

**Studien am Flagellensystem des *Escherichia coli*
Stammes Nissle 1917 (EcN) im Hinblick auf seine
Funktion als Probiotikum**

**Studies on the flagellar system of *Escherichia coli*
Nissle 1917 (EcN) with regard to its function as a
probiotic**



**Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Infection and Immunity**

vorgelegt von

Anja Troge

aus Regensburg

Würzburg 2012

Eingereicht am: 28.09.2012

Mitglieder des Promotionskomitees:

Prüfungsvorsitzender:

1. Betreuer: AOR Dr. Tobias Ölschläger
2. Betreuer: Prof. Dr. Ulrich Dobrindt
3. Betreuer: Dr. Jan Wehkamp

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Studien am Flagellensystem des *Escherichia coli* Stammes Nissle 1917 (EcN) im Hinblick auf seine Funktion als Probiotikum“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher, noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, 28.09.2012

Meiner lieben Tante Loni



Danksagung

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Dr. Tobias Ölschläger (*Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg*) für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie die Förderung und Unterstützung während meiner Zeit als Doktorandin. Bedanken möchte ich mich vor allem für die gute Betreuung meiner Arbeit durch die ständige Diskussionsbereitschaft und die stetig neuen Anregungen und Vorschläge, sowie für die Ermöglichung der Teilnahme an internationalen Symposien.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Dobrindt (*Institut für Hygiene, Universitätsklinikum Münster*) und Herrn Dr. Jan Wehkamp (*Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für klinische Pharmakologie, Stuttgart*) danke ich für die Erstellung des Zweit-, und Drittgutachtens, sowie für ihre Diskussionsbereitschaft und fachliche Unterstützung. Jan Wehkamp möchte ich hier insbesondere für die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe, die Möglichkeit in seinem Labor neue Methoden zu erlernen, sowie für die Bereitstellung humaner Darmbiopsien und humaner Mucusproben danken.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich außerdem bei Dr. Björn Schröder für die Isolierung der humanen Mucusproben bedanken. Jutta Bader und Kathleen Siegel danke ich herzlich für die gute Betreuung während meines Laboraufenthalts in Stuttgart. Bedanken möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für die Unterstützung im Labor und ein paar schöne Wochen in Stuttgart.

Großer Dank gilt auch Herrn Prof. Wolfgang Scheppach vom *Juliusspital Würzburg* für die Bereitstellung der humanen Darmbiopsien.

Danke auch an Klaus Heuner vom *RKI Berlin* für die Bereitstellung des anti-FlaA-Antikörpers.

Ich bedanke mich außerdem bei Herrn Prof. Dr. Georg Krohne und seinen Mitarbeiterinnen Daniela Bunsen und Claudia Gehrig vom *Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften* (Universität Würzburg), die mir am Transmissionselektronenmikroskop hilfreich zur Seite standen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei der Graduate School of Life Sciences für die Organisation des Graduiertenprogramms und die Möglichkeit der Teilnahme an abwechslungsreichen Workshops. Speziell bedanke ich mich hier bei Gabi Blum-Oehler, die

immer ein offenes Ohr für die während der Doktorarbeit alltäglich auftretenden Probleme hatte und mir auch bei vielen administrativen Fragen mit Rat und Tat zur Seite stand.

Besonderer Dank geht an Marita Bartrow, die mich die größte Zeit meiner Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe Ölschläger begleitet und unterstützt hat, und mir in der Zeit eine sehr gute Freundin geworden ist. Allen anderen ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, insbesondere Johannes, Stefan, Svetlana und Karen danke ich für die gute Zeit und die gegenseitige Hilfe und Unterstützung bei der täglichen Arbeit. Stefan möchte ich hier vor allem für die Bereitstellung seiner Domäne D3 Deletionsmutante sowie für seine Hilfe bei diversen Programmen zur Darstellung von Proteinsequenzen danken.

Ich bedanke mich außerdem bei Christiane und Roswitha für ihre stets aufbauenden Worte, wenn's mal wieder nicht so gut lief, sowie für die schöne gemeinsame Zeit am Institut und die lustigen Mittagspausen bei unserem Lieblingsbäcker (und dem Huhn).

Zum Schluss möchte ich mich noch bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung und Aufmunterung in schwierigen Phasen bedanken. Besonders bedanken möchte ich mich hier bei meinem Freund Micha, der sich die Mühe gemacht hat, die Arbeit Korrektur zu lesen.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
Summary.....	3
1 Einleitung.....	5
1.1 Die Darmflora des Menschen.....	5
1.1.1 Entwicklung der humanen Darmflora.....	6
1.1.2 Die Darmflora als Infektionsbarriere.....	7
1.2 Probiotika.....	7
1.3 Die Gattung <i>Escherichia coli</i>	9
1.4 Der probiotische Bakterienstamm <i>E. coli</i> Nissle 1917 (EcN).....	10
1.4.1 Entdeckung von EcN.....	10
1.4.2 Molekulare Eigenschaften von EcN.....	10
1.4.3 Wirkmechanismen von EcN.....	11
1.5 Die uropathogenen <i>E. coli</i> Stämme CFT073 und 536.....	12
1.6 Gastrointestinaler Mucus.....	13
1.7 Bakterielle Adhäsion.....	14
1.7.1 P-Pili, Typ 1 Pili und Afa/Dr Adhäsine.....	15
1.7.2 Typ IV Pili.....	15
1.7.3 Curli.....	16
1.7.4 Autotransporter Adhäsine.....	16
1.8 Die bakterielle Flagelle.....	17
1.8.1 Aufbau der Flagelle.....	17
1.8.2 Funktionen der bakteriellen Flagelle.....	19
1.9 Aufgabenstellung und Zielsetzung.....	20
2 Materialien.....	22
2.1 Geräte.....	22
2.2 Chemikalien und Biochemikalien.....	23

2.3	Bakterienstämme	25
2.4	Plasmide	25
2.5	Oligonukleotide	26
2.6	Zelllinien und Zellkulturmedien.....	27
2.6.1	Zelllinien	27
2.6.2	Zellkulturmedien	27
2.7	Nährmedien und Antibiotika	27
2.7.1	Nährmedien	27
2.7.2	Antibiotika.....	28
2.8	Antiseren	29
2.9	Molekularbiologische Kits	29
3	Methoden	30
3.1	Mikrobiologische Methoden	30
3.1.1	Anzucht und Stammhaltung von Bakterien.....	30
3.1.2	Bestimmung des Wachstums in Flüssigkulturen.....	30
3.1.3	Isolierung der hyperflagellierten EcN-Variante ATHF.....	30
3.2	Molekularbiologische und genetische Methoden.....	31
3.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA.....	31
3.2.1.1	Isopropanol-Extraktion von Plasmid-DNA	31
3.2.1.2	Phenol-Chloroform-Extraktion von Plasmid-DNA.....	31
3.2.1.3	Isolierung von Plasmid-DNA mittels kommerziellem Kit	32
3.2.2	PCR	32
3.2.3	Aufreinigung von PCR Produkten.....	33
3.2.4	Agarosegelelektrophorese	34
3.2.5	Gelextraktion	34
3.2.6	Sequenzierung	35
3.2.7	Restriktionsverdau.....	35
3.2.8	Herstellung elektrokompetenter Zellen	35
3.2.9	Transformation elektrokompetenter Bakterien.....	35
3.3	Proteinbiochemische Methoden	36

3.3.1	SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-Page)	36
3.3.2	Präparation von Gesamtzelllysaten	37
3.3.3	Coomassie-Färbung von SDS-Gelen.....	37
3.3.4	Silberfärbung von SDS-Gelen	38
3.3.5	Western Blot (Immunoblot)	39
3.3.6	Isolierung von Flagellen	40
3.3.7	Isolierung von murinem Mucus.....	41
3.3.8	Isolierung von humanem Mucus	42
3.3.9	Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels Roti-Nanoquant.....	42
3.3.10	ELISA zum Nachweis der direkten Interaktion isolierter Flagellen mit Mucin2, murinem Mucus und humanem Mucus	42
3.4	Zellbiologische Methoden	43
3.4.1	Auftauen von Zellen	43
3.4.2	Kultivierung von Zellen	43
3.4.3	Einfrieren von Zellen.....	44
3.5	Elektronenmikroskopie	44
3.6	Motilitätstest auf Schwärmagar	44
3.7	Dual-Luciferase-Assay	45
3.7.1	Vorbereitung der Stimulanzen.....	45
3.7.2	Durchführung des Dual-Luciferase-Assay	46
3.8	Adhäsionsassay	47
3.8.1	Adhäsionsassay mit Kryoschnitten humaner Darmbiopsien	47
3.8.1.1	Herstellen von Kryoschnitten humaner Darmbiopsien	47
3.8.1.2	Durchführung des Adhäsionsassays	47
3.8.1.3	Fixierung und Färbung der Kryoschnitte	48
3.8.1.4	Mikroskopische Auswertung.....	48
3.8.2	Adhäsionsassay mit Zellen.....	48
3.8.3	Adhäsionsassays mit beschichteten Platten.....	49
3.8.3.1	Ermittlung der Adhäsion durch CFU-Bestimmung.....	49
3.8.3.2	Ermittlung der Adhäsion durch Fluoreszenzbestimmung	50
3.9	Färbung von Mucinen	50

3.10	Computergestützte Analysen.....	51
3.11	Statistische Analyse.....	51
4	Ergebnisse	52
4.1	Überprüfung aller Stämme auf EcN-Identität mittels PCR.....	52
4.1.1	Plasmidebene.....	52
4.1.2	Chromosomale Ebene.....	53
4.2	Charakterisierung der hyperflagellierten EcN-Variante ATHF	55
4.2.1	Motilitätstest.....	55
4.2.2	Elektronenmikroskopie	56
4.2.3	Bestimmung der Proteinkonzentration des produzierten Flagellins mittels Western Blot und Roti-Nanoquant	59
4.2.3.1	Western Blot mit Gesamtzellprotein	59
4.2.3.2	Western Blot mit isolierten Flagellen.....	60
4.2.3.3	Bestimmung der Flagellinmenge mittels Roti-Nanoquant	61
4.2.4	Bestimmung der hBD2-Induktion mittels Dual-Luciferase-Assay	62
4.2.5	PCR zur Überprüfung auf Insertion von IS-Elementen.....	63
4.2.6	Sequenzierung des <i>lrhA</i> -Gens.....	64
4.3	Adhäsionsstudien.....	65
4.3.1	Adhäsion von EcN an Kryoschnitte humaner Darmbiopsien.....	65
4.3.2	Adhäsion von EcN an die Epithelzellen Caco-2 und T24.....	70
4.3.3	Adhäsion von EcN an Kryoschnitte nach Präinkubation mit Mucin2.....	71
4.3.4	Adhäsion von EcN an die humanen Epithelzellen LS174-T	74
4.3.5	Adhäsion an Mucin2	75
4.4	Interaktionsstudien	76
4.4.1	Interaktion zwischen isolierten Flagellen von EcN Wildtyp und Mucin2	76
4.4.2	Interaktion zwischen isolierten Flagellen von EcN Wildtyp und murinem Mucus.....	77
4.4.3	Interaktion isolierter Flagellen von EcN Wildtyp und humanem Mucus.....	78
4.4.4	Interaktion von Flagellen anderer Bakterienstämme mit Mucin2	79
4.5	Effekt verschiedener Kohlenhydrate auf die Interaktion Flagelle ↔ Mucus	79
4.5.1	Effekt verschiedener Kohlenhydrate auf die Interaktion isolierter Flagellen von EcN und Mucin2.....	80

4.5.2	Effekt verschiedener Kohlenhydrate auf die Interaktion isolierter Flagellen von EcN und humanem Mucus	83
4.6	Effekt von Gluconat auf die Adhäsionsfähigkeit lebender Bakterien	84
4.6.1	Effekt von Gluconat auf die Adhäsion verschiedener EcN-Stämme an Mucin2-beschichtete Platten	84
4.6.2	Effekt von Gluconat auf die Adhäsion verschiedener EcN-Stämme an Kryoschnitte humaner Darmbiospien	86
4.7	Einfluss der Domäne D3 von Flagellin auf die Interaktion isolierter Flagellen mit Mucin2 oder humanem Mucus	87
5	Diskussion	91
5.1	Charakterisierung der hyperflagellierten EcN-Variante ATHF	91
5.2	Adhäsionsstudien.....	93
5.3	Interaktionsstudien	96
5.4	Abschließende Worte und Ausblick.....	104
6	Literatur.....	107
7	Anhang.....	115
7.1	Sequenzvergleich des <i>lrhA</i> -Gens von EcN Wildtyp und EcN ATHF.....	115
7.2	Nukleotidsequenz des <i>fliC</i> -Gens verschiedener Stämme	116
7.2.1	Nukleotidsequenz des <i>fliC</i> -Gens des probiotischen <i>E. coli</i> Stammes Nissle 1917	116
7.2.2	Nukleotidsequenz des <i>fliC</i> -Gens des uropathogenen <i>E. coli</i> Stammes CFT073	116
7.2.3	Nukleotidsequenz des <i>fliC</i> -Gens des uropathogenen <i>E. coli</i> Stammes 536	116
7.2.4	Nukleotidsequenz des <i>fliC</i> -Gens der Domäne D3 Deletionsmutante EcN Δ <i>fliC</i> pSR-GE2.....	117
7.3	Sequenzvergleich des <i>fliC</i> -Gens von EcN 1917 und CFT073	118
7.4	Sequenzvergleich des <i>fliD</i> -Gens von EcN 1917 und CFT073	120
7.5	AS-Sequenzen des Flagellins (FliC) verschiedener Bakterienstämme	122
7.5.1	AS-Sequenz des Flagellins (FliC) des probiotischen <i>E. coli</i> Stammes Nissle 1917 ...	122
7.5.2	AS- Sequenz des Flagellins (FliC) des uropathogenen <i>Escherichia coli</i> CFT073.....	122
7.5.3	AS- Sequenz des Flagellins (FliC) des uropathogenen <i>Escherichia coli</i>	123

7.5.4	AS- Sequenz des Flagellins (FliC) der Domäne D3 Deletionsmutante EcN Δ fliC pSR-GE2.....	123
7.6	Vergleich der AS-Sequenzen von Flagellin verschiedener Bakterienstämme	124
7.7	Abbildungsverzeichnis	125
7.8	Abkürzungsverzeichnis	127
7.9	Tabellenverzeichnis.....	129
7.10	Veröffentlichungen.....	130
7.10.1	Publikationen.....	130
7.10.2	Vorträge.....	130
7.10.3	Poster.....	130
7.11	Lebenslauf	132

Zusammenfassung

Escherichia coli Nissle 1917 (EcN) gehört zu den am besten untersuchten und charakterisierten probiotischen Bakterienstämmen. Seit Beginn des letzten Jahrhunderts wird er als Medikament eingesetzt, um verschiedene Darmerkrankungen wie z.B. Diarrhöe, entzündliche Darmerkrankungen und Verstopfung zu behandeln. Die Flagelle des EcN vermittelt Beweglichkeit und kann die Produktion von humanem β -Defensin 2 (hBD2) durch Epithelzellen induzieren. Somit ist dieses Organell direkt in die probiotische Funktion des EcN involviert. Es konnte gezeigt werden, dass die Flagellen anderer Bakterien, wie z.B. dem probiotischen Stamm *Bacillus cereus* CH oder den pathogenen Stämmen *Pseudomonas aeruginosa* und *Clostridium difficile*, die Adhäsion an intestinalen Mucus, welcher von Epithelzellen sekretiert wird, vermitteln. Allerdings blieb unklar, welcher Teil der Flagelle an welche Mucuskomponente bindet. Die Fähigkeit effizient an Wirtgewebe zu adhären wird als wichtiges Attribut eines probiotischen Stammes angesehen.

Ex vivo Adhäsionsstudien mit Kryoschnitten humaner Darmbiopsien haben gezeigt, dass die Flagelle des EcN in die effiziente Adhäsion an humanes Darmgewebe involviert sein muss. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Funktion der Flagelle des EcN als Adhäsion untersucht. Zunächst wurde die hyperflagellierte Variante EcN ATHF isoliert und durch verschiedene Experimente, z.B. Schwärmagartests und Elektronenmikroskopie, charakterisiert. Weitere *ex vivo* Adhäsionsstudien mit EcN ATHF zeigten eine höhere Adhäsionseffizienz dieser hyperflagellierten Variante und bestätigten damit die Rolle der Flagelle bei der effizienten Adhäsion von EcN an die Kryoschnitte der humanen Darmbiopsien. Interessanterweise fungierte die Flagelle in *in vitro* Studien mit den humanen Epithelzellen Caco-2 und T24 nicht als Adhäsion. Diese Unterschiede zwischen den *in vitro* und *ex vivo* Studien führten zu der Annahme, dass die Flagelle des EcN *in vivo* die Adhäsion an Mucus vermittelt, welcher von den Caco-2- und T24-Zellen nicht produziert wird, aber in den Kryoschnitten der Darmbiopsien nachgewiesen wurde. Diese Vermutung wurde durch *in vitro* Adhäsionsstudien mit der Mucin-produzierenden Epithelzelllinie LS174-T bestätigt, da die Flagellen für eine effektive Adhäsion an diese Zellen essentiell waren. Zudem reduzierte die Präinkubation flagellierter EcN-Stämme mit Mucin2 ihre Adhäsionseffizienz an Kryoschnitte humaner Darmbiopsien.

Um die direkte Interaktion zwischen Flagellen des EcN Wildtyps und Mucus zu zeigen, wurde ein ELISA etabliert. Es konnte eine direkte konzentrationsabhängige Interaktion zwischen isolierten Flagellen des EcN Wildtyps und Mucin2, bzw. humanem Mucus (Kolon)

beobachtet werden. Interessanterweise konnte keine Interaktion zwischen isolierten Flagellen des EcN Wildtyps und murinem Mucus (Duodenum, Ileum, Caecum, Colon) festgestellt werden. Dies weist darauf hin, dass die Mucuszusammensetzung zwischen verschiedenen Spezies variiert.

Verschiedene Kohlenhydrate, welche bekannte Mucusbestandteile sind, wurden auf ihre Interaktion mit der Flagelle von EcN getestet und Gluconat wurde als ein Rezeptor identifiziert. Die Präinkubation isolierter Flagellen mit Gluconat reduzierte ihre Interaktion mit Mucin2, bzw. humanem Mucus signifikant. Zudem wurde die oberflächenexponierte Domäne D3 des Flagellins, der Hauptuntereinheit der Flagelle, als möglicher Interaktionspartner von Mucin2, bzw. humanem Mucus ausgeschlossen. Flagellen, die aus einer Domäne D3 Deletionsmutante isoliert wurden, zeigten sogar eine effizientere Bindung an Mucin2, bzw. humanen Mucus. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Änderungen des pH-Wertes signifikante Effekte auf die Interaktion zwischen Mucus und isolierten Flagellen hatten, vermutlich aufgrund von Konformationsänderungen.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit die Flagelle als neues und scheinbar wichtigstes Adhäsion *in vivo* für den probiotischen Stamm EcN identifiziert. Hierfür wurden sowohl eine hyperflagellierte Variante, eine Δ *fliC* Mutante, sowie der dazugehörige komplementierte Stamm verwendet. EcN ist zudem der erste probiotische Stamm für den eine direkte Bindung der Flagellen an humanen Mucus nachgewiesen werden konnte. Die Mucuskomponente Gluconat konnte dabei als wichtiger Rezeptor identifiziert werden. Da einige pathogene Bakterien ihre Flagelle zur Adhäsion an Wirtsgewebe nutzen, könnte dieses Organell EcN dazu befähigen, mit Pathogenen um die erfolgreiche Kolonisierung des Darms zu konkurrieren, was als wichtige Eigenschaft eines Probiotikums betrachtet wird.

Summary

Escherichia coli Nissle 1917 (EcN) is one of the best studied and characterized probiotic bacterial strains. It is in use as a drug since the beginning of last century to treat various diseases and dysfunctions of the human intestinal tract, e.g. diarrhea, inflammatory bowel diseases and obstipation. The flagellum of EcN mediates motility and is able to induce human beta defensin 2 (hBD2) production by epithelial cells. Therefore, this organelle is directly involved in EcN's probiotic function. It has been shown that the flagella of several other bacteria, including the probiotic strain *Bacillus cereus* CH or the pathogenic strains *Pseudomonas aeruginosa* and *Clostridium difficile*, mediate adhesion to intestinal mucus, which is secreted by epithelial cells. However it remained unclear which part of the flagella binds to which mucus component. The ability to adhere efficiently to host tissue is considered to be an important attribute for a probiotic strain.

Ex vivo adhesion studies with cryosections of human gut biopsies have revealed, that the flagellum of EcN must be involved in efficient adhesion to human intestinal tissue. Thus, the function of EcN's flagellum as an adhesin was investigated in this work. First, the hyperflagellated variant EcN ATHF was isolated and characterized by several experiments, e.g. motility tests and electron microscopy. Further *ex vivo* adhesion studies with EcN ATHF demonstrated a higher adhesion efficiency of this hyperflagellated variant confirming the role of the flagellum for adhesion of EcN to cryosections of human gut biopsies. Interestingly, EcN's flagellum did not function as an adhesin in *in vitro* adhesion studies with the human epithelial cells Caco-2 and T24. These differences between the *in vitro* and *ex vivo* studies led to the assumption, that *in vivo* the flagellum of EcN mediates adhesion to mucus, which is not produced by Caco-2 and T24 cells, but was shown to be present in the cryosections of human gut biopsies. This was confirmed by *in vitro* adhesion studies with the mucin-producing epithelial cell line LS174-T, as flagella were essential for efficient adhesion to these cells. Furthermore, preincubation of flagellated EcN strains with mucin2 (porcine stomach) reduced their adhesion efficiency to cryosections of human gut biopsies.

To demonstrate the direct interaction between flagella from EcN wildtype and mucus, an ELISA was established. A direct concentration-dependent interaction between isolated flagella from EcN wildtype and mucin2 as well as human mucus (Colon) could be observed. In contrast, there was no direct interaction between isolated flagella from EcN wildtype and murine mucus (Duodenum, Ileum, Ceacum, Colon), indicating that mucus composition varies among different species.

By testing different carbohydrates - known to be constituents of mucus - for their interaction with the flagellum of EcN, gluconate was identified as one receptor. Preincubation of isolated flagella with gluconate significantly reduced their interaction with mucin2 or human mucus. Additionally, the surface exposed domain D3 of flagellin, the major subunit of the flagellum, could be excluded to be responsible for the interaction with mucin2 or human mucus. Flagella, which were isolated from a domain D3 deficient mutant, bound even more efficient to mucin2 as well as to human mucus. Furthermore the change of pH had significant effects on the interaction between mucus and isolated flagella, probably due to conformational changes.

In summary, this study identified the flagellum as a novel and apparently major adhesin *in vivo* of the probiotic EcN by employing a hyperflagellated variant, a $\Delta fliC$ mutant as well as the corresponding complemented strain. Additionally, EcN is so far the first probiotic strain, for which it has been shown, that its flagella directly bind to human mucus. Thereby the mucus component gluconate was identified as an important receptor. As some pathogens have been reported to use their flagella for adhesion to human host tissue, this organelle might enable EcN to compete with pathogens for successful colonization of the gut, which has been postulated to be a prerequisite for probiotics.

1 Einleitung

1.1 Die Darmflora des Menschen

Als Darmflora bezeichnet man die Gesamtheit der Mikroorganismen, die den Darm des Menschen besiedeln. Dieses wichtige Organ besitzt eine Oberfläche von etwa 200 bis 300 m² und repräsentiert damit eine der Hauptoberflächen für die bakterielle Kolonisierung (Gebbers und Laissue, 1989). Zudem ist der Darm reich an Nährstoffen, was ihn zu einem bevorzugten Besiedelungsort macht (Sekirov et al., 2010). Die Anzahl kommensaler Bakterien im Darmtrakt Erwachsener wird auf circa 10¹³ bis 10¹⁴ geschätzt und übersteigt damit die Anzahl der menschlichen Körperzellen um ein Vielfaches. Besiedelt wird der Darm von Bakterien, Archaeen und Eukaryoten und stellt so ein komplexes und dynamisches Ökosystem dar. Der Hauptanteil der Darmflora besteht aus strikten Anaerobiern (Gordon und Dubos, 1970; Harris et al., 1976). Obwohl bisher über 50 verschiedene Phyla beschrieben sind (Schloss und Handelsman, 2004), wird die menschliche Darmflora jedoch zu 99% von nur vier Phyla dominiert: den grampositiven Firmicutes und Actinobacteria, sowie den gramnegativen Bacteroidetes und Proteobacteria. Die Besiedlung durch Fungi und Archeae beläuft sich auf weniger als 1% (Miller und Wolin, 1983; Simon und Gorbach, 1984).

Die genaue Anzahl an Arten innerhalb der intestinalen Mikrobiota variiert je nach Studie stark, allgemein begegnet man jedoch Zahlen zwischen 500 und 1000 Arten (Xu und Gordon, 2003). Unter Verwendung von Gensonden konnte allerdings gezeigt werden, dass diese enorme Anzahl verschiedener Spezies noch um ein Vielfaches höher ist, diese jedoch meist nicht erfasst werden können, da eine Kultivierung dieser Spezies im Labor bisher nicht möglich ist (Tannock, 2001; Furrie, 2006). In einer weiteren Studie wurde postuliert, dass die humane Darmmikrobiota aus über 35000 Bakterienarten besteht (Frank et al., 2007). Durch die unterschiedlichen Bedingungen in den einzelnen Abschnitten des Magen-Darm-Trakts variiert auch die Verteilung der Bakterien (Abbildung 1). Im Magen, Duodenum und Jejunum befinden sich bis zu 10³ Bakterien pro Gramm Magen- bzw. Darminhalt. Im Ileum findet man dann bereits 10⁴ bis 10⁸ Bakterien pro Gramm Darminhalt und im Kolon steigt die Konzentration der Mikroorganismen dann auf bis zu 10¹² Bakterien pro Gramm Darminhalt (O'Hara und Shanahan, 2006; Blaut und Clavel, 2007).

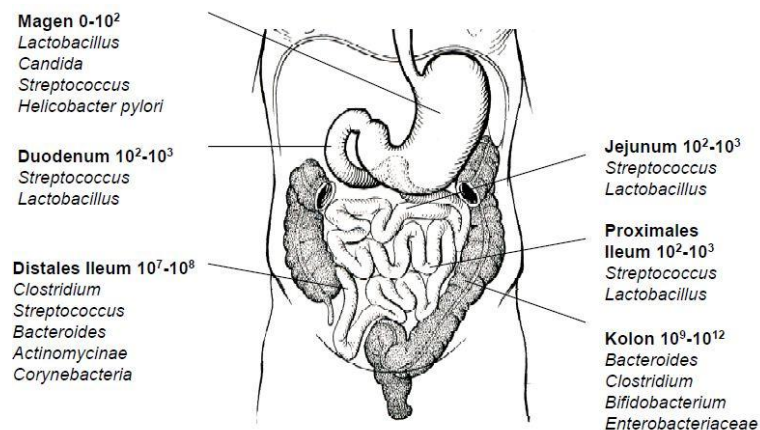


Abbildung 1: Die Mikroflora des humanen Magen-Darm-Trakts.

Gezeigt sind die Bakterienzahlen pro g Magen- bzw. Darminhalt sowie die Verteilung der unterschiedlichen Bakterienspezies in den verschiedenen Abschnitten des Magen-Darm-Trakts. Modifiziert nach Sartor et al., 2008.

1.1.1 Entwicklung der humanen Darmflora

Die Kolonisierung des Darms beginnt unmittelbar mit der Geburt. Während der Schwangerschaft ist der heranwachsende Fetus in der Regel keimfrei. Bei der Geburt bekommt das Neugeborene Kontakt mit Mikroorganismen aus der Umwelt, welche dann die inneren und äußeren Körperflächen besiedeln. Bei einer natürlichen Geburt stammen diese Mikroorganismen größtenteils von der Vaginal- und Intestinalflora der Mutter (Mandar und Mikelsaar, 1996; Biasucci et al., 2010). Bei einem Kaiserschnitt ist die frühkindliche Besiedelung durch Mikroorganismen stark vom Keimmilieu der Umgebung abhängig, so dass die erste Mikrobiota jener auf der Haut der Mutter ähnelt (Gronlund et al., 1999; Huurre et al., 2008). Die Besiedelung des Säuglingsdarms erfolgt weltweit immer in einer bestimmten Reihenfolge. In den ersten 48 Stunden nach der Geburt siedeln sich aerobe Keime an, unter ihnen vor allem Enterokokken und Lactobazillen. Diese verstoffwechseln den vorhandenen Sauerstoff und schaffen so das passende Milieu für anaerobe Bakterien, wie z.B. Bifidobakterien, welche sich dann ein bis zwei Tage später ansiedeln. Nach etwa 3 bis 5 Jahren ist die Entwicklung der Darmflora abgeschlossen und die zu diesem Zeitpunkt existierende Darmflora bleibt dann für den Rest des Lebens relativ stabil erhalten, kann jedoch durch verschiedene Faktoren, wie z.B. Ernährung (Finegold und Sutter, 1978; Sekirov et al., 2010) oder Einnahme von Antibiotika (Dethlefsen et al., 2008; Jernberg et al., 2010) individuell beeinflusst werden.

1.1.2 Die Darmflora als Infektionsbarriere

Im erwachsenen Menschen repräsentiert die Darmflora ein stabiles, sehr komplexes mikroökologisches System mit verschiedenen Stoffwechselaktivitäten (Nordgaard und Mortensen, 1995). Sie funktioniert als mikrobielle Barriere gegen die Besiedelung des Darms durch pathogene Bakterien, wie z.B. *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* ssp. oder *Campylobacter jejuni* (Savage, 1977). Die Hemmwirkung der physiologischen Darmbakterien auf potenziell und obligat pathogene Mikroorganismen bezeichnet man auch als „bakteriellen Antagonismus“. Solche antagonistischen Wirkungen umfassen zahlreiche Mechanismen, unter anderem die Besetzung ökologischer Nischen, die reine Inanspruchnahme von Raum und damit Blockierung von Kolonisationsstellen für pathogene Bakterien, die Blockierung von Rezeptoren, sowie die Produktion antimikrobieller Substanzen, die das Wachstum pathogener Keime hemmen oder diese sogar abtöten.

1.2 Probiotika

Der Begriff Probiotikum (pl. Probiotika) stammt aus dem Griechischen (pro bios) und bedeutet so viel wie „für das Leben“. Probiotika sind definiert als lebende Mikroorganismen, die in ausreichender Menge in aktiver Form in den Darm gelangen können und dadurch positive gesundheitliche Wirkungen erzielen. Im Lebensmittelbereich werden als Probiotika vorwiegend Laktobazillen und Bifidobakterien eingesetzt (Klein et al., 1998; Teitelbaum und Walker, 2002; Marteau und Shanahan, 2003), im Arzneimittelbereich findet man auch nicht pathogene Kolibakterien, Enterokokken und Hefen (Dixit und Kailasapathy, 2005; Montrose und Floch, 2005; Schultz, 2008; Zuccotti et al., 2008). Präbiotika sind nicht verdauliche Lebensmittelbestandteile, die ihren Wirt positiv beeinflussen, indem sie das Wachstum und/oder die Aktivität einer oder mehrerer Bakterienarten im Darm gezielt anregen und somit die Gesundheit des Wirts verbessern (Gibson und Roberfroid, 1995). Es handelt sich dabei meist um Pektine, Inuline oder Inulin-Abkömmlinge (z.B. Fructooligosaccharide), die überwiegend als Nahrungsergänzungsmittel eingesetzt werden. Synbiotika sind Präparate, in denen Probiotika und Präbiotika vereint sind. Sie sind bisher hauptsächlich als Nahrungsergänzungsmittel auf dem Markt zu finden (Gibson und Roberfroid, 1995; Collins und Gibson, 1999).

Um als Probiotikum wirksam werden zu können, müssen die Mikroorganismen den Gastrointestinaltrakt lebend, also vermehrungsfähig, stoffwechselaktiv und in ausreichender Keimzahl erreichen. Weitere Anforderungen an Probiotika ist die Fähigkeit zur Adhärenz,

Kolonisierung und Persistenz. Die Adhäsionsfähigkeit ist ein wesentliches Merkmal probiotischer Stämme von welchem sehr häufig auch ihr Kolonisationsverhalten abgeleitet wird. Für lange Zeit galt in der Probiotika-Forschung der Grundsatz, dass eine probiotische Wirkung auf einen Wirtsorganismus nur dann möglich ist, wenn die applizierten Mikroorganismen sich auch im Darm ansiedeln. Da aus mikroökologischer Sicht eine Kolonisation des Darms mit „fremden“ Keimen generell nicht wünschenswert ist, wird dieses Postulat aber immer mehr in Frage gestellt. Stattdessen soll für den therapeutischen Effekt eines Probiotikums hauptsächlich seine Persistenz, also seine temporäre Anwesenheit von Bedeutung sein. Diese lässt sich auch z.B. durch die wiederholte Gabe eines Probiotikums erreichen.

Probiotika besitzen ein breites, individuell unterschiedliches Wirkungsspektrum, welches sowohl durch Interaktionen mit dem Wirtsorganismus als auch dessen Mikroflora geprägt ist. Abbildung 2 zeigt eine schematische Übersicht der Wirkungen von Probiotika im Darm und am Darmepithel.

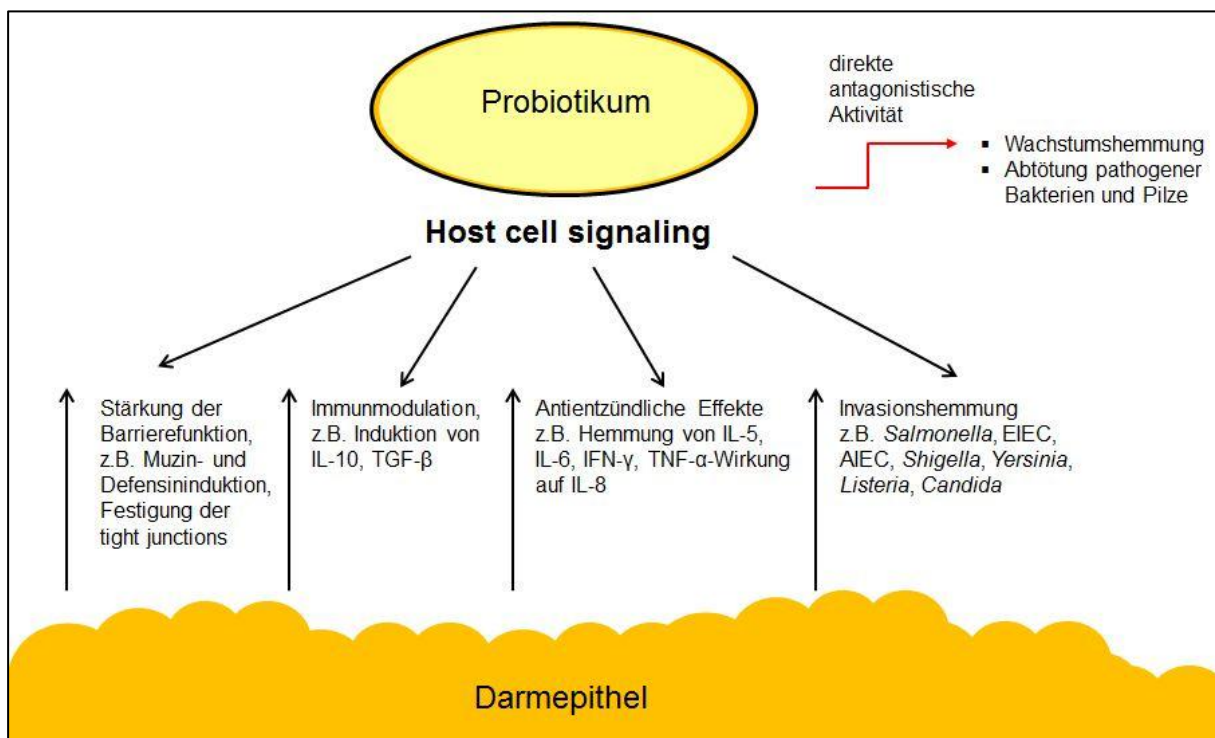


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Wirkungen von Probiotika im Darm und am Darmepithel.

IL = Interleukin, TGF = Transforming Growth Factor, IFN = Interferon, TNF = Tumornekrosefaktor, EIEC = enteroinvasive *E. coli*, AIEC = adhären – invasive *E. coli*; modifiziert nach Schulze et al., 2008

Probiotika finden ihren Einsatz hauptsächlich in der Lebensmittelindustrie als probiotische, fermentierte Lebensmittel und Nahrungsergänzungsmittel oder als Futtermittelzusatzstoffe in

der Nutztierhaltung. Darüber hinaus werden sie sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin als Arzneimittel zur Behandlung gastrointestinaler Infektionen verwendet.

1.3 Die Gattung *Escherichia coli*

Escherichia coli wurde 1885 von Theodor Escherich entdeckt und zunächst als „Bacterium coli commune“ bezeichnet (Escherich, 1886). Es ist der Familie der *Enterobacteriaceae* zuzuordnen und ist eng verwandt mit der Gattung *Shigella*. Nahe Verwandtschaft besteht zu den Gattungen *Citrobacter*, *Salmonella* und *Klebsiella*. *E. coli* - Bakterien sind gramnegative Stäbchen mit einer Größe von circa 1,1 - 1,5 µm x 2,0 - 6,0 µm. Sie können sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen wachsen, sind also fakultativ anaerob. Unter optimalen Wachstumsbedingungen teilt sich ein *E. coli* - Bakterium alle 20 Minuten. Diese Konditionen werden allerdings nur im Labor und nicht in der natürlichen Umgebung der Bakterien erreicht. Im menschlichen Darm kann die Verdopplung von *E. coli* sogar bis zu 30 Stunden dauern.

E. coli Bakterien besitzen bezüglich der Kolonieförmigkeiten einen hohen Grad an morphologischer Vielfalt. Mittels 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 Serovaren (Kauffmann 1965). Bisher sind 200 Oberflächen-(O-), 80 Kapsel-(K-) und 60 Geißel-(H-) Antigene bei *E. coli* bekannt. Verschiedene Serotypen von *E. coli* können bestimmten Erkrankungen zugeordnet werden. Allerdings wird die Pathogenität dieser Bakterienstämme nicht den Oberflächenantigenen selbst zugeschrieben. Vielmehr handelt es sich dabei um klonale Abstammungslinien, welche als „Wirte“ für horizontal übertragene Virulenzgene dienen und somit pathogene Eigenschaften erlangen (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 adhärenz *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.

1.4 Der probiotische Bakterienstamm *E. coli* Nissle 1917 (EcN)

1.4.1 Entdeckung von EcN

Escherichia coli Nissle 1917 (EcN) wurde Anfang des letzten Jahrhunderts vom Freiburger Humanmediziner und Wissenschaftler Prof. Dr. Alfred Nissle (1874-1965) aus den Fäzes eines Soldaten isoliert. Dieser war während des Balkanfeldzugs im Ersten Weltkrieg in der Region Dobrudscha stationiert und im Gegensatz zur großen Mehrzahl seiner Kameraden nicht an Diarrhöe erkrankt. Als Ursache dafür vermutete Nissle einen stark antagonistisch wirksamen *E. coli* Stamm im Darm des Soldaten, der ihn vor einer Erkrankung geschützt habe. Dies war in der Tat der Fall und 1917 wurde der probiotische Stamm *E. coli* Nissle 1917 in die medizinische Praxis eingeführt und unter dem Namen Mutaflor® als geschütztes Warenzeichen eingetragen (Nissle, 1918). Unter diesem Namen wird dieses Probiotikum auch heute noch von der Firma Ardeypharm GmbH (Herdecke, Deutschland) vertrieben. Eingesetzt wird das Medikament bei Durchfällen, Darmentzündungen und Verstopfung, aber auch zur Kolonisationsprophylaxe bei Neugeborenen.

1.4.2 Molekulare Eigenschaften von EcN

Serologisch ist EcN der *E. coli* O6-Serogruppe zuzuordnen (O6:K5:H), allerdings unterscheidet sich der Stamm im Aufbau seines Lipopolysaccharids (LPS) in einigen Aspekten von den LPS-Arten anderer *E. coli*-Stämme. Die stark verkürzte Oligosaccharid-Seitenkette verleiht dem Stamm einen semi-rauen Phänotyp und führt dazu, dass EcN keine Sepsis auslösen kann. Der Stamm besitzt zwar immunmodulatorische Eigenschaften, hat jedoch keinerlei immuntoxischen Effekte.

EcN besitzt Flagellen vom Serotyp H1 und mindestens drei verschiedene Arten von Adhäsinen (Typ 1-, F1C-, und Curli- Fimbrien), die sowohl für die Adhärenz an Epithelzellen als auch für die Biofilmbildung von Bedeutung sind. Die von pathogenen *E. coli*-Stämmen exprimierten P- und S-Fimbrien findet man jedoch nicht (Blum et al., 1995; Grozdanov et al., 2004; Lasaro et al., 2009). EcN besitzt einige Fitnessfaktoren. So verfügt er über mindestens sieben verschiedene Siderophorsysteme, was dem Keim auch in eisenarmer Umgebung eine optimale Eisenaufnahme ermöglicht. Er sezerniert die Mikrozyme M und H47, die das Wachstum sensibler Bakterienstämme unterdrücken (Patzner et al., 2003). Zudem ist er in der

Lage Zellulose zu synthetisieren. Diese molekularen Charakteristika, sowie seine probiotischen Eigenschaften machen *E. coli* Nissle 1917 zu einem beliebten Modellorganismus in Wissenschaft und Forschung.

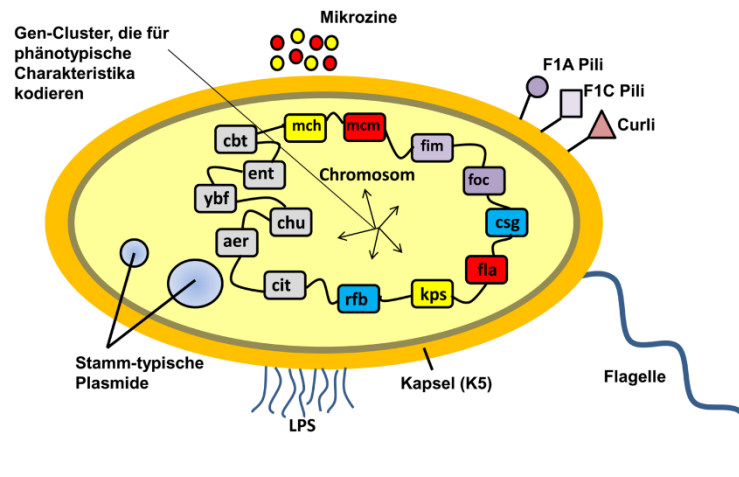


Abbildung 3: Molekulare Eigenschaften des probiotischen *E. coli* Stammes Nissle 1917.
Modifiziert nach J. Hacker

1.4.3 Wirkmechanismen von EcN

Für *E. coli* Nissle 1917 sind bereits viele Wirkmechanismen bekannt, welche zu seinen probiotischen Effekten beitragen. Trotzdem sind die meisten molekularen Ursachen dieser Effekte noch nicht erforscht. Seine antagonistische Aktivität gegen verschiedene Pathogene, wie z.B. *Salmonella* und *Shigella* ssp., konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* demonstriert werden (Mandel et al., 1995; Leatham et al., 2009; Reissbrodt et al., 2009).

In vitro und *in vivo* Studien haben belegt, dass EcN bemerkenswerte immunmodulatorische Fähigkeiten besitzt. So bewirkt dieser probiotische Stamm die Expression der proinflammatorischen Zytokine MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), MIP-2 α (macrophage inflammatory protein-2 α) und MIP-2 β (macrophage inflammatory protein-2 β), was wiederum zu einer entzündlichen Immunantwort führt (Ukena et al., 2005). Außerdem konnte gezeigt werden, dass EcN die T-Zellfunktion durch Aktivierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen mit verminderter TNF α - und vermehrter IL-6 Sekretion sowie nachfolgender Induktion der Apoptose beeinflusst. Zudem unterdrückt EcN die TNF α -induzierte Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-8 an intestinale Epithelzellen. Ein weiterer Wirkmechanismus von EcN ist die Stärkung des Zusammenhalts des epithelialen Zellverbands. So konnte gezeigt werden, dass in Gegenwart von EcN die beiden Tight-junction-Proteine ZO-1 und ZO-2 verstärkt exprimiert werden und zusammen mit dem

regulatorischen Enzym PKC ξ die Verbindung der Epithelzellen stabilisieren. Eine weitere wichtige Eigenschaft von EcN ist die Stärkung der intestinalen Barrierefunktion. So konnte gezeigt werden, dass EcN in der Lage ist die Invasion humaner Epithelzellen durch verschiedene darmpathogene Keime, wie z.B. *Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella*, *Listeria* oder *Legionella* ssp. zu hemmen (Altenhoefer et al., 2004). Zudem hat EcN einen Induktionseffekt auf die Synthese antimikrobieller Peptide des Darmepithels. Zu diesen in den letzten Jahren intensiv untersuchten körpereigenen Schutzsubstanzen gehören die humanen α - und β -Defensine und die Cathelicidine. Defensine sind niedermolekulare (3-6 kDa) Peptide mit sechs Cysteinresten und werden je nach ihrer Tertiärstruktur in α - und β -Defensine eingeteilt (Ouellette, 2004). Beim gesunden Menschen sind diese antimikrobiellen Peptide eng mit der Mucusschicht verbunden und bilden dadurch eine intakte intestinale Barriere, welche die Bakterien im Lumen von den Epithelzellen fernhält (Gersemann et al., 2012). Bei bestimmten Darmerkrankungen ist die Synthese dieser Defensine vermindert und in Folge dessen kommt es bei diesen Patienten zu einer dichten Besiedelung der Mucusschicht durch mitunter pathogene Bakterien (Wehkamp et al., 2005). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass EcN die Produktion von humanem β -Defensin 2 durch Darmepithelzellen induziert (Wehkamp et al., 2004; Schlee et al., 2007). Die Interaktion von EcN mit seinem Wirtsorganismus führt demnach zu verschiedenen pro- und antiinflammatorischen Immunantworten. Zusammen mit der intestinalen Mikroflora dienen diese der Abwehr von Pathogenen und anderen entzündungsfördernden Einflüssen.

1.5 Die uropathogenen *E. coli* Stämme CFT073 und 536

Escherichia coli CFT073 (O6:K2:H1) ist ein uropathogener *E. coli*-Stamm, welcher 1990 aus dem Blut einer Krankenhauspatientin mit akuter Niereninfektion (Pyelonephritis) isoliert und dessen Genom vollständig sequenziert wurde (Moblely et al., 1990). Der uropathogene CFT073 ist mit dem probiotischen EcN sehr nahe verwandt. So konnte gezeigt werden, dass sich beide Stämme auf genetischer Ebene nur durch wenige hundert Gene unterscheiden (Vejborg et al., 2010).

