

**Genetische und molekularbiologische
Analyse von *fim* Determinanten bei
Citrobacter freundii und *Escherichia coli***

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

vorgelegt von
Petra Hess
aus Lohrheim

Würzburg 2003

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Hacker

Gutachter: Prof. Dr. J. Kreft

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Diese Arbeit wurde von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt.

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

Würzburg, im September 2003

Petra Hess

*Das Schönste, was wir erleben können,
ist das Geheimnisvolle.
Es ist das Grundgefühl, das an der Wiege
von wahrer Kunst und Wissenschaft steht.
Wer es nicht kennt und sich nicht mehr wundern,
nicht mehr staunen kann,
der ist sozusagen tot und sein Auge erloschen.*

Albert Einstein (1879-1955), Physiker

*Erfahrung ist nicht das, was einem zustösst,
Erfahrung ist das, was man aus dem macht,
was einem zustösst.*

Aldous Huxley (1894-1963), Schriftsteller

Meinen Eltern

Meiner Schwester

In Erinnerung an Oma Herta

In Erinnerung an Stefan

Die Experimente zur vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von Mai 1998 bis März 2002 am Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. J. Hacker danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die Überlassung des interessanten und vielseitigen Themas.

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

Herrn Dr. T. A. Oelschlaeger danke ich für die gute und engagierte Betreuung sowie für die wissenschaftliche Anleitung und Unterstützung während meiner Doktorarbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. M. Keller (Universität Bielefeld) für die Überlassung der beiden Plasmide pK18mob und pK19mob, bei Herrn Dr. S. P. Kidd (Universität Birmingham) für das Suizidplasmid pJP5603, bei Prof. Dr. T. K. Korhonen (Universität Helsinki) für den Stamm IHE3034-2 und das Plasmid pRPO-1, bei Prof. Dr. R. Fünfstück (Universität Jena) und Frau Dr. G. Blum-Oehler für die Bereitstellung der uropathogenen Patientinnen-Isolate, bei Herrn Prof. Dr. K. S. Kim (Universität Baltimore) für die Durchführung der *in vivo* Experimente in seinem Labor sowie bei Herrn Prof. Dr. J. Köhrle (KFG, Universität Würzburg) für die Benutzung des Phosphor Imagers bedanken. Ebenso danke ich Britta Schulte-Holthausen für die Konstruktion der Plasmide pB7-3, pB7-5 und pB7-6 im Rahmen ihres F2-Praktikums sowie Artur Altenhöfer, der die Invasionsstudien mit der *C. freundii* Komplementante durchgeführt hat.

Danken möchte ich auch all jenen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts, die während der Zeit im Labor immer freundlich und geduldig bereit waren, mir zu helfen. Besonders erwähnen möchte ich Anja, Barbara, Dagmar, Georg, Jutta, Lubo und Seong Hak, die stets zu einem Scherz und einem netten Wort bereit waren.

Ganz herzlicher Dank in vielfältiger Art und Weise gebührt Salam. Die hervorragende Zusammenarbeit und seine ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft waren mir eine großartige Unterstützung bei der Bewältigung zahlreicher Probleme im Laboralltag. Besonders die biochemischen Untersuchungen dieser Arbeit wurden durch die etlichen Tipps und Tricks von Salam maßgeblich erleichtert. Darüber hinaus danke ich Salam für die freundschaftlichen Ratschläge sowie für die vielen angeregten wissenschaftlichen und vor allem die nicht-wissenschaftlichen Gespräche.

Mein besonderer Dank gilt Thomas, der mir nicht nur in den zahlreichen fachlichen Diskussionen einen detaillierten Einblick in die Molekularbiologie ermöglichte, sondern der auch mit seinen wertvollen Anregungen und seiner konstruktiven Kritik entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ein herzliches „Danke schön“ geht natürlich an Iris, die mir bei den unterschiedlichsten Problemen mit Computern oder deren Programmen stets weiterhelfen konnte, die in schwierigen Phasen immer wieder aufmunternde Worte fand und deren Ratschläge und Korrekturen mir bei der Zusammenschrift dieser Arbeit eine wertvolle Hilfe waren.

Ganz zum Schluss bedanke ich mich recht herzlich bei meinen Eltern und bei meiner Schwester, die mich während meines ganzen Studiums und der Promotion in jeder nur denkbaren Hinsicht unterstützt und ermutigt haben.

Inhaltsverzeichnis

1.	ZUSAMMENFASSUNG	1
2.	EINLEITUNG	5
2.1	Virulenzfaktoren von uropathogenen <i>Escherichia coli</i>	5
2.2	Typ 1 Fimbrien von Enterobakterien	10
2.3	Invasionsmechanismen von fakultativ intrazellulären Bakterien	16
2.4	Biologie und Pathogenität von <i>Citrobacter freundii</i>	24
2.5	Zielsetzung	29
3.	MATERIAL UND METHODEN	31
3.1	Geräte und Chemikalien	31
3.2	Größenmarker, Enzyme und Laborkits	32
3.3	Bakterienstämme, Plasmide und Zelllinien	34
3.4	Oligonukleotide und DNA-Sonden	39
3.5	Antiseren	43
3.6	Anzucht der Bakterien	44
3.6.1	Nährmedien und Medienzusätze	44
3.6.2	Wachstumsbedingungen	45
3.7	Anzucht und Stammhaltung der eukaryontischen Zellen	46
3.7.1	Nährmedien	46
3.7.2	Passagieren der eukaryontischen Zellen	46
3.7.3	Stammhaltung der eukaryontischen Zellen	47
3.8	Trypanblau-Färbung eukaryontischer Zellen	47
3.9	Invasionsassay (Gentamycin-Überlebensassay)	47
3.10	Molekularbiologische Methoden	49
3.10.1	Plasmidisolierung	49
3.10.2	Isolierung von chromosomaler DNA	51
3.10.3	DNA Reinigung	51
3.10.4	DNA Konzentrationsbestimmung	52
3.10.5	Restriktionsverdau	53
3.10.6	Agarosegelelektrophorese	53
3.10.7	DNA Ligation	54

3.10.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	55
3.10.9	Herstellung von kompetenten Bakterienzellen	55
3.10.10	Transformation von Bakterienzellen	56
3.10.11	Konjugation	57
3.10.12	Southernblot	57
3.10.13	Southern-Hybridisierung mit dem ECL-Kit	58
3.10.14	DNA Sequenzierung	59
3.11	Biochemische Methoden	60
3.11.1	Präparation von Proteinen	60
3.11.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	61
3.11.3	Westernblot	62
3.11.4	Färbung von Proteinen in PAA-Gelen	63
3.12	Radioaktive Markierung von bakteriellen Proteinen	63
3.13	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	64
4.	ERGEBNISSE	65
4.1	Plasmidkonstruktionen	65
4.1.1	Subklonierung der Invasionsdeterminante aus <i>C. freundii</i> 3009	65
4.1.2	Plasmide zur Konstruktion chromosomaler Deletionsmutanten	68
4.1.3	Komplementationsstudien	70
4.1.4	Klonierung des <i>fim</i> Genclusters aus <i>E. coli</i> 536 und IHE3034	73
4.2	Konstruktion und Teilcharakterisierung von <i>C. freundii</i> Wildtypmutanten	76
4.2.1	Konstruktion und PCR-Analyse der Deletions-Insertionsmutante 3009-dz:: <i>kan</i>	76
4.2.2	Konstruktion und PCR-Analyse der Deletionsmutante 3009-dz	78
4.2.3	Southernblot-Analyse	78
4.2.4	Komplementation der Deletionsmutante 3009-dz	82
4.3	Studien zur Invasivität von <i>C. freundii</i> 3009 und <i>E. coli</i> IHE3034	85
4.3.1	Internalisierungsraten verschiedener <i>C. freundii</i> 3009 und rekombinanter <i>E. coli</i> Stämme	85
4.3.2	Einfluss von Kohlenhydraten auf die Invasion von <i>C. freundii</i> 3009	90
4.3.3	<i>In vivo</i> Experimente mit <i>C. freundii</i> 3009	93
4.3.4	Invasionsstudien mit <i>E. coli</i> IHE3034	94
4.4	Untersuchungen zur Expression von <i>fim</i> Genen aus <i>C. freundii</i> 3009	97
4.4.1	Hefeagglutination	97
4.4.2	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	99
4.4.3	Westernblot-Analyse	101
4.4.4	Radioaktive Markierung von Fim Proteinen	103
4.5	Analyse von Deletionen im Bereich des Typ 1 Fimbrien Genclusters in uropathogenen Patientinnen-Isolaten	106

5.	DISKUSSION	113
5.1	Charakterisierung der Invasionsdeterminante aus <i>C. freundii</i> 3009	113
5.2	Adhäsine als Invasine	120
5.3	Expression von <i>fim</i> Genen aus <i>C. freundii</i> 3009	122
5.4	Deletion des <i>fim</i> Genclusters in uropathogenen Patientinnen-Isolaten	126
6.	LITERATUR	134
7.	ANHANG	156
7.1	Abkürzungen	156
7.2	Sequenzen	158
7.2.1	<i>C. freundii</i> 3009 <i>fim</i> Gencluster	158
7.2.2	IS 1 in <i>fim</i> _{CtA} von Plasmid pPH24	165
7.2.3	IS 1 in der <i>fim</i> Deletionsstelle der uropathogenen Patientinnen-Isolate Nr. 1-6	166
7.3	Sequenzvergleich der <i>fim</i> Gencluster von <i>C. freundii</i>, <i>S. typhimurium</i> und <i>E. coli</i>	167
7.4	PCR Ergebnisse zur Analyse von Deletionen im Bereich des <i>fim</i> Genclusters in uropathogenen Patientinnen-Isolaten	179
7.5	Publikationen und Tagungsbeiträge	184
7.6	Lebenslauf	185

1. Zusammenfassung

Citrobacter freundii sind Gram-negative, bewegliche, stäbchenförmige Bakterien aus der Familie der *Enterobacteriaceae*. Als harmloser Kommensal zählt *C. freundii* zur normalen intestinalen Flora von Menschen und Tieren, kann aber als opportunistischer Erreger beispielsweise Harnwegsinfektionen und in seltenen Fällen Neugeborenen-Meningitis verursachen. Die Invasion eukaryontischer Zellen ist eine Möglichkeit, um in Uroepithelzellen einzudringen oder die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Die Internalisierung von *C. freundii* 3009 in das Endosom von Harnblasenepithelzellen (T24) erfolgt *in vitro* über einen ausschließlich Mikrotubuli-abhängigen Mechanismus. Als genetische Grundlage der Invasionskompetenz von *C. freundii* 3009 wurde in Vorarbeiten eine im Chromosom lokalisierte Invasionsdeterminante identifiziert, die eine hohe Identität zum Typ 1 Fimbrien Gencluster (*fim*) von *Salmonella enterica* serovar Typhimurium aufweist. Diese in Plasmid pTO3 klonierte Invasionsdeterminante vermittelt nicht-invasiven *E. coli* K12 Stämmen Invasivität. Im Gegensatz dazu sind rekombinante *E. coli* K12 Klone, die das *fim* Operon aus *S. enterica* serovar Typhimurium bzw. *E. coli* oder andere *E. coli* Adhäsindeterminanten tragen, nicht invasiv.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die für die Invasionsfähigkeit von *C. freundii* 3009 essentiellen Gene der klonierten Invasionsdeterminante ermittelt. Dies geschah zum einen durch Subklonierung von Teilen des Plasmids pTO3. In anschließenden Invasionsassays wurden die entsprechenden *E. coli* K12 Klone hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Invasion untersucht. Die Internalisierung des Wildtyps *C. freundii* 3009 sowie der invasiven rekombinanten *E. coli* K12 Stämme konnte nicht nur, wie erwartet, mittels Mannose, sondern auch mittels Chitinhydrolysat [(GlcNAc)_n] inhibiert werden. Zum anderen wurden *C. freundii* Wildtypmutanten konstruiert, in denen der zentrale Teil der Invasionsdeterminante deletiert ist. Diese chromosomalen Deletionsmutanten weisen im Vergleich zum Wildtyp 3009 eine deutlich reduzierte Invasionsrate in die humane Harnblasenepithelzelllinie T24 auf. Für die Komplementante wurde die Wiederherstellung des invasiven Phänotyps demonstriert. Darüber hinaus ist bekannt, dass *C. freundii* 3009 in humane mikrovaskuläre Endothelzellen aus dem Gehirn (HBMEC) eindringen und dort replizieren kann. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sowohl *C. freundii* 3009 als auch der, die *fim*_{Cf} Determinante tragende, rekombinante *E. coli* Stamm HB101pPH1 in der Lage sind, im Tiermodell mit neugeborenen Ratten die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden.

Neben der Analyse der Funktion der klonierten *C. freundii* 3009 *fim* Determinante in Invasionsassays und mittels Mannose-sensitiver Hefeagglutination, wurden die Genprodukte selbst ebenfalls nachgewiesen. Durch radioaktive Markierung der für die Invasivität essentiellen Proteine nach induzierter Transkription in einem T7 Phagenexpressionssystem konnten die Molekulargewichte von Fim_{Cf}A, Fim_{Cf}D, Fim_{Cf}F und Fim_{Cf}H ermittelt werden. Diese stimmen mit den von der DNA Sequenz abgeleiteten Molekulargewichten gut überein. Sowohl mit *C. freundii* 3009 als auch mit entsprechenden rekombinanten *E. coli* K12 Stämmen gelang es in Westernblots, das Adhäsın Fim_{Cf}H an der Bakterienoberfläche nachzuweisen. Dies konnte auch für Fim_{Cf}F in denselben rekombinanten *E. coli* K12 Stämmen gezeigt werden. Allerdings scheinen die Fim_{Cf} Proteine nicht zu einem Pilus assembliert zu werden, da in elektronenmikroskopischen Untersuchungen von *C. freundii* 3009 oder die *fim*_{Cf} Determinante tragenden *E. coli* K12 Stämmen niemals Fimbrien beobachtet werden konnten.

Da auch bestimmte Typ 1 Fimbrien Varianten aus *E. coli* über das Adhäsın Fim_{Ec}H die Internalisierung der Bakterien in Blasenepithelzellen zu induzieren vermögen, wurden die *fim*_{Ec} Gencluster aus den beiden human pathogenen *E. coli* Stämmen 536 (uropathogenes Isolat) und IHE3034 (Neugeborenen-Meningitis Isolat) kloniert. Zudem wurde die Invasionsfähigkeit des *E. coli* K1 Stamms IHE3034 und der *fim* negativen Insertionsmutante IHE3034-2 charakterisiert.

Typ 1 Fimbrien werden als wichtige Virulenzfaktoren von uropathogenen *E. coli* (UPEC) angesehen. Trotzdem konnte eine Reihe von klinischen UPEC Isolaten identifiziert werden, die diesen Adhäsintyp nicht mehr exprimieren. Genetische Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit ergaben, dass in 11 Isolaten das *fim*_{Ec} Operon vollständig aus dem Chromosom der Bakterien deletiert ist. In den übrigen 6 Isolaten ist noch ein Teil des 3'-Endes des Gens *fim*_{Ec}H vorhanden. Außerdem ist in die Deletionsstelle dieser 6 Isolate ein IS1 Element von *E. coli* inseriert. In den übrigen uropathogenen Isolaten sind auch angrenzende DNA Bereiche von der Deletion betroffen.

Abschließend kann festgestellt werden, dass eine *fim* ähnliche Determinante in *C. freundii* 3009 als Invasionssystem fungiert. Die Typ 1 Fimbrien der *E. coli* Stämme 536 und IHE3034 sind zwar notwendig, aber nicht hinreichend für die Invasivität. Obwohl Typ 1 Fimbrien als wichtige Virulenzfaktoren von uropathogenen *E. coli* gelten, ist dennoch in einer Reihe von klinischen UPEC Isolaten das *fim*_{Ec} Operon deletiert.

Summary

Citrobacter freundii, which belong to the family of *Enterobacteriaceae*, are Gram-negative, motile and rod shaped bacteria. As commensals they are part of the normal intestinal flora of humans and animals. However, as an opportunistic pathogen they are known to be involved in urinary tract infections as well as in newborn meningitis in rare cases.

The ability to invade eukaryotic cells might be a way by which pathogenic bacteria can enter uroepithelial cells or breach the blood-brain-barrier. *In vitro*, the internalization of *C. freundii* 3009 into the endosomes of the urinary bladder epithelial cell line T24 exclusively follows a microtubule dependent mechanism. Previously, a chromosomal invasion determinant of *C. freundii* 3009 has been identified and cloned in plasmid pTO3. This invasion determinant shows high identity to the type 1 fimbrial gene cluster (*fim*) of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Interestingly, non-invasive *E. coli* K12 strains become invasive, when they are transformed with plasmid pTO3. In contrast, recombinant *E. coli* K12 strains harbouring the *fim* operon of either *S. enterica* serovar Typhimurium and *E. coli*, respectively, or other *E. coli* adhesin determinants were not invasive.

In this work the genes of this chromosomal determinant, which are essential for invasiveness, were identified. This was achieved on one hand by subcloning parts of the invasion determinant of plasmid pTO3. Subsequently, the ability of the resulting plasmids to confer invasiveness to *E. coli* K12 strains was examined by gentamicin protection assays. Interestingly, the internalization of those recombinant *E. coli* K12 strains is not only inhibited by an analogue of the natural receptor of the adhesin Fim_{Cf}H, namely mannose, but also by chitin hydrolysate [(GlcNAc)_n]. On the other hand, mutants of wild type *C. freundii* 3009 were constructed by deleting the central part of this particular invasion determinant. These chromosomal deletion mutants showed a considerable lower invasion rate of the human epithelial cell line T24 in comparison to the wild type. Complementation of one of these mutants fully restored the wild type phenotype. Furthermore, it is known that *C. freundii* 3009 is capable to invade and replicate in human brain microvascular endothelial cells (HBMEC). The results presented here demonstrate that not only *C. freundii* 3009 is capable to breach the blood-brain-barrier in a newborn rat animal model, but also recombinant *E. coli* strain HB101pPH1 which carries the chromosomal *fim*_{Cf} determinant.

In addition to the functional analysis of the *C. freundii* 3009 *fim* determinant by performing gentamicin protection assays and mannose sensitive yeast agglutination, the expression of the corresponding gene products was shown. Proteins essential for invasion, namely Fim_{Cf}A, Fim_{Cf}D, Fim_{Cf}F and Fim_{Cf}H, were specifically radio labelled using a T7 phage expression system and their molecular weight was determined. The

observed molecular weights are in agreement with the calculated ones from deduced amino acid sequences. Furthermore, the presence of the fimbrial adhesin minor subunit Fim_{Cf}H on the outer surface of *C. freundii* 3009 as well as appropriate recombinant *E. coli* K12 strains was shown using Westernblot technique. Expression of the minor subunit Fim_{Cf}F on the outer surface was also shown for the recombinant *E. coli* K12 strains using the same technique. However, electron microscopic studies of *C. freundii* 3009 or *E. coli* K12 strains harbouring the *fim*_{Cf} determinant indicate that Fim_{Cf} protein subunits are not assembled in hair like appendages called fimbriae.

Since certain type 1 fimbrial variants of *E. coli* are able to induce bacterial internalization by bladder epithelial cells via the adhesin Fim_{EC}H, the *fim*_{EC} gene cluster from human pathogenic *E. coli* strains 536 (uropathogenic isolate) and IHE3034 (newborn meningitis isolate) were cloned in order to examine the role of type 1 fimbriae of these strains in invasiveness. In addition, *E. coli* K1 strain IHE3034 and the isogenic *fim* negative insertion mutant IHE3034-2 were characterized for their invasion capability.

Although type 1 fimbriae are known to be an indispensable virulence factor of uropathogenic *E. coli* (UPEC), several clinical UPEC strains, which are incapable of expressing this particular adhesin, were isolated and identified. By performing genetic analysis, it could be demonstrated that the *fim*_{EC} operon is completely deleted from the chromosome in 11 of those isolates. In another 6 isolates the presence of only the 3'-end of the gene *fim*_{EC}H could be found. Furthermore, an IS1 element inserted in the *fim* deletion was identified in these 6 strains. In the remaining 11 isolates also the DNA region adjacent to the *fim*_{EC} cluster was affected by this deletion process.

In conclusion, it was ascertained that in *C. freundii* 3009 a *fim* like determinant functions as an invasion system. Type 1 fimbriae of *E. coli* strains 536 and IHE3034 are necessary but not sufficient to confer invasiveness. Although type 1 fimbriae of uropathogenic *E. coli* are known to be an important virulence factor, in several clinical uropathogenic *E. coli* strains the *fim*_{EC} operon was deleted.

2. Einleitung

2.1 Virulenzfaktoren von uropathogenen *Escherichia coli*

Heutzutage zählen Harnwegsinfektionen in den Industriestaaten neben Atemwegs- und Magen-Darm-Infektionen zu den am häufigsten auftretenden bakteriellen Infektionen. So werden z.B. in Deutschland ungefähr 2 Millionen Fälle jährlich ärztlich behandelt (Heesemann und Hacker, 2000). In den USA erleiden schätzungsweise 11 % der Frauen mindestens eine ärztlich diagnostizierte Harnwegsinfektion pro Jahr und ungefähr 60 % aller amerikanischen Frauen werden während ihres Lebens an einer oder sogar mehreren Harnwegsinfektionen erkranken (Foxman, 2002; Foxman *et al.*, 2000). Ungefähr 25 % aller einmal infizierten Frauen erkranken innerhalb der folgenden sechs Monate wiederholt an einer Harnwegsinfektion, wobei in den meisten Fällen der schon zuvor isolierte *E. coli* Stamm (Rezidiv) an der Reinfektion beteiligt ist (Hooton, 2001; Hooton und Stamm, 1997).

Harnwegsinfektionen werden von fakultativ anaeroben Bakterien der menschlichen Darmflora verursacht, wobei *Escherichia coli* den Leitkeim darstellt. Das gesamte Erregerspektrum reicht allerdings von *E. coli* über *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* und *Citrobacter freundii* bis hin zu *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus saprophyticus* und *Staphylococcus epidermidis*. Auch der Pilz *Candida albicans* ist als Verursacher von Harnwegsinfektionen, hauptsächlich bei Patienten nach Organtransplantationen oder Chemotherapie, bekannt (Bonadio *et al.*, 2001; Lipsky *et al.*, 1980; MacMillan, 2001; Nicolle, 2002; Oelschlaeger und Hacker, 1998; Ronald, 2002; Wagenlehner *et al.*, 2002). Man unterscheidet zwischen unkomplizierten Infektionen, die durch einen akuten und kurzen Verlauf gekennzeichnet und durch verstärkte Flüssigkeitsaufnahme (Spüleffekt) und/oder Antibiotika gut therapierbar sind, und komplizierten Infektionen, die einen chronischen Verlauf nehmen und nur schwer mit Antibiotika behandelbar sind. Nahezu 80 % der unkomplizierten sowie etwa 40 % der komplizierten Harnwegsinfektionen werden von uropathogenen *E. coli* Bakterien (UPEC) verursacht. Die verschiedenen Erkrankungen, die von UPEC ausgelöst werden, reichen von asymptomatischen Bakteriurien (Ausscheidung von Bakterien im normalerweise sterilen Urin) über Entzündungen der Harnblase (Cystitis)

und Nierenbeckenentzündungen (Pyelonephritis) bis hin zu Bakteriämien (vorübergehendes Vorhandensein von Bakterien im Blut), woraus sich in seltenen Fällen sogar eine Urosepsis entwickeln kann (Bahrani-Mougeot *et al.*, 2001; Heesemann und Hacker, 2000).

Während die meisten *E. coli* Isolate als Teil der kommensalen Darmflora apathogene Stämme sind, besitzen pathogene *E. coli* zusätzliche genetische Elemente mit Virulenzgenen, die es den pathogenen Stämmen ermöglichen, zelluläre oder immunologische Barrieren zu überwinden (Falkow, 1997). Durch horizontalen Gentransfer können solche Virulenzgene als mobile genetische Elemente apathogenen Mikroorganismen bereitgestellt werden. Die entsprechenden genetischen Informationen befinden sich beispielsweise auf Plasmiden (z.B. *elt*, kodiert LT-1 Enterotoxin), Transposons (z.B. ST-1 Enterotoxin), Phagen (z.B. *slt-1*, kodiert Shiga-like toxin 1) und/oder im Chromosom von pathogenen *E. coli* Stämmen auf sogenannten Pathogenitätsinseln (Hacker und Kaper, 2000; Mühldorfer und Hacker, 1994; Steiner, 1998). Bei extraintestinalen *E. coli*, zu denen UPEC gehören, sind die Virulenzgene auf dem Chromosom lokalisiert. Für UPEC sind die folgenden Pathogenitätsfaktoren und deren Funktion hinsichtlich der Etablierung einer Infektion bekannt (Bahrani-Mougeot *et al.*, 2002; Foxman *et al.*, 1995; Guyer *et al.*, 2002; Guyer *et al.*, 2000; Heesemann und Hacker, 2000; Johnson, 1991; Mulvey, 2002; Mulvey *et al.*, 2000; Oelschlaeger *et al.*, 2002a; Schilling *et al.*, 2001b; Schilling und Hultgren, 2002; Wullt *et al.*, 2002):

- fimbrielle und afimbrielle Adhäsine (Typ 1, S-, P- und F1C-Fimbrien, Dr Familie)
 - ⇒ Anheftung der Bakterien an uroepitheliale Zellen
 - zum Teil Invasion von Blasenepithelzellen (Typ 1 Fimbrien, Dr Pili, Afalll)
- Lipopolysaccharid (LPS) und Kapseln
 - ⇒ Resistenz gegen Serumkomplement und Phagozytose
- porenbildende Cytotoxine (z.B. α -Hämolyisin)
 - ⇒ Lyse von Wirtszellen
- Sat (secreted autotransporter toxin; Serin-Protease)
 - ⇒ Abbau von Komponenten in der extrazellulären Matrix von Wirtszellen
- CNF1 (cytotoxic necrotizing factor type 1)
 - ⇒ noch nicht endgültig aufgeklärt;
 - eventuell Induktion von Apoptose in humanen Blasenepithelzellen
- Eisenaufnahmesysteme: Siderophore, z.B. Aerobaktin, Enterobaktin Chu (Nutzung von Hämin als Eisenquelle)
 - ⇒ Überleben und Vermehrung im Wirt

Diesen bakteriellen Pathogenitätsfaktoren stehen die folgenden unspezifischen und spezifischen Wirtsabwehrfaktoren gegenüber (s. auch Abb. 1):

- Urinfluss
 - ⇒ ausspülen von nicht oder nur schwach adhätierenden Bakterien
- niedriger pH-Wert und hohe Salzkonzentration (Osmolarität) im Urin
 - ⇒ Hemmung des bakteriellen Wachstums
- Harnstoff, Lactoferrin und organische Säuren im Urin
 - ⇒ erschweren das Überleben der Bakterien im Harnweg
- Sekretion von anti-adhäsiven Faktoren (Tamm-Horsfall Protein (THP), niedermolekulare Zucker, sekretorisches IgA, Uromucoid)
 - ⇒ verhindern die Bindung von Bakterien an oberflächliche Blasenepithelzellen
- Exfoliation von Epithelzellen
 - ⇒ adhärente und internalisierte Bakterien werden zusammen mit den oberflächlichen Epithelzellen abgestoßen
- Sekretion von Chemokinen (z.B. Interleukin-8) und Cytokinen (z.B. Interleukin-6)
 - ⇒ Aktivierung und Rekrutierung von Neutrophilen auf der apikalen Seite der Mucosa
- Produktion von Substanzen mit mikrobizider Wirkung (Stickstoffmonoxid, Defensine)
 - ⇒ abtöten von Mikroorganismen

Im allgemeinen beginnt eine Harnwegsinfektion mit der Kolonisierung der normalerweise sterilen Harnröhre (Urethra) mit aus dem Dickdarm (Colon) oder der Vagina stammenden uropathogenen *E. coli* Stämmen. Nach dem Eintritt der Bakterien in die Blase sind sie einer Reihe von Wirtsabwehrfaktoren wie Urinfluss, Uromucoid, Tamm-Horsfall Protein, sekretorischem Immunglobulin A und schlechten Wachstumsbedingungen ausgesetzt (Abb. 1). Um trotz dieser Abwehrmaßnahmen des Wirtsorganismus eine Infektion etablieren zu können, adhätieren bzw. invadieren UPEC Blasenepithelzellen, was durch die Expression von Adhäsinen, vor allem von Typ 1 und P Fimbrien, ermöglicht wird (Hagberg *et al.*, 1981). Dadurch wird dann eine Reihe weiterer Wirtsabwehrfaktoren ausgelöst, wie beispielsweise die Exfoliation von oberflächlichen Blasenepithelzellen zusammen mit adhärenenten bzw. internalisierten Bakterien in den Urin oder die Produktion von Cytokinen bzw. Chemokinen. Allerdings sind UPEC in der Lage, sich in den absterbenden Wirtszellen zu replizieren und sich sogar aus solchen Zellen freizusetzen, was zur Folge hat, dass sich die Bakterien in tiefer gelegenen Epithelzellschichten festsetzen können. Darüber hinaus gelingt es UPEC, die Ausschüttung von Cytokinen bzw. Chemokinen durch die Blasenepithelzellen zumindest teilweise zu unterbinden. Trotz aller Wirtsabwehrmechanismen kann sich eine geringe Anzahl von UPEC im Verlauf einer akuten

Infektion im Blasenepithel festsetzen und dieses manchmal als dauerhaftes Reservoir, z.B. als Ausgangsort einer erneuten bzw. wiederkehrenden Harnwegsinfektion, nutzen (Mulvey *et al.*, 2001; Mulvey *et al.*, 1998). Weiterhin sind auch der Gastrointestinaltrakt sowie Bereiche der Vagina und der Harnröhre als Nische für persistente UPEC bekannt (Russo *et al.*, 1995; Schilling und Hultgren, 2002; Stamey und Sexton, 1975).

