika reisoliert und in regelmäßigen Abständen molekular verifiziert. Die Analyse der Stuhlproben erfolgte bis Tag 5 täglich und darauf folgend bis Tag 15 alle zwei Tage. Die letzte Stuhlprobe wurde an Tag 20 analysiert. Zu Versuchsende an Tag 22 wurden die Versuchstiere euthanasiert (siehe auch Abbildung 4.14 unten). Zur weiteren Analyse erfolgte die Präparation des Ileums, Caecums und Colons. Der Inhalt dieser intestinalen Bereiche und das Gewebe selbst wurden auf Kolonisierung mit Bakterien analysiert. Dazu wurden der Darminhalt und das verbleibende Gewebe nach

Homogenisierung analog zu den Stuhlproben in geeigneten Verdünnungen auf Agarplatten ausplattiert und die Bakterienzahl pro Gramm bestimmt.

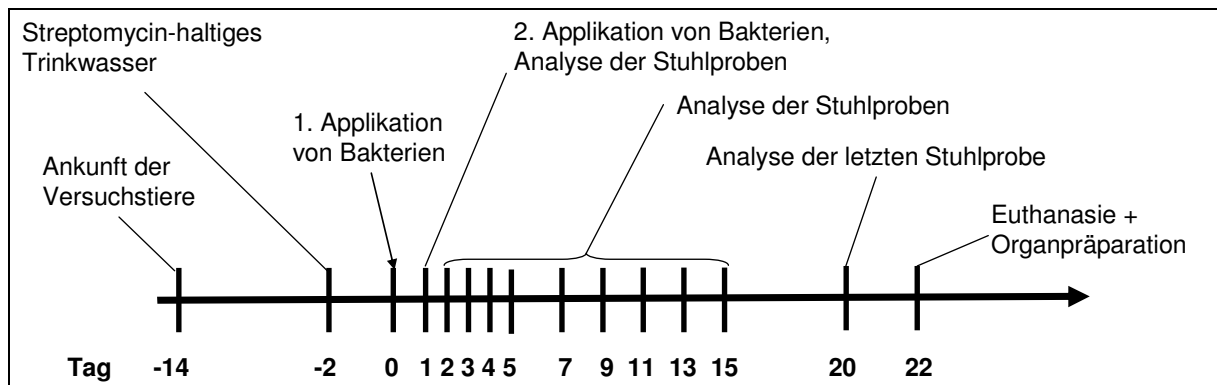


Abbildung 4.14: Zeittafel des kompetitiven Kolonisierungsexperiments im murinen Intestinalmodell. Übersicht der zeitlichen Abläufe für diesen durchgeführten Versuch.

Die Anzahl der aus den Stuhlproben reisolierten *E. coli* Nissle 1917 Mutanten zeigte eine heterogene Verteilung innerhalb der Versuchstiergruppe. Während bis zu Tag 7 die prozentuale Verteilung von Colibactin-positiven und -negativen *E. coli* Nissle 1917 in fünf Individuen nahezu gleichmäßig verlief, zeigte sich bei den drei verbleibenden Individuen eine Tendenz zu höherer Kolonisierung durch den Colibactin-negativen Stamm. Diese Tendenz setzte sich aber nur für ein Individuum bis zu Versuchsende fort. Bei dem zweiten Individuum relativierte sich die prozentuale Verteilung der Bakterienstämme auf ein ausgeglichenes Maß und im dritten Fall konnte sogar ein höherer Prozentsatz an Colibactin-positiven Bakterien zu Versuchsende beobachtet werden. Ab Tag 9 bis zu Versuchsende konnte eine erhöhte Heterogenität bei allen Versuchstieren festgestellt werden. Die zu Anfang bezüglich der Colibactin-positiven und -negativen Bakterienstämme ausgeglichenen Individuen zeigten bis auf zwei eine individuell verstärkte Kolonisierung durch den Colibactin-positiven oder -negativen Stamm. Am Versuchsende wurde für drei Individuen eine ausgeglichene prozentuale Verteilung festgestellt. Zwei Versuchstiere zeigten eine stärkere Kolonisierung durch den Colibactin-negativen Stamm und drei eine stärkere Kolonisierung durch den Colibactin-positiven Stamm.

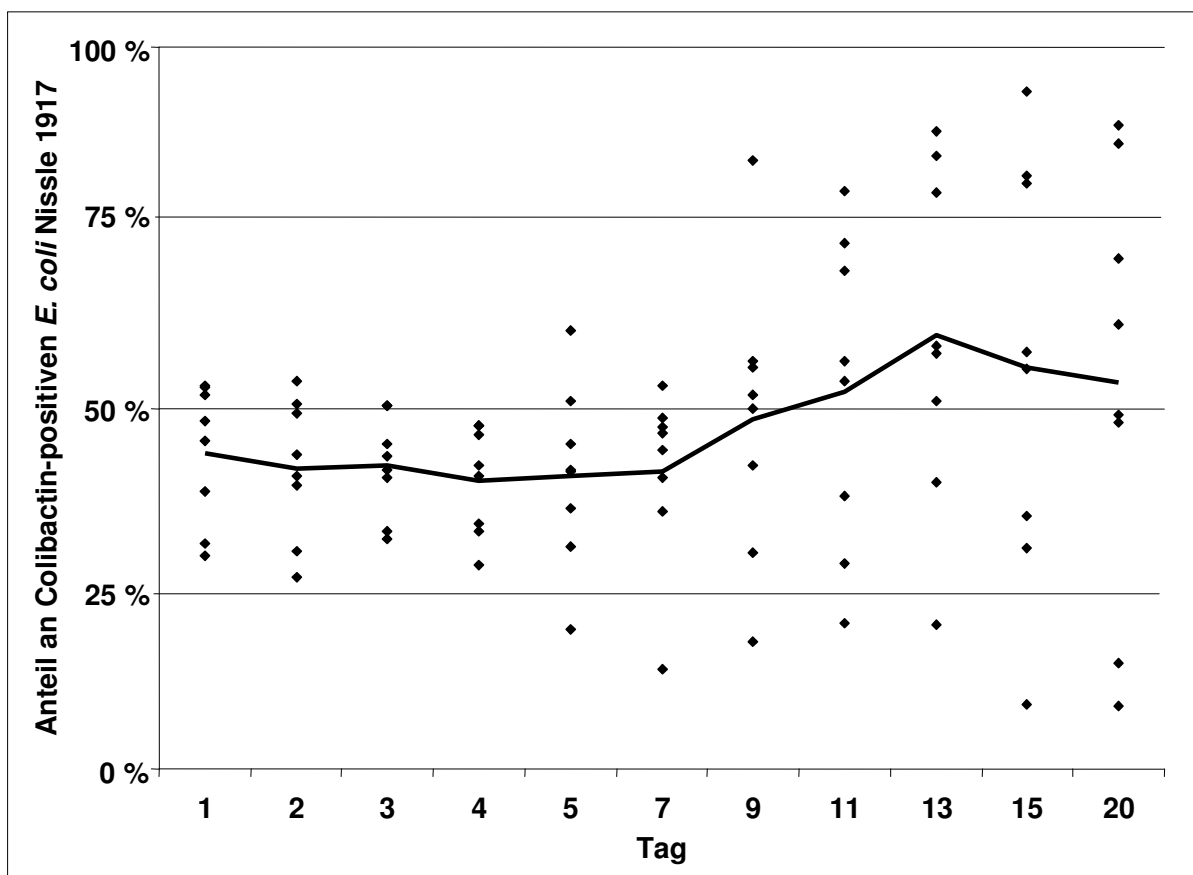


Abbildung 4.15: Prozentsatz der aus Stuhlproben reisolieren Colibactin-positiven *E. coli* Nissle 1917 während der kompetitiven Kolonisierungsstudie im murinen Intestinalmodell. Dargestellt ist der prozentuale Anteil Colibactin-positiver Bakterien berechnet anhand der Gesamtzahl reisolierter Bakterien. Die schwarze Linie stellt den Mittelwert aller acht Versuchstiere über die gesamte Versuchsdauer dar. Die Quadrate zeigen die Werte der einzelnen Individuen.

Das Ergebnis der kompetitiven Kolonisierungsstudie im murinen Intestinalmodell wies eine sehr heterogene Verteilung Colibactin-positiver und -negativer *E. coli* Nissle 1917 innerhalb der Versuchstiergruppe auf. Der Mittelwert aller acht Individuen zeigte ein ausgeglichenes Verhältnis beider Bakterienstämme. Eine genauere Betrachtung der Einzelindividuen ließ allerdings erkennen, dass es bei der Kolonisierung starke Unterschiede gab. Zu Versuchsende konnte neben einer ausgeglichenen Kolonisierung durch Colibactin-positive und -negative Bakterien sowohl eine verstärkte Kolonisierung durch Colibactin-positive als auch -negative abhängig vom betrachteten Einzelindividuum beobachtet werden. Daher konnte keine eindeutige Tendenz festgestellt werden, die auf einen Colibactin-abhängigen Effekt schließen lässt.

Aufgrund der sehr heterogenen Ergebnisse innerhalb der Versuchstiergruppe wurden zusätzlich ausgewählte Individuen näher untersucht. Diese näheren Untersuchungen beinhalteten die Präparation des Intestinaltrakts. Dieser besteht aus Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum und Colon. Für die durchgeführten Untersuchungen wurden die Abschnitte Ileum, Caecum und Colon verwendet. (siehe Abbildung. 4.16). Analysiert wurde der Bakteriengehalt sowohl des Darminhaltes als auch des Darmgewebes.

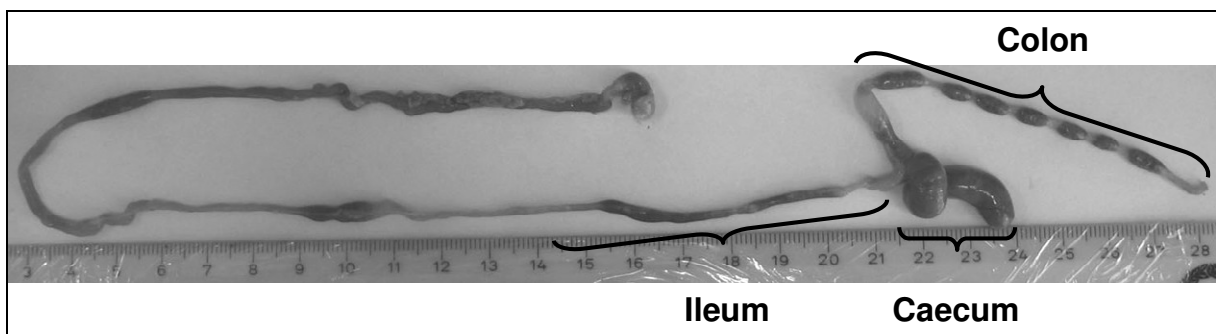


Abbildung 4.16: Präparierter muriner Intestinaltrakt bestehend aus Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum und Colon. Die für weitere Analysen verwendeten Darmabschnitte Ileum, Caecum und Colon sind durch geschweifte Klammern gekennzeichnet.

Die weiteren Analysen zur Kolonisierung des Darminhaltes und Darmgewebes wurden für besonders unterschiedliche Einzelindividuen ausgeführt, um einen möglichst großen Querschnitt zu erhalten. Die ausgewählten Einzelindividuen zeigten während der Analyse der Stuhlproben folgende bakterielle Kolonisierung:

1. ausgeglichenes Verhältnis von Colibactin-positiven und -negativen Bakterien über die gesamte Versuchsdauer
2. zunächst ausgeglichenes Verhältnis von Colibactin-positiven und -negativen Bakterien mit starker Verlagerung zu Colibactin-negativen Bakterien im Laufe des Versuchs
3. zunächst stärkere Kolonisierung durch Colibactin-negative mit Relativierung zu ausgeglichenem Verhältnis zu Versuchsende
4. zunächst ausgeglichenes Verhältnis von Colibactin-positiven und -negativen Bakterien mit starker Verlagerung zu Colibactin-positiven Bakterien im Laufe des Versuchs.

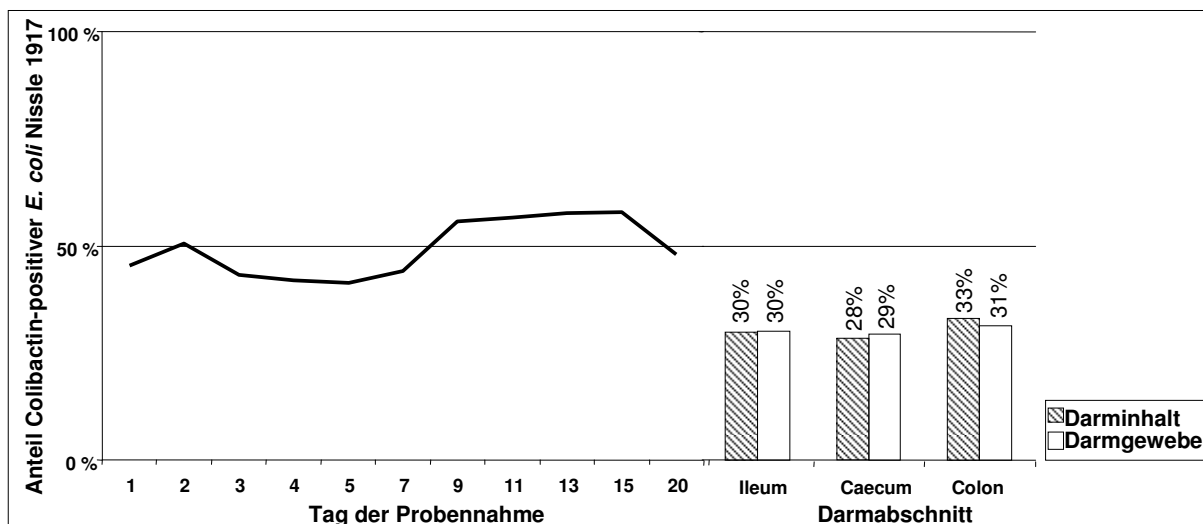


Abbildung 4.17A: Prozentualer Anteil Colibactin-positiver *E. coli* Nissle 1917 isoliert aus den Stuhlproben (schwarze Linie) und Darmabschnitten (Balkendiagramm) für Individuum 1.

Die Daten des Individuums 1 – dargestellt in Abbildung 4.17A – zeigen eine ausgeglichene Besiedelung durch Colibactin-positive sowie -negative *E. coli* Nissle 1917 über den gesamten Versuchszeitraum ermittelt anhand der Stuhlproben. Die Analyse des Darminhalts und Darmgewebes der Darmabschnitte Ileum, Caecum und Colon ergab einen leichten Rückgang der Colibactin-positiven Bakterien.

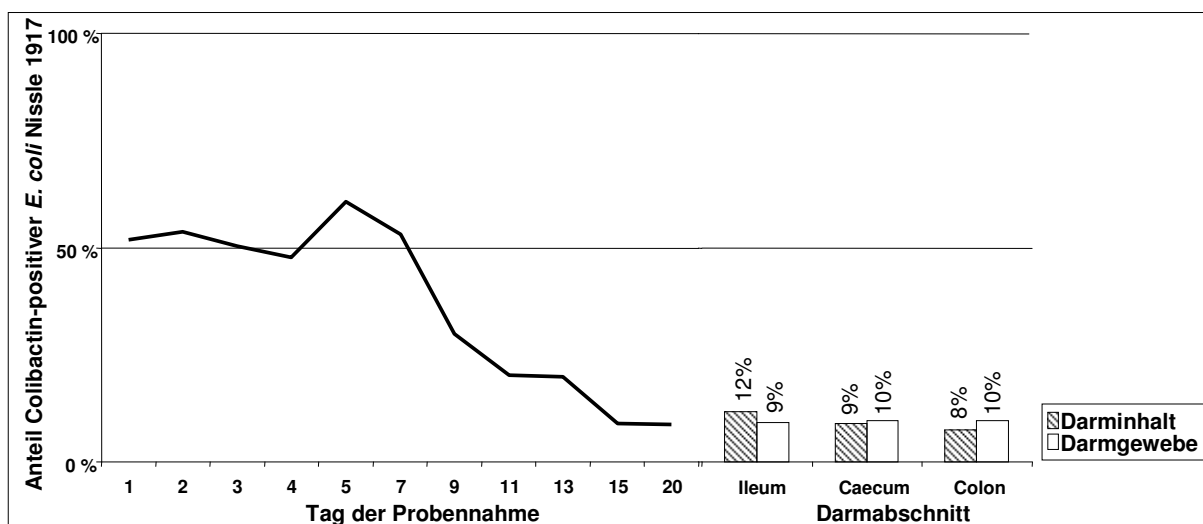


Abbildung 4.17B: Prozentualer Anteil Colibactin-positiver *E. coli* Nissle 1917 isoliert aus den Stuhlproben (schwarze Linie) und Darmabschnitten (Balkendiagramm) für Individuum 2.

Die Daten des Individuums 2 – dargestellt in Abbildung 4.17B – zeigen nach einigen Tagen eine deutliche Tendenz zu stärkerer Kolonisierung durch Colibactin-negative

E. coli Nissle 1917. Zu Versuchsende wurde ein Anteil von ca. 90 % Colibactin-negativer Bakterien beobachtet. Dieses Verhältnis konnte auch für die Analyse des Darminhaltes und Darmgewebes festgestellt werden.

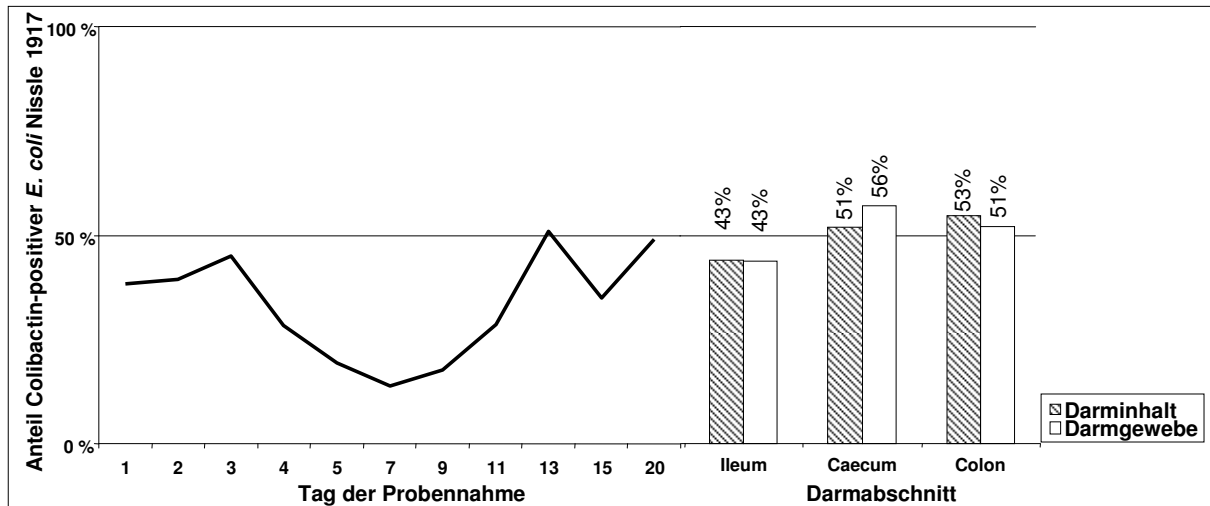


Abbildung 4.17C: Prozentualer Anteil Colibactin-positiver *E. coli* Nissle 1917 isoliert aus den Stuhlproben (schwarze Linie) und Darmabschnitten (Balkendiagramm) für Individuum 3.

Die Daten des Individuums 3 – dargestellt in Abbildung 4.17C – zeigen zunächst eine Tendenz zu stärkerer Kolonisierung durch Colibactin-negative *E. coli* Nissle 1917, welche sich aber im weiteren Versuchsverlauf relativierte. Zu Versuchsende war das Verhältnis von Colibactin-positiven und -negativen Bakterien ausgeglichen. Die Analyse des Darminhaltes und Darmgewebes bestätigte die Daten der Stuhlproben am Versuchsende.

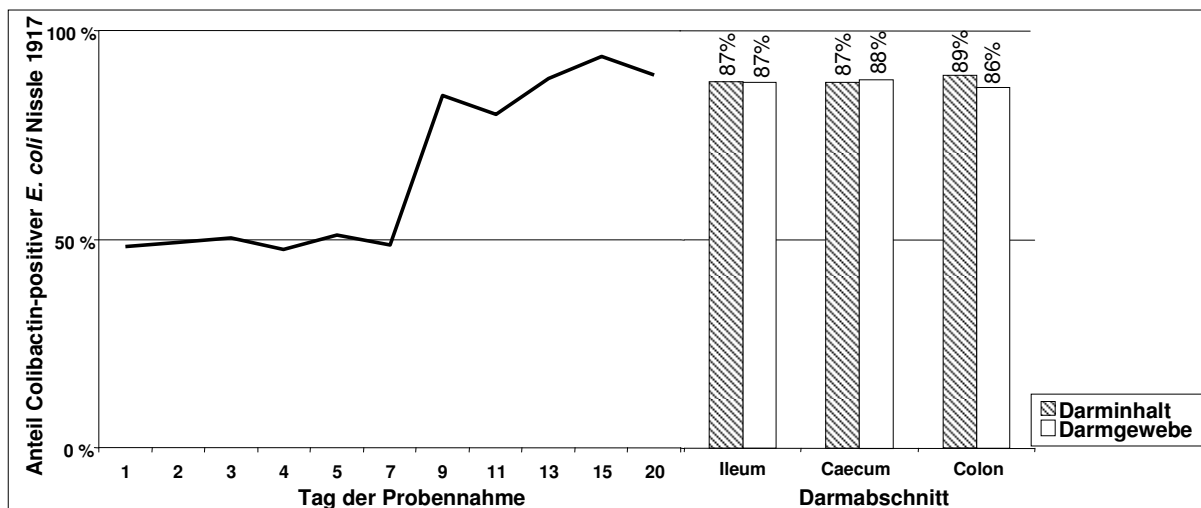


Abbildung 4.17D: Prozentualer Anteil Colibactin-positiver *E. coli* Nissle 1917 isoliert aus den Stuhlproben (schwarze Linie) und Darmabschnitten (Balkendiagramm) für Individuum 4.

Die Daten des Individuums 4 – dargestellt in Abbildung 4.17D - zeigen nach einigen Tagen eine deutliche Tendenz zu stärkerer Kolonisierung durch Colibactin-positive *E. coli* Nissle 1917. Zu Versuchsende wurde ein Anteil von annähernd 90 % Colibactin-positiver Bakterien beobachtet. Dieses Verhältnis konnte auch für die Analyse des Darminhaltes und Darmgewebes festgestellt werden.

5 DISKUSSION

In dieser Arbeit wurden zwei Aspekte des Colibactin Genclusters, welches in vorangegangenen Arbeiten (Nougayrede *et al.* 2006; Homburg 2007) in *E. coli* erstmals nachgewiesen und beschrieben werden konnte, bearbeitet. Die bisherigen Untersuchungen zur Verbreitung dieser genomischen Insel beschränkten sich auf die Spezies *E. coli*. In *E. coli* konnte das Colibactin Gencluster ausschließlich in extraintestinal pathogenen (ExPEC) und nichtpathogenen Stuhlisolaten der phylogenetischen Gruppe ECOR-B2 detektiert werden. Da es sich bei dem Colibactin Gencluster um ein horizontal verbreitetes genetisches Element handelt, wurde in der vorliegenden Arbeit die Verbreitung in der Familie der *Enterobacteriaceae* untersucht. Zusätzlich standen die Integrationsstelle und genomische Struktur des Colibactin Genclusters in positiven Spezies abseits von *E. coli* im Mittelpunkt des Interesses. Neben diesen rein deskriptiven Arbeiten zur Verbreitung des Colibactin Genclusters in verschiedenen ausgewählten Gattungen und Arten innerhalb der *Enterobacteriaceae* sollte auch die biologische Funktion des Colibactins analysiert werden. Der Fokus dieses Teilprojekts lag dabei ausschließlich auf einem möglichen Effekt des Colibactins während der Kolonisierung des murinen streptomycinbehandelten Intestinaltrakts.