Der uropathogene Stamm 536 (O6:K15:H31) wurde vor dreißig Jahren aus einem Patienten mit akuter Pyelonephritis isoliert (Berger et al., 1982). Seitdem hat er sich zu einem Modellorganismus für Analysen zur Genomstruktur und Evolution uropathogener Erreger entwickelt.

1.6 Gastrointestinaler Mucus

Die Epithelzellen des Darms sind mit einer Mucusschicht bedeckt. Dabei handelt es sich um eine biochemisch hochkomplexe Struktur, die reich ist an Glykoproteinen, antimikrobiellen Peptiden, Immunoglobulinen, Lipiden und Elektrolyten (Juge, 2012). Die Mucusschicht ist zweigeteilt. Die äußere, dickere und diffus aufgebaute Schicht liegt auf einer dünneren, dichten und fest an die Epithelzellen adhärierenden Schicht (Atuma et al., 2001). Die Dicke der Mucusschicht variiert abhängig von der jeweiligen Region des Magen-Darm-Traktes. Die innere Mucusschicht im distalen Kolon der Maus ist in etwa 50 µm dick, bei der Ratte wurden bis zu 100 µm gemessen. Bisher war es noch nicht möglich die Dicke der humanen inneren Mucusschicht zu messen, aber höchstwahrscheinlich ist diese noch um einiges dicker. Die äußere Mucusschicht hat eine weniger definierte äußere Grenze. Generell wird sie zwar auf die doppelte Dicke der inneren Mucusschicht geschätzt, die tatsächliche Dicke ist jedoch hoch variabel. Mucus dient als effektive Barriere zwischen Darmlumen und Epithelzellen. So konnte gezeigt werden, dass zwar die äußere Schicht von Bakterien kolonisiert wird, die innere Schicht jedoch komplett frei von Bakterien ist (Johansson et al., 2008). Daraus lässt sich schließen, dass die Darmbakterien unter normalen Umständen nicht mit den Epithelzellen in Kontakt treten und somit gut vom Immunsystem separiert sind.

Als Hauptkomponenten von Mucus finden sich gelformende Mucine, die funktional in zwei Gruppen eingeteilt werden können: membrangebundene und sekretierte Mucine. Beim Menschen werden sie unabhängig davon mit dem Kürzel „MUC“ und einer Zahl (MUC1, MUC2, MUC3...) benannt. Bisher sind 17 verschiedene Mucine (MUC1-4, MUC5AC, MUC5B, MUC6-7, MUC12-17 und MUC19-21) identifiziert worden (Juge, 2012). Typisch für die Proteinstruktur der Mucine ist die PTS Domäne mit einer starken Anhäufung der Aminosäuren Prolin, Threonin und Serin (Lang et al., 2007). Im Darm besteht der Mucus hauptsächlich aus dem sekretierten MUC2 Mucin (Johansson et al., 2009), wohingegen im Magen vor allem MUC1, MUC5AC und MUC6 vertreten sind (Moran et al., 2011).

Das humane MUC2 Mucin besitzt ein zentrales Protein mit ungefähr 5179 Aminosäuren. Abbildung 4 zeigt die Domänenstruktur dieses Glykoproteins.

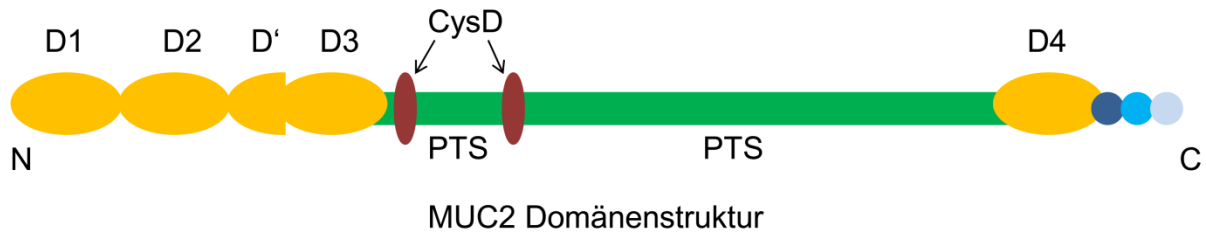


Abbildung 4: Domänenstruktur des MUC2 Mucins.

MUC2 besitzt Cysteinreiche C- und N-Termini mit vier kompletten und einer halben von Willebrand D Domänen. Die zentralen PTS Domänen werden stark O-glykosyliert. Modifiziert nach M.E.V. Johansson, 2010.

Das Protein wird in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums transloziert und bildet dort Dimere über Disulfidbrückenbindungen zwischen den CysD-Domänen aus. Auf ihrem Weg durch den Golgi-Apparat werden die PTS-Domänen der Mucin-Dimere stark glykosyliert und erreichen Molekulargewichte im Bereich von 5 MDa. Die Dimere werden dicht in sekretorische Vesikel verpackt, aus der Zelle geschleust und breiten sich schließlich zu netzartigen Strukturen aus. Durch die starke Glykosylierung besteht das MUC2 Mucin zu mindestens 80% aus Kohlenhydraten. Saccharide, die bereits als Bestandteile von Mucus identifiziert wurden sind Mannose, Glucose, Fucose, Galactose, Ribose, N-Acetylglucosamin (GlcNAc), N-Acetylgalactosamin, N-Acetylneuraminsäure, Gluconat, Galactonat oder Glucuronat (Roos und Jonsson, 2002; Fox et al., 2009).

1.7 Bakterielle Adhäsion

Die Adhäsion von Mikroorganismen an Wirtsoberflächen ist ein wichtiger erster Schritt bei der bakteriellen Kolonisierung des menschlichen Darmtraktes. Die Fähigkeit zur effektiven Adhäsion ist wichtig für die Aufrechterhaltung der intestinalen Mikroflora. Zahlreiche Studien belegen, dass die Adhäsion pathogener Mikroorganismen an Wirtsgewebe Grundvoraussetzung für die Etablierung einer Infektion darstellt. Darüber hinaus wurde postuliert, dass die Fähigkeit probiotischer Bakterien an intestinale Oberflächen zu adhären, direkt mit ihrer Wirksamkeit als Probiotika zusammenhängt (Kirjavainen et al., 1998). Der grundlegende Mechanismus, welcher dem Adhäsionsvorgang zugrunde liegt ist die Ausbildung von Adhäsinen durch die Bakterien, welche spezifisch mit Rezeptoren auf der Wirtsoberfläche interagieren und so die Bindung vermitteln.

1.7.1 P-Pili, Typ 1 Pili und Afa/Dr Adhäsine

Pyelonephritis-assoziierte (P-) Pili gehören zu den zuerst entdeckten und am besten untersuchten Fimbrien. Sie werden von *E. coli* Stämmen exprimiert, die den Urogenitaltrakt kolonisieren und anschließend Niereninfektionen auslösen, den sogenannten uropathogenen *E. coli* (UPEC). P-Pili werden vom pap-Gencluster codiert, welches sowohl regulatorische als auch biosynthetische Gene für Fimbrienuntereinheiten, Chaperone und die Verankerung in der äußeren Membran enthält (Pizarro-Cerda und Cossart, 2006). Der Zusammenbau der P-Pili erfolgt über das sogenannte Chaperone/Usher Sekretionssystem. Das periplasmatische Chaperon PapD transportiert die Pilus-Untereinheiten zum „usher“ PapC in der äußeren Membran, welcher wiederum den Transport der Untereinheiten an die Zelloberfläche vermittelt (Thanassi et al., 1998). P-Pili binden über das PapG-Adhäsine an α -D-Galactopyranosyl-(1-4)- β -D-Galactopyranosidreste von Glycoproteinen der Zellen des oberen Urogenitaltraktes (Kallenius et al., 1981; Leffler und Svanborg-Eden, 1981). Eine weitere Art von Fimbrien, sind die Typ 1 Pili, welche von vielen pathogenen *E. coli*, aber auch von dem probiotischen *E. coli* Stamm Nissle 1917, exprimiert werden. Sie werden vom *fim*-Gencluster codiert und die Fimbrienuntereinheiten werden ebenfalls über das Chaperon/Usher Sekretionssystem an die Zelloberfläche transportiert. FimC ist dabei das periplasmatische Chaperon, FimD der „usher“ in der äußeren Membran und FimH das Pilus-Adhäsine. Kommensale *E. coli* Isolate exprimieren FimH-Varianten, die an Trimannosereste von Glycoproteinrezeptoren binden, die FimH-Varianten uropathogener *E. coli* erkennen dahingegen spezifisch Monomannosereste (Pizarro-Cerda und Cossart, 2006). Eine weitere Familie adhärenter Oberflächenstrukturen, die über das Chaperon/Usher Sekretionssystem an die Zelloberfläche transportiert werden, sind die Afa/Dr Adhäsine, welche in UPEC und DAEC identifiziert wurden. Sie werden von mindestens fünf *afa*-Genen (A bis E) codiert, *afaE* codiert dabei das eigentliche Adhäsine. Die meisten Afa/Dr-Adhäsine binden an das Dr^a-Blutgruppen Antigen des Moleküls CD55 (Anderson et al., 2004), aber einige interagieren auch mit Zelladhäsionsmolekülen der Carcinoembryonalen Antigen-Familie (CEACAMs), Typ IV Kollagen oder mit $\alpha_5\beta_1$ Integrinen.

1.7.2 Typ IV Pili

Typ IV Pili sind polymere adhäsive Oberflächenstrukturen, die von vielen gramnegativen Bakterien, wie z.B. EPEC, EHEC, *Salmonella enterica* serovar Typhi, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* und

Vibrio cholerae exprimiert werden (Craig et al., 2004). Im Gegensatz zu den Typ 1 und P-Pili, die an der Zelloberfläche zusammengebaut werden, werden Typ IV Pili an der Cytoplasmamembran biosynthetisiert und dort verankert. Der komplette Pilus durchdringt anschließend die äußere Membran (Wolfgang et al., 2000).

1.7.3 Curli

Einige kommensale und pathogene Darmbakterien, wie z.B. *E. coli* und *Salmonella* ssp. exprimieren dünne aggregative Fimbrien, sogenannte Curli. Die Hauptuntereinheit der Curli, das Protein CsgA wird dabei Sec-abhängig über die innere Membran, und durch eine CsgG-Pore über die äußere Membran transportiert. Dort kommt es durch die Interaktion mit CsgB, einem an der Zelloberfläche gebundenen Protein, zu einer Konformationsänderung und zur Ausbildung der amyloiden Fimbrien. Curli sind grundsätzlich klebrig, besitzen jedoch keine eindeutige Ligandenspezifität. Viele kommensale *E. coli*- und *Salmonella*-Isolate exprimieren Curli nur bei Raumtemperatur. Für eine Reihe klinischer pathogener *E. coli* Isolate konnte eine Expression dieser Oberflächenstrukturen auch bei 37 °C nachgewiesen werden, was darauf hinweist, dass Curli eine Rolle bei der Pathogenität dieser Isolate spielen (Bian et al., 2000).

1.7.4 Autotransporter Adhäsine

Autotransporter sind Proteine auf der Oberfläche von Bakterien und repräsentieren den einfachsten Weg des Proteinexports. Moleküle die über dieses System, bekannt als Typ V Sekretionssystem, sekretiert werden, enthalten ein N-terminales Peptid, welches die Sec-abhängige Sekretion über die innere Membran vermittelt, eine C-terminale Domäne, die eine Pore in der äußeren Membran bildet, und das restliche Protein (passenger-Domäne), welches durch die Pore transportiert wird. In einigen Fällen wird dann der porenbildende Bereich des Proteins noch proteolytisch abgespalten (Henderson et al., 2004). Verschiedene Autotransporter von *E. coli* werden mit Adhäsion in Verbindung gebracht. Antigen 43 enthält RGD-Motive, welche an Integrin binden und dadurch die Adhäsion an Zellen vermitteln. AIDA-A wird von diffus-adhärenenten *E. coli* Stämmen exprimiert und ist für deren teilweise diffus-adhärenenten Phänotyp verantwortlich. Das von ETEC exprimierte TibA vermittelt über seine Glykosylierung adhäsive Eigenschaften. Beispiele von Autotransportern anderer

gramnegativer Bakterien, die eine Rolle in der Adhäsion spielen, sind BabA von *Helicobacter pylori*, welches die Adhäsion an das Blutgruppenantigen Lewis b (Le^b) vermittelt (Ilver et al., 1998), sowie YadA von *Yersinia enterocolitica*, der Prototyp der trimären Autotransporter. Drei Autotransporteruntereinheiten bilden hierbei die funktionale Pore (Cotter et al., 2005), wobei das sekretierte YadA-Protein die Adhäsion an Kollagen, Laminin und Fibronectin vermittelt (Nummelin et al., 2004).

1.8 Die bakterielle Flagelle

1.8.1 Aufbau der Flagelle

Flagellen sind lange, helikale Filamente, die für die Fortbewegung der Bakterien von entscheidender Bedeutung sind (Berg und Anderson, 1973). Der Flagellenapparat ist eine supramolekulare Oberflächenstruktur und besteht im Wesentlichen aus drei Teilen: dem Basalkörper, dem Haken und dem Filament (Minamino und Namba, 2004). Der Basalkörper fungiert als Motor und ist in der Zellmembran verankert. Der Haken bildet das Gelenk, welches diesen Motorkomplex mit dem Filament verbindet. Dieses wiederum fungiert als Propeller und ragt ebenso wie der Haken von der Zelloberfläche nach außen. Abbildung 5 zeigt schematisch den Aufbau einer bakteriellen Flagelle.

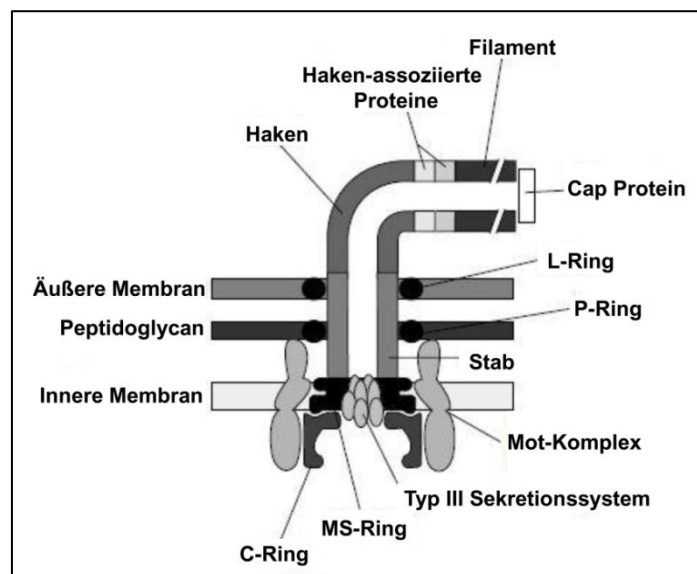


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Flagelle eines gramnegativen Bakteriums. Modifiziert nach Aldridge et al., 2002.

Der Basalkörper besteht aus einem MS-Ring, einem Stab, dem P- und dem L-Ring. Der MS-Ring besteht aus dem Protein FliF und ist in die Cytoplasmamembran integriert (Ueno et al., 1992). Der P-Ring ist im periplasmatischen Raum lokalisiert und wird aus dem Protein FlgI gebildet. Das Protein FlgH wiederum bildet den in der äußeren Membran liegenden L-Ring. Der Stab durchläuft den kompletten periplasmatischen Raum und wird aus den Proteinen FLgB, FlgC, FlgF und FlgG gebildet (Terashima et al., 2008). L- und P-Ring bilden zusammen einen zylindrischen Komplex, welcher äußerst stabil gegenüber chemischen Behandlungen ist (Jones et al., 1990). Die beiden cytoplasmatischen Proteine MotA und MotB bilden einen Proteinkomplex um den Basalkörper und sind an der Energiekopplung zwischen Protonenfluss und Rotationsentwicklung der Flagelle beteiligt (Berg, 2000). Allgemein wird vermutet, dass MotB als Stator fungiert, da er ein Peptidoglykan-Bindemotiv besitzt. Drei weitere Proteine FliG, FliM und FliN bilden den C-Ring auf der cytoplasmatischen Seite des MS-Rings und fungieren so vermutlich als Rotor (Francis et al., 1994). Diese Proteine sind sowohl für die Rotationsentwicklung als auch für die Richtungsänderung der Bewegung verantwortlich. Zudem wurde gezeigt, dass elektrostatische Interaktionen zwischen Rotor und Stator für die Rotationsentwicklung wichtig sind (Zhou et al., 1998). Der Haken ist eine kurze röhrenförmige Struktur, die aus über 120 Untereinheiten des Proteins FlgE besteht und das Filament mit dem Basalkörper verbindet. Eine bemerkenswerte Eigenschaft des Hakens ist, dass seine Länge genau kontrolliert wird und in wildtypischen Zellen bei circa 55 ± 6 nm liegt (Hirano et al., 1994). Verantwortlich dafür ist das Längenkontrollprotein FliK, welches zusammen mit der integralen Membranexportkomponente FlhB die Substratspezifität für den Proteinexport verändert, sobald der Haken seine maximale Länge erreicht hat (Kutsukake et al., 1994; Williams et al., 1996; Aldridge und Hughes, 2002). Das Filament ist der größte Teil der Flagelle und durch den Selbstzusammenbau von mehr als 30000 Untereinheiten des Proteins Flagellin (FliC) bis zu 15 μm lang. Flagellin ist aus vier Domänen (D0-D3) aufgebaut. Domäne 0 und 1 bestehen jeweils aus dem N- und C-terminalen Teil. Diese Domänen sind sehr stark konserviert und essentiell für die korrekte Synthese und Motilität der Flagelle (Mimori-Kiyosue et al., 1997; Smith et al., 2003). Sie bilden kompakte α -Helix-Strukturen, welche im Inneren des Filaments positioniert sind. Domäne 2 und 3 bilden den hypervariablen Teil des Flagellins und eine β -Faltblattstruktur, welche nach außen exponiert ist.

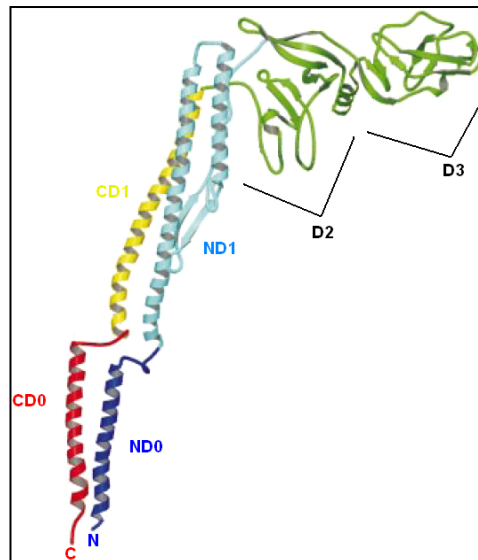


Abbildung 6: Schematische Struktur der Flagellindomänen bei *Salmonella typhimurium*.
Modifiziert nach Yonekura et al., 2003

Am wachsenden Ende des Filaments befindet sich das sogenannte „Cap“-Protein FliD, welches eine wichtige Rolle für das effiziente Wachstum des Filaments besitzt. Mutanten, denen FliD fehlt, können kein Filament mehr ausbilden, sondern sezernieren monomeres Flagellin nach außen (Homma et al., 1984; Ikeda et al., 1985). Fast alle Substrukturen der Flagelle befinden sich im Cytoplasma und müssen vor dem Zusammenbau zunächst aus der Bakterienzelle exportiert werden. Der Export der Flagellenproteine erfolgt über einen TypIII-Exportapparat, welcher aus sechs integralen Membranproteinen und drei cytoplasmatischen Proteinen besteht. Der Export der Proteine erfolgt dabei in einer ganz bestimmten Reihenfolge (Suzuki et al., 1978; Kubori et al., 1992).

1.8.2 Funktionen der bakteriellen Flagelle

Eine der wichtigsten Aufgaben der bakteriellen Flagelle ist die Vermittlung von Motilität. Für viele pathogene Bakterien wurde die Flagelle als wichtiger Virulenzfaktor identifiziert. So ist z. B. bei *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni* und *Helicobacter pylori* die Präsenz von Flagellen und die damit verbundene Motilität der Bakterien wichtig für die Wirtskolonisation und das Auslösen von Entzündungen (Attridge und Rowley, 1983; Morooka et al., 1985; Eaton et al., 1996; Allen-Vercoe und Woodward, 1999). Zudem konnte gezeigt werden, dass den Flagellen eine nicht unbedeutende Rolle bei der Ausbildung von Biofilmen in *Stenotrophomonas maltophilia*, *E. coli* und *Aeromonas* zukommt (de Oliveira-Garcia et al., 2002; Kirov et al., 2004; Wood et al., 2006). Eine weitere Funktion der Flagelle

ist die Vermittlung der Adhäsion. Adhäsive Eigenschaften von Flagellen konnten bereits bei einigen, vorwiegend pathogenen Bakterien, wie z.B. *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium difficile*, sowie EPEC und ETEC beobachtet werden (Arora et al., 1998; Tastyre et al., 2001; Erdem et al., 2007). Die adhäsiven Eigenschaften der Flagellen sind vermutlich in ihrer molekularen Struktur zu finden. Es ist anzunehmen, dass die nach außen ragende hypervariable Region des Hauptproteins Flagellin für die speziesspezifische Adhäsion verantwortlich ist (Erdem et al., 2007). Eine weitere Funktion der Flagelle, welche für den probiotischen *E. coli* Stamm Nissle 1917 gezeigt werden konnte, ist die Induktion der hBD2-Produktion in Caco-2-Zellen (Schlee et al., 2007). Dies belegt, dass die Flagelle direkt in die probiotische Wirksamkeit dieses Stammes involviert ist.

1.9 Aufgabenstellung und Zielsetzung

E. coli Nissle 1917 gehört mit zu den am besten untersuchten probiotischen Bakterien, die derzeit als Lebensmittelzusätze oder Medikamente eingesetzt werden. Mittlerweile sind zwar viele molekulare Strukturen und Wirkmechanismen von EcN bekannt, die seinen probiotischen Charakter ausmachen, dennoch fehlt es häufig an der Aufklärung der molekularen Ursachen dieser Mechanismen. So wurde z.B. gezeigt, dass EcN die Adhäsion verschiedener pathogener Bakterien an humane Epithelzellen inhibieren kann. Auch wurde postuliert, dass dies eventuell darauf zurückzuführen ist, dass EcN selbst an diese Zellen adhärert und somit die Bindungsstellen für die pathogenen Bakterien blockiert. Generell ist bisher jedoch wenig über die Adhäsionsmechanismen von EcN bekannt. Da gezeigt wurde, dass die Flagelle von EcN durch die Induktion der hBD2-Produktion zu seiner probiotischen Wirksamkeit beiträgt, war es ein Ziel dieser Arbeit, die Rolle der Flagelle des EcN im Hinblick auf dessen Funktion als Probiotikum weiter zu charakterisieren. In früher durchgeführten Adhäsionsstudien mit Kryoschnitten humaner Darmbiopsien konnte gezeigt werden, dass die Flagelle für die effiziente Adhäsion des EcN an diese Strukturen wichtig ist, Die flagellenegative Mutante EcN Δ *fliC* adhärte nicht mehr effizient an die Kryoschnitte humaner Darmbiopsien, wohingegen die dazugehörige Komplementante EcN Δ *fliC* pDB2 wieder zu einer effizienten Adhäsion in der Lage war. Diese Hinweise auf eine mögliche Rolle der Flagelle des EcN bei der Adhäsion an Wirtsgewebe sollten in dieser Arbeit weiter verfolgt werden. Dazu sollte versucht werden, hyperflagellierte Varianten von EcN zu isolieren und zu charakterisieren. Ebenso sollten verschiedene *ex-vivo*-, *in vitro*- und auch

evtl. *in vivo*- Studien etabliert werden, um die Funktion der Flagelle als Adhäsion weiter zu bestätigen und damit ein tieferes molekulares Verständnis dieses Mechanismus darzulegen.

2 Materialien

2.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Firma
Analysewaage	JL – 180	Chyo Balance Corp. (Japan)
Brutschrank	Function Line BB 16	Thermo Fisher Scientific (Erlangen)
Elektrophoresekammern für PAGE	Mini – PROTEAN 3	BioRad (München)
Elektroporationsgerät	Gene Pulser Xcell	BioRad (München)
ELISA-Messgerät	Multiskan Ascent	Thermo Fisher Scientific (Erlangen)
Fluorometer	Fluoroskan Ascent	Thermo Fisher Scientific (Erlangen)
Gel-Dokumentation	INTAS GDS	Intas (Göttingen)
Heizblock	HX-2	Peqlab (Erlangen)
Inverses Mikroskop	Telaval 31	Zeiss (Jena)
Kameraeinheit für Lichtmikroskop	DS-Vi1	Nikon (Düsseldorf)
Kühl-Mikrozentrifuge	Biofuge 13 R	Heraeus (Hanau)
Kühl-Mikrozentrifuge Rotor	Sepatech #3575	Heraeus (Hanau)
Kühlzentrifuge	Multifuge 1 L – R	Heraeus (Hanau)
Kühlzentrifuge Rotor	Sorvall 75002000	Heraeus (Hanau)
Lichtmikroskop	Eclipse 50i	Nikon (Düsseldorf)
Luminometer	2030 Luminescence Reader, Victor™ X Light	Perkin Elmer (Rodgau)
Mikrozentrifuge	Biofuge pico	Heraeus (Hanau)
pH-Meter	Inolab pH 720	WTW (Weilheim)
Photometer	Ultrospec™ 3100 pro	Amersham Biosciences (Nürnberg)
Thermocycler	T3	Biometra (Göttingen)
Transmissionselektronenmikroskop	EM 10	Zeiss (Jena)

Neben den in Tabelle 1 aufgelisteten Geräten wurden Laborstandardgeräte eingesetzt.

2.2 Chemikalien und Biochemikalien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Firma
2' – Desoxyadenosin – 5' – triphosphat (dATP)	Sigma – Aldrich (Taufkirchen)
2' – Desoxycytidin – 5' – triphosphat (dCTP)	Sigma – Aldrich (Taufkirchen)
2' – Desoxyguanosin – 5' – triphosphat (dGTP)	Sigma – Aldrich (Taufkirchen)
2' – Desoxythymidin – 5' – triphosphat (dTTP)	Sigma – Aldrich (Taufkirchen)
4 – Chloro – 1 – Naphtol	Sigma – Aldrich (Taufkirchen)
Acrylamid – Lösung 30% (Rotiphorese® Gel 30)	Roth (Karlsruhe)
Agar (Difco™)	BD Bioscience (Heidelberg)
Albumin Fraktion V	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem (Darmstadt)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau	AppliChem (Darmstadt)
Calciumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Chloramphenicol	Roth (Karlsruhe)
Coomassie – Brilliant – Blue R250	Roth (Karlsruhe)
D – Gluconsäure Calciumsalz	Roth (Karlsruhe)
D – Glucuronsäure	Roth (Karlsruhe)
DMEM High Glucose (4,5 g/l)	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
DMSO	Sigma – Aldrich (Taufkirchen)
D – Ribose	Roth (Karlsruhe)
Dulbecco's PBS	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
EDTA	Roth (Karlsruhe)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ethanol	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Fetales Kälberserum	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder #SM0311	Fermentas (St. Leon – Rot)
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder #SM0241	Fermentas (St. Leon – Rot)
Giemsa Stammlösung	Roth (Karlsruhe)
Glutaraldehyd	AppliChem (Darmstadt)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
GoTaq® Flexi DNA Polymerase	Promega (Mannheim)
Hefeextrakt	Roth (Karlsruhe)
Immersionöl	AppliChem (Darmstadt)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Kanamycin	Roth (Karlsruhe)

Ladepuffer (Loading Dye Solution 6x)	Fermentas (St. Leon – Rot)
L – Fucose	Roth (Karlsruhe)
L – Glutamin	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
Lysozym	Sigma – Aldrich (Taufkirchen)
Magnesiumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Mannose	Roth (Karlsruhe)
May – Grünwald – Lösung	Roth (Karlsruhe)
Mc Coy's 5A Medium	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe)
Mucin aus dem Schweinemagen Typ II	Sigma – Aldrich (Taufkirchen)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat	Roth (Karlsruhe)
peqGold Universal Agarose	Peqlab (Erlangen)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder #SM0671	Fermentas (St. Leon – Rot)
Phusion High Fidelity DNA – Polymerase	Thermo Fisher Scientific (Erlangen)
Restriktionsenzyme	NEB (Frankfurt)
Salzsäure rauchend	Roth (Karlsruhe)
Silbernitrat	AppliChem (Darmstadt)
TEMED	Roth (Karlsruhe)
TMB – Lösung	Merck (Darmstadt)
Trichloressigsäure (TCA)	Roth (Karlsruhe)
Tris	Roth (Karlsruhe)
Triton X – 100	Roth (Karlsruhe)
Trypton/Pepton	Roth (Karlsruhe)
Tween 20	AppliChem (Darmstadt)
Trypanblau	Sigma – Aldrich (Taufkirchen)
Wasserstoffperoxid (30%)	Roth (Karlsruhe)
β – Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)

2.3 Bakterienstämme

Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 (EcN)	O6:K5:H1; pMUT1, pMUT2, Mikrozin H47/M, F1C-Fimbrien, Typ 1 Fimbrien, Curli	Nissle, 1918
EcN ATHF	hyperflagellierte Variante von EcN	diese Arbeit
EcN $\Delta fliC$	FliC-Deletionsmutante von EcN	I. Finsel, Würzburg
EcN $\Delta fliC$ pDB2	FliC- Komplementante von EcN; amp ^R	D. Bartel, Würzburg
EcN $\Delta fliC$ pSR-GE2	FliC – D3 - Deletionsmutante von EcN, amp ^R	S. Rund, Würzburg
EcN Δfim	Keine Typ1-Pili	Altenhoefer et al., 2004
EcN Δfoc	Keine F1C-Pili	Altenhoefer et al., 2004
EcN $\Delta fim \Delta foc$	Keine Typ1- und F1C-Pili	Altenhoefer et al., 2004
EcN Δcsg	Keine Curli-Fimbrien	S. Homburg, Würzburg
<i>Escherichia coli</i> CFT073	Uropathogenes Humanisolat; O6:K2:H1; Hämolytisch; Type IV Pili	Mobley, 1990
<i>Escherichia coli</i> CFT073 $\Delta fliC$	FliC-Deletionsmutante von CFT073	I. Finsel, Würzburg
<i>Escherichia coli</i> UPEC 536	Uropathogenes Humanisolat, O6:K15:H31; Hämolytisch	Berger, 1982
<i>Escherichia coli</i> MG1655	K-12 Isolat; OR:H48:K-	Blattner, 1997
EcN Wildtyp pMW211	amp ^R , rot fluoreszierend	diese Arbeit
EcN ATHF pMW211	amp ^R , rot fluoreszierend	diese Arbeit
EcN $\Delta fliC$ pMW211	amp ^R , rot fluoreszierend	diese Arbeit

2.4 Plasmide

Tabelle 4: Verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pDB2	trägt <i>fliC</i> -Gen von EcN	D. Bartel, Würzburg
pGL3-2	codiert hBD2-Promotor und <i>Firefly</i> -Luciferase	J. Wehkamp, Stuttgart
pMW211	codiert das DsRed Gencluster	Bumann et al, 2003
pRenilla	codiert <i>Renilla</i> Luciferase	Promega, Mannheim
pSR-GE2	trägt <i>fliC</i> -Gen ohne Domäne D3 von EcN	S. Rund, Würzburg

2.5 Oligonukleotide

Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
Muta 5	AACTGTGAAGCGATGAACCC	Überprüfung auf pMUT1
Muta 6	GGACTGTTCAGAGAGCTATC	Überprüfung auf pMUT1
Muta 7	GACCAAGCGATAACCGGATG	Überprüfung auf pMUT2
Muta 8	GTGAGATGATGGCCACGATT	Überprüfung auf pMUT2
Muta 9	GCGAGGTAACCTCGAACATG	Überprüfung auf pMUT2
Muta 10	CGGCGTATCGATAATTCACG	Überprüfung auf pMUT2
1L2	AATGAACCAGATCCGTGTGA	Überprüfung auf EcN-Identität (chromosomale Ebene)
1R2	CAGGTCCAAACGTAACAGTGC	Überprüfung auf EcN-Identität (chromosomale Ebene)
4L2	GGGCGATCGGATTTAATCAT	Überprüfung auf EcN-Identität (chromosomale Ebene)
4R2	CGAGGACTCGGAGCTTACTG	Überprüfung auf EcN-Identität (chromosomale Ebene)
5L1	GCCTCTCGCAACTTAACGAC	Überprüfung auf EcN-Identität (chromosomale Ebene)
5R1	AGTTATCCAGCGTTGCCATC	Überprüfung auf EcN-Identität (chromosomale Ebene)
IS-F 1	CCCCCTCCGTTGTATGTGCG	Überprüfung auf IS-Element Insertion
IS-F 2	CCTGTTTCATTTTTGCTTGCCAGT	Überprüfung auf IS-Element Insertion
IS-R	GGAATGTTTCGCCACACCG	Überprüfung auf IS-Element Insertion
<i>lrhA</i> F	GTGCACAGCATTAACCAGCTCAG	Überprüfung auf Mutation im <i>lrhA</i> Gen
<i>lrhA</i> R	AATAAACCCAGCGGTTTCGTT	Überprüfung auf Mutation im <i>lrhA</i> Gen

2.6 Zelllinien und Zellkulturmedien

2.6.1 Zelllinien

Tabelle 6: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
Caco-2	Humane Kolon-Adenokarzinom Zelllinie	DMSZ (Braunschweig)
T24	Humane Blasenkarzinomepithelzellen	DMSZ (Braunschweig)
LS174-T	Humane Kolon-Adenokarzinom Zelllinie	Cell Line Service GmbH (Eppelheim)

2.6.2 Zellkulturmedien

Caco-2/LS174-T:	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), high Glucose (4,5 g/l)	500 ml
	FCS (Fetal Calf Serum), hitzeinaktiviert	50 ml
T24:	Mc Coy's 5A Medium	500 ml
	FCS (Fetal Calf Serum), hitzeinaktiviert	50 ml
	L-Glutamin	5,5 ml

2.7 Nährmedien und Antibiotika

2.7.1 Nährmedien

Alle folgenden Nährmedien wurden mit dH₂O angesetzt und für 20 min bei 121 °C und einem Überdruck von 1 bar autoklaviert.

Luria-Bertani (LB)-Medium:	Trypton/Pepton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
		ad 1 l dH ₂ O

Luria-Bertani (LB)-Agar:	Trypton/Pepton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	Agar	15 g
		ad 1 l dH ₂ O

SOC-Medium:	Trypton/Pepton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	0,3 g
	KCl	0,09 g
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1,02 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,23 g
	→ nach dem Autoklavieren werden dem Medium 20 mM Glucose zugesetzt	

Schwärmagar:	Trypton/Pepton	5 g
	Hefeextrakt	2,5 g
	NaCl	2,5 g
	Agar	1,5 g
		ad 500 ml dH ₂ O

TSB-Medium:	Pepton aus Sojamehl	3 g
	Glucose	2,5 g
	NaCl	5 g
	Dikaliumhydrogenphosphat	2,5 g
		ad 1l dH ₂ O
	→ pH 7,3 ± 0,2 einstellen und autoklavieren	

2.7.2 Antibiotika

Tabelle 7: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Lösungsmittel	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin (Amp)	dH ₂ O	100 mg/ml	100 µg/ml
Chloramphenicol (Cm)	70% Ethanol	20 mg/ml	20 µg/ml
Kanamycin (Kan)	dH ₂ O	30 mg/ml	30 µg/ml

2.8 Antiseren

Tabelle 8: Verwendete Antiseren

Antiserum	Beschreibung	Verdünnung	Bezugsquelle
anti-FlaA	Serum aus Kaninchen gegen FlaA aus <i>Legionella pneumophila</i>	1:1000	Klaus Heuner (Berlin)
anti-Kaninchen IgG Peroxidase Konjugat	Serum aus Ziegen mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert	1:5000 (ELISA) 1:10000 (Western Blot)	Dianova (Hamburg)

2.9 Molekularbiologische Kits

Tabelle 9: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
Qiaquick prep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Anzucht und Stammhaltung von Bakterien

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 5000 Upm 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 (OD) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm verfolgt.

3.1.3 Isolierung der hyperflagellierten EcN-Variante ATHF

Die Isolierung der hyperflagellierten EcN-Variante ATHF erfolgte mittels eines U-Röhrchen-Experiments. Ein mit 12 ml Schwärmagar gefülltes U-Röhrchen (H: 10 cm, B: 4,5 cm, Ø: 1 cm) wurde zunächst auf einer Seite mit einer Kolonie EcN Wildtyp angeimpft und auf der anderen Seite 1 ml LB-Medium über den Agar gefüllt. Anschließend wurde das Röhrchen mit den Bakterien bei 37 °C inkubiert und die Laufront der Bakterien in regelmäßigen Abständen überprüft. Sobald die Bakterien die andere Seite erreicht hatten (nach ca. 10 bis 14 h), wurden in jeweils sehr kurzen Zeitabständen (10 min) jeweils 100 µl des LB-Mediums

ausplattiert, um genau die Bakterien zu isolieren, die zuerst die andere Seite des Röhrchens erreicht hatten.

3.2 Molekularbiologische und genetische Methoden

3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

3.2.1.1 Isopropanol-Extraktion von Plasmid-DNA

2 ml ÜNK wurden in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 2 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Bakteriensediment in 150 µl Puffer P1 (Qiagen) resuspendiert und 3 µl Lysozym (50 mg/ml) zugegeben. Nach 10 min Inkubationszeit bei RT wurden 300 µl Puffer P2 (Qiagen) zugefügt und durch viermaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes gut durchmischt. Anschließend wurde der Ansatz maximal 5 min bei RT inkubiert, 225 µl Puffer P3 (Qiagen) zugegeben und durch fünfmaliges Invertieren gemischt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde die Mischung für 10 min bei 13000 Upm zentrifugiert, der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, erneut für 5 min bei 13000 Upm zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Danach wurden 472,5 µl Isopropanol (100%) zugefügt, kurz gemischt und die Mischung für 1-2 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 30 min bei 13000 Upm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment mit 1 ml Ethanol (70%) durch Zentrifugation für 10 min bei 13000 Upm gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment für 30 bis 60 min bei RT getrocknet. Abschließend wurde das getrocknete Sediment in 30 bis 50 µl dH₂O aufgenommen, die DNA-Konzentration bestimmt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.1.2 Phenol-Chloroform-Extraktion von Plasmid-DNA

Zunächst erfolgte die Phenol-Chloroform-Extraktion ebenso wie die Isopropanolfällung mit den Puffern P1, P2 und P3 (Qiagen). Nach der 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden nun allerdings 100 µl einer Phenol-Chloroform-Mischung (1:1) zugefügt und durch kurze Benutzung des Reagenzgefäßmischers gut durchmischt. Danach wurde 10 min bei 13000

Upm zentrifugiert, wodurch es zu einer Phasentrennung der zuvor hergestellten Emulsion kam. Die untere organische Phase enthielt die Proteine, die obere wässrige Phase enthielt DNA. RNA wurde bereits durch die RNase A in Puffer P1 abgebaut. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Mit 100%-igem eiskaltem Ethanol wurde dann das Reaktionsgefäß bis zur 2 ml Füllgrenze aufgefüllt. Nach 30 min Zentrifugation bei 13000 Upm wurde der Überstand verworfen und 1 ml 70%-iger Ethanol zugefügt. Nun wurde 10 min bei 13000 Upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Noch verbleibender Ethanol wurde durch 30-minütiges Trocknen bei Raumtemperatur entfernt. Das Sediment wurde in 20 bis 30 µl dH₂O resuspendiert, die DNA-Konzentration bestimmt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA mittels kommerziellem Kit

Zur schnellen Isolierung von Plasmid-DNA wurde das QIAGEN Plasmid Mini Kit der Firma QIAGEN (Düren) verwendet. Die Isolierung der DNA wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die DNA wurde in 30-50 µl EB-Puffer aufgenommen, die Konzentration bestimmt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.2 PCR

Mit der Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) können spezifische DNA-Fragmente amplifiziert werden. Die zur Vervielfältigung eingesetzten Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert und hatten einen Bindebereich von 18-25 bp an das jeweilige Template. Als Template diente entweder isolierte Plasmid-DNA oder Bakterienzelllysate. Zur Gewinnung der DNA aus Bakterienzelllysate wurden 100 µl einer Übernachtskultur aufgekocht (95 °C, 10 min) und anschließend 1-2 µl als DNA-Matrize für die PCR verwendet. Zur Amplifikation von DNA-Abschnitten wurde die GoTaq® Flexi DNA Polymerase der Firma Promega (Mannheim) verwendet. Bei PCR-Ansätzen mit anschließender Sequenzierung wurde mit der Phusion High-Fidelity Polymerase der Firma New England Biolabs (Frankfurt) mit 3'-5'-Korrekturlese-Exonuklease-Aktivität („proofreading - Aktivität) gearbeitet. Die Reaktionsansätze und die verwendeten Programme sind in Tabelle 10 und Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 10: Reaktionsansatz und –programm für die PCR mit der GoTaq® Flexi DNA Polymerase

Reaktionsansatz		Reaktionsprogramm			Zyklen
DNA	100 ng	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1
dNTPs (jeweils 10 mM)	1 µl	Denaturierung	95 °C	30 – 60 s	30
MgCl ₂ (25 mM)	1,25 µl	Annealing	x °C	30 – 60 s	
5' – Primer (100 pmol/µl)	1 µl	Elongation	72 °C	1 min/kb	
3' – Primer (100 pmol/µl)	1 µl	Finale Elongation	72 °C	10 min	1
5x GoTaq® Flexi Puffer	10 µl				
GoTaq® Flexi DNA Polymerase	0,25 µl				
dH ₂ O	ad 50 µl				

Tabelle 11: Reaktionsansatz und –programm für die PCR mit der Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase

Reaktionsansatz		Reaktionsprogramm			Zyklen
DNA	100 ng	Initiale Denaturierung	98 °C	5 min	1
dNTPs (10 mM)	1 µl	Denaturierung	98 °C	30 s	30
5' – Primer (100 pmol/µl)	1 µl	Annealing	x °C	30 s	
3' – Primer (100 pmol/µl)	1 µl	Elongation	72 °C	30 s/kb	
5x Phusion HF Puffer	10 µl	Finale Elongation	72 °C	10 min	1
Phusion DNA Polymerase	0,5 µl				
dH ₂ O	ad 50 µl				

Die Hybridisierungstemperatur wurde unter Berücksichtigung der Schmelztemperatur T_M des Primers ausgewählt. Die Berechnung der Schmelztemperatur erfolgt nach folgender Formel (Suggs, *et al.*, 1981):

$$T_M [^\circ\text{C}] = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C) \quad (A, G, C, T: \text{Anzahl der entsprechenden Oligonukleotide})$$

Alternativ kann die T_M auch mit Hilfe des Online Programms Oligo Calculator berechnet werden: <http://www.pitt.edu/~rsup/OligoCalc.html>

3.2.3 Aufreinigung von PCR Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem Qiaquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde in 30-50 µl EB-Puffer eluiert und bei -20 °C gelagert.

3.2.4 Agarosegelelektrophorese

DNA-Moleküle können anhand ihrer Größe im elektrischen Feld mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt werden. Die Nukleinsäuren wandern dabei aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen im Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat in der Agarosematrix zur Anode und werden in Abhängigkeit ihrer Molekularmasse und Konformation aufgetrennt. Dafür wurden Gele mit 1,0 – 4,0% (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer verwendet. Vor dem Lauf wurden die Proben mit 1x DNA-Probenpuffer versetzt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard zur Bestimmung der Fragmentgröße diente die 1 kb plus DNA-Leiter (Invitrogen, Karlsruhe). Die Elektrophorese wurde in horizontalen Gelkammern bei konstant 120 V für 60 – 80 min durchgeführt. Im Anschluss wurden die Gele im Ethidiumbromid-Färbebad für 15 min gefärbt. Die Detektion und Dokumentation der getrennten DNA-Fragmente erfolgte auf einem UV-Transilluminator bei 254 nm.

Elektrophoresepuffer (1x TAE):	Tris	40 mM
	Essigsäure	40 mM
	EDTA	1 mM
		<hr/> pH 8,2
Agarosegel:	Agarose	1,0 – 4,0%
		<hr/> in 1x TAE
Ethidiumbromid – Färbebad:	Ethidiumbromid	1 µg/ml dH ₂ O

3.2.5 Gelextraktion

Die DNA-Extraktion aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAGEN Gel Extraction Kit gemäß den Herstellerangaben. Die DNA wurde in 30 bis 50 µl EB-Puffer aufgenommen, die Konzentration bestimmt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.6 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden durch die Firma LGC Genomics (Berlin) vorgenommen. Dafür wurden die PCR-Produkte wie beschrieben gereinigt (3.2.3) und 50-80 ng/ μ l PCR-Produkt (in 40 μ l Volumen) für die Sequenzierung zur Verfügung gestellt. Die Sequenzierungs-Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von 100 pmol/ μ l (20 μ l) jeweils mitgeschickt.

3.2.7 Restriktionsverdau

Die sequenzspezifische Spaltung von Plasmid-DNA durch Restriktions-Endonukleasen erfolgte in Reaktionsansätzen von 20-50 μ l bei 37 °C für 1 h oder über Nacht im vom Hersteller empfohlenen Puffersystem. Es wurden Restriktionsenzyme der Firma New England Biolabs (Frankfurt) verwendet. Die Spaltung von Plasmid-DNA wurde im Agarosegel überprüft.

3.2.8 Herstellung elektrokompenter Zellen

Übernachtskulturen wurden 1:100 in LB-Medium verdünnt, entsprechende Antibiotika zugegeben und bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD_{600} von 0,6 - 0,7 inkubiert. Die Bakterienkultur wurde dann 20 min auf Eis abgekühlt und die Zellen anschließend bei 4 °C für 10 min bei 6000 Upm zentrifugiert. Die Bakterien wurden zweimal mit 50 ml vorgekühltem dH₂O gewaschen und ein weiteres Mal mit 1 ml vorgekühltem, 10%-igem Glycerin gewaschen. Das Zellsediment wurde in 150 μ l 10%-igem Glycerin aufgenommen und in Aliquots von 75 μ l bei -80 °C gelagert.