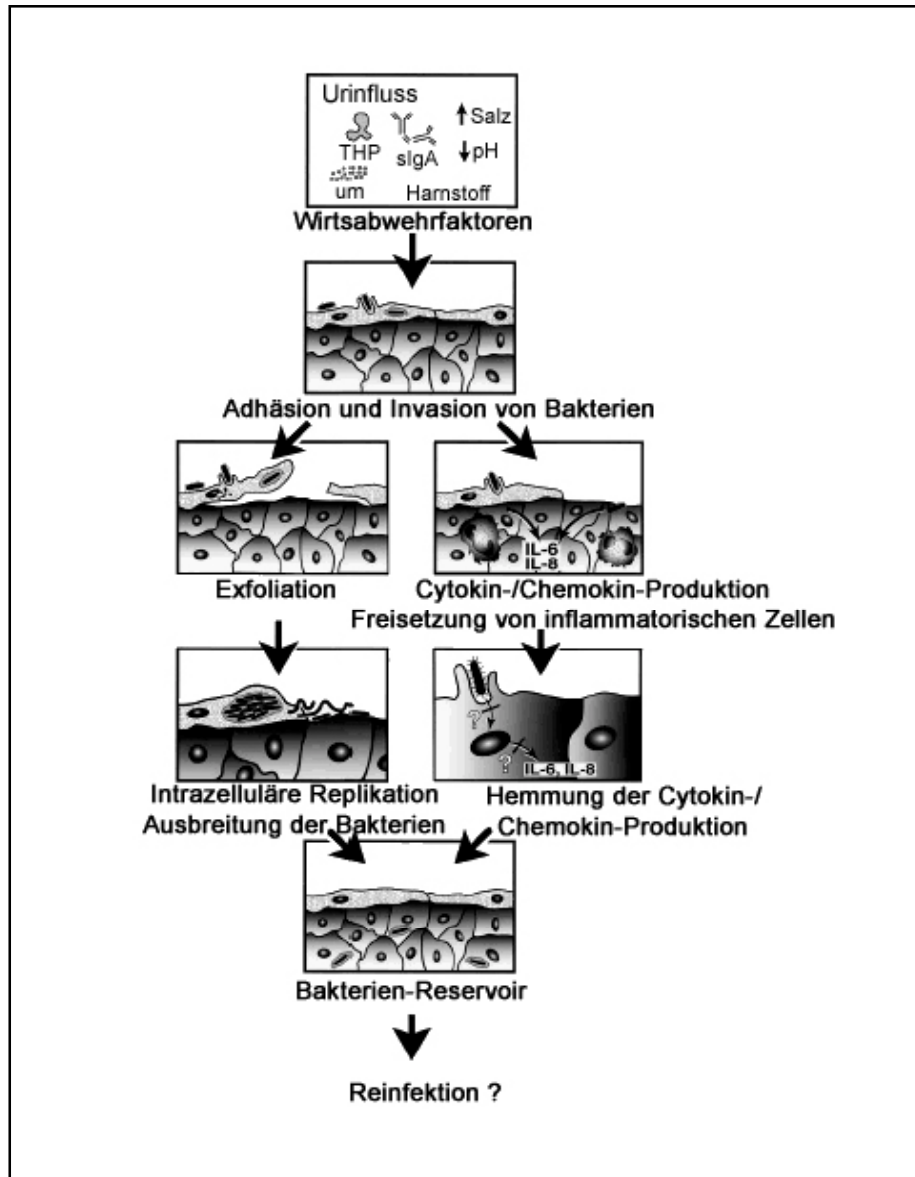


Abb. 1 Wesentliche Wechselwirkungen zwischen den wichtigsten bakteriellen Virulenzfaktoren und der Wirtsabwehr im Verlauf einer Harnwegsinfektion (modifiziert nach Schilling *et al.*, 2001a).

slgA: sekretorisches Immunglobulin A; um: Uromucoid; THP: Tamm-Horsfall Protein; IL-6: Interleukin-6; IL-8: Interleukin-8

Da der auswaschende Effekt des Urinflusses einen wichtigen effektiven Wirtsabwehrfaktor darstellt, ist die Fähigkeit der Bakterien, sich an die Blasenmucosa anheften zu können, von entscheidender Bedeutung für die Initiation einer Harnwegsinfektion. Dieser Vorgang wird durch die Expression verschiedenster Arten von Adhäsinen (sowohl fimbrielle als auch afimbrielle) ermöglicht (Connell *et al.*, 1996; Mulvey, 2002). Zu den im Zusammenhang mit uropathogenen Harnwegsisolaten am besten untersuchten Fimbriendeterminanten zählen Typ 1 Fimbrien (*fim*) und P Fimbrien (*pap* = pyelonephritic associated pili).

Typ 1 Fimbrien binden an sekretierte Mannose-haltige Glykoproteine, die an der Oberfläche verschiedenster Typen von Wirtszellen (Blasen- und Nierenepithelzellen, Erythrozyten, Mastzellen, Makrophagen, Neutrophile) sowie in der extrazellulären Matrix und an anderen Bakterien vorhanden sind (Mulvey, 2002; Mulvey *et al.*, 1998; Pak *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001). Dabei handelt es sich um Wechselwirkungen des Adhäsins FimH mit den Wirtszellrezeptoren Uroplakin (UPIa und UPIb) und CD48 sowie mit dem Tamm-Horsfall Protein, Typ I und Typ IV Kollagen, Laminin und Fibronectin (s. auch Kap. 2.2). Über das Adhäsins FimH wird aber nicht nur die Adhäsion an Blasenepithelzellen vermittelt, sondern auch die Internalisierung der Bakterien induziert (Martinez und Hultgren, 2002; Martinez *et al.*, 2000; Mulvey, 2002; Oelschlaeger, 2001). Innerhalb der luminalen Epithelzellen können UPEC replizieren und anschließend große bakterielle Einschlüsse bilden (Mulvey *et al.*, 2001). Die Internalisierung bietet den UPEC einige Vorteile um im Harnwegstrakt zu überleben. So sind intrazelluläre Bakterien vor bestimmten Wirtsabwehrmechanismen und der Wirkung verschiedener Antibiotika geschützt.

P Fimbrien spielen insbesondere bei mit Pyelonephritis assoziierten UPEC Stämmen eine bedeutende Rolle (Bahrani-Mougeot *et al.*, 2001; Kuehn *et al.*, 1992; Wullt *et al.*, 2001b; Wullt *et al.*, 2000). Über das Adhäsins PapG wird eine Bindung an Glykolipid- bzw. Glykoprotein-Rezeptoren ermöglicht, die das Disaccharid α -D-Gal-(1,4)- β -D-Gal (Globobiose) oder dessen Multimere enthalten und über β -Glukose (Glc) an Ceramid als Membrananker gebunden sind (Lund *et al.*, 1987; Roberts *et al.*, 1994). Die entsprechenden Rezeptoren GbO3 (Globotriaosylceramid), GbO4 (Globotetraosylceramid, GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4GlcCer) und GbO5 (GalNAc α 1-3GalNAc3Gal α 1-4Gal β 1-4GlcCer; Forssman Antigen) werden an der Oberfläche von Nierenepithelzellen und Erythrozyten präsentiert (Dodson *et al.*, 2001; Mulvey, 2002; Svenson *et al.*, 1983; Wullt *et al.*, 2002; Wullt *et al.*, 2001a).

Diese Variationen in der Bindungsspezifität wurden als Grundlage für die Einteilung des Adhäsins PapG in drei Klassen herangezogen. Aus medizinischer Sicht sind vor allem die Klasse II und III Adhäsine (PapGII, PapGIII) interessant, weil sie in P Fimbrien von

human pathogenen *E. coli* Isolaten exprimiert werden. So wurde in *E. coli* Stämmen von Patienten mit akuter Pyelonephritis überwiegend PapGII als fimbrielles Adhäsion identifiziert. PapGII bindet bevorzugt an GbO4, das häufig im oberen Harnweg von Menschen vorkommt. P Fimbrien, die PapGIII (bindet an GbO5) in ihrer Spitze enthalten, treten gewöhnlich bei mit Cystitis und selten bei mit Pyelonephritis assoziierten *E. coli* Isolaten auf. Darüber hinaus wurden verschiedene Serogruppen innerhalb der P Fimbrien identifiziert, die als PapA Varianten in F-Klassen eingeteilt wurden (Johnson *et al.*, 2000; Strömberg *et al.*, 1990).

Da die Behandlung von Infektionen mit Antibiotika aufgrund des zunehmenden Auftretens von resistenten Erregern weltweit sowie von multiresistenten Keimen im Bereich der nosokomialen Infektionen immer problematischer wird, besteht ein großes Interesse an der Entwicklung neuer antimikrobieller Substanzen. Die sogenannte Anti-Adhäsive-Therapie (Kelly und Younson, 2000; Ofek *et al.*, 1996) basiert auf der Blockierung der Wechselwirkungen zwischen bakteriellen Adhäsinen und den entsprechenden Wirtszellrezeptoren, wodurch eine Infektion schon in einem frühen Stadium bekämpft werden kann. In diesem Zusammenhang werden zur Zeit vier verschiedene Konzepte verfolgt. Zum einen werden in klinischen Studien anti-Adhäsion-Antikörper zu prophylaktischen Schutzimpfungen eingesetzt, zum anderen werden Adhäsion-analoge bzw. Rezeptor-analoge Substanzen verwendet, um das Anheften von pathogenen Bakterien an Wirtszellen und somit letztendlich eine Kolonisierung zu verhindern (Langermann *et al.*, 1997; Sharon und Ofek, 2000; Wizemann *et al.*, 1999). Darüber hinaus gelang in einer Studie mit Affen der Nachweis, dass auch durch den direkten Einsatz des Adhäsins FimH als Impfstoff eine Infektion durch UPEC unterbunden werden kann (Langermann *et al.*, 2000).

2.2 Typ 1 Fimbrien von Enterobakterien

Die Strukturen an der Oberfläche von Bakterien, die zur Adhäsion an unterschiedliche Arten von Wirtszellen notwendig sind, werden Adhäsine oder Kolonisierungsfaktoren genannt. Häufig sind diese Adhäsine Bestandteil von aus mehreren Proteinuntereinheiten zusammengesetzten, faserförmigen Zellfortsätzen, die als Fimbrien oder Pili bezeichnet und grob in Mannose-sensitive (MS) und Mannose-resistente (MR) Pili eingeteilt werden (Duguid *et al.*, 1979; Hacker, 1990; Krogfelt, 1991). Darüber hinaus wurden auch Nicht-Fimbrienadhäsine beschrieben, die entweder in Form von einzelnen integralen Membranproteinen auf der äußeren Membran präsent sind oder die Bakterienzelle als große polymere Aggregate umgeben (Schmidt, 1994). Prominente Vertreter dieser Klasse von Adhäsinen sind u.a. Afa (afimbrielle Adhäsine)

und Nfa (nicht-fimbrielle Adhäsine), die von pathogenen *E. coli* Stämmen exprimiert werden (Ahrens *et al.*, 1993; Goldhar *et al.*, 1987; Jouve *et al.*, 1997), Intimin (Eae) von enterohämorrhagischen und enteropathogenen *E. coli* (Kenny *et al.*, 1997) oder Dr-II von *E. coli* (Pham *et al.*, 1997). Neben diesen klassischen Proteinadhäsinen sind auch Kohlenhydratstrukturen, z.B. Lipopolysaccharide (LPS) von *Neisseria* und Lipoteichonsäuren (LTA) Gram-positiver Bakterien, wie z.B. Streptokokken, als mikrobielle Adhärenzfaktoren bekannt (Hacker, 2000).

Typ 1 Fimbrien werden an der Zelloberfläche der meisten wildtypischen *E. coli*, und zwar sowohl von uropathogenen Stämmen als auch von Kommensalen im Darm, und vielen anderen Enterobakterien exprimiert. Dabei handelt es sich um haarförmige Organellen, die aus ungefähr 1000 Proteinuntereinheiten pro Pilus bestehen. Typischerweise befinden sich auf der Oberfläche einer fimbrierten Bakterienzelle rund 500 bis 1000 Fimbrien. Es wird angenommen, dass Typ 1 Fimbrien eine bedeutende Rolle bei der Etablierung einer Harnblasenentzündung (Cystitis) zukommt (Connell *et al.*, 1996; Langermann *et al.*, 1997; Thankavel *et al.*, 1997). So konnte in einem Maus-Harnwegsinfektionen-Modell gezeigt werden, dass durch die Expression von Typ 1 Fimbrien die Virulenz von uropathogenen *E. coli* gesteigert wird (Connell *et al.*, 1996).

Das charakteristische phänotypische Kennzeichen von Typ 1 Fimbrien ist die Fähigkeit zur Hämagglutination von Erythrocyten aus Meerschweinchen sowie die Agglutination von Hefezellen. Beides kann mit α -D-Mannose inhibiert werden, so dass Typ 1 Fimbrien zu den Mannose-sensitiven Pili zählen (Klemm und Krogfelt, 1994). Das Adhäsिन FimH kann sowohl an Monomannose- als auch an Oligomannose-Bereiche verschiedener Substrate und Rezeptoren binden. Bindungsstudien zeigten jedoch, dass die Hämagglutination durch verschiedenartige Oligomannoside effektiver inhibiert wird als durch Methyl- α -Mannosid (Firon *et al.*, 1984). Außerdem wurde ein Polymorphismus von FimH bezüglich der Stärke der Bindung an Monomannose-Strukturen beobachtet. Während FimH von verschiedenen *E. coli* Isolaten an Oligomannose-Reste mit nahezu gleicher Affinität bindet, zeigten kommensale intestinale *E. coli* Stämme eine niedrige, uropathogene *E. coli* Stämme jedoch eine hohe Bindungsaffinität für Monomannose-Bereiche. Die Ursache für das Auftreten dieser unterschiedlichen Phänotypen könnte in der Anpassung der Bakterienstämme an ihre jeweilige Umgebung liegen (Sokurenko *et al.*, 1997; Sokurenko *et al.*, 1998).

Das Hauptstrukturprotein FimA bildet zusammen mit den Nebenstrukturproteinen den aus der Zelle ragenden, starren Pilus-Schaft, der einen Durchmesser von ungefähr 7 nm aufweist und über eine ca. 3 nm dicke, flexible Verlängerung (Fibrillum) mit dem eigentlichen Adhäsिन FimH verbunden ist, das für die Vermittlung der

Rezeptorerkennung verantwortlich ist (Jones *et al.*, 1995b; Klemm *et al.*, 1985; Oelschlaeger *et al.*, 1997; Russell und Orndorff, 1992). Der Schaft des Pilus besteht überwiegend aus sich wiederholenden FimA Untereinheiten, die sich zu einem dicht gepackten, schraubenförmigen (rechtsgängige Helix) Heteropolymer zusammensetzen, in das wahrscheinlich auch FimH als kryptisches Adhäsion in regelmäßigen Intervallen eingebunden ist (Hanson und Brinton, 1988; Ponniah *et al.*, 1991; Thankavel *et al.*, 1999). Das Adhäsion FimH besteht aus zwei verschiedenen Domänen, einem Lektin-bindenden N-Terminus, der eine Mannose-bindende „Tasche“ enthält, und einem Chaperon-bindenden C-Terminus. Die Chaperon-bindende Domäne ist hoch konserviert in allen Fimbrienuntereinheiten und essentiell für den korrekten Zusammenbau des Pilus mit Hilfe des Chaperons FimC (Choudhury *et al.*, 1999; Sauer *et al.*, 1999; Schembri *et al.*, 2000).

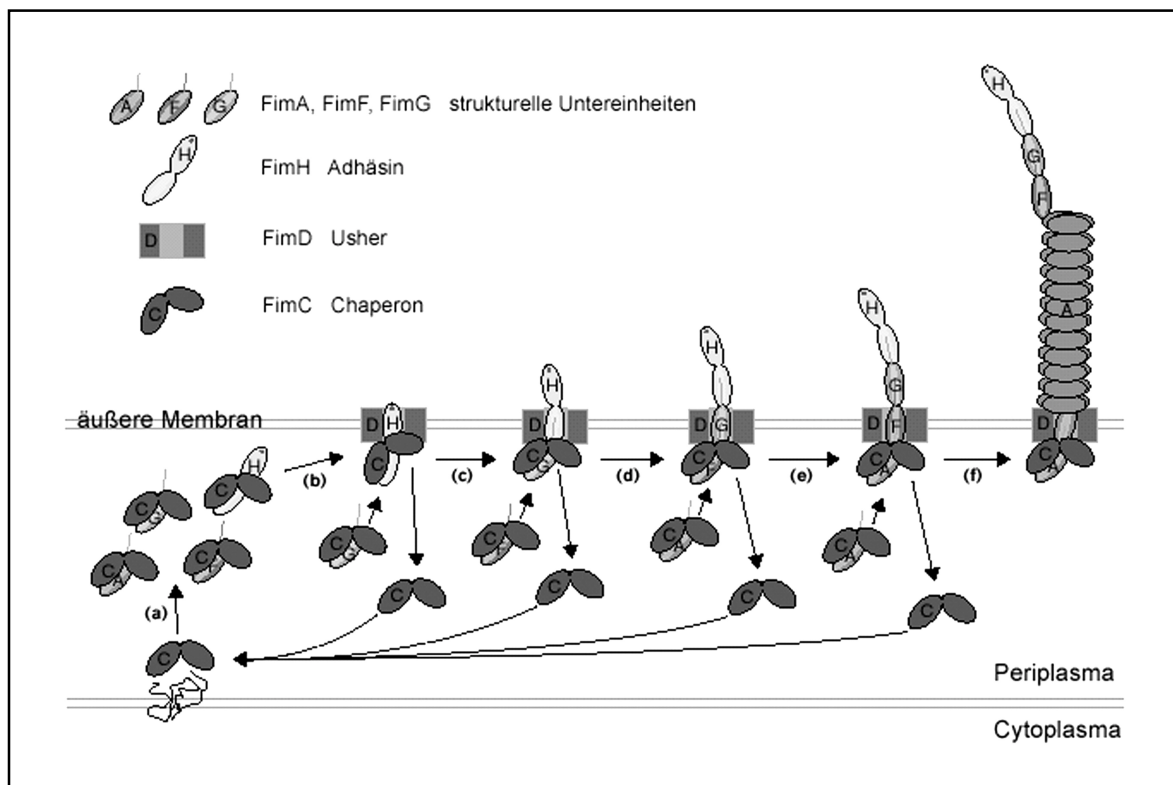


Abb. 2 Darstellung der Biogenese von Typ 1 Fimbrien aus *Escherichia coli* über den Chaperon-Usher-Pathway. Das Chaperon FimC schützt die Untereinheiten FimA, FimF, FimG und FimH vor dem Abbau im Periplasma sowie vor verfrühter Aggregation und transportiert sie zum porenbildenden Membranprotein FimD (Usher). Dort werden die Fimbrienuntereinheiten nach außen sekretiert und an der Oberfläche der Bakterienzelle zum Pilus zusammengebaut (modifiziert nach Knight *et al.*, 2000).

Typ 1 Fimbrien gehören zu den Fimbrien, die über ein Zwei-Komponenten-System, den sogenannten Chaperon-Usher-Pathway, zusammengebaut werden (Abb. 2). Dieser stellt die mechanistische Basis bei der Biogenese von über 30 verschiedenen fimbriellen und nicht-fimbriellen Oberflächenorganellen dar, die im allgemeinen Adhäsine enthalten, die spezifisch an die Zuckerreste der Wirtszellrezeptoren binden können. Für diese Art des Zusammenbaus von Adhäsinen sind zwei Proteine von entscheidender Bedeutung: das periplasmatische Chaperon FimC und das porenbildende äußere Membranprotein (Usher) FimD (Hung und Hultgren, 1998; Hung *et al.*, 1996; Sauer *et al.*, 2000; Soto und Hultgren, 1999; Thanassi *et al.*, 1998a). Die Fimbrienuntereinheiten FimA, FimF, FimG und FimH gelangen über das Sec-Exportsystem ins Periplasma der Bakterienzelle. Dort wird durch die Interaktion mit dem Chaperon FimC zunächst die Freisetzung der Untereinheit von der Cytoplasma-Membran und die Faltung der Untereinheit eingeleitet, was in einem stabilen und löslichen Chaperon-Untereinheit-Komplex resultiert (Barnhart *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 1993; Klemm, 1992; Sauer *et al.*, 1999; Soto *et al.*, 1998). In Abwesenheit des Chaperons werden die verschiedenen Fimbrienuntereinheiten im Periplasma degradiert. Zudem besetzt das Chaperon die interaktive Domäne der Untereinheit, die als Akzeptor für die Verbindung zu einer weiteren Proteinuntereinheit fungiert, und verhindert dadurch eine vorzeitige Untereinheit-Untereinheit-Wechselwirkung bzw. -Aggregation im Periplasma (Bullitt *et al.*, 1996; Kuehn *et al.*, 1994). Alle Chaperon-Untereinheit-Komplexe besitzen spezifische Targetbereiche für die Bindung an den Usher FimD, der eine oligomere Pore mit einem Durchmesser von 2-3 nm in der äußeren Membran bildet, durch welche die Fimbrienuntereinheiten sekretiert und anschließend auf dem Usher an der Zelloberfläche zusammengebaut werden (Dodson *et al.*, 1993; Klemm und Christiansen, 1990; Thanassi *et al.*, 1998b). Am schnellsten und stärksten kann der Chaperon-Adhäsine-Komplex an einen freien Usher binden, weshalb angenommen wird, dass durch diese Interaktion der Zusammenbau des Pilus initiiert wird. Die Bildung dieser ternären Zwischenstufe, bestehend aus Chaperon, Adhäsine und Usher, bewirkt Veränderungen in der Konformation des Ushers, die während des nachfolgenden Aufbaus des Pilus beibehalten wird (Saulino *et al.*, 1998). Außerdem wird durch die Wechselwirkung mit dem Usher die Dissoziation des Chaperons von der Untereinheit eingeleitet, wodurch das Akzeptor-Epitop der Fimbrienuntereinheit wieder verfügbar ist, so dass sie in den „wachsenden“ Pilus eingebaut werden kann. Das Chaperon verbleibt im Periplasma und ist kein Bestandteil des fertigen Pilus, der durch den Usher als lineare Kette nach außen gelangt und erst an der Oberfläche der Bakterien seine endgültige quartäre Struktur einnimmt (Saulino *et al.*, 2000).

Die mannose-sensitive Hämagglutination von Typ 1 Fimbrien gibt Hinweise darauf, dass Glykoproteine mit N-gebundenen Oligomannose-Ketten (z.B. Uroplakine, CD48), die reichlich auf der Oberfläche von menschlichen und tierischen Schleimhäuten (Mucosa) vorhanden sind, als Wirtsrezeptoren *in vivo* in Frage kommen (Malaviya *et al.*, 1999; Mulvey *et al.*, 1998). FimH vermittelt aber nicht nur die Anheftung von Bakterien an Blasen-, Nieren- und Wangenepithelzellen, sondern auch an Erythrozyten, Neutrophile, Mastzellen und Makrophagen (Malaviya *et al.*, 1996; Mulvey *et al.*, 1998; Ofek *et al.*, 1977; Pak *et al.*, 2001; Tewari *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 2001). Durch die über FimH vermittelte Adhäsion an Makrophagen und in Abwesenheit von Antikörpern umgehen die Mikroorganismen die normalen Abtötungsmechanismen (Phagozytose, Pinozytose) von Makrophagen und sind dadurch in der Lage, intrazellulär für mindestens 24 Stunden zu überleben (Baorto *et al.*, 1997).

Weiterhin wurden ein 60 kDa Protein aus dem menschlichen Speichel und ein 65 kDa Protein, das von Meerschweinchen-Erythrozyten präsentiert wird, als Rezeptoren von Typ 1 Fimbrien identifiziert (Giampapa *et al.*, 1988). Auch Laminin, Kollagen und Fibronectin (Glykoproteine aus der extrazellulären Matrix der Basalmembran) sind als Bindungspartner von FimH *in vitro* bekannt. Obwohl Kollagen keine terminalen Mannose-Reste besitzt, kann die Bindung von FimH mit Mannose inhibiert werden (Kukkonen *et al.*, 1993; Pouttu *et al.*, 1999).

Darüber hinaus wurde von einer nicht über Kohlenhydrat-Reste vermittelten Bindung von FimH an die Protease Plasminogen berichtet. Plasminogen spielt u.a. bei der Degradierung von Proteinen der extrazellulären Matrix eine wichtige Rolle. Die proteolytische Aktivität wird dabei über Wechselwirkungen mit Lysin-Bindestellen aktiviert, an die wahrscheinlich auch Typ 1 Fimbrien adhäreren können (Parkkinen und Korhonen, 1989). Ein weiteres Beispiel für solch eine reine Protein-Protein-Interaktion ist die Mannose-sensitive Bindung von Typ 1 Fimbrien des *E. coli* Stamms CSH-50 an immobilisiertes Fibronectin (Sokurenko *et al.*, 1992). Außerdem ist bekannt, dass bei der Biofilmbildung in einem Modellsystem Typ 1 Fimbrien für das erstmalige Anheften der Bakterien an eine Oberfläche benötigt werden (Pratt und Kolter, 1998).

Die Gene aller Proteine, die für den Aufbau eines Typ 1 Pilus benötigt werden, sind in einem Gencluster angeordnet. Beim Vergleich der Typ 1 Fimbrien Gencluster der Spezies *Escherichia coli* (Hull *et al.*, 1981; Klemm und Krogfelt, 1994; Krogfelt, 1991) und *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*Salmonella typhimurium*)* (Clegg *et al.*, 1996; Clegg *et al.*, 1987; Purcell *et al.*, 1987; Rossolini *et al.*, 1993) ergeben sich

* in dieser Arbeit wird die Bezeichnung *Salmonella typhimurium* verwendet

deutliche Unterschiede in der Anordnung, Anzahl und Art der vorhandenen Gene (Abb. 3). Auch die Zusammensetzung des Fibrillums ist nicht einheitlich. Im Gegensatz zur Fimbrienspitze von *S. typhimurium*, die vom Adaptorprotein FimF und dem Adhäsın FimH gebildet wird, enthält die Spitze von *E. coli* Typ 1 Fimbrien zusätzlich die Nebenuntereinheit FimG (Hull *et al.*, 1981; Jones *et al.*, 1995b; Saulino *et al.*, 2000).