5.1 Untersuchungen zur Verbreitung, genetischen Struktur, Integration und Übertragung des Colibactin-Genclusters

5.1.1 Verbreitung des Colibactin-Genclusters innerhalb der *Enterobacteriaceae*

Das Colibactin Gencluster konnte bisher nur in *E. coli* der phylogenetischen Gruppe ECOR-B2 gefunden werden. Aufgrund seiner chromosomalen Eigenschaften, die es als genomische Insel ausweisen, kann die Art *E. coli* jedoch nicht als Ursprung des Colibactin Genclusters angesehen werden. Es liegt vielmehr nahe, dass dieses horizontal erworben wurde und darauf folgend klonal weiter verbreitet wurde. Für diese These spricht das Auftreten der Insel in vornehmlich einer distinkten phylogenetischen Gruppe (Nougayrede *et al.* 2006) und der geringen Deletionsrate dieser Insel, die mittels etablierter Methoden zur Stabilität von genomischen Inseln in *E. coli* 536 nachgewiesen werden konnte. Diese geringe Deletionsrate deutet darauf hin, dass diese Insel unter natürlichen Bedingungen nicht mehr exzidiert (Hochhut *et al.* 2006). Da die horizontale Weitergabe von genetischem Material allerdings weitestgehend ungerichtet stattfindet (Droge *et al.* 1998), ist davon auszugehen, dass das Colibactin Gencluster auch in anderen Spezies als *E. coli* anzutreffen ist. So konnte beispielsweise schon Ende der 80ziger Jahre ein Plasmidtransfer von *E. coli* zu Gram-positiven Bakterien durch Konjugation nachgewiesen werden (Trieu-Cuot *et al.* 1987). Im Allgemeinen ist der horizontale Gentransfer zwischen sehr verschiedenartigen Mikroorganismen ein natürlicher und verbreiteter Vorgang, welcher auch den Genaustausch zwischen Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien mit einschließt. Allerdings ist in einem solchen Fall die Tendenz des horizontalen Gentransfers von Gram-negativ zu Gram-positiv höher, da aufgrund der verschiedenen Genexpression häufig Inkompatibilitäten auftreten (Courvalin 1994). Der Transfer von Genen kann in verschiedenen Umgebungen stattfinden. Eine bedeutende Umgebung, in welcher horizontaler Gentransfer zwischen verschiedenen Bakterien stattfindet, ist der Intestinaltrakt und im Besonderen das Colon. Hier besteht die Möglichkeit, dass die vorhandenen kommensalen Bakterien als Reservoir für bestimmte horizontal übertragbare genetische Elemente (z. B. Virulenzfaktoren) dienen, die unter bestimmten Gegebenheiten an vorübergehend im Intestinaltrakt

vorhandene Bakterien weitergegeben werden können und somit verbreitet werden (Farthing 2004). Die dichte Besiedelung des Intestinaltrakts mit den verschiedensten Bakterien führt dazu, dass diese sich in nächster Nähe befinden und unter Umständen zusätzlich in Biofilmen oder Biofilm-ähnlichen Verbänden assoziiert sind. Dieser enge Kontakt bietet die idealen Bedingungen für horizontalen Gentransfer zwischen verschiedenen Bakterien. Aber auch in anderen Umgebungen wie dem Pansen (McCuddin *et al.* 2006), Nahrungsmitteln (Brautigam *et al.* 1997), Biofilmen (Maeda *et al.* 2006) und in der Mundhöhle (Mercer *et al.* 1999) konnte horizontaler Gentransfer beobachtet werden.

Experimentelle Ansätze zur Analyse des horizontalen Gentransfers haben gezeigt, dass z. B. Antibiotikaresistenzen, welche auf Transposons kodiert sind, im murinen Verdauungstrakt von *Enterococcus faecalis* auf *E. coli* und *Listeria monocytogenes* übertragen werden können (Doucet-Populaire *et al.* 1991; Doucet-Populaire *et al.*). Des Weiteren konnte die Übertragung von Resistenzen zwischen kommensalen und pathogenen Vertretern der Familie *Enterobacteriaceae* in *in vitro* Versuchen, die die Bedingungen im Ileum des Schweins simulierten, nachgewiesen werden (Blake *et al.* 2003). Aber auch im menschlichen Colon konnte ein beträchtlicher Austausch von Antibiotika-Resistenzgenen durch Konjugation zwischen verschiedenen Bakterienarten beobachtet werden, der zum Teil als Erklärung für den rasanten Anstieg resistenter Stämme dienen kann (Shoemaker *et al.* 2001).

Die oben genannten Beispiele zeigen, dass der horizontale Gentransfer durch Mechanismen wie Transformation, Transduktion aber vor allem Konjugation eine bedeutsame Rolle für die genetische Diversität von Bakterien spielt. Dieser Austausch von genetischer Information ist zusätzlich nicht an Speziesgrenzen gebunden, sondern ist vielmehr ein universeller Vorgang.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben auch für die Verbreitung des Colibactin Genclusters gezeigt, dass dieses durchaus in mehreren Arten der Familie *Enterobacteriaceae* zu finden ist. Als Träger des Colibactin Genclusters konnten neben weiteren *E. coli* auch *C. koseri*, *E. aerogenes* und *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* identifiziert werden. Allerdings kann aufgrund der sehr unterschiedlichen Anzahl getesteter Bakterienstämme und der teils sehr geringen Probenanzahl keine Aussage darüber getroffen werden, welche dieser Spezies den höchsten Anteil an Colibactin Gencluster positiven Stämmen besitzt. Die Ergebnisse für die Gattung *Klebsiella* lassen jedoch vermuten, dass hier die Art *K. pneumoniae* subsp.

pneumoniae die signifikanteste wenn nicht einzige Colibactin positive Gruppe dieser Gattung darstellt, da in sechs weiteren *Klebsiella* Arten trotz relativ großer Probenanzahl der Nachweis der Colibactin Insel nicht möglich war.

Für den horizontalen Transfer des Colibactin Genclusters ist es wie bei der Weitergabe jeglichen genetischen Materials notwendig, dass sich die beteiligten Bakterien zur gleichen Zeit im selben Habitat befinden. Da sowohl *E. coli* als auch die weiteren Colibactin positiven Bakterienarten *C. koseri*, *E. aerogenes* und *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* im Verdauungstrakt von Menschen und anderen Säugern vorzufinden sind (Todar 2006), könnte der Intestinaltrakt als Umgebung für den Austausch gedient haben. Zusätzlich bietet dieser ideale Bedingungen für horizontalen Gentransfer (Scott 2002). So konnte in einer Studie zur Resistenzentwicklung von *Salmonella typhi* eine effektive Selektion auf resistente Erreger während Antibiotika-Gabe beobachtet werden. Interessanterweise konnten für *E. coli* und *K. pneumoniae* Stämme, welche aus derselben Stuhlprobe wie *S. typhi* isoliert wurden, ähnliche Resistenzmuster nachgewiesen werden. Dies wurde auf den Austausch eines großen Plasmids zwischen diesen Bakterienarten durch Konjugation zurückgeführt (Schwalbe *et al.* 1990). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass der Anteil an Colibactin positiven *E. coli* Fäkalisolaten bei nahezu 20 % liegt. Diese konnten alle der phylogenetischen Gruppe ECOR-B2 zugeordnet werden. Obwohl die biologische Funktion des Colibactin noch nicht aufgeklärt werden konnte, könnte dieser relativ hohe Anteil Colibactin positiver *E. coli* auf die horizontale Übertragung innerhalb des Intestinaltrakts hinweisen. Neben dem Intestinaltrakt können *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter spp.* und *Citrobacter spp.* vor allem opportunistische Infektionen der Harnwege auslösen. Daher ist es möglich, dass der Austausch des Colibactin Genclusters innerhalb des Harnapparates geschieht. Da allerdings unter normalen Umständen die Harnblase steril ist und nur im Rahmen einer Infektion Bakterien nachzuweisen sind, ist die Wahrscheinlichkeit für das Zusammentreffen verschiedener Bakterien und horizontalem Gentransfer zwischen diesen gering. Andere Habitate in denen Vertreter der *Enterobacteriaceae* vorkommen sind z. B. das Erdreich und Gewässer (Brenner *et al.* 1984). In diesen ist allerdings die Bakteriendichte bei weitem nicht so hoch wie im Intestinaltrakt, womit die Bedingungen für den horizontalen Transfer genetischen Materials weit schlechter sind. Ungeachtet dessen sind das Erdreich und Gewässer durchaus denkbare

Habitats für den konjugativen Austausch des Colibactin Genclusters, wenn auch weit weniger wahrscheinlich.

5.1.2 Genetische Struktur des integrativen und konjugativen Elements (ICE*Ck1*) aus *Citrobacter koseri* Frederiksen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Colibactin Gencluster in verschiedenen Mitgliedern der Familie *Enterobacteriaceae* vertreten ist. In der Mehrheit der Colibactin-positiven *E. coli* Stämme ist dieses als separate genomische Insel vorzufinden. Allerdings konnte das Colibactin Gencluster sowohl in drei *E. coli* Urinisolaten der phylogenetischen Gruppe ECOR-B1 als auch in zwei *C. koseri* Stämmen, drei *E. aerogenes* Stämmen und fünf *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* Stämmen als Teil eines ca. 140 kb großen ICE gefunden werden. Dieses ICE kann in mehrere Bereiche gegliedert werden. Ein Bereich stellt das Colibactin Gencluster dar, an den sich ein zweiter Bereich anschließt, welcher Gene beinhaltet, die für DNA-Transfer und -Mobilisierung kodieren könnten. Der dritte Bereich weist hohe Homologien zur *Yersinia* HPI auf, und kodiert für Yersiniabactin. Ein letzter vierter Bereich, dem allerdings keine bemerkenswerten Funktionen zugeordnet werden können, vervollständigt das ICE. Sowohl Colibactin als auch Yersiniabactin stellen hybride Verbindungen bestehend aus nichtribosomalen Peptid und Polyketid dar. Bisher wurden diese Polyketid Determinanten als Teile individueller genomischer bzw. Pathogenitätsinseln beschrieben, wobei sie dabei zusammen mit einer P4-ähnlichen Integrase von direkten Wiederholungssequenzen flankiert sind (Buchrieser *et al.* 1998; Nougayrede *et al.* 2006). Das in dieser Arbeit beschriebene ICE*Ck1* stellt eine genomische Region dar, in welcher sowohl Colibactin als auch Yersiniabactin Gencluster gemeinsam auftreten. Die zusätzliche Präsenz von Genen, welche für den konjugativen Transfer und die Mobilisierung von DNA kodieren, erhöhen die Ähnlichkeit dieses genetischen Elements zu integrativen und konjugativen Elementen (Burrus *et al.* 2002; Burrus *et al.* 2006). So zeigt das ICE*Ck1* Gemeinsamkeiten mit schon bekannten und charakterisierten chromosomalen integrativen Elementen wie ICE*Ec1* und ICE*Kp1* (Schubert *et al.* 2004; Lin *et al.* 2008). Neben der Ähnlichkeiten zu integrativen und konjugativen Elementen bestehen zusätzlich Homologien des ICE*Ck1* zu verschiedenen enterobakteriellen Plasmiden wie pCRY (Song *et al.* 2004), pMET1 (Soler Bistue *et al.* 2008), pESA2

(CP000784) und auch pLVPK (Chen *et al.* 2004). Diese Homologien weisen auf die effektive Rekombination von chromosomalen und Plasmid-kodierten Genen hin. Die genetische Zusammensetzung des ICE*Ck1* und das Vorhandensein desselben in verschiedenen Spezies veranschaulicht somit, dass unter verschiedenen Mitgliedern der Familie *Enterobacteriaceae* aktiver Genaustausch stattfindet.

5.1.3 Chromosomale Integrationsstellen des Colibactin-Genclusters

Das Colibactin Gencluster kann in *E. coli* zum größten Teil nur in der phylogenetischen Gruppe ECOR-B2 gefunden werden. In der vorliegenden Arbeit war es möglich drei Isolate zu identifizieren, die positiv für das Colibactin Gencluster sind, aber der phylogenetischen Gruppe ECOR-B1 angehören. Zusätzlich konnte eine sehr konservierte Integrationsstelle innerhalb Colibactin positiver *E. coli* der ECOR-B2 Gruppe beobachtet werden (Nougayrede *et al.* 2006). Die Integration der Insel konnte in dem *tRNA-asnW* Gen nachgewiesen werden. Das Vorhandensein einer bevorzugten Integrationsstelle kann einerseits auf die Spezifität der Integrase zurückzuführen sein, andererseits ist dies vielmehr ein Hinweis für die klonale Weitergabe dieser genomischen Insel in der Spezies *E. coli*.

Während der Untersuchungen zur Verbreitung des Colibactin Genclusters innerhalb der Familie *Enterobacteriaceae* konnte dieses auch in *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *C. koseri* und *E. aerogenes* nachgewiesen werden. Dabei wurde zusätzlich festgestellt, dass in diesen Bakterienstämmen und auch in den drei *E. coli* Urinisolate der ECOR-B1 Gruppe das Colibactin Gencluster Teil eines fast 140 kb großen integrativen und konjugativen Elements (ICE) ist. Auf die Organisation dieses ICE aus *C. koseri* (ICE*Ck1*) wurde im vorherigen Abschnitt näher eingegangen.

Nachdem das Colibactin Gencluster in mehreren Bakterienstämmen als Teil des ICE*Ck1* identifiziert worden war und das ICE*Ck1* in diesen verschiedenen Bakterienstämmen auch vollständig nachgewiesen werden konnte, wurde die chromosomale Integrationsstelle untersucht. Wie zu erwarten, konnte die Integration in *tRNA-asnW*, welches in *E. coli* die vorherrschende Integrationsstelle darstellt, in den *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *C. koseri* und *E. aerogenes* Stämmen nicht bestätigt werden. Interessanterweise konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das Colibactin Gencluster auch in *E. coli* Urinisolaten der phylogenetischen Gruppe

ECOR-B1 als Teil des ICE*Ck1* zu finden ist und zusätzlich die chromosomale Integration in diesen Urinisolaten nicht in *tRNA-asnW* zu detektieren ist. Vielmehr konnte für diese *E. coli* Stämme gezeigt werden, dass das ICE*Ck1* in *tRNA-asnU* integriert wurde. Die Funktion des Colibactins in Zellkultur ist in diesen Stämmen nicht eingeschränkt was durch den Nachweis des zytopathischen Effekts in Zellkultur gezeigt werden konnte (Putze *et al.* 2009). Die Präsenz des Colibactin Genclusters in zwei verschiedenen phylogenetischen Gruppen von *E. coli* und die Integration dieses in zwei verschiedenen tRNA Genen spricht für zwei voneinander getrennt vollzogene horizontale Gentransfers.

Für die Spezies *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* konnten insgesamt fünf Stämme als positiv für das Colibactin Gencluster getestet werden. Zusätzlich wurde in diesen das Colibactin Gencluster als Teil des ICE*Ck1* nachgewiesen. Die chromosomale Integrationsstelle des ICE*Ck1* konnte für vier dieser Stämme exakt bestimmte werden. In zwei dieser Stämme ist das ICE*Ck1* an *asn1* inseriert. Als weitere Integrationsstellen konnten *asn2* und *asn3* identifiziert werden. Die Integrationsstelle des ICE*Ck1* im Stamm *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* CF44 konnte bislang noch nicht aufgeklärt werden, jedoch kann die Integration in einem der vier *tRNA-asn* Gene ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass in fünf *K. pneumoniae* Stämmen vier verschiedene chromosomale Integrationsstellen für das ICE*Ck1* nachgewiesen werden können. Das bedeutet weiter, dass in diesen *K. pneumoniae* Stämmen das ICE*Ck1* und somit das Colibactin Gencluster in mehreren voneinander unabhängigen Gentransferereignissen horizontal weitergegeben wurde oder nach Erwerb des ICE*Ck1* dieses seine Position innerhalb des Chromosoms geändert hat. Ob dieser Gentransfer innerhalb der Art *K. pneumoniae* oder zwischen *K. pneumoniae* und einer anderen bakteriellen Spezies stattgefunden hat, lässt sich anhand der Daten nicht bestimmen. Für eine klonale Weitergabe des ICE*Ck1* wurden wenige Hinweise gefunden, da nur zwei *K. pneumoniae* Stämme mit derselben Integrationsstelle gefunden werden konnten. Der phänotypische Effekt des Colibactins in Zellkultur konnte für alle *K. pneumoniae* Stämme nachgewiesen werden (Putze *et al.* 2009).

Die Integrationsstelle des ICE*Ck1* im vollständig sequenzierten *C. koseri* Stamm Frederiksen ist das *tRNA-asn* Gen an Base 953.774 - 953.846. Die Analyse von 24 weiteren *C. koseri* Isolaten zeigte jedoch, dass nur in einem dieser Isolate das ICE*Ck1* vollständig nachweisbar ist. Obwohl hier das ICE*Ck1* an sich vorhanden ist,

zeigen die weiteren Ergebnisse, dass es nicht in demselben tRNA Gen inseriert ist wie in dem sequenzierten *C. koseri* Stamm Frederiksen. Die verbleibenden 23 *C. koseri* Stämme enthalten nicht das vollständige ICECk1. Alle 23 Stämme sind positiv für das Colibactin Gencluster und auch der Bereich DNA-Transfer und -Mobilisierung kann zum größten Teil nachgewiesen werden. Allerdings kann ein ca. 15 kb großer DNA-Bereich zwischen *virB8/9* und dem Bereich der für Yersiniabactin kodiert, nicht nachgewiesen werden. Ein großer Bereich, der für Yersiniabactin (Gene *ybtE* bis *ybtX*) kodiert, kann wiederum nachgewiesen werden. Allerdings war es nicht möglich eine Assoziation der Yersiniabactin kodierenden DNA-Region mit der DNA-Region für DNA-Transfer und -Mobilisierung zu zeigen. Das bedeutet, dass diese zwei DNA-Bereiche des ICECk1, welche in 23 *C. koseri* Isolaten nachweisbar sind, nicht in einem ICECk1-ähnlichen genetischen Element zusammengefasst sein müssen. Der genaue chromosomale Kontext des Colibactin Genclusters und weiterer Teile des ICECk1 in diesen *C. koseri* Isolaten konnte nicht abschließend geklärt werden. Es kann allerdings festgehalten werden, dass entgegen der Erwartung, das ICECk1 aus *C. koseri* Frederiksen nur in einem von 24 Colibactin Gencluster positiven *C. koseri* Isolaten vollständig nachgewiesen werden konnte und an anderer Stelle im Chromosom integriert wurde. Für die verbleibenden *C. koseri* Isolate konnte eine abweichende genomische Struktur festgestellt werden, die nicht näher aufgeklärt wurde.

5.1.4 Übertragung des Colibactin-Genclusters

Die in dieser Arbeit gewonnenen Einblicke in die Verbreitung, chromosomale Integrationsstellen und die genetische Struktur des Colibactin Genclusters innerhalb der Familie der *Enterobacteriaceae* können als deutliche Hinweise für den horizontalen Transfer dieser genomischen Insel gewertet werden. Im Rahmen dieser Studien konnte das Colibactin Gencluster in den Spezies *E. coli*, *C. koseri*, *E. aerogenes* und *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* detektiert werden. Zusätzlich konnte die phänotypische Ausprägung und somit die Funktionalität des Genclusters für diese Bakterienarten nachgewiesen werden. Die variablen chromosomalen Integrationsstellen innerhalb der Spezies *E. coli* und vor allem *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* aber auch *C. koseri* deuten stark auf die horizontale Verbreitung hin.

Zunächst konnte das Colibactin Gencluster nur in *E. coli* als individuelle genomische Insel nachgewiesen werden. Genomische Inseln sowie Pathogenitätsinseln sind als chromosomale Regionen beschrieben worden, die zwar horizontal erworben wurden, aber nicht mehr selbst ihre Übertragung vermitteln können bzw. nie konnten (Hentschel & Hacker 2001). Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen, dass das Colibactin Gencluster als Teil eines ICE-ähnlichen Elements vorkommen kann. ICEs sind als genetische Elemente beschrieben worden, die in der Lage sind aus dem Chromosom zu exzidieren und durch Konjugation und homologe Rekombination in ein anderes Genom zu integrieren oder auch die Position im Genom zu ändern (Burrus & Waldor 2004). Die Analyse der genetischen Struktur des ICE*Ck1* und vergleichende Analysen der vorhandenen ORFs hat ergeben, dass neben dem Colibactin Gencluster und der HPI auch Gene für die DNA-Mobilisierung und den DNA-Transfer vorhanden sind. Dies lässt vermuten, dass das ICE*Ck1* nach Exzision aus dem Genom und anschließender extrachromosomaler Zirkularisation übertragen werden kann. Experimentell war es nicht möglich extrachromosomale Intermediate des ICE*Ck1* nachzuweisen. Allerdings kann ein möglicher Mechanismus für die horizontale Verbreitung des Colibactin Genclusters postuliert werden. Burrus und Waldor haben ein Modell zur Mobilisierung und Verbreitung genomischer Inseln durch ICEs vorgeschlagen (Burrus & Waldor 2004). Dabei werden genomische Inseln, die nicht selbst ihre Übertragung vermitteln können, durch Integration eines ICE an *attR* der genomischen Insel Teil eines neuen ICE, welches dann die Übertragung der genomischen Insel ermöglicht (Abbildung 5.1).