3.2.9 Transformation elektrokompenter Bakterien

Elektrokompente Zellen wurden auf Eis 30 min aufgetaut und mit 20 bis 50 ng Plasmid-DNA gemischt. Der Elektroporationsansatz wurde in eine Elektroporationsküvette (Gene-Pulser, Bio-Rad) überführt und die Transformation erfolgte mit einem Bio-Rad Gene Pulser bei 1,8 bis 2,5 kV, 200 Ω und 25 μ F. Die Zellen wurden in 1 ml gekühltes SOC-Medium (2.7.1) aufgenommen und für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. 100 μ l des Ansatzes der Bakteriensuspension wurden auf selektiven Agarplatten ausplattiert und bei entsprechender Temperatur inkubiert.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-Page)

Bei der sodium dodecyl sulfate Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Für die Elektrophorese wurden 1,0 mm dicke Flachgele der Größe 8 x 7 cm in einer Minigel-Kammer von Bio-Rad (München) verwendet. SDS-Gele bestehen in der Regel aus einem Trenngel (je nach Größe des aufzutrennenden Proteins: 4-12%) und einem Sammelgel (5%). In dieser Arbeit wurden entweder 8- oder 12%-ige Trenngele verwendet. Die angegebenen Mengen wurden zur Herstellung von zwei Minigelen mit dem Bio-Rad-System verwendet.

Tabelle 12: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für SDS-PAGE

	Trenngel (8%)	Trenngel (12%)	Sammelgel (5%)
Acrylamid/Bis-Lösung (30%)	4 ml	6 ml	1,33 ml
ddH ₂ O	6,9 ml	4,9 ml	4,37 ml
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	3,8 ml	3,8 ml	
0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)			2 ml
10% SDS	150 µl	150 µl	80 µl
10% APS	150 µl	150 µl	40 µl
TEMED	9 µl	6 µl	5 µl

Als Größenstandard wurde die PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Die Proteinproben wurden vor dem Lauf mit Lämmli-Puffer (5x) versetzt und für 10 min bei 95 °C denaturiert.

Die Gelkammer wurde mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt und die Proben in die Geltaschen pipettiert. Zunächst wurde die Elektrophorese für 30 min bei 50 V gestartet, so dass die Proben ins Sammelgel laufen konnten. Nachdem sich eine klare Trennlinie gebildet hatte, wurde die Elektrophorese bei 120 V für ca. 120 min fortgesetzt. Nach der Elektrophorese wurden die SDS-Gele in Coomassie-Lösung gefärbt, silbergefärbt oder für Immunoblot-Analysen eingesetzt.

Lämmli-puffer (5x):	0,5 M Tris-HCl pH 6,8	4,36 ml
	Bromphenolblau	4,9 ml
	SDS	980 mg
	Glycerin	2,82 ml
	dH ₂ O	2,82 ml
<hr/>		
Aufteilung in Aliquots zu 1,96 ml und Lagerung bei -20 °C; vor Gebrauch Zugabe von 40 µl β-Mercaptoethanol		
SDS-Laufpuffer (5x):	Tris	15 g
	Glyzin	72 g
	SDS	5 g
	<hr/>	
	dH ₂ O	ad 1000 ml

3.3.2 Präparation von Gesamtzelllysaten

Für die Herstellung von Gesamtzelllysaten wurde die OD₆₀₀ von Übernachtskulturen bestimmt und mit LB-Medium auf 1,0 eingestellt. 100 µl dieser Kulturen wurden jeweils mit 25 µl Lämmli-Puffer (3.3.1) versetzt und für 10 min bei 95 °C aufgeköcht. Im Anschluss wurden jeweils 10 bis 20 µl (je nach Größe der Geltaschen) der Proben auf das Gel aufgetragen. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte wie beschrieben (3.3.1).

3.3.3 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Zur Visualisierung der mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurde eine Coomassie-Färbung der Gele durchgeführt. Der Farbstoff bindet dabei unspezifisch an kationische und hydrophobe Seitenketten von Proteinen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 30 Minuten in Fixierlösung inkubiert. Kurz vor Gebrauch wurde die Coomassie-Färbelösung durch 1:1 Mischung von Stocklösung I und II vorbereitet und die Gele anschließend 20 Minuten darin gefärbt. Für eine erste schnelle Entfärbung wurden die Gele für ca. 1 min in Entfärberlösung I (entspricht Fixierlösung) gegeben. Das Gel wurde dann bis zur gewünschten Sichtbarkeit der Proteinbanden in Entfärberlösung II weiter entfärbt.

Fixierlösung:	Eisessig	10 ml
	Ethanol	40 ml
	dH ₂ O	50 ml
Stocklösung I:	Coomassie Brilliant Blau R250	100 mg
	Ethanol	40 ml
	dH ₂ O	10 ml
Stocklösung II:	Essigsäure	10 ml
	dH ₂ O	40 ml
Entfärberlösung II:	Eisessig	50 ml
	Ethanol	100 ml
	dH ₂ O	350 ml

3.3.4 Silberfärbung von SDS-Gelen

Eine weitere Färbemöglichkeit zum Sichtbarmachen über SDS-PAGE aufgetrennter Proteine ist die Silberfärbung. Zuerst wurde dabei das Gel in Fixierlösung für 30 Minuten oder über Nacht fixiert. Anschließend erfolgten drei Waschschrte in dH₂O für jeweils 20 Minuten, um die Essigsäure zu entfernen. Durch längeres Waschen an dieser Stelle kann der Hintergrund reduziert und die Sensitivität der Färbung verstärkt werden. Das Gel wurde für 1-2 Minuten in 0,02%-iger Natriumthiosulfatlösung sensibilisiert und erneut zweimal in dH₂O gewaschen. Nun folgte die Färbung in 0,1%-iger gekühlter (4 °C) Silbernitratlösung für 30 min. Das Gel wurde wiederholt zweimal in dH₂O gewaschen. Schließlich wurde es bis zur gewünschten Intensität der Banden in Entwicklerlösung inkubiert und abschließend zum Abstoppen der Reaktion in 1%-ige Essigsäurelösung gegeben.

Fixierlösung:	Methanol	450 ml
	Essigsäure	50 ml
	dH ₂ O	500 ml

Entwicklerlösung:	Formaldehyd	0,04% (w/v)
	Natriumcarbonat	2% (w/v)

3.3.5 Western Blot (Immunoblot)

Bei der Detektion von Proteinen in einem Immunoblot werden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und anschließend mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen.

Der Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen erfolgte mit Hilfe einer Semi-Dry-Blotting-Apparatur. Hierfür wurden zunächst sechs in Anodenpuffer I getränkte Whatmanpapiere auf eine mit dH₂O befeuchtete Graphitplatte gelegt, gefolgt von drei in Anodenpuffer II getränkten Whatmanpapieren und der ebenfalls in Anodenpuffer II angefeuchteten Membran. Darauf wurde das SDS-Gel luftblasenfrei aufgebracht und anschließend drei in Kathodenpuffer getränkte Whatmanpapiere darauf gelegt. Zum Schluss wurde die mit dH₂O befeuchtete Kathodenplatte aufgesetzt, beschwert und der Transfer für 60 min bei 38 mA (0,8 mA/cm²) durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit Blockierlösung (5% Magermilchpulver in TBS-T) ÜN bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T erfolgte die Inkubation der Membran mit dem spezifischen Primär-Antiserum in Blockierlösung für 60 min und RT. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T erfolgte die Zugabe des Sekundärantikörpers in Blockierlösung für 60 min und RT. Ungebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit TBS-T entfernt. Die Entwicklung des Blots erfolgte durch Inkubation der Membran in Entwicklerlösung I. Die Inkubation wurde beendet, sobald sich dunkle Banden auf der Membran abzeichneten. Der Blot wurde 30 min in dH₂O gelegt und anschließend getrocknet.

Anodenpuffer I:	Tris	36,34 g
	Methanol	200 ml
	Tween 20	1 ml
	dH ₂ O	ad 1000 ml

Anodenpuffer II:	Tris	3,03 g
	Methanol	200 ml
	<hr/>	
	dH ₂ O	ad 1000 ml
Kathodenpuffer:	Tris	3,03 g
	Methanol	200 ml
	ε-Amino-Caprinsäure	5,25 g
	<hr/>	
	dH ₂ O	ad 1000 ml
TBS (10x):	1 M Tris-HCl pH7,5	200 ml
	5 M Natriumchlorid-Lösung	300 ml
	<hr/>	
	dH ₂ O	ad 1000 ml
TBS-T (10x):	1 M Tris-HCl pH7,5	200 ml
	5 M Natriumchlorid-Lösung	300 ml
	Tween 20	10 ml
	<hr/>	
	dH ₂ O	ad 1000 ml
Entwicklerlösung I:	TBS (1x)	47 ml
	4-Chloro-1-Naphthol (0,3% in Methanol)	3 ml
	H ₂ O ₂	80 µl

3.3.6 Isolierung von Flagellen

In einem Erlenmeyer-Kolben (250 ml) wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml Übernachtskultur der jeweiligen Bakterienstämme angeimpft und über Nacht für 16 bis 18 h bei 37 °C als Standkultur inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde in zwei 50 ml Greiner-Röhrchen überführt und für 20 min bei 4000 Upm und 4 °C in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakteriensediment in 5 ml sterilem PBS mit Proteinaseinhibitor resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde in ein 15 ml Greiner-Röhrchen überführt und für 10 Minuten mit dem Vortex Power Mix kräftig geschüttelt.

Anschließend wurde für 30 min bei 4000 Upm und 4 °C in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 15 ml Greiner-Röhrchen überführt, die Proteinkonzentration bestimmt, die Proben anschließend bei 4 °C gelagert und innerhalb einer Woche für Experimente verwendet. Zur längeren Aufbewahrung wurden die Proteinproben bei -20 °C gelagert und die Proteinkonzentration der einzelnen Proben nach jedem Auftauen neu bestimmt.

PBS (10x):	Natriumchlorid	8 g
	Kaliumchlorid	0,2 g
	Dinatriumhydrogenphosphat	1,42 g
	Kaliumdihydrogenphosphat	0,27 g
	<hr/>	
	dH ₂ O	ad 1000 ml
	→Einstellen des pH auf 7,4	

3.3.7 Isolierung von murinem Mucus

Die Isolierung von Mucus aus dem Dünn- und Dickdarm von 7 bis 8 Wochen alten weiblichen c57BL/6 Mäusen (Charles River Breeding Laboratories, Sulzfeld, Germany) erfolgte modifiziert nach Cohen et al. (1984). Die Unterbringung und Behandlung der Mäuse erfolgte nach den Tierschutzrichtlinien der deutschen Regierung. Alle Tierexperimente wurden durch die unterfränkische Regierung überprüft. Nach der Tötung der Tiere, wurden der Dünn- und Dickdarm entnommen und in eiskaltes PBS (3.3.6) überführt. Die jeweiligen Därme wurden in 2 bis 3 cm lange Stücke geschnitten und alle Fäzes, sowie unverdaute Nahrungsreste mit einem kleinen Spatel aus dem Darm herausgedrückt. Die entleerten Därme wurden in eine Petrischale mit eiskaltem PBS überführt und mit einer feinen Schere der Länge nach aufgeschnitten. Die offenen Darmabschnitte wurden nochmal in PBS gewaschen um restliche Ablagerungen zu entfernen und in eine neue Petrischale überführt. Der Mucus wurde mit einem kleinen Spatel von der inneren Darmoberfläche abgeschabt und in eiskaltes PBS überführt. Die Proben wurden kurz gemischt und anschließend bei 4 °C und 10000 Upm für 15 min abzentrifugiert, um kleine zelluläre Partikel zu entfernen. Der Überstand wurde in neue Röhrchen überführt, die Proteinkonzentration ermittelt und die Proben bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.3.8 Isolierung von humanem Mucus

Mucus aus dem humanen Colon wurde freundlicherweise von Dr. Jan Wehkamp zur Verfügung gestellt. Isoliert wurden die Mucusproben von vier Patienten während einer Routine-Koloskopie. Alle Patienten gaben ihre schriftliche Einverständniserklärung und die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Tübingen überprüft. Die Isolation der Mucusproben wurde wie bereits zuvor beschrieben (Hamer et al., 2009) durchgeführt. Jedem der Patienten wurde eine Probe mit einer kleinen Bürste entnommen. Diese wurde dann direkt in 600 µl Puffer (0.1 M Tris-HCl, 154 mM NaCl, 0.01% AZID, 0.02% Tween-20, pH 7.4) gegeben. Die Bürste wurde dann im Puffer auf Eis ca. 5 Minuten kräftig geschüttelt. Die Pufferlösung wurde dann 45 Minuten im eiskalten Ultraschallbad beschallt und 5 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Anschließend wurde die Bürste entfernt und der Mucus bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

3.3.9 Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels Roti-Nanoquant

Von allen isolierten Proteinproben (humaner Mucus, muriner Mucus und Flagellen) wurde direkt nach der Isolation, sowie nach jedem Auftauen die Proteinkonzentration bestimmt. Zur Quantifizierung absoluter Proteinmengen wurde das Roti-Nanoquant System von der Firma Carl Roth GmbH verwendet. Hierfür wurde zuerst eine OD_{590/450}-Kalibrierungsgerade mit verschiedenen BSA-Konzentrationen erstellt (Nanoquant, Benutzerhandbuch). Am Photometer wurde der Quotient OD_{590/450} der Proben bestimmt. Mit diesem Wert und mit Hilfe der Gleichung der Kalibrierungsgeraden konnten dann die Konzentrationen der jeweiligen Proteinproben ermittelt werden.

3.3.10 ELISA zum Nachweis der direkten Interaktion isolierter Flagellen mit Mucin2, murinem Mucus und humanem Mucus

Für den Nachweis der direkten Interaktion zwischen isolierten Flagellen verschiedener Bakterienstämme und Mucin2 wurde ein Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) entwickelt. Eine 96-Kavitäten Platte (Nunc Immuno 96 MicroWell™ Solid Plates Maxisorp, Dänemark) wurde über Nacht zur einen Hälfte mit Mucin2 (5 µg/Kavität in PBS; V = 100 µl) zur anderen Hälfte mit Milchpulver (5 µg/Kavität in PBS; V = 100 µl) bei 4 °C beschichtet. Die Beschichtung mit Milchpulver diente als Negativkontrolle. Am nächsten Tag wurde die Mucinlösung und die Milchpulverlösung abgesaugt und die Platte unter der Sterilbank

getrocknet. Es wurden verschiedene Proteinkonzentrationen (2, 5 und 10 µg/ml) isolierter Flagellen zugegeben (50 µl/Kavität) und für 1 h bei RT inkubiert. Die Platte wurde dreimal mit PBS-T gewaschen und unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit 1% BSA in PBS für 4 h bei RT abgesättigt. Erneut wurde dreimal mit PBS-T gewaschen und anschließend der Primärantikörper (anti-FlaA, 1:1000 in PBS mit 1% BSA) für 1 h bei RT zugegeben (50 µl/Kavität). Die Platte wurde dreimal mit PBS-T gewaschen und der Sekundärantikörper (anti-Kaninchen, 1:5000 in PBS mit 1% BSA) für 1 h bei RT zugegeben (50 µl/Kavität). Danach wurde die Platte viermal mit PBS-T gewaschen. 50 µl TMB-Lösung pro Kavität zugegeben und die Platte für 20 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden 50 µl 500 mM H₂SO₄ zugegeben und die Absorption bei 450 nm im ELISA-Reader bestimmt.

Für die Bestimmung der Interaktion von Flagellen mit murinem oder humanem Mucus wurden die Platten jeweils mit den entsprechenden Mucusproben beschichtet (muriner Mucus: 50 µg/ml, humaner Mucus: 20 µg/ml).

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Auftauen von Zellen

Zum Ansetzen neuer Zellkulturen wurden die eingefrorenen Zellen in einem 37 °C warmen Wasserbad angetaut. Kurz bevor sich die Zellsuspension komplett verflüssigt hatte, wurden die Zellen in eine 75 cm²-Zellkulturflasche mit 20 ml frischem Zellkulturmedium überführt. Da das Einfriermedium das Zellgift DMSO enthielt, wurde spätestens nach 24 h ein Mediumwechsel durchgeführt.

3.4.2 Kultivierung von Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen im Brutschrank unter standardisierten Zellkulturbedingungen (37 °C, 5% CO₂, gesättigte Wasserstoffatmosphäre) kultiviert. Um eine ausreichende Nährstoffversorgung zu gewährleisten, wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen mit neuem Medium versorgt. Für einen einfachen Mediumwechsel wurde das verbrauchte Zellkulturmedium entfernt und 20 ml frisches Zellkulturmedium zugegeben. Das Wachstum der Zellen wurde täglich unter dem Mikroskop überprüft. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie gesplittet. Zum

Splitten der Zellen wurde ebenfalls das verbrauchte Zellkulturmedium abgenommen, 5 ml Trypsin/EDTA (1x) zugegeben und für einige Minuten (abhängig von Zelllinie und Passage) inkubiert, bis die Zellen anfangen, sich abzulösen. Das Trypsin wurde vorsichtig entfernt und die Zellen mit 5 ml frischem Zellkulturmedium von der Flasche gelöst. Die Zellen wurden bis zum Erreichen einer Einzelzellsuspension im Zellkulturmedium resuspendiert, und jeweils 1 ml davon in eine neue 75 cm² Zellkulturflasche überführt. Nach Zugabe von 19 ml frischem Zellkulturmedium wurden die Zellen unter standardisierten Zellkulturbedingungen weiter kultiviert.

3.4.3 Einfrieren von Zellen

Für 3 ml einzufrierende Zellsuspension wurden Zellen einer zu 95% konfluenten 75 cm²-Zellkulturflasche verwendet. Die Zellen wurden mit 1x Trypsin/EDTA Lösung behandelt, bis sie anfangen sich vom Flaschenboden loszulösen. Die Trypsin/EDTA Lösung wurde entfernt und die Zellen mit 3 ml Einfriermedium (70% Zellkulturmedium, 20% FCS, 10% DMSO) abgelöst, resuspendiert und anschließend auf zwei Kryoröhrchen verteilt. Die Kryoröhrchen wurden anschließend in das Kryoeinfriergerät (Mr. Frosty) überführt und dieses über Nacht bei -80 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte dann die Überführung in flüssigen Stickstoff.

3.5 Elektronenmikroskopie

Übernachtskulturen der jeweiligen Bakterienstämme wurden in sterilfiltriertem LB-Medium angesetzt und für 14 bis 16 h bei 37 °C als Standkulturen inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen in sterilfiltriertem ddH₂O 1:10 verdünnt. 5 µl dieser Bakteriensuspension wurden anschließend auf ein Kupfernetzchen gegeben und für 1 min bei RT inkubiert. Die Flüssigkeit wurde mit einem Filterpapier abgesaugt und 5 µl Uranylacetat (2% in H₂O) für 45 s bei RT auf das Netzchen gegeben. Das Uranylacetat wurde mit Filterpapier abgesaugt und das Netzchen getrocknet. Anschließend wurde es bis zur Mikroskopie in einer Aufbewahrungsbox gelagert.

3.6 Motilitätstest auf Schwärmagar

Um die Motilität der verschiedenen Bakterienstämme zu testen, kamen Schwärmagarplatten zum Einsatz. Dafür wurde eine sterile Pipettenspitze in eine Flüssigkultur der OD₆₀₀ = 0.1 getaucht und damit kurz und ganz vorsichtig die Oberfläche einer Schwärmagarplatte berührt.

Die Platten wurden bei 37 °C inkubiert und der Motilitätsfortschritt stündlich für insgesamt 24 h fotografisch festgehalten.

3.7 Dual-Luciferase-Assay

Das hier verwendete Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) besteht aus zwei Hauptkomponenten. Es werden die Aktivitäten der firefly-Luciferase von Leuchtkäfern (*Photinus pyralis*) und der *Renilla*-Luciferase von Seefedern (*Renilla reniformis*) gemessen. In diesem Versuch wurde ein Plasmid (pGL3-2) verwendet, in welches vor das Gen für die firefly-Luciferase der *hBD2*-Promotor kloniert wurde. Durch diese Kopplung erhielt man die Möglichkeit die Aktivität des Promotors zu bestimmen, da diese proportional zur produzierten Luciferase-Menge war. Um Unterschiede bei der Transfektionseffizienz und Pipettierungenauigkeiten auszugleichen wurde die *Renilla*-Luciferase als interne Kontrolle verwendet. Das verwendete Plasmid (pRL-SV40) enthielt neben dem Gen für die *Renilla*-Luciferase den konstitutiven Promotor SV40. Die Transfektion dieses Plasmids ermöglichte die Bestimmung eines Grundwertes, der dann mit den Werten der firefly-Luciferase ins Verhältnis gesetzt werden konnte.

3.7.1 Vorbereitung der Stimulanzien

Übernachtskulturen der zu testenden Bakterienstämme wurden 1:100 in 5 ml TSB-Medium verdünnt und bis zu einer $OD_{600} = 1,0$ als Standkultur kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien im Wasserbad bei 65 °C für 1 h hitzeinaktiviert. Die Bakterien wurden für 10 min mit dem Vortex Power Mix kräftig geschüttelt und anschließend für 10 min bei 4000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, 1:1 mit Zellkulturmedium verdünnt und bis zur Verwendung als Stimulans bei -20 °C gelagert. Das Bakteriensediment wurde in 5 ml TSB Medium resuspendiert, mit 5 ml Zellkulturmedium vermischt und ebenfalls bis zur Verwendung als Stimulans bei -20 °C gelagert.

3.7.2 Durchführung des Dual-Luciferase-Assay

Für den Dual-Luciferase-Assay wurde die humane Darmepithelzelllinie Caco-2 verwendet. Es wurden $3,0 \times 10^5$ Zellen/Kavität (24-Kavitäten-Platte) ausgesät und für 24 h bei 37 °C unter Standardbedingungen inkubiert. Waren die Zellen nach dieser Inkubation zu 70–80% konfluent, konnten sie für die Transfektion verwendet werden. Die Zellen wurden zweimal mit je 500 µl Dulbecco's PBS (1x) gewaschen und 400 µl DMEM (-FBS) in jede Kavität überführt. Zum DMEM (-FBS) wurden 100 µl Transfektionsmischung (Tabelle 13) kreisförmig eingetropft und für 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Als Kontrolle dienten Kavitäten, die 500 µl DMEM (-FBS) aber keine Transfektionsmischung enthielten.

Tabelle 13: Verwendete Transfektionsmischung

Bestandteil	Menge
pGL3-2 (<i>hBD2</i> - Promotor – firefly-Luciferase)	0,5 µg/Kavität
pRL-SV40 (<i>Renilla</i>)	0,05 µg/Kavität
X-treme GENE HP DNS Transfektions-Reagenz	1,65 µl/Kavität
DMEM (-FBS)	ad 100 µl/Kavität

Nach der 24-stündigen Inkubation mit der Transfektionsmischung wurde das Medium abgesaugt und 500 µl des entsprechenden, bei 37 °C vorgewärmten Stimulans zugegeben. Als Kontrolle für die spätere Berechnung wurde hier eine 1:1 Mischung aus DMEM (-FBS) und TSB-Medium verwendet. Nach 4 h Inkubation unter standardisierten Zellkulturbedingungen wurde das Medium verworfen, die Zellen mit 500 µl PBS (1x) gewaschen und 250 µl Lysis Puffer (PLB, 1x) zugegeben. Die 24-Kavitäten-Platte wurde unter Schütteln bei RT für 30 min inkubiert und das Zelllysate jeder Kavität in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C eingefroren.

Zur Messung am Luminometer wurden 40 µl des Zelllysates in eine weiße 96-Kavitäten-Platte überführt, 50 µl LARII-Reagenz in die Kavitäten gegeben und mit der Messung der firefly-Luciferase Aktivität begonnen. Danach wurde jeweils 50 µl Stop&Glo-Reagenz in die Kavitäten gegeben und die *Renilla*-Luciferase Aktivität gemessen. Die Zugabe des LARII-Reagenz induzierte die firefly-Reaktion. Das Stop&Glo-Reagenz beendet die firefly-Reaktion und induziert zugleich die *Renilla*-Reaktion, sowie die damit verbundene Lichtemission.

3.8 Adhäsionsassay

3.8.1 Adhäsionsassay mit Kryoschnitten humaner Darmbiopsien

3.8.1.1 Herstellen von Kryoschnitten humaner Darmbiopsien

Für die *ex vivo*-Adhäsionsstudien in dieser Arbeit wurden Darmbiopsien von drei gesunden Patienten verwendet, welche diesen während der Durchführung von Routinekoloskopien entnommen wurden. Alle Patienten gaben ihre schriftliche Einverständniserklärung zur Entnahme der Biopsien und die Studie wurde durch die zuständige Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg überprüft. Die Darmbiopsien stammten jeweils aus den vier Darmabschnitten: dem terminalen Ileum, Colon ascendens, Colon transversum und Colon descendens. Bis zur Herstellung der Kryoschnitte wurden die humanen Darmbiopsien bei -80 °C gelagert. Zur Vorbereitung für die Kryosektion wurden die Gewebeproben vorsichtig in ein mit dem Einbettmittel O.C.T. Compound gefülltes Förmchen überführt und mittig positioniert. Zum Festwerden des Einbettmittels wurden die Proben über Nacht bei -20 °C gelagert. Die Schnitte (10 µm) wurden am Mikrotom HM 500 OM hergestellt, auf Objektträger aufgenommen und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.8.1.2 Durchführung des Adhäsionsassays

Von den zu testenden Bakterienstämmen wurden zunächst Übernachtskulturen hergestellt und für 14 bis 16 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen 1:100 in 2 ml LB-Medium verdünnt und für 2 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die OD₆₀₀ der Kulturen wurde bestimmt und mit LB-Medium auf 0,2 eingestellt. Anschließend wurden die Bakterien 1:1 mit dH₂O, Mucin2 (0,2% und 5% in dH₂O) oder Gluconat (200 mM in dH₂O) vermischt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Kryoschnitte auf den Objektträgern mit einem Marker umrandet und in einer feuchten Kammer positioniert. 60 µl der jeweiligen Bakteriensuspensionen wurden auf jeweils einen Kryoschnitt gegeben und dann für 1 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Jeder Ansatz wurde dabei auf insgesamt mindestens zwei Kryoschnitte gegeben. Nach der Inkubation wurden die Objektträger fünfmal für je 1 min in einem Saline-Tauchbad gewaschen.

3.8.1.3 Fixierung und Färbung der Kryoschnitte

Die Objektträger mit den Kryoschnitten wurden 20 min in Methanol fixiert. Anschließend folgte die Färbung nach Pappenheim (Abbildung 7).

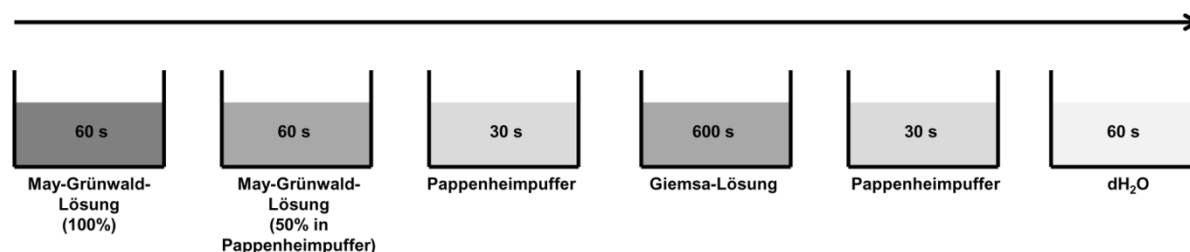


Abbildung 7: Schema zur Färbung von Präparaten nach Pappenheim.

Diese Färbemethode ist eine Kombination zweier verschiedener Färbelösungen, der May-Grünwald-Lösung und der Giemsa-Lösung. Gezeigt ist der Ablauf der Färbung mit Zeitangaben der jeweiligen Inkubationszeiten in s.

Nach dem Waschen wurden die Objektträger unter dem Abzug getrocknet und schließlich bis zur mikroskopischen Auswertung in Objektträgerboxen verwahrt.

3.8.1.4 Mikroskopische Auswertung

Die mikroskopische Auswertung der Adhäsionsversuche mit den Kryoschnitten humaner Darmbiopsien erfolgte am Durchlichtmikroskop Eclipse 50i der Firma Nikon. Für die Auszählung adhärenter Bakterien und die Bildaufnahme wurde mit dem 50x-Objektiv gearbeitet. Berücksichtigt man noch den Vergrößerungsfaktor des Okulars (10x), lag die Gesamtvergrößerung, mit der gearbeitet wurde, bei 500x. Zur Auszählung adhärenter Bakterien wurde das Softwareprogramm NIS-Elements D3.2 verwendet. Gezählt wurden die Bakterien innerhalb einer querschnittenen Krypte, in insgesamt 10 Krypten pro Kryoschnitt. Von jedem Kryoschnitt wurde abschließend mindestens eine Bildaufnahme mit der Kameraeinheit Nikon DS-Vi1 gemacht.

3.8.2 Adhäsionsassay mit Zellen

$2,5 \times 10^5$ Zellen/ml wurden in einer 24-Kavitäten Platte ausgesät (1 ml/Kavität) und unter standardisierten Zellkulturbedingungen für 24 h inkubiert. Von den Bakterienstämmen wurden zunächst Übernachtskulturen angesetzt und für 14 bis 16 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 2 h Kulturen vorbereitet. Nach der 2-stündigen Inkubation

wurde die OD₆₀₀ der Bakterien bestimmt und auf 0,1 eingestellt. Das Zellkulturmedium in den 24-Kavitätenplatten wurde durch frisches Medium (1 ml/Kavität) ersetzt und pro Kavität 25 µl der jeweiligen Bakterienkultur zugegeben. Die Zellen wurden 2 h mit den Bakterien unter standardisierten Zellkulturbedingungen inkubiert. Um nicht adhärenente Bakterien zu beseitigen, wurden die Zellen dreimal mit Saline (1 ml/Kavität) gewaschen. Pro Kavität wurde 1 ml Triton X-100 (0,1%) zugegeben und die Platte für 10 min unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert. Zur Bestimmung der KBEs wurden die Zell-Bakterien-Tritongemische entsprechend in Saline verdünnt, auf LB-Platten ausplattiert und für 14 bis 16 h bei 37 °C inkubiert.

Saline:	Natriumchlorid	9 g
	dH ₂ O	ad 1000 ml

3.8.3 Adhäsionsassays mit beschichteten Platten

3.8.3.1 Ermittlung der Adhäsion durch CFU-Bestimmung

Eine 24-Kavitäten Platte wurde über Nacht bei 4 °C mit Mucin2 (50 µg/ml) beschichtet. Übernachtskulturen der jeweiligen Bakterienstämme wurden angesetzt und für 14 bis 16 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Mucin2-Lösung abgesaugt und die Platte unter der Sterilbank getrocknet. Die Übernachtskulturen der Bakterien wurden 1:100 in LB-Medium verdünnt (V = 2 ml) und für 2 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die OD₆₀₀ wurde bestimmt, auf 0,1 eingestellt, 1 ml der jeweils entsprechenden Bakteriensuspension pro Kavität zugegeben und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Nichtadhärenente Bakterien wurden durch dreimaliges Waschen mit Saline entfernt, 1 ml Triton-X100 (0,1%) pro Kavität zugegeben und unter leichtem Schütteln für 10 min bei RT inkubiert. Adhärenente Bakterien wurden durch Abschaben mit einer blauen Pipettenspitze in die Tritonlösung aufgenommen und in neue 1,5 ml Reagenzgefäße überführt. Zur Bestimmung der KBEs wurden die Triton-Bakteriengemische entsprechend in Saline verdünnt, auf LB-Platten ausplattiert und für 14 bis 16 h bei 37 °C inkubiert.

3.8.3.2 Ermittlung der Adhäsion durch Fluoreszenzbestimmung

Für die Adhäsionsassays mit den Stämmen EcN Wildtyp pMW211, EcN ATHF pMW211 sowie EcN Δ *fliC* pMW211 wurde eine weiße 96-Kavitätenplatte über Nacht bei 4 °C mit Mucin2 (50 µg/ml) beschichtet. Übernachtkulturen der jeweiligen Bakterienstämme wurden angesetzt und für 14 bis 16 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Mucin2-Lösung abgesaugt und die Platte unter der Sterilbank getrocknet. Die OD₆₀₀ der Kulturen wurde bestimmt und auf 2,0 eingestellt. Die Bakterien wurden entweder mit Gluconat (200 mM) oder mit dH₂O 1:1 für 1 h vorinkubiert und anschließend jeweils 100 µl pro Kavität auf die Mucin2-beschichtete Platte gegeben. Jeder Ansatz wurde dabei in jeweils 12 Kavitäten überführt. Die Platte wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert, dreimal mit Saline gewaschen um nicht adhärenente Bakterien zu entfernen und 50 µl dH₂O pro Kavität zugegeben. Anschließend wurde die Fluoreszenz der adhärenenten Bakterien bei 544/590nm bestimmt. Zur Kontrolle wurde außerdem ein Faktor für die Fluoreszenzstärke der jeweiligen Bakterienstämme bestimmt, um darauf zurückzuführende Fluoreszenzschwankungen ausschließen zu können. Dazu wurde die OD₆₀₀ der jeweiligen Bakterienstämme auf 0,1 eingestellt, jeweils 100 µl eines entsprechenden Stammes in 12 Kavitäten überführt und deren Fluoreszenz bei 544/590nm bestimmt.

3.9 Färbung von Mucinen

Der Nachweis von Mucinen in Gewebeproben erfolgte mit Hilfe der PAS-Färbung. Hierfür wurde das PAS-Färbekit der Firma Carl Roth GmbH (Karlsruhe) verwendet. Für das Anfärben von Epithelzellen wurden diese zunächst in die Kavitäten eines Chamber Slides (Lab Tek™ Chamber Slides Permanox™ 8 well, Nunc) ausgesät, für 24 h unter standardisierten Zellkulturbedingungen kultiviert und anschließend nach Anleitung gefärbt. Die Färbung von Kryoschnitten erfolgte analog. Die gefärbten Präparate wurden am Durchlichtmikroskop Eclipse 50i der Firma Nikon betrachtet. PAS-positive Zellen erschienen rosa bis violett, Zellkerne dagegen blau gefärbt.

3.10 Computergestützte Analysen

Für standardmäßige Nukleotidsequenz-, Aminosäuresequenz- und Datenbankvergleiche wurde BLAST (*basic local alignment search tool*; Altschul *et al.*, 1990) unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, sowie ClustalX2 verwendet. Zur graphischen Darstellung von DNA Sequenzen kam VectorNTI™ v10 (Invitrogen), zur graphischen Darstellung von Aminosäuresequenzen das Programm GSview 5.0 zum Einsatz. Primer-Design wurde mittels FASTPCR (<http://primerdigital.com/fastpcr.html>) durchgeführt. Restriktionsschnittstellen für DNA-Sequenzen wurden mit VectorNTI™ v10 (Invitrogen) ermittelt. Die digitale Fotoverarbeitung erfolgte mit Adobe® Photoshop® Elements.

3.11 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 5. Zur Bestimmung der Signifikanz von Daten wurde der t-Test verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Überprüfung aller Stämme auf EcN-Identität mittels PCR

Um die EcN-Identität der verwendeten Stämme zu bestätigen, wurden diese mittels PCR-Reaktion sowohl auf Plasmid- als auch auf chromosomaler Ebene überprüft. Diese Überprüfungen wurden in regelmäßigen Abständen durchgeführt.

4.1.1 Plasmidebene

Für die PCR zum Nachweis der EcN spezifischen Plasmide pMUT1 und pMUT2 wurden die Primer Muta 5-10 (Tabelle 5) verwendet. Die Durchführung erfolgte in einer Multiplex-PCR, wie in der ursprünglichen Publikation (Blum-Oehler et al., 2003) beschrieben. Tabelle 14 zeigt sowohl die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes, als auch das PCR-Programm, mit welchem die Reaktion durchgeführt wurde.

Tabelle 14: Reaktionsansatz und –programm der PCR zum spezifischen Nachweis der Plasmide pMUT1 und pMUT2 von EcN

Reaktionsansatz		Reaktionsprogramm			Zyklen
DNA (ÜNK, aufgekocht)	1 µl	Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	1
dNTPs (jeweils 10 mM)	1 µl	Denaturierung	95 °C	45 s	35
MgCl ₂ (25 mM)	1,25 µl	Annealing	60 °C	45 s	
Muta 5, 7, 9 (100 pmol/µl)	je 1 µl	Elongation	72 °C	45 s	
Muta 6, 8, 10 (100 pmol/µl)	je 1 µl	Finale Elongation	72 °C	10 min	1
5x GoTaq® Flexi Puffer	10 µl				
GoTaq® Flexi DNA Polymerase	0,25 µl				
dH ₂ O	ad 50 µl				

Tabelle 15 zeigt die Größe der durch die eingesetzten Primerpaare amplifizierten PCR-Produkte, sowie das Plasmid welches nachgewiesen wird.

Tabelle 15: Größe der amplifizierten PCR-Produkte beim Nachweis der EcN-spezifischen Plasmide pMUT1/pMUT2

Primerpaar	Größe des amplifizierten PCR-Produkts	Nachweis von
Muta 5/6	361 bp	pMUT1
Muta 7/8	427 bp	pMUT2
Muta 9/10	313 bp	pMUT2

Abbildung 8 zeigt beispielhaft einen PCR-Screen für den Nachweis der EcN-spezifischen Plasmide pMUT1 und pMUT2. Überprüft wurden in dieser Reaktion die Stämme EcN Wildtyp, EcN ATHF, EcN $\Delta fliC$, EcN $\Delta fliC$ pDB2, EcN Δfim , EcN Δfoc , EcN $\Delta fim\Delta foc$, EcN Δcsg , CFT073 Wildtyp, CFT073 $\Delta fliC$, UPEC 536 und *E. coli* MG1655. Für alle EcN-Stämme konnten die beiden Plasmide pMUT1 und pMUT2 nachgewiesen werden, nicht jedoch für die vier anderen getesteten *E. coli* Stämme.

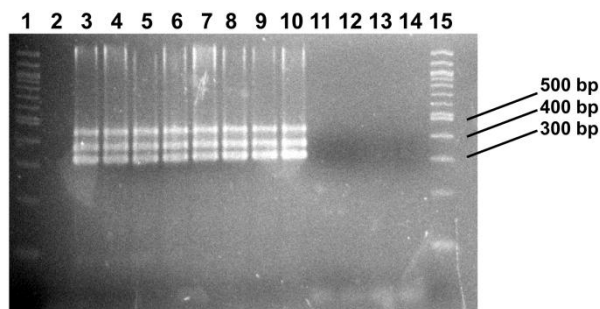


Abbildung 8: PCR-Screen zum Nachweis der EcN-spezifischen Plasmide pMUT1 und pMUT2.

Durchgeführt wurde eine Multiplex-PCR mit den Primern Muta 5-10; Spur 1 und 15: 100 bp DNA-Leiter (Fermentas); Spur 2: Negativkontrolle (dH₂O), Spur 3: EcN Wildtyp; Spur 4: EcN ATHF; Spur 5: EcN $\Delta fliC$, Spur 6: EcN $\Delta fliC$ pDB2; Spur 7: EcN Δfim ; Spur 8: EcN Δfoc ; Spur 9: EcN $\Delta fim\Delta foc$; Spur 10: EcN Δcsg ; Spur 11: CFT073 Wildtyp; Spur 12: CFT073 $\Delta fliC$; Spur 13: UPEC 536; Spur 14: *E. coli* MG1655;

4.1.2 Chromosomale Ebene

Mit den drei Primerpaaren 1L2, 1R2, 4L2, 4R2, 5L1, sowie 5R1 wurden für EcN spezifische chromosomale Abschnitte nachgewiesen. Tabelle 16 zeigt sowohl die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes, als auch das PCR-Programm, mit welchem die Reaktion durchgeführt wurde.

Tabelle 16: Reaktionsansatz- und Programm für den Nachweis EcN-spezifischer chromosomaler Abschnitte

Reaktionsansatz		Reaktionsprogramm			Zyklen
DNA (ÜNK, aufgekocht)	1 µl	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1
dNTPs (jeweils 10 mM)	1 µl	Denaturierung	95 °C	45 s	30
MgCl ₂ (25 mM)	1,25 µl	Annealing	55 °C	60 s	
1L2, 4L2, 5L1 (100 pmol/µl)	je 1 µl	Elongation	72 °C	30 s	
1R2, 4R2, 5R1 (100 pmol/µl)	je 1 µl	Finale Elongation	72 °C	10 min	1
5x GoTaq® Flexi Puffer	10 µl				
GoTaq® Flexi DNA Polymerase	0,25 µl				
dH ₂ O	ad 50 µl				

Tabelle 17 zeigt die Größe der durch die eingesetzten Primerpaare amplifizierten PCR-Produkte.

Tabelle 17: Größe der amplifizierten PCR-Produkte zum EcN-spezifischen Nachweis auf chromosomaler Ebene

Primerpaar	Größe des amplifizierten PCR-Produkts
1L2/1R2	103 bp
4L2/4R2	186 bp
5L1/5R1	232 bp

Abbildung 9 zeigt beispielhaft einen PCR-Screen zum Nachweis EcN-spezifischer chromosomaler Sequenzen. Überprüft wurden in dieser Reaktion die Stämme EcN Wildtyp, EcN ATHF, EcN $\Delta fliC$, EcN $\Delta fliC$ pDB2, EcN Δfim , EcN Δfoc , EcN $\Delta fim\Delta foc$, EcN Δcsg , CFT073 Wildtyp, CFT073 $\Delta fliC$, UPEC 536 und *E. coli* MG1655. Für alle EcN-Stämme konnten die drei EcN-spezifischen chromosomalen Abschnitte nachgewiesen werden, nicht jedoch für die vier anderen getesteten *E. coli* Stämme.

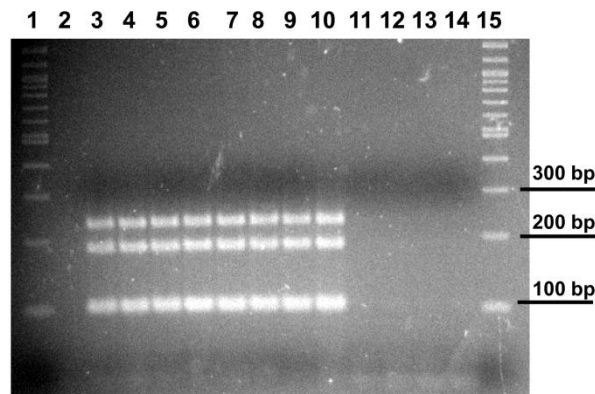


Abbildung 9: PCR Screen zum Nachweis EcN-spezifischer chromosomaler Sequenzen.

Durchgeführt wurde eine Multiplex-PCR mit den Primern 1L2, 1R2, 4L2, 4R2, 5L1 und 5R2; Spur 1 und 15: 100 bp DNA-Leiter (Fermentas); Spur 2: Negativkontrolle (dH₂O), Spur 3: EcN Wildtyp; Spur 4: EcN ATHF; Spur 5: EcN Δ fliC, Spur 6: EcN Δ fliC pDB2; Spur 7: EcN Δ fim; Spur 8: EcN Δ foc; Spur 9: EcN Δ fim Δ foc; Spur 10: EcN Δ csg; Spur 11: CFT073 Wildtyp; Spur 12: CFT073 Δ fliC; Spur 13: UPEC 536; Spur 14: *E. coli* MG1655;

4.2 Charakterisierung der hyperflagellierten EcN-Variante ATHF

Die während eines U-Röhrchen-Experiments (3.1.3) isolierte hyperflagellierte EcN-Variante ATHF wurde durch verschiedene Tests und Experimente weiter charakterisiert.

4.2.1 Motilitätstest

Um die Beweglichkeit der isolierten EcN-Variante ATHF zu testen, wurden Schwärmagartests wie beschrieben (3.6) durchgeführt. Abbildung 10 zeigt die Stämme EcN Wildtyp, EcN ATHF, EcN Δ fliC und EcN Δ fliC pDB2 nach jeweils 4, 12 und 24 Stunden Inkubation der Platten bei 37 °C.

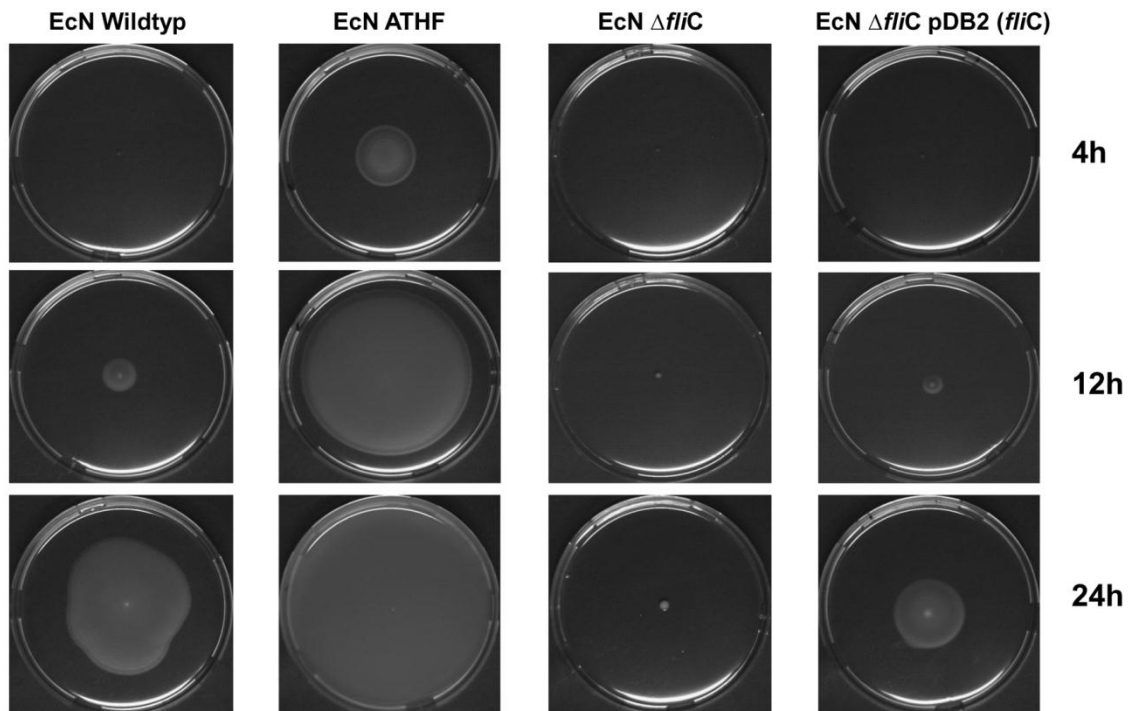


Abbildung 10: Motilitätstest auf Schwärmagar.