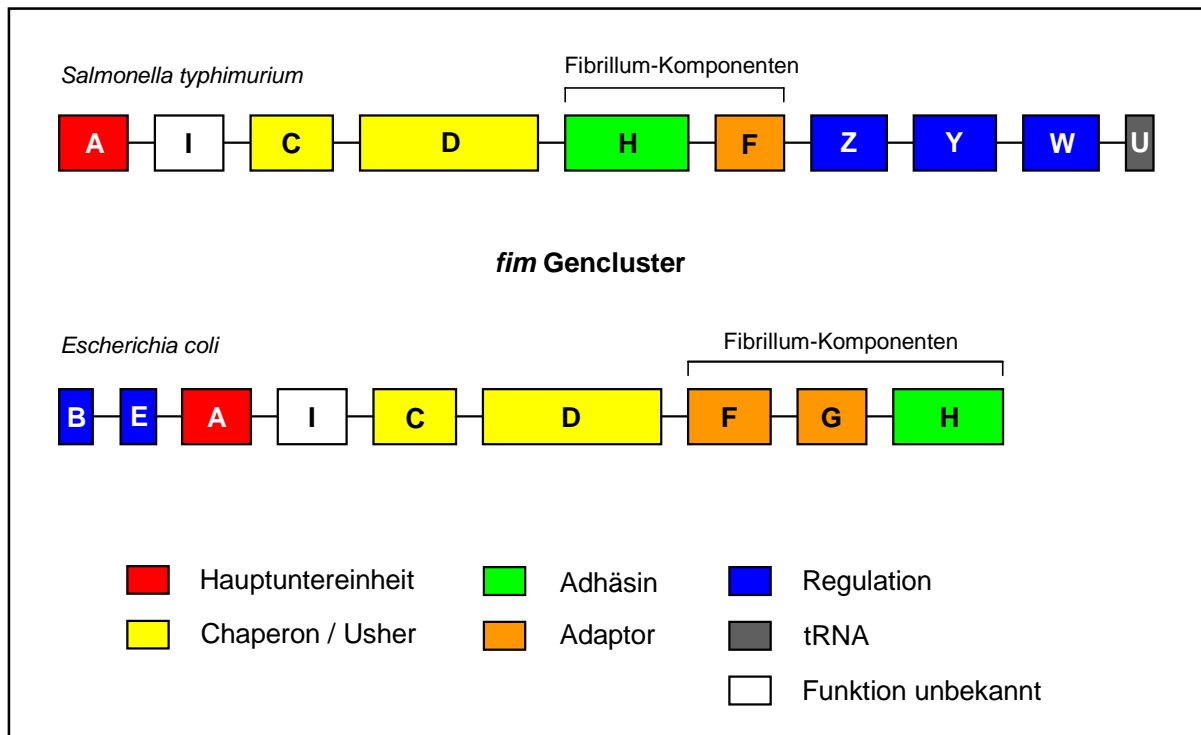


Abb. 3 Aufbau und Organisation der Typ 1 Fimbrien Gencluster (*fim*) von *Salmonella typhimurium* und *Escherichia coli*. Während der Teil des Genclusters, der Strukturproteine (*fimA*, *fimF*, *fimG*, *fimH*) und Produkte für den Transport und Zusammenbau (*fimC*, *fimD*) kodiert, gute Übereinstimmungen zeigt, sind die regulatorischen Gene im *E. coli* Operon vor und im *S. typhimurium* Operon dagegen stromabwärts dieser Region positioniert.

Der entscheidende Unterschied zwischen den beiden *fim* Genclustern besteht in der Regulation des Operons. Bei *E. coli* werden alle Gene in dieselbe Richtung transkribiert. Die Phasenvariation, bei der die Expression von Genen auf bestimmte Umweltsignale hin an- bzw. abgeschaltet werden kann, erfolgt über ein 314 bp langes invertierbares DNA-Fragment, auf dem der Promotor von *fimA* lokalisiert ist. Dazu werden die beiden „Site“-spezifischen Rekombinasen FimB und FimE und auch die Gegenwart des DNA bindenden Proteins IHF (integration host factor), das nicht im *fim* Gencluster kodiert wird, benötigt (Abraham *et al.*, 1985; Dorman und Higgins, 1987; Eisenstein *et al.*, 1987;

Klemm, 1986; McClain *et al.*, 1991; Pallesen *et al.*, 1989). Bei *S. typhimurium* sind an der Regulation der Fimbrienexpression die Gene *fimW*, *fimY* und *fimZ* und wahrscheinlich auch das für eine tRNA kodierende *fimU* beteiligt (Boyd und Hartl, 1999; Clegg und Hughes, 2002; Swenson *et al.*, 1994; Tinker und Clegg, 2000; Tinker und Clegg, 2001; Tinker *et al.*, 2001; Yeh *et al.*, 1995).

Die klonierte und sequenzierte Invasionsdeterminante von *Citrobacter freundii* Stamm 3009 weist eine hohe Identitätsrate zum *fim* Gencluster von *Salmonella typhimurium* auf (Daryab, 1997; Hess *et al.*, 2000). Der auffälligste Unterschied besteht in der Insertion eines IS10 Elements zwischen den Genen *fimZ* und *fimY* in der Invasionsdeterminanten von *C. freundii*. Aufgrund dieser Übereinstimmung wird angenommen, dass es sich bei dieser Invasionsdeterminante ebenfalls um ein Typ 1 Fimbrien kodierendes Gencluster handeln könnte.

2.3 Invasionsmechanismen von fakultativ intrazellulären Bakterien

Vielfältige Untersuchungen haben gezeigt, dass die Anheftung von Mikroorganismen an Zellen des Wirts (Adhäsion), das aktive Eindringen in Wirtszellen (Invasion) und die Fähigkeit, in den Wirtszellen zu überleben und sich dort vermehren zu können, entscheidende Schritte in der Pathogenese von bakteriellen Infektionen sind. Das Erreichen von tieferen Gewebeschichten des Wirts stellt für eine Vielzahl von mikrobiellen Krankheitserregern einen wichtigen Schritt im Infektionsprozess dar. Dadurch sind invasive Erreger in der Lage, sich in schützenden Nischen im Körper festzusetzen, womit sie zum einen der Wirtsabwehr entgehen und sich zum anderen sogar der Wirkung von verschiedenen Antibiotika entziehen können (Donnenberg, 2000; Falkow, 1991; Finlay und Falkow, 1988; Oelschlaeger, 1994).

Durch Adhäsion von Bakterien an die Zytoplasmamembran werden in den Wirtszellen in der Regel Signaltransduktionskaskaden sowie Umlagerungen des Wirtszytoskeletts ausgelöst. Mit diesem als „microbial directed endocytosis“ bezeichneten Vorgang induzieren fakultativ intrazelluläre Bakterien ihre eigene Aufnahme in nicht-professionelle Phagozyten (z.B. Epithelzellen). Nach der Internalisierung befinden sich die Mikroorganismen in einer Vakuole, in der sie entweder replizieren bzw. persistieren (Legionellen, Salmonellen und Mycobakterien) oder aus der sie nach der Lyse des Endosoms entweichen (Listerien, Shigellen und Rickettsien) und mittels eines Aktinschweifes ins Zytoplasma benachbarter Epithelzellen eindringen, um sich dort rasch zu vermehren (Bliska *et al.*, 1993a; Gaillard *et al.*, 1987; Garcia-del Portillo und Finlay, 1994; Goebel und Gross, 2001; Moulder, 1985; Rosenshine und Finlay, 1993; Sansonetti *et al.*, 1986; Steele-Mortimer *et al.*, 2000; Vazquez-Torres und Fang, 2000).

Um ihre Aufnahme in Wirtszellen zu induzieren, haben invasive Bakterien zwei unterschiedliche Mechanismen entwickelt (Finlay und Cossart, 1997; Marra und Isberg, 1996; Swanson und Baer, 1995). Beim sogenannten „Trigger“- (Auslöse-) Mechanismus kann eine gewisse räumliche Distanz zwischen Bakterium und Zielzelle vorhanden sein. Normalerweise bewirken über Typ III Sekretionssysteme in die Wirtszelle injizierte Signalmoleküle eine massive Veränderung des Zytoskeletts der Wirtszelle. An den Kontaktstellen kommt es zur Aktinpolymerisation und zum Kräuseln der Wirtszellmembran (membrane ruffling). Parallel liegende und durch Plastin querverbundene Aktinfilamente bilden um das Bakterium aufsteigende Zellausläufer und es entstehen Membranfalten sowie Pseudopodien. Die Vereinigung der Zellausläufer über dem Erreger führt zu dessen Makropinozytose-ähnlicher Internalisierung. In der Regel werden mehrere Bakterien in eine eukaryontische Zelle aufgenommen. Die bekanntesten Vertreter dieser Invasionsstrategie sind *Shigella*, *Salmonella* und enteroinvasive *E. coli* (Adam *et al.*, 1995; Amyere *et al.*, 2002; Boudeau *et al.*, 1999; Dramsi und Cossart, 1998; Finlay *et al.*, 1991; Finlay und Falkow, 1989; Groisman und Ochman, 1993; Menard *et al.*, 1996; Rosqvist *et al.*, 1995; Small *et al.*, 1987).

Die Internalisierung von *Yersinia* und *Listeria* in nicht-phagozytierende Zellen erfolgt über den „Zipper“- (Reißverschluss-) Mechanismus. Im Gegensatz zum „Trigger“- Mechanismus besteht hier ein enger Kontakt zwischen Bakterium und Zytoplasmamembran der Zielzelle. Durch die Wechselwirkung der bakteriellen Liganden mit den entsprechenden Wirtszellrezeptoren werden wie beim „Trigger“- Mechanismus Signaltransduktionsvorgänge in der eukaryontischen Zelle ausgelöst. Den reißverschlussartigen Interaktionen zwischen Zellrezeptoren und bakteriellen Liganden folgt dann eine sukzessive Umzirkelung des bakteriellen Organismus durch die Zytoplasmamembran der Wirtszelle. Auf diesem Weg wird meist nur ein Bakterium in die Wirtszelle aufgenommen (Finlay und Falkow, 1997; Isberg, 1991; Mengaud *et al.*, 1996; Vazquez-Boland *et al.*, 2001).

Die Gram-negativen human pathogenen Spezies *Salmonella*, *Shigella* und *Yersinia* sowie die Gram-positiven Stäbchenbakterien *Listeria* sind Gegenstand intensiver Untersuchungen zur Interaktion von mikrobiellen Effektoren mit korrespondierenden Wirtszellkomponenten. Daraus hat sich inzwischen das neue Forschungsgebiet der „zellulären Mikrobiologie“ entwickelt. Beim Menschen stellt der untere Dünndarm (Ileum), dessen Wand typische Lymphfollikel enthält, die bevorzugte Eintrittspforte für diese Erreger dar, die dort u.a. über als M-Zellen (microfold cells) bezeichnete membranöse Epithelzellen in die als Peyer-Plaques (PP) bekannten Lymphfollikel invadieren (Jepson und Clark, 1998; Jones *et al.*, 1995a; Neutra *et al.*, 1999; Sansonetti und Phalipon, 1999; Siebers und Finlay, 1996; Vazquez-Torres und Fang, 2000).

Im folgenden werden die unterschiedlichen erregerspezifischen Invasionsmechanismen kurz beschrieben.

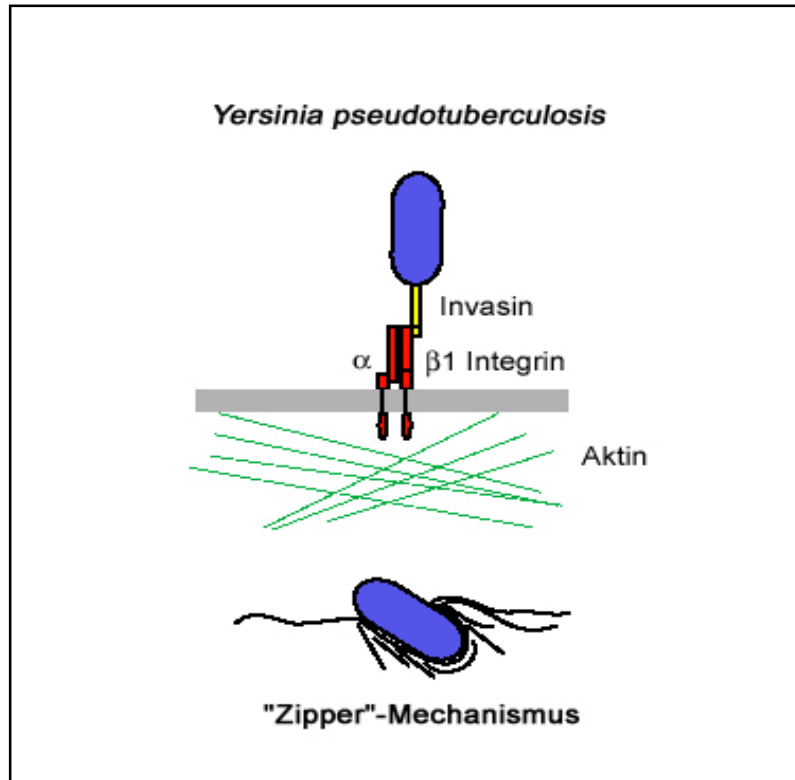


Abb. 4 Invasionsmechanismus von *Yersinia pseudotuberculosis* (modifiziert nach Finlay und Cossart, 1997).

Für *Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pseudotuberculosis* wurde ein als Invasin bezeichnetes Oberflächen-assoziiertes Protein identifiziert, das durch die Bindung an einen Rezeptor die nach dem „Zipper“-Mechanismus erfolgende Aufnahme des Erregers in nicht-phagozytierende Zellen induziert (Abb. 4). Der Interaktion des chromosomal kodierten Invasins (*inv* Gen) mit der $\beta 1$ Integrin-Untereinheit des Invasinrezeptors von beispielsweise M-Zellen folgt die Transzytose der Yersinien durch die Mucosa und deren Vermehrung in den darunter gelegenen Mesenteriallymphknoten (Peyer-Plaques) (Falkow *et al.*, 1992; Isberg *et al.*, 1987; Isberg und Falkow, 1985; Miller und Falkow, 1988; Pepe und Miller, 1993). Da sich die Transmembranintegrine von eukaryontischen Zellen aus α und β Untereinheiten zusammensetzen, werden durch die Invasin- $\beta 1$ -Integrin-Wechselwirkung nicht nur Signaltransduktionskaskaden ausgelöst, sondern auch mittels Aktin-Bindeproteinen (z.B. Paxillin, Vinculin, Talin und α -Aktinin) die Aktinfasern mit Transmembranproteinen verknüpft und die Bildung von

Pseudopodien induziert (Isberg *et al.*, 2000; Isberg und Leong, 1990). Die Aufnahme von mit Invasin überzogenen Partikeln in Wirtszellen verdeutlicht die Effektivität der durch Invasin vermittelten Invasionsfähigkeit (Rankin *et al.*, 1992; Young *et al.*, 1990). Auch YadA (*Yersinia* adherence protein), ein zunächst eigentlich als Adhäsion charakterisiertes, auf dem Virulenzplasmid von *Yersinia* kodiertes Protein, vermittelt die Invasion in humane Zelllinien. Das oligomere „lollipopförmige“ YadA ist auf der gesamten Oberfläche der Bakterienzellen vorhanden und bindet an β 1 Integrin, Kollagen, Laminin und Fibronectin (Bliska *et al.*, 1993b; El Tahir und Skurnik, 2001; Emödy *et al.*, 1989; Isberg und Leong, 1990; Schulze-Koops *et al.*, 1992; Skurnik und Wolf-Watz, 1989; Tamm *et al.*, 1993). *Yersinia* spp. invadieren M-Zellen und kultivierte Epithelzelllinien, z.B. CHO, MDCK, HeLa, HEp-2 und Henle (Clark *et al.*, 1998; Grützkau *et al.*, 1990; Isberg *et al.*, 1987; Miller und Falkow, 1988; Young *et al.*, 1992), und können zudem durch die Sekretion von Yops (*Yersinia* outer proteins) ihre Phagozytose durch Makrophagen verhindern (Cornelis, 2000; Fällman *et al.*, 2002; Rosqvist *et al.*, 1988).

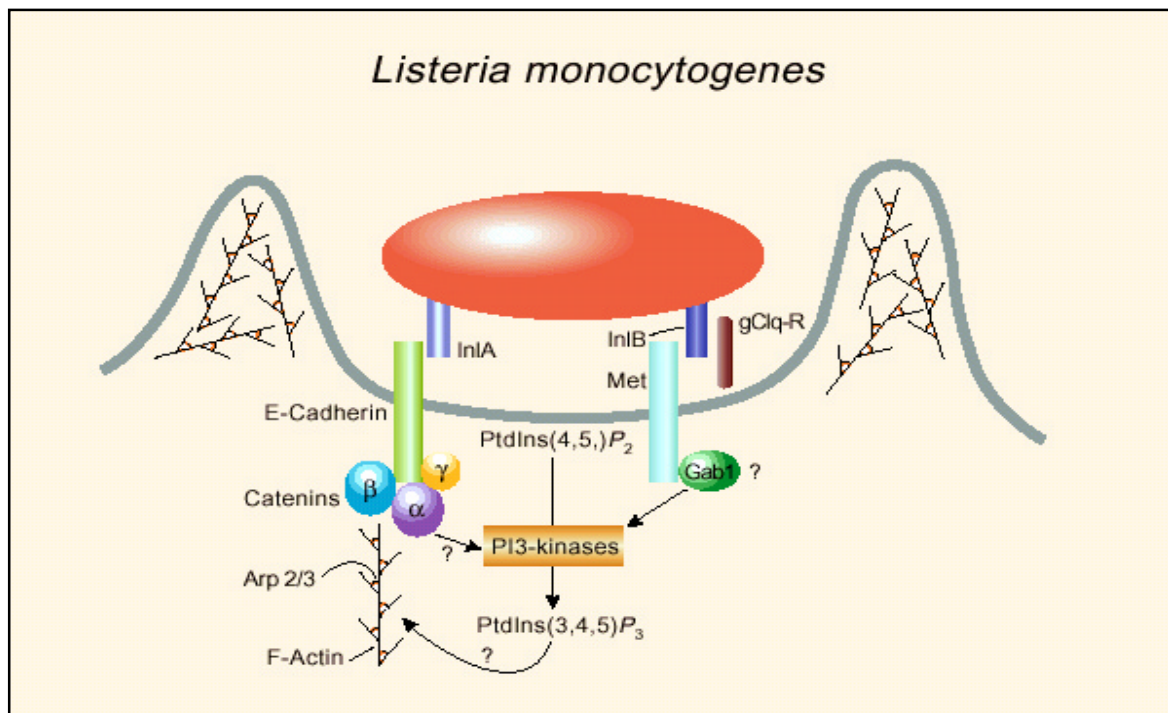


Abb. 5 Aufnahmemechanismus von Gram-positiven *Listeria monocytogenes* (Greenberg, 2001).

Ebenfalls über den „Zipper“-Mechanismus wird die Phagozytose-ähnliche Aufnahme von *Listeria monocytogenes* mittels verschiedener Internaline induziert. Dem zu *Yersinia* identischen Invasionsmechanismus schließen sich dann allerdings

unterschiedliche Signalkaskadewege in der Zielzelle an (Abb. 5). Es wurde nachgewiesen, dass von InIA bzw. InIB eine Internalisierung in unterschiedliche nicht-phagozytierende Zelllinien vermittelt wird, die unabhängig voneinander erfolgt (Dramsi *et al.*, 1995; Gaillard *et al.*, 1991; Gaillard und Finlay, 1996; Greiffenberg *et al.*, 1998; Kolb-Mäurer *et al.*, 2000; Lingnau *et al.*, 1995). Von den bakteriellen Adhäsinen InIA und InIB werden jeweils Rezeptoren der Wirtszellen benutzt, die normalerweise andere Funktionen haben. So bindet InIA an das Zell-Zell-Adhäsionsmolekül E-Cadherin (Gaillard *et al.*, 1991), das vorwiegend auf der basolateralen Seite von Enterozyten exprimiert wird (Cepek *et al.*, 1994; Mengaud *et al.*, 1996). InIB interagiert mit der Tyrosinkinase Met, die als Ligand für den Hepatozyten-Wachstumsfaktor HGF in Wachstums- und Differenzierungsprozesse involviert ist (Braun *et al.*, 1997; Shen *et al.*, 2000), sowie mit dem Protein gC1q-R, einem Rezeptor für den Komplementfaktor C1q (Braun *et al.*, 2000). In Invasionsstudien mit Latexkügelchen, die mit den gereinigten Proteinen InIA und InIB beschichtet wurden, konnte deren Invasions-vermittelnde Eigenschaft bestätigt werden (Braun *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 1998). Durch Kontakte zwischen den Internalinen und den entsprechenden Wirtszellrezeptoren wird die Aktivierung von Phosphatidylinositolkinase (PI3) ausgelöst, die an der Kontrolle des Aktinzytoskeletts beteiligt ist (Ireton *et al.*, 1999). Das charakteristische gemeinsame Element aller Internaline sind LRR (leucine rich repeats), die essentiell für eine erfolgreiche Invasion sind (Lecuit *et al.*, 1997). Listerien replizieren im Zytoplasma der Wirtszellen und können sich ebenso wie Shigellen mit Hilfe eines Aktinschweifs, dessen Bildung von ActA induziert wird, von Zelle zu Zelle ausbreiten (Kreft und Vazquez-Boland, 2001; Kuhn und Goebel, 1995; Sansonetti *et al.*, 1994; Sheehan *et al.*, 1994; Vazquez-Boland *et al.*, 2001).

Der Internalisierungsprozess von *Shigella flexneri* stellt ein Beispiel für den sogenannten „Trigger“-Mechanismus dar (Abb. 6). Es handelt sich hierbei um einen komplexen Eintrittsmechanismus, bei dem auf bakterieller Seite mehr als 30 Gene und auf eukaryontischer Seite massive Umlagerungen des Zytoskeletts beteiligt sind (Van Nhieu und Sansonetti, 1999). Die für die Induktion der Aufnahme von *Shigella* notwendigen Gene, z.B. *ipa* (invasion plasmid antigens; Invasionsdeterminante), *ics* (intracellular spreading; intrazelluläre Ausbreitung) und *mxi-spa* (membrane expression of antigens, secretion of protein antigens; Typ III Sekretionsapparat) liegen innerhalb eines 31 kb großen Fragments auf einem ungefähr 220 kb großen Virulenzplasmid, das bei allen virulenten Shigellen vorkommt. Über das Typ III Sekretionssystem Mxi-Spa werden Effektoren, wie z.B. Zytoskelettveränderungen verursachende Proteine oder Aktivatoren von GTPasen der Rho-Familie (Cdc42, Rac, Rho), die für die Regulation des Aktinzytoskeletts verantwortlich sind, direkt ins Zytoplasma der Wirtszellen injiziert (Menard *et al.*, 1996). Das Genprodukt von *ipgC* wirkt als Chaperon für die Proteine IpaB und IpaC, die so in einer stabilen und löslichen Form im Zytoplasma der

Bakterienzellen vorliegen und schnell in aktiver Form sezerniert werden können. Die Sekretion der für die Aufnahme wichtigen Ipa Proteine wird durch den Kontakt mit Epithelzellen stimuliert, wobei Shigellen im Gegensatz zu anderen fakultativ intrazellulären Bakterien nur sehr schwach an die Zielzellen adhären (Menard *et al.*, 1996). Die Bindung des IpaB/C-Komplexes an einen Rezeptor (möglicherweise $\alpha_5\beta_1$ -Integrin und Hyaluronsäurerezeptor CD44) führt einerseits zu einer primären Aktinpolymerisation an der Kontaktstelle und induziert andererseits die Sekretion der weiteren Effektoren, z.B. IpaA und IpaD. IpaA bindet Vinculin, ein Protein des fokalen Adhäsionskomplexes, und sorgt somit aufgrund einer besseren Bindung der Bakterien und der Restrukturierung des Aktinzytoskeletts für eine effiziente Internalisierung.

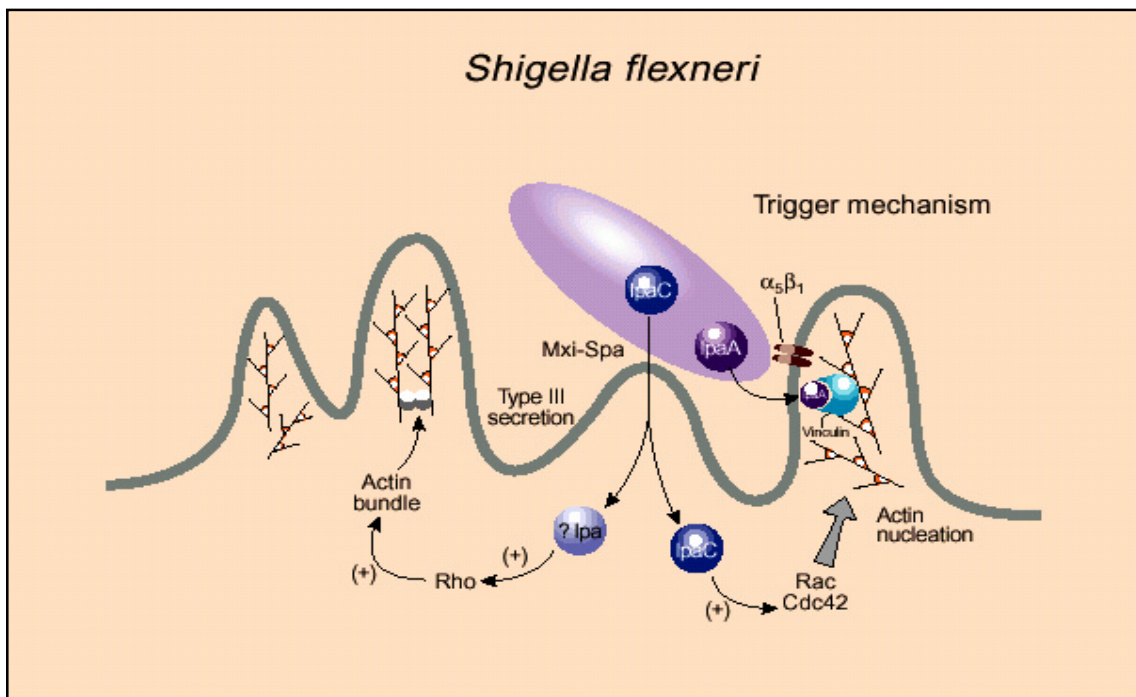


Abb. 6 Invasionsmechanismus von *Shigella flexneri* (Greenberg, 2001).

Die Umhüllung der Shigellen durch die Wirtszelle (membrane ruffling) erfolgt unter Bildung von Lammellipodien und Mikrospekes und wird deshalb auch als Makropinozytose-ähnlicher Mechanismus bezeichnet. An der den Umbau des Zytoskeletts bewirkenden Signaltransduktion innerhalb der Wirtszelle sind wahrscheinlich die GTPase Rho und die Protein-Tyrosin-Kinase pp60^{c-src} beteiligt (Van Nhieu *et al.*, 1999). Finlay und Falkow zeigten, dass in Gegenwart von Tyrosin-Kinase-Inhibitoren, die die Signaltransduktion der Wirtszelle blockieren, die Bakterien zwar an

die Zielzelle adhären, deren Internalisierung jedoch verhindert wird (Finlay und Falkow, 1997). Der genaue Mechanismus, wie die Aufnahme in die Wirtszellen durch die Sekretion der Proteine IpaA, IpaB, IpaC und IpaD induziert wird, ist noch nicht aufgeklärt.

Wie *Listeria* können sich auch Shigellen unter Ausbildung eines Aktinschweifs innerhalb der Wirtszelle bewegen und angrenzende Zellen infizieren (Goldberg, 2001). Nach Auflösung der Phagosom-Membran, woran IpaB und IpaC beteiligt sind, vermehren sich die Shigellen im Zytoplasma und induzieren an einem Pol ihrer Zellwand die Polymerisation des Aktins der Wirtszelle zur Bildung eines Aktinschweifs.