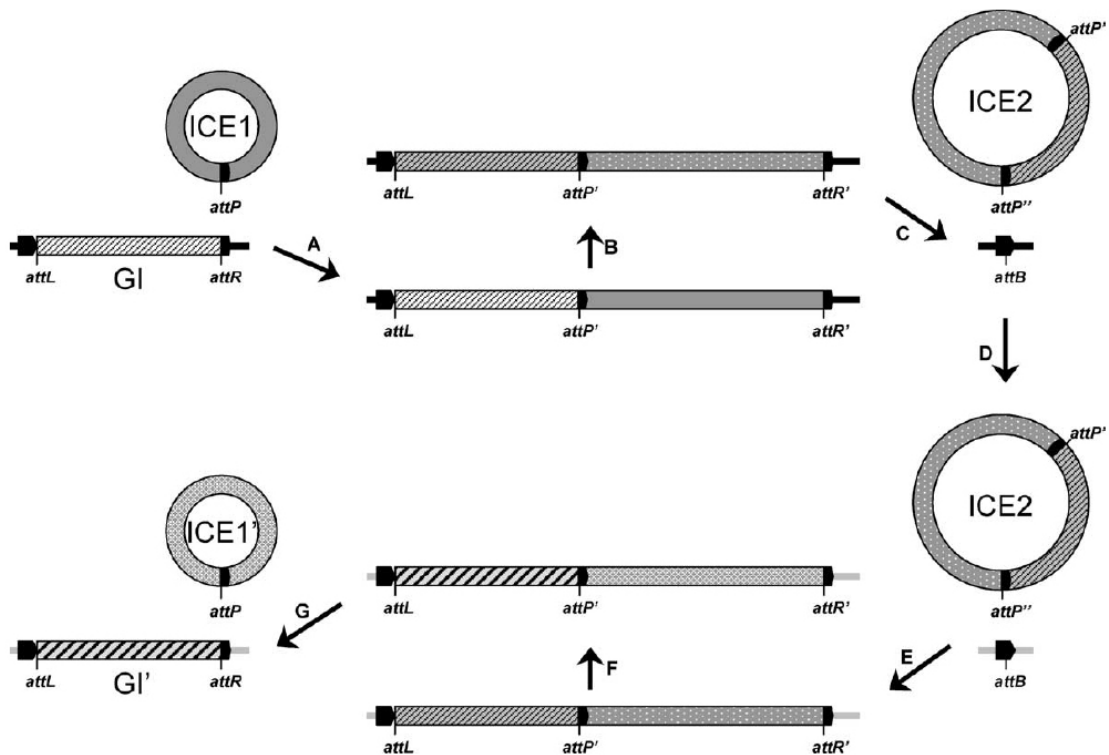


Abbildung 5.1: Modell der Mobilisierung genomischer Inseln (GI) durch ICEs. (A) Ein ICE dringt in einen neuen Wirt ein, der eine GI beherbergt, die an einer konservierten Zielstelle integriert ist. Die Integrase katalysiert die Integration des ICE an der *attR* Stelle der GI. (B) Die gesamte Struktur verändert sich durch Mutationen, den Erwerb und Verlust von DNA-Fragmenten und die Umwelt selektiert auf die für den Wirt vorteilhaftesten Elemente. (C) Da die GI und das ICE kompatible *att* Stellen besitzen, kann die Integrase die Exzision eines größeren Elements, ICE2, katalysieren, welches dann zwei gleiche *attP* Stellen beinhaltet. (D) Das ICE2 kann auf einen neuen Wirt übertragen werden, der nicht zwangsläufig nah verwandt zum vorherigen Wirt sein muss. (E) Das ICE2 integriert an der konservierten Zielstelle des neuen Wirts mittels einer der beiden *attP* Stellen (hier ist nur die Struktur gezeigt, die durch die Rekombination von *attP''* und *attB* entsteht). (F) Wiederum besteht die Möglichkeit, dass das gesamte Element im neuen Wirt verändert wird. (G) Das ICE kann unabhängig von der GI durch Rekombination zwischen *attP'* und *attR* exzidieren. Das Ergebnis dieses Mechanismus ist die Verbreitung einer GI durch ein ICE und die schnelle Entwicklung beider Elemente. Aus Burrus & Waldor 2004

Das Modell von Burrus und Waldor könnte auch für die horizontale Verbreitung des Colibactin Genclusters zutreffen. Es gibt mehrere Hinweise, die für einen solchen Mechanismus sprechen. So kann, wie oben schon erwähnt, dass Colibactin Gencluster sowohl als individuelle genomische Insel als auch als Teil eines ICE nachgewiesen werden. Ein weiterer Teil dieses ICECK1 ist die HPI von *Yersinia*. Im

Rahmen der Untersuchungen zur Verbreitung des Colibactin Genclusters innerhalb der Familie der *Enterobacteriaceae* konnte auch festgestellt werden, dass die Präsenz des Colibactin Genclusters direkt mit der Präsenz der HPI/Yersiniabactin gekoppelt ist. Alle Colibactin positiven Bakterienstämme konnten auch positiv für die HPI getestet werden. Es ist allerdings nicht so, dass die Präsenz der HPI direkt mit dem Vorhandensein des Colibactin Genclusters gekoppelt ist (Putze *et al.* 2009). Möglicherweise liegt der Verbreitung dieser beiden genomischen Inseln der gleiche oder zumindest ein ähnlicher Mechanismus zugrunde. Für die HPI konnte gezeigt werden, dass auch diese genomische Insel sowohl individuell als auch als Teil des ICE*Ec1* gefunden werden kann. Das ICE*Ec1* kodiert neben Yersiniabactin auch ein vollständiges und funktionales Typ IV Sekretionssystem und zusätzliche Gene für die Mobilisierung von DNA. Für das ICE*Ec1* konnte die Exzision und die Bildung von extrachromosomalen zirkulären Intermediaten nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten auf einen möglichen konjugativen Transfer des ICE*Ec1* hin, der aber noch nicht gezeigt werden konnte (Schubert *et al.* 2004).

Das in dieser Arbeit identifizierte ICE*Ck1* weist auch eine große Ähnlichkeit zu dem ICE*Kp1* aus *K. pneumoniae* NTUH-K2044 auf. Dieses ICE kann in drei Regionen aufgeteilt werden: Die 5'-Region beinhaltet Gene, die ähnlich zur HPI von *Yersinia pestis* sind. Die mittlere Region weist hohe Ähnlichkeit zu Teilen eines großen Plasmids (pLVPK) von *K. pneumoniae* auf und die 3'-Region beinhaltet Gene für den konjugativen Transfer von DNA. Dieses ICE ist in dem *asn3 tRNA*-Gen integriert. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Integrationsstelle des ICE*Ck1* in *K. pneumoniae* Stamm SB3431 ebenso in *asn3* lokalisiert ist. Für das ICE*Kp1* konnte sowohl die präzise Exzision und die Bildung von extrachromosomalen zirkulären Intermediaten als auch der konjugative Transfer von Donor zu Akzeptor gezeigt werden (Lin *et al.* 2008). Die Analyse der Integrationsstellen in verschiedenen Transkonjuganten ergab, dass das ICE*Kp1* in alle vier *tRNA-asn* Gene integrieren kann. Da für das ICE*Ck1* die Integration in drei verschiedenen *tRNA-asn* Genen gezeigt werden konnte, ist ein ähnlicher Mechanismus für die konjugative Übertragung des ICE*Ck1* möglich wie er für ICE*Kp1* gezeigt wurde.

Neben *E. coli* Stämmen, die das Colibactin Gencluster als individuelle genomische Insel, integriert in *tRNA-asnW*, beherbergen, konnten in dieser Arbeit auch drei *E. coli* Urinisolate identifiziert werden, die das gesamte ICE*Ck1* beinhalten. Als

chromosomale Integrationsstelle in diesen Stämmen konnte *tRNA-asnU* identifiziert werden. Für drei weitere *E. coli* Isolate (UPEC) konnte der chromosomale Kontext des Colibactin Genclusters nicht aufgeklärt werden. In diesen Stämmen konnte weder die Integration des Colibactin Genclusters in *tRNA-asnW* noch die Präsenz des ICE*Ck1* bestätigt werden. Diese Stämme scheinen eine weitere strukturelle Variante darzustellen, die möglicherweise durch den Verlust oder Gewinn zusätzlicher DNA-Fragmente entstanden ist.

Die Ergebnisse des Screenings auf das ICE*Ck1* in der Spezies *C. koseri* haben gezeigt, dass wider Erwarten das ICE*Ck1* nur in einem von 24 *C. koseri* Isolaten nachgewiesen werden konnte und die Integrationsstelle von der in *C. koseri* Frederiksen abweicht. In den verbleibenden 23 *C. koseri* Isolaten kann nur ein Teilbereich des ICE*Ck1* nachgewiesen werden. Dieser Teilbereich besteht zum einen aus der Colibactin Determinante und daran anschließend aus einem ca. 12 kb großen DNA Bereich, der Gene für die DNA-Mobilisierung und den DNA-Transfer beinhaltet. Die Yersiniabactin Determinante konnte zwar wieder in allen Isolaten nachgewiesen werden, allerdings war es nicht möglich die direkte Nachbarschaft zu der Colibactin Determinante zu belegen. Daher könnten diese DNA Bereiche an völlig verschiedenen Stellen im Chromosom lokalisiert sein. Dies zeigt wiederum, dass die genetische Struktur des ICE*Ck1* sehr plastisch zu sein scheint und sich dieses genetische Element in ständiger Entwicklung befindet.

5.2 Effekt des Colibactin-Genclusters während der Kolonisierung des murinen Intestinaltrakts

Da die biologische Funktion des Colibactins bisher nicht aufgeklärt werden konnte, wurden Studien zu einem möglichen Effekt des Colibactins während der Kolonisierung des murinen streptomycinbehandelten Intestinaltrakts durchgeführt. Das Colibactin Gencluster wurde zunächst in der Spezies *E. coli* gefunden. Diese Bakterien kommen üblicherweise im Darm (Kaper *et al.* 2004), aber auch extraintestinal, vor. Der *E. coli* Stamm Nissle 1917 konnte als natürlicher Wirt des Colibactin Genclusters identifiziert werden. Dieser kommensale Stamm kolonisiert sowohl den murinen als auch den menschlichen Darm außerordentlich gut und wird zur probiotischen Therapie bei intestinalen Funktionsstörungen wie z. B. Colitis ulcerosa eingesetzt (Malchow 1997; Rembacken *et al.* 1999; Kruis 2001). Die verlangsamte Erneuerung des intestinalen Epithels durch die Blockierung des Zellzyklus, herbeigeführt durch Colibactin, könnte entsprechenden Bakterien eine längere Kolonisierung des intestinalen Epithels ermöglichen (Nougayrede *et al.* 2006). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden sowohl nicht-kompetitive als auch kompetitive Kolonisierungsstudien im murinen streptomycinbehandelten Intestinalmodell (Myhal *et al.* 1982) durchgeführt.

Nicht-kompetitive, Colibactin-abhängige Kolonisierung des murinen Intestinaltrakts durch *E. coli* Nissle 1917

Zur Untersuchung eines möglichen Effekts von Colibactin während der Kolonisierung des murinen streptomycinbehandelten Intestinaltrakts wurde der *E. coli* Stamm Nissle 1917 Sm^r und dessen isogene Colibactin-negative Mutante *E. coli* Stamm Nissle 1917 Δ PKS Sm^r Gruppen von je acht Versuchstieren getrennt verabreicht. Darauf folgend wurde die Anzahl lebensfähiger Bakterien in den Fäzes der Versuchstiere bestimmt. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass zunächst die Anzahl Colibactin-positiver *E. coli* Nissle 1917 niedriger war als die von Colibactin-negativen *E. coli* Nissle 1917. Im Verlauf dieses Experiments relativierte sich dieser anfänglich beobachtete Effekt bis zu Versuchsende auf einen nicht als signifikant zu bezeichnenden Unterschied. Sowohl für den Colibactin-positiven wie auch den

Colibactin-negativen Bakterienstamm konnte eine effiziente Kolonisierung des streptomycinbehandelten murinen Intestinaltrakts beobachtet werden, da die Menge an reisolierten Bakterien stetig anstieg und dann ein stabiles Niveau erreichte.

Die Analyse der angefertigten Gewebeschnitte der Caeca der Versuchstiere gab ebenfalls keinen Hinweis auf eine Colibactin-abhängige Veränderung des Darmepithels. Somit kann anhand dieser Studie kein Effekt des Colibactins auf die Kolonisierungseigenschaften von *E. coli* Nissle 1917 nachgewiesen werden.

Kompetitive, Colibactin-abhängige Kolonisierung des murinen Intestinaltrakts durch *E. coli* Nissle 1917

Nachdem während der nicht-kompetitiven Kolonisierungsstudie kein Colibactin-vermittelter Effekt nachgewiesen werden konnte, wurde zusätzlich eine kompetitive Studie durchgeführt. Im Rahmen dieser wurden acht Versuchstieren Colibactin-positive und -negative *E. coli* Nissle 1917 Stämme zu gleichen Teilen gleichzeitig verabreicht. Somit konnte überprüft werden, ob Colibactin einen Effekt auf die Kolonisierung des streptomycinbehandelten murinen Intestinaltrakts ausübt, wenn Wildtyp und Mutante in direkter Konkurrenz zueinander stehen. Die erhaltenen Ergebnisse dieser Studie waren sehr heterogen. Die Unterschiede zwischen einzelnen Individuen waren teils enorm. Im Gesamten konnte allerdings auch während der kompetitiven Kolonisierungsstudie kein signifikanter Effekt des Colibactins während der Kolonisierung beobachtet werden.

Mit Hilfe der durchgeführten *in vivo* Studien im murinen streptomycinbehandelten Intestinalmodell sollte ein möglicher selektiver Vorteil vermittelt durch das Colibactin Gencluster untersucht werden. Es ist davon auszugehen, dass das Colibactin Gencluster einen solchen selektiven Vorteil mit sich bringt, da bakterielle Genome dazu tendieren, überflüssige DNA-Abschnitte, die keinen Nutzen bringen, zu eliminieren bzw. zu verlieren. Meist kann deshalb solchen durch horizontalen Gentransfer erworbenen DNA-Abschnitten eine distinkte Funktion zugeordnet werden (Dobrindt *et al.* 2004). Allerdings sind bisher noch keine Studien zur Expression des Colibactin Genclusters im Intestinaltrakt oder unter anderen *in vivo* Bedingungen durchgeführt worden. Die Expressionsanalyse unter verschiedenen *in vitro* Bedingungen hat gezeigt, dass die ORFs des Colibactin Genclusters stetig exprimiert werden. Die Expression ist dabei nicht für alle ORFs gleich stark und zeigt

einen Anstieg unter aeroben Bedingungen. Des Weiteren konnte keine erhöhte Expression durch Kontakt mit eukaryotischen Zellen festgestellt werden (Homburg *et al.* 2007). Daher ist davon auszugehen, dass die Gene des Colibactin Genclusters auch unter *in vivo* Bedingungen im murinen Intestinaltrakt exprimiert werden, obwohl experimentelle Daten noch ausstehen.

Der zytopathische Effekt des Colibactins kann in Zellkultur nur nach direktem Kontakt lebensfähiger Bakterien mit den eukaryotischen Zellen nachgewiesen werden. Die Verwendung von Kulturüberständen, bakteriellen Lysaten oder die räumliche Trennung der Bakterien von den eukaryotischen durch eine permeable Membran hebt den zytopathischen Effekt auf (Nougayrede *et al.* 2006). Das murine Darmepithel ist von einer ca. 50 µm dicken Mukusschicht überzogen, die den direkten Kontakt von Bakterien mit Epithelzellen verhindert (Roze *et al.* 1982). Da es sich bei dem verwendeten *E. coli* Stamm Nissle 1917 um ein kommensales nicht-pathogenes Isolat handelt, ist davon auszugehen, dass dieser Stamm nicht in der Lage ist die Mukusschicht zu durchdringen und in direkten Kontakt mit den Epithelzellen zu treten. Da aber zumindest in Zellkultur der direkte Kontakt der Bakterien mit den Epithelzellen unabdingbar für die Ausprägung des zytopathischen Effekts ist, kann davon ausgegangen werden, dass durch den fehlenden direkten Kontakt *in vivo* ein Colibactin-vermittelter Effekt ausbleibt.

Zudem besteht die Möglichkeit, dass das Colibactin-Gencluster unter den Bedingungen im murinen streptomycinbehandelten Intestinaltrakt deletiert wird. Entsprechende Untersuchungen der reisolierten Bakterien auf die Präsenz des Colibactin-Genclusters und weitergehend die Funktionalität im Zellkultur-System wurden nicht durchgeführt. Da aber das Colibactin-Gencluster als genomische Insel angesehen werden kann, welche als nicht mehr selbst-mobilisierbar gelten (Hentschel & Hacker 2001), und zusätzlich eine sehr geringe Deletionsrate aufweist (Hochhut *et al.* 2006), kann davon ausgegangen werden, dass das Colibactin-Gencluster auch unter *in vivo* Bedingungen stabil im Chromosom verbleibt.

5.3 Schlussfolgerung und Fazit

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Colibactin Gencluster nicht nur wie anfangs als individuelle genomische Insel, sondern auch als Teil eines integrativen und konjugativen Elements gefunden werden kann. Neben diesen zwei genetischen Strukturen gibt es noch weitere Abwandlungen, die das Colibactin Gencluster enthalten. Diese konnten nicht abschließend aufgeklärt werden. Das Vorhandensein des Colibactin Genclusters in mehreren genetischen Strukturen, die alle durch genetische Umordnungen und Rekombination entstanden sein könnten, legt zugleich einen Mechanismus zu Verbreitung des Colibactin Genclusters nahe. Wie in Abschnitt 5.1.4 dargelegt, wird die horizontale Verbreitung des Colibactin Genclusters möglicherweise durch ein integratives und konjugatives Element erreicht. Dieses Modell wurde von Burrus und Waldor für die Mobilisierung genomischer Inseln vorgeschlagen, da diese in den meisten Fällen nicht mehr zur horizontalen Übertragung befähigt sind (Hentschel & Hacker 2001). Zusätzlich sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ein weiteres Beispiel für die Genomplastizität und genetische Diversität von Bakterien (Jain *et al.* 2002; Jain *et al.* 2003). Der Vergleich des durchschnittlichen G+C Gehalts der Genome von *C. koseri* Frederiksen (53 % G+C), *K. pneumoniae* MGH 78578 (57 % G+C) und *E. coli* (50 % G+C) mit dem des Colibactin Genclusters (53 % G+C) kann als Hinweis gedeutet werden, dass dieses seinen Ursprung in *C. koseri* haben könnte.

Die biologische Funktion des Colibactin Genclusters bleibt weiterhin offen. Eine mögliche Funktion als Kolonisierungsfaktor innerhalb des Darms konnte mittels der Studien im murinen streptomycinbehandelten Intestinaltrakt nicht belegt werden. Zumindest in diesem murinen Modell scheint die Anwesenheit des Colibactin Genclusters keinen Vorteil zu verleihen. Die durch Colibactin verursachten phänotypischen Auswirkungen auf eukaryotische Zellen *in vitro* deuten auf eine mögliche Involvierung bei der Entstehung von Krebs hin. Viele bakterielle Toxine können ein karzinogenes Potential besitzen, welches auf der Modulation des Zellzyklus oder der Induktion von Inflammation, Apoptose oder DNA-Schädigungen beruht. Allerdings konnte ein direkter Zusammenhang zwischen Toxinproduktion und Krebsentstehung bisher nicht nachgewiesen werden (Lax 2005). Es besteht sogar die Möglichkeit, dass die normale intestinale Mikroflora eine Rolle bei der Entstehung

von Dickdarmkrebs spielt (Hope *et al.* 2005). Ein genauer Mechanismus konnte auch hier bisher nicht aufgeklärt werden. Die Entstehung von Dickdarmkrebs wird jedoch vermehrt in Industrienationen beobachtet (Ilyas *et al.* 1999), wo kommensale *E. coli*-Stämme der phylogenetischen Gruppe B2 dominieren (Nowrouzian *et al.* 2005). Möglicherweise korrelieren diese beiden Beobachtungen miteinander und sind durch die Aktivität des Colibactin begründet, da ein Großteil der Colibactin-positiven *E. coli* Stämme der phylogenetischen Gruppe B2 zugeordnet werden kann. Darüber hinaus konnte das Colibactin Gencluster zusammen mit anderen ExPEC-Virulenzfaktoren vermehrt in Mukosa-assoziierten Isolaten von Patienten mit Dickdarmkrebs nachgewiesen werden, als in Stämmen, die aus gesunden Patienten isoliert wurden (Bronowski *et al.* 2008).

Neben einer biologischen Funktion des Colibactins im Darmtrakt sind aber ebenso andere Habitate denkbar, in denen es sich als Fitness- oder Virulenzfaktor erweisen könnte. Möglicherweise dient der Darmtrakt, der ideale Bedingungen für den horizontalen Gentransfer zwischen verschiedenen Bakterien bietet (Scott 2002), nur der Verbreitung des Colibactin Genclusters. Aufgrund der bakteriellen Vielfalt der Darmflora (Gilmore & Ferretti 2003) kann der Intestinaltrakt durchaus als Reservoir für die Verbreitung bakterieller Virulenzfaktoren transienter Mikroorganismen angesehen werden (Farthing 2004). In gesunden Individuen ist der erste Schritt einer Harnwegsinfektion oft die Translokation von uropathogenen *E. coli* aus dem Intestinaltrakt zum Harntrakt (Xie *et al.* 2006). So konnte z. B. im Falle von uropathogenen *E. coli*-Stämmen eine Korrelation von rektalen, vaginalen und Harnwegs-Isolaten sogar zwischen heterosexuellen Geschlechtspartnern gezeigt werden (Foxman *et al.* 2002). Ein Virulenzfaktor von uropathogenen *E. coli* ist der *cytotoxic necrotizing factor* (CNF). Dieses Toxin beeinflusst den eukaryotischen Zellzyklus und ist somit in gewisser Weise dem Colibactin ähnlich, auch wenn die Mechanismen dieser beiden Toxine nicht vergleichbar sind (Nougayrede *et al.* 2005; Nougayrede *et al.* 2006). Für CNF1 konnte unter experimentellen Bedingungen im murinen Harnwegsinfektions-Modell gezeigt werden, dass es UPEC einen beträchtlichen Vorteil innerhalb der Blase und der Nieren verleiht (Rippere-Lampe *et al.* 2001; Bower *et al.* 2005). Die Expression von CNF1 kann unter Umständen die Pathogenese einer Harnwegsinfektion auf verschiedene Arten beeinflussen. Das Toxin CNF1 kann die Apoptose von Blasenepithelzellen fördern, was dazu führt, dass die Ablösung der Epithelzellen stimuliert wird und somit den Bakterien der

Zugang zu tiefer liegendem Gewebe erleichtert wird (Mills *et al.* 2000). Interessanterweise kann die Sekretion von CNF1-haltigen äußeren Membranvesikeln durch ein UPEC Isolat die Phagozytose und Chemotaxis von Neutrophilen inhibieren (Davis *et al.* 2005; Davis *et al.* 2006). Insgesamt könnten diese CNF1-vermittelten Effekte die Verbreitung und Persistenz von UPEC im Harntrakt erleichtern. Die Induktion von DNA Doppelstrangbrüchen und der Zellzyklus Arrest durch Colibactin scheint ein universeller Mechanismus zu sein und erste Experimente zeigen, dass auch Lymphozyten, Makrophagen und dendritische Zellen empfindlich gegenüber Colibactin sind (Nougayrede, persönliche Kommunikation). Auf Basis dieser Erkenntnisse kann ein Effekt von Colibactin auf Zellen des Immunsystems nicht ausgeschlossen werden, was im Rahmen der Etablierung und Aufrechterhaltung einer Infektion ein deutlicher Vorteil für Colibactin-positive Bakterien wäre. Bisher konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden, dass das Colibactin Gencluster oft mit anderen Virulenzfaktoren verknüpft ist und häufiger in pathogenen Isolaten als in kommensalen Bakterienstämmen zu finden ist (Bronowski *et al.* 2008; Johnson *et al.* 2008; Putze *et al.* 2009). Ob die Expression des Colibactins allerdings zu einer erhöhten Pathogenität beiträgt, ist noch nicht abschließend geklärt.

5.4 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur Verbreitung des Colibactin Genclusters innerhalb der Familie *Enterobacteriaceae* und der strukturellen Variabilität dieses genetischen Elements können als Grundlage für weitere Arbeiten dienen. Zwar kann über den Mechanismus der horizontalen Übertragung des Colibactin Genclusters bzw. des ICE*Ck1* nur spekuliert werden, allerdings könnte durch weitere Arbeiten geklärt werden, ob das Colibactin Gencluster tatsächlich durch ein ICE mobilisierbar ist. Des Weiteren gibt es Hinweise auf weitere genetische Strukturen, die das Colibactin Gencluster beinhalten, aber von der Organisation als individuelle genomische Insel und als Teil eines integrativen und konjugativen Elements abweichen. Die Aufklärung dieser Strukturen wird tiefere Einblicke in die Entwicklung und Variabilität dieses genetischen Elements gewähren.

Die Entdeckung, dass das Colibactin Gencluster neben *E. coli* in weiteren Vertretern der Familie *Enterobacteriaceae* wie *K. pneumoniae*, *C. koseri* und *E. aerogenes* zu finden ist, bietet eine breitere Grundlage zur Erforschung seiner biologischen Funktion. Durch die Verwendung geeigneter Mutanten dieser Colibactin-positiven Bakterienspezies in verschiedenen *in vivo* Modellen sollte der biologische Nutzen aufgeklärt werden können.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman (1990). "Basic local alignment search tool." J Mol Biol **215**(3): 403-10.