Getestet wurde die Motilität der Stämme EcN Wildtyp, EcN ATHF, EcN $\Delta fliC$ und EcN $\Delta fliC$ pDB2. Die Aufnahmen entstanden nach 4 h, 12 h und 24 h Inkubation bei 37 °C.

Im Vergleich zum Wildtypstamm war die isolierte EcN-Variante ATHF wesentlich beweglicher und zeigte schon innerhalb der ersten vier Stunden ausgeprägtes Schwärmverhalten auf den Platten. Für die nichtflagellierte EcN-Mutante EcN $\Delta fliC$, konnte dahingegen wie erwartet keine Motilität beobachtet werden. Die Komplementante EcN $\Delta fliC$ pDB2 war wiederum beweglich, wenn auch in etwas geringerem Ausmaß als der Wildtyp.

4.2.2 Elektronenmikroskopie

Um die Flagellenexpression zu untersuchen, wurden Präparate des EcN ATHF, sowie weiterer EcN-Stämme für die Elektronenmikroskopie wie beschrieben (3.5) vorbereitet. Abbildung 11 zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen der Stämme EcN Wildtyp, EcN ATHF, EcN $\Delta fliC$ und EcN $\Delta fliC$ pDB2.

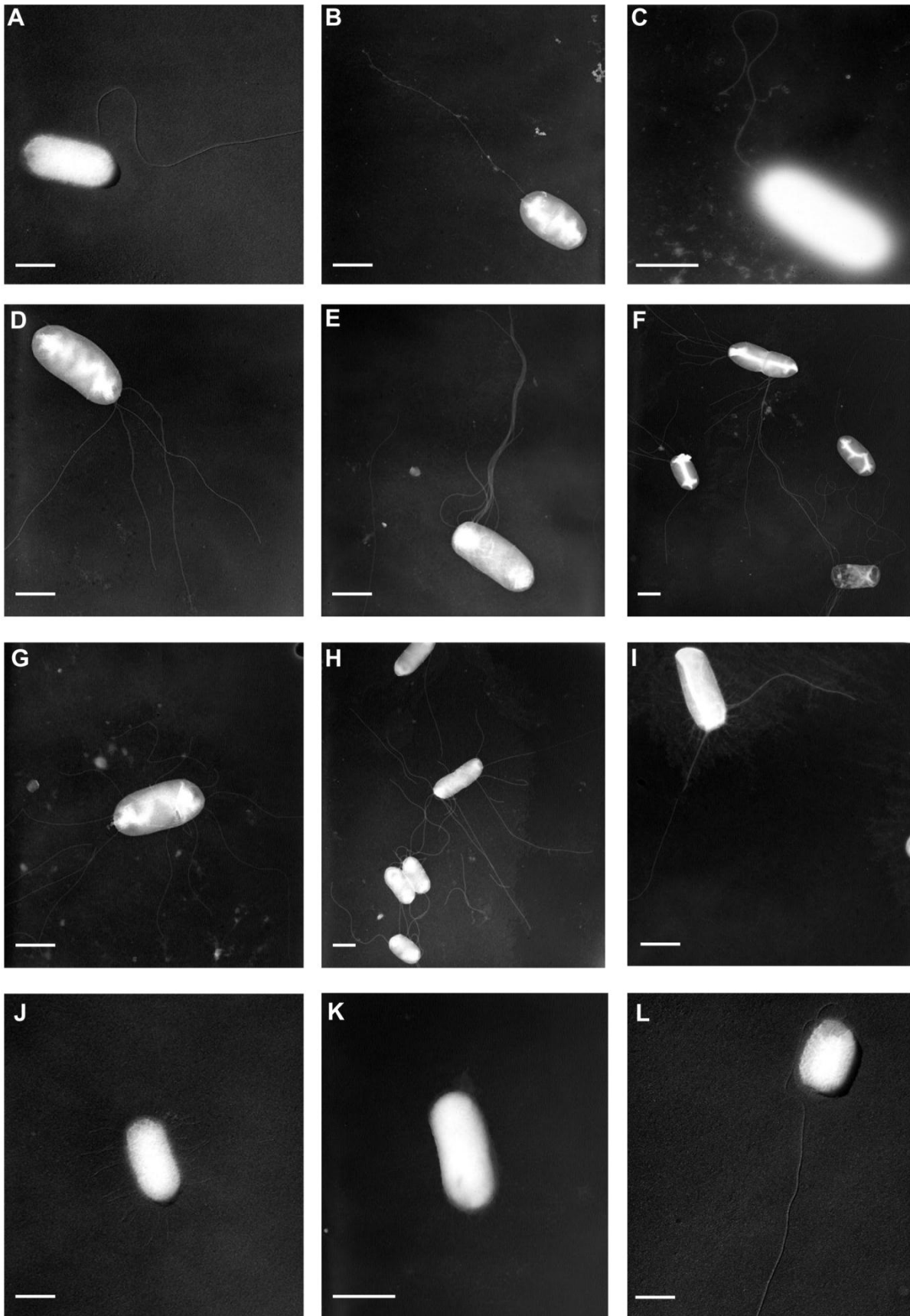


Abbildung 11: Elektronenmikroskopische Aufnahmen zur Charakterisierung von EcN ATHF.

A-C: EcN Wildtyp (monotriche Flagellierung); D-I: EcN ATHF (polytriche Flagellierung); J, K: EcN Δ *fliC* (keine Flagellierung); L: EcN Δ *fliC* pDB2 (wenn flagelliert, dann monotriche Flagellierung); Maßstrich: 1 μ m.

Durch die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde offensichtlich, dass EcN Wildtyp monotrich flagelliert ist. EcN ATHF exprimiert im Gegensatz dazu multiple Flagellen, ist also polytrich begeißelt. Die Mutante EcN $\Delta fliC$ ist unflagelliert, somit konnte wie erwartet keine Expression von Flagellen beobachtet werden. Die Komplementante EcN $\Delta fliC$ pDB2 ist jedoch wieder in der Lage Flagellen auszubilden. Zusätzlich zu diesen bildlich festgehaltenen phänotypischen Beobachtungen wurde jeweils die Anzahl der Flagellen pro Bakterium, von insgesamt 120 Bakterienzellen pro Stamm, bestimmt (Tabelle 18).

Tabelle 18: Durchschnittliche Anzahl der Flagellen pro Bakterium der verschiedenen Stämme

Bakterienstamm	EcN Wildtyp	EcN ATHF	EcN $\Delta fliC$	EcN $\Delta fliC$ pDB2
Durchschnittliche Anzahl der Flagellen (minimal-maximal)	0,92 (0-1)	5,17 (1-15)	0 (0)	0,53 (0-1)

Die durchschnittliche Anzahl der Flagellen pro Bakterium von 0,92 des EcN Wildtyps hat ihre Ursache darin, dass für einige wenige Bakterien elektronenmikroskopisch keine Flagelle zu erkennen war. Dies ist vermutlich auf das Abreißen einzelner Flagellen während der Vorbereitung der Präparate zurückzuführen, da auch einzelne „bakterienlose“ Flagellen sichtbar waren. Generell konnte beobachtet werden, dass EcN ATHF immer mehrere Flagellen pro Bakterienzelle exprimiert, jedoch schwankte die Anzahl ziemlich stark und es kam auch hier zum Abriss einzelner Flagellen während der Probenvorbereitung. Die durchschnittliche Anzahl der Flagellen pro Bakterienzelle lag bei ungefähr 5 (5,17), die tatsächliche Anzahl variierte jedoch stark zwischen den einzelnen Bakterien (1 bis 15 Flagellen pro Bakterienzelle). Die durchschnittliche Anzahl der Flagellen der *fliC*-Deletionsmutante lag wie erwartet bei 0. Die Komplementante EcN $\Delta fliC$ pDB2 mit einer durchschnittlichen Flagellenanzahl von 0,52 war zwar durchaus in der Lage Flagellen auszubilden, jedoch scheinen ca. die Hälfte der Bakterien entweder keine Flagellen zu exprimieren oder diese während der Probenvorbereitung verloren zu haben.

4.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration des produzierten Flagellins mittels Western Blot und Roti-Nanoquant

Zur Bestimmung der produzierten Flagellinmenge einzelner Bakterienstämme wurden Western Blots mit Gesamtzellprotein, sowie mit isolierten Flagellen durchgeführt. Zusätzlich wurde der Gesamtproteingehalt der isolierten Flagellen mittels Roti-Nanoquant bestimmt.

4.2.3.1 Western Blot mit Gesamtzellprotein

Für den Western Blot mit Gesamtzellprotein wurden Übernachtskulturen der Bakterienstämme EcN Wildtyp, EcN ATHF, EcN Δ fliC, EcN Δ fliC pDB2, CFT073 Wildtyp, CFT073 Δ fliC und UPEC 536 verwendet. Die OD₆₀₀ der Übernachtskulturen wurde auf 1,0 eingestellt und dann 20 μ l der einzelnen Kulturen mit 5 μ l Lämmli-Puffer (5x) versetzt. Die Proben wurden aufgekocht und für 2 h bei 120 V in einem SDS-Gel (12%) aufgetrennt. Anschließend wurde ein Western Blot durchgeführt und durch Antikörperreaktion mit dem anti-FlaA-Serum die jeweils vorhandene Flagellinmenge sichtbar gemacht. Insgesamt wurden drei SDS-Gele hergestellt, die beiden anderen wurden Coomassie- und silbergefärbt.

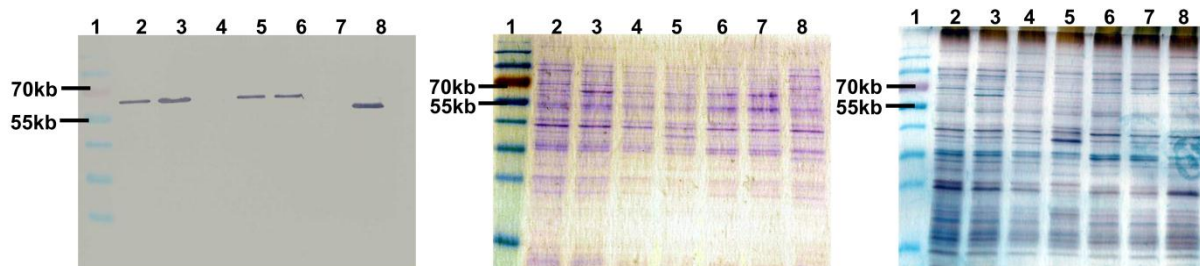


Abbildung 12: Western Blot (links) von Gesamtzellprotein verschiedener EcN- und UPEC-Stämme und dazugehörige Coomassie- (Mitte) und silber- (rechts) gefärbte SDS-Gele.

1: Marker; 2: EcN Wildtyp; 3: EcN ATHF, 4: EcN Δ fliC; 5: EcN Δ fliC pDB2; 6: CFT073 Wildtyp; 7: CFT073 Δ fliC ; 8: UPEC 536. Im Western Blot wurde das Flagellin in Übernachtskulturen verschiedener EcN- und UPEC-Stämme mit dem anti-FlaA Antikörper nachgewiesen. Die gefärbten SDS-Gele zeigen die gesamten Zellproteine der Bakterien. FliC von EcN 1917 und UPEC CFT073 besitzt ein Molekulargewicht von 60,9 kDa, FliC von UPEC 536 besitzt ein Molekulargewicht von 56,6 kDa.

Im Western Blot war gut zu erkennen, dass EcN ATHF im Vergleich zum EcN Wildtyp wesentlich mehr Flagellin produzierte. Wie erwartet exprimierten weder EcN Δ fliC, noch CFT073 Δ fliC Flagellin. EcN Δ fliC pDB2 und CFT073 Wildtyp produzierten in etwa genauso viel Flagellin wie der EcN Wildtyp. Der UPEC-Stamm 536 exprimierte dahingegen wesentlich mehr Flagellin. Die Färbung der gesamten Proteine auf den SDS-Gele zeigte, dass die Silberfärbung vor allem im niedermolekularen Bereich die sensitivere Färbemethode zum Nachweis von Proteinen ist.

4.2.3.2 Western Blot mit isolierten Flagellen

Die Flagellen wurden von den Stämmen EcN Wildtyp, EcN ATHF, EcN $\Delta fliC$, EcN $\Delta fliC$ pDB2, CFT073 Wildtyp, CFT073 $\Delta fliC$ und UPEC 536 wie beschrieben (3.3.6) isoliert, 20 μ l der einzelnen Flagellenlösungen mit 5 μ l Lämmli-Puffer (5x) versetzt, für 10 min bei 95 °C aufgeköcht und für 2 h bei 120 V in einem SDS-Gel (12%) aufgetrennt. Anschließend wurde ein Western Blot durchgeführt und durch Antikörperreaktion mit dem anti-FlaA-Serum die jeweils vorhandene Flagellinmenge sichtbar gemacht. Insgesamt wurden drei SDS-Gele hergestellt, die beiden anderen wurden Coomassie- und silbergefärbt.

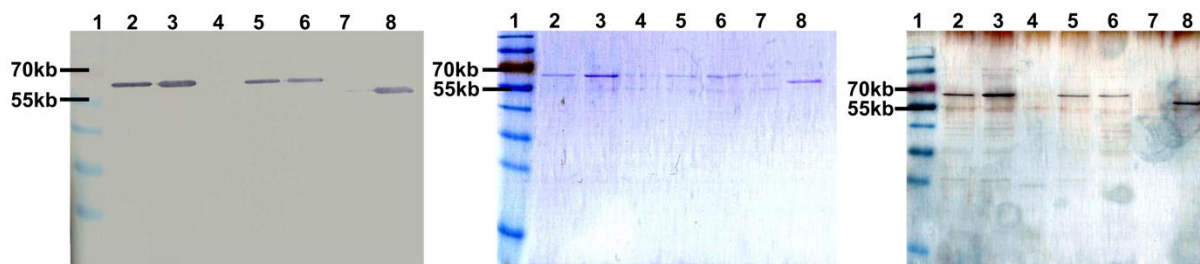


Abbildung 13: Western Blot (links) isolierter Flagellen verschiedener EcN- und UPEC-Stämme und dazugehörige Coomassie- (Mitte) und silber- (rechts) gefärbte SDS-Gele.

1: Marker; 2: EcN Wildtyp; 3: EcN ATHF, 4: EcN $\Delta fliC$; 5: EcN $\Delta fliC$ pDB2; 6: CFT073 Wildtyp; 7: CFT073 $\Delta fliC$; 8: 536. Im Western Blot wurde das Flagellin in Proben isolierter Flagellen verschiedener EcN- und UPEC-Stämme mit dem anti-FlaA Antikörper nachgewiesen. Die gefärbten SDS-Gele zeigen die gesamten Proteine in den Proben der isolierten Flagellen der Bakterien. FliC von EcN 1917 und UPEC CFT073 besitzt ein Molekulargewicht von 60,9 kDa, FliC von UPEC 536 besitzt ein Molekulargewicht von 56,6 kDa.

Vergleicht man die Flagellinmenge der isolierten Flagellen von den verschiedenen Stämmen, so fällt auf, dass im Vergleich zum Wildtyp aus EcN ATHF wesentlich mehr Flagellin isoliert werden konnte. Die Flagellinmengen aus den Proben isolierter Flagellen von EcN $\Delta fliC$ pDB2 und CFT073 Wildtyp entsprachen in etwa der aus dem Wildtyp isolierten Flagellinmenge. Aus dem UPEC-Stamm 536 konnte wiederum eine wesentlich höhere Menge an Flagellin gewonnen werden. Wie erwartet wurde im Western Blot kein Flagellin für die Proben isolierter Flagellen von EcN $\Delta fliC$ und CFT073 $\Delta fliC$ nachgewiesen. Die Färbung der gesamten Proteine der Proben isolierter Flagellen zeigte jedoch auch bei diesen beiden Stämmen die Präsenz einiger Proteine. Diese wurden vermutlich bei der Methode zur Isolierung der Flagellen mit gewonnen, machten jedoch nur einen sehr kleinen Teil der gesamten Proteine aus. Bei den vielen zusätzlichen Proteinbanden in den Proben isolierter Flagellen der anderen Stämme könnte es sich um Abbauprodukte des Flagellins handeln, allerdings werden diese im Western Blot nicht mehr detektiert. Es könnte auch sein, dass durch das Fehlen des FliC in den Stämmen EcN $\Delta fliC$ und CFT073 $\Delta fliC$ die Expression anderer Proteine unterdrückt wird und deshalb weniger Proteinbanden zu sehen sind.

4.2.3.3 Bestimmung der Flagellinmenge mittels Roti-Nanoquant

Mit Hilfe des Roti-Nanoquant-Messsystems ist es möglich, anhand einer vorher erstellten BSA-Eichgerade, die Konzentration einer Proteinprobe zu ermitteln (3.3.9). Auf diese Weise wurde die Konzentration der aus den Stämmen EcN Wildtyp, EcN ATHF, EcN Δ fliC, EcN Δ fliC pDB2, CFT073, CFT073 Δ fliC und UPEC 536 jeweilig isolierten Flagellinproben ermittelt. Tabelle 19 zeigt die jeweiligen Proteinkonzentrationen der von den verschiedenen Stämmen isolierten Flagellen.

Tabelle 19: Proteinkonzentrationen (= c) der isolierten Flagellen verschiedener EcN- und UPEC-Stämme

Stamm	EcN Wildtyp (μ g/ml)	EcN ATHF (μ g/ml)	EcN Δ fliC (μ g/ml)	EcN Δ fliC pDB2 (μ g/ml)	UPEC CFT073 (μ g/ml)	CFT073 Δ fliC (μ g/ml)	UPEC 536 (μ g/ml)
c (Isolierung 1)	19,5	41,3	2,7	17,5	18,9	1,8	35,6
c (Isolierung 2)	24,8	37,5	3,1	21,1	20,3	2,3	39,2
c (Isolierung 3)	21,9	38,9	4,0	19,2	19,4	2,7	34,8
c (gesamt)	22 \pm 3	39 \pm 2	3 \pm 1	19 \pm 2	19 \pm 1	2 \pm 1	37 \pm 3

Für die isolierten Flagellen des hyperflagellierten EcN Stammes ATHF konnte wie erwartet stets eine wesentlich höhere Proteinkonzentration gemessen werden als für die isolierten Proben des EcN Wildtyps. Dass auch bei der EcN Δ fliC Mutante eine geringe Proteinkonzentration gemessen wurde, liegt daran, dass bei der Isolierung der Flagellen zwar hauptsächlich die Flagellen, zu einem geringen Anteil aber auch noch andere Oberflächenproteine isoliert und bei der Proteinbestimmung dann mit erfasst wurden.

4.2.4 Bestimmung der hBD2-Induktion mittels Dual-Luciferase-Assay

Wie bereits gezeigt wurde, ist neben anderen Faktoren die Flagelle des probiotischen *E. coli* Stammes Nissle 1917 für die Induktion der hBD2-Produktion verantwortlich (Schlee et al., 2007). Dementsprechend sollte die Hyperflagellierung dieses Stammes auch zu einer besseren Induktion der hBD2-Produktion führen. Dies wurde in Dual-Luciferase-Versuchen mit den humanen Epithelzellen Caco-2 wie beschrieben (3.7) überprüft.

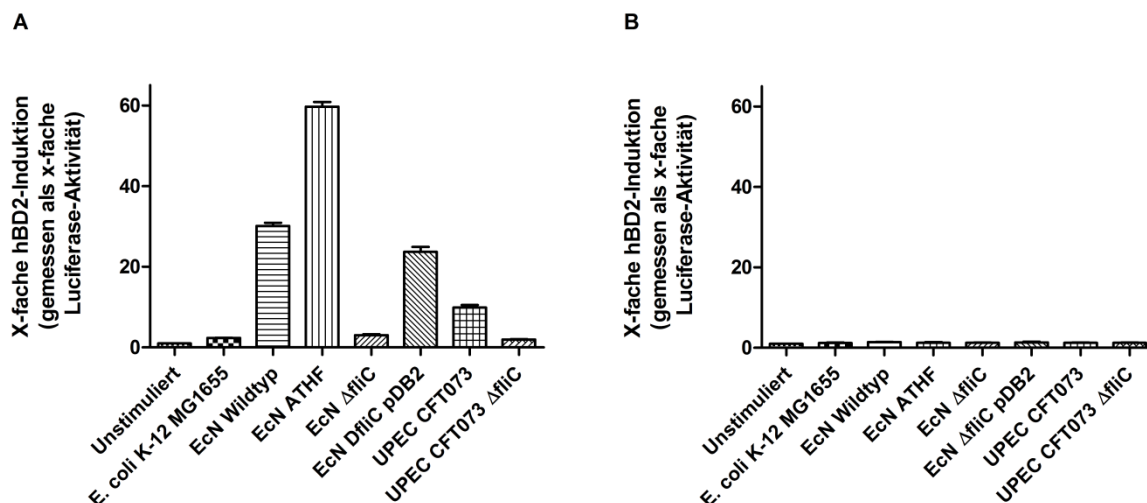


Abbildung 14: Gemessene hBD2-Induktion nach Stimulierung durch den Überstand (A) bzw. durch das Pellet (B).

Die gemessene Fluoreszenzstärke entspricht der Stärke der hBD2-Induktion; der Fluoreszenzwert, bzw. die hBD2-Induktion der unstimulierten Probe wurde gleich 1 gesetzt und dementsprechend die Werte für die anderen Stimulanzen ermittelt. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt und die jeweiligen Messwerte gemittelt aufgetragen. Fehlerbalken: + Standardabweichung

Wie in Abbildung 14B zu erkennen ist, konnte durch den Einsatz der Stimulanzen, die zuvor aus dem Pellet gewonnen wurden (3.7.1), keinerlei hBD2-Produktion induziert werden. Abbildung 14A dahingegen zeigt, dass durch den Einsatz der Stimulanzen, die aus dem Überstand der Stämme EcN Wildtyp, EcN ATHF, EcN Δ fliC pDB2 sowie UPEC CFT073 gewonnen wurden, die hBD2-Produktion durch Caco-2-Zellen induziert werden konnte. Wie erwartet verstärkte der Einsatz von EcN ATHF die Induktion der hBD2-Produktion im Vergleich zum Wildtyp um fast 100%. Für den uropathogenen Stamm CFT073 konnte zwar eine Induktion der hBD2-Produktion gemessen werden, jedoch war dies nicht mit dem Effekt des EcN Wildtyps vergleichbar. Die Stimulanzen aus den Überständen der flagellennegativen Mutanten EcN Δ fliC und CFT Δ fliC zeigten keinerlei Effekt auf die hBD2-Induktion.

4.2.5 PCR zur Überprüfung auf Insertion von IS-Elementen

In *E. coli* müssen mindestens 14 Operons in einer regulierten Kaskade exprimiert werden, um eine funktionierende Flagelle auszubilden (Chilcott und Hughes, 2000). Das *flhD*-Operon wurde dabei als primäres Ziel für die Regulation durch zahlreiche Umweltfaktoren identifiziert (Soutourina und Bertin, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass die Insertionselemente IS1 und IS5 sich spontan in den regulatorischen Bereich des *flhD*-Operons einbauen können, was zu einer erhöhten Expression und damit zu erhöhter Motilität führt (Barker et al., 2004). Isolate ohne IS1-Element stromaufwärts vom *flhD*-Promotor waren kaum beweglich. Um zu testen, ob die Insertion eines solchen IS-Elements in den regulatorischen Bereich des *flhD*-Operons von *E. coli* Nissle 1917 für die Motilitätsunterschiede zwischen EcN Wildtyp und EcN ATHF verantwortlich ist, wurde eine PCR wie bereits beschrieben (Barker et al., 2004) durchgeführt. Zwei separate Reaktionen wurden realisiert. In beiden Ansätzen wurde der gleiche reverse-Primer IS-R verwendet, jedoch zwei unterschiedliche forward-Primer (IS-F 1 und IS-F 2), jeweils einer stromaufwärts und stromabwärts einer Einbaustelle für ein IS-Element (Abbildung 15).

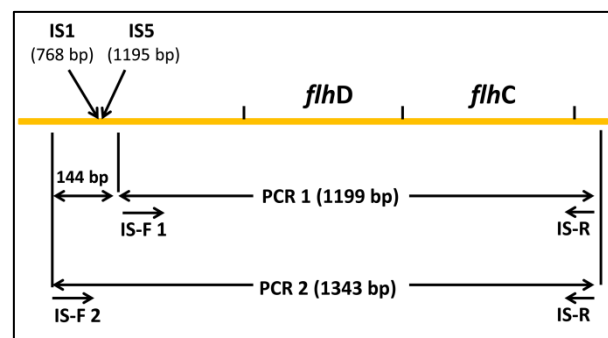


Abbildung 15: Skizzierung des *flhD*-Operons (modifiziert nach Barker et al, 2004).

Das *flhD*-Operon besteht aus den zwei Genen *flhD* und *flhC*; die Bindestellen der Primer sind eingezeichnet; Die Reaktion mit den Primern IS-F 1 und IS-R führt zu einem PCR-Produkt von 1,2 kb; die Reaktion mit den Primern IS-F 2 und IS-R ergab PCR-Produkt von 1,34 kb (ohne Insertion).

Tabelle 20 zeigt sowohl die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes, als auch das PCR-Programm, mit welchem die Reaktion durchgeführt wurde.

Tabelle 20: Reaktionsansatz und –programm der PCR zum Nachweis des Einbaus von IS-Elementen in den regulatorischen Bereich des *flhD*-Operons

Reaktionsansatz		Reaktionsprogramm			Zyklen
DNA (ÜNK, aufgekocht)	1 µl	Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	1
dNTPs (jeweils 10 mM)	1 µl	Denaturierung	95 °C	60 s	30
MgCl ₂ (25 mM)	1,25 µl	Annealing	55 °C	60 s	
IS-F1 oder IS-F2 (100 pmol/µl)	je 1 µl	Elongation	72 °C	4 min	
IS-R (100 pmol/µl)	je 1 µl	Finale Elongation	72 °C	10 min	1
5x GoTaq® Flexi Puffer	10 µl				
GoTaq® Flexi DNA Polymerase	0,25 µl				
dH ₂ O	ad 50 µl				

Die PCR-Proben wurden auf einem Agarosegel (1%) aufgetrennt und nach der Färbung im Ethidiumbromidbad unter UV-Licht analysiert (Abbildung 16).

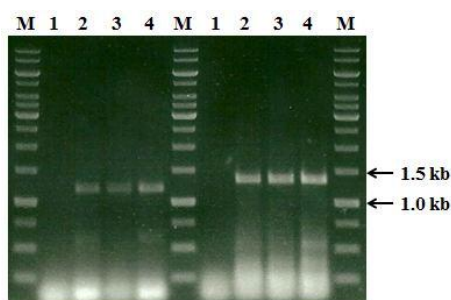


Abbildung 16: PCR-Screen für die IS-Element Insertion in die regulatorische Region des *flhD*-Operons.

1 = Negativkontrolle; 2 = EcN Wildtyp; 3 = EcN ATHF; 4 = EcN Δ *fliC*; M = 1 kb DNA-Leiter (Fermentas)

Der PCR-Screen zeigte, dass keine Insertion eines IS-Elements bei einem der drei getesteten EcN-Stämme vorliegt und somit eine IS-Elementinsertion als molekulare Ursache für den Unterschied der Flagellierung zwischen EcN Wildtyp und EcN ATHF ausgeschlossen werden kann.

4.2.6 Sequenzierung des *lrhA*-Gens

Der LysR-ähnliche Transkriptionsregulator LrhA kontrolliert Gene, welche in Flagellierung, Bewegung und Chemotaxis involviert sind (Lehnen et al., 2002). Es wurde gezeigt, dass eine Mutation im *lrhA*-Gen von *E. coli* K-12 die Ausbildung einer wesentlich höheren Anzahl an Flagellen verursacht. Um zu untersuchen, ob solch eine Mutation im *lrhA*-Gen die Ursache für die Hyperflagellierung von EcN ATHF ist, wurde dieses Gen aus EcN Wildtyp und EcN

ATHF sequenziert und beide Sequenzen im BLAST-Programm miteinander verglichen. Der Vergleich der Sequenzen (7.1) zeigte eine 100%-ige Übereinstimmung, so dass eine Mutation im *lrhA*-Gen als Ursache für die Hyperflagellierung von EcN ATHF ausgeschlossen werden kann.

4.3 Adhäsionsstudien

4.3.1 Adhäsion von EcN an Kryoschnitte humaner Darmbiopsien

Um die Adhäsionseigenschaften verschiedener EcN-Stämme an Kryoschnitte humaner Darmbiopsien zu untersuchen, wurden Adhäsionsexperimente mit den Stämmen EcN Wildtyp, EcN ATHF, EcN $\Delta fliC$, EcN $\Delta fliC$ pDB2, sowie den Fimbrien-negativen Mutanten EcN Δfim , EcN Δfoc und EcN $\Delta fim\Delta foc$ wie beschrieben (3.8.1.2) durchgeführt. Die Adhäsionseffizienzen an die jeweils vier verschiedenen Darmabschnitte (terminales Ileum, Colon ascendens, Colon transversum und Colon descendens) wurden von insgesamt drei Spendern bestimmt (Abbildung 17).

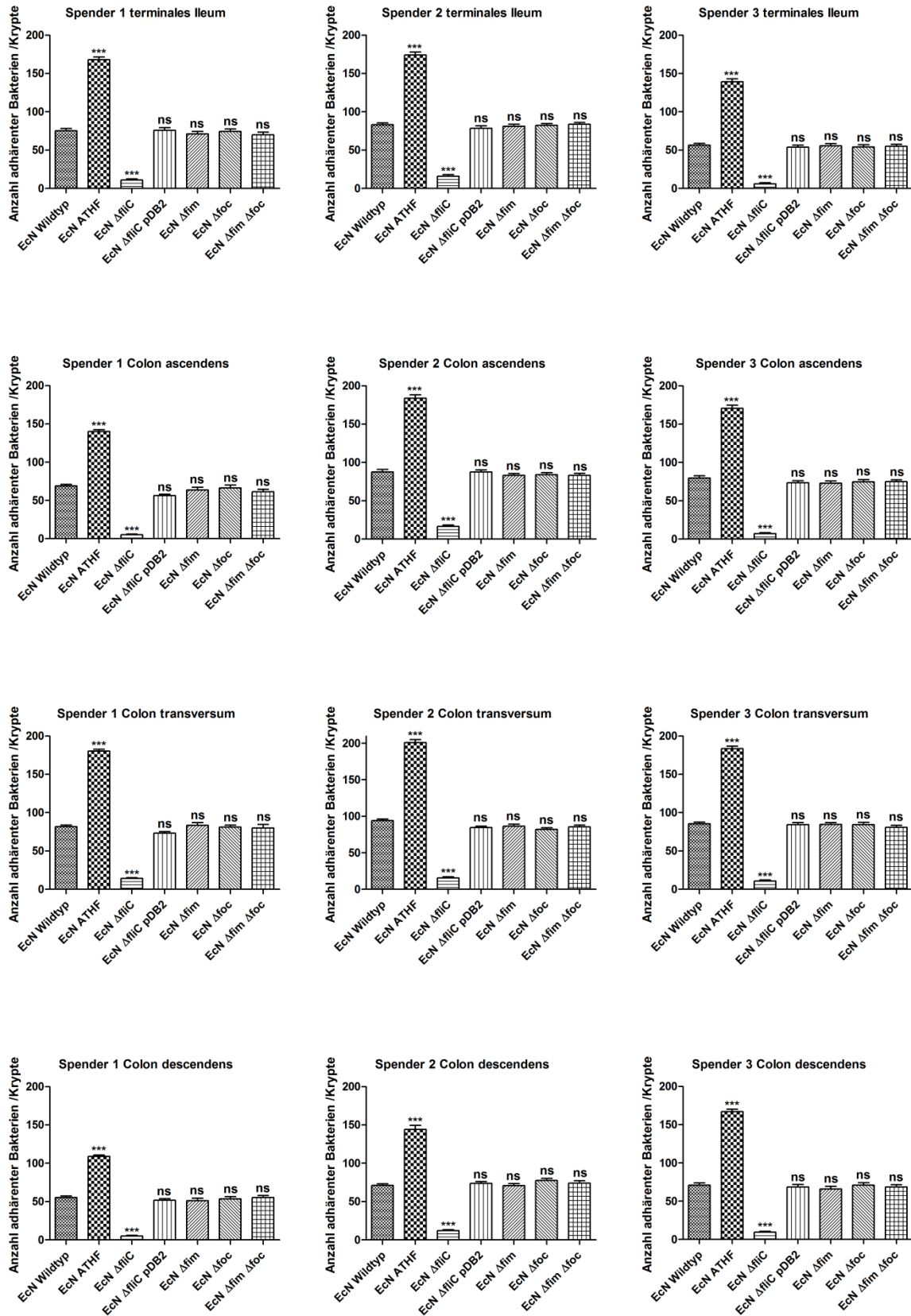
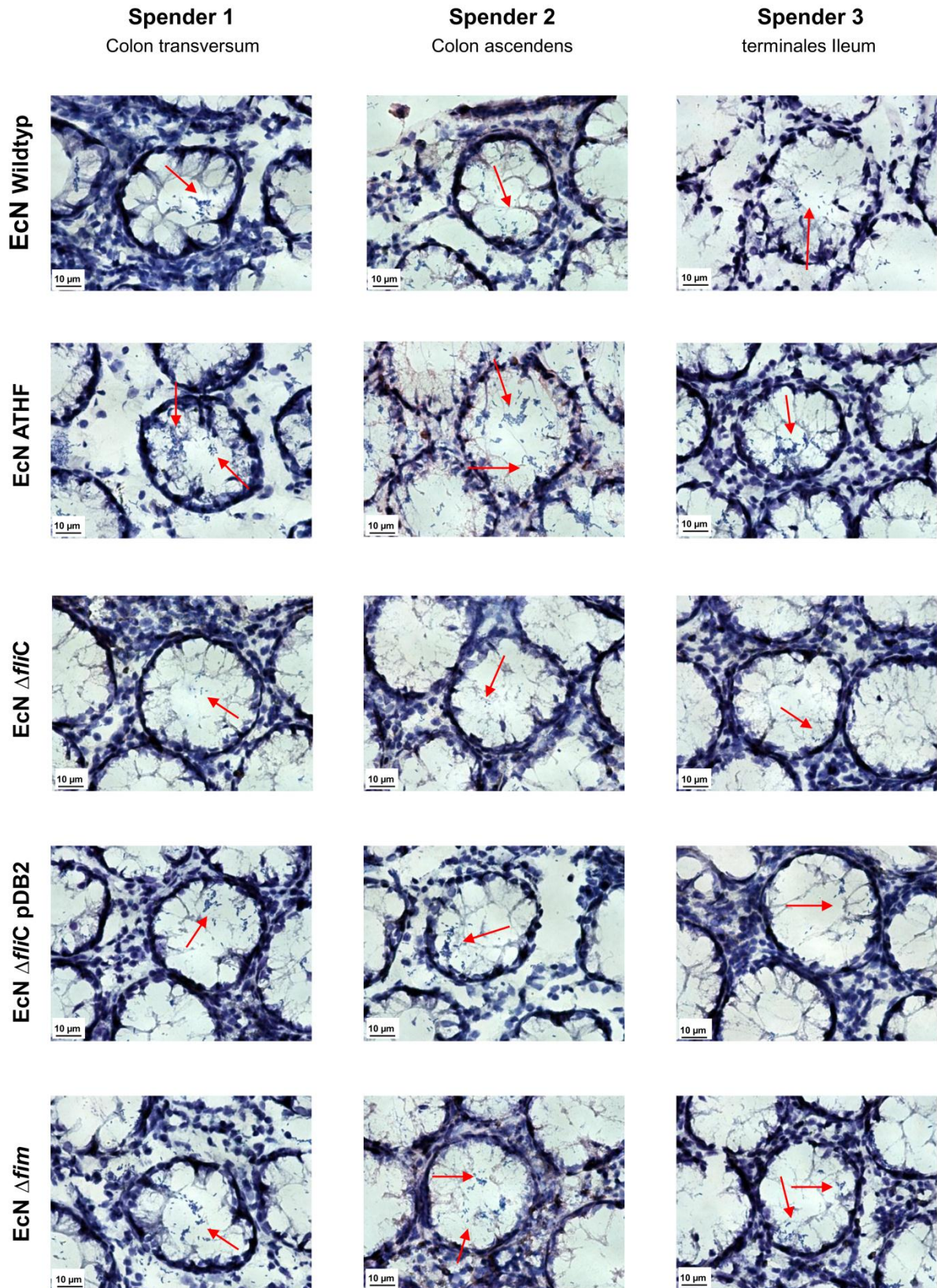


Abbildung 17: Adhäsion verschiedener EcN-Stämme an Kryoschnitte humaner Darmbiopsien.

Die Darmbiopsien stammten von insgesamt drei Spendern und jeweils vier Darmabschnitten (terminales Ileum, Colon ascendens, Colon transversum und Colon descendens); für jeden Spender und Darmabschnitt wurden drei Experimente unabhängig voneinander durchgeführt; gezeigt sind die Mittelwerte + Standardabweichung; die Signifikanz der

Adhäsionseffizienzunterschiede der einzelnen Stämme im Vergleich zum Wildtyp wurden mittels t-Test ermittelt (***) = $p < 0,0001$; ns = nicht signifikant $p > 0,05$)

Die Adhäsionsexperimente zeigten, dass die hyperflagellierte EcN-Variante ATHF im Vergleich zum Wildtyp eine wesentlich höhere Adhäsionseffizienz an Kryoschnitte humaner Darmbiopsien aufwies. Im Gegensatz dazu konnte der nichtflagellierte Stamm EcN $\Delta fliC$ nicht mehr effizient adhären. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen führte die Komplementierung des *fliC*-Gens (EcN $\Delta fliC$ pDB2) zu einer dem Wildtyp ähnlich hohen Adhäsionseffizienz. Das Fehlen der typischen Adhäsine, F1A- und F1C-Pili, hatte interessanterweise keinen signifikanten Effekt auf die Adhäsionsfähigkeit dieser EcN-Mutanten. Je nachdem von welchem Darmabschnitt und Spender die Kryoschnitte stammten, gab es zwar geringe Abweichungen in der absoluten Zahl adhärenter Bakterien, die Flagellen-abhängige und Pili-unabhängige Adhäsion konnte jedoch immer beobachtet werden. Abbildung 18 zeigt Mikrofotografien von gefärbten Kryoschnitten mit verschiedenen adhärenen EcN-Stämmen.



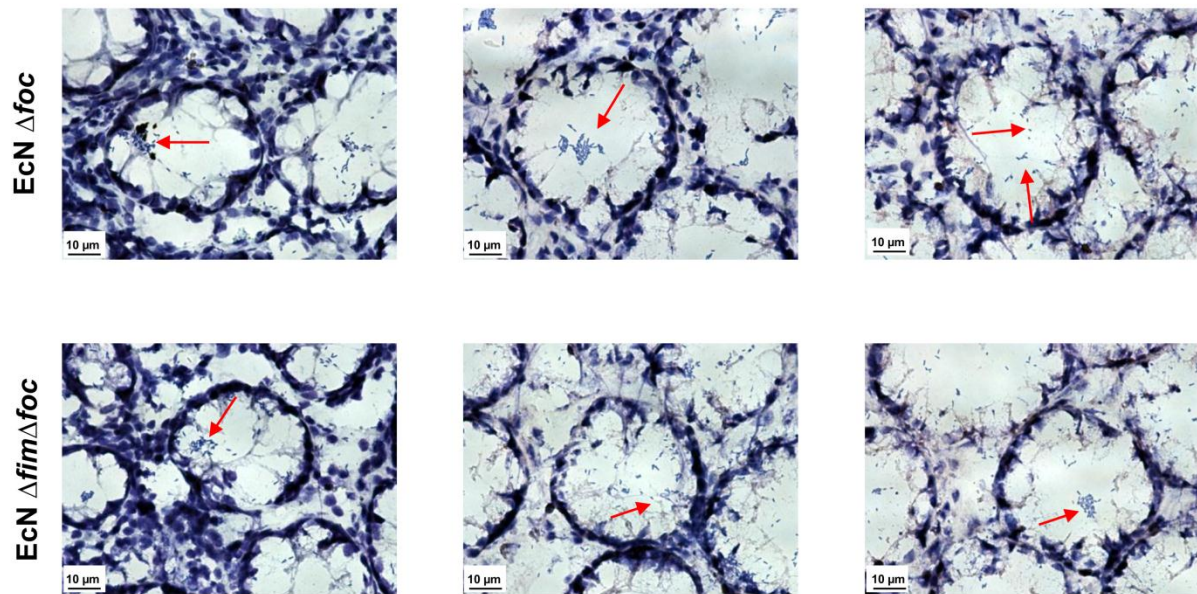


Abbildung 18: Mikrofotografien von Kryoschnitten humaner Darmbiopsien mit adhärenen Bakterien.

Gezeigt sind nach Pappenheim gefärbte Kryoschnitte des Colon transversum von Spender 1, des Colon ascendens von Spender 2 und des terminalen Ileums von Spender 3 mit adhärenen Bakterien. Die Pfeile zeigen auf adhärenente Bakterien.

4.3.2 Adhäsion von EcN an die Epithelzellen Caco-2 und T24

Nach den *ex vivo* Adhäsionsstudien wurden die Adhäsionseigenschaften verschiedener EcN-Stämme auch *in vitro* an die humanen Karzinomepithelzellen Caco-2 und T24 untersucht. Die Versuche wurden wie beschrieben (3.8.2) durchgeführt. Zusätzlich zu den Stämmen aus den *ex vivo* Studien wurde auch die Adhäsionsfähigkeit der Curli-negativen Mutante EcN Δ csg getestet.

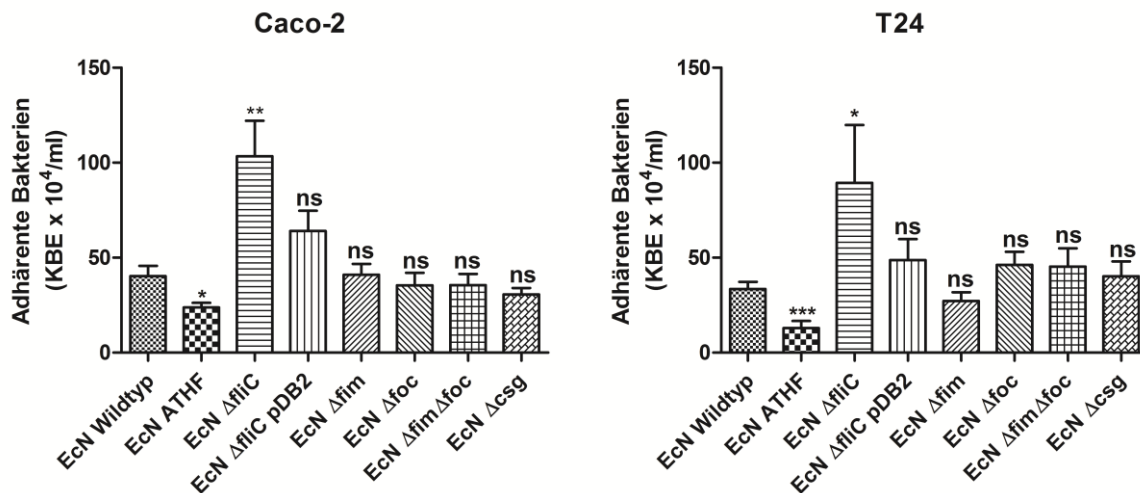


Abbildung 19: Adhäsion verschiedener EcN-Stämme an die humanen Karzinomepithelzellen Caco-2 und T24.

In 24-Kavitäten-Platten konfluent gewachsene Zellen wurden mit verschiedenen EcN-Stämmen infiziert. Nach 2 h wurden die Zellen gewaschen, lysiert und verschiedene Verdünnungen ausplattiert, um die KBEs der adherenten Bakterien zu bestimmen. Die Daten zeigen die Mittelwerte + Standardabweichung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit Dreifachbestimmung pro Ansatz. Die Signifikanz der Unterschiede im Adhärenzverhalten der einzelnen Stämme im Vergleich zum Wildtyp wurden mittels t-Test bestimmt (*/**/*** = $p < 0,05/0,001/0,0001$; ns = $p > 0,05$).

Für beide Zelllinien konnte beobachtet werden, dass ein Fehlen der Flagelle hier ganz im Gegensatz zu den *ex vivo* Experimenten zu einer signifikant erhöhten Adhäsion führte. Die Ausprägung mehrerer Flagellen schien für eine effiziente Adhäsion eher hinderlich zu sein, da die hyperflagellierte EcN-Variante ATHF nicht mehr in der Lage war, sich genauso effizient wie der Wildtyp an die Zellen zu haften. Die Komplementante zeigte im Vergleich zum Wildtyp eine leichte, wenn auch nicht signifikant höhere Adhäsionseffizienz. Interessanterweise hatte die Abwesenheit von F1A- und F1C-Pili sowie der Curli-Fimbrien auch hier keinen signifikanten Effekt auf die Adhäsionsfähigkeit.

4.3.3 Adhäsion von EcN an Kryoschnitte nach Präinkubation mit Mucin2

Die beobachteten Unterschiede des Adhäsionsverhaltens von EcN zwischen *ex vivo*- und *in vitro*-System könnten ihre Ursache darin haben, dass EcN *in vivo* nicht an die Epithelzellen selbst adhärert, sondern vielmehr an den von diesen Zellen sekretierten Mucus. Unter den gegebenen *in vitro*-Bedingungen produzieren weder Caco-2- noch T24-Zellen Mucus, allerdings konnten mittels PAS-Färbung (3.9) Mucusreste auf den Kryoschnitten nachgewiesen werden. Somit könnte es sein, dass die Flagelle zwar für die Adhärenz an Mucus wichtig ist, jedoch keine Rolle bei der direkten Adhärenz an die Epithelzellen spielt. Diese Annahme wurde in erneuten Adhäsionsexperimenten mit Kryoschnitten humaner Darmbiopsien und den Stämmen EcN Wildtyp, EcN ATHF, EcN Δ fliC und EcN Δ fliC pDB2 überprüft. Die Durchführung erfolgte wie beschrieben (3.8.1.2), nur wurden die Bakterien diesmal mit dH₂O und zwei verschiedenen konzentrierten Mucin2-Lösungen für 1 h bei 37°C vorinkubiert. Die Kryoschnitte stammten von zwei verschiedenen Spendern, diesmal von jeweils zwei unterschiedlichen Darmabschnitten (Spender 1: terminales Ileum, Colon transversum; Spender 2: Colon ascendens, Colon descendens).