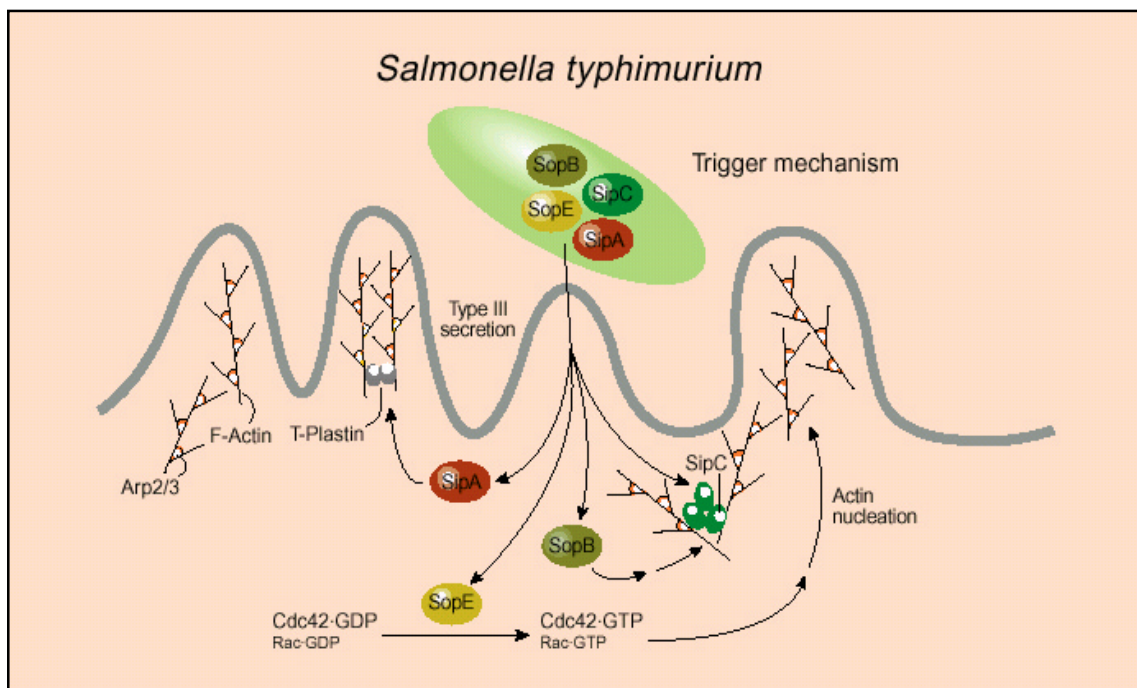


Abb. 7 Aufnahmemechanismus von *Salmonella typhimurium* (Greenberg, 2001).

Salmonella typhimurium ist wie *Shigella* ein Vertreter derjenigen Invasionsstrategie, bei der es durch sezernierte Proteine zu einem massiven Umbau des Zytoskeletts der Wirtszelle kommt (Hueck *et al.*, 1995; Menard *et al.*, 1996). Es wurde von einigen Gruppen festgestellt, dass eine sehr große Ähnlichkeit zwischen den am Invasionssystem beteiligten Komponenten des Typ III Sekretionssystems von *Shigella* und *Salmonella* vorliegt und sich diese sogar gegenseitig komplementieren können (Ginocchio und Galan, 1995; Hermant *et al.*, 1995; Kaniga *et al.*, 1995a; Kaniga *et al.*, 1995b; Rosqvist *et al.*, 1995). Die Grundlage zur Invasion von *Salmonella* in nicht-

phagozytierende Zellen (Abb. 7) bilden mehr als 30 verschiedene chromosomale Gene, von denen der Großteil auf der ungefähr 40 kb umfassenden Pathogenitätsinsel SPI1 (*Salmonella* pathogenicity island 1) lokalisiert ist. SPI1 kodiert zahlreiche Virulenzfaktoren, u.a ein Typ III Sekretionssystem (Inv, Spa, Prg, OrgA) und die von diesem in das Zytoplasma der Zielzelle translozierten Moduline und Regulatoren (Collazo und Galan, 1997; Galan, 1996; Kaniga *et al.*, 1995b). SipA ist an der Reorganisation des Aktinzytoskeletts beteiligt, indem es F-Aktin bindet bzw. stabilisiert und Plastein aktiviert (Jepson *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 1999). Auch die Tyrosin-Phosphatase SptP wirkt bei der Internalisierung der Bakterien mit, indem sie vermutlich die Spaltung von Aktinfilamenten induziert und so eine Umstrukturierung des Zytoskeletts erleichtert (Kaniga *et al.*, 1996). Darüber hinaus werden über den Typ III Sekretionsweg, der nach dem Kontakt der Salmonellen mit den Zielzellen aktiviert wird, auch Effektorproteine (SopB, SopE) sezerniert, deren Gene nicht auf der SPI1 lokalisiert sind. SopE, das wie ein GEF (GDP/GTP exchange factor) für die kleinen GTP-bindenden Proteine Cdc42, Rac und Rho wirkt, induziert Veränderungen in den zellulären Signaltransduktionswegen und stimuliert somit letztendlich ebenfalls Zytoskelettlagerungen (Galan und Zhou, 2000; Zhou und Galan, 2001). Neben diesem mit der Invasion assoziierten Sekretionssystem existiert in *Salmonella*, mit Ausnahme von *S. bongori*, interessanterweise ein weiteres Typ III Sekretionssystem, das auf der SPI2 lokalisiert ist und für das intrazelluläre Überleben von *Salmonella* in Makrophagen benötigt wird (Cirillo *et al.*, 1998; Hensel *et al.*, 1998).

Die Aufnahme von *Salmonella* in Wirtszellen ist ein sehr schneller Vorgang (wenige Minuten) und erfolgt nach dem „Trigger“-Mechanismus (Finlay und Cossart, 1997). Sobald Kontakt zur Epithelzelle besteht, wird durch *Salmonella* die Degeneration der Mikrovilli der Wirtszelle ausgelöst und es kommt zu einer starken, auf die Kontaktstelle lokal begrenzten Oberflächenveränderung (membrane ruffling). Anschließend werden die Bakterien über die Bildung von Lamellopodien in einem Makropinozytose-ähnlichen Prozess internalisiert (Finlay und Falkow, 1989). Der Invasionsvorgang ist abgeschlossen, wenn sich die Salmonellen in von einer Membran umgebenen Vesikeln befinden und sich die durch Zytoskelettlagerungen auf der Zelloberfläche gebildeten trichterförmigen Ausstülpungen wieder zurückgebildet haben (Finlay *et al.*, 1991; Francis *et al.*, 1993; Garcia del Portillo und Finlay, 1994; Ginocchio *et al.*, 1994). *Salmonella typhimurium* invadiert *in vitro* verschiedene Epithelzelllinien, wie HeLa, MDCK, Caco-2 oder T84 (Finlay und Falkow, 1990; Finlay *et al.*, 1988; Giannella *et al.*, 1973; McCormick *et al.*, 1993).

Für enteropathogene *E. coli* (EPEC) ist eine sehr interessante Wechselwirkung zwischen Bakterien und Wirtszellen beschrieben worden. Der bakterielle Ligand Intimin (EaeA) bindet nicht an einen Wirtszellrezeptor, sondern an das zuvor über den Typ III

Sekretionsweg in die Zielzelle exportierte und in die Wirtszellmembran eingelagerte bakterielle Protein Tir (translocated intimin receptor) (Kenny *et al.*, 1997).

Zunächst wird durch die Anheftung der EPEC an Epithelzellen der Darmwand mittels Typ IV Fimbrien, die auch als Bfp (bundle forming pili) bezeichnet werden, ein erster Kontakt zwischen Bakterien und Wirtszellen hergestellt (Giron *et al.*, 1991; Hicks *et al.*, 1998). Anschließend werden alle für die Bildung von „attachment and effacing (A/E) lesions“ benötigten Proteine (Esp, Eae, Tir) über ein Typ III Sekretionssystem in die Zielzelle transportiert, wodurch Signaltransduktionskaskaden, beispielsweise Tyrosinphosphorylierungen verschiedener Proteine, ausgelöst werden (Jerse *et al.*, 1990; Kenny und Finlay, 1995; Moon *et al.*, 1983; Wolff *et al.*, 1998). Die entsprechenden Gene (*esp*: E. coli secreted protein; *esc*: E. coli secretion; *sep*: secretion of E. coli proteins; *eae*: E. coli ataching and effacing; *tir*: translocated intimin receptor) sind in einem Cluster auf einer ungefähr 35 kb großen Pathogenitätsinsel (LEE: locus of enterocyte effacement) lokalisiert (McDaniel *et al.*, 1995). Durch die Bindung von Intimin (EaeA) an den phosphorylierten Rezeptor Tir werden über die Aktivierung von WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) und des Arp2/3-Komplexes Aktinpolymerisationen induziert, die zur Ausbildung charakteristischer Podeste (bis zu 10 µm Länge) führen, auf denen die Bakterien lokalisiert sind (Donnenberg *et al.*, 1989; Rosenshine *et al.*, 1996).

2.4 Biologie und Pathogenität von *Citrobacter freundii*

Citrobacter freundii, vormals auch als „*Bacterium freundii*“, „*Escherichia freundii*“ bzw. „*Salmonella ballerup*“ bezeichnet (Sakazaki, 1984; Skerman *et al.*, 1980), ist ein Gramnegatives, bewegliches und stäbchenförmiges Bakterium und gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Erstmals beschrieben wurde *C. freundii* 1928 von Braak sowie 1932 von Werkman und Gillen (Jagnow *et al.*, 1977; Miki *et al.*, 1996; Skerman *et al.*, 1980) und erhielt seinen Namen aufgrund der besonderen Fähigkeit des Stoffwechsels, Citrat als alleinige Kohlenstoffquelle verwerten zu können. Das Vorkommen von *Citrobacter* spp. in der Natur ist weit verbreitet. So konnte *C. freundii* im Wasser, im Boden, in Fischen und Vögeln sowie in verschiedenen Säugetieren und auch in Nahrungsmitteln nachgewiesen werden (Sedlak, 1973).

Als harmloser Kommensal zählt *Citrobacter freundii* zur normalen intestinalen Flora von Menschen und Tieren, verursacht als opportunistisches Pathogen aber auch Durchfallerkrankungen, Wundinfektionen, Bakteriämie, Sepsis, Harnwegsinfektionen und nosokomiale Infektionen, z.B. Atemwegsinfektionen (Bruehl und Listernick, 1992; Emori und Gaynes, 1993; Fincher *et al.*, 1990; Graham *et al.*, 1981; Guarino *et al.*, 1987; Herrmann und Burman, 1985; Hodges *et al.*, 1978; Lipsky *et al.*, 1980; Samonis

et al., 1991). Außerdem ist bekannt, dass *Citrobacter* Stämme an der Entstehung von Pyomyositis, Gehirnabzessen und Neugeborenen-Meningitis mit hohen Mortalitätsraten beteiligt sind (Joaquin et al., 1991; Kline et al., 1988a; Kline et al., 1988b; Li et al., 1990; Rae et al., 1991; Tang et al., 1994).

Über die Pathogenitätsfaktoren von *Citrobacter freundii* ist bisher, im Gegensatz zu denen der häufiger als human pathogene Krankheitserreger auftretenden Mikroorganismen wie *Escherichia coli* oder *Salmonella* spp., nur wenig bekannt. *C. freundii* Isolate zeichnen sich oftmals durch Resistenzen gegen mehrere verschiedene Antibiotika aus, wobei ein Teil der entsprechenden Antibiotika-Resistenz-Gene (z.B. Tetrazyklin, Chloramphenicol und Streptomycin) auf durch Konjugation übertragbaren Plasmiden lokalisiert ist (Morzejko et al., 1989).

Außerdem wurde beobachtet, dass einige *Citrobacter* Serotypen das Vi (virulence) Antigen produzieren, ein Kapsel-Antigen, das auch bei *Salmonella typhi* Stämmen gefunden wurde (Alliluev et al., 1988; Houg et al., 1992; Ou et al., 1988). Die Ausbildung von Kapseln schützt die Mikroorganismen vor der Immunantwort des Wirts. Dabei kann die Kapsel als Barriere gegen die Opsonisierung durch Antikörper oder Komponenten des Komplementsystems wirken, sowie die Phagozytose durch Makrophagen und Neutrophile verhindern (Celli und Finlay, 2002; Ofek et al., 1995; van Oss, 1986). Darüber hinaus kann durch die Kapsel eine unspezifische Adhärenz an Wirtszellen vermittelt werden. Im allgemeinen sind pathogene Erreger, die Krankheiten wie Meningitis oder Sepsis auslösen können, häufig bekapselt.

In diesem Zusammenhang wurde von einem 32 kDa OMP (äußeres Membranprotein) von *Citrobacter diversus* berichtet, dessen Expression bisher nur bei Isolaten von an Meningitis erkrankten Kindern beobachtet wurde, und das virulenzassoziiert zu sein scheint (Li et al., 1990). Durch die Expression des äußeren Membranproteins OmpA und anderen Oberflächenantigenen sind Bakterien in der Lage, einen Angriff des Komplementsystems zu überstehen. Solche Stämme werden als serumresistent bezeichnet.

Bei einigen *Citrobacter* Isolaten, die von humanen oder Rindfleisch Proben stammten, wurde die Produktion eines dem Shiga-like-Toxin II (SLT-II) verwandten Cytotoxins beobachtet (Schmidt et al., 1993). Von an Durchfall erkrankten Patienten gewonnene *Citrobacter* Stämme sezernieren ein hitzestabiles Enterotoxin, das identisch zu ST1a von *E. coli* ist (Guarino et al., 1987; Guarino et al., 1989).

Es gibt außerdem Hinweise darauf, dass in einige *Citrobacter* Stämme Pathogenitätsinseln (PAI), die für verschiedenste Virulenzfaktoren kodieren, durch horizontalen Gentransfer übertragen wurden. So wurde im Chromosom von klinischen Isolaten von *Citrobacter* spp. und weiteren Enterobakterien die HPI (high pathogenicity island) von *Yersinia* nachgewiesen, auf der u.a. die Synthesegene für das Siderophor Yersiniabaktin (Ybt) lokalisiert sind (Khashe und Janda, 1996; Schubert et al., 2000). Siderophore werden zur Eisenaufnahme von den Bakterien sezerniert und

anschließend mit dem gebundenen Eisen über Rezeptoren der äußeren Membran wieder aufgenommen und ins Cytoplasma der Bakterienzellen transportiert. Eisenaufnahme und Eisentransportsysteme sind für das Überleben und die Vermehrung von Mikroben im Wirt von großer Wichtigkeit, da Eisen in zahlreichen, die Redoxreaktionen der Atmungskette katalysierenden, Enzymen (z.B. Eisen-Schwefel-Proteine, Cytochrome) enthalten ist und somit für essentielle Prozesse wie Sauerstoff- oder Elektronentransport benötigt wird (Braun, 2001; Guerinot, 1994; Wooldridge und Williams, 1993).

Des Weiteren wurde für *Citrobacter rodentium* (früher *Citrobacter freundii* Biotyp 4280) das Vorhandensein einer LEE Insel detektiert (Deng *et al.*, 2001; Luperchio und Schauer, 2001; Schauer und Falkow, 1993a). Auf dieser 35 kb großen Pathogenitätsinsel, die normalerweise in enteropathogenen *E. coli* (EPEC) und in enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) vorkommt, befinden sich u.a. die Gene *eaeA* (Intimin) und *espB*, deren Expression in *C. rodentium* beobachtet wurde (Frankel *et al.*, 1996; Newman *et al.*, 1999; Schauer und Falkow, 1993b). Die entsprechenden Genprodukte befähigen die Bakterien zu einer engen Haftung an Wirtszellen.

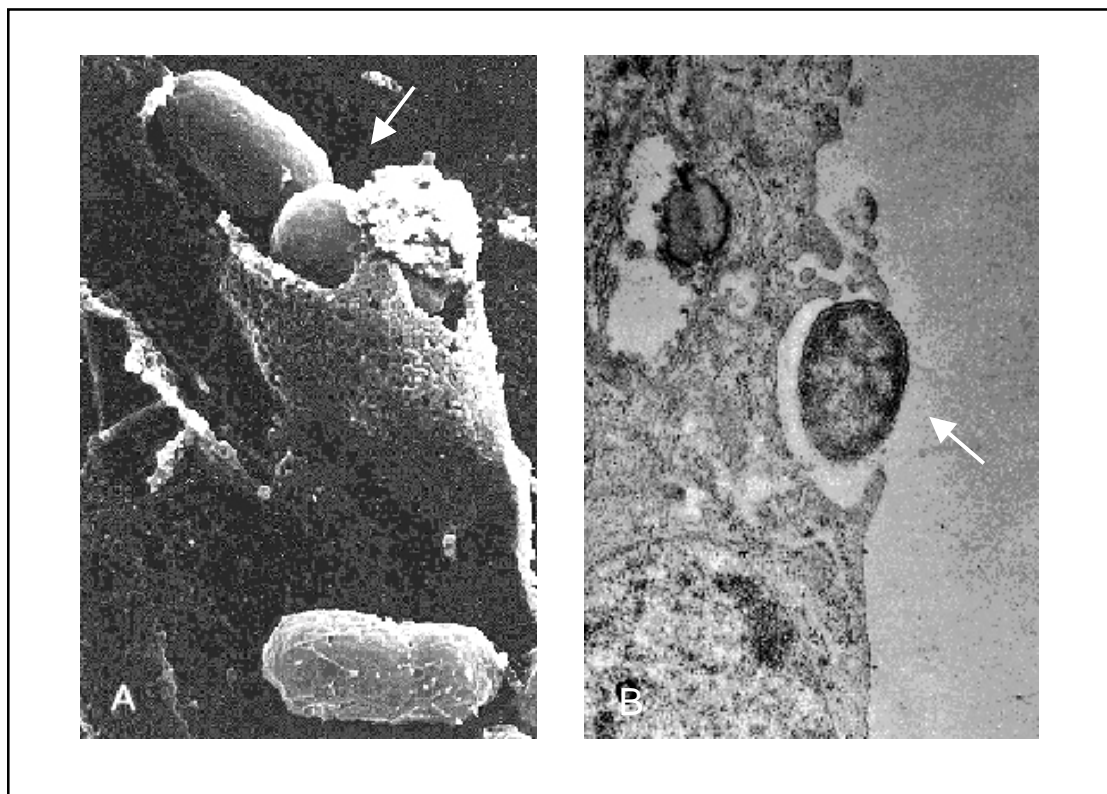


Abb. 8 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von mit *Citrobacter freundii* Stamm 3009 infizierten humanen Blasenepithelzellen (T24) (Daryab *et al.*, 1999). Die Internalisierung von *C. freundii* 3009 erfolgt über eine Umhüllung der Bakterien durch die Epithelzelle (ruffling), was sowohl mittels Scanning- (A) als auch Transmissions-Elektronenmikroskopie (B) beobachtet werden konnte.

Neuere Untersuchungen beschreiben die Fähigkeit von *Citrobacter freundii* Stamm 3009, *in vitro* in nicht-professionelle Phagozyten, z.B. transformierte humane Epithel- und Endothelzelllinien, eindringen zu können (Abb. 8). *C. freundii* 3009 ist in der Lage, seine Aufnahme in humane Blasenepithelzellen (T24, RT112, 5637), in aus dem menschlichen Verdauungstrakt stammende Zelllinien, wie HCT8 (Ileozökum) und INT407 (Darm), und sogar in humane mikrovaskuläre Endothelzellen aus dem Gehirn (HBMEC, human brain microvascular endothelial cells) zu induzieren (Badger *et al.*, 1999; Hess *et al.*, 2000; Oelschlaeger *et al.*, 1993; Stins *et al.*, 2001). *In vivo* bietet eine intrazelluläre Lokalisierung für *C. freundii* 3009 den Vorteil, in einer schützenden Nische replizieren oder persistieren zu können. Da die Mikroorganismen im Endosom von eukaryontischen Zellen sowohl vor dem Angriff von (humoralen) Wirtsabwehrsystemen als auch vor der Wirkung von zahlreichen Antibiotika geschützt sind, wird die Infektionszeit verlängert und eine Penetration durch Wirtsbarrieren erleichtert (Falkow, 1991; Oelschlaeger, 1994). Die Auslösung von Bakteriämie und Meningitis reflektiert die Fähigkeit von *C. freundii*, mittels Transzytose eukaryontischer Zellen Wirtsbarrieren in Form von Harnwegsepithelzellen oder der Blut-Hirn-Schranke überwinden zu können (Huang *et al.*, 2000; Tuomanen, 1996). Die Blut-Hirn-Schranke stellt eine selektiv durchlässige Barriere zwischen Blut und Gehirn dar, die den Stofftransport aus dem Blut in das Zentralnervensystem (ZNS) erschwert, wodurch die Nervenzellen vor schädlichen Stoffen und vor dem Eindringen von pathogenen Erregern geschützt werden (Huang und Jong, 2001).

Durch die spezifische Interaktion von Wirtszellrezeptoren mit bakteriellen Liganden werden in der Regel Signaltransduktionskaskaden induziert, die in einer anschließenden Umstrukturierung des Zytoskeletts der Wirtszellen resultieren, und so eine Internalisierung der Mikroben ermöglichen. Das Zytoskelett ist bei allen eukaryontischen Zellen aus Aktinfilamenten (Mikrofilamente (MF)) und Mikrotubuli (MT), die aus α - und β -Tubulinen bestehen, zusammengesetzt. Daher kann die Internalisierung von Mikroorganismen durch die Depolymerisierung der Mikrofilamente (mittels Cytochalasin D) bzw. der Mikrotubuli (mittels Colchicin, Vincristin, Vinblastin oder Nocodazole) inhibiert werden. Die Rolle von Intermediär-Filamenten bei der Umlagerung des Zytoskeletts während der Aufnahme von Bakterien konnte bis jetzt aufgrund fehlender Untersuchungsmöglichkeiten noch nicht aufgeklärt werden (Oelschlaeger und Kopecko, 2000; Oelschlaeger, 1994). Intermediär-Filamente sind als zusätzliche dynamische Komponenten nur in bestimmten Zellarten (z.B. Epithelzellen) vorhanden.

Bei den meisten der bislang beschriebenen Internalisierungsrezeptoren handelt es sich um Transmembranproteine, die normalerweise mit dem Aktinfilamentnetzwerk des Wirtszytoskeletts in Verbindung stehen. Es ist deshalb nicht erstaunlich, dass der überwiegende Teil der bisher untersuchten fakultativ intrazellulären Bakterien intakte Mikrofilamente für den Internalisierungsprozess benötigt, z.B. enteroinvasive und enterotoxische *Escherichia coli* (Donnenberg *et al.*, 1990; Elsinghorst und Kopecko, 1992), *Bordetella pertussis* (Ewanowich *et al.*, 1989), *Neisseria gonorrhoeae* (Makino *et al.*, 1991), *Listeria monocytogenes* (Gaillard *et al.*, 1987), *Salmonella*, *Shigella* und *Yersinia* spp. (Elsinghorst *et al.*, 1989; Finlay und Falkow, 1997; Finlay und Falkow, 1989; Finlay und Falkow, 1988; Hale *et al.*, 1979). Eine Beteiligung der Mikrofilamente lässt auf einen mit der Phagozytose durch Makrophagen vergleichbaren zugrundeliegenden Aufnahmemechanismus schließen, da diese ebenfalls durch die Depolymerisierung der Mikrofilamente hemmbar ist. Die proximalen Glc-NAc-Reste N-glykosylierter Zellproteine wurden in Invasionsstudien für diese Art der Aufnahme als möglicher Internalisierungsrezeptor für *Klebsiella pneumoniae* identifiziert (Fumagalli *et al.*, 1997).

Ein ausschließlich Mikrotubuli-abhängiger Internalisierungsvorgang wurde bislang lediglich für *Campylobacter jejuni* und *Citrobacter freundii* beobachtet (Hess *et al.*, 2000; Oelschlaeger *et al.*, 1993). Diese Tatsache eröffnet die Möglichkeit, *C. freundii* 3009 als Modellorganismus zu etablieren, um so z.B. Mikrotubuli-abhängige Internalisierungsmechanismen von anderen Enterobakterien leichter analysieren zu können.

Darüber hinaus wurde in weiteren Untersuchungen gezeigt, dass bei einer Reihe von Organismen die Internalisierung sowohl mit Mikrofilament- als auch mit Mikrotubuli-depolymerisierenden Substanzen verhindert werden kann. Zu diesen zählen enteropathogene *E. coli* (Donnenberg *et al.*, 1990), enterohämorrhagische *E. coli* (Oelschlaeger *et al.*, 1994), Meningitis-auslösende *E. coli* (Meier *et al.*, 1996), *Neisseria gonorrhoeae* (Grassme *et al.*, 1996), *Campylobacter jejuni* (Oelschlaeger *et al.*, 1993), *Haemophilus influenzae* (St. Geme und Falkow, 1990), *Klebsiella pneumoniae* (Fumagalli *et al.*, 1997; Oelschlaeger und Tall, 1997), *Proteus mirabilis* (Oelschlaeger und Tall, 1996), *Mycobacterium bovis* BCG (Buchwalow *et al.*, 1997), *Mycobacterium tuberculosis* (Bermudez und Goodman, 1996), *Mycoplasma penetrans* (Borovsky *et al.*, 1998), *Porphyromonas gingivalis* (Lamont *et al.*, 1995), *Legionella pneumophila* (Maruta *et al.*, 1998), *Listeria monocytogenes* (Guzman *et al.*, 1995; Kuhn, 1998) und der in dieser Arbeit näher charakterisierte Mikroorganismus *Citrobacter freundii* Stamm 3009 (Hess *et al.*, 2000; Oelschlaeger *et al.*, 1993).

Es muss deutlich hervorgehoben werden, dass lediglich der Aufnahmeprozess von *C. freundii* 3009 in das Endosom von humanen Blasenepithelzellen (T24) *in vitro* exklusiv Mikrotubuli-abhängig erfolgt. Die Invasion in humane Epithelzellen aus dem Ileozökum (HCT8) oder aus dem Darm von Embryonen (INT407) verläuft dagegen sowohl Mikrofilament- als auch Mikrotubuli-abhängig (T. Oelschlaeger, persönliche Mitteilung; Reisenauer, 1999). Aus diesem komplexen Invasionsverhalten lässt sich schließen, dass *C. freundii* 3009 über mindestens zwei verschiedene Invasionsysteme verfügt, die mit unterschiedlichen Wirtszellrezeptoren Interaktionen eingehen können.

Um weitergehende Einblicke in die Invasionscharakteristika von *C. freundii* 3009 zu erhalten, wurde in Klonierungsversuchen eine Invasionsdeterminante aus dem Chromosom von *C. freundii* 3009 identifiziert, kloniert, sequenziert und zum Teil charakterisiert (Altenhöfer, 2001; Daryab, 1997; Michaelis, 1999; Reisenauer, 1999). Interessanterweise weist die klonierte Invasionsdeterminante eine sehr hohe Identität (ca. 80 % auf Nukleotidebene) zum Typ 1 Fimbrien Gencluster von *Salmonella typhimurium* auf. Das resultierende Plasmid pTO3 vermittelt den damit transformierten nicht-invasiven *E. coli* K12 Stämmen (HB101, AAEC189) Invasivität. Allerdings dringen die entsprechenden rekombinanten *E. coli* Stämme im Gegensatz zum *Citrobacter* Wildtyp über einen exklusiv Mikrofilament-abhängigen Internalisierungsmechanismus in T24 Zellen ein. Die Ursache für diese überraschende Diskrepanz sowie die Frage, ob *C. freundii* 3009 über zwei unabhängig voneinander agierende Invasionsysteme verfügt, konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden.

2.5 Zielsetzung

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Ermittlung und Charakterisierung der für die Invasionsfähigkeit von *Citrobacter freundii* Stamm 3009 essentiellen Gene. Dazu sollte die sequenzierte Invasionsdeterminante aus *C. freundii* (pTO3) subkloniert und zudem eine chromosomale Mutante konstruiert werden, in welcher der zentrale Teil der Invasionsdeterminante deletiert ist. Mit den resultierenden rekombinanten *E. coli* Stämmen sowie der *Citrobacter* Wildtypmutante und der entsprechenden Komplementante wurde in Funktionsstudien mittels Invasionsassays die Rolle der jeweils fehlenden bzw. nicht-funktionellen Gene der Invasionsdeterminante bestimmt. Da die Invasionsdeterminante aus *C. freundii* 3009 eine hohe Homologie zum Typ 1 Fimbrien Gencluster (*fim*) von *Salmonella typhimurium* aufweist, wurde die Expression der auf der Invasionsdeterminante kodierten Gene mittels Hefeagglutination, Westernblotanalyse, Elektronenmikroskopie und radioaktiver Markierung der Proteine unter Verwendung eines T7 Expressionssystems untersucht.