Bach, S., A. de Almeida and E. Carniel (2000). "The *Yersinia* high-pathogenicity island is present in different members of the family *Enterobacteriaceae*." FEMS Microbiol Lett **183**(2): 289-94.

Berger, H., J. Hacker, A. Juarez, C. Hughes and W. Goebel (1982). "Cloning of the chromosomal determinants encoding hemolysin production and mannose-resistant hemagglutination in *Escherichia coli*." J Bacteriol **152**(3): 1241-7.

Blake, D. P., K. Hillman, D. R. Fenlon and J. C. Low (2003). "Transfer of antibiotic resistance between commensal and pathogenic members of the *Enterobacteriaceae* under ileal conditions." J Appl Microbiol **95**(3): 428-36.

Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau and Y. Shao (1997). "The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12." Science **277**(5331): 1453-62.

Blum-Oehler, G., S. Oswald, K. Eiteljorge, U. Sonnenborn, J. Schulze, W. Kruis and J. Hacker (2003). "Development of strain-specific PCR reactions for the detection of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 in fecal samples." Res Microbiol **154**(1): 59-66.

Bower, J. M., D. S. Eto and M. A. Mulvey (2005). "Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract." Traffic **6**(1): 18-31.

Boyd, E. F., F. S. Wang, T. S. Whittam and R. K. Selander (1996). "Molecular genetic relationships of the *salmonellae*." Appl Environ Microbiol **62**(3): 804-8.

Brautigam, M., C. Hertel and W. P. Hammes (1997). "Evidence for natural transformation of *Bacillus subtilis* in foodstuffs." FEMS Microbiol Lett **155**(1): 93-8.

Brenner, D. J., N. R. Krieg and J. T. Staley (1984). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Springer.

Bronowski, C., S. L. Smith, K. Yokota, J. E. Corkill, H. M. Martin, B. J. Campbell, J. M. Rhodes, C. A. Hart and C. Winstanley (2008). "A subset of mucosa-associated *Escherichia coli* isolates from patients with colon cancer, but not Crohn's disease, share pathogenicity islands with urinary pathogenic *E. coli*." Microbiology **154**(Pt 2): 571-83.

Brzuszkiewicz, E., H. Bruggemann, H. Liesegang, M. Emmerth, T. Olschlager, G. Nagy, K. Albermann, C. Wagner, C. Buchrieser, L. Emody, G. Gottschalk, J. Hacker and U. Dobrindt (2006). "How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(34): 12879-84.

Buchrieser, C., R. Brosch, S. Bach, A. Guiyole and E. Carniel (1998). "The high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis* can be inserted into any of the three chromosomal *asn tRNA* genes." Mol Microbiol **30**(5): 965-78.

Buchrieser, C., M. Prentice and E. Carniel (1998). "The 102-kilobase unstable region of *Yersinia pestis* comprises a high-pathogenicity island linked to a pigmentation segment which undergoes internal rearrangement." J Bacteriol **180**(9): 2321-9.

Burrus, V., J. Marrero and M. K. Waldor (2006). "The current ICE age: biology and evolution of SXT-related integrating conjugative elements." Plasmid **55**(3): 173-83.

Burrus, V., G. Pavlovic, B. Decaris and G. Guedon (2002). "Conjugative transposons: the tip of the iceberg." Mol Microbiol **46**(3): 601-10.

Burrus, V. and M. K. Waldor (2003). "Control of SXT integration and excision." J Bacteriol **185**(17): 5045-54.

Burrus, V. and M. K. Waldor (2004). "Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements." Res Microbiol **155**(5): 376-86.

Cane, D. E. and C. T. Walsh (1999). "The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases." Chem Biol **6**(12): R319-25.

Carniel, E. (1999). "The *Yersinia* high-pathogenicity island." Int Microbiol **2**(3): 161-7.

Carniel, E., I. Guilvout and M. Prentice (1996). "Characterization of a large chromosomal "high-pathogenicity island" in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*." J Bacteriol **178**(23): 6743-51.

Chen, Y. T., H. Y. Chang, Y. C. Lai, C. C. Pan, S. F. Tsai and H. L. Peng (2004). "Sequencing and analysis of the large virulence plasmid pLVPK of *Klebsiella pneumoniae* CG43." Gene **337**: 189-98.

Clermont, O., S. Bonacorsi and E. Bingen (2000). "Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group." Appl Environ Microbiol **66**(10): 4555-8.

Courvalin, P. (1994). "Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria." Antimicrob Agents Chemother **38**(7): 1447-51.

Das, A. and C. Khosla (2009). "Biosynthesis of aromatic polyketides in bacteria." Acc Chem Res **42**(5): 631-9.

Davis, J. M., H. M. Carvalho, S. B. Rasmussen and A. D. O'Brien (2006). "Cytotoxic necrotizing factor type 1 delivered by outer membrane vesicles of uropathogenic *Escherichia coli* attenuates polymorphonuclear leukocyte antimicrobial activity and chemotaxis." Infect Immun **74**(8): 4401-8.

Davis, J. M., S. B. Rasmussen and A. D. O'Brien (2005). "Cytotoxic necrotizing factor type 1 production by uropathogenic *Escherichia coli* modulates polymorphonuclear leukocyte function." Infect Immun **73**(9): 5301-10.

Dobrindt, U., F. Agerer, K. Michaelis, A. Janka, C. Buchrieser, M. Samuelson, C. Svanborg, G. Gottschalk, H. Karch and J. Hacker (2003). "Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays." J Bacteriol **185**(6): 1831-40.

Dobrindt, U. and J. Hacker (2001). "Whole genome plasticity in pathogenic bacteria." Curr Opin Microbiol **4**(5): 550-7.

Dobrindt, U., B. Hochhut, U. Hentschel and J. Hacker (2004). "Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms." Nat Rev Microbiol **2**(5): 414-24.

Doucet-Populaire, F., P. Trieu-Cuot, A. Andremont and P. Courvalin (1992). "Conjugal transfer of plasmid DNA from *Enterococcus faecalis* to *Escherichia coli* in digestive tracts of gnotobiotic mice." Antimicrob Agents Chemother **36**(2): 502-4.

Doucet-Populaire, F., P. Trieu-Cuot, I. Dosbaa, A. Andremont and P. Courvalin (1991). "Inducible transfer of conjugative transposon Tn1545 from *Enterococcus faecalis* to *Listeria monocytogenes* in the digestive tracts of gnotobiotic mice." Antimicrob Agents Chemother **35**(1): 185-7.

Droge, M., A. Puhler and W. Selbitschka (1998). "Horizontal gene transfer as a biosafety issue: a natural phenomenon of public concern." J Biotechnol **64**(1): 75-90.

Escherich, T. (1886). "Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehungen zur Physiologie der Verdauung." Ferdinand Enke, Stuttgart.

Farthing, M. J. (2004). "Bugs and the gut: an unstable marriage." Best Pract Res Clin Gastroenterol **18**(2): 233-9.

Finking, R. and M. A. Marahiel (2004). "Biosynthesis of nonribosomal peptides1." Annu Rev Microbiol **58**: 453-88.

Flint, H. J., S. H. Duncan, K. P. Scott and P. Louis (2007). "Interactions and competition within the microbial community of the human colon: links between diet and health." Environ Microbiol **9**(5): 1101-11.

Foxman, B., S. D. Manning, P. Tallman, R. Bauer, L. Zhang, J. S. Koopman, B. Gillespie, J. D. Sobel and C. F. Marrs (2002). "Uropathogenic *Escherichia coli* are more likely than commensal *E. coli* to be shared between heterosexual sex partners." Am J Epidemiol **156**(12): 1133-40.

Gal-Mor, O. and B. B. Finlay (2006). "Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence." Cell Microbiol **8**(11): 1707-19.

Gillor, O., B. C. Kirkup and M. A. Riley (2004). "Colicins and microcins: the next generation antimicrobials." Adv Appl Microbiol **54**: 129-46.

Gilmore, M. S. and J. J. Ferretti (2003). "Microbiology. The thin line between gut commensal and pathogen." Science **299**(5615): 1999-2002.

Grimberg, J., S. Maguire and L. Belluscio (1989). "A simple method for the preparation of plasmid and chromosomal *E. coli* DNA." Nucleic Acids Res **17**(21): 8893.

Grohmann, E., G. Muth and M. Espinosa (2003). "Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria." Microbiol Mol Biol Rev **67**(2): 277-301, table of contents.

Grosse, C., J. Scherer, D. Koch, M. Otto, N. Taudte and G. Grass (2006). "A new ferrous iron-uptake transporter, EfeU (YcdN), from *Escherichia coli*." Mol Microbiol **62**(1): 120-31.

Grozdanov, L., C. Raasch, J. Schulze, U. Sonnenborn, G. Gottschalk, J. Hacker and U. Dobrindt (2004). "Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917." J Bacteriol **186**(16): 5432-41.

Grozdanov, L., U. Zahringer, G. Blum-Oehler, L. Brade, A. Henne, Y. A. Knirel, U. Schombel, J. Schulze, U. Sonnenborn, G. Gottschalk, J. Hacker, E. T. Rietschel and U. Dobrindt (2002). "A single nucleotide exchange in the *wzy* gene is responsible for the semirough O6 lipopolysaccharide phenotype and serum sensitivity of *Escherichia coli* strain Nissle 1917." J Bacteriol **184**(21): 5912-25.

Guerinot, M. L. (1994). "Microbial iron transport." Annu Rev Microbiol **48**: 743-72.

Hacker, J. and E. Carniel (2001). "Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes." EMBO Rep **2**(5): 376-81.

Hacker, J. and J. B. Kaper (2000). "Pathogenicity islands and the evolution of microbes." Annu Rev Microbiol **54**: 641-79.

Hattori, M. and T. D. Taylor (2009). "The human intestinal microbiome: a new frontier of human biology." DNA Res **16**(1): 1-12.

Hentschel, U. and J. Hacker (2001). "Pathogenicity islands: the tip of the iceberg." Microbes Infect **3**(7): 545-8.

Hentschel, U., M. Steinert and J. Hacker (2000). "Common molecular mechanisms of symbiosis and pathogenesis." Trends Microbiol **8**(5): 226-31.

Hochhut, B. and M. K. Waldor (1999). "Site-specific integration of the conjugal *Vibrio cholerae* SXT element into *prfC*." Mol Microbiol **32**(1): 99-110.

Hochhut, B., C. Wilde, G. Balling, B. Middendorf, U. Dobrindt, E. Brzuszkiewicz, G. Gottschalk, E. Carniel and J. Hacker (2006). "Role of pathogenicity island-associated integrases in the genome plasticity of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536." Mol Microbiol **61**(3): 584-95.

Homburg, S. (2007). Untersuchungen zur Molekularbiologie von *Escherichia coli*-Wildstämmen. Institut für Molekulare Infektionsbiologie. Würzburg, Julius-Maximilians-Universität Würzburg. **Dissertation**.

- Homburg, S., E. Oswald, J. Hacker and U. Dobrindt (2007). "Expression analysis of the colibactin gene cluster coding for a novel polyketide in *Escherichia coli*." FEMS Microbiol Lett **275**(2): 255-62.
- Hope, M. E., G. L. Hold, R. Kain and E. M. El-Omar (2005). "Sporadic colorectal cancer--role of the commensal microbiota." FEMS Microbiol Lett **244**(1): 1-7.
- Hou, Y. M. (1999). "Transfer RNAs and pathogenicity islands." Trends Biochem Sci **24**(8): 295-8.
- Hsu, S. C. and H. Y. Tsen (2001). "PCR primers designed from malic acid dehydrogenase gene and their use for detection of *Escherichia coli* in water and milk samples." Int J Food Microbiol **64**(1-2): 1-11.
- Ilyas, M., J. Straub, I. P. Tomlinson and W. F. Bodmer (1999). "Genetic pathways in colorectal and other cancers." Eur J Cancer **35**(14): 1986-2002.
- Jain, R., M. C. Rivera, J. E. Moore and J. A. Lake (2002). "Horizontal gene transfer in microbial genome evolution." Theor Popul Biol **61**(4): 489-95.
- Jain, R., M. C. Rivera, J. E. Moore and J. A. Lake (2003). "Horizontal gene transfer accelerates genome innovation and evolution." Mol Biol Evol **20**(10): 1598-602.
- Johnson, J. R., B. Johnston, M. A. Kuskowski, J. P. Nougayrede and E. Oswald (2008). "Molecular epidemiology and phylogenetic distribution of the *Escherichia coli* pks genomic island." J Clin Microbiol **46**(12): 3906-11.
- Juhas, M., J. R. van der Meer, M. Gaillard, R. M. Harding, D. W. Hood and D. W. Crook (2009). "Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution." FEMS Microbiol Rev **33**(2): 376-93.
- Kaper, J. B., J. P. Nataro and H. L. Mobley (2004). "Pathogenic *Escherichia coli*." Nat Rev Microbiol **2**(2): 123-40.

Katz, L. and S. Donadio (1993). "Polyketide synthesis: prospects for hybrid antibiotics." Annu Rev Microbiol **47**: 875-912.

Kauffmann, F. (1965). "[Supplement to the Kauffmann-White scheme. 8.]." Acta Pathol Microbiol Scand **64**(3): 362-6.

Korhonen, T. K. (2000). "Adherence of enteric bacteria onto the mammalian extracellular matrix. Test-tube artefact or a virulence function?" Adv Exp Med Biol **485**: 193-200.

Korhonen, T. K., M. V. Valtonen, J. Parkkinen, V. Vaisanen-Rhen, J. Finne, F. Orskov, I. Orskov, S. B. Svenson and P. H. Makela (1985). "Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis." Infect Immun **48**(2): 486-91.

Krewulak, K. D. and H. J. Vogel (2008). "Structural biology of bacterial iron uptake." Biochim Biophys Acta **1778**(9): 1781-804.

Kruis, W., P. Fric, M. Stolte (2001). "The mutaflor study group. Maintenance of remission in ulcerative colitis is equally effective with *Escherichia coli* Nissle 1917 and with standard mesalamine." Gastroenterology(120 (Suppl)): A127.

Lawrence, J. G. and H. Ochman (1998). "Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(16): 9413-7.

Lax, A. J. (2005). "Opinion: Bacterial toxins and cancer--a case to answer?" Nat Rev Microbiol **3**(4): 343-9.

Lewis, J. A. and G. F. Hatfull (2001). "Control of directionality in integrase-mediated recombination: examination of recombination directionality factors (RDFs) including Xis and Cox proteins." Nucleic Acids Res **29**(11): 2205-16.

Lin, T. L., C. Z. Lee, P. F. Hsieh, S. F. Tsai and J. T. Wang (2008). "Characterization of integrative and conjugative element ICEKp1-associated genomic heterogeneity in a *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from a primary liver abscess." J Bacteriol **190**(2): 515-26.

Lodinova-Zadnikova, R. and U. Sonnenborn (1997). "Effect of preventive administration of a nonpathogenic *Escherichia coli* strain on the colonization of the intestine with microbial pathogens in newborn infants." Biol Neonate **71**(4): 224-32.

Maeda, S., M. Ito, T. Ando, Y. Ishimoto, Y. Fujisawa, H. Takahashi, A. Matsuda, A. Sawamura and S. Kato (2006). "Horizontal transfer of nonconjugative plasmids in a colony biofilm of *Escherichia coli*." FEMS Microbiol Lett **255**(1): 115-20.

Malchow, H., U. Sonnenborn, R. Greinwald, and A. Körner (1995). "Colonization of adults by a non-pathogenic *Escherichia coli* strain." Gastroenterology(108 (Suppl)): A869.

Malchow, H. A. (1997). "Crohn's disease and *Escherichia coli*. A new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease?" J Clin Gastroenterol **25**(4): 653-8.

Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook (1989). Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Marrs, C. F., L. Zhang, P. Tallman, S. D. Manning, P. Somsel, P. Raz, R. Colodner, M. E. Jantunen, A. Siitonen, H. Saxen and B. Foxman (2002). "Variations in 10 putative uropathogen virulence genes among urinary, faecal and peri-urethral *Escherichia coli*." J Med Microbiol **51**(2): 138-42.

McCuddin, Z. P., S. A. Carlson, M. A. Rasmussen and S. K. Franklin (2006). "*Klebsiella* to *Salmonella* gene transfer within rumen protozoa: implications for antibiotic resistance and rumen defaunation." Vet Microbiol **114**(3-4): 275-84.

- Menzella, H. G. and C. D. Reeves (2007). "Combinatorial biosynthesis for drug development." Curr Opin Microbiol **10**(3): 238-45.
- Mercer, D. K., K. P. Scott, W. A. Bruce-Johnson, L. A. Glover and H. J. Flint (1999). "Fate of free DNA and transformation of the oral bacterium *Streptococcus gordonii* DL1 by plasmid DNA in human saliva." Appl Environ Microbiol **65**(1): 6-10.
- Mills, M., K. C. Meysick and A. D. O'Brien (2000). "Cytotoxic necrotizing factor type 1 of uropathogenic *Escherichia coli* kills cultured human uroepithelial 5637 cells by an apoptotic mechanism." Infect Immun **68**(10): 5869-80.
- Mobley, H. L., D. M. Green, A. L. Trifillis, D. E. Johnson, G. R. Chippendale, C. V. Lockett, B. D. Jones and J. W. Warren (1990). "Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains." Infect Immun **58**(5): 1281-9.
- Mollenbrink, M. and E. Bruckschen (1994). "[Treatment of chronic constipation with physiologic *Escherichia coli* bacteria. Results of a clinical study of the effectiveness and tolerance of microbiological therapy with the *E. coli* Nissle 1917 strain (Mutaflor)]." Med Klin (Munich) **89**(11): 587-93.
- Moore, B. S. and J. N. Hopke (2001). "Discovery of a new bacterial polyketide biosynthetic pathway." ChemBiochem **2**(1): 35-8.
- Myhal, M. L., D. C. Laux and P. S. Cohen (1982). "Relative colonizing abilities of human fecal and K 12 strains of *Escherichia coli* in the large intestines of streptomycin-treated mice." Eur J Clin Microbiol **1**(3): 186-92.
- Nissle, A. (1918). "Die antagonistische Behandlung chronischer Darmstörungen mit Kolibakterien." Med Klein(2): 29-30.
- Nougayrede, J. P., S. Homburg, F. Taieb, M. Boury, E. Brzuszkiewicz, G. Gottschalk, C. Buchrieser, J. Hacker, U. Dobrindt and E. Oswald (2006). "*Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells." Science **313**(5788): 848-51.

Nougayrede, J. P., F. Taieb, J. De Rycke and E. Oswald (2005). "Cyclomodulins: bacterial effectors that modulate the eukaryotic cell cycle." Trends Microbiol **13**(3): 103-10.

Nowrouzian, F. L., A. E. Wold and I. Adlerberth (2005). "*Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2 have superior capacity to persist in the intestinal microflora of infants." J Infect Dis **191**(7): 1078-83.

Ochman, H., A. S. Gerber and D. L. Hartl (1988). "Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction." Genetics **120**(3): 621-3.

Ochman, H., J. G. Lawrence and E. A. Groisman (2000). "Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation." Nature **405**(6784): 299-304.

Oelschlaeger, T. A., D. Zhang, S. Schubert, E. Carniel, W. Rabsch, H. Karch and J. Hacker (2003). "The high-pathogenicity island is absent in human pathogens of *Salmonella enterica* subspecies I but present in isolates of subspecies III and VI." J Bacteriol **185**(3): 1107-11.

Ogata, H., S. Goto, K. Sato, W. Fujibuchi, H. Bono and M. Kanehisa (1999). "KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes." Nucleic Acids Res **27**(1): 29-34.

Patzer, S. I., M. R. Baquero, D. Bravo, F. Moreno and K. Hantke (2003). "The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catecholate siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and IroN." Microbiology **149**(Pt 9): 2557-70.

Preston, G. M., B. Haubold and P. B. Rainey (1998). "Bacterial genomics and adaptation to life on plants: implications for the evolution of pathogenicity and symbiosis." Curr Opin Microbiol **1**(5): 589-97.

Putze, J., C. Hennequin, J. P. Nougayrede, W. Zhang, S. Homburg, H. Karch, M. A. Bringer, C. Fayolle, E. Carniel, W. Rabsch, T. A. Oelschlaeger, E. Oswald, C. Forestier, J. Hacker and U. Dobrindt (2009). "Genetic structure and distribution of the colibactin genomic island among *Enterobacteriaceae*." Infect Immun.

Rademaker, J. L. W. and F. J. De Bruijn (1992). Characterization and classification of microbes by REP-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis, J. Wiley & Sons, Inc.

Rembacken, B. J., A. M. Snelling, P. M. Hawkey, D. M. Chalmers and A. T. Axon (1999). "Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial." Lancet **354**(9179): 635-9.

Rippere-Lampe, K. E., A. D. O'Brien, R. Conran and H. A. Lockman (2001). "Mutation of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor type 1 (cnf(1)) attenuates the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*." Infect Immun **69**(6): 3954-64.

Rozee, K. R., D. Cooper, K. Lam and J. W. Costerton (1982). "Microbial flora of the mouse ileum mucous layer and epithelial surface." Appl Environ Microbiol **43**(6): 1451-63.

Salyers, A. A., N. B. Shoemaker, A. M. Stevens and L. Y. Li (1995). "Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements." Microbiol Rev **59**(4): 579-90.

Schmidt, H. and M. Hensel (2004). "Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis." Clin Microbiol Rev **17**(1): 14-56.

Schubert, S., S. Dufke, J. Sorsa and J. Heesemann (2004). "A novel integrative and conjugative element (ICE) of *Escherichia coli*: the putative progenitor of the *Yersinia* high-pathogenicity island." Mol Microbiol **51**(3): 837-48.

Schubert, S., B. Picard, S. Gouriou, J. Heesemann and E. Denamur (2002). "*Yersinia* high-pathogenicity island contributes to virulence in *Escherichia coli* causing extraintestinal infections." Infect Immun **70**(9): 5335-7.

Schwalbe, R. S., C. W. Hoge, J. G. Morris, Jr., P. N. O'Hanlon, R. A. Crawford and P. H. Gilligan (1990). "In vivo selection for transmissible drug resistance in *Salmonella typhi* during antimicrobial therapy." Antimicrob Agents Chemother **34**(1): 161-3.

Scott, J. R., F. Bringel, D. Marra, G. Van Alstine and C. K. Rudy (1994). "Conjugative transposition of Tn916: preferred targets and evidence for conjugative transfer of a single strand and for a double-stranded circular intermediate." Mol Microbiol **11**(6): 1099-108.

Scott, K. P. (2002). "The role of conjugative transposons in spreading antibiotic resistance between bacteria that inhabit the gastrointestinal tract." Cell Mol Life Sci **59**(12): 2071-82.

Sentchilo, V., R. Ravatn, C. Werlen, A. J. Zehnder and J. R. van der Meer (2003). "Unusual integrase gene expression on the *clc* genomic island in *Pseudomonas* sp. strain B13." J Bacteriol **185**(15): 4530-8.

Shen, B. (2003). "Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms." Curr Opin Chem Biol **7**(2): 285-95.

Shoemaker, N. B., H. Vlamakis, K. Hayes and A. A. Salyers (2001). "Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and other genera in the human colon." Appl Environ Microbiol **67**(2): 561-8.

Soler Bistue, A. J., D. Birshan, A. P. Tomaras, M. Dandekar, T. Tran, J. Newmark, D. Bui, N. Gupta, K. Hernandez, R. Sarno, A. Zorreguieta, L. A. Actis and M. E. Tolmasky (2008). "*Klebsiella pneumoniae* multiresistance plasmid pMET1: similarity with the *Yersinia pestis* plasmid pCRY and integrative conjugative elements." PLoS One **3**(3): e1800.