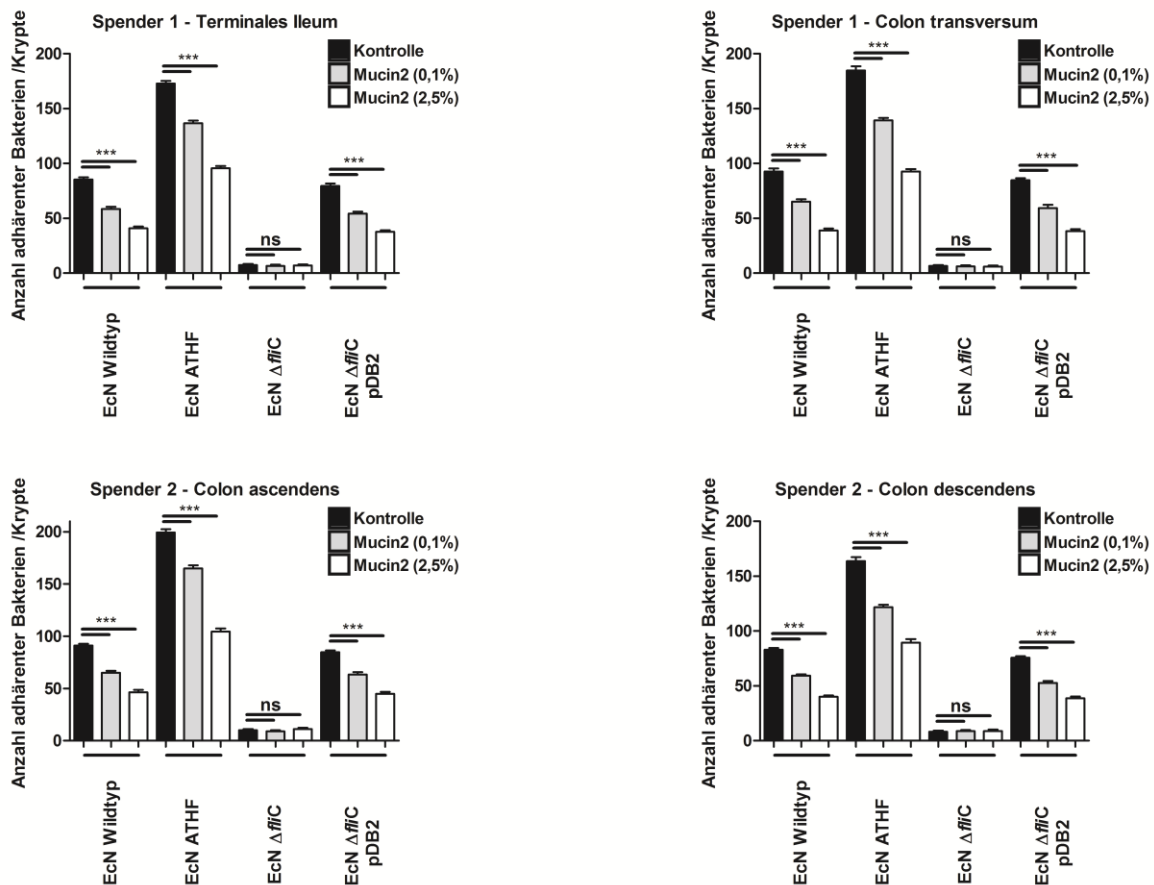


Abbildung 20: Adhäsion verschiedener EcN-Stämme an Kryoschnitte humaner Darmbiopsien nach Präinkubation mit verschiedenen konzentrierten Mucin2-Lösungen.

Es wurden Darmbiopsien von zwei Spendern und jeweils zwei verschiedenen Darmabschnitten (Spender1: terminales Ileum, Colon transversum; Spender 2: Colon ascendens und Colon descendens) verwendet. Für jeden Spender und Darmabschnitt wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Gezeigt sind die Mittelwerte + Standardabweichung. Die Signifikanz der Unterschiede im Adhäsionsverhalten nach Inkubation mit verschiedenen konzentrierten Mucin2-Lösungen im Vergleich zur Kontrolle wurde mittels t-Test bestimmt (***) = $p < 0,0001$; ns = $p > 0,05$).

Unabhängig von Spender und Darmabschnitt konnte gezeigt werden, dass die Präinkubation der flagellierten Stämme EcN Wildtyp, EcN ATHF und EcN Δ fliC pDB2 mit Mucin2 ihre Fähigkeit effizient an die Kryoschnitte zu adhären, dosisabhängig signifikant reduzierte. Die Präinkubation der nichtflagellierten Mutante EcN Δ fliC mit Mucin2 hatte dahingegen keinen Effekt auf ihr Adhäsionsverhalten. Abbildung 21 zeigt Mikrofotografien gefärbter Kryoschnitte des terminalen Ileums von Spender 1 nach der Inkubation mit den verschiedenen Mucinlösungen, bzw. dH₂O (Kontrolle).

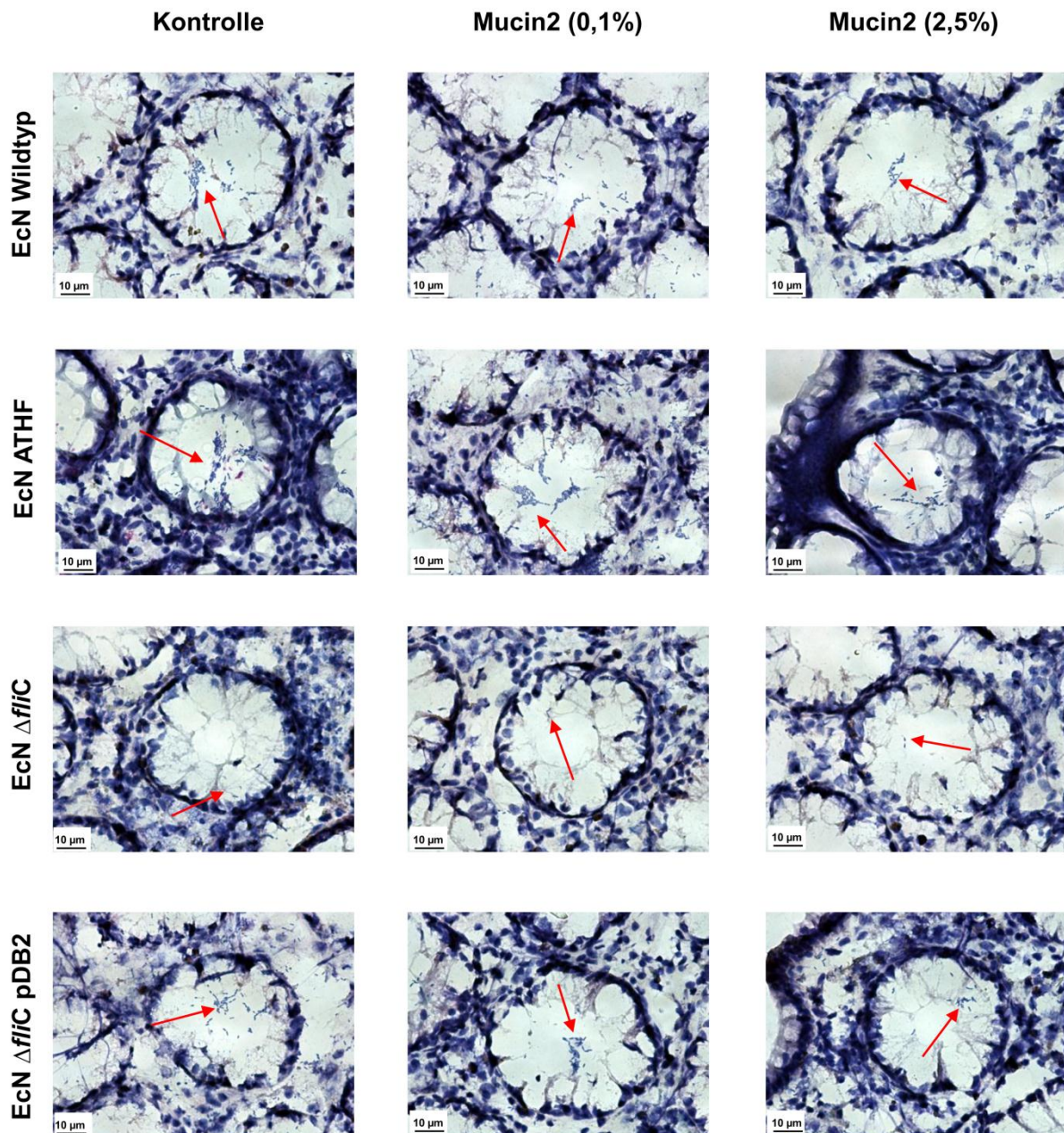


Abbildung 21: Mikrofotografien von Kryoschnitten humaner Darmbiopsien mit adhärenen Bakterien nach Inkubation mit Mucin2.

Gezeigt sind gefärbte Präparate des terminalen Ileums von Spender 1 mit adhärenen Bakterien nach Inkubation mit verschiedenen Mucin2-Lösungen (0,1%; 2,5%), bzw. dH₂O (Kontrolle). Die Pfeile zeigen auf adhärenen Bakterien.

4.3.4 Adhäsion von EcN an die humanen Epithelzellen LS174-T

Caco-2 und T24-Zellen produzieren unter den gegebenen *in vitro*-Bedingungen keinen Mucus. Die humane Epithelzelllinie LS174-T dagegen produziert Mucus, eine schleimige Schicht, die die Zellen bedeckt und schon mit bloßem Auge bei der Kultivierung der Zellen zu erkennen ist. Zudem wurde die Produktion von Mucinen durch PAS-Färbung nachgewiesen (3.9). Diese Zelllinie wurde daher für weitere Adhäsionsstudien verwendet, um die Wichtigkeit der Flagelle bei der Adhäsion an Mucus zu bestätigen. Die Versuche wurden mit den Bakterienstämmen EcN Wildtyp, EcN ATHF, EcN $\Delta fliC$ und EcN $\Delta fliC$ pDB2 wie beschrieben (3.8.2) durchgeführt.

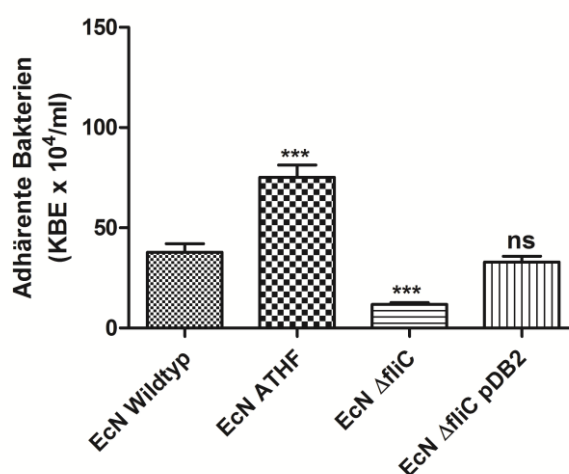


Abbildung 22: Adhäsion von EcN an die Mucus-produzierende humane Karzinomepithelzelllinie LS174-T.

In 24-Kavitäten-Platten konfluent gewachsene LS174-T Zellen wurden mit verschiedenen EcN-Stämmen infiziert. Nach 2 h wurden die Zellen gewaschen, lysiert und verschiedene Verdünnungsstufen ausplattiert, um die KBEs der adhärenen Bakterien zu bestimmen. Die Daten zeigen die Mittelwerte + Standardabweichung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit Dreifachbestimmung pro Ansatz. Die Signifikanz der Unterschiede im Adhärenzverhalten der einzelnen Stämme im Vergleich zum Wildtyp wurde mit dem t-Test bestimmt (***) = $p < 0,0001$; ns = $p > 0,05$).

In den Adhäsionsstudien mit der Zelllinie LS174-T konnte für die hyperflagellierte EcN-Variante ATHF eine im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöhte Adhäsionseffizienz beobachtet werden. Im Gegensatz dazu adhärierte die FliC-negative Mutante nur noch geringfügig. Die dazugehörige Komplementante adhärierte wieder wesentlich besser an die Epithelzellen, ohne signifikanten Unterschied zum Wildtyp.

4.3.5 Adhäsion an Mucin2

In weiteren Adhäsionsexperimenten wurde die Adhärenz verschiedener EcN-Stämme an Mucin2 untersucht. Aufgrund dessen, dass der uropathogene *E. coli* CFT073 eine Flagelle vom gleichen Serotyp wie EcN ausbildet, jedoch durchaus Unterschiede in der Wirkung auf die Induktion der hBD2-Produktion durch Caco-2-Zellen beobachtet werden konnten (4.2.4), wurden auch die Stämme CFT073, sowie die flagellennegative Mutante CFT073 Δ fliC auf ihre Adhäsionsfähigkeit an Mucin2 untersucht.

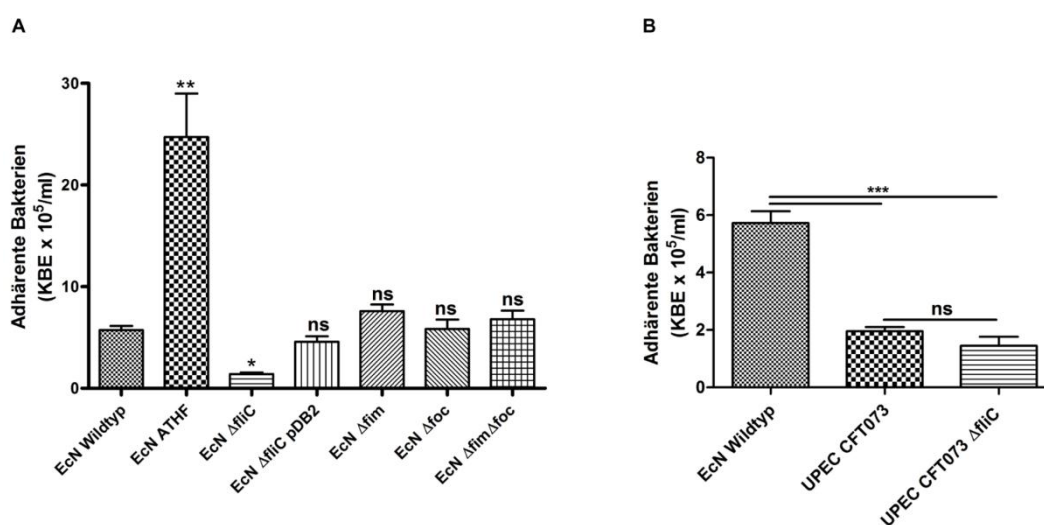


Abbildung 23: Adhäsion verschiedener EcN- (A) sowie UPEC CFT073-Stämme (B) an Mucin2.

Mucin2-beschichtete 24-Kavitäten-Platten wurden für 2 h mit verschiedenen Bakterienstämmen inkubiert. Anschließend wurden die Platten gewaschen, adhärenen Bakterien und Mucin2 abgeschabt und verschiedene Verdünnungen ausplattiert, um die KBEs der adhärenen Bakterien zu bestimmen. Die Daten zeigen die Mittelwerte + Standardabweichung aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit Dreifachbestimmung pro Ansatz. Die Unterschiede im Adhärenzverhalten der verschiedenen Stämme im Vergleich zum EcN Wildtyp wurden mittels t-Test auf ihre Signifikanz untersucht (*/**/*** = $p < 0,05/0,001/0,0001$; ns = $p > 0,05$).

Die Adhäsion von EcN an Mucin2 erfolgte flagellenabhängig. Der hyperflagellierte Stamm ATHF adhärte signifikant effizienter an Mucin2 als EcN Wildtyp, wohingegen die flagellennegative Mutante EcN Δ fliC kaum adhärte. Die Komplementante EcN Δ fliC pDB2 zeigte im Vergleich dazu eine dem Niveau des EcN Wildtyps ähnlich gute Adhäsionseffizienz. Auch hier hatte das Fehlen der F1A- und F1C-Pili keine signifikante Auswirkung auf das Adhäsionsverhalten von EcN. Abbildung 23B zeigt die Adhäsionseffizienz der uropathogenen Stämme CFT073 und CFT073 Δ fliC im Vergleich zum EcN Wildtyp. Obwohl der UPEC-Stamm CFT073 genau wie EcN Flagellen vom Serotyp H1 exprimiert und die FliCs beider Stämme identische Aminosäuresequenzen aufweisen, war er nicht dazu in der Lage, genauso effizient an Mucin2 zu adhären wie der EcN Wildtyp. Des Weiteren konnte kein Unterschied der Adhäsionseffizienz zwischen dem CFT073 Wildtyp

und der flagellennegativen Mutante CFT073 Δ *flhC* festgestellt werden, so dass anzunehmen ist, dass die Adhäsion von CFT073 an Mucin2 nicht durch die Flagelle vermittelt wird.

4.4 Interaktionsstudien

4.4.1 Interaktion zwischen isolierten Flagellen von EcN Wildtyp und Mucin2

Für den Nachweis der direkten Interaktion von Flagellen mit Mucin2 wurde ein ELISA etabliert und wie beschrieben (3.3.10) durchgeführt.

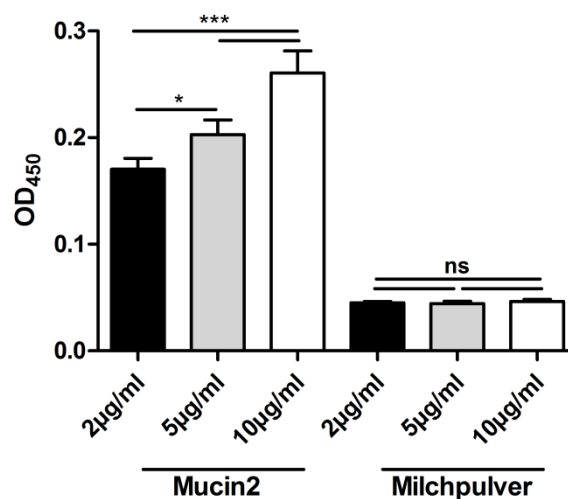


Abbildung 24: Interaktion isolierter Flagellen von EcN Wildtyp mit Mucin2 oder Milchpulver.

Es wurden ELISA-Versuche mit Mucin2- bzw. Milchpulver-beschichteten Platten (5 µg/Kavität) durchgeführt. Isolierte Flagellen vom EcN Wildtyp wurden in verschiedenen Konzentrationen (2, 5 und 10 µg/ml) eingesetzt, um eine direkte Interaktion zwischen Mucin2 und diesen Zelloberflächenstrukturen zu zeigen. Milchpulver diente als Negativkontrolle. Die Interaktion wurde durch die Messung der OD₄₅₀ nach der Antikörperreaktion bestimmt. Die Daten zeigen die Mittelwerte + Standardabweichung von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten mit Dreifachbestimmung pro Ansatz. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen einzelnen Messdaten wurde mittels t-Test bestimmt (*/** = $p < 0,05/0,0001$; ns = $p > 0,05$).

Es konnte eine direkte konzentrationsabhängige Interaktion zwischen den isolierten Flagellen des EcN Wildtyps und Mucin2 beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte solch eine Interaktion isolierter Flagellen mit Milchpulver nicht bestätigt werden.

4.4.2 Interaktion zwischen isolierten Flagellen von EcN Wildtyp und murinem Mucus

Im Hinblick auf die Durchführung von *in vivo*-Kolonisierungsversuchen im Mausmodell, wurde zunächst untersucht, ob die Flagellen des EcN Wildtyps auch mit murinem Mucus interagieren. Dafür wurde Mucus aus den verschiedenen Darmabschnitten von fünf Mäusen isoliert (3.3.7), deren Konzentration bestimmt und eine 96-Kavitäten-Platte mit diesen Mucusproben (5 µg/Kavität) beschichtet. Anschließend wurde der ELISA wie beschrieben (3.3.10) durchgeführt.

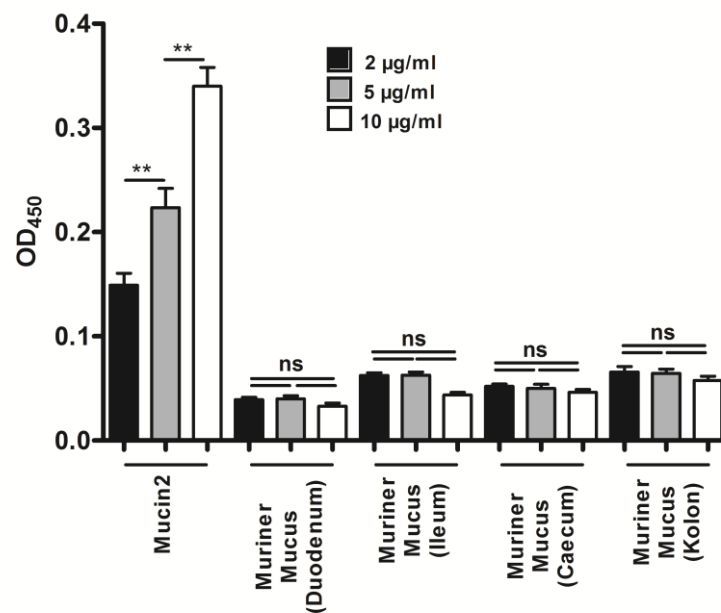


Abbildung 25: Interaktion isolierter Flagellen von EcN Wildtyp mit murinem Mucus.

Muriner Mucus wurde aus vier verschiedenen Darmabschnitten von insgesamt 5 Mäusen isoliert. Platten wurden mit diesen Mucus-Proben beschichtet (5 µg/Kavität) und ELISA-Versuche durchgeführt. Als Kontrolle wurden einige Kavitäten der Platte mit Mucin2 (5 µg/Kavität) beschichtet. Isolierte Flagellen vom EcN Wildtyp wurden in verschiedenen Konzentrationen (2, 5 und 10 µg/ml) eingesetzt, um eine direkte Interaktion zwischen murinem Mucus und diesen Zelloberflächenstrukturen zu zeigen. Die Interaktion wurde durch die Messung der OD₄₅₀ nach der Antikörperreaktion bestimmt. Die Daten zeigen die Mittelwerte + Standardabweichung von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten mit Dreifachbestimmung pro Ansatz. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen einzelnen Messdaten wurde mittels t-Test bestimmt (** = $p < 0,001$; ns = $p > 0,05$).

Bei der Auswertung dieser Versuche wurde ersichtlich, dass keine direkte Interaktion zwischen isolierten Flagellen des EcN Wildtyps und dem murinem Mucus stattfand. *In vivo* Experimente im Mausmodell schienen daher eher ungeeignet, um einen eventuellen Kolonisierungsvorteil der hyperflagellierten EcN-Variante ATHF gegenüber dem Wildtyp in *in vivo*-Experimenten zu untersuchen.

4.4.3 Interaktion isolierter Flagellen von EcN Wildtyp und humanem Mucus

Da sich die Mucus-Zusammensetzung verschiedener Spezies durchaus voneinander unterscheidet und bisher nur die direkte Interaktion der Flagelle mit Mucin2 aus dem Schweinemagen nachgewiesen wurde, sollte ebenfalls die Interaktion zwischen isolierten Flagellen von EcN Wildtyp und humanem Mucus überprüft werden. Dazu wurden Mucusproben von vier verschiedenen Patienten isoliert (3.3.8), deren Proteingehalt bestimmt und eine 96-Kavitäten-Platte mit den Proben beschichtet (2 µg/Kavität). Dann wurde der ELISA wie beschrieben (3.3.10) durchgeführt.

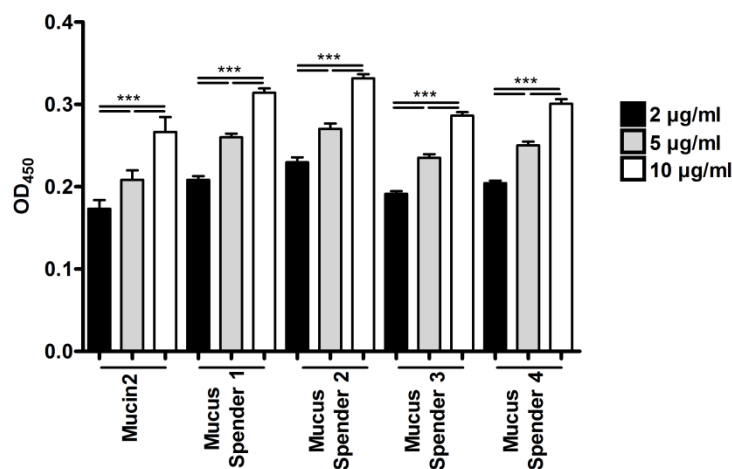


Abbildung 26: Interaktion der Flagellen von EcN mit humanem Mucus.

Humane Mucusproben von insgesamt vier gesunden Spendern wurden während einer Routine-Koloskopie isoliert. Mit diesen Mucusproben wurden Platten beschichtet (2 µg/Kavität) und anschließend ELISA-Versuche durchgeführt. Einige Kavitäten der Platten wurden zur Kontrolle mit Mucin2 (5 µg/Kavität) beschichtet. Isolierte Flagellen vom EcN Wildtyp wurden in verschiedenen Konzentrationen (2, 5 und 10 µg/ml) eingesetzt, um eine direkte Interaktion zwischen humanem Mucus und diesen Zelloberflächenstrukturen zu zeigen. Die Interaktion wurde durch die Messung der OD₄₅₀ nach der Antikörperreaktion bestimmt. Die Daten zeigen die Mittelwerte + Standardabweichung von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten mit Dreifachbestimmung pro Ansatz. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen einzelnen Messdaten wurde mittels t-Test bestimmt (***) = $p < 0,0001$; ns = $p > 0,05$).

Bei allen vier humanen Mucusproben konnte eine direkte konzentrationsabhängige Interaktion mit den isolierten Flagellen des EcN Wildtyps beobachtet werden. Da zwischen den verschiedenen Spendern keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten, wurden die Proben der vier Spender für weitere Interaktionsstudien gepoolt, die Proteinkonzentration bestimmt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.4.4 Interaktion von Flagellen anderer Bakterienstämme mit Mucin2

Um zu überprüfen, ob die Interaktion der Flagelle mit Mucin2 für EcN spezifisch ist, wurden Flagellen aus den uropathogenen *E. coli* Stämmen CFT073 und 536 isoliert und für Interaktionsstudien mit Mucin2 verwendet.

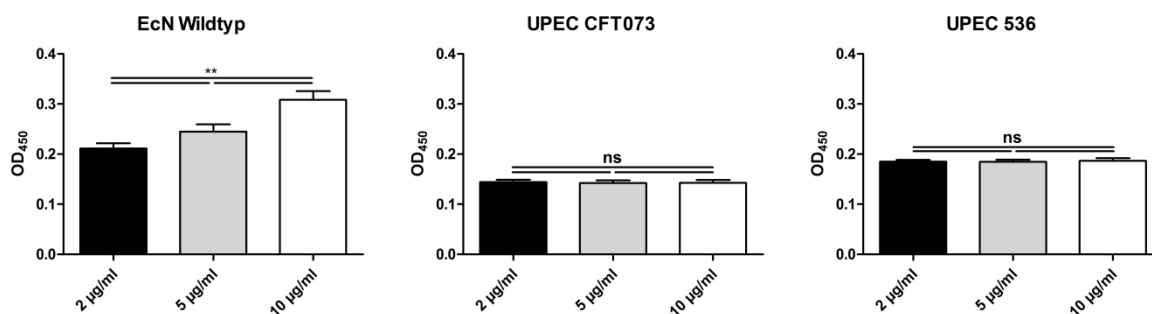


Abbildung 27: Interaktion von Flagellen der UPEC-Stämme CFT073 und 536 mit Mucin2.

Es wurde ein ELISA mit Mucin2- beschichteten Platten (5 µg/Kavität) durchgeführt. Isolierte Flagellen vom EcN Wildtyp, UPEC CFT073 sowie UPEC 536 wurden in verschiedenen Konzentrationen (2, 5 und 10 µg/ml) eingesetzt, um eine direkte Interaktion zwischen Mucin2 und diesen Zelloberflächenstrukturen zu zeigen. Die Interaktion wurde durch die Messung der OD₄₅₀ nach der Antikörperreaktion bestimmt. Die Daten zeigen die Mittelwerte + Standardabweichung von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten mit Dreifachbestimmung pro Ansatz. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen einzelnen Messdaten wurde mittels t-Test bestimmt (*/** = $p < 0,05/0,0001$; ns = $p > 0,05$).

Aus Abbildung 27 wird ersichtlich, dass die Flagellen der uropathogenen *E. coli* Stämme CFT073 und 536 im Vergleich zu denen von EcN Wildtyp nicht konzentrationsabhängig mit Mucin2 interagierten.

4.5 Effekt verschiedener Kohlenhydrate auf die Interaktion Flagelle ↔ Mucus

Die Mucusschicht des Darms besteht aus zahlreichen Glykoproteinen, antimikrobiellen Peptiden, Immunglobulinen, Lipiden und Elektrolyten. Die Hauptstrukturkomponenten sind dabei die Mucine. Im Kolon besteht die Mucusschicht hauptsächlich aus dem sekretierten MUC2 Mucin und es ist daher anzunehmen, dass die Flagelle von EcN mit diesem hoch glykosylierten Protein interagiert. Verschiedene Kohlenhydrate wurden bereits als Mucus-Bestandteile identifiziert. Es wurden erneut Interaktionsstudien im Rahmen von ELISA-Experimenten durchgeführt, um zu überprüfen, mit welchen dieser Kohlenhydrate die Flagelle von EcN interagiert. Dabei wurden unterschiedliche Konzentrationen isolierter Flagellen (4, 10 und 20 µg/ml) des EcN Wildtyps 1:1 mit verschiedenen Kohlenhydratlösungen (200 mM) oder dH₂O (Kontrolle) für 1 h bei RT inkubiert und anschließend der ELISA wie beschrieben (3.3.10) durchgeführt.

4.5.1 Effekt verschiedener Kohlenhydrate auf die Interaktion isolierter Flagellen von EcN und Mucin2

Zunächst wurde der Effekt verschiedener Kohlenhydrate auf die Interaktion isolierter Flagellen des EcN Wildtyps mit Mucin2 überprüft. Als Kohlenhydrate wurden hierbei eingesetzt: Fucose, Gluconat, Glucuronat, Mannose, N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und Ribose.

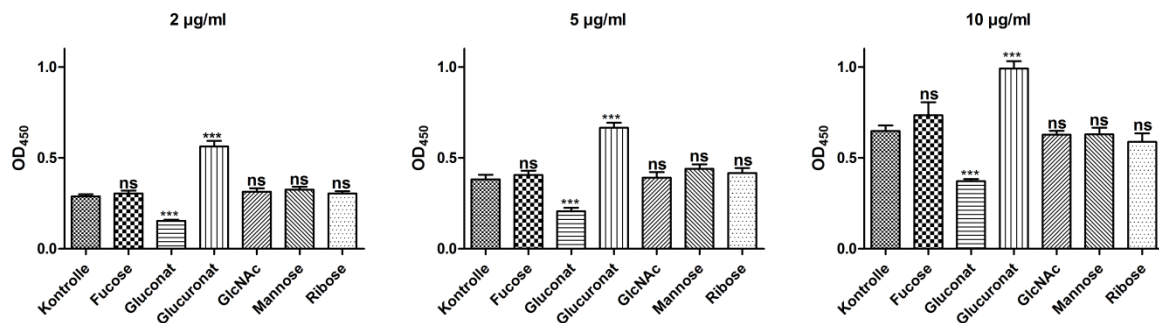


Abbildung 28: Interaktion isolierter Flagellen mit Mucin2 nach Präinkubation mit verschiedenen Kohlenhydraten.

Verschiedene Konzentrationen (2, 5 und 10 µg/ml) isolierter Flagellen von EcN wurden mit verschiedenen Kohlenhydraten für 1 h bei RT vorinkubiert und anschließend ELISA-Versuche mit Mucin2-beschichteten Platten durchgeführt, um einen eventuellen Effekt auf die Interaktion zwischen Mucin2 und den Flagellen zu zeigen. Die Interaktion wurde durch das Messen der OD₄₅₀ nach der Antikörperreaktion bestimmt. Die Daten zeigen die Mittelwerte + Standardabweichung von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten mit Dreifachbestimmung pro Ansatz. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen Kontrolle und den einzelnen Kohlenhydraten wurde mittels t-Test bestimmt (***) = $p < 0,0001$; ns = $p > 0,05$).

Die Auswertung der Interaktionsstudien ergab, dass nur die Präinkubation der Flagellen mit Gluconat deren Interaktion mit Mucin2 inhibierte (Abbildung 28). Die Präinkubation der Flagellen mit Fucose, GlcNAc, Mannose oder Ribose hatte keinen signifikanten Effekt auf die Interaktion mit Mucin2. Auffallend war, dass die Interaktion der Flagellen mit Mucin2 durch die Präinkubation mit Glucuronat deutlich erhöht wurde.

Die Präinkubation der Flagellen mit verschiedenen Konzentrationen von Gluconat (100 mM und 200 mM) zeigte einen leichten, aber signifikanten dosisabhängigen, reduzierenden Effekt auf die Interaktion dieser bakteriellen Oberflächenstrukturen mit Mucin2 (Abbildung 29).

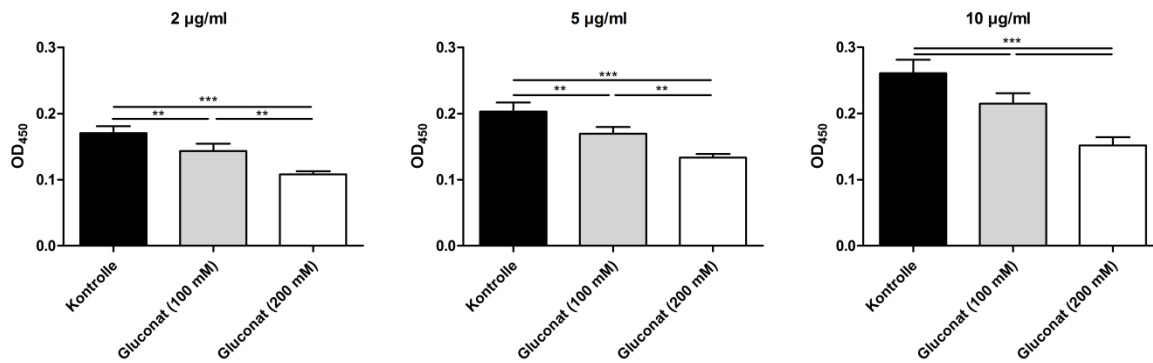


Abbildung 29: Effekt von Gluconat auf die Interaktion isolierter Flagellen des EcN Wildtyps mit Mucin2.

Verschiedene Konzentrationen (2, 5 und 10 µg/ml) isolierter Flagellen von EcN wurden mit zwei unterschiedlich konzentrierten Gluconatlösungen (100 mM und 200 mM) für 1 h bei RT vorinkubiert und anschließend ELISA-Versuche mit Mucin2-beschichteten Platten (5 µg/Kavität) durchgeführt, um einen eventuell konzentrationsabhängigen Effekt auf die Interaktion zwischen Mucin2 und den Flagellen zu zeigen. Die Interaktion wurde durch die Messung der OD₄₅₀ nach der Antikörperreaktion bestimmt. Die Daten zeigen die Mittelwerte + Standardabweichung von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten mit Dreifachbestimmung pro Ansatz. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen Kontrolle und den einzelnen Kohlenhydraten wurde mittels t-Test bestimmt (**/** = p < 0,001/0,0001; ns = p > 0,05).

Aufgrund der signifikant stärkeren Interaktion von Flagellen mit Mucin2 nach Präinkubation mit Glucuronat wurde von allen Lösungen (isolierte Flagellen, sowie Kohlenhydratlösungen) der pH-Wert vor der Präinkubation sowie der verschiedenen Koinkubationsgemische (isolierte Flagellen + Kohlenhydratlösung) nach der Präinkubation gemessen. Tabelle 21 zeigt die Ergebnisse der pH-Messung.

Tabelle 21: pH-Werte der isolierten Flagellen und verschiedenen Kohlenhydratlösungen vor und nach der Präinkubation

	pH Wert vor Präinkubation	pH Wert nach Präinkubation
Isolierte Flagellen (2, 5 und 10 µg/ml)	7,0	7,0
Fucose	7,0	7,0
Gluconat	7,0	7,0
Glucuronat	4,0	4,0
GlcNAc	7,0	7,0
Mannose	7,0	7,0
Ribose	7,0	7,0

Den Ergebnissen aus der pH-Messung nach zu urteilen, könnte die signifikante Erhöhung der Interaktion zwischen isolierten Flagellen des EcN Wildtyps und Mucin2 durch die Präinkubation mit Glucuronat auf einen pH-Effekt zurückgeführt werden. Dies wurde in weiteren Interaktionsstudien mit isolierten Flagellen und Mucin2-beschichteten Platten überprüft. Dabei wurden die Flagellen erneut 1:1 mit dH₂O (Kontrolle) oder Glucuronat (200

mM) für eine Stunde präinkubiert. In einem dritten Ansatz wurden die Flagellen 1:1 mit dH₂O gemischt, der pH-Wert der Lösung auf 4,0 eingestellt und ebenfalls für eine Stunde bei RT inkubiert. In einem weiteren Ansatz wurden die Flagellen 1:1 mit einer Glucuronatlösung, deren pH-Wert auf 7,0 eingestellt wurde, für eine Stunde bei RT präinkubiert. Anschließend wurde der ELISA wie beschrieben (3.3.10) durchgeführt.

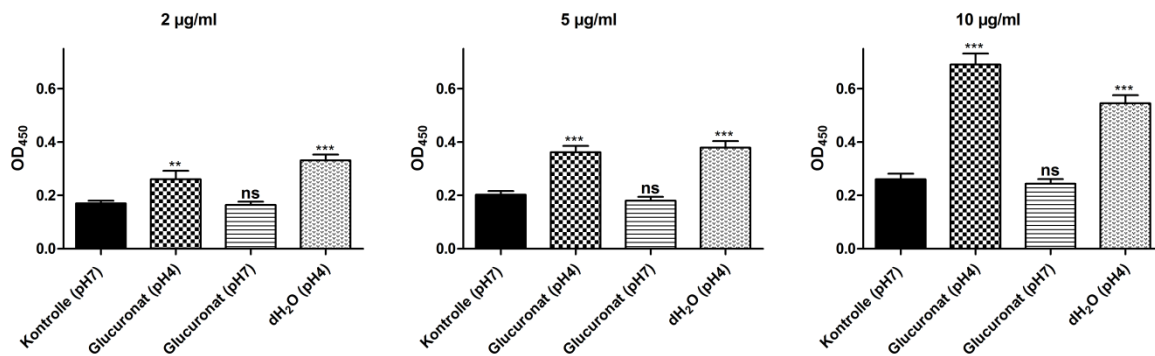


Abbildung 30: pH-Effekt auf die Interaktion zwischen isolierten Flagellen des EcN Wildtyps und Mucin2.

Verschiedene Konzentrationen (2, 5 und 10 µg/ml) isolierter Flagellen von EcN wurden mit verschiedenen Glucuronatlösungen (pH4 und pH7) für 1 h bei RT vorinkubiert und anschließend ELISA-Versuche mit Mucin2-beschichteten Platten (5 µg/Kavität) durchgeführt, um einen eventuellen Effekt auf die Interaktion zwischen Mucin2 und den Flagellen zu zeigen. Zusätzlich wurde der pH-Wert der Flagellen auf 4 eingestellt und deren Interaktion mit Mucin2 untersucht. Als Kontrolle dienten Flagellenlösungen mit einem pH-Wert von 7. Die Interaktion wurde durch die Messung der OD₄₅₀ nach der Antikörperreaktion bestimmt. Die Daten zeigen die Mittelwerte + Standardabweichung von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten mit Dreifachbestimmung pro Ansatz. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen Kontrolle und den einzelnen Kohlenhydraten wurde mittels t-Test bestimmt (*/** = $p < 0,05/0,0001$; ns = $p > 0,05$).

Genau wie die Präinkubation isolierter Flagellen mit Glucuronat führte die Änderung des pH-Wertes isolierter Flagellen allein von 7,0 auf 4,0 zu einer signifikant erhöhten Interaktion mit Mucin2. Demnach ist davon auszugehen, dass die erhöhte Interaktion mit Mucin2 durch Präinkubation der Flagellen mit Glucuronat kein Effekt des Kohlenhydrats selbst, sondern ein pH-Effekt ist.

4.5.2 Effekt verschiedener Kohlenhydrate auf die Interaktion isolierter Flagellen von EcN und humanem Mucus

Des Weiteren wurde der Effekt verschiedener Kohlenhydrate auf die Interaktion isolierter Flagellen von EcN mit humanem Mucus untersucht. Als Kohlenhydrate wurden auch hier Fucose, Gluconat, Glucuronat, Mannose, N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und Ribose eingesetzt.

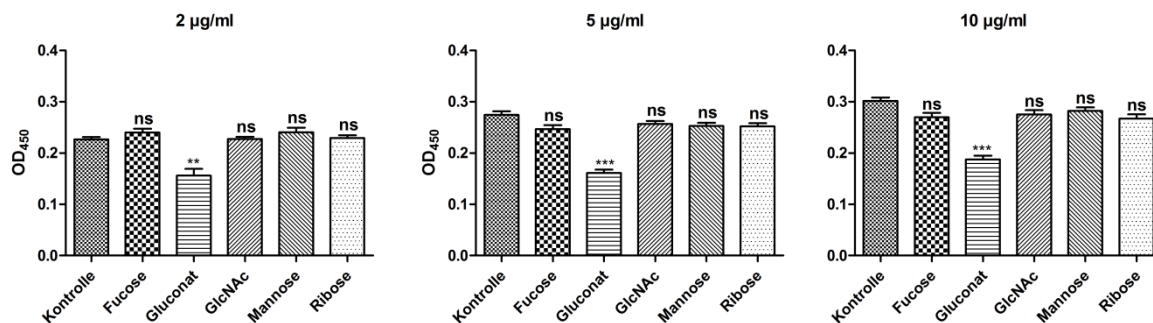


Abbildung 31: Effekt verschiedener Kohlenhydrate auf die Interaktion isolierter Flagellen von EcN mit humanem Mucus.

Verschiedene Konzentrationen (2, 5 und 10 µg/ml) isolierter Flagellen von EcN wurden mit verschiedenen Kohlenhydraten für 1 h bei RT vorinkubiert (Kontrolle: Flagellen + dH₂O). Platten wurden mit humanem Mucus beschichtet (2 µg/Kavität) und anschließend ELISA-Versuche mit den Flagellen-Kohlenhydratgemischen durchgeführt, um einen eventuellen Effekt der Kohlenhydrate auf die Interaktion zwischen humanem Mucus und den Flagellen zu zeigen. Die Interaktion wurde durch die Messung der OD₄₅₀ nach der Antikörperreaktion bestimmt. Die Daten zeigen die Mittelwerte + Standardabweichung von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten mit Dreifachbestimmung pro Ansatz. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen Kontrolle und den einzelnen Kohlenhydraten wurde mittels t-Test bestimmt (**/***) = $p < 0,001/0,0001$; ns = $p > 0,05$).

Abbildung 31 zeigt die Effekte der Kohlenhydrate Fucose, Gluconat, GlcNAc, Mannose und Ribose auf die Interaktion isolierter Flagellen von EcN Wildtyp mit humanem Mucus. Es konnte ebenfalls eine Reduktion der Interaktion isolierter Flagellen mit humanem Mucus durch die Präinkubation mit Gluconat festgestellt werden. Die anderen Kohlenhydrate hatten keinen signifikanten Effekt auf die Interaktion. In Abbildung 32A ist der Effekt von Glucuronat auf die Interaktion der Flagellen mit humanem Mucus zu sehen. Die Präinkubation der Flagellen mit Glucuronat erhöhte deren Interaktion mit humanem Mucus signifikant um ein Vielfaches. Des Weiteren wurde hier ebenfalls getestet, ob es sich um einen einfachen pH-Effekt handelt, indem zusätzlich die Interaktion von Flagellen, deren pH-Wert auf 4,0 eingestellt wurde, mit humanem Mucus überprüft wurde (Abbildung 32B).

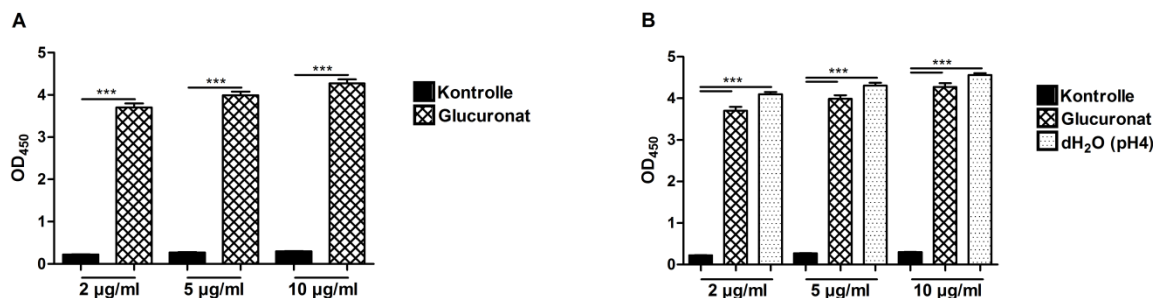


Abbildung 32: Effekt von Glucuronat (A) und pH4 (B) auf die Interaktion isolierter Flagellen des EcN Wildtyps mit humanem Mucus.

Verschiedene Konzentrationen (2, 5 und 10 µg/ml) isolierter Flagellen des EcN Wildtyps wurden mit Glucuronat für 1 h bei RT vorinkubiert. Um einen eventuellen Effekt auf die Interaktion zwischen humanem Mucus und den Flagellen zu zeigen, wurden anschließend ELISA-Versuche mit Platten durchgeführt, die zuvor mit humanem Mucus (2 µg/Kavität) beschichtet wurden. Zusätzlich wurde der pH-Wert der Flagellen auf 4 eingestellt und deren Interaktion mit humanem Mucus untersucht. Als Kontrolle dienten Flagellenlösungen mit einem pH-Wert von 7. Die Interaktion wurde durch die Messung der OD₄₅₀ nach der Antikörperreaktion bestimmt. Die Daten zeigen die Mittelwerte + Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen durchgeführten Experimenten mit Dreifachbestimmung pro Ansatz. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen Kontrolle und Glucuronat, bzw. pH4 wurde mittels t-Test bestimmt (***) = $p < 0,05/0,0001$; ns = $p > 0,05$).

Auch die Veränderung des pH-Wertes der Flagellenlösungen führte zu einer stark erhöhten Interaktion mit humanem Mucus, was wiederum darauf hinweist, dass der Effekt des Glucuronats auf die Interaktion der Flagellen mit humanem Mucus allein auf den pH-Wert dieser Kohlenhydratlösung zurückzuführen ist.

4.6 Effekt von Gluconat auf die Adhäsionsfähigkeit lebender Bakterien

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Gluconat die Interaktion isolierter Flagellen mit Mucin2 und humanem Mucus inhibiert, sollte nun auch der Effekt dieses Kohlenhydrats auf die Adhäsion lebender Bakterien an Mucus gezeigt werden. Hierzu wurden sowohl *in vitro* Adhäsionsexperimente mit Mucin2-beschichteten Platten als auch *ex vivo* Adhäsionsexperimente mit Kryoschnitten humaner Darmbiopsien durchgeführt.