Vor dem Hintergrund, dass bestimmte Typ 1 Fimbrien Varianten von *E. coli* die Internalisierung der Bakterien in Blasenepithelzellen induzieren, widmete sich ein weiterer Teil dieser Arbeit der Untersuchung des Invasionsvermögens des Neugeborenen-Meningitis verursachenden *E. coli* K1 Stamms IHE3034. Außerdem sollte das Typ 1 Fimbrien Gencluster aus IHE3034 sowie aus dem uropathogenen *E. coli* Stamm 536 kloniert werden. Darüber hinaus wurde für klinische UEPC Isolate, bei denen ein *fim* negativer Genotyp vorlag, eine genetische Charakterisierung im Bereich der Deletionsstelle durchgeführt.

3. Material und Methoden

3.1 Geräte und Chemikalien

Analysenwaage	Chyo JL 180
Autoklaven	Teknomara
Brutschränke	Memmert TV 40b
	Heraeus electronics T10A, CO ₂ -belüftet
Cleanbench	Nunc Microflow 50726
DNA-Sequenzierer	Li-Cor DNA-Sequencer, Model 4000
Eismaschine	Scotsman AF-20
Elektrophoresekammern	
für Agarose-Gele	Pharmacia Biotech; BioRad
für PAA-Gele	BioRad
Elektroporationsgerät	BioRad, Gene Pulser TM
Exponierkassette	Dr. Goos
Geldokumentationsanlage	BioRad
Geltrockner	BioRad, 1125 B
Grobwaagen	Chyo, MP 3000
Hybridisierungsöfen	MWG Biotech
Kühlzentrifuge	Beckman J2-21
pH-Meter	Metrohm-Herisau E 512
Photometer	Unicam, 8625
Speed-Vakuumentrifuge	Univapo 150 H Uniequip
Thermocycler	Eppendorf, Mastercycler gradient
	Biometra, Thermocycler T3
Tischinkubator	Eppendorf, Thermostat 5320
Tischzentrifuge	Eppendorf, Zentrifuge 5415 C
Transmissionselektronenmikroskop	Zeiss EM 10
UV-Crosslinker	BioRad
Vakuumblotgerät	Pharmacia Biotech

Die verschiedenen Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Bayer (Leverkusen), Becton-Dickinson (Augsburg), Boehringer (Mannheim), Difco (Augsburg), Fluka (Deisenhofen), Gibco (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Oxoid (Wesel), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Antibiotika wurden bei Sigma (Deisenhofen) gekauft.

3.2 Größenmarker, Enzyme und Laborkits

In den Agarosegelen wurde zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten der DNA-Marker 1 kb DNA Leiter von MBI Fermentas sowie die 100 bp plus DNA Leiter von New England Biolabs verwendet. Für die Größenbestimmung von Proteinen in PAA-Gelen wurde der Rainbow Marker RPN 800 von Amersham Pharmacia und die 10 kDa Protein Leiter von Gibco eingesetzt.

Tab. 1 DNA-Größenmarker

Fragment	1 kb DNA Leiter Größe in kb	100 bp DNA Leiter Größe in bp
1	10,0	3000
2	8,0	2000
3	6,0	1500
4	5,0	1200
5	4,0	1031
6	3,5	900
7	3,0	800
8	2,5	700
9	2,0	600
10	1,5	500
11	1,0	400
12	0,75	300
13	0,5	200
14	0,25	100

Tab. 2 Verwendete Proteingrößenmarker

Rainbow Marker RPN 800		
Fragment	MW in kDa	Farbe
1	250	blau
2	160	rot
3	105	grün
4	75	gelb
5	50	purpur
6	35	blau
7	30	orange
8	25	grün
9	15	blau
10	10	rot

10 kDa Protein Leiter	
Fragment	MW in kDa
1	200
2	120
3	110
4	100
5	90
6	80
7	70
8	60
9	50
10	40
11	30
12	20
13	10

In dieser Arbeit wurden die folgenden Enzyme und Laborkits verwendet.

Tab. 3 Verwendete Enzyme und Laborkits

Enzym	Bezugsquelle
Elongase Enzyme Mix	Gibco, Eggenstein
Lysozym	Merck, Darmstadt
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt; Gibco, Eggenstein; Amersham Pharmacia, Freiburg; Stratagene, Heidelberg
RNAse A	Roth, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	Gibco, Eggenstein
Taq-Polymerase	Qiagen, Hilden; Promega, Mannheim

Laborkit	Bezugsquelle
ECL Hybridisierungskit	Amersham Pharmacia, Freiburg
Gene Clean Kit	Bio 101, Dianova, Hamburg
pGEM T-Easy Kit	Promega, Mannheim
PCR Script Cam	Stratagene, Heidelberg
PCR Supermix	Gibco, Eggenstein
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick	Qiagen, Hilden
Sequenzierungskit	Amersham Pharmacia, Freiburg

3.3 Bakterienstämme, Plasmide und Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme, Plasmide und Zelllinien sind in den Tabellen 4, 5 und 6 beschrieben.

Die Bakterienstämme werden als Glycerin-Kulturen bei -20°C und -80°C aufbewahrt. Zu 1 ml ÜNK werden 500 μl 86 % Glycerin zugegeben, gemischt und eingefroren.

Tab. 4 Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Eigenschaften	Referenz/Herkunft
<i>Citrobacter freundii</i>		
3009	UTI-Isolat, Ap^{r} , $\text{fim}^{\text{+}}$	Walter Reed Institute of Research, Washington; Oelschlaeger <i>et al.</i> , 1993
3009-dz	$\Delta\text{fim}(D), H, F, Z$, Ap^{r} ; 3009 Derivat	diese Arbeit
3009-dz:: <i>kan</i>	$\Delta\text{fim}(D), H, F, Z$, Km^{r} , Ap^{r} ; 3009 Derivat	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i>		
536	O6:K15:H31, $\text{hly I}^{\text{+}}$, $\text{hly II}^{\text{+}}$, $\text{sfa}^{\text{+}}$, $\text{fim}^{\text{+}}$, $\text{prf}^{\text{+}}$, Sm^{r} , $\text{Pai I}^{\text{+}}$, $\text{Pai II}^{\text{+}}$, UPEC-Isolat	Berger <i>et al.</i> , 1982
AAEC189	K12, Δfim , Δlac , recA^{-} , endA^{-} , hsdR^{-} , $\text{hsdM}^{\text{+}}$	Blomfield <i>et al.</i> , 1991
BL21(DE3)pLysS	F^{-} , ompT , hsdS_{B} , (r_{B}^{-} , m_{B}^{-}), gal , dcm , (DE3), pLysS (Cm^{r})	Studier, 1991

Bakterienstamm	Eigenschaften	Referenz/Herkunft
DH5 α	K12, F $^-$, <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , (<i>r_k</i> $^-$, <i>m_k</i> $^-$) <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , Δ (<i>argF-lac</i>)U169, λ^- , ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15	Bethesda Research Laboratories, 1969; Hanahan, 1983
HB101	F $^-$, <i>ara14</i> , <i>galK2</i> , <i>hsdS20</i> (<i>hsr</i> $^-$, <i>hsm</i> $^-$), <i>recA13</i> , <i>supE44</i> , <i>lacZ4</i> , <i>leuB6</i> , <i>proA2</i> , <i>thi-1</i> , <i>rpsL20</i> (Sm r), <i>xyl-5</i> , <i>mtl1</i> , λ^-	Boyer und Roulland-Dussoix, 1969
IHE3034	O18:K1:H7, <i>hly</i> $^-$, <i>sfa</i> $^+$, <i>fim</i> $^+$, NBM-Isolat	Korhonen <i>et al.</i> , 1985; Meier <i>et al.</i> , 1996
IHE3034-2	O18:K1:H7, <i>fim</i> $^-$ (<i>fimA::cat</i>), Cm r , IHE3034 Derivat	Pouttu <i>et al.</i> , 1999
MG1655	K12, <i>fim</i> $^+$, F $^-$, λ^- , <i>ilvG</i> $^-$, <i>rfb50</i> $^-$, <i>rph</i> $^-$	Blattner <i>et al.</i> , 1997
S17-1	RP4-2-Tc::Mu-Km r ::Tn7, <i>pro</i> , <i>res</i> , <i>mod</i> $^+$	Simon <i>et al.</i> , 1983
S17-1 λ pir	Sm r , <i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> $^-$ M $^-$, [RP4-2- Tc::Mu-Km r ::Tn7] (λ pir)	de Lorenzo und Timmis, 1994
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
3091	K16, <i>fimA</i> $^+$, <i>mrkA</i> $^-$, <i>mrkD</i> $^-$, UTI-Isolat	Walter Reed Institute of Research, Washington DC; Oelschlaeger und Tall, 1997
<i>Salmonella typhimurium</i>		
C17	Klinisches Isolat	Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Universität Würzburg; Meier <i>et al.</i> , 1996
Uropathogene Patientinnen-Isolate		
Nr. 1 (255; 1E1)	<i>fim</i> $^-$, UPEC, Klon 1-10, Patientin 1	Fünfstück, Universität Jena
Nr. 2 (257; 1E3)	<i>fim</i> $^-$, UPEC, Klon 1-10, Patientin 1	Fünfstück, Universität Jena
Nr. 3 (258; 1E4)	<i>fim</i> $^-$, UPEC, Klon 1-10, Patientin 1	Fünfstück, Universität Jena
Nr. 4 (260; 1E6)	<i>fim</i> $^-$, UPEC, Klon 1-10, Patientin 1	Fünfstück, Universität Jena
Nr. 5 (289; 1E3U)	<i>fim</i> $^-$, UPEC, Klon 1-10, Patientin 1	Fünfstück, Universität Jena
Nr. 6 (290; 1E4U)	<i>fim</i> $^-$, UPEC, Klon 1-10, Patientin 1	Fünfstück, Universität Jena

Bakterienstamm	Eigenschaften	Referenz/Herkunft
Nr. 7 (859; 11C3U)	Δfim , UPEC, Klon 11-4, Patientin 11	Fünfstück, Universität Jena
Nr. 8 (861; 11C5U)	Δfim , UPEC, Klon 11-5, Patientin 11	Fünfstück, Universität Jena
Nr. 9 (862; 11C6U)	Δfim , UPEC, Klon 11-4, Patientin 11	Fünfstück, Universität Jena
Nr. 10 (457; 6D1U)	Δfim , UPEC, Klon 6-5, Patientin 6	Fünfstück, Universität Jena
Nr. 11 (175; 8B5)	Δfim , UPEC, Klon 8-1, Patientin 8	Fünfstück, Universität Jena
Nr. 12 (364; 8C1)	Δfim , UPEC, Klon 8-3, Patientin 8	Fünfstück, Universität Jena
Nr. 13 (367; 8C4)	Δfim , UPEC, Klon 8-5, Patientin 8	Fünfstück, Universität Jena
Nr. 14 (543; 8E5)	Δfim , UPEC, Klon 8-11, Patientin 8	Fünfstück, Universität Jena
Nr. 15 (544; 8E6)	Δfim , UPEC, Klon 8-11, Patientin 8	Fünfstück, Universität Jena
Nr. 16 (756; 8F3)	<i>Proteus</i> , Klon 8-14, Patientin 8	Fünfstück, Universität Jena
Nr. 17 (757; 8F4)	Mischkultur aus <i>Proteus</i> und <i>E. coli</i> , Klon 8-15, Patientin 8	Fünfstück, Universität Jena
Nr. 18 (947; 8G2)	<i>fim</i> ⁺ , UPEC, Klon 8-17, Patientin 8	Fünfstück, Universität Jena

Tab. 5 Verwendete Plasmide

Plasmid	Vektor	Beschreibung	Herkunft/Referenz
pACYC177		Klonierungsvektor Km ^r , Ap ^r , ori p15a	Rose, 1988a
pACYC184		Klonierungsvektor Cm ^r , Tc ^r , ori p15a	Rose, 1988b
pBluescript II KS		Klonierungsvektor Ap ^r , oriColE1	Stratagene, Amsterdam
pBR322		Klonierungsvektor Ap ^r , Tc ^r , oriColE1	Bolivar <i>et al.</i> , 1977
pGEM T-Easy		T/A-Klonierungsvektor Ap ^r , oriColE1	Promega, Mannheim
pJP5603		Suizidvektor Km ^r , oriR6K, mobRP4	Penfold und Pemberton, 1992
pK19mob		broad-host-range Vektor Km ^r , oriV, mobRP4 (oriT), <i>lacZ</i> α	Schäfer <i>et al.</i> , 1994

Plasmid	Vektor	Beschreibung	Herkunft/Referenz
pPCR Script Cam		Klonierungsvektor Cm ^r , oriColE1	Stratagene, Amsterdam
pSU18		Klonierungsvektor Cm ^r , ori p15a	Bartolome <i>et al.</i> , 1991
pSU19		Klonierungsvektor Cm ^r , ori p15a	Bartolome <i>et al.</i> , 1991
pT7-3		T7 Expressionsvektor Ap ^r , oriColE1, <i>bla</i> → Φ10	Tabor und Richardson, 1985
pT7-5		T7 Expressionsvektor Ap ^r , oriColE1, <i>bla</i> ← Φ10	Tabor und Richardson, 1985
pT7-6		T7 Expressionsvektor Ap ^r , oriColE1, <i>bla</i> ← Φ10	Tabor und Richardson, 1985
pUC-4K		Klonierungsvektor Ap ^r , Km ^r , oriColE1	Amersham Pharmacia, Freiburg
pUC18		Klonierungsvektor Ap ^r , oriColE1	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pUC19		Klonierungsvektor Ap ^r , oriColE1	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pAA8	pSU19	Cm ^r , 5,9 kb <i>Bam</i> HI Fragment aus pTO3; <i>fim</i> _{Cf} A,I,C,D,H	Altenhöfer, 2001
pB7-3	pT7-3	Ap ^r , <i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I Fragment aus pTO3; <i>fim</i> _{Cf} A,I,C,D,H,F → Φ10	B. Schulte- Holthausen, 1999
pB7-5	pT7-5	Ap ^r , <i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I Fragment aus pTO3; <i>fim</i> _{Cf} A,I,C,D,H,F → Φ10	B. Schulte- Holthausen, 1999
pB7-6	pT7-6	Ap ^r , <i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I Fragment aus pTO3; <i>fim</i> _{Cf} A,I,C,D,H,F ← Φ10	B. Schulte- Holthausen, 1999
pISF101	pACYC184	Cm ^r , <i>fim</i> _{St} aus <i>S. typhimurium</i> 6704	Clegg <i>et al.</i> , 1985
pKL4	pBR322	Ap ^r , <i>fim</i> _{Ec} aus <i>E. coli</i> K12 PC31	Klemm <i>et al.</i> , 1985
pPH1	pSU19	Cm ^r , <i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I Fragment aus pTO3; <i>fim</i> _{Cf} A,I,C,D,H,F,Z	diese Arbeit
pPH4	pSU19	Cm ^r , religiertes 7,1 kb <i>Hpa</i> I/ <i>Sna</i> I Fragment aus pPH1; Δ <i>fim</i> _{Cf} (D),H,F,Z	diese Arbeit

Plasmid	Vektor	Beschreibung	Herkunft/Referenz
pPH5	pSU19	Cm ^r , Km ^r , pPH4 mit Km-Kassette in der <i>HpaI/SnaI</i> Deletionsstelle; $\Delta fim_{Cf}(D),H,F,Z$	diese Arbeit
pPH6	pPCR Script Cam	Cm ^r , <i>SmaI/SnaI</i> Fragment aus pPH1; $ fim_{Cf}D,H,F,Z; fim_{Cf}Z \rightarrow lacZ$ Promotor	diese Arbeit
pPH7	pPCR Script Cam	Cm ^r , <i>SmaI/SnaI</i> Fragment aus pPH1; $ fim_{Cf}D,H,F,Z; fim_{Cf}D,H,F \rightarrow lacZ$ Promotor	diese Arbeit
pPH8	pBS II KS	Ap ^r , <i>EcoRI/SacI</i> Fragment aus pPH6; $ fim_{Cf}D,H,F,Z; fim_{Cf}Z \rightarrow lacZ$ Promotor	diese Arbeit
pPH9	pBS II KS	Ap ^r , <i>EcoRI/SacI</i> Fragment aus pPH7; $ fim_{Cf}D,H,F,Z; fim_{Cf}D,H,F \rightarrow lacZ$ Promotor	diese Arbeit
pPH10	pSU18	Cm ^r , <i>EcoRI/SalI</i> Fragment aus pTO3; $ fim_{Cf}A,I,C,D,H,F,Z$	diese Arbeit
pPH11	pSU18	Cm ^r , <i>EcoRI/SalI</i> Fragment aus pPH4; $ \Delta fim_{Cf}(D),H,F,Z$	diese Arbeit
pPH12	pSU18	Cm ^r , Km ^r , <i>EcoRI/SalI</i> Fragment aus pPH5; $ \Delta fim_{Cf}(D),H,F,Z$	diese Arbeit
pPH13	pJP5603	Km ^r , oriR6K, <i>SalI/KpnI</i> Fragment aus pPH4; Suizidplasmid	diese Arbeit
pPH19	pBS II KS	Ap ^r , 6,2 kb <i>PstI</i> Fragment aus pTO3; $ fim_{Cf}(A),I,C,D,H,F$	diese Arbeit
pPH21	pGEM T-Easy	Ap ^r , $ fim_{Ec}$ aus <i>E. coli</i> 536; $ fim_{Ec}A,I,C,D,F,G,H$	diese Arbeit
pPH22	pGEM T-Easy	Ap ^r , $ fim_{Ec}$ aus <i>E. coli</i> IHE3034; $ fim_{Ec}A,I,C,D,F,G,H$	diese Arbeit
pPH23	pK19mob	Km ^r , mobRP4 (oriT), <i>SmaI/SnaI</i> Fragment aus pPH1; $ fim_{Cf}D,H,F,Z$	diese Arbeit
pPH24	pSU19	Cm ^r , pPH1 mit IS1 in $ fim_{Cf}A$	diese Arbeit
pRPO-1	pBR322	Ap ^r , $ fim_{Ec}$ aus <i>E. coli</i> IHE3034; $ fim_{Ec}B,E,A,I,C,D,F,G,H$	Pouttu <i>et al.</i> , 1999
pTO3	pBR322	Ap ^r , $ fim_{Cf}$ aus <i>C. freundii</i> 3009; $ fim_{Cf}A,I,C,D,H,F,Z,Y,W,U$	T. Oelschlaeger

Tab. 6 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Herkunft
HCT8	humane Ileo-Coecumzellen	Walter Reed Institute of Research, Washington DC, USA
T24	humane Blasenepithelzellen	ATCC, Rockville, USA

3.4 Oligonukleotide und DNA-Sonden

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech, Ebersberg, hergestellt und sind in der folgenden Tabelle aufgelistet. Sequenzierprimer (S) sind am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD-800 markiert.

Tab. 7 Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Verwendung/Referenz
CFfimD1	CCATTCTTTTTCCAGGGAAC	Charakterisierung von 3009 Wildtyp Mutanten
CFfimD2	ACGCCGGTCTGGTTTTCTAT	Charakterisierung von 3009 Wildtyp Mutanten
CFfimD5	ACCAGAAGGCTACACCGCTT	DNA-Sonde
CFfimD6	GCGCCGGTCTGGTTTTCTAT	DNA-Sonde
CFfimH1	CAGCCGGGACAGGTGGTAACG	Charakterisierung von 3009 Wildtyp Mutanten
CFfimH2	GGTTTATTCCCCGTCACGCTGA	Charakterisierung von 3009 Wildtyp Mutanten
CFfimZuni	CGATCAGCTCAACGATGGTG	Charakterisierung von 3009 Wildtyp Mutanten
CFfimZrev	GGACGAACACCCTATTGTCAG	Charakterisierung von 3009 Wildtyp Mutanten
ECIS10h	CTCTCTTTACCAATTCTGCCCCG	DNA-Sonde
ECIS10r	GCTCTGAGCTGCTCGTTCGGC	DNA-Sonde
Kan5	AACGTCTTGCTCGAGGCCGC	DNA-Sonde
Kan6	GACTTGTTCAACAGGCGAGCC	DNA-Sonde

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Verwendung/Referenz
KArev1(S)	CTCCTTCATTACAGAAACGGC	Sequenzierung der Km-Kassette in pPH5
KAuni1(S)	CACCTGATTGCCCGACATTATC	Sequenzierung der Km-Kassette in pPH5
KArev2	CCTGAGCGAGACGAAATACG	Charakterisierung von 3009 Wildtyp Mutanten
KAuni2	CCATCAAGCATT TTTATCCGTACTCC	Charakterisierung von 3009 Wildtyp Mutanten
M13Reverse(S)	CAGGAAACAGCTATGACC	Überprüfung von Klonierungen
M13Uni(S)	TGTAAAACGACGGCCAGT	Überprüfung von Klonierungen
PH45uni2	GGAGAAGTCCGGTGGGCTGATG	Charakterisierung von 3009 Wildtyp Mutanten
PH45rev2	GCCAGCATCACTGACAATGAGCG	Charakterisierung von 3009 Wildtyp Mutanten
PH4uni1(S)	GGAGAAGTCCGGTGGGCTGATG	Sequenzierung der <i>HpaI/SnaI</i> Deletionsstelle in pPH4
PH4rev1(S)	GCCAGCATCACTGACAATGAGCG	Sequenzierung der <i>HpaI/SnaI</i> Deletionsstelle in pPH4
pbuni(S)	TCGCTACTTGGAGCCACTAT	Sequenzierung des IS 1 in pPH24
pbrev(S)	TCCAGCGCGGTGGACGTATTGT	Sequenzierung des IS 1 in pPH24
pstuni(S)	ACAAATTCCGTTCTCCATCGTG	Sequenzierung des IS 1 in pPH24
pstrev(S)	TTCTACCAGAGCCTGAGCGGTA	Sequenzierung des IS 1 in pPH24
536fim1	AAGTGTACAGAACGACTGCCCAT	Amplifizierung von <i>fim</i> _{Ec} aus 536 und IHE3034
536fim2	CCAGCATTAGCAATGTCCTGTGA	Amplifizierung von <i>fim</i> _{Ec} aus 536 und IHE3034

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Verwendung/Referenz
Primer zur Charakterisierung von Deletionen im Bereich des <i>fim</i> Genclusters in uropathogenen Patientinnen-Isolaten		
ECfecl1	AGACGGAACAGCAGGCAGT	diese Arbeit
ECfecl2	TATCTGACCGCGCCACTAC	diese Arbeit
ECfecl3	ATAGTGGCGCGGTCAGACA	diese Arbeit
ECfecR1	ACGTTTCAGGATCGCATCGG	diese Arbeit
ECfecR2	CACAGTCAGCCGTCAGCAA	diese Arbeit
ECfimA1	GGCGAATTCTGTTCTGTCGGCTCTGTC	Kuhnert <i>et al.</i> , 1997
ECfimA2	TTGGAATTC AACCTTGAAGGTCGCATC	Kuhnert <i>et al.</i> , 1997
ECfimBuni	GGAACTTCCTGACCCATAGTG	diese Arbeit
ECfimBrev	CGCTGTCGTCCTCTGGCTC	diese Arbeit
ECfimB3	GAGAAAGCGGATTCCCCTTAC	diese Arbeit
ECfimC1	GCTTGCTGGCAGGTATCCT	diese Arbeit
ECfimC2	GGGTTCCGGCATTCAACTC	diese Arbeit
ECfimD1	GCGCGTGGTTATATTCCTCC	diese Arbeit
ECfimD2	GTCACCACTATTACCTGCGG	diese Arbeit
ECfimE1	CCATGATGCAGGCGGTTTG	diese Arbeit
ECfimE2	ATCCGGCAAACGAGCAGC	diese Arbeit
ECfimF1	GTGGCTGGCGGTGAGTCA	diese Arbeit
ECfimF2	GATATGCCCCGCAGTGACA	diese Arbeit
ECfimG1	GTGGGTATGTATTGGCGGC	diese Arbeit
ECfimG2	GCTGTAGGTATAGGTGATGC	diese Arbeit
ECfimH1	GCATCACCTATACCTACA	diese Arbeit
ECfimH2	GGGCTGATTATTGTGCTGA	diese Arbeit
ECfimH3	ACCTCTCCGGCACAACCGCA	diese Arbeit
ECfimH4(S)	CCCTCCGGTACGTGCATA	Sequenzierung der <i>fim</i> _{Ec} Deletionsstelle in den Isolaten Nr. 1-6
ECfimI1	ATGCCACCCTTGTGCGAT	diese Arbeit
ECfimI2	GATGCCGCCAGTAACCCG	diese Arbeit
ECgntP1	GGGGTCTGCTGGAGCTGGTC	diese Arbeit
ECgntP1ent	GACCAGCTCCAGCAGACCCC	diese Arbeit
ECgntP2	TCGGCATGTTGATGTCCCACG	diese Arbeit
ECgntP3	ATCATGTTAGCGCCGCTGG	diese Arbeit
ECgntP4	CGCCACCAACAAAGCCACC	diese Arbeit
ECinsA	CAGCTGTCCCTCCTGTTCA	diese Arbeit

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Verwendung/Referenz
ECinsB	ACTTCCGTCCCAGCCGTG	diese Arbeit
ECinsB1(S)	GGTGCTGCCTCAGATTCA	Sequenzierung der <i>fim_{EC}</i> Deletionsstelle in den Isolaten Nr. 1-6
ECIS1F2	TCACTGCCCCGGTTGTATGC	diese Arbeit
ECnogene1	GGTTTGTGGCTTGTAAGTGGTC	diese Arbeit
ECnogene1ent	GACCAGTTACAAGCCACAAACC	diese Arbeit
ECnogene2	GCATGGCGTTTGTATGGCAAC	diese Arbeit
ECnogene2ent	GTTGCCATACAAACGCCATGC	diese Arbeit
ECsgcC1	ATACCGACCGCCACGACAA	diese Arbeit
ECsgcC2	CGTTGCGGCAATCATGGTG	diese Arbeit
ECsgcQ1	AACTGACTGACTCGCGCCT	diese Arbeit
ECsgcQ2	GGCGTGAATGTTCTGTGGG	diese Arbeit
ECsgcX1	GGCTCAACGGGGAAATGTG	diese Arbeit
ECsgcX2	GATCGTCTAGGCTGTACTGC	diese Arbeit
ECuxuA1	ACCCGAAAACCTTCCACGAA	diese Arbeit
ECuxuA2	ACGCCAGTTGCGCCCGC	diese Arbeit
ECuxuB1	ACTTCGCAGATGCCCCAGT	diese Arbeit
ECyjhA1	ATCCGGTGATATGTCTCGTG	diese Arbeit
ECyjhA2	GGGGACGAAAAGCACAGTAA	diese Arbeit
ECyjhF1	AAGACCGGCGGTAGAGATC	diese Arbeit
ECyjhF2	TCTTTGCGGCCCGGTATTG	diese Arbeit
ECyjhG1	ATCGCCCGCCTTGATCTTG	diese Arbeit
ECyjhG2	CACATCCCGGCAATTGCTC	diese Arbeit
ECyjhP1	AATACCGGTCCCAGCCTTC	diese Arbeit
ECyjhP2	ACACCGCATCCATAACCCG	diese Arbeit
ECyjhQ1	TCCGGTTTCATCAGGGTCTG	diese Arbeit
ECyjhQ2	AGTGATGCCAGTGATATCCG	diese Arbeit
ECyjhR1	AGTCTGGATCAACGTCAGCT	diese Arbeit
ECyjhR2	GGCTGGTGGCACATAAGGA	diese Arbeit
ECyjhR3	GTCCGACACACAGCAGTTC	diese Arbeit
ECyjhS1	ACTGGACGACGGCACTGCG	diese Arbeit
ECyjhS2	AGTCCTTCGCCATACGCCAT	diese Arbeit
ECyjhT1	ACCTGAGTCAAGCCCTCGC	diese Arbeit
ECyjhT2	GTCGGGCCTACGGAGTATC	diese Arbeit
ECyjhU1	CCGTGACATATCCTCCCAG	diese Arbeit
ECyjhU2	AATGTGCTGGGGGTTGCCT	diese Arbeit

Die in dieser Arbeit für die Southern Hybridisierungen verwendeten DNA-Sonden wurden entweder aus einem Restriktionsverdau von Plasmid-DNA oder aus PCR-Ansätzen aufgereinigt.