Song, Y., Z. Tong, J. Wang, L. Wang, Z. Guo, Y. Han, J. Zhang, D. Pei, D. Zhou, H. Qin, X. Pang, J. Zhai, M. Li, B. Cui, Z. Qi, L. Jin, R. Dai, F. Chen, S. Li, C. Ye, Z. Du, W. Lin, J. Yu, H. Yang, P. Huang and R. Yang (2004). "Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strain 91001, an isolate avirulent to humans." DNA Res **11**(3): 179-97.

Staunton, J. and K. J. Weissman (2001). "Polyketide biosynthesis: a millennium review." Nat Prod Rep **18**(4): 380-416.

Tarr, P. I., S. S. Bilge, J. C. Vary, Jr., S. Jelacic, R. L. Habeeb, T. R. Ward, M. R. Baylor and T. E. Besser (2000). "Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure." Infect Immun **68**(3): 1400-7.

Tilley, S. J. and H. R. Saibil (2006). "The mechanism of pore formation by bacterial toxins." Curr Opin Struct Biol **16**(2): 230-6.

Todar, K. (2006). "Todar's Online Textbook of Bacteriology." from <http://www.textbookofbacteriology.net>.

Toth, I., F. Herault, L. Beutin and E. Oswald (2003). "Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: establishment of the existence of a new *cdt* variant (Type IV)." J Clin Microbiol **41**(9): 4285-91.

Trieu-Cuot, P., C. Carlier, P. Martin and P. Courvalin (1987). "Plasmid transfer by conjugation from *Escherichia coli* to Gram-positive bacteria." FEMS Microbiol Lett **48**(1-2): 289-294.

Tseng, T. T., B. M. Tyler and J. C. Setubal (2009). "Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology." BMC Microbiol **9 Suppl 1**: S2.

Ukena, S. N., A. M. Westendorf, W. Hansen, M. Rohde, R. Geffers, S. Coldewey, S. Suerbaum, J. Buer and F. Gunzer (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.

Waksman, S. A. and H. B. Woodruff (1940). "The Soil as a Source of Microorganisms Antagonistic to Disease-Producing Bacteria." J Bacteriol **40**(4): 581-600.

Walsh, C. (2000). "Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance." Nature **406**(6797): 775-81.

Wassenaar, T. M. and W. Gaastra (2001). "Bacterial virulence: can we draw the line?" FEMS Microbiol Lett **201**(1): 1-7.

Wehkamp, J., J. Harder, K. Wehkamp, B. Wehkamp-von Meissner, M. Schlee, C. Enders, U. Sonnenborn, S. Nuding, S. Bengmark, K. Fellermann, J. M. Schroder and E. F. Stange (2004). "NF-kappaB- 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): 5750-8.

Weissman, K. J. (2004). "Polyketide biosynthesis: understanding and exploiting modularity." Philos Transact A Math Phys Eng Sci **362**(1825): 2671-90.

Westendorf, A. M., F. Gunzer, S. Deppenmeier, D. Tapadar, J. K. Hunger, M. A. Schmidt, J. Buer and D. Bruder (2005). "Intestinal immunity of *Escherichia coli* NISSLE 1917: a safe carrier for therapeutic molecules." FEMS Immunol Med Microbiol **43**(3): 373-84.

Xie, J., B. Foxman, L. Zhang and C. F. Marrs (2006). "Molecular epidemiologic identification of *Escherichia coli* genes that are potentially involved in movement of the organism from the intestinal tract to the vagina and bladder." J Clin Microbiol **44**(7): 2434-41.

Yan, F. and D. B. Polk (2004). "Commensal bacteria in the gut: learning who our friends are." Curr Opin Gastroenterol **20**(6): 565-71.

Zingler, G., M. Ott, G. Blum, U. Falkenhagen, G. Naumann, W. Sokolowska-Kohler and J. Hacker (1992). "Clonal analysis of *Escherichia coli* serotype O6 strains from urinary tract infections." Microb Pathog **12**(4): 299-310.

7 ANHANG

7.1 Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	Volumen pro Volumen	kDa	Kilodalton
(w/v)	Masse pro Volumen	Km	Kanamycin
°C	Grad Celsius	l	Liter
µg	Mikrogramm	LB	<i>Lysogen Broth</i>
µl	Mikroliter	M	Molar
µm	Mikrometer	MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
A	Adenin	mg	Milligramm
Abb.	Abbildung	min	Minute
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	ml	Milliliter
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>	mm	Millimeter
bp	Basenpaare	mM	Millimolar
BSA	Bovines Serumalbumin	MW	Molekulargewicht
C	Cytosin	neAA	non essential Amino Acids
Cm	Chloramphenicol	nm	nanometer
CPE	<i>Cytopathic Effect</i>	NRP	nichtribosomales Peptid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	NRPS	nichtribosomale Peptidsynthase
DNA	Desoxyribonukleinsäure	OD _x	Optische Dichte bei x nm
DNase	Desoxyribonuklease	ORF	<i>Open Reading Frame</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
DR	<i>Direct Repeat</i>	PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
EcN	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	PK	Polyketid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	PKS	Polyketidsynthase
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>	Upm	Umdrehungen pro Minute
EtOH	Ethanol	RT	Raumtemperatur
FCS	Fötales Kälberserum	SDS	Natriumdodecylsulfat
g	Gramm	Sm	Streptomycin
G	Guanin	T	Thymidin

Abkürzungsverzeichnis (Fortsetzung)

GEI	genomische Insel	Tab.	Tabelle
H ₂ O _{dest.}	einfach destilliertes Wasser	TAE	Tris-Acetat-EDTA
H ₂ O _{bide.}	zweifach destilliertes Wasser	Tris	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan
h	Stunde		
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2- ethansulfonsäure	u	Unit
		ÜNK	Übernachtkultur
ICE	<i>Integrative and Conjugative Element</i>	V	Volt
		WT	Wildtyp
IS	Insertionssequenz		
kb	Kilobasen		

7.2 Oligonukleotide**Tabelle 7.2:** Oligonukleotide und deren Verwendungszwecke

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Anwendung	Referenz
asnW-PAlleftend1	AATCAACCCAGCTGCAAATC	Nachweis	Nougayre
asnW-PAlleftend2	CACCCCATCATTAAAAACG	des	de, 2006
asnW-PAIrightend1	AGCCGTATCCTGCTCAAAC	Colibactin	
asnW-PAIrightend2	TCGGTATGTCCGGTTAAAGC	Genclusters	
ORF1907-1908.1	TCTGTCTTGGTCGCGTAGTG		
ORF1907-1908.2	TCAGTTCGGGTATGTGTGGA		
ORF1911-1912.1	ATTGATAGCGTCACCCAAC		
ORF1911-1912.2	TAAGCGTCTGGAATGCAGTG		
ORF1913-1914.1	CGCTTCATCAACACGCTTTA		
ORF1913-1914.2	CGCATCAGGATGTTCTGCTA		
ORF1915-1918.1	TCATCGCAATTTGGATTTCA		
ORF1915-1918.2	TGATGAACGTGGCGGTAATA		
ORF1919-1920.1	CCTCGCTAAAGAAGGTGACG		
ORF1919.1920.2	ACCGTTGACTGTGATGGACA		
ORF1920-1922.1	ATTCGCCCTGATATTGTCG		
ORF1920-1922.2	CCTTCGTTGGCAGATTGATT		

Tabelle 7.2: Oligonukleotide und deren Verwendungszwecke (Fortsetzung)

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Anwendung	Referenz
CDT-s1	GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG	Nachweis	Toth,
CDT-s2	GAAAATAAATGGAACACACATGTCCG	von <i>cnf/cdt</i>	2003
CDT-as1	AAATCACCAAGAATCATCCAGTTA	Multiplex und	
CDT-as2	AAATCTCCTGCAATCATCCAGTTA	<i>cdt-I</i> , <i>cdt-II</i> ,	
CNF-s	TTATATAGTCGTCAAGATGGA	<i>cdt-III</i> , <i>cdt-IV</i> ,	
CND-as	CACTAAGCTTTACAATATTGA	<i>cnf-1</i> , <i>cnf-2</i>	
CDT-Is	CAATAGTCGCCACAGGA		
CDT-Ias	ATAATCAAGAACACCACCAC		
CDT-IIs	GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG		
CDT-IIas	TTTGTGTTGCCGCCGCTGGTGAAA		
CDT-IIIs	GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG		
CDT-IIIas	TTTGTGTCGGTGCAGCAGGGAAAA		
CDT-IVs	CCTGATGGTTCAGGAGGCTGGTTC		
CDT-IVas	TTGCTCCAGAATCTATACCT		
CNF-1s	GGGGGAAGTACAGAAGAATTA		
CNF-1as	TTGCCGTCCACTCTCACCAGT		
CNF-2s	TATCATACGGCAGGAGGAAGCACC		
CNF-2as	GTCACAATAGACAATAATTTTCCG		
IPCR_Keb_1_s	CCCAGCCAATCAGATAGGAA	Inverse PCR,	Diese
IPCR_Kleb_1_as	TAAATGGACCCGAGGTCGTA	Integrations-	Arbeit
inrightend_s	ACCGCCGTCTAAAACAAATG	bestimmung	
IPCR_rightend_s1	GGTGGTCATTCTGGTGGTCT	des	
IPCR_rightend_as1	AGCGATAACAGTCCGCTCAG	Colibactin-	
IPCR_leftend_s2	AAGGGTATCGGTGGCTGTAA	Genclusters	
Ck_leftout1	TTTCGTTATCGCTGTTGCAG	Primer-	Diese
Ck_rightout1	TTCATGCACTTGCTCCTTTG	Walking an	Arbeit
int_pks_left_seq01	GTTCCCCTACAGCTATTTGTGC	tRNA-Ende	
int_pks_left_seq02	GGTGGCACATCTTCCCTTAT	des	
int_left_seq03Kp	TGGTGATCCCCCATAGTGAT	Colibactin	
int_left_seq03Ec	TTTTATTGAGCGCTCTGTTT	Genclusters	
int_left_seq04Kp	CCGACTTTTTTCAGGGAGATT		
int_left_seq04Ec	GAAGCCAGCTTTAATTGCTCTA		
int_left_seq05Ec	TTTGCCGGGTTCAAAGTATC		

Tabelle 7.2: Oligonukleotide und deren Verwendungszwecke (Fortsetzung)

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Anwendung	Referenz
int_pks_right_seq1	CTAGTCTGTGGCCGTCGTTT	Primer-	Diese
int_right_seq02Kp	GTACGGGAAATCACGGAAAA	Walking an	Arbeit
int_right_seq02Ec	CCGGTTCGGTTGTGTATTTC	nicht tRNA-	
int_rightseq03Kp	TCTCTGGCGTAAGCAATACC	Ende des	
int_rightseq03Ec	AGCGACGTTAACCACAATCC	Colibactin	
int_rightseq04Kp	TAATCAGCGATGGTGCTCTG	Genclusters	
int_rightseq05Kp	TTAACGGCAGCAAAGAACCT		
int_rightseq06Kp	GGGACTTGAACCGAAGAACA		
Ck_PCR_left01s	ATCGGAGAAGGTGACCAGTG	Detektion	Diese
CK_PCR_left01as	GCTGTGTACCAGCATCGAGA	von DNA-	Arbeit
Ck_PCR_left02s	AGCGGTACGCTTAGATCGTG	Regionen up-	
Ck_PCR_left02as	GCCTTAATCGGTACGCTCAG	und	
Ck_PCR_left03s	CGTTTATGCCGATTTGGTCT	downstream	
Ck_PCR_left03as	CGAGGAAAGCAATGAGCTTC	des	
Ck_PCR_left04s	GGCTGGAAAGGTCATGTTGT	Colibactin-	
Ck_PCR_left04as	TTGTCAAAGCCTGAATGCAC	Genclusters	
Ck_PCR_right01s	GGTCTCCGTCAGTTTCTGGA	in <i>C. koseri</i>	
Ck_PCR_right01as	AGATACAAATCCCGCACCCAG	Frederiksen	
Ck_PCR_right02s	GCGGTAATTCCAGCGTAAAA		
Ck_PCR_right02as	GTGGCGTGGATAACCAGACTT		
Ck_PCR_right03s	ACTTCGGCAACCATTGAAAC		
Ck_PCR_right03as	TTTCGGCGATCAACACATTA		
Ck_PCR_right04s	GAACGGTGCGATGAAGATTT		
Ck_PCR_right04as	TTCCGAATTCACCAATGACA		
CK_right1.1s	GCCGCCAGATGACTGTTAAT		
Ck_right1.1as	AGCAGAGACCAGGGACAGAA		
CK_right1.2s	TTTCGGTTTGTGGTTGTTCA		
CK_right1.2as	TTATCGGCACAACCTGGTTCA		
Ck_right1.3s	TATTTGTATCAGGCGGGTCAG		
Ck_right1.3as	ACGCTCCGTTCTGGTTAAAT		
Ck_right1.4s	TCATTTCGATGTTTCAGGTTGTC		
Ck_right1.4as	TGAAATATAACCGCGAACAGATG		
Ck_right1.5s	CATCTGTTTCGCGGTATATTTCA		
Ck_right1.5as	GTTCCCTGTAGCGTGGGATAAAG		

Tabelle 7.2: Oligonukleotide und deren Verwendungszwecke (Fortsetzung)

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Anwendung	Referenz
tRNA_end_seq01Kp	GATGCGGAGGGTAAAATCAA	Primer-	Diese
tRNA_end_seq02Kp	GATGCGGAGGGTAAAATCAA	Walking an	Arbeit
tRNA_end_seq01Kp CF1	GATGCGGAGGGTAAAATCAA	tRNA-Ende des ICE <i>Ck1</i>	
CkpkstRNA 1s	GGGAGATCAGATGACGAC	ICE <i>Ck1</i> -	Diese
CkpkstRNA 2s	CATTGATTTCCGTTTGTGG	Screening	Arbeit
CkpkstRNA 3s	TTGCTGATGTATTTCTGGCT	"	"
CkpkstRNA 4s	GCGAACAGGGATAATATGAC	"	"
CkpkstRNA 5s	GTATATTTCCAGCTCTGCATTCC	"	"
CkpkstRNA 6s	GACAATTCGTGTTGAGTG	"	"
CkpkstRNA 7s	TCTTCTCGTCGTTTGTACC	"	"
CkpkstRNA 8s	GCCATATCTGCCATAGCC	"	"
CkpkstRNA 9s	TGCGATAAACCCAGTTACC	"	"
CkpkstRNA 10s	GTTGTGTTGCCATCTTCTC	"	"
CkpkstRNA 11s	AAGGTATACAGCTCAACGTC	"	"
CkpkstRNA 12s	GTCGCCTTATTAAGAACGAG	"	"
CkpkstRNA 13s	CAGGGTGATCCCTATACCA	"	"
CkpkstRNA 14s	CGCAAGCCAGAATAAGAG	"	"
CkpkstRNA 15s	GCTCGTCATTCATCACAG	"	"
CkpkstRNA 16s	CTTAATGGCTTTCTTCGCT	"	"
CkpkstRNA 17s	ATCATCATGCTCAACGGG	"	"
CkpkstRNA 18s	GATTCGCTGGATATAGCTC	"	"
CkpkstRNA 19s	GTCAGCGAGAACATTAG	"	"
CkpkstRNA 20s	CGCACATACAGATTTAACGTC	"	"
CkpkstRNA 21s	TCAGTGAATGGTATAGTGTC	"	"
CkpkstRNA 22s	GTGAAATGGGATGACTCTC	"	"
CkpkstRNA 23s	CATGTACAGGCCTATGGG	"	"
CkpkstRNA 24s	AAATGTTCCATCCGTTCCAGTC	"	"
CkpkstRNA 25s	TCAGATAACGCATGGTAGG	"	"
CkpkstRNA 26s	TTATAGAAGTCCTGCGCC	"	"
CkpkstRNA 27s	GTAATAGCCCGAGATGGT	"	"
CkpkstRNA 28s	CCCGTGAATAACGTAAGC	"	"
CkpkstRNA 29s	GCACCCGGAAATAATCAG	"	"
CkpkstRNA 30s	GCATATCTGGATCGTCAGG	"	"

Tabelle 7.2: Oligonukleotide und deren Verwendungszwecke (Fortsetzung)

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Anwendung	Referenz
CkpkstRNA 31s	CGTTGTTTATCCAGCCCT	ICE <i>Ck1</i>	Diese
CkpkstRNA 32s	AATGGCTGAACAGATCCT	Screening	Arbeit
CkpkstRNA 33s	GTATAGCGATTCAGACAGG	"	"
CkpkstRNA 34s	CCATGACCTGATGATCCA	"	"
CkpkstRNA 35s	GCTATACGCTGTTCTTCC	"	"
CkpkstRNA 36s	ACAGAGCCTGTTGTAACG	"	"
CkpkstRNA 37s	GCTGTGATAGTGAGACTG	"	"
CkpkstRNA 38s	TGATATGTTTCGCTCATCC	"	"
CkpkstRNA 39s	CTGTTGATGTTCAATGGG	"	"
CkpkstRNA 40s	GACGATAGTTAATGTCATGCTG	"	"
CkpkstRNA 41s	GGTTTCACGGTTTAATGG	"	"
CkpkstRNA 42s	GACGACAGTGACCATCAG	"	"
CkpkstRNA 43s	TTGCTTCGCGCTATATCC	"	"
CkpkstRNA 44s	GGTTAAGCGTGAACCTCAG	"	"
CkpkstRNA 45s	GACGAATGGTTGTTTCGAC	"	"
CkpkstRNA 46s	ACATACTCAATCTGTCCG	"	"
CkpkstRNA 47s	GGATCGTTGAAATAGCCT	"	"
CkpkstRNA 48s	GAAACCGGAACGTAAACC	"	"
CkpkstRNA 49s	CGAATAAGGTGATGTTAAGCAG	"	"
CkpkstRNA 50s	TTAACTGGTTCCATGCCG	"	"
CkpkstRNA 51s	ATGTTTCATCCAGCACCAG	"	"
CkpkstRNA 52s	CTGTCCCGATTTCTCTC	"	"
CkpkstRNA 53s	TGATGATGCTCAATAACCTG	"	"
CkpkstRNA 54s	CCTGTATCAACGGCTCTG	"	"
CkpkstRNA 55s	AAACTTACAGACCCGCAC	"	"
CkpkstRNA 56s	CATTCTCGATGAACCGAC	"	"
CkpkstRNA 57s	TGGCGATGCTGATTATGG	"	"
CkpkstRNA 58s	TGGTATTTAGGCAAAGGGT	"	"
CkpkstRNA 59s	ATTTAATGTCGGTTCGCCA	"	"
CkpkstRNA 60s	ATTGGCTTATACGGGTTATGG	"	"
CkpkstRNA 61s	TTGACCAGCAGATACAGAC	"	"
CkpkstRNA 62s	GCTGACTGGTATTAGTGG	"	"
CkpkstRNA 63s	CTGTTCGCTAATGTAGGTG	"	"
CkpkstRNA 64s	CTACCAATTGGCATTATTACGG	"	"

Tabelle 7.2: Oligonukleotide und deren Verwendungszwecke (Fortsetzung)

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Anwendung	Referenz
CkpkstRNA 65s	TGTAAGGAAAGAAGAACTGG	ICE <i>Ck1</i>	Diese
CkpkstRNA 66s	TATATCTGAGCCTCTGCC	Screening	Arbeit
CkpkstRNA 67s	TTATTCCGATCCTGTTGAG	"	"
CkpkstRNA 68s	ACAGCAGACTGAGATAGG	"	"
CkpkstRNA 69s	CTGATTTAGCGCATCAAGG	"	"
CkpkstRNA 70s	CCGCCTATAACAATGTATTCAC	"	"
CkpkstRNA 71s	GATTGTTCAAGCAAACCC	"	"
CkpkstRNA 72s	GCATTTTCATGCACCATCC	"	"
CkpkstRNA 73s	GGAAGCCGGTATTATTGC	"	"
CkpkstRNA 74s	CGATATTTTCGTGGAGGGT	"	"
CkpkstRNA 75s	ATACAGGCGAACCTATCG	"	"
CkpkstRNA 76s	TGAGTATCCGTCTTAATCCT	"	"
CkpkstRNA 77s	AGGTTATCAGAAGTTACGCA	"	"
CkpkstRNA 78s	GTGACAACACTTTCACCG	"	"
CkpkstRNA 79s	CACGGTACTGGGATTAGTG	"	"
CkpkstRNA 80s	CGTATCCTGCTTTATGCG	"	"
CkpkstRNA 81s	GGGTACGTTGATTAAGAAGG	"	"
CkpkstRNA 82s	GAGAAGTGAAATCGTTCC	"	"
CkpkstRNA 83s	GTTGAAGCCATTTGAAAGG	"	"
CkpkstRNA 84s	TTTCGCGGTAGATAAACCT	"	"
CkpkstRNA 85s	AAGTATCCTTCAGTTGGTGC	"	"
CkpkstRNA 86s	CTTAGTAATACTGGTGATGGAG	"	"
CkpkstRNA 87s	CGGTATGATTGACGATCAG	"	"
CkpkstRNA 88s	TGCACTGCTGGATATGAG	"	"
CkpkstRNA 89s	AAGAAATTCTCACCAGACAG	"	"
CkpkstRNA 90s	AAACAGAAATCGAAGCGC	"	"
CkpkstRNA 91s	ACTGGCAATGATCGATCC	"	"
CkpkstRNA 92s	CAGAGGAAGATTTAACAAGAGG	"	"
CkpkstRNA 93s	TCTGTAAACACATAGGCGA	"	"
CkpkstRNA 94s	CGGTTACGTCTTCATCTG	"	"
CkpkstRNA 95s	GACAATAGTACGCAGTTCCG	"	"
CkpkstRNA 96s	AAATAGCGACTATCAGCC	"	"
CkpkstRNA 97s	TTAACGGAGCCAGAATCC	"	"
CkpkstRNA 98s	ATTCCACGTAAATTTGCTG	"	"

Tabelle 7.2: Oligonukleotide und deren Verwendungszwecke (Fortsetzung)

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Anwendung	Referenz
CkpkstRNA 99s	TCATCAACGCCTGATGAC	ICE <i>Ck1</i>	Diese
CkpkstRNA 100s	CGTTATACTAACAATTCAGCGG	Screening	Arbeit
CkpkstRNA 101s	ATGTGATTGTTTCATGCTGG	"	"
CkpkstRNA 102s	TTCTCTTATTTGACAGCAGG	"	"
CkpkstRNA 1as	GAAGGCAACAAAGATGTCC	"	"
CkpkstRNA 2as	GATTTACTGGCTGATATCTC	"	"
CkpkstRNA 3as	GACTCCATGCGATGACTC	"	"
CkpkstRNA 4as	CAGAACTTAATGAAGCTGAC	"	"
CkpkstRNA 5as	CTGAGCCATTAAACACCC	"	"
CkpkstRNA 6as	GCCAGGTTATTGTTCTC	"	"
CkpkstRNA 7as	GGATTGATTTCGCACTTCTG	"	"
CkpkstRNA 8as	GACGACGAAGAGAAAGAC	"	"
CkpkstRNA 9as	AGTCTTTGATAACGATGAGG	"	"
CkpkstRNA 10as	TAATAGCTGAATCCCGCAC	"	"
CkpkstRNA 11as	GCACTTATGATTCTAGCGG	"	"
CkpkstRNA 12as	GAAATGAGCGTGAAAGCAG	"	"
CkpkstRNA 13as	GGCAGATACACCAAAGTC	"	"
CkpkstRNA 14as	TACTATCGGGTTATCAGTGG	"	"
CkpkstRNA 15as	CGGTACGCAATATTTCCG	"	"
CkpkstRNA 16as	GCTCTCCTGTTCTTACTTCC	"	"
CkpkstRNA 17as	TTGATCCCTGTACCAATCTG	"	"
CkpkstRNA 18as	CTCTTTAACAATATGGAGCGG	"	"
CkpkstRNA 19as	GTTAAGACCCACACCGAC	"	"
CkpkstRNA 20as	CCGATAAAGACGCAATGAG	"	"
CkpkstRNA 21as	GCACGTGAACTTAAATTCC	"	"
CkpkstRNA 22as	TACCACAACTATACTAGCC	"	"
CkpkstRNA 23as	TGATTGATACGCGCTATGG	"	"
CkpkstRNA 24as	GCAACAACAGCATTATTAC	"	"
CkpkstRNA 25as	CGCCAGTAAACAATCTTCC	"	"
CkpkstRNA 26as	ATCCGCATACCACTATTCTC	"	"
CkpkstRNA 27as	CAGGTCTGTCATCACTGG	"	"
CkpkstRNA 28as	CTTTCTCTGGTGACCTGG	"	"
CkpkstRNA 29as	CCGACAGTTGCTCTACTC	"	"
CkpkstRNA 30as	GAACATTTGACCAGCAG	"	"