4.6.1 Effekt von Gluconat auf die Adhäsion verschiedener EcN-Stämme an Mucin2-beschichtete Platten

Für die Durchführung dieses Experiments wurden zunächst die EcN-Stämme EcN Wildtyp, EcN ATHF, sowie EcN Δ *fliC* mit dem Plasmid pMW211, welches das DsRed-Gencluster codiert, transformiert. Die Bakterien erhielten dadurch die Fähigkeit zur Fluoreszenz und ihre jeweilige Adhäsionseffizienz konnte so im Versuch anhand der gemessenen Fluoreszenzintensität ermittelt werden. Nach der Transformation wurde zunächst die

Bewegungsfähigkeit der erhaltenen Stämme EcN Wildtyp pMW211, EcN ATHF pMW211 und EcN Δ *fliC* pMW211 in einem Schwärmagartest überprüft.

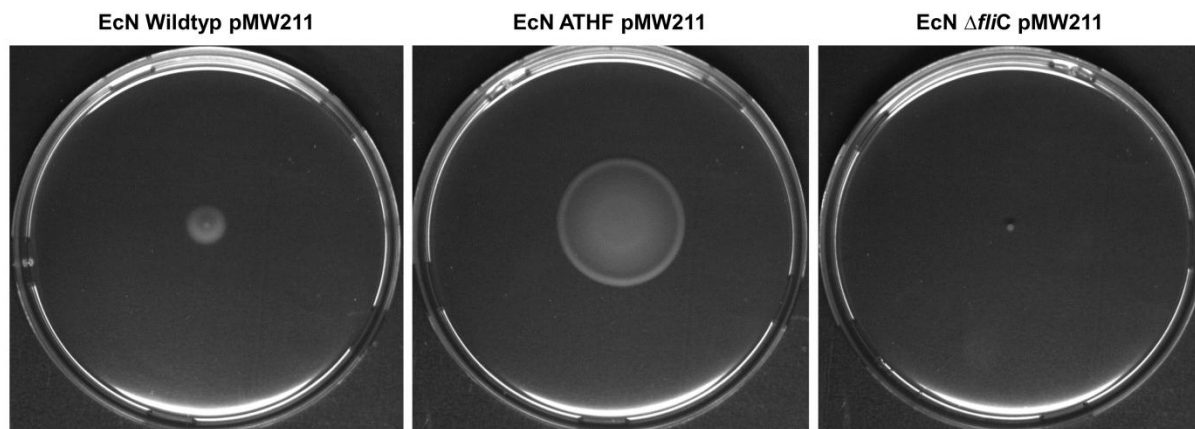


Abbildung 33: Motilität von EcN Wildtyp pMW211, EcN ATHF pMW211 und EcN Δ *fliC* pMW211 auf Schwärmagarplatten.

Die Aufnahmen entstanden nach 6 h Inkubation bei 37 °C.

Abbildung 33 zeigt, dass durch das Einbringen des Plasmids pMW211 in die EcN-Stämme deren Bewegungsfähigkeit nicht beeinflusst wurde. EcN ATHF pMW211 war im Vergleich zum Wildtyp immer noch weitaus beweglicher, wohingegen die flagellennegative Mutante EcN Δ *fliC* wie erwartet kein Schwärmverhalten auf den Platten zeigte. Die Adhäsionsexperimente mit den Mucin2-beschichteten Platten wurden daraufhin wie beschrieben (3.8.3.2) durchgeführt.

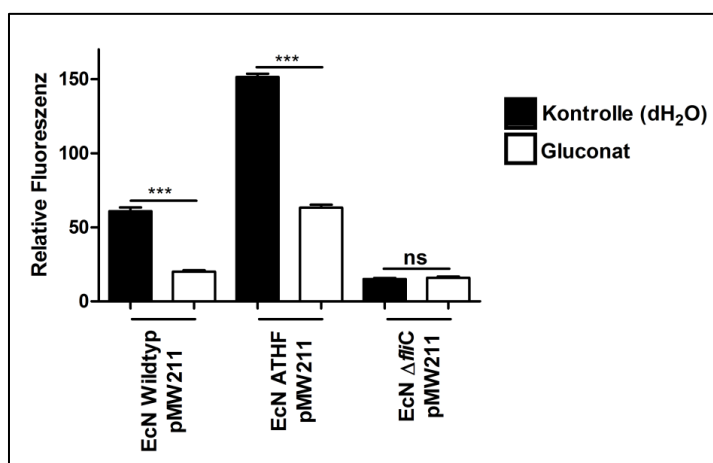


Abbildung 34: Effekt von Gluconat auf die Adhärenz verschiedener EcN-Stämme an Mucin2.

Die OD₆₀₀ von ÜNKs der Stämme EcN Wildtyp pMW211, EcN ATHF pMW211 sowie EcN Δ *fliC* pMW211 wurde auf 2,0 eingestellt, 1:1 mit dH₂O (Kontrolle) oder Gluconat (200 mM) für 1 h bei RT vorinkubiert und anschließend für 2 h auf Mucin2-beschichtete Platten (5 µg/Kavität) gegeben. Die relative Fluoreszenz adhärenter Bakterien wurde in einem Fluorometer gemessen. Gezeigt sind die Daten aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit jeweils 12-fach-Bestimmung pro Ansatz. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen Kontrolle und Gluconat wurden jeweils mittels t-Test ermittelt (***) = p < 0,0001; ns = p > 0,05).

Aus Abbildung 34 wird ersichtlich, dass auch die Stämme EcN Wildtyp pMW211, EcN ATHF pMW211, sowie EcN $\Delta fliC$ pMW211 flagellenabhängig an Mucin2 adhärten. Die hyperflagellierte Variante EcN ATHF pMW211 zeigte im Vergleich zum EcN Wildtyp pMW211 eine signifikant höhere Adhäsionseffizienz, wohingegen die flagellennegative Mutante EcN $\Delta fliC$ pMW211 kaum effizient adhärte. Die Präinkubation der Bakterien mit Gluconat resultierte im Falle der flagellierten Stämme EcN Wildtyp pMW211 und EcN ATHF pMW211 in einer signifikanten Reduktion der Adhäsionseffizienz an Mucin2, wohingegen kein Effekt auf die Adhäsionsfähigkeit von EcN $\Delta fliC$ pMW211 beobachtet werden konnte.

4.6.2 Effekt von Gluconat auf die Adhäsion verschiedener EcN-Stämme an Kryoschnitte humaner Darmbiopsien

Schließlich wurde der Effekt von Gluconat auf die Adhäsion der EcN-Stämme EcN Wildtyp, EcN ATHF und EcN $\Delta fliC$ an Kryoschnitte humaner Darmbiopsien untersucht. Dazu wurden die verschiedenen Bakterienstämme zunächst mit dH₂O (Kontrolle) oder Gluconat (200 mM) 1:1 vermischt und für 1 h bei RT vorinkubiert. Anschließend wurde das Experiment wie bereits beschrieben (3.8.1.2) durchgeführt.

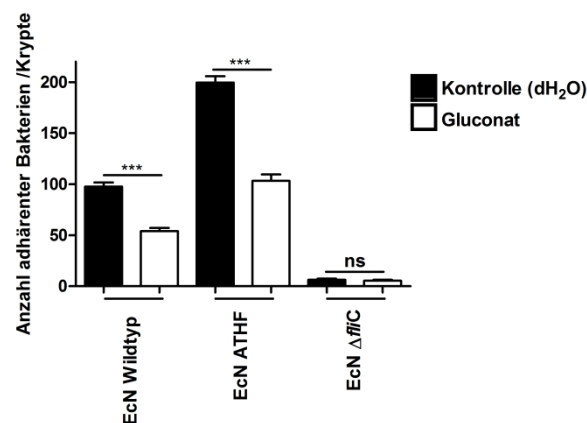


Abbildung 35: Effekt von Gluconat auf die Adhäsionseffizienz verschiedener EcN-Stämme an Kryoschnitte humaner Darmbiopsien.

Die Kryoschnitte stammten vom terminalen Ileum von Spender 3. Die EcN-Stämme EcN Wildtyp, EcN ATHF und EcN $\Delta fliC$ wurden mit Gluconat (200 mM) 1:1 für 1 h bei RT vorinkubiert und anschließend der Adhäsionsversuch mit den Kryoschnitten durchgeführt. Schließlich wurden nicht adhärenente Bakterien abgewaschen, adhärenente Bakterien und Kryoschnitte fixiert, gefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Gezeigt sind die Mittelwerte + Standardabweichung von insgesamt zwei voneinander unabhängigen Versuchen. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen Kontrolle und Gluconat wurden jeweils mittels t-Test ermittelt (***) = $p < 0,0001$; ns = $p > 0,05$).

Aus Abbildung 35 wird die flagellenabhängige Adhäsion an die Kryoschnitte humaner Darmbiopsien deutlich. EcN ATHF adhärte im Vergleich zum EcN Wildtyp viel

effizienter, wohingegen die Adhäsionsfähigkeit des EcN Δ *fliC* sehr gering war. Die Präinkubation mit Gluconat reduzierte die Adhäsionseffizienz der beiden flagellierten Stämme EcN Wildtyp und EcN ATHF an die Kryoschnitte signifikant, wohingegen kein Effekt auf die Adhärenz von EcN Δ *fliC* zu erkennen war. Abbildung 36 zeigt einige Mikrofotografien gefärbter Kryoschnitte des terminalen Ileums von Spender 3 mit adhärenenten Bakterien nach der Inkubation mit Gluconat, bzw. dH₂O (Kontrolle).

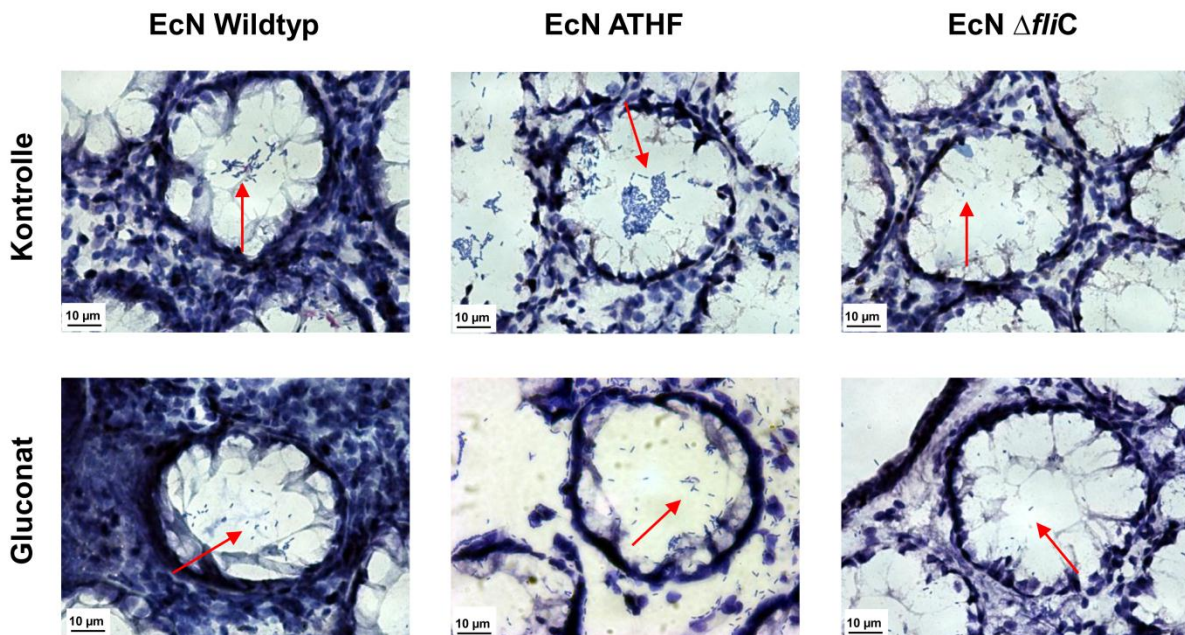


Abbildung 36: Mikrofotografien von Kryoschnitten humaner Darmbiopsien mit adhärenenten Bakterien nach Inkubation mit Gluconat.

Gezeigt sind nach Pappenheim gefärbte Kryoschnitte des terminalen Ileums von Spender 3 mit adhärenenten Bakterien nach Inkubation mit Gluconat (200 mM), bzw. dH₂O. Die Pfeile zeigen auf adhärenente Bakterien.

4.7 Einfluss der Domäne D3 von Flagellin auf die Interaktion isolierter Flagellen mit Mucin2 oder humanem Mucus

Da Flagellin die Hauptkomponente der Flagelle darstellt, ist anzunehmen, dass dieses Protein für die Interaktion zwischen Flagelle und Mucus verantwortlich ist. Wie bereits beschrieben, besteht Flagellin aus insgesamt vier Domänen. Die Domänen D0 und D1 bilden den innenliegenden Teil des Flagellins, wohingegen die Domänen D2 und D3 nach außen ragen und somit gute Kandidaten für die bereits nachgewiesene Interaktion mit Mucus sind. Im Rahmen eines in der Arbeitsgruppe durchgeführten Diplomarbeitprojekts (Stefan Rund, 2011) wurde eine EcN-Mutante hergestellt, bei der die Domäne D3 des Flagellins deletiert ist (EcN Δ *fliC* pSR-GE2). Von dieser wurden Flagellen isoliert, welche dann in Interaktionsstudien mit Mucin2 oder humanem Mucus eingesetzt wurden.

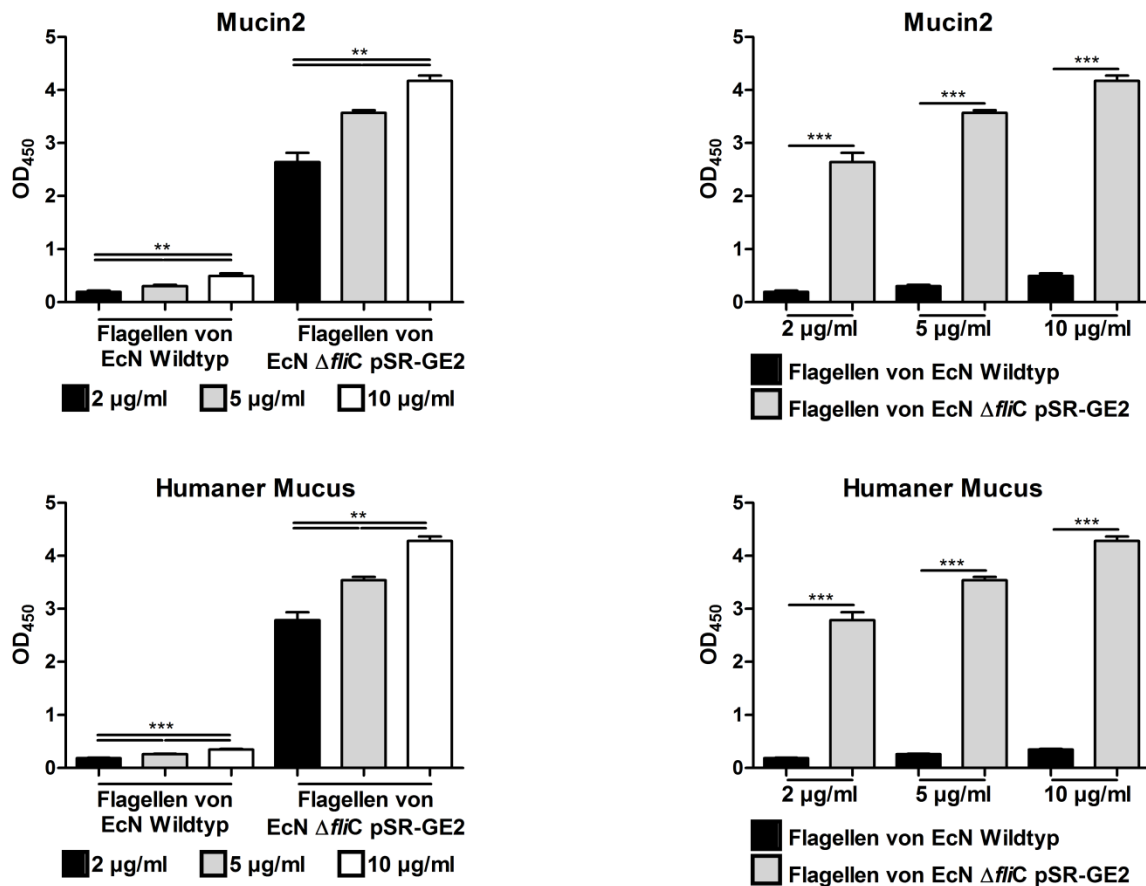


Abbildung 37: Effekt der Deletion von Domäne D3 auf die Interaktion isolierter Flagellen mit Mucin2 oder humanem Mucus.

Isolierte Flagellen von EcN Wildtyp und EcN Δ*fljC* pSR-GE2 wurden in verschiedenen Konzentrationen (2, 5 und 10 µg/ml) für ELISA-Versuche mit Platten, die zuvor mit Mucin2 (5 µg/Kavität) bzw. humanem Mucus (2 µg/Kavität) beschichtet wurden, eingesetzt. Die Interaktion wurde durch die Messung der OD₄₅₀ nach der Antikörperreaktion bestimmt. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte + Standardabweichung aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit Dreifachbestimmung pro Ansatz. Links ist die direkte konzentrationsabhängige Interaktion der beiden verschiedenen Flagellen mit Mucin2, bzw. humanem Mucus zu sehen. Die Signifikanz der konzentrationsabhängigen Interaktion der Flagellen mit Mucus, bzw. humanem Mucus wurde mittels t-Tests bestimmt. Rechts ist der direkte Vergleich der Interaktion verschieden konzentrierter Flagellen von EcN Wildtyp und EcN Δ*fljC* pSR-GE2 mit Mucin2, bzw. humanem Mucus zu sehen. Die Signifikanz der Unterschiede der Interaktion beider Flagellen mit Mucin2/humanem Mucus wurde mittels t-Test bestimmt (**/***) = p<0,001/0,0001)

Wie in Abbildung 37 deutlich zu erkennen ist, interagierten isolierte Flagellen ohne Domäne D3 signifikant stärker mit Mucin2 oder humanem Mucus als isolierte Flagellen von EcN Wildtyp. Demnach scheint zumindest Domäne D3 nicht für die Interaktion mit Mucus verantwortlich zu sein, da in diesem Fall keine Interaktion mehr stattfinden sollte. Ebenfalls untersucht wurde der Effekt von Gluconat auf die Interaktion der Flagellen ohne Domäne 3 mit Mucin2 oder humanem Mucus (Abbildung 38).

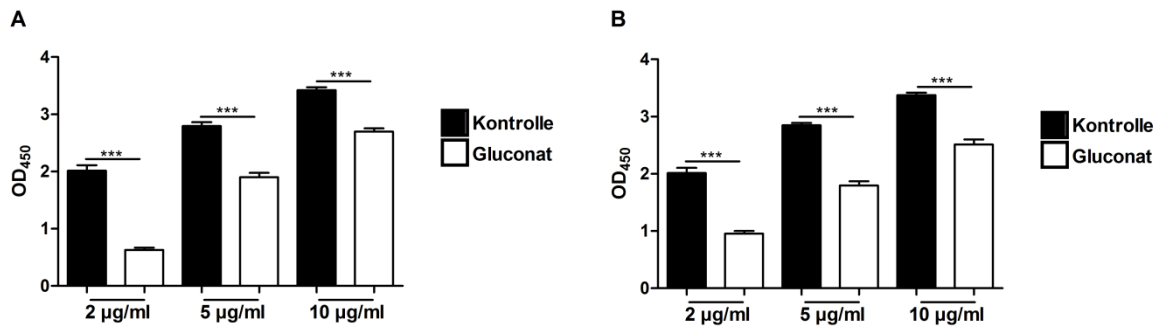


Abbildung 38: Effekt von Gluconat auf die Interaktion der Flagellen ohne Domäne D3 mit Mucin2 (A) oder humanem Mucus (B).

Verschiedene Konzentrationen (2, 5 und 10 $\mu\text{g/ml}$) isolierter Flagellen von EcN ΔfliC pSR-GE2 wurden mit dH_2O oder Gluconat (200 mM) für 1 h bei RT vorinkubiert und anschließend ELISA-Versuche durchgeführt, um einen Effekt auf die Interaktion zwischen Mucin2 (A) oder humanem Mucus (B) und den Flagellen zu zeigen. Die Interaktion wurde durch die Messung der OD_{450} nach der Antikörperreaktion bestimmt. Die Daten zeigen die Mittelwerte + Standardabweichung von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten mit Dreifachbestimmung pro Ansatz. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen Kontrolle und den einzelnen Kohlenhydraten wurde mittels t-Test bestimmt (*** = $p < 0,0001$).

Die Präinkubation der isolierten Flagellen ohne Domäne D3 mit Gluconat führte zu einer signifikanten Reduktion der Interaktion mit Mucin2 als auch mit humanem Mucus. Die für die Interaktion mit Mucus verantwortliche Struktur der Flagelle, welche durch Gluconat inhibiert werden kann, ist also trotz des Fehlens der Domäne D3 noch vorhanden. Zusätzlich wurde noch der pH-Effekt auf die Interaktion der Flagellen ohne Domäne D3 mit Mucin2 oder humanem Mucus untersucht (Abbildung 39).

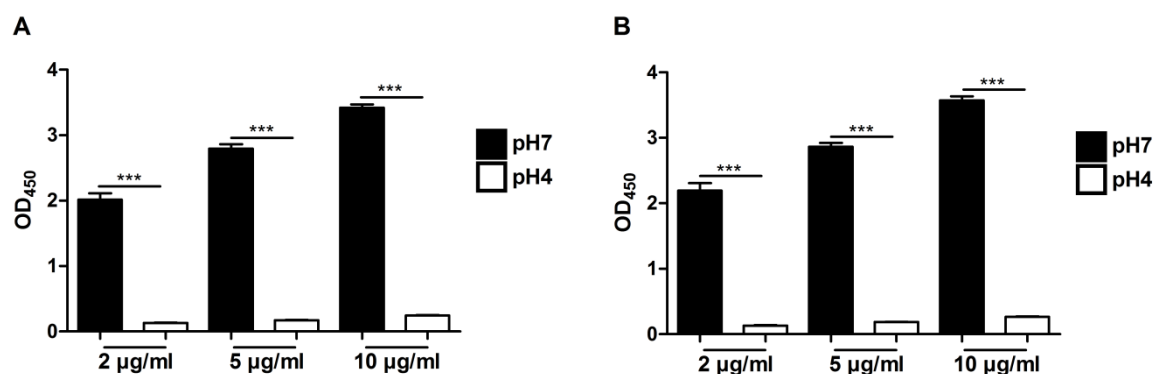


Abbildung 39: pH Effekt auf die Interaktion der Flagellen ohne Domäne D3 mit Mucin2 (A) oder humanem Mucus (B).

Verschieden konzentrierte Flagellenlösungen (2, 5 und 10 $\mu\text{g/ml}$) isolierter Flagellen von EcN ΔfliC pSR-GE2 wurden auf pH4 eingestellt und ELISA-Versuche durchgeführt, um den pH-Effekt auf die Interaktion mit Mucin2 (A) oder humanem Mucus (B) zu untersuchen. Als Kontrolle wurden Flagellenlösungen mit pH7 eingesetzt. Die Interaktion wurde durch die Messung der OD_{450} nach der Antikörperreaktion bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte + Standardabweichung von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen pH7 (Kontrolle) und pH4 wurde mittels t-Test bestimmt (*** = $p < 0,0001$).

Im Gegensatz zu den isolierten Flagellen des EcN Wildtyps, bei denen eine Erniedrigung des pH-Werts in einem signifikanten Anstieg der Interaktion mit Mucin2 bzw. humanem Mucus resultierte (Abbildung 30 und Abbildung 32), führte die Änderung des pH-Wertes der Lösungen mit Flagellen ohne Domäne 3 zu einer signifikant niedrigeren Interaktion mit Mucin2, sowie mit humanem Mucus. Insgesamt haben die Versuche mit isolierten Flagellen ohne Domäne D3 gezeigt, dass diese Domäne des Flagellins nicht für die Interaktion mit Mucus verantwortlich ist, da ein Fehlen der Domäne D3 keinen inhibierenden Effekt auf die Interaktion der Flagellen mit Mucin2, bzw. humanem Mucus hatte.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurden verschiedene Studien zum Flagellensystem des probiotischen *E. coli* Stammes Nissle 1917 im Hinblick auf seine Funktion als Probiotikum durchgeführt. Zum einen wurde die hyperflagellierte EcN-Variante ATHF isoliert und charakterisiert. Der größte Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung, welche Rolle die Flagelle des EcN bei der Adhäsion an Wirtsstrukturen einnimmt. Hierzu wurden zahlreiche Adhäsionsexperimente, sowie Interaktionsstudien etabliert und durchgeführt.

5.1 Charakterisierung der hyperflagellierten EcN-Variante ATHF

Die Flagelle ist eine wichtige Oberflächenstruktur von Bakterien, welche es diesen ermöglicht, sich in ihrer Umgebung gezielt zu bewegen. Besitzt ein Bakterium Flagellen, kann es diese nutzen, um geeignete Positionen für die Adhäsion an den Wirt zu finden. Somit erleichtert die Ausbildung von Flagellen eine effektive Kolonisierung von Wirtsgewebe. Grundsätzlich wird Darmbakterien, wie z.B. *Salmonella*- oder *E. coli*-Stämmen, eine peritriche Begeißelung zugeordnet. In dieser Arbeit konnte in elektronenmikroskopischen Untersuchungen gezeigt werden, dass dies auf den probiotischen *E. coli* Stamm Nissle 1917 (EcN) nicht zutrifft. Es wurde vielmehr offensichtlich, dass EcN Wildtyp monotrich flagelliert ist, also nur eine Flagelle pro Bakterienzelle exprimiert. Die hyperflagellierte EcN-Variante ATHF ist dahingegen polytrich begeißelt. Sie konnte in U-Röhrchen-Experimenten mit dem EcN Wildtyp isoliert werden. Im Motilitätstest auf Schwärmagarplatten zeigte sich EcN ATHF weitaus beweglicher als der Wildtyp und die elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigten den Verdacht, dass diese Variante mehr Flagellen als der Wildtyp exprimiert. Zunächst wurde angenommen, dass sich unter den wildtypischen EcN-Bakterien auch ein paar wenige hyperflagellierte Klone befanden, die das U-Röhrchen einfach schneller durchschwimmen konnten, als die monotrich flagellierten wildtypischen Bakterien. Grundsätzlich hätte man dann aber erwartet, dass im EcN Wildtyp Präparat für die Elektronenmikroskopie auch ein paar wenige Klone eine polytriche Flagellierung aufweisen. Von den 120 überprüften Bakterienzellen wies jedoch keine einzige mehr als eine Flagelle auf, was zu der Vermutung führt, dass sich die Anzahl der Flagellen einzelner Bakterien während dem Durchwandern des U-Röhrchens verändert und diesen dadurch einen Vorteil verschafft. Diese Veränderung scheint irreversibel zu sein, da die hyperflagellierte EcN-

Variante ATHF stabil isoliert werden konnte. Das bedeutet, dass Glycerinkulturen dieser EcN-Variante angelegt wurden und diese Bakterien nach jedem Auftauen und erneuten Ausstreichen den hyperflagellierten Phänotyp aufwiesen.

Auch peritrich flagellierte kommensale *E. coli* erreichen im gesunden Menschen nicht die Enterozyten. Dies ist zumindest teilweise darin begründet, dass die Darmepithelzellen antimikrobielle Peptide, wie z.B. Defensine sekretieren. Antimikrobielle Peptide, die von Enterozyten synthetisiert werden, stärken die Barrierefunktion der Darmschleimhaut. Bei bestimmten Darmerkrankungen, z.B. Colitis ulcerosa und Morbus Crohn ist die Synthese antimikrobieller Peptide vermindert (Wehkamp et al., 2005). Eine mögliche Stimulierung der krankheitsbedingt eingeschränkten Produktion dieser körpereigenen Schutzstoffe wäre demnach ein guter Wirkmechanismus für Probiotika. Es konnte gezeigt werden, dass die Flagelle von EcN die Produktion von humanem β -Defensin (hBD2) in Caco-2-Zellen induziert und damit die Barrierefunktion der Darmschleimhaut verstärkt (Schlee et al., 2007). In dieser Arbeit konnte diese Funktion der Flagellen von EcN in Versuchen mit dem Dual-Luciferase-System bestätigt werden. So gelang der Nachweis, dass durch die Verwendung der hyperflagellierten EcN-Variante ATHF im Vergleich zum EcN Wildtyp die Induktion der hBD2-Produktion bis zu 100% gesteigert werden konnte. Da die klinische Bedeutung von EcN für die Behandlung von Colitis ulcerosa unter anderem auf diesen Wirkmechanismus zurückgeführt wird, könnte der Einsatz der - ohne gentechnische Manipulationen erhaltenen - hyperflagellierten Variante EcN ATHF als Medikament die Behandlungsmöglichkeiten dieser Krankheit verbessern.

Weitere Untersuchungen fokussierten die Frage nach der molekularen Ursache der Hyperflagellierung von EcN ATHF. Wie bereits erwähnt, ist die Synthese funktionaler Flagellen in *E. coli* ein hochkomplex regulierter Vorgang, in den mindestens 14 Operons involviert sind, die alle in einer bestimmten Abfolge exprimiert werden müssen (Barker et al., 2004). Durch den Einbau eines IS-Elements in das *flhD*-Operon, wurde die Motilität eines *E. coli* K-12 Stammes nachweislich gesteigert. Es konnte allerdings kein Einbau eines IS-Elements in den regulatorischen Bereich von EcN ATHF als molekulare Ursache für die gesteigerte Motilität in diesem Stamm festgestellt werden. Ebenso konnte eine Mutation im LysR-ähnlichen Transkriptionsregulator LrhA als molekulare Ursache der Hyperflagellierung von EcN ATHF ausgeschlossen werden. Auch in anderen Spezies konnten verschiedene Ursachen für Hyperflagellierung identifiziert werden. Für *Salmonella enterica* serovar Typhimurium konnte z.B. gezeigt werden, dass die ClpXP-Protease die Flagellensynthese

reguliert und dass Mutanten, denen diese Protease fehlt, einen hyperflagellierten Phänotyp aufweisen (Tomoyasu et al., 2002). Diese Protease wurde ebenfalls in *E. coli* gefunden (Gottesman und Maurizi, 1992). Demnach könnte in einem nächsten Schritt überprüft werden, ob auch EcN dieses *clpXP*-Gen besitzt und wenn ja, ob beim EcN ATHF das Gen mutiert und inaktiv, also molekulare Ursache für den hyperflagellierten Phänotyp ist.

5.2 Adhäsionsstudien

Ein erster Schritt bei der bakteriellen Kolonisierung des humanen Gastrointestinaltraktes ist die Adhäsion von Mikroorganismen an das Wirtsgewebe (Torres et al., 2005). Die Fähigkeit effektiv an Wirtsgewebe zu adhären, gilt vor allem für pathogene Bakterien als wichtige Voraussetzung zur Etablierung einer Infektion. Aber auch probiotische Bakterien müssen zumindest vorübergehend dazu in der Lage sein an Wirtsstrukturen zu adhären, um ihre probiotische Wirksamkeit entwickeln zu können (Ouwehand et al., 1999). Sie nutzen dabei verschiedene Adhäsine, um sich an die unterschiedlichsten Rezeptoren auf Wirtsgewebe anzuhafte.

Über die Adhäsionseigenschaften des probiotischen *E. coli* Stammes Nissle 1917 ist bisher wenig bekannt. In dieser Arbeit wurden diese sowohl in *ex vivo* als auch in *in vitro* Experimenten untersucht. *Ex vivo* Experimente mit Kryoschnitten humaner Darmbiopsien zeigten, dass ein Fehlen der Flagelle zu einer signifikanten Reduktion der Adhäsion von EcN an diese führte. Damit übereinstimmend konnte die hyperflagellierte EcN-Variante ATHF wesentlich effektiver an die Kryoschnitte der humanen Darmbiopsien adhären. Demnach scheint die Flagelle eine essentielle Rolle bei der Adhäsion des EcN an die Kryoschnitte der humanen Darmbiopsien zu spielen. Auch interessant war, dass die Abwesenheit der F1A- und F1C-Fimbrien, welche bisher als wichtige Adhäsine von EcN angesehen wurden, sowohl einzeln als auch in Kombination, keinerlei signifikanten Einfluss auf das Adhäsionsverhalten von EcN an die Kryoschnitte der humanen Darmbiopsien hatte.

In vitro Experimente mit den humanen Karzinomepithelzellen Caco-2 und T24 führten zu einem ganz gegensätzlichen Ergebnis. Das Fehlen der Flagelle führte zu einer besseren Adhärenz von EcN an beide Zelllinien, wohingegen die Ausbildung multipler Flagellen die Adhäsion des probiotischen Stammes an diese Epithelzellen eher inhibierte. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Flagellen die Bakterienzelle räumlich von den Epithelzellen distanziert halten und daher den Kontakt anderer Adhäsine mit Rezeptoren auf den

Epithelzellen unterbinden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass durch die Überexpression der Flagellen die Ausbildung anderer, für die Adhärenz an Epithelzellen verantwortlicher, Adhäsine negativ beeinflusst wird. Für den uropathogenen *E. coli* Stamm CFT073 wurde z.B. gezeigt, dass die kontinuierliche Expression von Typ1-Fimbrien die Ausbildung von Flagellen negativ beeinträchtigt (Lane et al., 2007). Obwohl umgekehrt die Überexpression der Flagellen (Hyperflagellierung) nicht zu einer verminderten Expression von Typ1-Pili führte, kann ein solcher Effekt für andere Adhäsine nicht ausgeschlossen werden. Auch *in vitro* hatte die Abwesenheit der F1A- und F1C-Fimbrien keinen Effekt auf das Adhäsionsverhalten von EcN an die Epithelzellen. Ebenso konnten die Curli-Fimbrien als verantwortliche Adhäsine ausgeschlossen werden. Weder die Flagelle, noch die getesteten Fimbrienadhäsine konnten somit als für die Adhäsion verantwortliche Oberflächenstrukturen identifiziert werden. Möglich wäre, dass mehrere Adhäsine die Anhaftung an die Epithelzellen vermitteln können und dass das Fehlen eines bestimmten Adhäsins durch die anderen noch vorhandenen Adhäsine kompensiert wird. Ein Zusammenspiel der F1C und F1A Pili kann dabei bereits ausgeschlossen werden, da die Mutante EcN $\Delta fim \Delta foc$ genauso effizient an die Epithelzellen Caco-2 und T24 adhärte wie der EcN Wildtyp. Ein weiteres, sowohl in pathogenen als auch kommensalen *E. coli* verbreitetes Adhäsins ist der *E. coli* Common Pilus Ecp (Rendon et al., 2007; Saldana et al., 2009; Avelino et al., 2010). Auch EcN besitzt das Gen *ecpA*, welches für diesen Pilus codiert. Dieses Adhäsins könnte demnach ebenfalls für die effektive Anhaftung des Stammes an die Epithelzellen verantwortlich sein.

Diese unterschiedlichen Ergebnisse der *in vitro* und *ex vivo* Experimente verdeutlichen, dass *in vitro* Adhäsionsstudien mit humanen Epithelzellen, welche standardmäßig für die Untersuchung bakterieller Adhäsion eingesetzt werden, oftmals nicht die *in vivo* Verhältnisse widerspiegeln können. *In vivo* sind die intestinalen Epithelzellen von einer Mucusschicht bedeckt. Unter den gegebenen *in vitro* Bedingungen produzierten die hier verwendeten Caco-2- und T24-Zellen allerdings keinen Mucus. Da in den Kryoschnitten der humanen Darmbiopsien auch Reste von Mucus vorhanden sind, liegt hier vermutlich die Ursache für das unterschiedliche Adhäsionsverhalten von EcN in den *in vitro* und *ex vivo* Experimenten. Es ist anzunehmen, dass die Flagelle von EcN *ex vivo* die Adhäsion an Mucusreste vermittelt, wohingegen dies *in vitro* aufgrund des fehlenden Mucus nicht beobachtet werden konnte. Die Tatsache, dass Flagellen, die Adhäsion von Bakterien an Mucus vermitteln können, wurde bereits für einige pathogene Bakterien, wie z.B. für *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium difficile* oder verschiedene pathogene *E. coli* (Arora et al., 1998; Tasteyre et al., 2001; Erdem

et al., 2007; Mahajan et al., 2009) sowie den probiotischen Stamm *Bacillus cereus* CH (Sanchez et al., 2009) nachgewiesen.

Die Ergebnisse der *in vitro* Versuche mit der humanen Epithelzelllinie LS174-T unterstützten die Annahme, dass die Flagelle von EcN die Adhäsion an Mucus vermittelt. Diese Zellen waren in der Lage unter den gegebenen Zellkulturbedingungen Mucus zu produzieren, welcher die Epithelzellen als schleimige Schicht bedeckt und mit bloßem Auge in den Kulturflaschen zu erkennen war. Zudem konnte die Produktion von Mucinen durch PAS-Färbung nachgewiesen werden. An die LS174-T Zellen, bzw. den von ihnen produzierten Mucus, adhärte die hyperflagellierte EcN-Variante ATHF in wesentlich höherer Zahl als der Wildtyp. Das Fehlen der Flagelle dahingegen führte zu einer wesentlich niedrigeren Adhäsionseffizienz (31% im Vergleich zu 100% beim EcN Wildtyp) des Stammes EcN Δ *fliC*. Diese Daten bestätigten, dass die Unterschiede im Adhäsionsverhalten von EcN zwischen den *ex vivo* Versuchen mit den Kryoschnitten humaner Darmbiopsien und den *in vitro* Versuchen mit den humanen Karzinomepithelzellen Caco-2 und T24 tatsächlich auf die An-, bzw. Abwesenheit von Mucus zurückzuführen sind.

Die Hauptstrukturkomponenten der Mucusschicht sind die Mucine, wobei das MUC2 Mucin das Hauptmucin des humanen Dünn- und Dickdarms ist. Das in dieser Arbeit verwendete Mucin2 ist ein kommerziell erhältliches Mucin aus dem Schweinemagen und wurde zunächst in verschiedenen Konzentrationen (0,2% und 5%) eingesetzt, um den Effekt auf die Adhärenz verschiedener EcN-Stämme an Kryoschnitte humaner Darmbiopsien zu untersuchen. Dabei wurden die verschiedenen Stämme vor der eigentlichen Inkubation mit den Kryoschnitten für 1 h bei 37 °C 1:1 mit den Mucinlösungen inkubiert. Die Präinkubation der flagellierten EcN-Stämme mit den verschiedenen konzentrierten Mucin2-Lösungen führte zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der effektiven Adhäsion an Kryoschnitte humaner Darmbiopsien. Auf die sehr niedrige Adhäsionsfähigkeit des nichtflagellierten Stammes EcN Δ *fliC* hatte die Präinkubation mit Mucin2 keinen signifikanten Effekt. Mucin2 band demnach an die Flagellen und inhibierte so deren Interaktion mit Oberflächenrezeptoren auf den Kryoschnitten der humanen Darmbiopsien.

Auch die Ergebnisse der Adhäsionsstudien mit den Mucin2-beschichteten Platten bestätigten die Funktion der Flagelle als Adhäsion an Mucus. Im Vergleich zum EcN Wildtyp (Adhäsionseffizienz: 100%) adhärte die hyperflagellierte EcN-Variante ATHF signifikant effizienter (Adhäsionseffizienz: 434%) an Mucin2, wohingegen die nichtflagellierte Mutante EcN Δ *fliC* eine wesentlich schlechtere Adhäsionseffizienz (24%) zeigte. Die Komplementante

adhärierte wie erwartet ähnlich effizient wie der EcN Wildtyp (Adhäsionseffizienz: 87%). Interessanterweise adhärierte der zum EcN nah verwandte uropathogene Stamm CFT073 auf ähnlich niedrigem Niveau wie die flagellenegative Mutante EcN Δ fliC (Adhäsionseffizienz: 27%). Des Weiteren konnte zwischen dem wildtypischen CFT073 Stamm und der flagellenegativen Mutante CFT073 Δ fliC (Adhäsionseffizienz: 25%) kein signifikanter Unterschied in der Adhäsionseffizienz beobachtet werden. Demnach kann die Flagelle dieses uropathogenen Stammes nicht für die Adhäsion an Mucin2 verantwortlich sein. Genau wie bei der Induktion der hBD2-Produktion durch Caco-2-Zellen, hat auch hier die Flagelle des CFT073 nicht den gleichen Effekt wie die Flagelle des EcN, obgleich sowohl die Nukleotidsequenz, als auch die Aminosäuresequenz von Flagellin, der Hauptuntereinheit der Flagellen, zwischen beiden Stämmen zu 100% übereinstimmen. Ebenso wäre möglich, dass sich das „Cap“-Protein FliD der beiden Stämme voneinander unterscheidet und dieses statt FliC für die Bindung der Flagelle an Mucus verantwortlich ist. Dass dieses Protein die Bindung der Flagelle an Mucin vermitteln kann, wurde bereits für *Pseudomonas aeruginosa* gezeigt (Arora et al., 1998). Allerdings unterscheidet sich die Nukleotidsequenz des *fliD*-Gens der beiden Stämme nicht (7.4), so dass anzunehmen ist, dass beide „Cap“-Proteine identisch sind. Der Unterschied in den Funktionen der Flagelle zwischen EcN und CFT073 muss daher auf den Einfluss des Stammhintergrunds zurückzuführen sein.

5.3 Interaktionsstudien

Dass bakterielle Flagellen die Adhäsion an Mucus vermitteln, wurde in verschiedenen Studien gezeigt, unter anderem auch für den probiotischen Stamm *Bacillus cereus* CH (Sanchez et al., 2009). Eine direkte Interaktion zwischen Flagelle und Mucus konnte für diesen Stamm bisher jedoch nicht nachgewiesen werden. Um die direkte Interaktion zwischen den Flagellen des EcN und Mucus zu bestätigen und zu messen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein ELISA etabliert. Zunächst wurde mit solch einem ELISA die Interaktion zwischen isolierten Flagellen des EcN Wildtyps und Mucin2 untersucht. Dafür wurden 96-Kavitäten-Platten mit Mucin2 beschichtet. Als Kontrolle wurde jeweils ein Teil der Platte mit Milchpulver beschichtet. Dies war notwendig, um sicherzugehen, dass die Interaktion der Flagellen mit Mucin2 für dieses Glykoprotein spezifisch ist, und nicht auf eventuelle Interaktionen mit der 96-Kavitätenplatte selbst zurückgeführt werden kann. Die Ergebnisse aus diesen Versuchen bestätigten eine konzentrationsabhängige Interaktion der isolierten Flagellen des EcN Wildtyps mit Mucin2. Es konnte keine direkte Interaktion der Flagellen mit Milchpulver

beobachtet werden, so dass die Beschichtung mit Milchpulver in weiteren Versuchen als Negativkontrolle diene.

Die bisherig diskutierten Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die Flagelle des EcN für die Adhäsion an Mucus verantwortlich ist. Eine Hyperflagellierung des Stammes könnte somit zu einem Kolonisierungsvorteil gegenüber anderen, weniger oder nichtflagellierten Stämmen, wie dem EcN Wildtyp oder EcN $\Delta fliC$, führen. Dementsprechend lag die Überlegung nahe, *in vivo* Kolonisierungs-Experimente im Mausmodell durchzuführen. Voraussetzung dafür war jedoch eine direkte Interaktion zwischen isolierten Flagellen und murinem Mucus. Um dies zu überprüfen, wurde Mucus aus vier verschiedenen Darmabschnitten (Duodenum, terminales Ileum, Caecum und Colon) von insgesamt fünf c57BL/6 Mäusen isoliert. Mit diesen verschiedenen Mucusproben wurden 96-Kavitätenplatten beschichtet und ELISAs durchgeführt. Jedoch konnte für keine aus den verschiedenen Darmabschnitten isolierten Mucusproben eine direkte konzentrationsabhängige Interaktion mit den Flagellen von EcN beobachtet werden. Vielmehr schien gar keine Interaktion zwischen murinem Mucus und Flagellen von EcN stattzufinden. Interessanterweise wurde für Flagellen von *Clostridium difficile* genau das Gegenteil beobachtet. Sie interagierten mit murinem Mucus, jedoch nicht mit Mucin aus dem Schweinemagen (Tasteyre et al., 2001). Diese Ergebnisse weisen auf signifikante Unterschiede in der Zusammensetzung von Schweine- und Mäusemucus hin. Tatsächlich wurde dies durch eine kürzlich veröffentlichte Studie bestätigt, in welcher der intestinale Mucusmarker MUB₇₀ identifiziert und charakterisiert worden war (Coic et al., 2012). Dieser synthetisierte Cy5-konjugierte MUB70 Marker färbte spezifisch intestinalen Mucus auf fixiertem Gewebe von Menschen, Hasen und Meerschweinchen, war jedoch nicht in der Lage, intestinalen Mucus in Mäusegewebe nachzuweisen. Die Flagelle des EcN scheint demnach spezifische Rezeptoren zu erkennen, die zwar im Schweinemucin zu finden sind, in murinem Mucus jedoch fehlen.

Aufgrund dieser beobachteten Unterschiede war es natürlich von Interesse, ob die direkte konzentrationsabhängige Interaktion zwischen Flagellen des EcN Wildtyps und Mucin2 aus dem Schwein auch für humanen Mucus nachgewiesen werden kann. Insgesamt wurden für diese Versuche Mucusproben von vier gesunden Spendern isoliert und für die Beschichtung von 96-Kavitätenplatten verwendet. Im anschließenden ELISA konnte für alle vier Proben eine direkte Interaktion mit isolierten Flagellen des EcN Wildtyps beobachtet werden. Die Zusammensetzung des humanen intestinalen Mucus scheint daher der Zusammensetzung des Mucus aus dem Schweinemagen sehr ähnlich zu sein.