Tab. 8 Für Southern Hybridisierungen verwendete DNA-Sonden

Name	Herstellung	Größe in bp
PH1Pst	<i>Pst</i> I Fragment aus pPH1	6200
CFfimD5/6	PCR-Produkt (Primerpaar CFfimD5/CFfimD6)	995
Kan-Kass	PCR-Produkt (Primerpaar Kan5/Kan6)	513
IS10	PCR-Produkt (Primerpaar ECIS10h/ECIS10r)	922

3.5 Antiseren

Die verwendeten primären und sekundären Antiseren sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tab. 9 Verwendete primäre und sekundäre Antiseren

Antiserum	Beschreibung	Bezugsquelle
anti-Fim _{Cf} F	Serum aus Kaninchen gegen ein Polypeptid aus Fim _{Cf} F von <i>C. freundii</i> 3009	Eurogentec, Herstal, Belgien
anti-Fim _{Cf} H	Serum aus Kaninchen gegen ein Polypeptid aus Fim _{Cf} H von <i>C. freundii</i> 3009	Eurogentec, Herstal, Belgien
anti-Kaninchen	Serum aus Ziegen, gekoppelt mit Meerrettichperoxidase	Dako, Hamburg

Die polyklonalen Antiseren anti-Fim_{Cf}F und anti-Fim_{Cf}H wurden aus Kaninchen gewonnen, die mit den an den Träger KLH gekoppelten entsprechenden Polypeptiden immunisiert wurden. Die *fim* Determinante aus *Citrobacter freundii* 3009 bildet die Grundlage für die Aminosäuresequenz der synthetisierten Polypeptide aus Fim_{Cf}F (LHSDRTRLPLEQAS) bzw. Fim_{Cf}H (AGAGNRPEGINPQTK).

3.6 Anzucht der Bakterien

3.6.1 Nährmedien und Medienzusätze

Folgende Medien wurden für die Anzucht der Bakterien verwendet. Für Agarplatten werden vor dem Autoklavieren pro Liter Medium 12 g Agar zugegeben.

- LB (Luria-Bertani)
 - 10 g Casein-Hydrolysat-Pepton
 - 5 g Hefeextrakt
 - 5 g NaCl
 - ad 1 l dest. H₂O (Sambrook *et al.*, 1989)

- NB (Nutrient Broth)
 - 3,5 g Pepton
 - 3,5 g Rindfleischextrakt
 - 1 g Hefeextrakt
 - ad 1 l dest. H₂O (Gibco, Eggenstein)

- Enriched Medium
 - 20 g Trypton
 - 10 g Hefeextrakt
 - 5 g NaCl
 - 13,4 g K₃PO₄ x 3 H₂O
 - 2 ml Glycerin
 - ad 1 l dest. H₂O

- Minimalmedium M9
 - 10 ml M9-Salze (10x)
 - 2 mM MgSO₄
 - 0,1 mM CaCl₂
 - 0,2 % D-Glukose
 - 60 µM Thiamin
 - 0,1 mg/ml Aminosäuren-Lösung
 - ad 100 ml dest. H₂O

- M9-Salze (10x)
 - 128 g Na₂HPO₄ x 7 H₂O
 - 30 g KH₂PO₄
 - 5 g NaCl
 - 10 g NH₄Cl
 - ad 1 l dest. H₂O (Sambrook *et al.*, 1989)

- X-Gal-Platten

Nach dem Abkühlen des Agars auf 45°C gibt man pro Liter 3 ml 2 %ige X-Gal-Lösung (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -Galaktosid in Dimethylformamid) und 1 ml 100 mM IPTG (Isopropyl- β -D-thio-galaktosid) zu.

- Antibiotikazusätze für Medien und Nährböden

Die Antibiotika werden nach Abkühlung des Agars auf 45°C zugegeben.

Tab. 10 Konzentrationen der den Flüssigmedien bzw. dem Agar zugesetzten Antibiotika

Antibiotikum	Endkonzentration	Lösungsmittel
Ampicillin (Ap)	50 oder 100 $\mu\text{g/ml}$	dest. H ₂ O
Chloramphenicol (Cm)	30 $\mu\text{g/ml}$	Ethanol
Kanamycin (Km)	15–30 $\mu\text{g/ml}$	dest. H ₂ O
Rifampicin	200 $\mu\text{g/ml}$	Methanol
Tetracyclin (Tc)	10 $\mu\text{g/ml}$	dest. H ₂ O/Ethanol (1:1)

Bis auf Rifampicin (Stocklösung 20 mg/ml) wurden von allen Antibiotika (Sigma, Deisenhofen) 1000x Stocklösungen hergestellt und bei –20°C aufbewahrt (Sambrook *et al.*, 1989).

3.6.2 Wachstumsbedingungen

Das Wachstum der Bakterien erfolgt bei 37°C ÜN bei optimaler Belüftung auf einem Schütteltisch, wenn nicht anders angegeben.

Für die Verwendung im Hefeagglutinationstest bzw. in elektronenmikroskopischen Studien werden sowohl Wildtypstämme als auch rekombinante Stämme in NB als Standkulturen und unter teilweise anaeroben Bedingungen für 48 h bei 37°C kultiviert. *C. freundii* 3009 sowie die beiden Wildtypmutanten 3009-dz und 3009-dz::*kan* werden mindestens 3x überimpft.

3.7 Anzucht und Stammhaltung der eukaryontischen Zellen

3.7.1 Nährmedien

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

FCS wird vor Zugabe zum Medium Hitze-inaktiviert (1 h bei 60°C), aliquotiert (50 ml) und bei –20°C aufbewahrt. Glutamin-Lösungen werden in 10 ml Aliquots bei –20°C gelagert.

Tab. 11 Verwendete Zellkultur-Medien

Zelllinie	komplettes Nährmedium
HCT8	RPMI 1640, 10 % FCS, 2 mM Glutamin, 1 mM Pyruvat
T24	McCoy's 5A, 10 % FCS, 2 mM Glutamin, 0,1 mM nicht-essentielle Aminosäuren

3.7.2 Passagieren der eukaryontischen Zellen

Die eukaryontischen Zellen werden bei 37°C in einer 5 % CO₂ – 95 % Luft Atmosphäre mit 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert und zweimal wöchentlich in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:10 „gesplittet“. Dazu werden das jeweilige Nährmedium und die Trypsin/EDTA-Lösung auf 37°C vorgewärmt. Nach dem Abschütten des Zellkulturmediums aus der zu splittenden Flasche werden zum Trypsinieren der eukaryontischen Zellen 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben und je nach Zelllinie 3–10 min bei 37°C inkubiert. Durch Klopfen auf den Flaschenboden werden die Zellen von der Plastikoberfläche der Zellkulturflasche abgelöst, in 5 ml Zellkulturmedium aufgenommen und resuspendiert. Mit dieser Zellsuspension werden neue Kulturflaschen angesetzt. Die Kultivierung der eukaryontischen Zellen erfolgt immer ohne Zusatz von Antibiotika im Nährmedium.

3.7.3 Stammhaltung der eukaryontischen Zellen

Die eukaryontischen Zellen werden wie zuvor beschrieben trypsiniert, anschließend jedoch nicht in Zellkulturmedium sondern in 10 % DMSO in FCS aufgenommen. Jeweils 1 ml der Zellsuspension wird in Cryo-Röhrchen gegeben und bei -80°C eingefroren. Nach 1 Tag werden diese Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt und dort aufbewahrt.

Das Auftauen der eukaryontischen Zellen erfolgt in einem Wasserbad bei 37°C so rasch wie möglich, um die toxische Wirkung von DMSO zu minimieren. Die Zellsuspension wird in Zellkulturflaschen mit angewärmtem Medium überführt. Am folgenden Tag wird das Medium gewechselt, um das restliche DMSO zu entfernen.

3.8 Trypanblau-Färbung eukaryontischer Zellen

Die Lebensfähigkeit eukaryontischer Zellen wird mittels Trypanblau-Färbung überprüft. Trypanblau kann nur in das Cytoplasma von abgestorbenen eukaryontischen Zellen eindringen, d.h. blau angefärbte Zellen sind nicht mehr vital.

Nachdem die eukaryontischen Zellen in der 24-Napf-Platte mit EBSS gewaschen wurden, werden pro Kavität 10 μl 0,25 % Trypanblau-Lösung (Hazelton) zugegeben. Die Färbung wird mit einem Lichtmikroskop untersucht.

3.9 Invasionsassay (Gentamycin-Überlebensassay)

Standard-Invasionsassay

Mit Hilfe des Invasionsassays (Gentamycin-Überlebensassay) lässt sich die Invasionseffizienz von Bakterien in eukaryontische Zellen bestimmen (Elsinghorst, 1994; Tang *et al.*, 1993). Die Invasionsrate ist definiert als der Anteil der überlebenden Bakterien nach Gentamycin-Behandlung in Bezug auf das Inokulum.

Für die Invasionsassays werden die humanen Epithelzellen in 24-Napf-Platten (Falcon) ausgesäht und über Nacht im entsprechenden Zellkulturmedium ohne Zusatz von Antibiotika bei 37°C in einer 5 % CO_2 – 95 % Luft Atmosphäre mit 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Epithelzellen sollten einen konfluenten, einschichtigen Zellrasen (Monolayer) gebildet haben.

2 ml frisches LB Medium werden mit 5–50 μl einer Bakterien ÜNK angeimpft und bei 37°C unter Schütteln für ca. 2 h inkubiert bis die Bakterienkultur eine OD_{600} von 0,4–0,6

erreicht hat. Die genaue OD_{600} wird mit einem Photometer bestimmt und anschließend die Bakterienkultur auf eine OD_{600} von 0,1 verdünnt. 25 μ l dieser Verdünnung (1×10^5 bis 2×10^6 Bakterien) gibt man pro Napf zu dem konfluenten, einschichtigen Zellrasen, was einer MOI (multiplicity of infection) von ca. 30 entspricht. Um die Bakterien gleichmäßig zu verteilen, werden die 24-Napf-Platten leicht geschüttelt. Die Inkubationszeit (= Invasionsperiode) beträgt in der Regel 3 h bei 37°C in einer 5 % CO_2 – 95 % Luft Atmosphäre mit 90 % Luftfeuchtigkeit.

In der Zwischenzeit wird die Bakterienkultur mit der OD_{600} von 0,1 verdünnt (10^{-5}) und auf LB Platten ausplattiert (100 μ l). Den exakten Wert für das Inokulum erhält man, wenn man den so bestimmten Titer (Gesamtverdünnung 10^{-6}) noch durch 40 dividiert.

Nach der Invasionsperiode wird der Zellrasen zweimal mit EBSS gewaschen. Zur Abtötung der extrazellulären Bakterien wird in jeden Napf 1 ml frisches Zellkulturmedium mit 100 μ g/ml Gentamycin (Gm) gegeben. Nach einer weiteren Stunde Inkubation bei 37°C wird der Zellrasen dreimal mit EBSS gewaschen und anschließend mit 0,2 % Natrium-Desoxycholat in dest. H_2O für 4 min unter Schütteln lysiert (1 ml/Napf). Mit 100 μ l dieser Suspension werden geeignete Verdünnungen hergestellt und diese dann ausplattiert, um die Anzahl der freigesetzten Bakterien zu bestimmen. Das Verhältnis der Anzahl der intrazellulären Bakterien zum Inokulum ergibt die Invasionsrate.

Jeder Assay wird pro Stamm im Duplikat ausgeführt (2 Nöpfe) und mindestens dreimal unabhängig wiederholt. Es werden jeweils geeignete Negativkontrollen (*E. coli* AAEC189, HB101, DH5 α) als auch Positivkontrollen (*S. typhimurium* C17, *K. pneumoniae* 3091) mitgeführt. Die Ergebnisse geben den Mittelwert aller durchgeführten Experimente an.

In Kontrollexperimenten wird die Gentamycinsensitivität der verschiedenen Bakterienstämme unter den gleichen Bedingungen wie im Invasionsassay, allerdings in Abwesenheit der Epithelzellen, überprüft. Alle Bakterienstämme werden nach 1 h Inkubation in Zellkulturmedium mit 100 μ g/ml Gentamycin abgetötet. Die Lebensfähigkeit der eukaryontischen Zellen wird regelmäßig mittels Trypanblaufärbung überprüft.

Invasionsassays in Anwesenheit verschiedener Kohlenhydrate

Die verschiedenen Kohlenhydrate (100 mM Mannose; 0,6 mg/ml Chitinhydrolysat) werden im entsprechenden Zellkulturmedium gelöst und bei $-20^\circ C$ aufbewahrt. Chitinhydrolysat ist eine Mischung von N-Acetylglukosamin und Oligomeren dieses Zuckers in gesättigter NaCl Lösung (Vector Laboratories, Grünberg).

In eine 24-Napf Platte gibt man pro Napf 1 ml der Kohlenhydratlösung sowie das Inokulum und inkubiert 15 min bei Raumtemperatur auf einem Schütteltisch. Zusätzlich wird das Inokulum unter denselben Bedingungen in 1 ml Zellkulturmedium inkubiert.

Danach wird das Zellkulturmedium über dem geschlossenen Zellrasen entfernt und durch die Bakterien-Zuckerlösung ersetzt. Anschließend wird der Invasionsassay unter Standard-Bedingungen fortgesetzt. Zur Ermittlung der relativen Invasionsraten werden die Ansätze mit den Kohlenhydraten in Bezug zum Versuchsansatz ohne Kohlenhydrate (= 100 %) gesetzt.

- EBSS (10x)
 - Lösung 1 18 mM CaCl_2
8 mM MgSO_4
 - Lösung 2 53 mM KCl
1,2 M NaCl
10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
 - Lösung 3 7,5 % NaHCO_3 in dest. H_2O
 - Lösung 4 22 % D-Glukose in dest. H_2O

Die Lösungen 1 und 2 werden getrennt voneinander autoklaviert, die Lösungen 3 und 4 steril filtriert. Zu 387,5 ml sterilem dest. H_2O werden je 50 ml Lösung 1 und 2, 10 ml Lösung 3 und 2,5 ml Lösung 4 gegeben. Der pH-Wert der 1x EBSS Lösung sollte bei 7,4 liegen.

- 10 % Natrium-Desoxycholat 10 g Natrium-Desoxycholat
ad 100 ml dest. H_2O

Aus der 10 %igen Stammlösung wird nach dem Autoklavieren eine 0,2 %ige Lösung hergestellt.

3.10 Molekularbiologische Methoden

3.10.1 Plasmidisolierung

kleiner Maßstab (DNA Reinigung mittels Diatomeenerde)

Die Schnellpräparation von Plasmid-DNA erfolgte nach der von Hansen bzw. Machesky beschriebenen Methode (Hansen *et al.*, 1995; Machesky, 1996) mit Diatomeenerde (Sigma). Das Bakteriensediment von 2 ml einer ÜNK wird in 150 μl Puffer 1 resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Aufschluss der Bakterienzellen wird 150 μl Puffer 2 zugegeben, die Mischung durch invertieren gemischt bis sie klar ist und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 150 μl Puffer 3 werden Proteine und die chromosomale DNA gefällt. Nach einer 5 min Inkubation auf Eis und einem Zentrifugationsschritt (5 min, 14000 Upm) wird der klare Überstand in ein Eppendorfcap überführt, das bereits 900 μl Puffer L6 und 50 μl

Diatomeenerde enthält. Die Mischung wird geschüttelt und für weitere 5 min auf Eis inkubiert, so dass die Plasmid-DNA an die Diatomeenerde binden kann. Das Gemisch wird auf einen Filter gesaugt, der Filterkuchen mit 2 ml Waschlösung gespült und in einem Eppendorfcap vollständig trocken zentrifugiert (20 sec, 14000 Upm). Anschließend wird die gereinigte Plasmid-DNA mit 30–50 µl dest. H₂O aus dem Filterkuchen in ein neues Eppendorfcap eluiert.

- Puffer 1 5 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,5), 2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), 1 ml 10 mg/ml RNase A, ad 100 ml dest. H₂O
- Puffer 2 0,2 M NaOH, 1 % SDS in dest. H₂O
- Puffer 3 3 M Natriumacetat (pH 4,8)
- Diatomeenerde 10 g Diatomeenerde, 0,5 ml konz. HCl, ad 50 ml dest. H₂O
- Puffer L6 100 ml 0,1 M Tris-HCl (pH 6,4), 8,8 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), 2,6 ml TritonX-100, 120 g Guanidin, 13,2 ml dest. H₂O
- Waschlösung 10 ml 5 M NaCl, 5 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,5), 2,5 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), ad 250 ml dest. H₂O, 250 ml EtOH

Midi-Präparation (Qiagen)

Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA mit hohem Reinheitsgrad wurde eine Anionen-Austausch-Chromatographie mit Hilfe des Qiagen-Kits durchgeführt. Es werden 100 ml LB Medium mit einer Bakterienkolonie beimpft und ÜN unter Selektionsdruck bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Bakterienzellen werden in sterilen JA10-Röhrchen abzentrifugiert (8.000 Upm, 15 min, 4°C). Dann resuspendiert man das Zellsediment in 4 ml P1. Nach der Zugabe von 4 ml P2 und anschließender Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min versetzt man den Ansatz mit 4 ml P3, mischt vorsichtig und belässt ihn 15–20 min auf Eis. Anschließend wird in der Kühlzentrifuge in JA20-Röhrchen zentrifugiert (15.000 Upm, 30 min, 4°C). Zur Entfernung eventuell noch vorhandener Zellreste gibt man den Überstand durch einen angefeuchteten Faltenfilter auf eine zuvor mit 10 ml QBT äquilibrierte Qiagen-Säule (tip-100). Die an die Säulenmatrix gebundene Plasmid-DNA wird zweimal mit jeweils 10 ml QC gewaschen und anschließend mit 5 ml QF eluiert. Die Fällung der DNA erfolgt mit 0,7 Vol. (3,5 ml) Isopropanol. Nach einer 30 min Zentrifugation bei 15.000 Upm und 4°C wird das Pellet in 2 ml 70 % EtOH aufgenommen, in ein Eppendorfcap überführt und in der Eppendorfcap-Zentrifuge erneut für 2 min abzentrifugiert. Das Pellet wird in der Speed-Vacuumzentrifuge getrocknet und in einer geeigneten Menge (100µl) sterilem dest. H₂O aufgenommen. Die Konzentration und Reinheit der Plasmid-DNA wird entweder photometrisch oder durch Agarose-Gelelektrophorese bestimmt.

Die Regeneration der Säulen erfolgt mit 50 ml HS und 20 ml QPT. Die Säulen werden in QPT mit 0,1 % Natriumazid bei 4°C aufbewahrt.

- P1 50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A
- P2 200 mM NaOH, 1 % SDS
- P3 3 M Kalium-Acetat, pH 5,5
- QBT 750 mM NaCl, 50 mM MOPS (pH 7,0), 15 % EtOH, 0,15 % TritonX-100
- QC 1 M NaCl, 50 mM MOPS (pH 7,0), 15 % EtOH
- QF 1,25 M NaCl, 50 mM Tris/HCl (pH 8,5), 15 % EtOH
- HS 1,5 M NaCl, 50 mM MOPS (pH 8,5), 20 % EtOH
- QPT 0,4 M NaCl, 50 mM MOPS (pH 7,0), 0,15 % TritonX-100

3.10.2 Isolierung von chromosomaler DNA

Die Präparation chromosomaler DNA wurde nach der von Grimberg beschriebenen Methode durchgeführt (Grimberg *et al.*, 1989). 1 ml einer Bakterien ÜNK werden in einem Eppendorfcap zentrifugiert (8000 Upm, 4 min). Nachdem man das Pellet in 1 ml TNE resuspendiert und erneut zentrifugiert hat, nimmt man es in 270 µl TNEX auf. Der Zugabe von 30 µl Lysozym (5 mg/ml) folgt eine 30 min Inkubation bei 37°C. Man versetzt die Lösung mit 15 µl Proteinase K (20 mg/ml), lässt diese 2 h bei 65°C einwirken und gibt anschließend 15 µl 5 M NaCl-Lösung sowie 500 µl 96 % EtOH zu. Die gefällte DNA wird 10 min bei 4°C und 14000 Upm zentrifugiert, zweimal mit 80 % EtOH gewaschen, anschließend getrocknet und in 100 µl dest. H₂O aufgenommen.

- TNE 10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 10 mM NaCl, 10 mM EDTA
- TNEX 10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 10 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1 % TritonX-100

3.10.3 DNA Reinigung

Phenol-Extraktion und anschließende Fällung mit EtOH

Eine wässrige DNA Lösung wird mit 1 Vol. Phenol/Chloroform (1:1) versetzt, gut durchmischt und zur schnelleren Phasentrennung 10 min bei 14.000 Upm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wird in ein neues Eppendorfcap überführt. Man wiederholt diesen Vorgang so oft bis keine weiße Interphase mehr vorhanden ist.

Die Fällung der DNA erfolgt nach Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat (pH 4,8) und 2,5 Vol. 96 % EtOH bei -80°C für 1 bis 15 h. Anschließend zentrifugiert man 10 min und wäscht das Pellet mit 200 μl 70 % EtOH. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wird das Pellet getrocknet und in einer adäquaten Menge dest. H_2O aufgenommen.

Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose (Gene Clean Kit, Dianova)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten in einem TAE-Agarosegel wird die zu eluierende DNA-Bande unter schwachem UV-Licht aus dem Agarosegel herausgeschnitten und in ein Eppendorfcap überführt. Man gibt 3 Vol. 5 M NaI hinzu und schmilzt das Agarosestückchen bei 50°C bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hat. Nun werden 8 μl Glasmilch zugegeben, der Ansatz gut gemischt und 5 min auf Eis inkubiert, so dass die DNA an die Glasmilch binden kann. Durch kurzes Zentrifugieren (30 sec) wird die Glasmilch sedimentiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 200 μl eiskaltem New Wash-Puffer versetzt. Dieser Waschvorgang wird noch zweimal wiederholt. Anschließend gibt man 8 μl dest. H_2O zu dem Pellet, resuspendiert und inkubiert den Ansatz bei 50°C (2–5 min), damit sich die DNA wieder von der Glasmilch löst. In einem 1 min Zentrifugationsschritt wird die DNA von der Glasmilch abgetrennt und in ein neues Eppendorfcap überführt. Um die Ausbeute zu erhöhen, wird der letzte Inkubationsschritt wiederholt.

Aufreinigung von PCR-Produkten mit Qiaquick

Der PCR-Ansatz wird laut Herstellerangaben (Qiagen) mit 5 Vol. Lösung PB versetzt, gut gemischt und auf eine Qiaquick „spin column“ gegeben. Diese steckt man auf ein Eppendorfcap, zentrifugiert 30–60 sec bei 13.000 Upm und entfernt die Flüssigkeit, die sich im Eppendorfcap angesammelt hat. Dann gibt man 0,75 ml Lösung PE auf die „spin column“, zentrifugiert 30–60 sec bei 13.000 Upm, verwirft die Flüssigkeit im Eppendorfcap, zentrifugiert erneut für 1 min und steckt anschließend die „spin column“ auf ein neues steriles 1,5 ml Eppendorfcap. Die DNA wird in einem Zentrifugationsschritt mit 50 μl sterilem dest. H_2O von dem Säulenmaterial eluiert.

3.10.4 DNA Konzentrationsbestimmung

Die DNA Konzentration kann mit Hilfe eines Spektralphotometers bestimmt werden. Dazu wird eine wässrige DNA Lösung in einer geeigneten Verdünnung (1:20 bis 1:100) in einer Quarzküvette bei 260 nm, 280 nm und 320 nm gegen dest. H_2O vermessen. Die Berechnung der DNA Konzentration erfolgt über das Programm Nr. 1 des

Spektralphotometers. Aus dem Verhältnis der Extinktionskoeffizienten (E) bei den verschiedenen Wellenlängen lässt sich eine Aussage über die Reinheit der DNA treffen. Dabei sollte $E_{260}:E_{280}$ nicht kleiner als 1,8 und $E_{260}:E_{320}$ nicht kleiner als 2,2 sein (Sambrook *et al.*, 1989).

3.10.5 Restriktionsverdau

Zur Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen werden in einem Eppendorfcap die Plasmid-DNA mit den jeweiligen Restriktionsenzymen im dazugehörigen Puffer und dest. H₂O gemischt (Gesamtvolumen 20–50 µl) und für 1 bis 4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend gibt man Stopp-Puffer dazu und analysiert das Ergebnis des Restriktionsverdaus auf einem Agarosegel.

- Stopp-Puffer (10x) 0,25 % Bromphenolblau
0,25 % Xylencyanon
25 % Ficoll Typ 400 in H₂O in dest. H₂O

Für den Restriktionsverdau von chromosomaler DNA werden in einem Eppendorfcap 2–5 µg DNA mit dem jeweiligen Restriktionsenzym und dem entsprechenden Puffer in dest. H₂O mindestens 6 h bei 37°C inkubiert, wobei nach 2 h und nach 4 h jeweils nochmals Restriktionsenzym hinzugegeben werden. Nach Zugabe von Stopp-Puffer wird der Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen und die Vollständigkeit der Restriktionsspaltung kontrolliert.

3.10.6 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA Molekülen nach ihrer Größe erfolgt mittels Agarosegelelektrophorese. Die Agarosekonzentration und die angelegte Spannung richtet sich nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente (Sambrook *et al.*, 1989).

100 ml Laufpuffer (1x) werden mit Agarose versetzt und in der Mikrowelle bis zur vollständigen Auflösung der Agarose erhitzt. Nach Abkühlen auf ca. 50°C wird die Lösung in einen abgedichteten Gelträger gegossen und der Gelkamm eingesetzt. Sobald die Agarose erstarrt ist, wird der Kamm herausgezogen und das Agarosegel in eine Gelkammer, die den entsprechenden Laufpuffer enthält, gelegt. Nach Abschluss der Elektrophorese wird das Gel in einer Ethidiumbromidlösung gefärbt (15 min) und die DNA Banden unter UV-Licht photographiert.

- TAE-Puffer (50x) 242 g Tris
57,1 ml Eisessig
100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
ad 1 l dest. H₂O
- TPE-Puffer (10x) 108 g Tris
15,5 ml 85 % H₃PO₄
40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
ad 1 l dest. H₂O

Zur Herstellung der beiden Stocklösungen werden die entsprechenden Chemikalien eingewogen, in 800 ml dest. H₂O gelöst und ein pH-Wert von 8,0 eingestellt. Anschließend wird die Lösung mit dest. H₂O auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

3.10.7 DNA Ligation

Die Ligation gereinigter Vektor- und Insert-DNA, die in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:10 eingesetzt werden, erfolgt in 50 µl Gesamtvolumen in einem Eppendorfcap. Zur Vektor- und Insert-DNA (insgesamt ca. 0,5 µg) werden Ligationspuffer (10x) und 1 µl T4-DNA-Ligase (6 U/µl) gegeben und der Rest mit dest. H₂O aufgefüllt. Im Fall von „sticky end“ Ligationen wird die Reaktion ÜN bei 14–16°C, bei „blunt end“ Ligationen ÜN bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Hitzeinaktivierung der T4-DNA-Ligase (10 min bei 65°C) wird ein Teil des Ligationsansatzes direkt für eine Transformation verwendet.

Zur direkten Klonierung von amplifizierten PCR-Produkten in einen Plasmidvektor wurde das pGEM T-Easy Kit (Promega, Mannheim) benutzt. Laut Anleitung werden 1 µl Vektor-DNA (pGEM T-Easy, bereits gespalten, 3'T-Überhang) mit einer geeigneten Menge PCR-Produkt, 5 µl Puffer (2x) und 1 µl T4-DNA-Ligase versetzt, mit dest. H₂O auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und ÜN bei 4°C inkubiert. Anschließend wird der Ansatz für eine Transformation eingesetzt.

3.10.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der PCR gelingt es, DNA-Fragmente spezifisch zu amplifizieren. Dabei werden Polymerasen aus thermophilen Bakterien zur Synthese der DNA eingesetzt. Diese Polymerasen bewirken den Einbau der Nukleotide in die verwendeten Oligonukleotid-Primer (Saiki *et al.*, 1988). Für Standardreaktionen wurde der PCR-Ansatz (Mullis und Faloona, 1987) mit den Taq-Polymerasen von Promega und Qiagen sowie mit dem Supermix (Gibco) laut Anleitung angesetzt. PCR-Produkte, die für Klonierungen eingesetzt wurden oder größer als 3 kb waren, wurden nach Herstellerangaben mit dem Polymerasengemisch „Elongase“ (Gibco, 3′–5′–Exonuklease-Aktivität) amplifiziert. Die Annealing-Temperatur richtet sich nach der Schmelztemperatur (T_m) der Primer/DNA-Komplexe, wobei für jedes hybridisierende GC-Paar 4°C und für jedes hybridisierende AT-Paar 2°C angenommen wird. Haben die beiden Primer unterschiedliche Schmelztemperaturen, wird die niedrigere als Annealing-Temperatur herangezogen. Die Polymerisationsdauer richtet sich nach der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments, wobei von der Faustregel von 1000 Nukleotiden pro min ausgegangen wird. Als Template werden sowohl Plasmid-DNA als auch chromosomale DNA verwendet. Anstelle von isolierter DNA können aber auch ganze Bakterien eingesetzt werden. Dazu wird eine Bakterienkolonie in einem Eppendorfcap in 100 µl sterilem H₂O für 10 min aufkocht, schnell auf Eis abgekühlt, zentrifugiert und 1 µl des Überstands für die PCR verwendet.