Tabelle 7.2: Oligonukleotide und deren Verwendungszwecke (Fortsetzung)

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Anwendung	Referenz
CkpkstRNA 31as	GAGCCACTATTTACAGCAG	ICE <i>Ck1</i>	Diese
CkpkstRNA 32as	CGCAGTATCTGGAAACCT	Screening	Arbeit
CkpkstRNA 33as	GTTGAGGTGATCCGTGAG	"	"
CkpkstRNA 34as	GAGAAAGCATGGAACCAG	"	"
CkpkstRNA 35as	GGACGCTATCTTATTCTCTACTC	"	"
CkpkstRNA 36as	CGGAGAAAGTGATAGCGG	"	"
CkpkstRNA 37as	CCAATGCGTCTGTTTGAC	"	"
CkpkstRNA 38as	ATCAACTGGTACAACGCT	"	"
CkpkstRNA 39as	GGTATTTGCAGACGAAGAC	"	"
CkpkstRNA 40as	GCAAATTCCTCCCTTACTG	"	"
CkpkstRNA 41as	GCGTACAAACTCAACCTG	"	"
CkpkstRNA 42as	CTGAATCTGGTGCAACTG	"	"
CkpkstRNA 43as	CTCAGGAGGTTGAAACAC	"	"
CkpkstRNA 44as	CAGCAACTCTTATCAACTGG	"	"
CkpkstRNA 45as	CCTGGCCTTTAACCATCC	"	"
CkpkstRNA 46as	CGTCTATCTGGTCTAACG	"	"
CkpkstRNA 47as	GACATGCGTTATCAGTGG	"	"
CkpkstRNA 48as	CTACGTGAAGTCCGTAATACC	"	"
CkpkstRNA 49as	GCAGCAGTTACATGAAGAG	"	"
CkpkstRNA 50as	TAAGAATAAGATCGACTCCCAC	"	"
CkpkstRNA 51as	GTAATGAGAGGTGTTGAACG	"	"
CkpkstRNA 52as	GGATAATGAAAGCTCACCT	"	"
CkpkstRNA 53as	AACGCTGGAGATAAGCTG	"	"
CkpkstRNA 54as	GATAAACATCGCCATCGG	"	"
CkpkstRNA 55as	CCTGTCCCTCTTCTATCAC	"	"
CkpkstRNA 56as	TCAGCATTAAATACCAGCAG	"	"
CkpkstRNA 57as	CAAAGTTGAACCCGACCT	"	"
CkpkstRNA 58as	TAATCGCGTTCAGAGCAG	"	"
CkpkstRNA 59as	AGAACCCATTATTGGCGT	"	"
CkpkstRNA 60as	AATTGGTGGTCAAATCTGG	"	"
CkpkstRNA 61as	GTCTTGATGCCATATTTGCT	"	"
CkpkstRNA 62as	GTAGTTTGTAACAACGCC	"	"
CkpkstRNA 63as	TCGGTTGCTTTCATAATTGG	"	"
CkpkstRNA 64as	GATCAATCCATGAGAATCCC	"	"

Tabelle 7.2: Oligonukleotide und deren Verwendungszwecke (Fortsetzung)

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Anwendung	Referenz
CkpkstRNA 65as	TTCACCTAACGATTCTCC	ICE <i>Ck1</i>	Diese
CkpkstRNA 66as	TTTGTCTCGCTATATGGG	Screening	Arbeit
CkpkstRNA 67as	GGTTTCGGCTGTAATGTC	"	"
CkpkstRNA 68as	AGTGATGAGCGTAATTTTCAG	"	"
CkpkstRNA 69as	ATACTGATAACAGAAGCAGG	"	"
CkpkstRNA 70as	AGATTCTGTGAGGCAATGG	"	"
CkpkstRNA 71as	GATATGATTGTCCGCTATCTG	"	"
CkpkstRNA 72as	GTGCCTGTGTAAGAAGGT	"	"
CkpkstRNA 73as	TCCAGTAGCTTATGAATTCG	"	"
CkpkstRNA 74as	GGGCATAAGGTTTGTGG	"	"
CkpkstRNA 75as	AGATTCTGACCGTTAGCC	"	"
CkpkstRNA 76as	AAGTTTCACCGCTACCTC	"	"
CkpkstRNA 77as	ATAAAGCCAGTGACTIONCAACC	"	"
CkpkstRNA 78as	CTATTGAAGAAAGTCAGGCG	"	"
CkpkstRNA 79as	TTTCTCGTGCTGAAAGGT	"	"
CkpkstRNA 80as	CCTGTTATCTGATGTTGAAGG	"	"
CkpkstRNA 81as	CTGTTGTTTATCGTAACGG	"	"
CkpkstRNA 82as	GGTCATCACGACATTAC	"	"
CkpkstRNA 83as	GTTGATTTGAATTTCTCGCC	"	"
CkpkstRNA 84as	CCGACCATTGTAATCCCT	"	"
CkpkstRNA 85as	CGTTATCAAACAATTCAGGG	"	"
CkpkstRNA 86as	GCACGTTGAAATTTCTCAC	"	"
CkpkstRNA 87as	CGGATTATCTGTTGATGAC	"	"
CkpkstRNA 88as	AAGGACCATAATAGTTTCGAC	"	"
CkpkstRNA 89as	GCCAAGTTCATTCAATACGA	"	"
CkpkstRNA 90as	GACACTGAAGCAGTAATCG	"	"
CkpkstRNA 91as	AAGTTACTGATGATGCTGTC	"	"
CkpkstRNA 92as	CTTGATCGGTGGTAAGGG	"	"
CkpkstRNA 93as	GCAATAGCCGTAATACCCA	"	"
CkpkstRNA 94as	CCTGACGACATCAATGCT	"	"
CkpkstRNA 95as	CGCTTTATGGTTCATTTCTG	"	"
CkpkstRNA 96as	TGTCATGCACGACTACTC	"	"
CkpkstRNA 97as	CACCAACAATTCCGATCG	"	"
CkpkstRNA 98as	CAACTGGGATCTTGATAAGG	"	"

Tabelle 7.2: Oligonukleotide und deren Verwendungszwecke (Fortsetzung)

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Anwendung	Referenz
CkpkstRNA 99as	GCGCATGGCTTATATTCAC	ICE <i>Ck1</i>	Diese
CkpkstRNA 100as	TGAATATCAACCCGGTACAG	Screening	Arbeit
CkpkstRNA 101as	CGCAATGTGTAATACTTCC	"	"
CkpkstRNA 102as	CCTCGCCGACATATTCAG	"	"
MGH_nacp_rev	AGACCATCACCTCAGGCAAC	Verifizierung	Diese
MGH_shantip_ff	ATCGGTCTGCCGTTTATGAC	der chromo-	Arbeit
MG1655_mdcs_rev	TGGCGTAAAGCAGAGGAGAT	somalen	
MG1655_cbl_ff	GGTTGCGAATATGCTTTTTACC	Integrations-	
Kp_MGH_yeel_s	CATCTTTCGTCCACTGAGCA	stellen	
Kp_MGH_KPN_024 34_as	ACGTAGTTGCCCGTGATTTC		
int_IMI1023_v1.1_tR NA	ACCAGATCGGCATAAACAGG		
int_IMI1023_v1_non tRNA	TCGCAGGCTTCCAGAGTAGT		
CkpkstRNA2as_rc	GAGATATCAGCCAGTAAATC	Sequenz-	Diese
CkpkstRNA4s_rc	GTCATATTATCCCTGTTCGC	ierung von	Arbeit
CkpkstRNA6as_rc	GAGGAACAATAACCTGGC	PCR-	
CkpkstRNA27s_rc	ACCATCTCGGGCTATTAC	Produkten	
Frag5seq01	CTCCCTTTCAGCTTCCAGTG	des ICE <i>Ck1</i>	
Frag7seq01	GCGTTGATGGCTGGATAGAT	Screenings	
Frag24-26seq01	CGGGTGCCAAGTTCATAGTT		
Frag24-26seq02	CATCGACATACAGGGTGACG		
Frag24-26seq03	TTTCAATTCACCATTGTCGGTA		
CkFrag97s1	GTGGTCGTCCGTCTGATCTT		
CkFrag97as1	TCTTCGGTTCAAGTCCCAAC		
ICE <i>Ck1</i> _circ_01	AACTCTTACGTTTGGCATACCAGG	Nachweis	Diese
ICE <i>Ck1</i> _circ_02	CAAGCCCAGTTGATTAATGGTCG	zirkulärer	Arbeit
ICE <i>Ck1</i> _circ_03	CGTTATTGGAACCATCACCATAATT	Intermediate	
ICE <i>Ck1</i> _circ_04	CCTGTAGAGGTGGTGGTAATTTGC	des ICE <i>Ck1</i>	
ICE <i>Ck1</i> _circ_05	ACATGAGAAATAACGGAGGTTTCAGG	mittels PCR	
ICE <i>Ck1</i> _circ_06	TATTAGTACCTCGCGATCATCCCC		

Tabelle 7.2: Oligonukleotide und deren Verwendungszwecke (Fortsetzung)

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Anwendung	Referenz
CircNest_1.1	GAGAGCGTAGGTGAGCTGGT	Nachweis	Diese
CircNest_1.2	AAGCTATCGGCAAGCCCTAC	zirkulärer	Arbeit
CircNest_1.1'	GGCGCTGATGGTTTCAGTAT	Intermediate	
CircNest_1.2'	TTCACGCCAGAAAAGAACCT	des <i>ICECk1</i>	
CircNest_2.1	CCAGGCAGAGATTCAGCTTC	mittels	
CircNest_2.2	CGCAACTTGAGCGTGATAAA	Nested-PCR	
CircNest_2.1'	CGTTTATGCCGATTTGGTCT		
CircNest_2.2'	TTGATAACGGTGGGGAATGT		
CircNest_3.1	CTGCCTTTCGCCTTACTGAG		
CircNest_3.2	TTTTGGTTCTTCAGGCATCA		
CircNest_3.1'	TATCGCTGGGGATTAACGTC		
CircNest_3.2'	ACCACATGCAGTAGGGAAGC		
CircNest_4.1	GTTCTGCGACCATTTCTGT		
CircNest_4.2	AGCCCAACAATACGATCCTG		
CircNest_4.1'	GACAGGGAGATGGCTGGATA		
CircNest_4.2'	CAGCAGCACTGGCTACTGAG		
CircNest_5.1	TGACCGGAAAGATGTGATTG		
CircNest_5.2	GCTACCGATGTCGACGATTT		
CircNest_5.1'	CCAGCATTTTACGGACACCT		
CircNest_5.2'	CCGACGCTGATTTTTATGCT		
CircNest_6.1	TGCCAGTGAGCGTCTGAGTA		
CircNest_6.2	CGCTCTTCAGGGATTTGAAC		
CircNest_6.1'	GGTTGTTGCCGATATTGTT		
CircNest_6.2'	GGCTTCCATGAAGTGCTGAT		

7.3 Screening des Colibactin-Genclusters

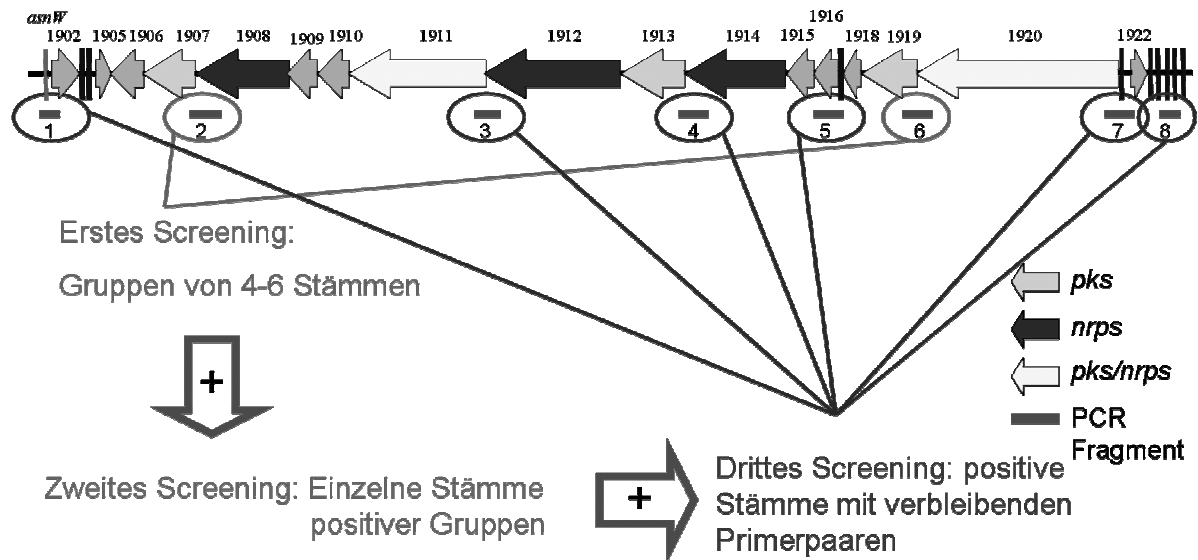


Abbildung 7.3: Screening-Strategie zum Nachweis des Colibactin-Genclusters.

Schematische Abbildung des Colibactin-Genclusters und der kodierten ORFs. Die mit Hilfe der Screening-Primer amplifizierte PCR-Fragmente sind durch grüne Balken dargestellt. Das PCR-Screening zur Detektion des Colibactin-Genclusters wurde folgendermaßen durchgeführt: Bakterienlysate von 4 bis 6 Bakterienstämmen wurden zunächst auf das Vorhandensein essentieller ORFs, die für Polyketidsynthasen (*pks*), nichtribosomale Peptidsynthasen (*nrps*) und Hybride derer kodieren, getestet. Im Fall eines positiven PCR-Ergebnisses wurden die entsprechenden Stämme einzeln getestet. Die daraufhin als positiv getesteten Stämme wurden mit den verbleibenden Primerpaaren überprüft.

7.4 Vergleichende Wachstumskurven verschiedener Mutanten von *Escherichia coli* Nissle 1917

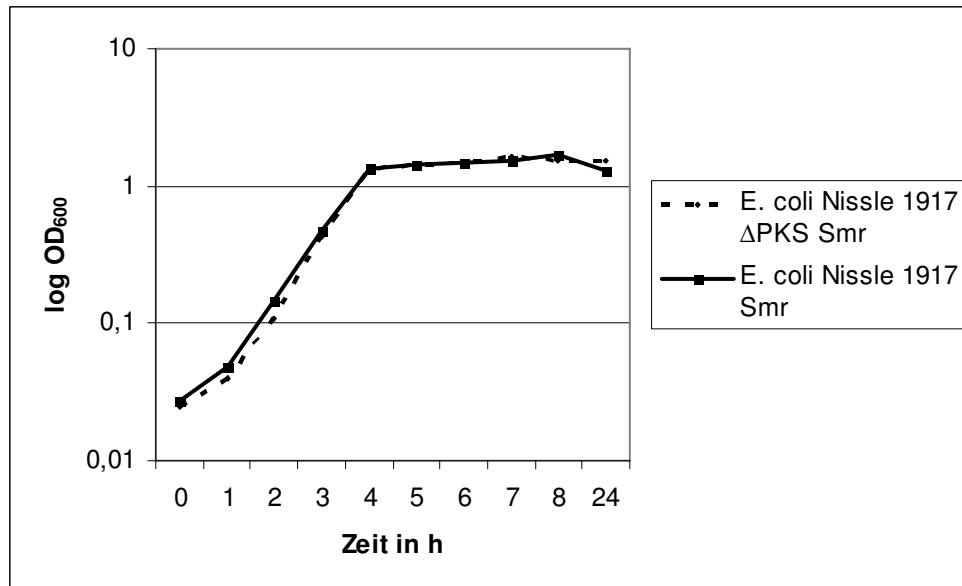


Abbildung 7.4.1: Vergleichende Wachstumskurven von *E. coli* Nissle 1917 Sm^r und *E. coli* Nissle 1917 Δ PKS Sm^r in LB-Medium mit 100 µg/ml Streptomycin. Vor der Verwendung von *E. coli* Nissle 1917 im murinen Intestinalmodell wurden die Mutanten *in vitro* auf unbeeinträchtigt Wachstum getestet. Anhand der Wachstumskurven ist erkenntlich, dass die beiden im nicht-kompetitiven Mausmodell verwendeten Stämme gleiches Wachstum unter Laborbedingungen zeigen. Quelle: Grit Krumbholz, persönlich

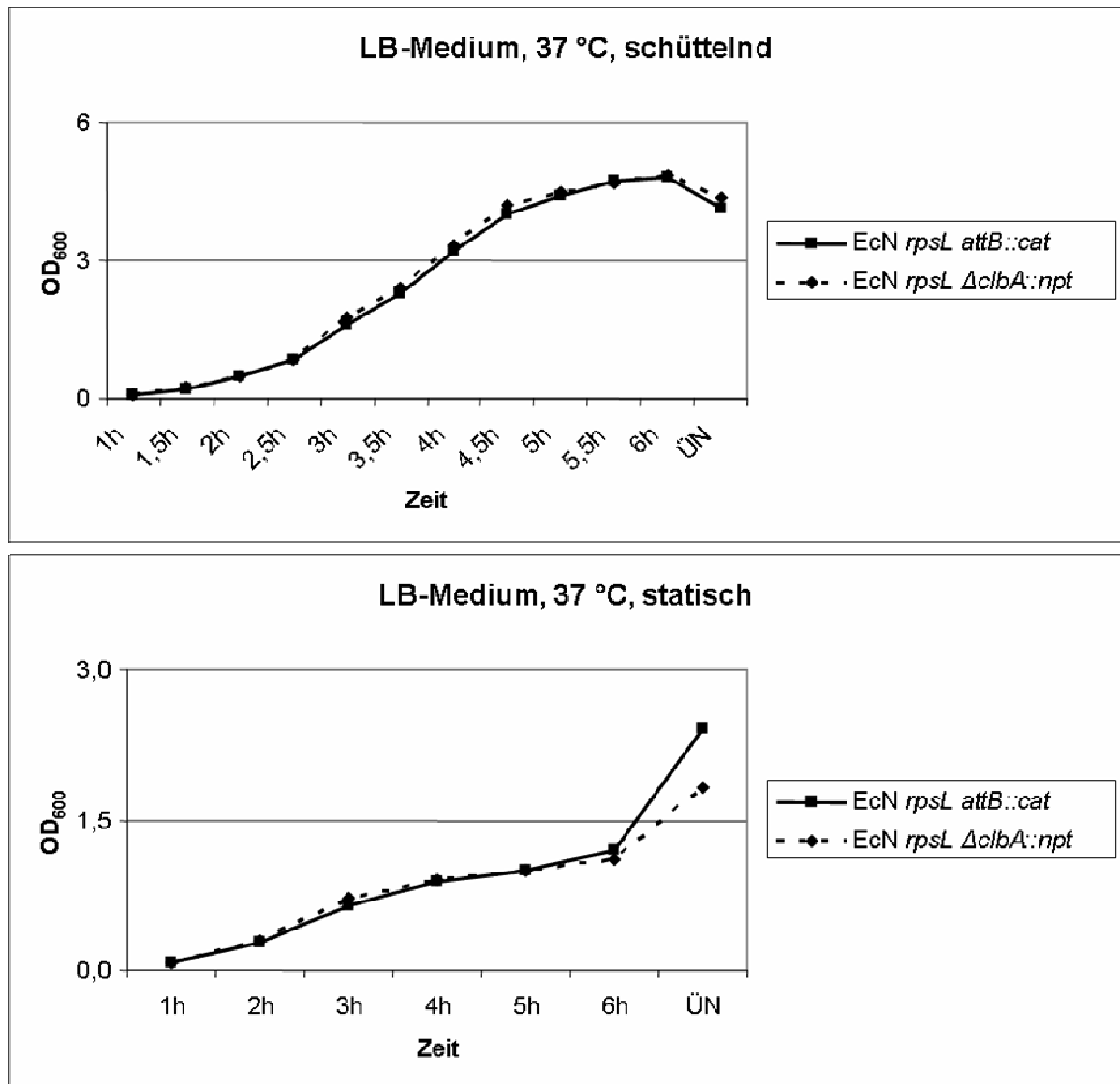


Abbildung 7.4.2: Vergleichende Wachstumskurven von *E. coli* Nissle 1917 *rpsL* K42R *attB::cat* und *E. coli* Nissle 1917 *rpsL* K42R *clbA::npt* in LB-Medium mit 100 µg/ml Streptomycin. Wachstum von *E. coli* Nissle 1917 Mutanten unter aeroben (schüttelnd) und anaeroben (statisch) Bedingungen vor Verwendung im kompetitiven murinen Intestinalmodell. Anhand der Wachstumskurven ist zu erkennen, dass sich die Wachstumskinetik beider Mutanten äquivalent verhält.