EcN besitzt Flagellen vom Serotyp H1. Um zu überprüfen, ob die Interaktion zwischen isolierten Flagellen und Mucin2 für EcN spezifisch ist, wurde ebenfalls die Interaktion isolierter Flagellen anderer *E. coli* Stämme mit Mucin2 untersucht. Isoliert und getestet wurden hierbei Flagellen vom uropathogenen *E. coli* Stamm CFT073, welcher ebenfalls Flagellen vom Serotyp H1 exprimiert, sowie vom uropathogenen *E. coli* Stamm 536, welcher Flagellen vom Serotyp H31 ausbildet. Unter 7.5 sind die AS-Sequenzen von FliC, dem Hauptflagellenprotein der verschiedenen *E. coli* Stämme aufgeführt. Interessanterweise konnte für die Flagellen beider uropathogener Stämme kein konzentrationsabhängiger Anstieg der Interaktion mit Mucin2 beobachtet werden. Die Flagelle scheint ganz im Gegensatz zum probiotischen Stamm EcN bei beiden uropathogenen *E. coli* Stämmen keine Rolle für die Adhärenz an Mucus zu spielen. Da beide Stämme jedoch eher den Urogenitaltrakt als den Intestinaltrakt kolonisieren, ist es nicht weiter verwunderlich, dass die Flagelle bei diesen Stämmen nicht als Adhäsion an intestinalen Mucus fungiert. Wiederum zeigte sich jedoch in diesen Experimenten die unterschiedliche Wirkung der Flagelle vom EcN und dem UPEC-Stamm CFT073. Wie bereits erwähnt, exprimieren beide Stämme Flagellen vom Serotyp H1 und sowohl die Nukleotidsequenz, als auch die Aminosäuresequenz des Hauptflagellenproteins FliC ist bei beiden Stämmen zu 100% identisch. Die Unterschiede zwischen beiden Flagellen im Hinblick auf die hBD2-Induktion und die Adhäsion an, bzw. Interaktion mit Mucus, könnte aber auch auf stammspezifische posttranslationale Modifikationen zurückzuführen sein. Eine Glykosylierung des Hauptflagellenproteins Flagellin wurde bereits in einigen flagellierten Mikroorganismen, wie z.B. *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile* oder *Pseudomonas* ssp. nachgewiesen (Ewing et al., 2009; Konishi et al., 2009; Twine et al., 2009). Es wurde gezeigt, dass diese posttranslationalen Modifikationen für den Zusammenbau der Flagelle, aber auch für ihre Funktion als Virulenzfaktor wichtig sein können (Logan, 2006; Taguchi et al., 2010). Allerdings ist solch eine posttranslationale Modifikation immer mit einem höheren Molekulargewicht des Proteins verbunden. Dementsprechend sollten Glykosylierungen von Flagellin im Western Blot durch ein höheres Molekulargewicht des Proteins auffallen. Die Flagelline des EcN Wildtyps und des UPEC CFT073 sind jedoch im Western Blot auf der gleichen Höhe zu finden, besitzen also das gleiche Molekulargewicht, wenn isolierte Flagellen der beiden Stämme untersucht wurden. Zudem entspricht dieses Molekulargewicht dem anhand der Aminosäuresequenz berechneten Molekulargewicht des Flagellins (60,9 kDa).

Bisher wurden in keiner Studie, welche die Rolle der Flagelle bei der Adhäsion an Wirtsgewebe thematisierte, Substrukturen oder Domänen von Mucus identifiziert, die für die

Interaktion mit der Flagelle verantwortlich sein könnten. Die Mucusschicht besteht hauptsächlich hochglykosylierten Proteinen, den Mucinen. Mehrere Kohlenhydratkomponenten von Mucus sind bereits bekannt, darunter Arabinose, Maltose, Mannose, Glucose, Fucose, Galactose, Ribose, N-Acetylglucosamin (GlcNAc), N-Acetylgalactosamin (GalNAc), N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), Gluconat, Galactonat oder Glucuronat (Roos und Jonsson, 2002; Fox et al., 2009). Für *E. coli* O157 wurde gezeigt, dass ihm die meisten dieser Kohlenhydrate als Nahrungssubstrate dienen, was ihm beim Wachstum folglich einen selektiven Vorteil gegenüber anderen Bakterien verschafft (Miranda et al., 2004). Um herauszufinden, ob eines dieser Kohlenhydrate als potentieller Interaktionspartner der Flagelle von EcN in Frage kommt, wurden in dieser Arbeit einige Kohlenhydrate auf ihre Fähigkeit getestet, die Interaktion von Flagellen mit Mucin2, bzw. humanem Mucus zu inhibieren. Die Präinkubation mit Gluconat reduzierte die Interaktion isolierter Flagellen des EcN Wildtyps mit Mucin2, bzw. humanem Mucus signifikant. So wurde die Interaktion isolierter Flagellen des EcN Wildtyps mit Mucin2 durch die Präinkubation mit Gluconat (100 mM) bis zu 47% gehemmt, bei humanem Mucus lag die Hemmung bei bis zu 41%. Dass Gluconat einen Rezeptor für die Flagelle des EcN darstellt, wurde daraufhin auch in weiteren *ex vivo* Adhäsionsexperimenten mit lebenden Bakterien belegt. Die Präinkubation der beiden flagellierten Stämme EcN Wildtyp und EcN ATHF mit Gluconat führte zu einer drastischen Reduktion ihrer Adhärenz an Kryoschnitte humaner Darmbiopsien. Im Gegensatz dazu hatte die Präinkubation mit Gluconat keinen Einfluss auf die Adhärenz der flagellennegativen Mutante EcN Δ *fliC* an das Wirtsgewebe. Auch die Ergebnisse aus den Adhäsionsexperimenten mit den fluoreszierenden Bakterien EcN Wildtyp pMW211, EcN ATHF pMW211 und EcN Δ *fliC* pMW211 bestätigten die Funktion von Gluconat als Rezeptor für die Flagelle. Die Adhäsion der flagellierten Stämme EcN Wildtyp pMW211 und EcN ATHF pMW211 an Mucin2 konnte durch die Präinkubation der beiden Stämme mit Gluconat (100 mM) bis zu 67% gehemmt werden. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen, hatte die Präinkubation mit Gluconat keinen Effekt auf die Adhärenz der flagellennegativen Mutante EcN Δ *fliC* an Mucin2. Die Anwesenheit von Gluconat bedingte also sowohl eine Reduktion der Interaktion isolierter Flagellen mit Mucin2, bzw. humanem Mucus, als auch eine Hemmung der Adhäsionseffizienz lebender Bakterien in *ex vivo* und *in vitro* Adhäsionsstudien. Somit konnte der Mucusbestandteil Gluconat als ein wesentlicher Rezeptor für die Flagelle des EcN identifiziert werden.

Die ebenfalls getesteten Kohlenhydrate Fucose, Mannose, Ribose und GlcNAc hatten keinen signifikanten Effekt auf die Interaktion isolierter Flagellen des EcN Wildtyps und Mucin2,

bzw. humanem Mucus. Sie konnten daher als potentielle Rezeptoren für die Flagelle des EcN ausgeschlossen werden. Die Präinkubation isolierter Flagellen mit Glucuronat führte dahingegen zu einer verstärkten Bindung der Flagellen an Mucin2, bzw. humanem Mucus. Auch wurde festgestellt, dass dies vermutlich auf den niedrigen pH-Wert der Glucuronatlösung (pH4) zurückzuführen ist, mit welcher die isolierten Flagellen präinkubiert wurden. Wurde vor der Präinkubation mit den isolierten Flagellen der pH-Wert der Glucuronatlösung auf pH7 eingestellt, zeigte sich keine erhöhte Bindung der Flagellen an Mucin2. Ein möglicher Effekt des niedrigen pH-Wertes auf Mucin2, bzw. humanen Mucus kann ausgeschlossen werden, da zusätzliche Kontrollexperimente durchgeführt wurden. In diesen Experimenten wurden Platten, die zuvor mit Mucin2, bzw. humanem Mucus beschichtet worden waren, mit saurer (pH4) und neutraler (pH7) PBS-Lösung für 1 h bei RT präinkubiert und dann die Interaktionsstudie mit isolierten Flagellen wie bisher durchgeführt. Bezüglich der Interaktion mit isolierten Flagellen von EcN Wildtyp konnte hier kein Unterschied zwischen der Präinkubation von Mucin2, bzw. humanem Mucus mit saurem oder neutralem PBS festgestellt werden. Demnach ist anzunehmen, dass der niedrige pH-Wert auf die Flagelle selbst wirkt. Für Flagellen von *Bacillus subtilis* und *E. coli* wurde gezeigt, dass sie bei saurem pH-Wert in monomeres Flagellin dissoziieren (DePamphilis und Adler, 1971). Somit könnte die Präinkubation isolierter Flagellen mit Glucuronat (pH4) oder saurem PBS (pH4) dazu führen, dass diese in monomere Flagellinuntereinheiten zerfallen. Dadurch könnten Bindungsstellen am FliC freiwerden, was folglich dazu führt, dass mehr Flagellin an Mucin2, bzw. humanem Mucus bindet. Eine weitere Erklärung für diese erhöhte Interaktion mit Mucin2, bzw. humanem Mucus könnte aber auch sein, dass der verwendete Primärantikörper an monomeres Flagellin besser bindet. Prinzipiell wäre es zudem möglich, dass die Flagellen durch den niedrigen pH-Wert nicht nur dissoziierten, sondern auch die Konformation ihrer Hauptuntereinheit, dem Flagellin, verändert wurde. Dies könnte ebenfalls zum Freiwerden von Bindestellen für Mucin2, bzw. humanem Mucus geführt und somit die erhöhte Interaktion verursacht haben. Eine pH-abhängige Interaktion von Adhäsinen mit Mucus, wurde ebenfalls für Mucus-bindende Proteine (MUBs) von *Lactobacillus reuteri* gezeigt (Roos und Jonsson, 2002). Die Interaktion von MUBs mit Mucus-Komponenten konnte zwischen pH3 und pH7,4 beobachtet werden, fand ihr Maximum jedoch bei pH4-5. Die Ursache dafür wurde hier jedoch nicht weiter thematisiert. Der pH-Wert im Gastrointestinaltrakt variiert zwischen 4,0 und 6,7 (Fallingborg, 1999). Die maximale Bindung der Flagelle an Mucus bei einem bestimmten pH-Wert könnte so den Ort der Besiedelung im Darm bestimmen. In einigen Studien konnte außerdem nachgewiesen werden,

dass der pH-Wert im Darm bei Patienten mit akuter Colitis ulcerosa, sowie bei Patienten mit Morbus Crohn, niedriger ist, als bei gesunden Individuen (Nugent et al., 2001). Die erhöhte Bindung seiner Flagelle an Mucus bei niedrigeren pH-Werten könnte hier also zu einem Kolonisierungsvorteil für den probiotischen Stamm EcN führen, der zumindest bei Colitis ulcerosa bereits als Medikament eingesetzt wird.

Intakte Flagellen von *E. coli* bestehen im Wesentlichen aus drei Teilen: dem Filament, dem Haken und dem Basalkörper (DePamphilis und Adler, 1971). Der Grund für die adhäsiven Eigenschaften von Flagellen liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit in ihrer molekularen Struktur. Das Filament der Flagellen besteht aus mehreren tausend Kopien von Flagellin, der Hauptuntereinheit der Flagelle (Macnab, 2003). Flagellin besteht wie bereits beschrieben aus vier Domänen: den hochkonservierten Domänen D0 und D1, welche am N- und C-Terminus des Proteins lokalisiert sind und im Inneren des Filaments liegen, sowie den hypervariablen Domänen D2 und D3, welche oberflächenexponiert und damit gute Kandidaten für die Interaktion mit Mucus sind. In dieser Arbeit wurden Flagellen aus einer Domäne D3 Deletionsmutante (EcN Δ fliC pSRGE-2) von EcN isoliert und für Interaktionsstudien mit Mucin2, bzw. humanem Mucus verwendet. Diese Domäne D3 Deletionsmutante wurde im Rahmen eines Diplomarbeitprojekts (Stefan Rund, 2011) in der Arbeitsgruppe hergestellt und bereits teilweise charakterisiert. So zeigte diese Mutante im Schwärmagartest keine Motilität, exprimiert aber dennoch Flagellen, wie in elektronenmikroskopischen Untersuchungen nachgewiesen werden konnte. Allerdings waren diese Flagellen wesentlich fragiler als die des EcN Wildtyps. Die Ergebnisse der Interaktionsstudien zeigten, dass Domäne D3 nicht für die Interaktion mit Mucin2, bzw. humanem Mucus verantwortlich sein kann. Trotz fehlender Domäne D3 fand eine konzentrationsabhängige Interaktion mit Mucin2, bzw. humanem Mucus statt. Zudem hatte die Präinkubation dieser Flagellen mit Gluconat einen inhibierenden Effekt auf deren Interaktion mit Mucin2, bzw. humanem Mucus, was darauf hinweist, dass der für die Interaktion verantwortliche Teil der Flagelle, welcher durch Gluconat inhibiert werden kann, immer noch vorhanden ist. Es ist daher anzunehmen, dass die andere nach außen exponierte Domäne des FliC, Domäne D2, für die Interaktion mit Mucin2, bzw. humanem Mucus verantwortlich ist. Interessant war auch die im Vergleich zur wildtypischen Flagelle stark erhöhte Interaktion der aus der Domäne D3 Deletionsmutante isolierten Flagellen mit Mucin2, bzw. humanem Mucus. Die hier gemessenen Werte erinnerten an die ebenfalls stark erhöhte Interaktion der wildtypischen Flagelle mit humanem Mucus bei niedrigem pH-Wert (pH4). Betrachtet man die Struktur des FliC (Abbildung 40), wird

offensichtlich, dass durch das Fehlen der Domäne D3, die Domäne D2 vermutlich viel freier zugänglich ist.

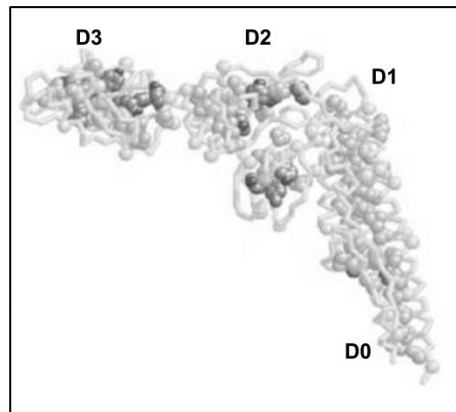


Abbildung 40: Struktur des Flagellin.

Flagellin besteht aus den vier Domänen D0, D1, D2 und D3. Während D0 und D1 hoch konserviert im Inneren der Flagelle positioniert sind, sind die hochvariablen Domänen D2 und D3 nach außen exponiert. Modifiziert nach Terashima et al., 2008.

Die stark erhöhte Interaktion der Flagellen aus der Domäne D3 Deletionsmutante mit Mucin2, bzw. humanem Mucus, könnte demnach darauf zurückgeführt werden, dass Domäne D2 nun besser an diese Wirtsstrukturen binden kann. Auch hier kann jedoch eine bessere Bindung des Primärantikörpers als Ursache für die erhöhte Interaktion nicht ausgeschlossen werden. Außerdem wäre möglich, dass die instabilen Flagellen der Domäne D3 Deletionsmutante - genau wie die Flagellen des EcN Wildtyps bei pH4 - während der Isolation in Monomere dissoziieren, welche dann wiederum durch freigewordene Bindungsstellen besser mit Mucin2, bzw. humanem Mucus interagieren können. Allein die Dissoziation der Flagellen bei niedrigem pH-Wert, bzw. durch Deletion von Domäne D3 und der damit verbundenen erhöhten Interaktion mit Mucin2, bzw. humanem Mucus, erklärt jedoch nicht die Ergebnisse aus den Interaktionsstudien, in denen der pH-Effekt auf die Interaktion der Flagellen von EcN Δ fliC pSRGE-2 mit Mucin2, bzw. humanem Mucus untersucht wurde. Waren diese Flagellen einem niedrigen pH-Wert ausgesetzt, reduzierte sich deren Interaktion mit Mucin2, bzw. humanem Mucus dramatisch. Würde eine Erniedrigung des pH-Wertes nur zu einer Dissoziation der Flagellen in Monomere und in Folge dessen zum Freiwerden von Mucusbindungsstellen, bzw. von Bindungsstellen für den Primärantikörper führen, sollte dies jedoch in einer erhöhten oder zumindest gleichbleibenden Interaktion dieser Flagellen an Mucin2, bzw. humanem Mucus resultieren. Es ist daher anzunehmen, dass den isolierten Flagellen des EcN Wildtyps sowie von EcN Δ fliC pSRGE-2 durch die pH-Wert-Änderung eine Konformationsänderung widerfährt. Daraus hat sich ein bisher rein spekulatives Modell (Abbildung 41) entwickelt, welches die Ergebnisse der Interaktionsstudien erklären könnte.

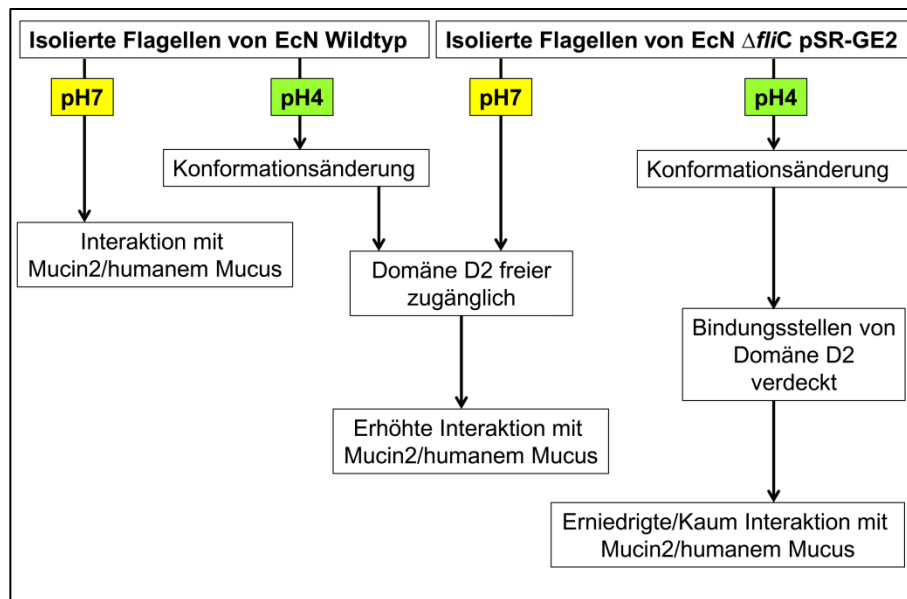


Abbildung 41: Spekulatives Modell zur Erklärung der Ergebnisse der Interaktionsstudien.

Nach diesem Modell führt die Erniedrigung des pH-Wertes bei der Wildtyp-Flagelle zu einer Konformationsänderung, bei der die Domäne D2 freier zugänglich wird. In Folge dessen kommt es dann zu einer erhöhten Bindung der Flagellen an Mucin2, bzw. humanem Mucus. Die Domäne D2 des Flagellins von Flagellen der Domäne D3 Deletionsmutante ist bereits aufgrund der Deletion freier zugänglich. Dadurch wird die Interaktion dieser Flagellen mit Mucin2, bzw. humanem Mucus signifikant erhöht. Die Erniedrigung des pH-Wertes führt dann auch hier zu einer Konformationsänderung, in Folge derer Bindungsstellen der Domäne D2 für Mucin2, bzw. humanen Mucus verdeckt werden, wodurch die Interaktion sinkt. Möglicherweise zerstört die Konformationsänderung auch Strukturen der Domäne D2, welche für die Bindung an Gluconat, dem hier identifizierten Rezeptor der Flagelle, wichtig sind.

Insgesamt konnte durch die Interaktionsstudien nachgewiesen werden, dass die Flagelle des EcN tatsächlich direkt mit Mucin2, bzw. humanem Mucus interagiert. Gluconat konnte als Mucusbestandteil identifiziert werden, der als Rezeptor für die Flagelle des EcN dient. Seitens der Flagelle konnte die nach außen exponierte Domäne D3 des Hauptflagellenproteins Flagellin als für die Interaktion mit Mucin2, bzw. humanem Mucus verantwortliche Struktur ausgeschlossen werden. Die Untersuchung von pH-Effekten führte zu einem spekulativen Modell, welches die unterschiedlichen Ergebnisse der Interaktionsstudien erklären könnte.

5.4 Abschließende Worte und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Flagelle des probiotischen *E. coli* Stammes Nissle 1917 eindeutig als Adhäsın identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass sie die Adhäsion an humanen Mucus sowie an Mucin2 aus dem Schweinemagen vermittelt. In den Studien wurden dabei die Grenzen von *in vitro* Zellkulturexperimenten aufgezeigt, da diese oftmals nicht die *in vivo* Verhältnisse widerspiegeln können. So wäre die Flagelle des EcN wohl niemals als Adhäsın identifiziert worden, wenn nur die Standardzellkulturexperimente durchgeführt worden wären. Unklar bleibt, welches Adhäsın des EcN für die Bindung an die nicht mucinproduzierenden Zellen Caco-2 und T24 verantwortlich ist. Möglich wäre, dass das Fehlen eines Adhäsıns durch die Expression eines anderen ausgeglichen wird. Um dies herauszufinden, müssten zunächst Mutanten generiert werden, denen zwei oder mehr Adhäsıne gleichzeitig fehlen und diese anschließend in Adhäsionsstudien mit den Zellen getestet werden. Ebenfalls sollte eine *ecpA*-Mutante von EcN hergestellt werden, um zu überprüfen, ob möglicherweise das Adhäsın Ecp (*E. coli* common pilus) für die Anhaftung an die Epithelzellen verantwortlich ist.

Für die Untersuchungen zur Funktion der Flagelle als Adhäsın war auch die Isolierung der hyperflagellierten Variante EcN ATHF von großem Vorteil. Leider konnte bisher die molekulare Ursache der Hyperflagellierung nicht aufgeklärt werden. Wie bereits erwähnt, wäre als weiterer Schritt die Überprüfung des EcN Wildtyps auf das Vorhandensein des *clpXP*-Gens hilfreich. Ist es vorhanden, könnte eine Mutation in diesem Gen bei der EcN-Variante ATHF zur Hyperflagellierung geführt haben. Dies müsste dann durch Sequenzierung des Gens beider Stämme und anschließendem Sequenzvergleich überprüft werden. Am einfachsten wäre die komplette Sequenzierung des EcN ATHF und anschließendem Sequenzvergleich mit der Genomsequenz des EcN. Diese Möglichkeit ist allerdings sehr kostenintensiv, zudem wird gerade noch an der Annotierung des Wildtypgenoms gearbeitet, welches zwar vollständig sequenziert, jedoch noch nicht öffentlich zugänglich ist.

Dass die Flagelle von Bakterien als Adhäsın an Mucus fungieren kann, ist nicht neu, allerdings wurde in keiner bisherigen Studie die Adhäsion an humanen Mucus gezeigt. In den meisten Studien wurde die Adhärenz der Bakterien mit Hilfe ihrer Flagelle an Mucus von der Maus, dem Rind oder dem Schwein untersucht. Für die Flagelle des EcN konnte jedoch keine Interaktion mit Mucus von der Maus beobachtet werden, was auf signifikante Unterschiede in der Zusammensetzung von humanem und murinem Mucus hinweist. Die Ergebnisse verdeutlichen auch die Grenzen von *in vivo* Versuchen im Mausmodell. Zwar wird die Maus

seit Jahrzehnten als beliebter Modellorganismus in der Forschung verwendet, da sie als Säugetier in naher Verwandtschaft zum Menschen steht. Entscheidende Strukturen, wie hier z.B. der Mucus, können sich aber doch signifikant unterscheiden. Nicht umsonst heißt es bei den Wissenschaftlern seit Jahren: „Mice tell lies“, Mäuse lügen.

Sowohl für Mucin2 aus dem Schweinemagen, als auch für humanen Mucus konnte Gluconat als ein Bestandteil identifiziert werden, der für die Interaktion mit der Flagelle des EcN verantwortlich ist. Bisher wurden keine Mucusbestandteile auf ihre Interaktion mit Flagellen untersucht und so ist dieses Kohlenhydrat der erste identifizierte Rezeptor für die Flagelle des EcN und auch der erste Rezeptor für Mucus-bindende Flagellen überhaupt. In dieser Arbeit wurden sechs Kohlenhydrate auf ihre mögliche Interaktion mit der Flagelle des EcN untersucht. Da auch die anderen Kohlenhydratbestandteile von Mucus (Arabinose, Galactose, Galacturonat, Maltose, N-Acetylgalactosamin und N-Acetylneuraminsäure) prinzipiell als Rezeptor für die Flagelle dienen können, sollten diese in weiteren Interaktionsstudien mit Mucin2, bzw. humanem Mucus getestet werden. Allerdings müssten dazu zunächst neue humane Mucusproben isoliert werden.

Ebenfalls von Bedeutung sind die Ergebnisse der Interaktionsstudien mit den Flagellen der Domäne D3 Deletionsmutante. Diese nach außen ragende Domäne des Hauptflagellenproteins Flagellin kann aufgrund der durchgeführten Studien als Interaktionspartner mit Mucin2, bzw. humanem Mucus ausgeschlossen werden. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die ebenfalls nach außen exponierte Domäne D2 des Proteins für die Interaktion mit Mucin2, bzw. humanem Mucus verantwortlich ist. Um dies zu testen, müsste daher eine Domäne D2 Deletionsmutante hergestellt werden. Da die Flagellen der Domäne D3 Deletionsmutante allerdings bereits sehr instabil waren, ist unklar, ob eine Deletion der Domäne D2 nicht noch instabilere Flagellen verursacht, bzw. von so einer Mutante überhaupt noch Flagellen ausgebildet werden. Dies müsste dann zunächst in Western Blots, Schwärmagartests und durch elektronenmikroskopische Untersuchungen überprüft werden. Prinzipiell wäre es auch möglich, dass die beiden anderen Domänen des Flagellins, D0 und D1, für die Interaktion zwischen Flagelle und humanem Mucus verantwortlich sind. Für die Flagelle von ETEC (Serotyp: H48) konnte gezeigt werden, dass EtpA an den N-Terminus (AS 1-173) des Flagellins bindet und so die Adhäsion an Wirtszellen vermittelt (Roy et al., 2009). Demnach sind diese hochkonservierten Bereiche zumindest temporär zugänglich und könnten so auch für die Bindung der Flagelle an Mucus, bzw. den Rezeptor Gluconat verantwortlich sein.

Studien, in denen pH-Effekte auf die Interaktion der Flagellen des EcN Wildtyps und der Domäne D3 Deletionsmutante EcN Δ *fliC* pSR-GE2 mit Mucin2, bzw. humanem Mucus untersucht wurden, haben schließlich zu einem Modell geführt, welches die unterschiedlichen Ergebnisse der Interaktionsstudien erklären könnte. Dieses Modell ist jedoch reine Spekulation, da es bisher keine Möglichkeit gab, Konformationsänderungen des Flagellins von EcN strukturebiologisch nachzuweisen. So konnte bisher nicht festgestellt werden, ob Konformationsänderungen des Flagellins zu einer Erhöhung, bzw. Erniedrigung der Bindestellen für Mucus oder aber für den Primärantikörper resultieren. Für die meisten der in der Strukturbiologie angewandten Methoden benötigt man hochreines Protein in möglichst hohen Konzentrationen. Mit der derzeit angewandten Methode zur Isolierung von Flagellen des EcN erhält man das Flagellin allerdings weder hochrein, noch in hohen Konzentrationen.

Abschließend bleibt zu sagen, dass EcN der erste probiotische Stamm ist, für den gezeigt werden konnte, dass seine Flagelle direkt an humanen Mucus bindet. Dieses Adhäsin könnte ihm daher dabei behilflich sein, mit Pathogenen um die erfolgreiche Besiedelung des Darms zu konkurrieren, was für Probiotika als wichtige Eigenschaft angesehen wird.

6 Literatur

- Aldridge, P. und Hughes, K. T. (2002). "Regulation of flagellar assembly." Curr Opin Microbiol **5**(2): 160-165.
- Allen-Vercoe, E. und Woodward, M. J. (1999). "The role of flagella, but not fimbriae, in the adherence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis to chick gut explant." J Med Microbiol **48**(8): 771-780.
- Altenhoefer, A., Oswald, S., et al. (2004). "The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens." FEMS Immunol Med Microbiol **40**(3): 223-229.
- Anderson, K. L., Billington, J., et al. (2004). "An atomic resolution model for assembly, architecture, and function of the Dr adhesins." Mol Cell **15**(4): 647-657.
- Arora, S. K., Ritchings, B. W., et al. (1998). "The *Pseudomonas aeruginosa* flagellar cap protein, FliD, is responsible for mucin adhesion." Infect Immun **66**(3): 1000-1007.
- Attridge, S. R. und Rowley, D. (1983). "The role of the flagellum in the adherence of *Vibrio cholerae*." J Infect Dis **147**(5): 864-872.
- Atuma, C., Strugala, V., et al. (2001). "The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **280**(5): G922-929.
- Avelino, F., Saldana, Z., et al. (2010). "The majority of enteroaggregative *Escherichia coli* strains produce the *E. coli* common pilus when adhering to cultured epithelial cells." Int J Med Microbiol **300**(7): 440-448.
- Barker, C. S., Pruss, B. M., et al. (2004). "Increased motility of *Escherichia coli* by insertion sequence element integration into the regulatory region of the *flhD* operon." J Bacteriol **186**(22): 7529-7537.
- Berg, H. C. (2000). "Constraints on models for the flagellar rotary motor." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **355**(1396): 491-501.
- Berg, H. C. und Anderson, R. A. (1973). "Bacteria swim by rotating their flagellar filaments." Nature **245**(5425): 380-382.
- Berger, H., Hacker, J., et al. (1982). "Cloning of the chromosomal determinants encoding hemolysin production and mannose-resistant hemagglutination in *Escherichia coli*." J Bacteriol **152**(3): 1241-1247.
- Bian, Z., Brauner, A., et al. (2000). "Expression of and cytokine activation by *Escherichia coli* curli fibers in human sepsis." J Infect Dis **181**(2): 602-612.
- Biasucci, G., Rubini, M., et al. (2010). "Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut." Early Hum Dev **86** Suppl 1: 13-15.

- Blaut, M. und Clavel, T. (2007). "Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease." J Nutr **137**(3 Suppl 2): 751S-755S.
- Blum-Oehler, G., Oswald, S., et al. (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.
- Blum, G., Falbo, V., et al. (1995). "Gene clusters encoding the cytotoxic necrotizing factor type 1, Prs-fimbriae and alpha-hemolysin form the pathogenicity island II of the uropathogenic *Escherichia coli* strain J96." FEMS Microbiol Lett **126**(2): 189-195.
- Chilcott, G. S. und Hughes, K. T. (2000). "Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli*." Microbiol Mol Biol Rev **64**(4): 694-708.
- Cohen, P. S., Laux, D. C., et al. (1984). "Adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* to immobilized intestinal mucosal preparations: a model for adhesion to mucosal surface components." Journal of Microbiological Methods **2**: 27-39.
- Coic, Y. M., Baleux, F., et al. (2012). "Design of a specific colonic mucus marker using a human commensal bacterium cell surface domain." J Biol Chem **287**(19): 15916-15922.
- Collins, M. D. und Gibson, G. R. (1999). "Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut." Am J Clin Nutr **69**(5): 1052S-1057S.
- Cotter, S. E., Surana, N. K., et al. (2005). "Trimeric autotransporters: a distinct subfamily of autotransporter proteins." Trends Microbiol **13**(5): 199-205.
- Craig, L., Pique, M. E., et al. (2004). "Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity." Nat Rev Microbiol **2**(5): 363-378.
- de Oliveira-Garcia, D., Dall'Agnol, M., et al. (2002). "Characterization of flagella produced by clinical strains of *Stenotrophomonas maltophilia*." Emerg Infect Dis **8**(9): 918-923.
- DePamphilis, M. L. und Adler, J. (1971). "Fine structure and isolation of the hook-basal body complex of flagella from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*." J Bacteriol **105**(1): 384-395.
- Dethlefsen, L., Huse, S., et al. (2008). "The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing." PLoS Biol **6**(11): e280.
- Dixit, S. und Kailasapathy, K. (2005). "Bacterial diversity of *Escherichia coli* in the gut: a reason to re-evaluate probiotic formulations?" Curr Issues Intest Microbiol **6**(1): 17-23.
- Eaton, K. A., Suerbaum, S., et al. (1996). "Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes." Infect Immun **64**(7): 2445-2448.
- Erdem, A. L., Avelino, F., et al. (2007). "Host protein binding and adhesive properties of H6 and H7 flagella of attaching and effacing *Escherichia coli*." J Bacteriol **189**(20): 7426-7435.
- Escherich, T. (1886). ""Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehungen zur Physiologie der Verdauung."" Ferdinand Enke, Stuttgart.
- Ewing, C. P., Andreishcheva, E., et al. (2009). "Functional characterization of flagellin glycosylation in *Campylobacter jejuni* 81-176." J Bacteriol **191**(22): 7086-7093.

- Fallingborg, J. (1999). "Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract." Dan Med Bull **46**(3): 183-196.
- Finegold, S. M. und Sutter, V. L. (1978). "Fecal flora in different populations, with special reference to diet." Am J Clin Nutr **31**(10 Suppl): S116-S122.
- Fox, J. T., Drouillard, J. S., et al. (2009). "Effects of mucin and its carbohydrate constituents on *Escherichia coli* O157 growth in batch culture fermentations with ruminal or fecal microbial inoculum." J Anim Sci **87**(4): 1304-1313.
- Francis, N. R., Sosinsky, G. E., et al. (1994). "Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex." J Mol Biol **235**(4): 1261-1270.
- Frank, D. N., St Amand, A. L., et al. (2007). "Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(34): 13780-13785.
- Furrie, E. (2006). "A molecular revolution in the study of intestinal microflora." Gut **55**(2): 141-143.
- Gebbers, J. O. und Laissue, J. A. (1989). "Immunologic structures and functions of the gut." Schweiz Arch Tierheilkd **131**(5): 221-238.
- Gersemann, M., Wehkamp, J., et al. (2012). "Innate immune dysfunction in inflammatory bowel disease." J Intern Med **271**(5): 421-428.
- Gibson, G. R. und Roberfroid, M. B. (1995). "Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics." J Nutr **125**(6): 1401-1412.
- Gordon, J. H. und Dubos, R. (1970). "The anaerobic bacterial flora of the mouse cecum." J Exp Med **132**(2): 251-260.
- Gottesman, S. und Maurizi, M. R. (1992). "Regulation by proteolysis: energy-dependent proteases and their targets." Microbiol Rev **56**(4): 592-621.
- Gronlund, M. M., Lehtonen, O. P., et al. (1999). "Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery." J Pediatr Gastroenterol Nutr **28**(1): 19-25.
- Grozdanov, L., Raasch, C., et al. (2004). "Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917." J Bacteriol **186**(16): 5432-5441.
- Hamer, H. M., Jonkers, D. M., et al. (2009). "Analyses of human colonic mucus obtained by an in vivo sampling technique." Dig Liver Dis **41**(8): 559-564.
- Harris, M. A., Reddy, C. A., et al. (1976). "Anaerobic bacteria from the large intestine of mice." Appl Environ Microbiol **31**(6): 907-912.
- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., et al. (2004). "Type V protein secretion pathway: the autotransporter story." Microbiol Mol Biol Rev **68**(4): 692-744.
- Hirano, T., Yamaguchi, S., et al. (1994). "Roles of FliK and FlhB in determination of flagellar hook length in *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol **176**(17): 5439-5449.
- Homma, M., Fujita, H., et al. (1984). "Excretion of unassembled flagellin by *Salmonella typhimurium* mutants deficient in hook-associated proteins." J Bacteriol **159**(3): 1056-1059.

- Huurre, A., Kalliomaki, M., et al. (2008). "Mode of delivery - effects on gut microbiota and humoral immunity." Neonatology **93**(4): 236-240.
- Ikeda, T., Asakura, S., et al. (1985). "'Cap' on the tip of *Salmonella* flagella." J Mol Biol **184**(4): 735-737.
- Ilver, D., Arnqvist, A., et al. (1998). "*Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging." Science **279**(5349): 373-377.
- Jernberg, C., Lofmark, S., et al. (2010). "Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota." Microbiology **156**(Pt 11): 3216-3223.
- Johansson, M. E., Phillipson, M., et al. (2008). "The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(39): 15064-15069.
- Johansson, M. E., Thomsson, K. A., et al. (2009). "Proteomic analyses of the two mucus layers of the colon barrier reveal that their main component, the Muc2 mucin, is strongly bound to the Fcgbp protein." J Proteome Res **8**(7): 3549-3557.
- Jones, C. J., Macnab, R. M., et al. (1990). "Stoichiometric analysis of the flagellar hook-(basal-body) complex of *Salmonella typhimurium*." J Mol Biol **212**(2): 377-387.
- Juge, N. (2012). "Microbial adhesins to gastrointestinal mucus." Trends Microbiol **20**(1): 30-39.
- Kallenius, G., Svenson, S., et al. (1981). "Structure of carbohydrate part of receptor on human uroepithelial cells for pyelonephritogenic *Escherichia coli*." Lancet **2**(8247): 604-606.
- Kirjavainen, P. V., Ouwehand, A. C., et al. (1998). "The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus." FEMS Microbiol Lett **167**(2): 185-189.
- Kirov, S. M., Castrisios, M., et al. (2004). "Aeromonas flagella (polar and lateral) are enterocyte adhesins that contribute to biofilm formation on surfaces." Infect Immun **72**(4): 1939-1945.
- Klein, G., Pack, A., et al. (1998). "Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria." Int J Food Microbiol **41**(2): 103-125.
- Konishi, T., Taguchi, F., et al. (2009). "Structural characterization of an O-linked tetrasaccharide from *Pseudomonas syringae* pv. tabaci flagellin." Carbohydr Res **344**(16): 2250-2254.
- Kubori, T., Shimamoto, N., et al. (1992). "Morphological pathway of flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*." J Mol Biol **226**(2): 433-446.
- Kutsukake, K., Minamino, T., et al. (1994). "Isolation and characterization of FliK-independent flagellation mutants from *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol **176**(24): 7625-7629.
- Lane, M. C., Simms, A. N., et al. (2007). "complex interplay between type 1 fimbrial expression and flagellum-mediated motility of uropathogenic *Escherichia coli*." J Bacteriol **189**(15): 5523-5533.
- Lang, T., Hansson, G. C., et al. (2007). "Gel-forming mucins appeared early in metazoan evolution." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(41): 16209-16214.
- Lasaro, M. A., Salinger, N., et al. (2009). "F1C fimbriae play an important role in biofilm formation and intestinal colonization by the *Escherichia coli* commensal strain Nissle 1917." Appl Environ Microbiol **75**(1): 246-251.

- Leatham, M. P., Banerjee, S., et al. (2009). "Precolonized human commensal *Escherichia coli* strains serve as a barrier to *E. coli* O157:H7 growth in the streptomycin-treated mouse intestine." Infect Immun **77**(7): 2876-2886.
- Leffler, H. und Svanborg-Eden, C. (1981). "Glycolipid receptors for uropathogenic *Escherichia coli* on human erythrocytes and uroepithelial cells." Infect Immun **34**(3): 920-929.
- Lehnen, D., Blumer, C., et al. (2002). "LrhA as a new transcriptional key regulator of flagella, motility and chemotaxis genes in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **45**(2): 521-532.
- Logan, S. M. (2006). "Flagellar glycosylation - a new component of the motility repertoire?" Microbiology **152**(Pt 5): 1249-1262.
- Macnab, R. M. (2003). "How bacteria assemble flagella." Annu Rev Microbiol **57**: 77-100.
- Mahajan, A., Currie, C. G., et al. (2009). "An investigation of the expression and adhesin function of H7 flagella in the interaction of *Escherichia coli* O157 : H7 with bovine intestinal epithelium." Cell Microbiol **11**(1): 121-137.
- Mandar, R. und Mikelsaar, M. (1996). "Transmission of mother's microflora to the newborn at birth." Biol Neonate **69**(1): 30-35.
- Mandel, L., Trebichavsky, I., et al. (1995). "Stimulation of intestinal immune cells by *E. coli* in gnotobiotic piglets." Adv Exp Med Biol **371A**: 463-464.
- Marteau, P. und Shanahan, F. (2003). "Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects." Best Pract Res Clin Gastroenterol **17**(5): 725-740.
- Miller, T. L. und Wolin, M. J. (1983). "Stability of *Methanobrevibacter smithii* populations in the microbial flora excreted from the human large bowel." Appl Environ Microbiol **45**(1): 317-318.
- Mimori-Kiyosue, Y., Vonderviszt, F., et al. (1997). "Locations of terminal segments of flagellin in the filament structure and their roles in polymerization and polymorphism." J Mol Biol **270**(2): 222-237.
- Minamino, T. und Namba, K. (2004). "Self-assembly and type III protein export of the bacterial flagellum." J Mol Microbiol Biotechnol **7**(1-2): 5-17.
- Miranda, R. L., Conway, T., et al. (2004). "Glycolytic and gluconeogenic growth of *Escherichia coli* O157:H7 (EDL933) and *E. coli* K-12 (MG1655) in the mouse intestine." Infect Immun **72**(3): 1666-1676.
- Mobley, H. L., Green, D. M., et al. (1990). "Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains." Infect Immun **58**(5): 1281-1289.
- Montrose, D. C. und Floch, M. H. (2005). "Probiotics used in human studies." J Clin Gastroenterol **39**(6): 469-484.
- Moran, A. P., Gupta, A., et al. (2011). "Sweet-talk: role of host glycosylation in bacterial pathogenesis of the gastrointestinal tract." Gut **60**(10): 1412-1425.
- Morooka, T., Umeda, A., et al. (1985). "Motility as an intestinal colonization factor for *Campylobacter jejuni*." J Gen Microbiol **131**(8): 1973-1980.

- Nissle, A. (1918). "Die antagonistische Behandlung chronischer Darmstörungen mit Colibakterien." Med Klinik **2**: 29-30.
- Nordgaard, I. und Mortensen, P. B. (1995). "Digestive processes in the human colon." Nutrition **11**(1): 37-45.
- Nugent, S. G., Kumar, D., et al. (2001). "Intestinal luminal pH in inflammatory bowel disease: possible determinants and implications for therapy with aminosalicylates and other drugs." Gut **48**(4): 571-577.
- Nummelin, H., Merckel, M. C., et al. (2004). "The *Yersinia* adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel beta-roll." EMBO J **23**(4): 701-711.
- O'Hara, A. M. und Shanahan, F. (2006). "The gut flora as a forgotten organ." EMBO Rep **7**(7): 688-693.
- Ouellette, A. J. (2004). "Defensin-mediated innate immunity in the small intestine." Best Pract Res Clin Gastroenterol **18**(2): 405-419.
- Ouwehand, A. C., Kirjavainen, P. V., et al. (1999). "Probiotics: mechanisms and established effects." International Dairy Journal **9**: 43-52.
- Patzer, S. I., Baquero, M. R., et al. (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): 2557-2570.
- Pizarro-Cerda, J. und Cossart, P. (2006). "Bacterial adhesion and entry into host cells." Cell **124**(4): 715-727.
- Reissbrodt, R., Hammes, W. P., et al. (2009). "Inhibition of growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by nonpathogenic *Escherichia coli*." FEMS Microbiol Lett **290**(1): 62-69.
- Rendon, M. A., Saldana, Z., et al. (2007). "Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(25): 10637-10642.
- Roos, S. und Jonsson, H. (2002). "A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components." Microbiology **148**(Pt 2): 433-442.
- Roy, K., Hilliard, G. M., et al. (2009). "Enterotoxigenic *Escherichia coli* EtpA mediates adhesion between flagella and host cells." Nature **457**(7229): 594-598.
- Saldana, Z., Erdem, A. L., et al. (2009). "The *Escherichia coli* common pilus and the bundle-forming pilus act in concert during the formation of localized adherence by enteropathogenic *E. coli*." J Bacteriol **191**(11): 3451-3461.
- Sanchez, B., Arias, S., et al. (2009). "Identification of surface proteins involved in the adhesion of a probiotic *Bacillus cereus* strain to mucin and fibronectin." Microbiology **155**(Pt 5): 1708-1716.
- Savage, D. C. (1977). "Microbial ecology of the gastrointestinal tract." Annu Rev Microbiol **31**: 107-133.
- Schlee, M., Wehkamp, J., et al. (2007). "Induction of human beta-defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin." Infect Immun **75**(5): 2399-2407.

- Schloss, P. D. und Handelsman, J. (2004). "Status of the microbial census." Microbiol Mol Biol Rev **68**(4): 686-691.
- Schultz, M. (2008). "Clinical use of *E. coli* Nissle 1917 in inflammatory bowel disease." Inflamm Bowel Dis **14**(7): 1012-1018.
- Sekirov, I., Russell, S. L., et al. (2010). "Gut microbiota in health and disease." Physiol Rev **90**(3): 859-904.
- Simon, G. L. und Gorbach, S. L. (1984). "Intestinal flora in health and disease." Gastroenterology **86**(1): 174-193.
- Smith, K. D., Andersen-Nissen, E., et al. (2003). "Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility." Nat Immunol **4**(12): 1247-1253.
- Soutourina, O. A. und Bertin, P. N. (2003). "Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria." FEMS Microbiol Rev **27**(4): 505-523.
- Suzuki, T., Iino, T., et al. (1978). "Incomplete flagellar structures in nonflagellate mutants of *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol **133**(2): 904-915.
- Taguchi, F., Yamamoto, M., et al. (2010). "Defects in flagellin glycosylation affect the virulence of *Pseudomonas syringae* pv. tabaci 6605." Microbiology **156**(Pt 1): 72-80.
- Tannock, G. W. (2001). "Molecular assessment of intestinal microflora." Am J Clin Nutr **73**(2 Suppl): 410S-414S.
- Tasteyre, A., Barc, M. C., et al. (2001). "Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization." Infect Immun **69**(12): 7937-7940.
- Teitelbaum, J. E. und Walker, W. A. (2002). "Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms." Annu Rev Nutr **22**: 107-138.
- Terashima, H., Kojima, S., et al. (2008). "Flagellar motility in bacteria structure and function of flagellar motor." Int Rev Cell Mol Biol **270**: 39-85.
- Thanassi, D. G., Saulino, E. T., et al. (1998). "The chaperone/usher pathway: a major terminal branch of the general secretory pathway." Curr Opin Microbiol **1**(2): 223-231.
- Tomoyasu, T., Ohkishi, T., et al. (2002). "The ClpXP ATP-dependent protease regulates flagellum synthesis in *Salmonella enterica* serovar typhimurium." J Bacteriol **184**(3): 645-653.
- Torres, A. G., Zhou, X., et al. (2005). "Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells." Infect Immun **73**(1): 18-29.
- Twine, S. M., Reid, C. W., et al. (2009). "Motility and flagellar glycosylation in *Clostridium difficile*." J Bacteriol **191**(22): 7050-7062.
- Ueno, T., Oosawa, K., et al. (1992). "M ring, S ring and proximal rod of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium* are composed of subunits of a single protein, FliF." J Mol Biol **227**(3): 672-677.
- Ukena, S. N., Westendorf, A. M., et al. (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.