Der PCR-Ansatz wird gemischt, kurz zentrifugiert und dann in das PCR-Gerät gegeben. Nach einem 2 min Aufkochen bei 95°C läuft die PCR in der Regel unter den folgenden Bedingungen ab:

1. Hitzedenaturierung (30 sec, 95°C); Trennung der doppelsträngigen DNA
2. Annealing (45 sec, $T_m - 2^\circ\text{C}$); Primeranlagerung
3. Extension (1 kb/min, 68°C bzw. 72°C); Verlängerung der Primer an ihrem 3′-OH-Ende mit dNTPs

Dieser Zyklus wird insgesamt 30 mal durchlaufen. Die entstandenen PCR-Produkte werden mittels eines analytischen Agarosegels überprüft.

3.10.9 Herstellung von kompetenten Bakterienzellen

Kompetente Zellen nach der CaCl₂-Methode

49 ml LB Medium werden mit 1 ml einer Bakterien ÜNK beimpft und bei 37°C in einem Rotationsschüttler inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 0,6–0,8 erreicht ist. Die Kultur wird in sterilen JA20-Röhrchen zentrifugiert (3.000 Upm, 5 min, 4°C), der Überstand

abdekantiert, das Zellpellet in 25 ml eiskaltem 100 mM CaCl₂ resuspendiert und anschließend erneut zentrifugiert (3.000 Upm, 5 min, 4°C). Danach wird das Bakteriensediment in 1,5 ml eiskaltem 100 mM CaCl₂ aufgenommen und 1 h auf Eis belassen. Nach Zugabe von 1 ml eiskaltem 86 % Glycerin (Endkonzentration 15 %) und guter Durchmischung werden die kompetenten Zellen, die für eine Transformation mittels Hitzeschock eingesetzt werden, in Eppendorfcaps zu je 150 µl aliquotiert. Die Aufbewahrung erfolgt bei –70°C.

Kompetente Zellen für die Elektroporation

Es werden 200 ml LB Medium mit 2 ml einer Bakterien ÜNK beimpft und bei 37°C in einem Rotationsschüttler bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5-1,0 kultiviert. Nach einer 15–30 min Inkubation auf Eis werden die Bakterienzellen in sterile JA10-Becher überführt und bei 6.000 Upm und 4°C (10 min) geerntet. Man dekantiert den Überstand ab, resuspendiert das Pellet in 200 ml eiskaltem sterilem dest. H₂O und zentrifugiert erneut (6.000 Upm, 4°C, 10 min). Dieser Waschvorgang wird anschließend mit jeweils 100 ml eiskaltem sterilem dest. H₂O und 5 ml eiskaltem sterilem 10 % Glycerin wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wird das Bakterienpellet in 500 µl eiskaltem sterilem 10 % Glycerin aufgenommen und in Aliquots von je 50 µl bei –70°C aufbewahrt.

3.10.10 Transformation von Bakterienzellen

Transformation mittels Hitzeschock (CaCl₂-Methode)

Ein geeigneter Teil eines Ligationsansatzes bzw. ca. 0,1 µg in dest. H₂O gelöster Plasmid-DNA werden zu 50 µl der zuvor langsam (30–60 min) auf Eis aufgetauten kompetenten Bakterienzellen gegeben, diese Mischung 30–60 min auf Eis inkubiert und anschließend ein 5 min Hitzeschritt bei 37°C durchgeführt. Nach weiteren 5–10 min auf Eis wird der Transformationsansatz in 1 ml LB Medium überführt und 60–90 min bei 37°C in einem Rotationsschüttler inkubiert. Von dieser Bakterienkultur werden 200 µl auf einer Selektionsagarplatte (mit entsprechendem Antibiotikum) ausplattiert. Um einen zweiten, konzentrierteren Ausstrich zu erhalten, zentrifugiert man den Rest der Bakteriensuspension für 10 min bei 7.000 Upm, verwirft ca. 600 µl des Überstandes, löst das Pellet im restlichen LB Medium und plattiert auf einer weiteren Selektionsagarplatte aus.

Transformation mittels Elektroporation (Calvin und Hanawalt, 1988)

Man taut ein 50 µl Aliquot kompetenter Zellen langsam auf Eis auf, versetzt den Ansatz mit 1–10 µl in sterilem dest. H₂O gelöster Plasmid-DNA (0,01-0,1 µg) oder mit 1–5 µl eines Ligationsansatzes, inkubiert 1 min auf Eis und pipettiert die Mischung in eine sterile, zuvor gekühlte Elektroporationsküvette (2 mm Elektrodenabstand). Die Elektroporation der Bakterienzellen erfolgt unter diesen Bedingungen: U = 2,5 kV, C = 25 µF, R = 600 Ω. Danach wird die Bakteriensuspension sofort mit 1 ml LB Medium aus der Küvette gespült, in ein Eppendorfcap gegeben und 1 h bei 37°C geschüttelt. Nach kurzem Zentrifugieren (4.000 Upm, 2 min, RT) und Verwerfen des Überstandes wird das Bakteriensediment in 200 µl LB Medium resuspendiert und auf einer Selektionsagarplatte ausplattiert.

3.10.11 Konjugation

Die Konjugation des Suizidplasmides pPH13 mit defektem oriR6K und mobRP4-Region erfolgte vom Donor *E. coli* S17-1λpir (Ap^s) in den *C. freundii* Stamm 3009 (Ap^r) als Rezipienten. Im *E. coli* S17-1λpir ist ein Derivat des lysogenen λ-Phagen integriert, der das *pir* Gen trägt, das das Protein π kodiert, welches essentiell für die Replikation von Plasmiden mit oriR6K ist (Kolter *et al.*, 1978). Zusätzlich ist im Chromosom des Stammes S17-1λpir ein Derivat des Plasmides RP4 mit *tra* Genen, die für den konjugativen Apparat kodieren, vorhanden. Dadurch wird der Transfer von Plasmiden mit mobRP4-Region in verschiedene Gram-negative Rezipienten ermöglicht (Simon *et al.*, 1983).

Für die Konjugation werden Einzelkolonien von Donor und Rezipient auf LB Agarplatten ohne Antibiotika kreuzweise übereinander gestrichen. Nach einer Inkubation bei 37°C für mindestens 4 h wird ein Teil des Bakterienrasens abgenommen und damit auf einer Selektionsagarplatte (mit 50 µg/ml Ap und 15 µg/ml Km) ein Vereinzlungsausstrich durchgeführt.

3.10.12 Southernblot

Mit dem Southernblot Verfahren wird das DNA Bandenmuster eines Agarosegels auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert (Southern, 1975). Wird die Nylonmembran anschließend mit einer markierten DNA-Sonde behandelt, die nur an komplementäre DNA-Fragmente hybridisiert, lassen sich diese DNA-Fragmente

spezifisch aus einer großen Anzahl weiterer DNA-Fragmente identifizieren.

Ein mit Ethidiumbromid gefärbtes TPE-Agarosegel wird zusammen mit einem fluoreszierenden Lineal unter UV-Licht photographiert, um später die Größen der hybridisierten DNA-Fragmente bestimmen zu können. Die DNA-Fragmente werden in einer Vakuum-Blot-Apparatur (VakuGene-Blotter, Pharmacia) aus dem TPE-Agarosegel auf die Nylonmembran (Hybond-N⁺) transferiert. Dazu wird eine der Größe des TBE-Agarosegels angepasste Nylonmembran zunächst mit dest. H₂O (5 min) und anschließend mit 20x SSC (5 min) befeuchtet. Danach legt man die Nylonmembran auf eine Trägerplatte in der Vakuum-Blot-Apparatur, deckt sie mit einer Plastikmaske an den Rändern ab und lässt das TPE-Agarosegel luftblasenfrei darauf gleiten. Um eine hohe Transfereffizienz zu erzielen, erfolgt zunächst eine Depurinierung der DNA mit HCl. Nachdem man die Geloberfläche vollständig mit 0,25 M HCl bedeckt hat, wird ein Unterdruck von 50 mbar angelegt und es folgt eine 20 min Einwirkphase. Zur Denaturierung der DNA wird das Gel für 20 min mit 1,5 M NaCl in 0,5 M NaOH überschichtet. Abschließend wird die DNA für weitere 20 min mit 0,5 M Tris in 1,5 M NaCl (pH 7,5) neutralisiert. Der eigentliche Transfer der DNA auf die Nylonmembran erfolgt durch 60 min Blotten mit 20x SSC. Anschließend wird die Nylonmembran für je 1 min in 0,4 M NaOH und in 0,2 M Tris-HCl (pH 7,5) gewaschen. Durch die Einwirkung von UV-Licht in einem UV-Crosslinker wird die DNA schließlich kovalent an die Nylonmembran gebunden.

- 20x SSC (pH 7,0) 175,32 g NaCl
88,23 g Na-Citrat
ad 1 l dest. H₂O

3.10.13 Southern-Hybridisierung mit dem ECL-Kit

Die Nylonmembran mit der darauf fixierten DNA wird aufgerollt in ein Hybridisierungsröhrchen gegeben, mit 25 ml Hybridisierungslösung (enthalten im ECL-Kit, angesetzt mit 0,5 M NaCl) versetzt und 1 h bei 42°C unter Rotation im Hybridisierungsofen vorhybridisiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Danach gibt man die in der Zwischenzeit markierte DNA-Sonde zu und hybridisiert bei 42°C über Nacht im Hybridisierungsofen.

Die Markierung der DNA-Sonde mit Peroxidase erfolgt nach Herstellerangaben. Eine Lösung von 0,1–0,5 µg gereinigter Sonden-DNA in 10 µl sterilem dest. H₂O wird für 10 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt (5 min). Nach Zugabe

von 10 µl DNA-Labeling-Mix sowie 10 µl Glutaraldehyd-Lösung wird der Ansatz gut gemischt und für 10 min bei 37°C inkubiert.

Am folgenden Tag wird die hybridisierte Nylonmembran in einer Schale zunächst zweimal in vorgewärmter Waschlösung 1 (0,4 % SDS, 0,5x SSC) für 10 min bei 50°C im Wasserbad und anschließend zweimal mit Waschlösung 2 (2x SSC) bei RT gewaschen. In der Dunkelkammer bedeckt man die Nylonmembran mit jeweils 7,5 ml der Detektionslösungen 1 und 2, schwenkt gut (1 min), legt die Nylonmembran auf Whatmanpapier und wickelt alles luftblasenfrei in Frischhaltefolie ein. Zur Detektion der Chemilumineszenz wird in einer Exponierkassette ein Hyperfilm-ECL aufgelegt und je nach Stärke des Signals zwischen 2 min und 2 h exponiert. Zur erneuten Hybridisierung derselben Nylonmembran mit einer anderen DNA-Sonde wird die Nylonmembran in eine kochende 0,5 % SDS-Lösung gelegt, auf einem Schüttler bis zur Abkühlung auf RT inkubiert und mit 2x SSC gewaschen, bevor mit einer erneuten Vorhybridisierung begonnen wird.

3.10.14 DNA Sequenzierung

Die Bestimmung der Nukleotidsequenzen erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruchmethode von Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Grundlage dieser Methode ist die Herstellung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge und deren anschließender Auftrennung in einem denaturierenden Polyacrylamidgel. Mit dem automatischen DNA Sequenziergerät LiCor Modell 4000 (MWG Biotech, Ebersberg) werden die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Primer mit Hilfe eines Lasers detektiert.

Zuerst werden mittels einer PCR DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge hergestellt. Der Reaktionsansatz wird mit dem „Thermo-Sequenase fluorescent labelled 7-deAza-dGTP-Kit“ nach Angaben des Herstellers (Amersham Pharmacia Biotech) zusammengestellt. Als Template für die dsDNA Sequenzierung wird gereinigte Plasmid-DNA verwendet. Man versetzt 3–5 µl Plasmid-DNA (100 ng pro kb) mit 1 µl des fluoreszenzmarkierten Primers (1 pmol) und füllt auf 13 µl Gesamtvolumen mit dest. H₂O auf, mischt die Lösung und zentrifugiert. Anschließend werden jeweils 3 µl dieses Ansatzes in 4 verschiedene, zuvor mit je 1 µl der Dideoxy-Nukleotidmischungen A, C, G und T bestückte, Eppendorfcaps pipettiert, gemischt und zentrifugiert. Die nachfolgende PCR in einem Thermocycler läuft nach einem 2 min Aufkochen bei 95°C unter den folgenden Bedingungen ab:

30 sec, 95°C	Hitzedenaturierung	
30 sec, $T_m - 2^\circ\text{C}$	Annealing	
30 sec, 70°C	Extension	30 Zyklen

Danach werden 3 μl Stopp-Puffer zugegeben und die Proben bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt. Auf das Polyacrylamidgel werden jeweils 1,5 μl der Proben aufgetragen.

Die Auswertung der Nukleotidsequenzen erfolgte mit den Programmen Autoassembler, GCG, CLUSTALW und DNA-Strider. Homologie-Vergleiche auf Nukleotid- oder Aminosäureebene wurden mittels BLAST Search (NCBI) durchgeführt.

3.11 Biochemische Methoden

3.11.1 Präparation von Proteinen

Bakterielles Gesamtzell-Lysat

Zur Gewinnung von bakteriellen Gesamtzell-Lysaten durch Lyse mit Laemmli-Puffer (Laemmli, 1970) werden 1 ml einer Bakterien ÜNK in einer Tischzentrifuge sedimentiert (14000 Upm, 5 min), der Überstand verworfen, das Pellet in 100 μl dest. H_2O resuspendiert und mit 25 μl Laemmli-Puffer (5x) versetzt. Anschließend wird die Suspension 10 min bei 96°C aufgekocht (das Lysat sollte klar werden), zentrifugiert (14000 Upm, 1 min) und der klare Überstand in ein neues Eppendorfcap überführt. Zur Proteinanalyse werden 1–3 μl dieses Überstands auf ein PAA-Gel aufgetragen. Für die Durchführung eines Westernblots werden 10–25 μl des Überstands verwendet.

- Laemmli-Puffer (5x) 1,1 g SDS
 0,41 g EDTA
 0,17 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
 1,1 ml β -Mercaptoethanol
 mit NaOH pH 7,2 einstellen, mit dest. H_2O auf 10 ml auffüllen
 10 ml 50 % Glycerin mit 20 mg Bromphenolblau

Hitze-Extraktion von Fimbrienproteinen (Khan und Schifferli, 1994)

Typ 1 Fimbrien können, wie beispielsweise auch 987P Fimbrien, durch eine Hitze-Extraktion isoliert werden. Dazu wird das Bakteriensediment von 50 ml einer Kultur in 5 ml 0,5 mM Tris-HCl (pH 7,4) aufgenommen und für 30 min bei 60°C unter Schütteln in einem Wasserbad inkubiert. Nach einer Zentrifugation (30 min, 12000 Upm, 4°C) wird der Überstand zur Konzentration der bakteriellen Oberflächenproteine auf einen

Zellulosefilter (Centricon YM-10, Millipore, Eschborn, Deutschland) überführt und zentrifugiert (ca. 40 min, 4500 Upm, 15°C).

3.11.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte durch eine diskontinuierliche Vertikalgelelektrophorese in einem SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970; Schagger *et al.*, 1988). Die Herstellung des Laufpuffers und der benötigten Lösungen für die Herstellung der PAA-Gele erfolgte nach der Anleitung im Laborhandbuch (Sambrook *et al.*, 1989). Für das Gießen der PAA-Gele wird eine gebrauchsfertige 30 % Acrylamid- / 0,8 % Bisacrylamid-Stammlösung (Roth, Karlsruhe) verwendet. Die Polyacrylamid-Endkonzentration im Gel beträgt je nach Fragestellung 10–15 %. Der Elektrophoreselauf erfolgt in einer Minigelkammer (BioRad) bei 32 mA (1 Gel) bzw. 36 mA (2 Gele) für ca. 1 h (bis die Bromphenolblau-Front den unteren Rand der Glasplatten erreicht). Dabei wandern die SDS-komplexierten und dadurch negativ geladenen Proteine zur Anode. Anschließend wird das PAA-Gel entweder angefärbt, um die aufgetrennten Proteinbanden sichtbar zu machen, oder direkt für den Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran eingesetzt.

- SDS-PAGE-Puffer (10x) 30 g Tris-Base
 188 g Glycin
 100 ml 10 % SDS
 ad 1 l dest. H₂O

- Sammelgel (5 %) 0,835 ml 30 % Acrylamid- / 0,8 % Bisacrylamid-Lösung
 1 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
 3,062 ml dest. H₂O
 50 µl 10 % APS
 50 µl 10 % SDS
 3 µl TEMED

- Trenngel (13 %) 4,3 ml 30 % Acrylamid- / 0,8 % Bisacrylamid-Lösung
 2 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
 3,495 ml dest. H₂O
 100 µl APS
 100 µl SDS
 5 µl TEMED

3.11.3 Westernblot

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen wurde das Westernblot-Verfahren eingesetzt (Towbin *et al.*, 1979). Die Proteine werden nach der elektrophoretischen Auftrennung vom PAA-Gel durch ein halbtrockenes Verfahren mit einer Graphitplattenkammer auf eine Nitrozellulose- oder auf eine PVDF-(Polyvinylidendifluorid) Membran transferiert. Zuerst werden alle benötigten Whatmanpapiere und die Membran auf Gelgröße zugeschnitten. Auf die mit dest. H₂O befeuchtete Graphitplatte der Anode werden sechs mit Anodenpuffer 1 getränkte Whatmanpapiere gelegt, gefolgt von drei mit Anodenpuffer 2 getränkten Whatmanpapieren und der ebenfalls mit Anodenpuffer 2 befeuchteten Membran. Darauf legt man luftblasenfrei das PAA-Gel auf und bedeckt es mit drei mit Kathodenpuffer getränkten Whatmanpapieren. Zum Schluss wird die mit dest. H₂O befeuchtete Graphitplatte der Kathode aufgesetzt und die Proteine für 60–75 min stromkonstant bei 0,8 mA/cm² Gelfläche auf die Membran transferiert.

- Anodenpuffer 1 0,3 M Tris-Base
 20 % Methanol
 dest. H₂O

- Anodenpuffer 2 25 mM Tris-Base
 20 % Methanol
 dest. H₂O

- Kathodenpuffer 25 mM Tris-Base
 40 mM ε-Amino-n-Caprinsäure
 20 % Methanol
 dest. H₂O

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran werden zunächst die noch freien Proteinbindungsstellen auf der Membran mit 5 % Magermilchpulver (BioRad) in TBS (pH 7,37) abgesättigt (ÜN bei 15°C). Anschließend wird die Membran kurz in TBS gewaschen. Die Inkubation der Membran in Gegenwart von Antikörpern erfolgt in TBS mit 1 % Milchpulver für 1–3 h bei Raumtemperatur. Als primäre Antikörper werden polyklonale Antiseren in Verdünnungen von 1:200 bis 1:1000 und als sekundärer Antikörper ein Anti-Kaninchen IgG (aus Schweinen, gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase, 1:2000 verdünnt) verwendet (s. Tab. 9, Kap. 3.5). Durch anschließendes dreimaliges Waschen mit 0,05 % Tween20 in TBS für je 5 min werden nicht-gebundene Antikörper entfernt. Die Detektion der an die entsprechenden Epitope gebundenen

Antikörper erfolgt nach Anleitung des Herstellers (Amersham-Pharmacia) mit dem ECL-Kit (s. Kap. 3.10.13).

Um eine spezifischere Antikörperreaktion zu erhalten, wurden die primären Antikörper ggf. mehrmals im Westernblot verwendet.

- TBS (1x) 10 mM Tris-HCl (pH 7,4)
 154 mM NaCl

3.11.4 Färbung von Proteinen in PAA-Gelen

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden im PAA-Gel mit Coomassie-Brilliant-Blau angefärbt. Dazu wird das PAA-Gel für 1 h in der Coomassie-Färbelösung auf einem Schüttler inkubiert und anschließend der Hintergrund wieder entfärbt durch ca. 2 h Schütteln in Entfärberlösung. Bei Bedarf wird das PAA-Gel danach bei 80°C auf einem Gelrockner getrocknet.

- Coomassie-Färbelösung 0,2 % Coomassie-Brilliant-Blue R250 (Serva)
 40 % Methanol
 10 % Essigsäure
- Entfärberlösung 40 % Methanol
 10 % Essigsäure

3.12 Radioaktive Markierung von bakteriellen Proteinen

Zur radioaktiven Markierung von Fim Proteinen aus *Citrobacter freundii* 3009 wurden T7-Expressionsvektoren im *E. coli* Stamm BL21pLysS verwendet (Studier, 1991). In diesem System können Gene spezifisch mit der T7-RNA-Polymerase exprimiert werden (Tabor und Richardson, 1985), so dass nur die Proteine der Gene, die sich unter der Kontrolle des T7-Promotors befinden, radioaktiv markiert werden.

Zu 2 ml LB Medium mit 1 % Glukose und entsprechenden Antibiotika (50 µl/ml Ampicillin, 20 µl/ml Chloramphenicol) gibt man 40 µl einer Bakterien ÜNK und inkubiert bei 37°C in einem Rotationsschüttler bis die Bakterienkultur eine OD₆₀₀ von 0,5–0,7 erreicht hat. Das Bakteriensediment aus 1 ml Kultur wird mit LB Medium gewaschen, anschließend in LB Medium, das 2 mM IPTG, 50 µl/ml Ampicillin und 20 µl/ml

Chloramphenicol enthält, resuspendiert, 30 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert und zentrifugiert. Nach Waschen des Pellets mit M9 Medium werden die Bakterien in 1 ml M9 Medium (ohne Methionin und Cystein) für 1 h bei 37°C in einem Rotationsschüttler inkubiert. Danach gibt man 10 µl Rifampicin (20 mg/ml) zu und nach einer weiteren 25 min Inkubationsphase bei 37°C im Rotationsschüttler schließlich eine geeignete Menge (10 µCi) Pro-Mix (Amersham-Pharmacia, Freiburg), eine Mischung aus 70 % [³⁵S]-L-Methionin und 30 % [³⁵S]-L-Cystein. Nach 15 min bei 37°C werden die Bakterien sedimentiert (5 min, 5000 Upm) und zweimal mit PBS gewaschen.

Die elektrophoretische Auftrennung des bakteriellen Gesamtzell-Lysats erfolgt in einem 13 % SDS-Polyacrylamidgel. Danach wird das PAA-Gel zunächst in der Fixierlösung für 30–40 min und nach dreimaligem Waschen mit 10 % Methanol in der Verstärkerlösung für ebenfalls 30–40 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem das PAA-Gel luftblasenfrei in eine Folie eingeschweißt wurde, exponiert man damit eine Matrix-Auflage ÜN in einer Exponierkassette und detektiert die radioaktiven Proteinbanden mit einem Phosphor Imager (S. Khan, persönliche Mitteilung).

- Fixierlösung 10 % Essigsäure
 10 % Methanol

- Verstärkerlösung 10 % Glycerin
 10 % Methanol
 1 M Salicylsäure (pH 7,2)

3.13 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen werden die verschiedenen Bakterienstämme unter geeigneten Bedingungen kultiviert, zentrifugiert, das Bakterienpellet mit 0,9 % NaCl gewaschen und in 0,9 % NaCl resuspendiert. Eine geeignete Menge der Suspension wird direkt auf ein mit Formvar[®] beschichtetes Kupferdrahtnetzchen aufgetropft. Nach der Sedimentation der Bakterien (ca. 1 min) werden diese mit einer 2 % Uranylacetat-Lösung versetzt (30 sec). Danach entfernt man den Flüssigkeitstropfen vom Kupferdrahtnetzchen mit einem Filterpapier, lässt die Netzchen bei Raumtemperatur richtig trocknen und untersucht schließlich die kontrastierten Bakterien mit einem Zeiss 10 A Transmissionselektronenmikroskop bei 60 kV.

4. Ergebnisse

4.1 Plasmidkonstruktionen

4.1.1 Subklonierung der Invasionsdeterminante aus *C. freundii* 3009

Ein Ziel dieser Arbeit war die Ermittlung der für die Invasionsfähigkeit von *C. freundii* 3009 essentiellen Gene. Dazu wurden, ausgehend von der klonierten und sequenzierten Invasionsdeterminante (Plasmid pTO3), verschiedene Teile der Determinante subkloniert und die resultierenden rekombinanten *E. coli* K12 Stämme hinsichtlich ihrer Hefeagglutinations- und Invasioneigenschaften untersucht (Abb. 9).

Die sukzessive Subklonierung von pTO3 erfolgte nach folgendem Schema: das gewünschte DNA-Fragment wurde mittels Restriktionsverdau (s. Kap. 3.10.5) aus pTO3 ausgeschnitten, durch Agarosegelelektrophorese (s. Kap. 3.10.6) von den restlichen Fragmenten abgetrennt, unter Verwendung des Gene Clean Kits (s. Kap. 3.10.3) aus dem Agarosegel isoliert und in den mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdauten und auf die gleiche Weise gereinigten Vektor ligiert. Nach der Ligation wurden die Ansätze zunächst in *E. coli* DH5 α transformiert und auf Selektionsagarplatten (entsprechendes Antibiotikum; Blau-Weiß-Selektion, wenn möglich) ausplattiert. Die Plasmide der erhaltenen Klone wurden in kleinem Maßstab (Diatomeenerde) isoliert, durch anschließenden Restriktionsverdau sowie Sequenzierung charakterisiert und schließlich mittels Calciumchloridmethode in die nicht-invasiven *E. coli* Stämme HB101 und AAEC189 transformiert.

Plasmid pPH1 wurde durch Ligation des 9,6 kb *EcoRI/SalI* Fragmentes aus pTO3 in den mit denselben Restriktionsenzymen geschnittenen Klonierungsvektor pSU19 erhalten. In pPH1 ist noch das 377 bp *EcoRI/BamHI* Fragment aus dem Vektoranteil (pBR322') von pTO3 vorhanden, auf dem der *tet*-Promotor lokalisiert ist und von dem aus die nachfolgenden *fim* Gene transkribiert werden können (Abb. 9).

Damit die auf dem *EcoRI/SalI* Fragment aus pTO3 lokalisierten *fim*_{Cf} Gene *fim*_{CfA,I,C,D,H,F} auch vom mit IPTG induzierbaren *lacZ*-Promotor aus transkribiert

werden können, wurde das 9,6 kb *EcoRI/SalI* Fragment aus pTO3 zusätzlich in den mit denselben Restriktionsenzymen geschnittenen Klonierungsvektor pSU18, welcher sich vom Vektor pSU19 lediglich in der Orientierung der MCS (multiple cloning site) unterscheidet, eingebracht. Das daraus resultierende Plasmid wurde mit pPH10 bezeichnet (s. Abb. 12).

Die Ligation des 7,1 kb *EcoRI/XhoI* Inserts aus pTO3 in den mit *EcoRI* und *SalI* verdauten Expressionsvektor pT7-3 ergab Plasmid pB7-3 (B. Schulte-Holthausen, unveröffentlichte Ergebnisse), in dem die Expression der inserierten *fim_{Cf}* Gene entweder vom T7 Promotor $\Phi 10$ oder vom *tet*-Promotor aus kontrolliert werden kann.

Das Plasmid pAA8 wurde konstruiert, indem das 5,9 kb *BamHI* Fragment aus pTO3 in den mittels Restriktionsverdau mit *BamHI* linearisierten Vektor pSU19 eingebracht wurde (Altenhöfer, 2001).

Durch Ligation des 6,2 kb *PstI* Fragments aus pTO3 in die *PstI* Schnittstelle des Klonierungsvektors pBluescript II KS(+) wurde Plasmid pPH19 erhalten. In den Plasmiden pAA8 und pPH19 werden die vorhandenen *fim* Gene unter der Kontrolle des *lacZ*-Promotors transkribiert (Abb. 9).