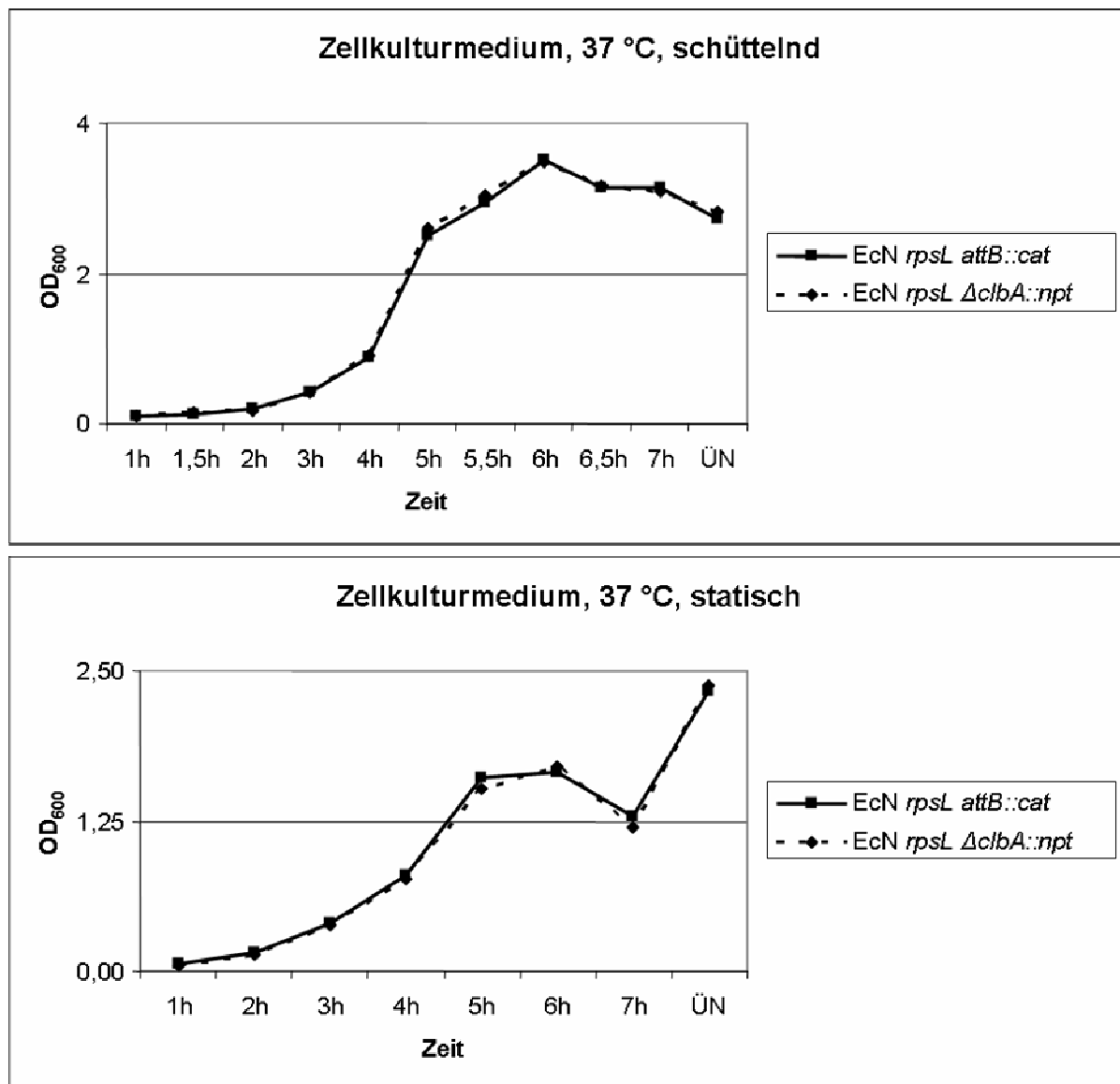


Abbildung 7.4.3: Vergleichende Wachstumskurven von *E. coli* Nissle 1917 *rpsL* K42R *attB::cat* und *E. coli* Nissle 1917 *rpsL* K42R *clbA::npt* in Zellkulturmedium mit 100 µg/ml Streptomycin. Wachstum von *E. coli* Nissle 1917 Mutanten unter aeroben (schüttelnd) und anaeroben (statisch) Bedingungen vor Verwendung im kompetitiven murinen Intestinalmodell. Anhand der Wachstumskurven ist zu erkennen, dass sich die Wachstumskinetik beider Mutanten äquivalent verhält.

7.5 Colibactin-Gencluster-Screening: Übersicht der untersuchten Bakterienstämme

Tabelle 7.5: Auf die Präsenz des Colibactin-Genclusters untersuchte Bakterienstämme

Bakterienstamm	Beschreibung	Colibactin-Gencluster	Quelle/Referenz
„Maria Souladaki“ 1/01	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/02	Fäkalisolat	+	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/03	Fäkalisolat	+	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/04	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/05	Fäkalisolat	+	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/06	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/08	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/09	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/10	Fäkalisolat	+	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/11	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/12	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/13	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/14	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/15	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/16	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/17	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/18	Fäkalisolat	+	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/19	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/20	Fäkalisolat	+	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/21	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/22	Fäkalisolat	+	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/23	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/24	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/25	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/26	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/27	Fäkalisolat	+	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/28	Fäkalisolat	-	IMIB ¹

Tabelle 7.5: Auf die Präsenz des Colibactin-Genclusters untersuchte Bakterienstämme (Fortsetzung)

Bakterienstamm	Beschreibung	Colibactin-Gencluster	Quelle/Referenz
„Maria Souladaki“ 1/29	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/30	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/31	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/32	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/33	Fäkalisolat	+	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/34	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/35	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/36	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/37	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/38	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/39	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/40	Fäkalisolat	+	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/41	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/42	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/43	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/44	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/45	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/46	Fäkalisolat	+	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/47	Fäkalisolat	+	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/48	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 1/49	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/01	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/02	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/03	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/04	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/05	Fäkalisolat	+	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/06	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/07	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/08	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/09	Fäkalisolat	-	IMIB ¹

Tabelle 7.5: Auf die Präsenz des Colibactin-Genclusters untersuchte Bakterienstämme (Fortsetzung)

Bakterienstamm	Beschreibung	Colibactin-Gencluster	Quelle/Referenz
„Maria Souladaki“ 2/10	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/11	Fäkalisolat	+	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/12	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/13	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/14	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/16	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/17	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/18	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/19	Fäkalisolat	+	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/20	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/21	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/22	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/23	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/24	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/25	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/26	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/27	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/28	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/29	Fäkalisolat	+	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/30	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/31	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/32	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/33	Fäkalisolat	+	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/34	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/35	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/36	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/37	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/38	Fäkalisolat	+	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/39	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/40	Fäkalisolat	-	IMIB ¹

Tabelle 7.5: Auf die Präsenz des Colibactin-Genclusters untersuchte Bakterienstämme (Fortsetzung)

Bakterienstamm	Beschreibung	Colibactin-Gencluster	Quelle/Referenz
„Maria Souladaki“ 2/41	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/42	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/43	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/44	Fäkalisolat	+	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/45	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/46	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/47	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/48	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 2/49	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/01	Fäkalisolat	+	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/02	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/03	Fäkalisolat	+	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/04	Fäkalisolat	+	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/05	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/06	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/07	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/08	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/09	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/10	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/11	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/12	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/13	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/14	Fäkalisolat	+	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/15	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/16	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/17	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/18	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/19	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/20	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/21	Fäkalisolat	-	IMIB ¹

Tabelle 7.5: Auf die Präsenz des Colibactin-Genclusters untersuchte Bakterienstämme (Fortsetzung)

Bakterienstamm	Beschreibung	Colibactin-Gencluster	Quelle/Referenz
„Maria Souladaki“ 3/22	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/23	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/24	Fäkalisolat	+	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/25	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/26	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/27	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/28	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/29	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/30	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/31	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/32	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/33	Fäkalisolat	+	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/34	Fäkalisolat	+	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/36	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/37	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/38	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/39	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
„Maria Souladaki“ 3/40	Fäkalisolat	-	IMIB ¹
<i>Citrobacter freundii</i> 3056	Harnwegsisolat	-	IMIB ¹
<i>Citrobacter freundii</i> 7004	keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Citrobacter freundii</i> 7014	keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Citrobacter freundii</i> CA 31	CoIA	-	IMIB ¹
<i>Citrobacter koseri</i> Frederiksen (ATCC BAA-895)	Patientenisolat, vollständig sequenziert (CP000822)	+	ATCC/IMIB ¹
<i>Enterobacter aerogenes</i> 20	Keine Angaben	+	IMIB ¹

Tabelle 7.5: Auf die Präsenz des Colibactin-Genclusters untersuchte Bakterienstämme (Fortsetzung)

Bakterienstamm	Beschreibung	Colibactin-Gencluster	Quelle/Referenz
<i>Enterobacter aerogenes</i> 50	Keine Angaben	+	IMIB ¹
<i>Enterobacter aerogenes</i> 64	Keine Angaben	+	IMIB ¹
<i>Enterobacter cloacae</i> 5458	Cloacin DF13	-	IMIB ¹
<i>Erwinia herbicola</i> K4	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Escherichia coli</i> 5159/91 O157:H7	EHEC (O157:H7)	-	IMIB ¹
<i>Escherichia coli</i> 0653/99	EHEC O128	-	IMIB ¹
<i>Escherichia coli</i> 1303	Mastitis-Isolat	-	IMIB ¹
<i>Escherichia coli</i> 312-00	EPEC ECOR-B2	-	IMIB ¹
<i>Escherichia coli</i> 4471-03	UPEC-Isolat, ECOR-B2	+	IMIB ¹
<i>Escherichia coli</i> 4483-03	UPEC-Isolat, ST73, ECOR-B2	+	IMIB ¹
<i>Escherichia coli</i> 4526-03	UPEC-Isolat, ECOR-B2	+	IMIB ¹
<i>Escherichia coli</i> 4736/98	EHEC O128	-	IMIB ¹
<i>Escherichia coli</i> 4789/97	EHEC O96:H-	-	IMIB ¹
<i>Escherichia coli</i> 549-00	EPEC ECOR-B2	-	IMIB ¹
<i>Escherichia coli</i> DH5 α pILL600	K-12-Isolat	-	IMIB ¹
<i>Escherichia coli</i> E32511	EHEC (O157:H7)	-	IMIB ¹
<i>Escherichia coli</i> ED147	EHEC (O26:H11)	-	IMIB ¹
<i>Escherichia coli</i> IHIT 0304	EPEC ECOR-B2	-	IMIB ¹
<i>Escherichia coli</i> IHIT Z311-94	EPEC ECOR-B2	-	IMIB ¹
<i>Escherichia coli</i> IHIT Z412-94	EPEC ECOR-B2	-	IMIB ¹

Tabelle 7.5: Auf die Präsenz des Colibactin-Genclusters untersuchte Bakterienstämme (Fortsetzung)

Bakterienstamm	Beschreibung	Colibactin-Gencluster	Quelle/Referenz
<i>Escherichia coli</i> TA024	Beutelteufel-Isolat (Australien)	-	IMIB ¹
<i>Escherichia coli</i> TA083	Beutelmarder-Isolat (Australien)	-	IMIB ¹
<i>Escherichia coli</i> TA109	Buschratten-Isolat (Australien)	-	IMIB ¹
<i>Escherichia coli</i> TA349	Fledermaus-Isolat (Australien)	-	IMIB ¹
<i>Escherichia coli</i> U12633	Urinisolat, ESBL+, ECOR-B1, O153:H31	+	IMIB ¹
<i>Escherichia coli</i> U15156	Urinisolat, ESBL+, ECOR-B1, O153:H31	+	IMIB ¹
<i>Escherichia coli</i> U19010	Urinisolat, ESBL+, ECOR-B1, O153:H31, ST101	+	IMIB ¹
<i>Escherichia coli</i> W36	Papageien-Isolat (Deutschland)	-	IMIB ¹
<i>Escherichia coli</i> W4	Tauben-Isolat (Deutschland)	-	IMIB ¹
<i>Escherichia coli</i> W45	Hunde-Isolat (Deutschland)	-	IMIB ¹
<i>Escherichia fergusonii</i> (Murray collection no. 693)	Keine Angabe	-	IMIB ¹
<i>Escherichia hermannii</i> (Murray collection no. 634)	Keine Angabe	-	IMIB ¹
<i>Klebsiella</i> BR13V3 (Newcastle, emdh positiv)	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Klebsiella</i> BR17V2 (Newcastle, emdh positiv)	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Klebsiella</i> BR21V1 (Newcastle, emdh positiv)	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Klebsiella</i> BR21V2 (Newcastle, emdh positiv)	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Klebsiella</i> BR21V3 (Newcastle)	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Klebsiella edwardsii</i>	Keine Angaben	-	IMIB ¹

Tabelle 7.5: Auf die Präsenz des Colibactin-Genclusters untersuchte Bakterienstämme (Fortsetzung)

Bakterienstamm	Beschreibung	Colibactin-Gencluster	Quelle/Referenz
<i>Klebsiella oxytoca</i> 407	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella oxytoca</i> 476	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella oxytoca</i> 504	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella oxytoca</i> 506	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella oxytoca</i> 514	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella oxytoca</i> CF17	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella oxytoca</i> ESBL 19	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella oxytoca</i> ESBL 21	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella oxytoca</i> ESBL 23	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella oxytoca</i> ESBL 24	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella oxytoca</i> ESBL 28	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella oxytoca</i> ESBL 30	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella oxytoca</i> ESBL 33	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella oxytoca</i> ESBL 35	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella oxytoca</i> ESBL 36	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella oxytoca</i> U 01	Umweltisolat (Gewässer)	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella oxytoca</i> U 07	Umweltisolat (Gewässer)	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella oxytoca</i> U 08	Umweltisolat (Gewässer)	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella oxytoca</i> U 19	Umweltisolat (Gewässer)	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella oxytoca</i> U 28	Umweltisolat (Gewässer)	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella oxytoca</i> U 32	Umweltisolat (Gewässer)	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella oxytoca</i> U 35	Umweltisolat (Gewässer)	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella oxytoca</i> U 39	Umweltisolat (Gewässer)	-	Universität Kiel ³

Tabelle 7.5: Auf die Präsenz des Colibactin-Genclusters untersuchte Bakterienstämme (Fortsetzung)

Bakterienstamm	Beschreibung	Colibactin-Gencluster	Quelle/Referenz
<i>Klebsiella oxytoca</i> U 42	Umweltisolat (Gewässer)	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella oxytoca</i> Va 1619	Patientenisolat: Trachealsekret TS	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella oxytoca</i> Va 16391	Patientenisolat: Trachealsekret TS	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella oxytoca</i> Va 16804	Patientenisolat: Abstrich Bindehaut	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella oxytoca</i> Va 17952	Patientenisolat: Abstrich Fuß	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella ozaenae</i> SB3464	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Klebsiella planticola</i> 456	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella planticola</i> 548	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella planticola</i> 554	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella planticola</i> P3	Abwasserisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella planticola</i> U 12	Umweltisolat (Gewässer)	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella planticola</i> U 14	Umweltisolat (Gewässer)	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella planticola</i> U 17	Umweltisolat (Gewässer)	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella planticola</i> U 22	Umweltisolat (Gewässer)	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella planticola</i> U 24	Umweltisolat (Gewässer)	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella planticola</i> U 30	Umweltisolat (Gewässer)	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella planticola</i> U 33	Umweltisolat (Gewässer)	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 3091	Keine Angaben	-	IMIB ¹

Tabelle 7.5: Auf die Präsenz des Colibactin-Genclusters untersuchte Bakterienstämme (Fortsetzung)

Bakterienstamm	Beschreibung	Colibactin-Gencluster	Quelle/Referenz
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 375	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 41	Patientenisolat	+	IMIB ¹
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 625	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CF 1	Patientenisolat	+	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CF 2	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CF 21	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CF 22	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CF 3	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CF 4	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CF 44	Patientenisolat	+	IMIB ¹
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CF 5	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CF 6	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CF 7	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CF 9	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella pneumoniae</i> E492	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Klebsiella pneumoniae</i> Kp110	Avirulentes Derivat von <i>K. pneumoniae</i> Kp52145	+	IMIB ¹
<i>Klebsiella pneumoniae</i> Kp52145	pathogenes Isolat	+	IMIB ¹
<i>Klebsiella pneumoniae</i> MGH78578	Patientenisolat, vollständig sequenziert	--	IMIB ¹

Tabelle 7.5: Auf die Präsenz des Colibactin-Genclusters untersuchte Bakterienstämme (Fortsetzung)

Bakterienstamm	Beschreibung	Colibactin-Gencluster	Quelle/Referenz
<i>Klebsiella pneumoniae</i> MGW 78576	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Klebsiella pneumoniae</i> SB3431	pathogenes Isolat (Asien)	+	IMIB ¹
<i>Klebsiella</i> <i>rhinoscleromatis</i> SB3432	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Klebsiella</i> sp.	Keine Angaben	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella</i> sp. Bk 1658	Patientenisolat: Blutkultur	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella</i> sp. Bk 2150	Patientenisolat: Blutkultur	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella</i> sp. Bk 317	Patientenisolat: Blutkultur	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella</i> sp. Bk 5951	Patientenisolat: Blutkultur	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella</i> sp. Bk 6358	Patientenisolat: Blutkultur	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella</i> sp. Bk 6672	Patientenisolat: Blutkultur	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella</i> sp. BK098/2	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Klebsiella</i> sp. Stamm 23	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Klebsiella</i> sp. U 047	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Klebsiella</i> sp. U 21	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Klebsiella</i> sp. U 26	Keine Angaben	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella</i> sp. U 27	Keine Angaben	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella</i> sp. U 58	Keine Angaben	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella</i> sp. U 58	Keine Angaben	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella</i> sp. U 983	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Klebsiella</i> sp. Va 10399	Patientenisolat: Abstrich Dekubitus	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella</i> sp. Va 11263	Patientenisolat: Abstrich Wunde Bauch	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella</i> sp. Va 11339	Patientenisolat: Abszeß	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella</i> sp. Va 1137	Patientenisolat: Bronchoalveoläre Lavage BAL	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella</i> sp. Va 11637	Patientenisolat: Trachealsekret (TS)	-	Universität Kiel ³

Tabelle 7.5: Auf die Präsenz des Colibactin-Genclusters untersuchte Bakterienstämme (Fortsetzung)

Bakterienstamm	Beschreibung	Colibactin-Gencluster	Quelle/Referenz
<i>Klebsiella sp.</i> Va 12094	Patientenisolat: Abstrich Wunde	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella sp.</i> Va 12103	Patientenisolat: Punktat Kniegelenk	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella sp.</i> Va 12938	Patientenisolat: Trachealsekret TS	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella sp.</i> Va 12973	Patientenisolat: Abstrich Gallenblase	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella sp.</i> Va 13199	Patientenisolat: Abszeß	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella sp.</i> Va 13251	Patientenisolat: Bronchoalveoläre Lavage (BAL)	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella sp.</i> Va 13334	Patientenisolat: Abstrich Bauch	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella sp.</i> Va 13411	Patientenisolat: Pus	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella sp.</i> Va 13613	Patientenisolat: Galle	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella sp.</i> Va 1428	Patientenisolat: Abstrich Wunde Hals	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella sp.</i> Va 15485	Patientenisolat: Abstrich Gallenblase	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella sp.</i> Va 1661	Patientenisolat: Trachealsekret (TS)	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella sp.</i> Va 16678	Patientenisolat: Abstrich Gallengang	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella sp.</i> Va 1771	Patientenisolat: Sputum	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella sp.</i> Va 18495	Patientenisolat: Punktat Pankreas	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella sp.</i> Va 18606	Patientenisolat: Abszeß	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella sp.</i> Va 19931	Patientenisolat: Abstrich Gehörgang	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella sp.</i> Va 20586	Patientenisolat: Trachealsekret TS	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella sp.</i> Va 20803	Patientenisolat: Abstrich Gallengang	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella sp.</i> Va 21065	Patientenisolat: ZVK-spitze	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella sp.</i> Va 21097	Patientenisolat: interabd. Abstrich	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella sp.</i> Va 21612	Patientenisolat: Trachealsekret TS	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella sp.</i> Va 22437	Patientenisolat: Trachealsekret TS	-	Universität Kiel ³

Tabelle 7.5: Auf die Präsenz des Colibactin-Genclusters untersuchte Bakterienstämme (Fortsetzung)

Bakterienstamm	Beschreibung	Colibactin-Gencluster	Quelle/Referenz
<i>Klebsiella sp.</i> Va 22965	Patientenisolat: Abstrich Gallengang	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella sp.</i> Va 23162	Patientenisolat: Trachealsekret TS	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella sp.</i> Va 3425	Patientenisolat: Abstrich Bauchhöhle	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella sp.</i> Va 8165	Patientenisolat: Trachealsekret TS	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella sp.</i> Va 8169	Patientenisolat: Trachealsekret TS	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella sp.</i> Va 8577	Patientenisolat: Abstrich Wunde Zeh	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella sp.</i> Va 8597	Patientenisolat: Abstrich Femur	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella sp.</i> Va 9684	Patientenisolat: Abstrich Unterbauch	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella sp.</i> Va 9687	Patientenisolat: Abstrich Fuß	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella sp.</i> Va 9959	Patientenisolat: ZVK-spitze	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella terrigena</i> T 56	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella terrigena</i> T 58	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella terrigena</i> T 59	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella terrigena</i> T 62	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella terrigena</i> T 63	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella terrigena</i> T 67	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella terrigena</i> T 68	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella terrigena</i> T 71	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella terrigena</i> T 72	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella terrigena</i> T 74	Patientenisolat	-	Universität Kiel ³

Tabelle 7.5: Auf die Präsenz des Colibactin-Genclusters untersuchte Bakterienstämme (Fortsetzung)

Bakterienstamm	Beschreibung	Colibactin-Gencluster	Quelle/Referenz
<i>Klebsiella terrigena</i> U 10	Umweltisolat (Gewässer)	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella terrigena</i> U 11	Umweltisolat (Gewässer)	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella terrigena</i> U 15	Umweltisolat (Gewässer)	-	Universität Kiel ³
<i>Klebsiella terrigena</i> U 23	Umweltisolat (Gewässer)	-	Universität Kiel ³
<i>Pantoea agglomerans</i> 1213	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Pantoea agglomerans</i> 1214	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Photorhabdus lumineszens</i> subspezies <i>akhurstii</i>	keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Photorhabdus lumineszens</i> TT01 subspezies <i>laumondii</i>	keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Proteus mirabilis</i> 30337	Harnwegsinfektion-Isolat	-	Universität Pécs, Levente Emödy
<i>Proteus mirabilis</i> 30568	Harnwegsinfektion-Isolat	-	Universität Pécs, Levente Emödy
<i>Proteus mirabilis</i> 30574	Harnwegsinfektion-Isolat	-	Universität Pécs, Levente Emödy
<i>Proteus mirabilis</i> 30578	Harnwegsinfektion-Isolat	-	Universität Pécs, Levente Emödy
<i>Proteus mirabilis</i> 30718	Harnwegsinfektion-Isolat	-	Universität Pécs, Levente Emödy
<i>Proteus mirabilis</i> 30994	Trachea-Isolat	-	Universität Pécs, Levente Emödy
<i>Proteus mirabilis</i> 31244	Harnwegsinfektion-Isolat	-	Universität Pécs, Levente Emödy
<i>Proteus mirabilis</i> 31287	Rachenisolat	-	Universität Pécs, Levente Emödy
<i>Proteus mirabilis</i> 731	Harnwegsinfektion-Isolat	-	Universität Pécs, Levente Emödy

Tabelle 7.5: Auf die Präsenz des Colibactin-Genclusters untersuchte Bakterienstämme (Fortsetzung)

Bakterienstamm	Beschreibung	Colibactin-Gencluster	Quelle/Referenz
<i>Proteus mirabilis</i> Nr. 1	Keine Angabe	-	Universität Pécs, Levente Emödy
<i>Proteus mirabilis</i> Nr. 102	Keine Angabe	-	Universität Pécs, Levente Emödy
<i>Proteus mirabilis</i> Nr. 3076	Keine Angabe	-	Universität Pécs, Levente Emödy
<i>Proteus mirabilis</i> U6450	Harnwegsinfektion-Isolat	-	Universität Pécs, Levente Emödy
<i>Proteus morganii</i> 227	Fäkalisolat	-	Universität Pécs, Levente Emödy
<i>Proteus morganii</i> 227 <i>hly</i> ⁻	Hämolysin-negative Spontanmutante von <i>Proteus morganii</i> 227	-	Universität Pécs, Levente Emödy
<i>Proteus morganii</i> 290	Fäkalisolat	-	Universität Pécs, Levente Emödy
<i>Proteus morganii</i> 290 <i>hly</i> ⁻	Hämolysin-negative Spontanmutante von <i>Proteus morganii</i> 290	-	Universität Pécs, Levente Emödy
<i>Proteus morganii</i> 30399	Harnwegsinfektion-Isolat	-	Universität Pécs, Levente Emödy
<i>Proteus morganii</i> 31145	Harnwegsinfektion-Isolat	-	Universität Pécs, Levente Emödy
<i>Proteus penneri</i> 05665V	Urinisolat (Großbritannien)	-	Universität Pécs, Levente Emödy
<i>Proteus penneri</i> 16803Z	Urinisolat (Großbritannien)	-	Universität Pécs, Levente Emödy
<i>Proteus penneri</i> 357	Wundisolat (Ungarn)	-	Universität Pécs, Levente Emödy
<i>Proteus penneri</i> 357 <i>hly</i> ⁻	Hämolysin-negative Spontanmutante von <i>Proteus penneri</i> 357	-	Universität Pécs, Levente Emödy
<i>Proteus penneri</i> 357/Sp	Hämolysin-negative Spontanmutante von <i>Proteus penneri</i> 357	-	Universität Pécs, Levente Emödy
<i>Proteus penneri</i> E100	Fäkalisolat (Deutschland)	-	Universität Pécs, Levente Emödy