- Vejborg, R. M., Friis, C., et al. (2010). "A virulent parent with probiotic progeny: comparative genomics of *Escherichia coli* strains CFT073, Nissle 1917 and ABU 83972." Mol Genet Genomics **283**(5): 469-484.
- Wehkamp, J., Harder, J., et al. (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): 5750-5758.
- Wehkamp, J., Schmid, M., et al. (2005). "Defensin deficiency, intestinal microbes, and the clinical phenotypes of Crohn's disease." J Leukoc Biol **77**(4): 460-465.
- Williams, A. W., Yamaguchi, S., et al. (1996). "Mutations in *fliK* and *flhB* affecting flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol **178**(10): 2960-2970.
- Wolfgang, M., van Putten, J. P., et al. (2000). "Components and dynamics of fiber formation define a ubiquitous biogenesis pathway for bacterial pili." EMBO J **19**(23): 6408-6418.
- Wood, T. K., Gonzalez Barrios, A. F., et al. (2006). "Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*." Appl Microbiol Biotechnol **72**(2): 361-367.
- Xu, J. und Gordon, J. I. (2003). "Honor thy symbionts." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(18): 10452-10459.
- Zhou, J., Lloyd, S. A., et al. (1998). "Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 6436-6441.
- Zuccotti, G. V., Meneghin, F., et al. (2008). "Probiotics in clinical practice: an overview." J Int Med Res **36 Suppl 1**: 1A-53A.

7 Anhang

7.1 Sequenzvergleich des *lrhA*-Gens von EcN Wildtyp und EcN ATHF

Length=955 (Query: *lrhA* von EcN Wildtyp; Sbjct: *lrhA* von EcN ATHF)

Score = 1764 bits (955), Expect = 0.0
Identities = 955/955 (100%), Gaps = 0/955 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1      GTCGATTACTCGATATCCCTTTCAATCAACAATGAGTCATCTCCTTCCGGAGCAGACATT 60
          |||
Sbjct 1      GTCGATTACTCGATATCCCTTTCAATCAACAATGAGTCATCTCCTTCCGGAGCAGACATT 60

Query 61     GGGCTGTATTGCCACGGATTATGGTAGCTCTCCATCGCCTGATAGATCACCTGGGCCAGC 120
          |||
Sbjct 61     GGGCTGTATTGCCACGGATTATGGTAGCTCTCCATCGCCTGATAGATCACCTGGGCCAGC 120

Query 121    TCATTATTACTGGACGGGTCATAGCACAGCAAATATTCGGTATCAGGTAGCGGCGGTAAG 180
          |||
Sbjct 121    TCATTATTACTGGACGGGTCATAGCACAGCAAATATTCGGTATCAGGTAGCGGCGGTAAG 180

Query 181    CCATCTACTCCACTCAGCACACGCAGTTCGGACTCATCATCTCGACCGGCCTTGCCGTC 240
          |||
Sbjct 181    CCATCTACTCCACTCAGCACACGCAGTTCGGACTCATCATCTCGACCGGCCTTGCCGTC 240

Query 241    ACGCCAAGACCGGCTTTCACCTGCGGCACGAACGGCCGGAAGCGTCGAGGCGACATAAGCC 300
          |||
Sbjct 241    ACGCCAAGACCGGCTTTCACCTGCGGCACGAACGGCCGGAAGCGTCGAGGCGACATAAGCC 300

Query 301    AGTCGCCAGGGAATATCTGCTTTATTAAGCGTCGCCAGCACCATATCGCGAAACGGACTT 360
          |||
Sbjct 301    AGTCGCCAGGGAATATCTGCTTTATTAAGCGTCGCCAGCACCATATCGCGAAACGGACTT 360

Query 361    GGATCATCCAGCAACACAAGAGGGATCGGCTCACCTTTTTGCAATACGTATTCGCTGCG 420
          |||
Sbjct 361    GGATCATCCAGCAACACAAGAGGGATCGGCTCACCTTTTTGCAATACGTATTCGCTGCG 420

Query 421    CAGTACCAGTGTGTTGGCGAGGTACGCAGGTTCAATGCCTTAAAGGTAGAAGGACGATGG 480
          |||
Sbjct 421    CAGTACCAGTGTGTTGGCGAGGTACGCAGGTTCAATGCCTTAAAGGTAGAAGGACGATGG 480

Query 481    GTGGTTACCATCAAATCCACTTCCTGGGATTCCAGCATTCTGCCATGTAGGCATTACGT 540
          |||
Sbjct 481    GTGGTTACCATCAAATCCACTTCCTGGGATTCCAGCATTCTGCCATGTAGGCATTACGT 540

Query 541    TTAACGCGGACATCCAGCGCTAGTTTCGGATAAAACCGAACTCACGCGATTAAACAGGAAA 600
          |||
Sbjct 541    TTAACGCGGACATCCAGCGCTAGTTTCGGATAAAACCGAACTCACGCGATTAAACAGGAAA 600

Query 601    GGTAAGATCGTATCGGCAGATTCATCTGAAGCACCGATAGTTAACACGCCCTGAAGATTA 660
          |||
Sbjct 601    GGTAAGATCGTATCGGCAGATTCATCTGAAGCACCGATAGTTAACACGCCCTGAAGATTA 660

Query 661    CTGAACATTAATGATGAGCAGGCCTCATCATTAAAACGCAGGATTTTCCTGGCGTAACCA 720
          |||
Sbjct 661    CTGAACATTAATGATGAGCAGGCCTCATCATTAAAACGCAGGATTTTCCTGGCGTAACCA 720

Query 721    AGAAGTTGAATGCCATGTTTTCAGTTAACAGTTTGTGCGACCGTGACGAGCGAACAGTTCT 780
          |||
Sbjct 721    AGAAGTTGAATGCCATGTTTTCAGTTAACAGTTTGTGCGACCGTGACGAGCGAACAGTTCT 780

Query 781    TTCCCAACGAGTTGTTCCAGACGCTGCATTTGCTGACTTACGGCGGACTGAGTACGACAC 840
          |||
Sbjct 781    TTCCCAACGAGTTGTTCCAGACGCTGCATTTGCTGACTTACGGCGGACTGAGTACGACAC 840

Query 841    ACAGCGGCAGCTGCGGCAGCAAAAAGTGTTCAGATCGGCAACAGCAACAAATGTTCTCAGC 900
          |||
Sbjct 841    ACAGCGGCAGCTGCGGCAGCAAAAAGTGTTCAGATCGGCAACAGCAACAAATGTTCTCAGC 900

Query 901    AGATCGAGGTCGAGGTCGAGGTTAATATTCGGACGATTTGCACTTATCATATATT 955
          |||
Sbjct 901    AGATCGAGGTCGAGGTCGAGGTTAATATTCGGACGATTTGCACTTATCATATATT 955

```


7.2.4 Nukleotidsequenz des *fliC*-Gens der Domäne D3 Deletionsmutante EcN Δ *fliC* pSR-GE2

atggcacaagtcattaataccaacagcctctcgctgatcactcaaaataatatcaacaagaaccagtctgcgctgtcagttctatcgagcgtctgtcttctggcttgcg
tattaacagcgcgaaggatgacgccgcgggtcagcgcgattgctaaccgtttacttctaaccattaaaggcctgactcaggctgcacgtaacgccaacgacgggtattc
tggtgcacagaccactgaaggcgcgctgtccgaaatcaacaacaacttacagcgtatccgtgagctgacggctcaggcttaccgggactaactctgattcgatct
ggactccattcaggacgaaatcaaatcccgtctcgacgaaatgaccgcgtatccggtcagaccagttcaacggcgtgaacgtactggcaaaagacggttcgatg
aaaattcaggttgggtcgaacgacggccagactatcactattgatctgaagaaaattgactctgatacgtggggctgaatggtttaacgtgaatggttccggtaga
tagccaataaaagcggcgaccattagcgacctgacagcagcgaatggatgctgcaactcaggaagcctatttaactagtgtgtaacttaactacaacgatgct
gggtggtcgcactcggctacgcttgatggtttattcaagaaagctgggtgatggcaatcaatcgggttaataagactgcatcagtcacgatggggggaacaactat
aactttaaagcgggtgctgatgctgggtgctgcaactgtaacgcaggggtatcgttactgatacagctagcaagaaaccgttttaataaagtggctacagctaaa
caaggcacagcagttgcagtaacgggtatacatccgcaacaattacctataaatctggcgttcagacgtatcagcgggtattgccgcaggtgacgggtactgctag
cgcaaaatagccgataaactgacgtttctaatgaacagcaacatacacagatgctgatgggtgaaatgactacaattggttcataccaccacgaagtattcaatcga
gctaacaacggcaaggtaactgttgattctggaactggtacgggtaaatatcgccgaaagtcggggctgaaagtatatgttagtctaattggtactttaacaacagat
gcaactagcgaaggcacagtaacaaaagatccactgaaagctctggtgaagctatcagctccatcgacaaatccgttcacccctgggggctatcaaaaccgttt
ggattcccgctcaccaacctgaacaacaccactaccaacctgtctgaagcgagtcctccgtattcaggacgccgactatcgaccgaaagtccaacatgctgaaa
gcccagattatccagcaggccgtaactccgtctggcaaaagccaaccaggtaccgcagcaggttctgtctctgctgcagggtaa

7.3 Sequenzvergleich des *fliC*-Gens von EcN 1917 und CFT073

Length=1788 (Query: *fliC* von EcN Wildtyp; Sbjct: *fliC* von UPEC CFT073)

Score = 3302 bits (1788), Expect = 0.0
Identities = 1788/1788 (100%), Gaps = 0/1788 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1      ATGGCACAAGTCATTAATACCAACAGCCTCTCGCTGATCACTCAAATAATATCAACAAG 60
            |
Sbjct 1      ATGGCACAAGTCATTAATACCAACAGCCTCTCGCTGATCACTCAAATAATATCAACAAG 60

Query 61     AACCAGTCTGCGCTGTCGAGTTCTATCGAGCGTCTGTCTTCTGGCTTGCCTATTAACAGC 120
            |
Sbjct 61     AACCAGTCTGCGCTGTCGAGTTCTATCGAGCGTCTGTCTTCTGGCTTGCCTATTAACAGC 120

Query 121    GCGAAGGATGACGCCGCGGGTCAGGCGATTGCTAACCGTTTTACTTCTAACATTAAGGC 180
            |
Sbjct 121    GCGAAGGATGACGCCGCGGGTCAGGCGATTGCTAACCGTTTTACTTCTAACATTAAGGC 180

Query 181    CTGACTCAGGCTGCACGTAACGCCAACGACGGTATTTCTGTTGCACAGACCACTGAAGGC 240
            |
Sbjct 181    CTGACTCAGGCTGCACGTAACGCCAACGACGGTATTTCTGTTGCACAGACCACTGAAGGC 240

Query 241    GCGCTGTCCGAAATCAACAACAACCTACAGCGTATCCGTGAGCTGACGGTTCAGGCTTCT 300
            |
Sbjct 241    GCGCTGTCCGAAATCAACAACAACCTACAGCGTATCCGTGAGCTGACGGTTCAGGCTTCT 300

Query 301    ACCGGGACTAACTCTGATTCCGATCTGGACTCCATTCAGGACGAAATCAAATCCCGTCTC 360
            |
Sbjct 301    ACCGGGACTAACTCTGATTCCGATCTGGACTCCATTCAGGACGAAATCAAATCCCGTCTC 360

Query 361    GACGAAATTGACCGGTATCCGGTCAGACCCAGTTCAACGGCGTGAACGTACTGGCAAAA 420
            |
Sbjct 361    GACGAAATTGACCGGTATCCGGTCAGACCCAGTTCAACGGCGTGAACGTACTGGCAAAA 420

Query 421    GACGGTTCGATGAAAATTCAGGTTGGTGCGAACGACGCCAGACTATCACTATTGATCTG 480
            |
Sbjct 421    GACGGTTCGATGAAAATTCAGGTTGGTGCGAACGACGCCAGACTATCACTATTGATCTG 480

Query 481    AAGAAAATTGACTCTGATACGCTGGGGCTGAATGGTTTTAACGTGAATGGTTCGGGTACG 540
            |
Sbjct 481    AAGAAAATTGACTCTGATACGCTGGGGCTGAATGGTTTTAACGTGAATGGTTCGGGTACG 540

Query 541    ATAGCCAATAAAGCGCGCACCATTAGCGACCTGACAGCAGCGAAAATGGATGCTGCAACT 600
            |
Sbjct 541    ATAGCCAATAAAGCGCGCACCATTAGCGACCTGACAGCAGCGAAAATGGATGCTGCAACT 600

Query 601    AATACTATAACTACAACAAATAATCGCTGACTGCATCAAAGGCCCTTGATCAACTGAAA 660
            |
Sbjct 601    AATACTATAACTACAACAAATAATCGCTGACTGCATCAAAGGCCCTTGATCAACTGAAA 660

Query 661    GATGGTGACACTGTTACTATCAAAGCAGATGCAGCTCAAACGCCACGGTCTATACATAC 720
            |
Sbjct 661    GATGGTGACACTGTTACTATCAAAGCAGATGCAGCTCAAACGCCACGGTCTATACATAC 720

Query 721    AATGCATCTGCTGGTAACTTCTCATTCAGTAATGTATCGAATAATACTTCAGCAAAGCA 780
            |
Sbjct 721    AATGCATCTGCTGGTAACTTCTCATTCAGTAATGTATCGAATAATACTTCAGCAAAGCA 780

Query 781    GGTGATGTAGCAGCTAGCCTTCTCCCGCCGGCTGGGCAAACGCTAGTAGTGGTGTTCACAAA 840
            |
Sbjct 781    GGTGATGTAGCAGCTAGCCTTCTCCCGCCGGCTGGGCAAACGCTAGTAGTGGTGTTCACAAA 840

Query 841    GCAGCAAGCGGTGAAGTGAACCTTTGATGTTGATGCGAATGGTAAAATTACAATCGGAGGA 900
            |
Sbjct 841    GCAGCAAGCGGTGAAGTGAACCTTTGATGTTGATGCGAATGGTAAAATTACAATCGGAGGA 900

Query 901    CAGGAAGCCTATTTAACTAGTGATGTTAACTTAACTACAAACGATGCTGGTGGTGCAGCT 960
            |
Sbjct 901    CAGGAAGCCTATTTAACTAGTGATGTTAACTTAACTACAAACGATGCTGGTGGTGCAGCT 960

Query 961    GCGGTACGCTTGTGATGGTTTATTCAAGAAAGCTGGTGGTCAATCAATCGGGTTAAT 1020
            |
Sbjct 961    GCGGTACGCTTGTGATGGTTTATTCAAGAAAGCTGGTGGTCAATCAATCGGGTTAAT 1020

Query 1021   AAGACTGCATCAGTCACGATGGGGGAACAACCTTATAACTTTAAAACGGGTGCTGATGCT 1080

```

```
|||||
Sbjct 1021 AAGACTGCATCAGTCACGATGGGGGAACAACCTTATAACTTTAAAACGGGTGCTGATGCT 1080
Query 1081 GGTGCTGCAACTGCTAACGCAGGGGTATCGTTCACCTGATACAGCTAGCAAAGAAACCGTT 1140
|||||
Sbjct 1081 GGTGCTGCAACTGCTAACGCAGGGGTATCGTTCACCTGATACAGCTAGCAAAGAAACCGTT 1140
Query 1141 TTAATAAAGTGGCTACAGCTAAACAAGGCACAGCAGTTGCAGCTAACGGTGATACATCC 1200
|||||
Sbjct 1141 TTAATAAAGTGGCTACAGCTAAACAAGGCACAGCAGTTGCAGCTAACGGTGATACATCC 1200
Query 1201 GCAACAATTACCTATAAATCTGGCGTTCAGACGTATCAGGCGGTATTTGCCGAGGTGAC 1260
|||||
Sbjct 1201 GCAACAATTACCTATAAATCTGGCGTTCAGACGTATCAGGCGGTATTTGCCGAGGTGAC 1260
Query 1261 GGTACTGCTAGCGCAAATATGCCGATAAATACTGACGTTTCTAATGCAACAGCAACATAC 1320
|||||
Sbjct 1261 GGTACTGCTAGCGCAAATATGCCGATAAATACTGACGTTTCTAATGCAACAGCAACATAC 1320
Query 1321 ACAGATGCTGATGGTGAAATGACTACAATTGGTTCATACACCACGAAGTATTCATCGAT 1380
|||||
Sbjct 1321 ACAGATGCTGATGGTGAAATGACTACAATTGGTTCATACACCACGAAGTATTCATCGAT 1380
Query 1381 GCTAACACCGGCAAGGTAACCTGTTGATTCTGGAACGGTACGGGTAAATATGCGCCGAAA 1440
|||||
Sbjct 1381 GCTAACACCGGCAAGGTAACCTGTTGATTCTGGAACGGTACGGGTAAATATGCGCCGAAA 1440
Query 1441 GTCGGGGCTGAAGTATATGTAGTGCTAATGGTACTTTAACACAGATGCAACTAGCGAA 1500
|||||
Sbjct 1441 GTCGGGGCTGAAGTATATGTAGTGCTAATGGTACTTTAACACAGATGCAACTAGCGAA 1500
Query 1501 GGCACAGTAACAAAAGATCCACTGAAAGCTCTGGATGAAGCTATCAGCTCCATCGACAAA 1560
|||||
Sbjct 1501 GGCACAGTAACAAAAGATCCACTGAAAGCTCTGGATGAAGCTATCAGCTCCATCGACAAA 1560
Query 1561 TTCCGTTTCATCCCTGGGGGCTATCCAAAACCGTTTGGATTCCGCCGTCACCAACCTGAAC 1620
|||||
Sbjct 1561 TTCCGTTTCATCCCTGGGGGCTATCCAAAACCGTTTGGATTCCGCCGTCACCAACCTGAAC 1620
Query 1621 AACACCACTACCAACCTGTCTGAAGCGCAGTCCCCTATTCAGGACGCCGACTATGCGACC 1680
|||||
Sbjct 1621 AACACCACTACCAACCTGTCTGAAGCGCAGTCCCCTATTCAGGACGCCGACTATGCGACC 1680
Query 1681 GAAGTGTCACCAACATGTCGAAAGCGCAGATTATCCAGCAGGCCGGTAACTCCGTGCTGGCA 1740
|||||
Sbjct 1681 GAAGTGTCACCAACATGTCGAAAGCGCAGATTATCCAGCAGGCCGGTAACTCCGTGCTGGCA 1740
Query 1741 AAAGCCAACCAGGTACCGCAGCAGTTCTGTCTCTGCTGCAGGGTTAA 1788
|||||
Sbjct 1741 AAAGCCAACCAGGTACCGCAGCAGTTCTGTCTCTGCTGCAGGGTTAA 1788
```

7.4 Sequenzvergleich des *fliD*-Gens von EcN 1917 und CFT073

Length=1407 (Query: *fliD* von EcN 1917; Sbjct: *fliD* von CFT073)

Score = 2599 bits (1407), Expect = 0.0
 Identities = 1407/1407 (100%), Gaps = 0/1407 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 1      ATGGCAAGTATTTTCATCGCTGGGAGTCGGGTCAGGTCTGGATTTAAGTTCAATCCTTGAT 60
          |||
Sbjct 1      ATGGCAAGTATTTTCATCGCTGGGAGTCGGGTCAGGTCTGGATTTAAGTTCAATCCTTGAT 60

Query 61     AGCCTCACCGCCGCGCAAAAAGCGACGCTAACCCCTATTTCAAATCAGCAATCGTCGTTT 120
          |||
Sbjct 61     AGCCTCACCGCCGCGCAAAAAGCGACGCTAACCCCTATTTCAAATCAGCAATCGTCGTTT 120

Query 121    ACCGCTAAACTTAGCGCCTACGGTACGCTGAAAAGCGCGCTGACGACTTTCAGACCGCC 180
          |||
Sbjct 121    ACCGCTAAACTTAGCGCCTACGGTACGCTGAAAAGCGCGCTGACGACTTTCAGACCGCC 180

Query 181    AATACTGCATTGTCTAAAGCCGATCTTTTTTCCGCTACCAGCACCACCAGCAGCACCACC 240
          |||
Sbjct 181    AATACTGCATTGTCTAAAGCCGATCTTTTTTCCGCTACCAGCACCACCAGCAGCACCACC 240

Query 241    GCGTTCAGTGCCACCACCGGGTAATGCCATCGCCGGGAAATACACCATCAGCGTCACC 300
          |||
Sbjct 241    GCGTTCAGTGCCACCACCGGGTAATGCCATCGCCGGGAAATACACCATCAGCGTCACC 300

Query 301    CATCTGGCGCAGGCGCAAAACCTGACAACGCGCACCACCAGAGACGATACGAAAACGGCG 360
          |||
Sbjct 301    CATCTGGCGCAGGCGCAAAACCTGACAACGCGCACCACCAGAGACGATACGAAAACGGCG 360

Query 361    ATCGCCACCAGCGACAGCAAACCTCACCATTCAACAAGGCGCGACAAAGATCCGATTTCC 420
          |||
Sbjct 361    ATCGCCACCAGCGACAGCAAACCTCACCATTCAACAAGGCGCGACAAAGATCCGATTTCC 420

Query 421    ATTGATATCAGCGCGCTAACTCGTCTTTAAGCGGGATCCGTGATGCCATCAACAACGCA 480
          |||
Sbjct 421    ATTGATATCAGCGCGCTAACTCGTCTTTAAGCGGGATCCGTGATGCCATCAACAACGCA 480

Query 481    AAAGCAGGCGTAAGCGCAAGCATCATTAACGTGGGTAACGGTGAATATCGTCTGTGAGTC 540
          |||
Sbjct 481    AAAGCAGGCGTAAGCGCAAGCATCATTAACGTGGGTAACGGTGAATATCGTCTGTGAGTC 540

Query 541    ACATCAAATGACACCGGCCCTTGATAATGCGATGACACTCTCGGTACAGCGGTGATGATGCG 600
          |||
Sbjct 541    ACATCAAATGACACCGGCCCTTGATAATGCGATGACACTCTCGGTACAGCGGTGATGATGCG 600

Query 601    CTACAAAGTTTTATGGGCTATGACGCCAGTGCCAGCAGCAACGGCATGGAGGTCTCGGTTC 660
          |||
Sbjct 601    CTACAAAGTTTTATGGGCTATGACGCCAGTGCCAGCAGCAACGGCATGGAGGTCTCGGTTC 660

Query 661    GCCGCCCAGAATGCACAGCTGACGGTCAATAACGTGCGCCATTGAGAACAGCAGCAACACC 720
          |||
Sbjct 661    GCCGCCCAGAATGCACAGCTGACGGTCAATAACGTGCGCCATTGAGAACAGCAGCAACACC 720

Query 721    ATCAGCGACGCGCTGAAAAACATCACCCCTGAACCTGAACGATGTCAACCACAGGCAACCAG 780
          |||
Sbjct 721    ATCAGCGACGCGCTGAAAAACATCACCCCTGAACCTGAACGATGTCAACCACAGGCAACCAG 780

Query 781    ACGCTGACCATCACTCAGGACACCTCCAAAGCGCAAACGGCGATTAAAGACTGGGTGAAT 840
          |||
Sbjct 781    ACGCTGACCATCACTCAGGACACCTCCAAAGCGCAAACGGCGATTAAAGACTGGGTGAAT 840

Query 841    GCCTATAACTCGCTAATAGATACCTTCAGCAGCCTGACCAAATACACCGCGTAGATGCG 900
          |||
Sbjct 841    GCCTATAACTCGCTAATAGATACCTTCAGCAGCCTGACCAAATACACCGCGTAGATGCG 900

Query 901    GGAGTGATAGCCAGAATTTAGCAATGGCGCACTACTCGGCGACTCCACGCTGCGAACG 960
          |||
Sbjct 901    GGAGTGATAGCCAGAATTTAGCAATGGCGCACTACTCGGCGACTCCACGCTGCGAACG 960

Query 961    ATTCAGACGAGTTGAAATCGATGTGAGTAATACCGTCAGTTCTTCCAACATAAAAACG 1020
          |||
Sbjct 961    ATTCAGACGAGTTGAAATCGATGTGAGTAATACCGTCAGTTCTTCCAACATAAAAACG 1020

Query 1021   CTGGCGCAGATTGGTATCACGACCGATCCCAGCGATGGCAAACCTGGAACGGATGCCGAC 1080
  
```


7.5 AS-Sequenzen des Flagellins (FliC) verschiedener Bakterienstämme

7.5.1 AS-Sequenz des Flagellins (FliC) des probiotischen *E. coli* Stammes Nissle 1917

FliC des probiotischen *Escherichia coli* Stammes Nissle 1917 besteht aus 595 AS und besitzt ein Molekulargewicht von 60,94 kDa.

AS-Sequenz:

MAQVINTNSLSLITQNNINKNQSALSSSIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQAA
 RNANDGISVAQTTEGALSEINNNLQRIRELTVQASTGTNSDSLDSIQDEIKSRLDEIDRVSGQT
 QFNGVNVLAKDGSMKIQVGANDGQTITIDLKKIDSRTLGLNGFNVNGSGTIANKAATISDLTA
 AKMDAATNTITTTNNALTASKALDQLKDGDVTIKADAAQTATVYTYNASAGNFSFSNVSN
 NTSKAGDVAASLLPPAGQTASGVYKAASGEVNFVDANGKITIGGQEAYLTS DGNLTTND
 AGGATAATLDGLFKKAGDGQSIFNKTASVTMGGTTYNFKTGADAGAATANAGVSFTDTAS
 KETVLNKVATAKQGTAVAANGDTSATITYKSGVQTYQAVFAAGDGTASAKYADNTDVSNA
 TATYTDADGEMTTIGSYTTKYSIDANNGKVTVDSTGTGKYAPKVGAEVYVSANGTLTTDA
 TSEGTVTKDPLKALDEAISSIDKFRSSLGAIQNRLDSAVTNLNNTTTTNLSEAQSRIQDADYATE
 VSNMSKAQIIQQAGNSVLAKANQVPQQVLSLLQG

7.5.2 AS- Sequenz des Flagellins (FliC) des uropathogenen *Escherichia coli* CFT073

FliC des uropathogenen *Escherichia coli* Stammes CFT073 besteht aus 595 AS und besitzt ein Molekulargewicht von 60,94 kDa.

AS-Sequenz:

MAQVINTNSLSLITQNNINKNQSALSSSIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQAA
 RNANDGISVAQTTEGALSEINNNLQRIRELTVQASTGTNSDSLDSIQDEIKSRLDEIDRVSGQT
 QFNGVNVLAKDGSMKIQVGANDGQTITIDLKKIDSRTLGLNGFNVNGSGTIANKAATISDLTA
 AKMDAATNTITTTNNALTASKALDQLKDGDVTIKADAAQTATVYTYNASAGNFSFSNVSN
 NTSKAGDVAASLLPPAGQTASGVYKAASGEVNFVDANGKITIGGQEAYLTS DGNLTTND
 AGGATAATLDGLFKKAGDGQSIFNKTASVTMGGTTYNFKTGADAGAATANAGVSFTDTAS
 KETVLNKVATAKQGTAVAANGDTSATITYKSGVQTYQAVFAAGDGTASAKYADNTDVSNA
 TATYTDADGEMTTIGSYTTKYSIDANNGKVTVDSTGTGKYAPKVGAEVYVSANGTLTTDA
 TSEGTVTKDPLKALDEAISSIDKFRSSLGAIQNRLDSAVTNLNNTTTTNLSEAQSRIQDADYATE
 VSNMSKAQIIQQAGNSVLAKANQVPQQVLSLLQG

7.5.3 AS- Sequenz des Flagellins (FliC) des uropathogenen *Escherichia coli*

FliC des uropathogenen *Escherichia coli* Stammes 536 besteht aus 555 AS und besitzt ein Molekulargewicht von 56,6 kDa.

AS-Sequenz:

MAQVINTNSLSLITQNNINKNQSALSSEIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQAA
 RNANDGISVAQTTEGALSEINNLQRIRELTVQASTGTNSDSLDSIQDEIKSRLDEIDRVSGQTQ
 FNGVNVLAKDGSMMKIQVGGANDGOTITIDLKIDSDTLGLSGFNVNGKAVANTAATKDDL
 AASVSAAVGNEYTVSAGLSKSTAADVIALSLTDGATVTAAGVSNNGFAAGATGNAYKFNQANN
 TFTYNTTSTAAELQSYLTPKAGDTATFSVEIGSTKQDVVLASDGKITAKDGSKLYIDTTGNLT
 QNGGGTLEEATLNGLAFNHSGPAAAVQSTITTADGTSIVLAGSGDFGTTKTAGAINVTGAVIS
 ADALLSASKATGFTSGAYTVGTDGVVKSGGNDVYNKADGTGLTTDNTTKYYLQDDGSVTN
 GSGKAVYVDATGKLTDDAETKAATTADPLKALDEAISSIDKFRSSLGAVQNRLDSAVTNLNN
 TTTNLSEAQSRIQDADYATEVSNMSKAQIIQQAGNSVLAKANQVPQQVLSLLQG

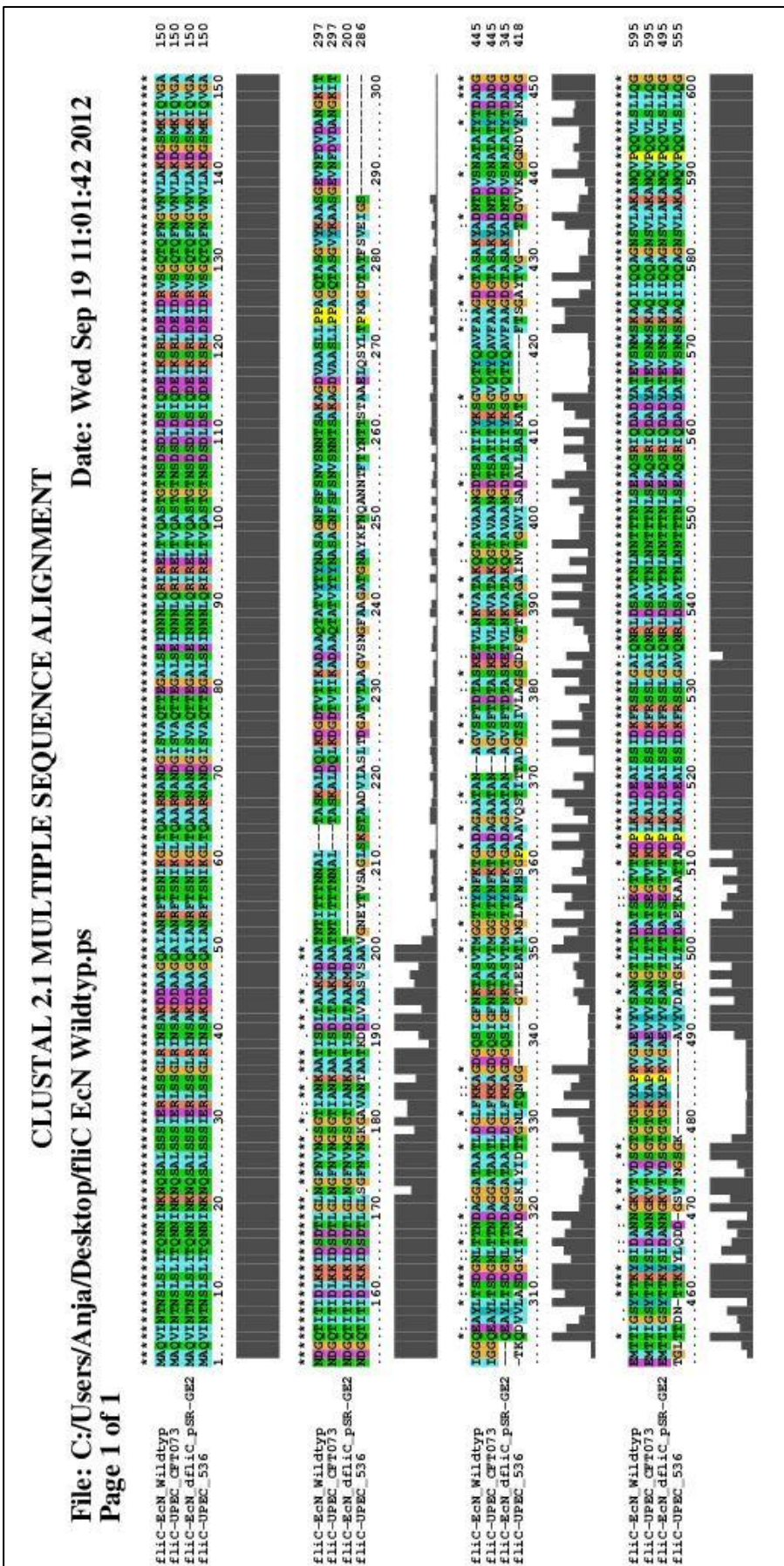
7.5.4 AS- Sequenz des Flagellins (FliC) der Domäne D3 Deletionsmutante EcN Δ fliC pSR-GE2

FliC der Domäne D3 Deletionsmutante EcN Δ fliC pSR-GE2 besteht aus 495 AS und besitzt ein Molekulargewicht von 50,98 kDa.

AS-Sequenz:

MAQVINTNSLSLITQNNINKNQSALSSEIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQAA
 RNANDGISVAQTTEGALSEINNNLQRIRELTVQASTGTNSDSLDSIQDEIKSRLDEIDRVSGQT
 QFNGVNVLAKDGSMMKIQVGGANDGQTITIDLKIDSDTLGLNGFNVNGSGTIANKAATISDLTA
 AKMDAATQEAYLTSNGNLTNDAGGATAATLDGLFKKAGDGQSIGFNKTASVTMGGTTYN
 FKTGADAGAATANAGVSFTDTASKETVLNKVATAKQGTAVAANGDTSATITYKSGVQTYQA
 VFAAGDGTASAKYADNTDVSANATATYTDADGEMTTIGSYTTKYSIDANNGKVTVDSTGTG
 KYAPKVGAEVYVSANGTLTTDATSEGTVTKDPLKALDEAISSIDKFRSSLGAIQNRLDSAVTN
 LNNTTTNLSEAQSRIQDADYATEVSNMSKAQIIQQAGNSVLAKANQVPQQVLSLLQG

7.6 Vergleich der AS-Sequenzen von Flagellin verschiedener Bakterienstämme



7.7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Mikroflora des humanen Magen-Darm-Trakts.	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Wirkungen von Probiotika im Darm und am Darmepithel.	8
Abbildung 3: Molekulare Eigenschaften des probiotischen <i>E. coli</i> Stammes Nissle 1917.	11
Abbildung 4: Domänenstruktur des MUC2 Mucins.	14
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Flagelle eines gramnegativen Bakteriums.	17
Abbildung 6: Schematische Struktur der Flagellindomänen bei <i>Salmonella typhimurium</i>	19
Abbildung 7: Schema zur Färbung von Präparaten nach Pappenheim.	48
Abbildung 8: PCR-Screen zum Nachweis der EcN-spezifischen Plasmide pMUT1 und pMUT2.	53
Abbildung 9: PCR Screen zum Nachweis EcN-spezifischer chromosomaler Sequenzen.	55
Abbildung 10: Motilitätstest auf Schwärmagar.	56
Abbildung 11: Elektronenmikroskopische Aufnahmen zur Charakterisierung von EcN ATHF.	57
Abbildung 12: Western Blot (links) von Gesamtzellprotein verschiedener EcN- und UPEC-Stämme und dazugehörige Coomassie- (Mitte) und silber- (rechts) gefärbte SDS-Gele.	59
Abbildung 13: Western Blot (links) isolierter Flagellen verschiedener EcN- und UPEC-Stämme und dazugehörige Coomassie- (Mitte) und silber- (rechts) gefärbte SDS-Gele.	60
Abbildung 14: Gemessene hBD2-Induktion nach Stimulierung durch den Überstand (A) bzw. durch das Pellet (B).	62
Abbildung 15: Skizzierung des <i>flhD</i> -Operons (modifiziert nach Barker et al, 2004).	63
Abbildung 16: PCR-Screen für die IS-Element Insertion in die regulatorische Region des <i>flhD</i> -Operons.	64
Abbildung 17: Adhäsion verschiedener EcN-Stämme an Kryoschnitte humaner Darmbiopsien.	66
Abbildung 18: Mikrofotografien von Kryoschnitten humaner Darmbiopsien mit adhärenen Bakterien.	69
Abbildung 19: Adhäsion verschiedener EcN-Stämme an die humanen Karzinomepithelzellen Caco-2 und T24.	70
Abbildung 20: Adhäsion verschiedener EcN-Stämme an Kryoschnitte humaner Darmbiopsien nach Präinkubation mit verschieden konzentrierten Mucin2-Lösungen.	72
Abbildung 21: Mikrofotografien von Kryoschnitten humaner Darmbiopsien mit adhärenen Bakterien nach Inkubation mit Mucin2.	73
Abbildung 22: Adhäsion von EcN an die Mucus-produzierende humane Karzinomepithelzelllinie LS174-T.	74
Abbildung 23: Adhäsion verschiedener EcN- (A) sowie UPEC CFT073-Stämme (B) an Mucin2. ...	75
Abbildung 24: Interaktion isolierter Flagellen von EcN Wildtyp mit Mucin2 oder Milchpulver.	76
Abbildung 25: Interaktion isolierter Flagellen von EcN Wildtyp mit murinem Mucus.	77
Abbildung 26: Interaktion der Flagellen von EcN mit humanem Mucus.	78

Abbildung 27: Interaktion von Flagellen der UPEC-Stämme CFT073 und 536 mit Mucin2.	79
Abbildung 28: Interaktion isolierter Flagellen mit Mucin2 nach Präinkubation mit verschiedenen Kohlenhydraten.	80
Abbildung 29: Effekt von Gluconat auf die Interaktion isolierter Flagellen des EcN Wildtyps mit Mucin2.	81
Abbildung 30: pH-Effekt auf die Interaktion zwischen isolierten Flagellen des EcN Wildtyps und Mucin2.	82
Abbildung 31: Effekt verschiedener Kohlenhydrate auf die Interaktion isolierter Flagellen von EcN mit humanem Mucus.	83
Abbildung 32: Effekt von Glucuronat (A) und pH4 (B) auf die Interaktion isolierter Flagellen des EcN Wildtyps mit humanem Mucus.	84
Abbildung 33: Motilität von EcN Wildtyp pMW211, EcN ATHF pMW211 und EcN Δ <i>fliC</i> pMW211 auf Schwärmagarplatten.	85
Abbildung 34: Effekt von Gluconat auf die Adhärenz verschiedener EcN-Stämme an Mucin2.	85
Abbildung 35: Effekt von Gluconat auf die Adhäsionseffizienz verschiedener EcN-Stämme an Kryoschnitte humaner Darmbiopsien.	86
Abbildung 36: Mikrofotografien von Kryoschnitten humaner Darmbiopsien mit adhärenenten Bakterien nach Inkubation mit Gluconat.	87
Abbildung 37: Effekt der Deletion von Domäne D3 auf die Interaktion isolierter Flagellen mit Mucin2 oder humanem Mucus.	88
Abbildung 38: Effekt von Gluconat auf die Interaktion der Flagellen ohne Domäne D3 mit Mucin2 (A) oder humanem Mucus (B).	89
Abbildung 39: pH Effekt auf die Interaktion der Flagellen ohne Domäne D3 mit Mucin2 (A) oder humanem Mucus (B).	89
Abbildung 40: Struktur des Flagellin.	102
Abbildung 41: Speklatives Modell zur Erklärung der Ergebnisse der Interaktionsstudien.	103

7.8 Abkürzungsverzeichnis

Ω	Elektrischer Widerstand
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	<u>B</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
C-terminal	Carboxy-terminal
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
ca.	Circa
Cm	Chloramphenicol
cm	Zentimeter
Δ	Delta
d	destilliert
dd	didestilliert
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	2'-Desoxyribonukleotid-5'-phosphat
EcN	<i>E. coli</i> Nissle 1917
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
ELISA	<u>E</u> nzyme- <u>l</u> inked <u>i</u> mmune <u>s</u> orbent <u>a</u> ssay
ETEC	Enterotoxische <i>E. coli</i>
EtOH	Ethanol
F	Farad (SI-Einheit für elektrische Kapazität)
FCS	Fötale Kälberserum
G	Guanin
g	Gramm/
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
h	Stunde
hBD2	humanes β -Defensin 2
H ₂ O	Wasser
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure

k	Kilo
kb	Kilobasenpaare
KBE	<u>K</u> olonie- <u>b</u> ildende <u>E</u> inheit
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
m	milli, Meter
M	molar, Mega
μ	mikro
mA	Milliampere
min	Minute
MOI	<u>M</u> ultiplicity <u>o</u> f <u>i</u> nfection
n	nano
N-terminal	Amino-terminal
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pH	pondus hydrogenii; negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration in einer wässrigen Lösung
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
sp./spp.	Spezies
ssp.	Subspezies
T	Thymin
TAE	<u>T</u> ris- <u>A</u> cet- <u>E</u> DTA
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethyldiamin
T _M	Schmelztemperatur
U	Uracil
ÜN	über Nacht
ÜNK	Übernachtskultur
UPEC	uropathogener <i>E. coli</i>
Upm	<u>U</u> mdrehungen pro <u>M</u> inute
V	Volt
z.B.	zum Beispiel

7.9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte	22
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien	23
Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme	25
Tabelle 4: Verwendete Plasmide	25
Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide.....	26
Tabelle 6: Verwendete Zelllinien	27
Tabelle 7: Verwendete Antibiotika	28
Tabelle 8: Verwendete Antiseren	29
Tabelle 9: Verwendete Kits	29
Tabelle 10: Reaktionsansatz und –programm für die PCR mit der GoTaq® Flexi DNA Polymerase.	33
Tabelle 11: Reaktionsansatz und –programm für die PCR mit der Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase	33
Tabelle 12: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für SDS-PAGE.....	36
Tabelle 13: Verwendete Transfektionsmischung	46
Tabelle 14: Reaktionsansatz und –programm der PCR zum spezifischen Nachweis der Plasmide pMUT1 und pMUT2 von EcN	52
Tabelle 15: Größe der amplifizierten PCR-Produkte beim Nachweis der EcN-spezifischen Plasmide pMUT1/pMUT2	53
Tabelle 16: Reaktionsansatz- und Programm für den Nachweis EcN-spezifischer chromosomaler Abschnitte.....	54
Tabelle 17: Größe der amplifizierten PCR-Produkte zum EcN-spezifischen Nachweis auf chromosomaler Ebene	54
Tabelle 18: Durchschnittliche Anzahl der Flagellen pro Bakterium der verschiedenen Stämme	58
Tabelle 19: Proteinkonzentrationen (= c) der isolierten Flagellen verschiedener EcN- und UPEC-Stämme.....	61
Tabelle 20: Reaktionsansatz und –programm der PCR zum Nachweis des Einbaus von IS-Elementen in den regulatorischen Bereich des <i>flhD</i> -Operons.....	64
Tabelle 21: pH-Werte der isolierten Flagellen und verschiedenen Kohlenhydratlösungen vor und nach der Präinkubation	81

7.10 Veröffentlichungen

7.10.1 Publikationen

Anja Troge, Wolfgang Scheppach, Bjoern O. Schroeder, Stefan A. Rund, Klaus Heuner, Jan Wehkamp, Eduard F. Stange, Tobias A. Oelschlaeger

More than a marine propeller – the flagellum of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 is the major adhesin mediating binding to human mucus

IJMM, eingereicht am 18.07.2012, akzeptiert am 16.09.2012

7.10.2 Vorträge

Anja Troge, Klaus Heuner, Tobias A. Oelschlaeger

More than a marine propeller - the flagella of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 is also the major adhesin mediating binding to mucin2

63. Jahrestagung der DGHM (Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie), 25.-28. September 2011, Essen, Deutschland

Anja Troge, Klaus Heuner, Tobias A. Oelschlaeger

The flagellum of *Escherichia coli* Nissle 1917 mediates adhesion to mucin

3. Seon Konferenz **Mikrobiota, Probiota und Wirt**, 18.-20. Juni 2010, Seon, Deutschland

Anja Troge, Tobias A. Oelschlaeger

Adherence properties of the probiotic *E. coli* strain Nissle 1917 with regard to human gut biopsies and human epithelial cell lines

61. Jahrestagung der DGHM (Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie), 20.-23. September 2009, Göttingen, Deutschland

7.10.3 Poster

Anja Troge, Klaus Heuner, Tobias A. Oelschlaeger

A further function for the flagellum of *Escherichia coli* Nissle 1917: the major adhesin *in vivo*?

4. Seon Konferenz **Mikrobiota, Probiota und Wirt**, 15.-17. April 2011, Seon, Deutschland

Anja Troge, Tobias A. Oelschlaeger

The flagellum of *Escherichia coli* Nissle 1917 mediates adhesion to mucin

Internationales Symposium zur Darmbarriere, 25.-26.03.2011, Stuttgart, Deutschland

Anja Troge, Klaus Heuner, Ulrich Sonnenborn, Tobias A. Oelschlaeger

The flagellum of the probiotic *E. coli* strain Nissle 1917: its major adhesin *in vivo*?

5. International Symposium organized by the students of the Graduate School of Life Sciences; 13.-14-Oktober 2010, Würzburg, Deutschland

Anja Troge, Ulrich Sonnenborn, Jürgen Schultze, Tobias A. Oelschlaeger

Is the flagellum of the probiotic *E. coli* strain Nissle 1917 the major adhesin *in vivo*?

3. Gemeinsame Konferenz der DGHM & VAAM, 28.-31. März 2010, Hannover, Deutschland

7.11 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Anja Yvonne Antoinette Troge
Geburtsdatum: 14.12.1982
Geburtsort: Regensburg
Staatsangehörigkeit: deutsch

AKADEMISCHE AUSBILDUNG

Seit April 2008 **Dissertation**
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Institut für Molekulare Infektionsbiologie
Betreuer: AOR Dr. T. Ölschläger, Prof. U. Dobrindt, Dr. J. Wehkamp
Titel: „Studien am Flagellensystem des *Escherichia coli* Stammes 1917 (EcN) im Hinblick auf seine Funktion als Probiotikum“

März 2008 **Diplom Biologie**
Hauptfach: Zell- und Entwicklungsbiologie
Nebenfach: Mikrobiologie, Humangenetik

Mai 2007 bis März 2008 **Diplomarbeit**
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Institut für Molekulare Infektionsbiologie
Betreuer: AOR Dr. T. Ölschläger, Prof. G. Krohne
Titel: „Bakterielle Adhäsion an Kryoschnitte humaner Darmbiopsien in Ab- und Anwesenheit ausgewählter Kohlenhydrate“

Oktober 2002 bis März 2008

Studiengang Diplom Biologie

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Mai 2002

Abitur

September 1993 bis Mai 2002

St. Marien-Gymnasium Regensburg

Würzburg, im September 2012