Tabelle 7.5: Auf die Präsenz des Colibactin-Genclusters untersuchte Bakterienstämme (Fortsetzung)

Bakterienstamm	Beschreibung	Colibactin-Gencluster	Quelle/Referenz
<i>Proteus penneri</i> E1125	Fäkalisolat (Deutschland)	-	Universität Pécs, Levente Emödy
<i>Proteus penneri</i> E1152	Fäkalisolat (Deutschland)	-	Universität Pécs, Levente Emödy
<i>Proteus penneri</i> E1263	Fäkalisolat (Deutschland)	-	Universität Pécs, Levente Emödy
<i>Proteus penneri</i> E180	Fäkalisolat (Deutschland)	-	Universität Pécs, Levente Emödy
<i>Proteus penneri</i> E46	Fäkalisolat (Deutschland)	-	Universität Pécs, Levente Emödy
<i>Proteus penneri</i> E587	Fäkalisolat (Deutschland)	-	Universität Pécs, Levente Emödy
<i>Proteus penneri</i> H1209	Fäkalisolat (Deutschland)	-	Universität Pécs, Levente Emödy
<i>Proteus penneri</i> H1360	Fäkalisolat (Deutschland)	-	Universität Pécs, Levente Emödy
<i>Proteus penneri</i> T77	Wundisolat (Türkei)	-	Universität Pécs, Levente Emödy
<i>Proteus sp.</i> UP4460	Keine Angaben	-	Universität Pécs, Levente Emödy
<i>Proteus</i> U007/1	Keine Angabe	-	Universität Pécs, Levente Emödy
<i>Providencia sp.</i> 116	CSF	-	Universität Pécs, Levente Emödy
<i>Salmonella</i> SARC 1	<i>Salmonella</i> Referenz Sammlung	-	Boyd <i>et al.</i> 1996
<i>Salmonella</i> SARC 10	<i>Salmonella</i> Referenz Sammlung	-	(Boyd, 1996)
<i>Salmonella</i> SARC 11	<i>Salmonella</i> Referenz Sammlung	-	Boyd <i>et al.</i> 1996
<i>Salmonella</i> SARC 12	<i>Salmonella</i> Referenz Sammlung	-	Boyd <i>et al.</i> 1996
<i>Salmonella</i> SARC 13	<i>Salmonella</i> Referenz Sammlung	-	Boyd <i>et al.</i> 1996
<i>Salmonella</i> SARC 14	<i>Salmonella</i> Referenz Sammlung	-	Boyd <i>et al.</i> 1996
<i>Salmonella</i> SARC 15	<i>Salmonella</i> Referenz Sammlung	-	Boyd <i>et al.</i> 1996
<i>Salmonella</i> SARC 16	<i>Salmonella</i> Referenz Sammlung	-	Boyd <i>et al.</i> 1996
<i>Salmonella</i> SARC 2	<i>Salmonella</i> Referenz Sammlung	-	Boyd <i>et al.</i> 1996
<i>Salmonella</i> SARC 3	<i>Salmonella</i> Referenz Sammlung	-	Boyd <i>et al.</i> 1996

Tabelle 7.5: Auf die Präsenz des Colibactin-Genclusters untersuchte Bakterienstämme (Fortsetzung)

Bakterienstamm	Beschreibung	Colibactin-Gencluster	Quelle/Referenz
<i>Salmonella</i> SARC 4	<i>Salmonella</i> Referenz Sammlung	-	Boyd <i>et al.</i> 1996
<i>Salmonella</i> SARC 5	<i>Salmonella</i> Referenz Sammlung	-	Boyd <i>et al.</i> 1996
<i>Salmonella</i> SARC 6	<i>Salmonella</i> Referenz Sammlung	-	Boyd <i>et al.</i> 1996
<i>Salmonella</i> SARC 7	<i>Salmonella</i> Referenz Sammlung	-	Boyd <i>et al.</i> 1996
<i>Salmonella</i> SARC 8	<i>Salmonella</i> Referenz Sammlung	-	Boyd <i>et al.</i> 1996
<i>Salmonella</i> SARC 9	<i>Salmonella</i> Referenz Sammlung	-	Boyd <i>et al.</i> 1996
<i>Serratia ficaria</i> G 4028	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Serratia forticola</i> 5680	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Serratia forticola</i> NC 12147	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Serratia grimesii</i> 4474	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Serratia grimesii</i> G 3893	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Serratia kiliensis</i> ATCC 7462	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Serratia liquefaciens</i> G 3634	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Serratia liquefaciens</i> G 866	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Serratia marcescens</i> CDS O4:H4	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Serratia marinor</i> NC 10912	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Serratia odorifera</i> 679	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Serratia odorifera</i> NC 11214	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Serratia plymuth.</i> 5530	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Serratia proteama</i> G 3706	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Serratia proteama</i> NC 11544	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Serratia rubidea</i> 5961	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Serratia rubidea</i> G 864	Keine Angaben	-	IMIB ¹

Tabelle 7.5: Auf die Präsenz des Colibactin-Genclusters untersuchte Bakterienstämme (Fortsetzung)

Bakterienstamm	Beschreibung	Colibactin-Gencluster	Quelle/Referenz
<i>Shigella boydii</i> Typ 2 Stamm 01/01292	Keine Angabe	-	IMIB ¹
<i>Shigella boydii</i> Typ 5 Stamm 01/10761	Keine Angabe	-	IMIB ¹
<i>Shigella dysenteriae</i> Typ 1 Stamm 00/02085	Keine Angabe	-	IMIB ¹
<i>Shigella dysenteriae</i> Typ 2 Stamm 00/04776	Keine Angabe	-	IMIB ¹
<i>Shigella dysenteriae</i> Typ 3 Stamm 00/02612	Keine Angabe	-	IMIB ¹
<i>Shigella dysenteriae</i> Typ 3 Stamm 00/08376	Keine Angabe	-	IMIB ¹
<i>Shigella flexneri</i> Stamm 2a	Keine Angabe	-	IMIB ¹
<i>Shigella flexneri</i> Stamm M90T	Keine Angabe	-	IMIB ¹
<i>Shigella sonnei</i> LT65 Stamm 16169/97	Keine Angabe	-	IMIB ¹
<i>Shigella sonnei</i> Stamm LT12	Keine Angabe	-	IMIB ¹
Uli 1258	Mastitis-Isolat	-	Lothar Wieler ²
Uli 1259	Mastitis-Isolat	-	W. Petzl, Schleißheim
Uli 1260	Mastitis-Isolat	-	W. Petzl, Schleißheim
Uli 1261	Mastitis-Isolat	-	W. Petzl, Schleißheim
Uli 1262	Mastitis-Isolat	-	W. Petzl, Schleißheim
Uli 1263	Mastitis-Isolat	-	W. Petzl, Schleißheim
Uli 1264	Mastitis-Isolat	-	W. Petzl, Schleißheim
Uli 1265	Mastitis-Isolat	-	W. Petzl, Schleißheim
Uli 1266	Mastitis-Isolat	-	W. Petzl, Schleißheim
Uli 1267	Mastitis-Isolat	-	W. Petzl, Schleißheim
Uli 1268	Mastitis-Isolat	-	W. Petzl, Schleißheim
Uli 1269	Mastitis-Isolat	-	W. Petzl, Schleißheim
Uli 1270	Mastitis-Isolat	-	W. Petzl, Schleißheim

Tabelle 7.5: Auf die Präsenz des Colibactin-Genclusters untersuchte Bakterienstämme (Fortsetzung)

Bakterienstamm	Beschreibung	Colibactin-Gencluster	Quelle/Referenz
Uli 907	Mastitis-Isolat	-	Lothar Wieler ²
Uli 908	Mastitis-Isolat	-	Lothar Wieler ²
Uli 909	Mastitis-Isolat	-	Lothar Wieler ²
Uli 910	Mastitis-Isolat	-	Lothar Wieler ²
Uli 911	Mastitis-Isolat	-	Lothar Wieler ²
Uli 912	Mastitis-Isolat	-	Lothar Wieler ²
Uli 913	Mastitis-Isolat	-	Lothar Wieler ²
Uli 914	Mastitis-Isolat	-	Lothar Wieler ²
Uli 915	Mastitis-Isolat	-	Lothar Wieler ²
Uli 916	Mastitis-Isolat	-	Lothar Wieler ²
Uli 917	Mastitis-Isolat	-	Lothar Wieler ²
Uli 918	Mastitis-Isolat	-	Lothar Wieler ²
Uli 919	Mastitis-Isolat	-	Lothar Wieler ²
Uli 920	Mastitis-Isolat	-	Lothar Wieler ²
Uli 921	Mastitis-Isolat	-	Lothar Wieler ²
Uli 922	Mastitis-Isolat	-	Lothar Wieler ²
Uli 923	Mastitis-Isolat	-	Lothar Wieler ²
Uli 924	Mastitis-Isolat	-	Lothar Wieler ²
Uli 925	Mastitis-Isolat	-	Lothar Wieler ²
Uli 926	Mastitis-Isolat	-	Lothar Wieler ²
Uli 927	Mastitis-Isolat	-	Lothar Wieler ²
Uli 928	Mastitis-Isolat	-	Lothar Wieler ²
Uli 929	Mastitis-Isolat	-	Lothar Wieler ²
Uli 930	Mastitis-Isolat	-	Lothar Wieler ²
Uli 931	Mastitis-Isolat	-	Lothar Wieler ²
Uli 932	Mastitis-Isolat	-	Lothar Wieler ²
Uli 933	Mastitis-Isolat	-	Lothar Wieler ²
Uli 934	Mastitis-Isolat	-	Lothar Wieler ²
Uli 935	Mastitis-Isolat	-	Lothar Wieler ²
Uli 936	Mastitis-Isolat	-	Lothar Wieler ²

Tabelle 7.5: Auf die Präsenz des Colibactin-Genclusters untersuchte Bakterienstämme (Fortsetzung)

Bakterienstamm	Beschreibung	Colibactin-Gencluster	Quelle/Referenz
<i>Xenorhabdus beddingii</i> 4764	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Xenorhabdus bovienii</i> 4766	Keine Angaben	-	IMIB ¹
<i>Xenorhabdus nematophila</i> 3370	Keine Angaben	-	IMIB ¹

¹IMIB: Stammsammlung des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie, Würzburg

²Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Freie Universität Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin, Lothar Wieler

³Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie, Nationales Referenzzentrum für *Klebsiella* Spezies, Universität Kiel, Dr. R. Podschun

7.6 Einteilung der Fäkalisolate „Maria Souladaki“-Sammlung in phylogenetische Gruppen (ECOR-Bestimmung)

Tabelle 7.6: Nachweis der *E. coli* Malat-Dehydrogenase (*emdh*) (Hsu & Tsen 2001) und phylogenetische Klassifizierung (Clermont, 2000) der Fäkalisolate „Maria Souladaki“ mittels PCR.

Bakterienstamm	Beschreibung	<i>emdh</i>	ECOR-Gruppe
„Maria Souladaki“ 1/01	Fäkalisolat	+	D
„Maria Souladaki“ 1/02	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 1/03	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 1/04	Fäkalisolat	+	D
„Maria Souladaki“ 1/05	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 1/06	Fäkalisolat	+	B1
„Maria Souladaki“ 1/08	Fäkalisolat	+	D
„Maria Souladaki“ 1/09	Fäkalisolat	+	D
„Maria Souladaki“ 1/10	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 1/11	Fäkalisolat	+	A
„Maria Souladaki“ 1/12	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 1/13	Fäkalisolat	+	D
„Maria Souladaki“ 1/14	Fäkalisolat	-	-
„Maria Souladaki“ 1/15	Fäkalisolat	+	D
„Maria Souladaki“ 1/16	Fäkalisolat	+	D
„Maria Souladaki“ 1/17	Fäkalisolat	+	B1
„Maria Souladaki“ 1/18	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 1/19	Fäkalisolat	+	D
„Maria Souladaki“ 1/20	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 1/21	Fäkalisolat	+	A
„Maria Souladaki“ 1/22	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 1/23	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 1/24	Fäkalisolat	+	D
„Maria Souladaki“ 1/25	Fäkalisolat	+	A
„Maria Souladaki“ 1/26	Fäkalisolat	+	A
„Maria Souladaki“ 1/27	Fäkalisolat	+	B2

Tabelle 7.6: Nachweis der *E. coli* Malat-Dehydrogenase (*emdh*) (Hsu & Tsen 2001) und phylogenetische Klassifizierung (Clermont, 2000) der Fäkalisolate „Maria Souladaki“ mittels PCR. (Fortsetzung)

Bakterienstamm	Beschreibung	<i>emdh</i>	ECOR-Gruppe
„Maria Souladaki“ 1/28	Fäkalisolat	+	B1
„Maria Souladaki“ 1/29	Fäkalisolat	+	B1
„Maria Souladaki“ 1/30	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 1/31	Fäkalisolat	+	A
„Maria Souladaki“ 1/32	Fäkalisolat	-	-
„Maria Souladaki“ 1/33	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 1/34	Fäkalisolat	+	D
„Maria Souladaki“ 1/35	Fäkalisolat	+	D
„Maria Souladaki“ 1/36	Fäkalisolat	+	A
„Maria Souladaki“ 1/37	Fäkalisolat	+	D
„Maria Souladaki“ 1/38	Fäkalisolat	+	A
„Maria Souladaki“ 1/39	Fäkalisolat	+	D
„Maria Souladaki“ 1/40	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 1/41	Fäkalisolat	+	B1
„Maria Souladaki“ 1/42	Fäkalisolat	+	D
„Maria Souladaki“ 1/43	Fäkalisolat	+	A
„Maria Souladaki“ 1/44	Fäkalisolat	+	D
„Maria Souladaki“ 1/45	Fäkalisolat	+	D
„Maria Souladaki“ 1/46	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 1/47	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 1/48	Fäkalisolat	+	B1
„Maria Souladaki“ 1/49	Fäkalisolat	+	A
„Maria Souladaki“ 2/01	Fäkalisolat	+	D
„Maria Souladaki“ 2/02	Fäkalisolat	+	D
„Maria Souladaki“ 2/03	Fäkalisolat	+	B1
„Maria Souladaki“ 2/04	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 2/05	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 2/06	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 2/07	Fäkalisolat	+	B1
„Maria Souladaki“ 2/08	Fäkalisolat	+	B2

Tabelle 7.6: Nachweis der *E. coli* Malat-Dehydrogenase (*emdh*) (Hsu & Tsen 2001) und phylogenetische Klassifizierung (Clermont, 2000) der Fäkalisolate „Maria Souladaki“ mittels PCR. (Fortsetzung)

Bakterienstamm	Beschreibung	<i>emdh</i>	ECOR-Gruppe
„Maria Souladaki“ 2/09	Fäkalisolat	-	-
„Maria Souladaki“ 2/10	Fäkalisolat	-	-
„Maria Souladaki“ 2/11	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 2/12	Fäkalisolat	+	D
„Maria Souladaki“ 2/13	Fäkalisolat	+	A
„Maria Souladaki“ 2/14	Fäkalisolat	+	B1
„Maria Souladaki“ 2/16	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 2/17	Fäkalisolat	+	D
„Maria Souladaki“ 2/18	Fäkalisolat	+	A
„Maria Souladaki“ 2/19	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 2/20	Fäkalisolat	+	A
„Maria Souladaki“ 2/21	Fäkalisolat	+	A
„Maria Souladaki“ 2/22	Fäkalisolat	+	D
„Maria Souladaki“ 2/23	Fäkalisolat	+	A
„Maria Souladaki“ 2/24	Fäkalisolat	+	B1
„Maria Souladaki“ 2/25	Fäkalisolat	+	A
„Maria Souladaki“ 2/26	Fäkalisolat	-	-
„Maria Souladaki“ 2/27	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 2/28	Fäkalisolat	+	D
„Maria Souladaki“ 2/29	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 2/30	Fäkalisolat	+	B1
„Maria Souladaki“ 2/31	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 2/32	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 2/33	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 2/34	Fäkalisolat	+	A
„Maria Souladaki“ 2/35	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 2/36	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 2/37	Fäkalisolat	+	D
„Maria Souladaki“ 2/38	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 2/39	Fäkalisolat	+	B2

Tabelle 7.6: Nachweis der *E. coli* Malat-Dehydrogenase (*emdh*) (Hsu & Tsen 2001) und phylogenetische Klassifizierung (Clermont, 2000) der Fäkalisolate „Maria Souladaki“ mittels PCR. (Fortsetzung)

Bakterienstamm	Beschreibung	<i>emdh</i>	ECOR-Gruppe
„Maria Souladaki“ 2/40	Fäkalisolat	+	A
„Maria Souladaki“ 2/41	Fäkalisolat	+	D
„Maria Souladaki“ 2/42	Fäkalisolat	+	A
„Maria Souladaki“ 2/43	Fäkalisolat	+	A
„Maria Souladaki“ 2/44	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 2/45	Fäkalisolat	+	A
„Maria Souladaki“ 2/46	Fäkalisolat	+	A
„Maria Souladaki“ 2/47	Fäkalisolat	+	A
„Maria Souladaki“ 2/48	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 2/49	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 3/01	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 3/02	Fäkalisolat	+	A
„Maria Souladaki“ 3/03	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 3/04	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 3/05	Fäkalisolat	+	A
„Maria Souladaki“ 3/06	Fäkalisolat	+	A
„Maria Souladaki“ 3/07	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 3/08	Fäkalisolat	+	A
„Maria Souladaki“ 3/09	Fäkalisolat	+	A
„Maria Souladaki“ 3/10	Fäkalisolat	+	A
„Maria Souladaki“ 3/11	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 3/12	Fäkalisolat	+	B1
„Maria Souladaki“ 3/13	Fäkalisolat	+	D
„Maria Souladaki“ 3/14	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 3/15	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 3/16	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 3/17	Fäkalisolat	+	A
„Maria Souladaki“ 3/18	Fäkalisolat	+	A
„Maria Souladaki“ 3/19	Fäkalisolat	+	A
„Maria Souladaki“ 3/20	Fäkalisolat	+	B2

Tabelle 7.6: Nachweis der *E. coli* Malat-Dehydrogenase (*emdh*) (Hsu & Tsen 2001) und phylogenetische Klassifizierung (Clermont, 2000) der Fäkalisolate „Maria Souladaki“ mittels PCR. (Fortsetzung)

Bakterienstamm	Beschreibung	<i>emdh</i>	ECOR-Gruppe
„Maria Souladaki“ 3/21	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 3/22	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 3/23	Fäkalisolat	+	D
„Maria Souladaki“ 3/24	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 3/25	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 3/26	Fäkalisolat	+	A
„Maria Souladaki“ 3/27	Fäkalisolat	+	A
„Maria Souladaki“ 3/28	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 3/29	Fäkalisolat	+	D
„Maria Souladaki“ 3/30	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 3/31	Fäkalisolat	+	A
„Maria Souladaki“ 3/32	Fäkalisolat	+	D
„Maria Souladaki“ 3/33	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 3/34	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 3/36	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 3/37	Fäkalisolat	+	B2
„Maria Souladaki“ 3/38	Fäkalisolat	+	A
„Maria Souladaki“ 3/39	Fäkalisolat	-	-
„Maria Souladaki“ 3/40	Fäkalisolat	+	B2

7.7 Geno- und phänotypische Charakterisierung der Colibactin-positiven Fäkalisolate der „Maria Souladaki“-Sammlung

Tabelle 7.7: Untersuchung der Colibactin-positiven Fäkalisolate „Maria Souladaki“ auf Hämolyse (Blutagar), CNF und CDT (Toth *et al.* 2003), und der Ausprägung des zytopathischen Effekts in Zellkultur (CPE).

Fäkalisolat	Hämolyse	<i>cnf</i>	<i>cdt</i>	CPE
„Maria Souladaki“ 1/2	-	-	-	+
„Maria Souladaki“ 1/3	-	-	-	+
„Maria Souladaki“ 1/5	-	-	-	+
„Maria Souladaki“ 1/10	-	-	-	+
„Maria Souladaki“ 1/18	-	-	-	+
„Maria Souladaki“ 1/20	+	<i>cnf-1</i>	-	n.b.
„Maria Souladaki“ 1/22	-	-	-	+
„Maria Souladaki“ 1/27	-	-	-	+
„Maria Souladaki“ 1/33	-	<i>cnf-1</i>	<i>cdt-IV</i>	+
„Maria Souladaki“ 1/40	-	<i>cnf-1</i>	<i>cdt-IV</i>	+
„Maria Souladaki“ 1/46	-	-	-	+
„Maria Souladaki“ 1/47	-	-	-	+
„Maria Souladaki“ 2/5	-	<i>cnf-1</i>	-	+
„Maria Souladaki“ 2/11	+	<i>cnf-1</i>	-	n.b.
„Maria Souladaki“ 2/19	-	-	-	+
„Maria Souladaki“ 2/29	-	-	-	+
„Maria Souladaki“ 2/33	-	-	-	+
„Maria Souladaki“ 2/38	+	<i>cnf-1</i>	-	n.b.
„Maria Souladaki“ 2/44	-	<i>cnf-1</i>	-	+
„Maria Souladaki“ 3/1	+	<i>cnf-1</i>	-	n.b.
„Maria Souladaki“ 3/3	-	-	<i>cdt-I</i>	+
„Maria Souladaki“ 3/4	-	-	-	+
„Maria Souladaki“ 3/14	+	<i>cnf-1</i>	<i>cdt-IV</i>	n.b.
„Maria Souladaki“ 3/24	+	-	-	n.b.
„Maria Souladaki“ 3/33	+	-	-	n.b.
„Maria Souladaki“ 3/34	-	-	-	+

n.b.: nicht bestimmbar aufgrund hämolytischer Aktivität

7.8 Publikationen und Tagungsbeiträge

Publikationen

Johannes Putze, Claire Hennequin, Jean-Philippe Nougayrède, Wenlan Zhang, Stefan Homburg, Helge Karch, Marie-Agnés Bringer, Corinne Fayolle, Elisabeth Carniel, Wolfgang Rabsch, Tobias A. Oelschlaeger, Eric Oswald, Christiane Forestier, Jörg Hacker, Ulrich Dobrindt (2009)

Genetic structure and distribution of the colibactin genomic island among *Enterobacteriaceae*. *Infection and Immunity* (accepted)

Tagungsbeiträge

30/09/07-04/10/07

Teilnahme und Posterpräsentation im Rahmen der 59. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) e.V.
in Göttingen

Putze, J., Krumbholz, G., Carniel, E., Homburg, S., Dobrindt, U., Hacker, J. and Oelschlaeger T.A.

Titel des Posters:

Distribution of the *pks* genomic island among *Enterobacteriaceae* and impact on gut colonization in an animal model

09/10/07-12/10/07

Teilnahme und Posterpräsentation am EMBO-FEMS-LEOPOLDINA Symposium „*Escherichia coli*- Facets of a versatile pathogen“
in Kloster Banz, Bad Staffelstein

Putze, J., Krumbholz, G., Carniel, E., Homburg, S., Dobrindt, U., Hacker, J. and Oelschlaeger T.A.

Titel des Posters:

Distribution of the *pks* genomic island among *Enterobacteriaceae* and impact on gut colonization in an animal model