In Plasmid pPH24 ist in der Nähe der *PstI* Schnittstelle im für die Hauptuntereinheit kodierenden Gen *fimA* ein 768 bp großes IS1 Element von *E. coli* inseriert, und zwar entgegen der Leserichtung von *fimA*. Die Charakterisierung dieser Insertion erfolgte durch geeigneten Restriktionsverdau und Sequenzierung über die Insertionsstelle hinweg. Die ermittelte Sequenz ist im Anhang (Kap. 7.2.2) angegeben.

Sowohl die Plasmide pPH1 und pPH10, in denen die Gene *fimU*, *fimW* und *fimY* nicht mehr vorhanden sind, als auch das Plasmid pB7-3, in welchem zusätzlich noch *zimZ* inaktiviert ist, verleihen nicht-invasiven *E. coli* K12 Stämmen (HB101, AAEC189) weiterhin Invasivität und die Fähigkeit zur Mannose-sensitiven Hefeagglutination (Abb. 9). In *Salmonella typhimurium* haben diese *fim* Gene regulatorische Funktionen (Clegg und Hughes, 2002; Tinker *et al.*, 2001; Tinker und Clegg, 2001; Tinker und Clegg, 2000). Für die Vermittlung von Adhäsions- bzw. Invasionseigenschaften sind sie in der klonierten Invasionsdeterminante von *C. freundii* 3009 entbehrlich. Eine weitere Verkleinerung des Inserts von pB7-3 führt allerdings zum Verlust dieser Eigenschaften, was mit Plasmid pAA8, in dem ein am 3'-Ende verkürztes *fimF* vorliegt, demonstriert werden konnte. Darüber hinaus resultiert eine Inaktivierung von *fimA*, entweder durch Fehlen des 5'-Bereichs (Plasmid pPH19) oder durch Insertion eines IS1 Elements (Plasmid pPH24), ebenfalls in nicht-agglutinierenden bzw. nicht-invasiven rekombinanten *E. coli* Stämmen (Abb. 9).

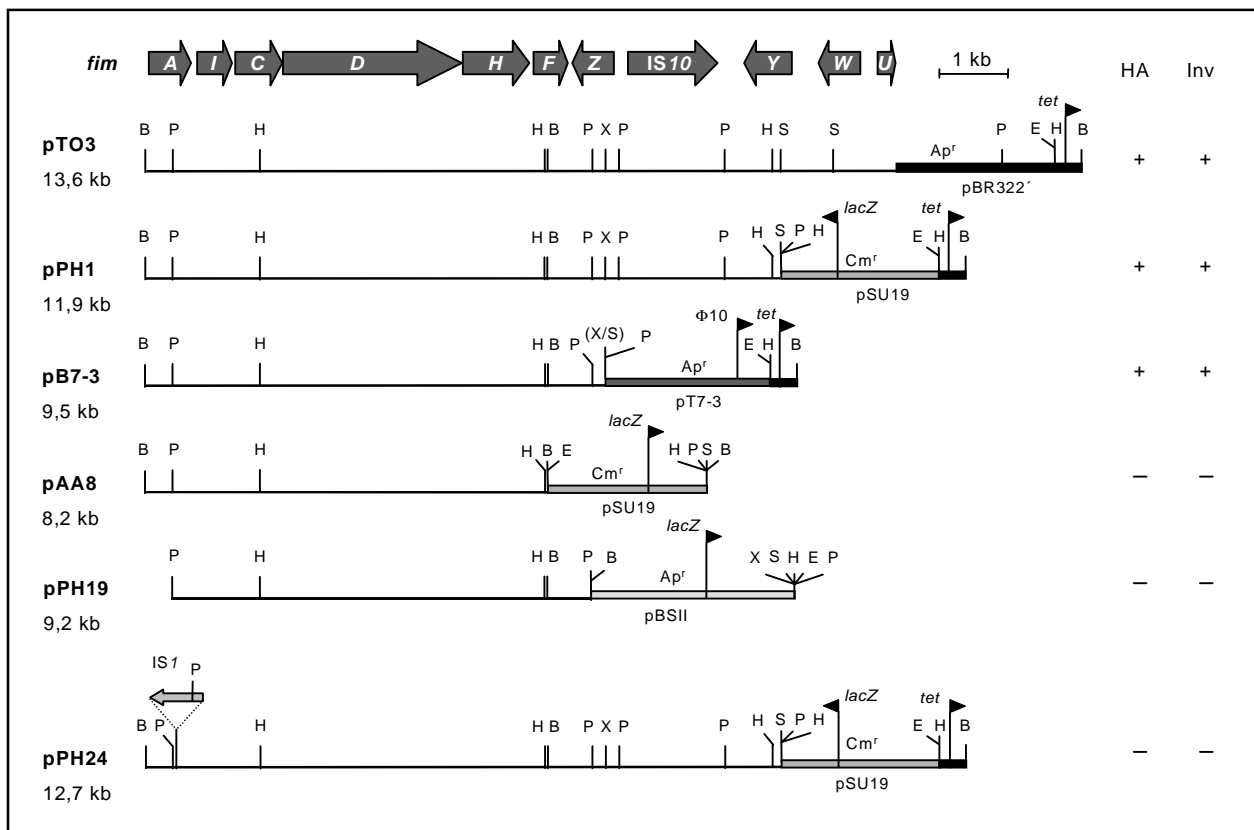


Abb. 9 Physikalische Karte von verschiedenen Plasmiden, die das *fim* Gencluster aus *C. freundii* 3009 vollständig (pTO3) bzw. partiell enthalten. Die Pfeile geben die relative Größe, Lage und Transkriptionsrichtung der einzelnen Gene an. Ausgefüllte Rechtecke markieren den Vektoranteil in den unterschiedlichen Plasmiden. Die Orientierung der verschiedenen Promotoren im Vektoranteil ist durch Fähnchen markiert. Die Gene *fimA*, *fimI*, *fimC*, *fimD*, *fimH* und *fimF* reichen aus, um den rekombinanten *E. coli* HB101 oder AAEC189 sowohl die Fähigkeit zur Hefeagglutination als auch Invasivität zu vermitteln.

B: *Bam*HI; E: *Eco*RI; H: *Hind*III; P: *Pst*I; S: *Sal*I; X: *Xho*I

HA: Hefeagglutination; Inv: Invasionsfähigkeit; pBSII: pBluescript II KS(+)

Zur Vermittlung von Invasivität und der Fähigkeit zur Mannose-sensitiven Hefeagglutination sind mindestens die sechs auf dem Insert von Plasmid pB7-3 lokalisierten *C. freundii* *fim* Gene *fimA*, *fimH* und *fimF* (Strukturgene) sowie *fimC* (periplasmatisches Chaperon), *fimD* (Usher) und *fimI* (Funktion bisher unbekannt) essentiell, während die regulatorischen Gene *fimZ*, *fimY* und *fimW* sowie das eine Arginin tRNA kodierende Gen *fimU* nicht unbedingt benötigt werden.

4.1.2 Plasmide zur Konstruktion chromosomaler Deletionsmutanten

Zur Charakterisierung der für die Invasionsfähigkeit von *C. freundii* 3009 notwendigen Gene sollte der zentrale Teil des *fim* Genclusters aus dem Chromosom deletiert werden. Zu diesem Zweck wurden zunächst verschiedene Plasmide kloniert (Abb. 10).

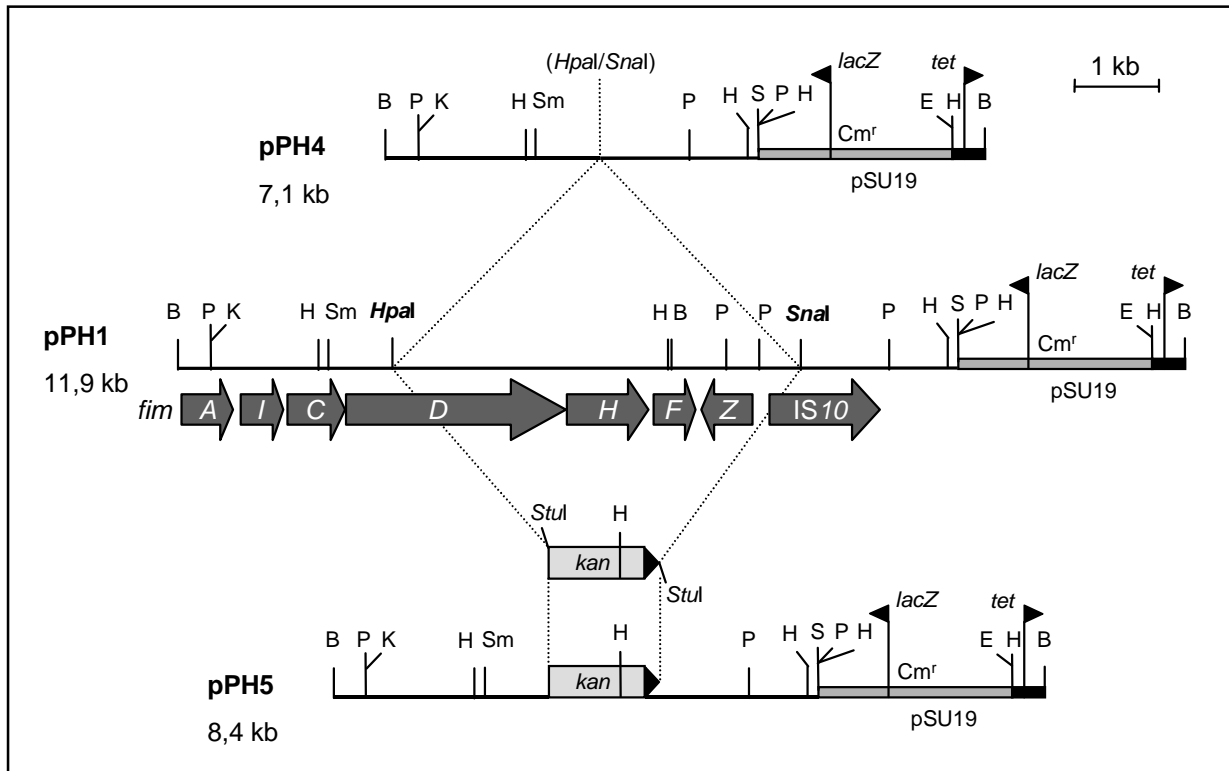


Abb. 10 Konstruktion der Plasmide pPH4 und pPH5, die als Grundlage für die Herstellung von *C. freundii* Wildtyp Deletionsmutanten verwendet wurden. Durch die Deletion des *HpaI/SnaI* Fragments werden die Gene *fimD*, *fimH*, *fimF* und *fimZ* deletiert bzw. inaktiviert. Die Pfeile geben die relative Größe, Lage und Transkriptionsrichtung der einzelnen Gene an. Ausgefüllte Rechtecke markieren den Vektoranteil in den unterschiedlichen Plasmiden. Die Orientierung der verschiedenen Promotoren im Vektoranteil ist durch Fähnchen markiert.

B: *Bam*HI; E: *Eco*RI; H: *Hind*III; K: *Kpn*I; P: *Pst*I; S: *Sal*I; Sm: *Sma*I

Das Plasmid pPH1 wurde mit den beiden glatte („blunt“) Enden erzeugenden Restriktionsenzymen *HpaI* und *SnaI* geschnitten, die beiden erhaltenen Fragmente über Agarosegelelektrophorese voneinander getrennt und das gewünschte 7,1 kb Fragment mittels Gene Clean Kit isoliert. Dieses DNA Fragment wurde zum einen für eine Religation verwendet und das resultierende Plasmid pPH4 genannt. Zum anderen wurde in das 7,1 kb *HpaI/SnaI* Fragment aus pPH1 eine, zuvor über einen

Restriktionsverdau mit *StuI* aus dem Plasmidvektor pACYC177 isolierte, 1,3 kb große Kanamycin-Kassette mittels „blunt-end“ Ligation eingebracht. Das erhaltene Plasmid wurde mit pPH5 bezeichnet (Abb. 10). Die Isolierung und Charakterisierung dieser Plasmide erfolgte wie in Kap. 4.1.1 beschrieben.

Darüber hinaus wurden das 4,8 kb *EcoRI/SalI* Fragment aus pPH4 bzw. das 6,1 kb *EcoRI/SalI* Fragment aus pPH5 in den Klonierungsvektor pSU18, der sich vom Vektor pSU19 lediglich in der Orientierung der MCS (multiple cloning site) unterscheidet, eingebracht. Dadurch können die in den resultierenden Plasmiden pPH11 bzw. pPH12 vorhandenen Gene zusätzlich vom *lacZ*-Promotor aus transkribiert werden.

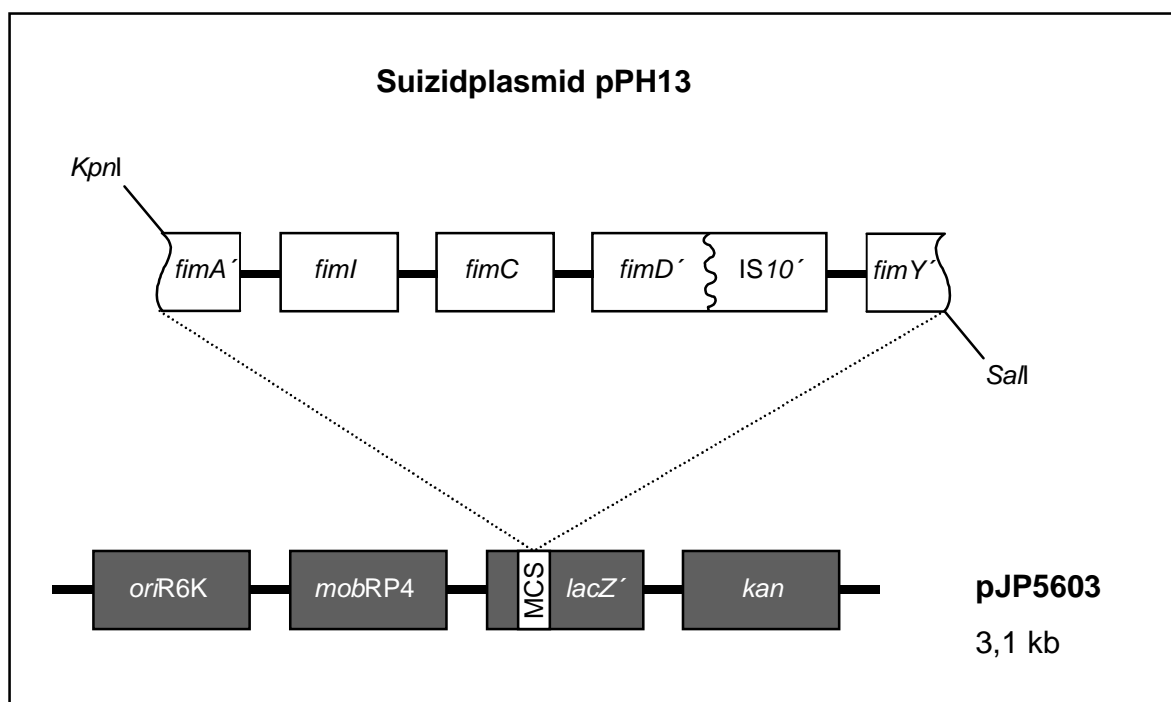


Abb. 11 Schematische Darstellung des Suizidplasmids pPH13 (7,1 kb), das für die Konstruktion der chromosomalen Deletionsmutante 3009-dz verwendet wurde. Die relevanten Merkmale des mobilisierbaren Suizidvektors pJP5603, der linear dargestellt ist, sind eingezeichnet.

Die Konstruktion des Suizidplasmids pPH13 (Abb. 11), das für die Herstellung der *C. freundii* Deletionsmutante 3009-dz verwendet wurde, erfolgte über die Ligation des 4 kb *SalI/KpnI* Fragments aus pPH4 in die MCS des mit denselben Restriktionsenzymen geschnittenen Suizidvektors pJP5603 (Penfold und Pemberton, 1992). Ein Teil des Ligationsansatzes wurde in den *E. coli* Stamm S17-1 λ pir transformiert, welcher die Replikation des Suizidplasmides pPH13 erlaubt (vgl. Kap. 3.10.11).

4.1.3 Komplementationsstudien

Zur Komplementation von inaktivierten *C. freundii* *fim* Genen in trans wurden die Plasmide pPH6, pPH7, pPH8, pPH9 und pPH23 konstruiert. Gemeinsames Merkmal dieser Plasmide ist, dass sie alle das 5,7 kb *SmaI/SnaI* Fragment aus pPH1 (s. Abb. 10) enthalten, auf dem die Gene *fimD*, *fimH*, *fimF* und *fimZ* kodiert sind. Die Isolierung und Charakterisierung dieser Plasmide erfolgte wie in Kap. 4.1.1 beschrieben.

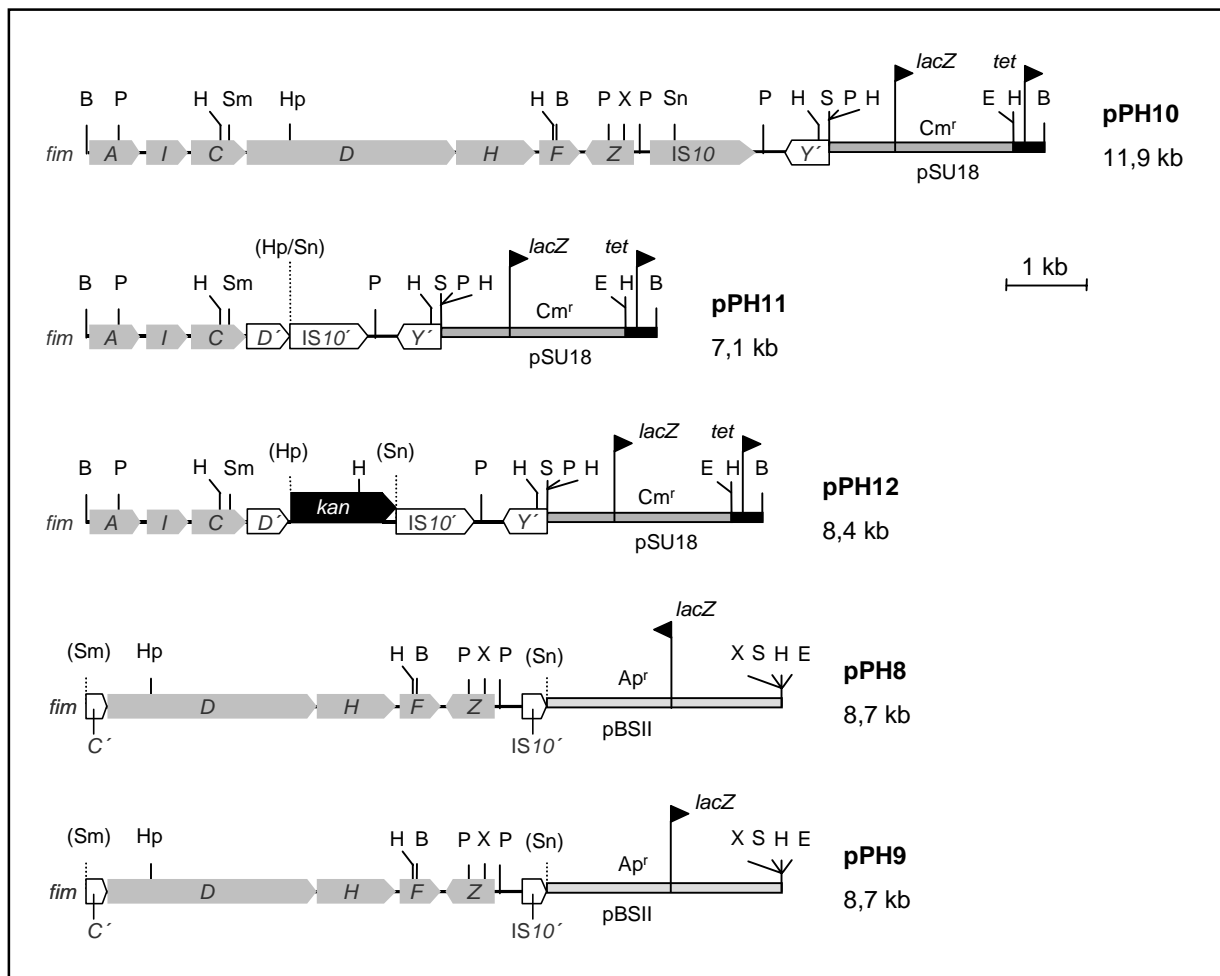


Abb. 12 Physikalische Karte von verschiedenen Plasmiden, die für Komplementationsstudien verwendet wurden. Die Pfeile geben die relative Größe, Lage und Transkriptionsrichtung der einzelnen Gene an. Verkürzte Gene sind durch nicht-ausgefüllte Pfeile dargestellt. Ausgefüllte Rechtecke markieren den Vektoranteil in den unterschiedlichen Plasmiden. Die Orientierung der verschiedenen Promotoren im Vektoranteil ist durch Fähnchen angegeben.

B: *Bam*HI; E: *Eco*RI; H: *Hind*III; Hp: *Hpa*I; P: *Pst*I; S: *Sal*I; Sm: *Sma*I; Sn: *Sna*I; X: *Xho*I
pBSII: pBluescript II KS(+)

Zunächst wurde das 5,7 kb *Sma*I/*Sna*I Fragment aus pPH1 über eine „blunt-end“ Ligation in beiden möglichen Orientierungen in die *Srf*I Schnittstelle in der MCS des Klonierungsvektors pPCRScriptCam (Stratagene) inseriert. Die resultierenden Plasmide sind pPH6, in dem lediglich *fimZ* unter der Kontrolle des *lacZ*-Promotors steht, und pPH7, in dem die Gene *fimD*, *fimH* und *fimF* vom *lacZ*-Promotor aus transkribiert werden können. Anschließend wurde das 5,7 kb *Sma*I/*Sna*I Fragment mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Sac*I aus der MCS des Vektors pPCRScriptCam in den Plasmiden pPH6 und pPH7 ausgeschnitten und in den mit denselben Restriktionsenzymen verdauten Klonierungsvektor pBluescript II KS(+) (Stratagene) ligiert. Die erhaltenen Plasmide wurden als pPH8 und pPH9 bezeichnet. In Plasmid pPH9 können die Gene *fimD*, *fimH* und *fimF* vom *lacZ*-Promotor aus transkribiert werden, in Plasmid pPH8 lediglich *fimZ* (Abb. 12).

Für Komplementationsstudien der *C. freundii* Wildtyp Mutanten 3009-dz und 3009-dz::*kan* wurde das Plasmid pPH23 konstruiert, in dem das 5,7 kb *Sma*I/*Sna*I Fragment aus pPH1 in den mit dem Restriktionsenzym *Sma*I linearisierten, mobilisierbaren Vektor pK19mob (Schäfer *et al.*, 1994) kloniert wurde. Als charakteristische Merkmale enthält dieser „broad-host-range“ Vektor die Gene *oriV*, *lacZ* α (mit MCS), *kan* und *mobRP4* (mit *oriT*). Als Donor für den Transfer des Plasmids pPH23 wurde der *E. coli* Stamm S17-1 verwendet, in dessen Chromosom ein Derivat des Plasmids RP4, das über *tra* Gene verfügt, integriert ist (Simon *et al.*, 1983).

Um einen ersten Hinweis darauf zu erhalten, ob das 5,7 kb *Sma*I/*Sna*I Fragment aus pPH1, auf dem die Gene *fimD*, *fimH*, *fimF* und *fimZ* lokalisiert sind, geeignet ist, die entsprechenden inaktivierten *fim* Gene in trans zu komplementieren, wurden jeweils die zur Mutagenese konstruierten Plasmide pPH11 und pPH12 zusammen mit den Plasmiden pPH8 bzw. pPH9 (Abb. 12) in die *E. coli* Stämme HB101 und AAEC189 transformiert, die beide keine Typ 1 Fimbrien exprimieren. Anschließend wurden die resultierenden rekombinanten Stämme hinsichtlich ihrer Hefeagglutinationseigenschaften untersucht (Tab. 12). Die Mannose-sensitive Agglutination mit Bäckerhefe stellt einen einfachen phänotypischen Nachweis für das Vorhandensein eines Mannose-bindenden Adhäsins dar.

Als Stammm Hintergrund für diese Untersuchungen wurden sowohl *E. coli* HB101, der zwar das *fim*_{Ec} Gencluster im Chromosom enthält, aber keine Typ 1 Fimbrien exprimiert, als auch *E. coli* AAEC189, in dem das komplette *fim*_{Ec} Gencluster deletiert ist (Blomfield *et al.*, 1991), ausgewählt. Auf diese Weise sollten Stamm-spezifische Effekte, wie regulatorische bzw. komplementatorische Effekte der auf den transformierten Plasmiden kodierten *Citrobacter fim* Gene (*fim*_{Cf}) auf die in HB101 vorhandenen *E. coli fim* Gene (*fim*_{Ec}), ausgeschlossen werden.

Tab. 12 Hefeagglutination verschiedener rekombinanter *E. coli* Stämme in Gegenwart und Abwesenheit von Mannose

Stamm	intakte <i>fim</i> _{Cf} Gene	Hefeagglutination	
		Hefe	Hefe + 100mM Mannose
HB101 / AAEC189			
pPH8	<i>fimD,H,F,Z</i>	–	–
pPH9	<i>fimD,H,F,Z</i>	–	–
pPH11	<i>fimA,I,C</i>	–	–
pPH12	<i>fimA,I,C</i>	–	–
pPH8/pPH11	<i>fimD,H,F,Z / fimA,I,C</i>	+	–
pPH8/pPH12	<i>fimD,H,F,Z / fimA,I,C</i>	–	–
pPH9/pPH11	<i>fimD,H,F,Z / fimA,I,C</i>	+	–
pPH9/pPH12	<i>fimD,H,F,Z / fimA,I,C</i>	–	–
pPH10	<i>fimA,I,C,D,H,F,Z</i>	+	–
pSU18	–	–	–
pBS II KS	–	–	–

In Plasmid pPH9 werden die Gene *fimD*, *fimH* und *fimF* vom *lacZ*-Promotor des Vektors pBluescript II KS (pBS II KS) aus transkribiert, nicht jedoch das auf dem Gegenstrang kodierte Gen *fimZ*. Dagegen steht in Plasmid pPH8 lediglich *fimZ* unter der Kontrolle des *lacZ*-Promotors. In Plasmid pPH12 ist eine Kanamycin-Kassette in die Deletionsstelle inseriert (vgl. Abb. 12).

Als Positivkontrollen wurden die Stämme HB101pPH10 und AAEC189pPH10 verwendet, die, wie erwartet, eine Mannose-sensitive Hefeagglutination zeigten, wohingegen die Stämme mit den Vektorkontrollen (pSU18 und pBS II KS) nicht agglutinierten. Bei allen getesteten Plasmiden spielte der jeweilige Stammhintergrund bezüglich der Hefeagglutinationseigenschaften keine Rolle. Zur Induktion des *lacZ*-Promotors in den Plasmiden pPH8, pPH9, pPH10, pPH11 und pPH12 wurden die entsprechenden rekombinanten Stämme auch mit 1 mM IPTG im Wachstumsmedium angezogen, was allerdings keinen Einfluss auf die beobachteten Hefeagglutinationseigenschaften der jeweiligen rekombinanten Stämme hatte.

Nach den Ergebnissen der Hefeagglutinationstests lässt sich nur die in Plasmid pPH11 vorliegende Deletion der Gene *fimD*, *fimH*, *fimF* und *fimZ* in trans komplementieren, während für die rekombinanten Stämme, die das Plasmid pPH12 tragen, in dem eine Kanamycin-Kassette in die Deletionsstelle inseriert ist, der erwartete Phänotyp durch Komplementation mit den Plasmiden pPH8 oder pPH9 nicht beobachtet werden konnte.

Möglicherweise könnte diese Tatsache auf einen polaren Effekt der Kanamycin-Kassette zurückzuführen sein, wodurch die Transkription der stromabwärts der Kanamycin-Kassette liegenden Gene unterbunden wird.

Interessanterweise gelang die Komplementation von pPH11 nicht nur mit dem Plasmid pPH9, in dem die Gene *fimD*, *fimH* und *fimF* unter der Kontrolle des *lacZ*-Promotors stehen, sondern auch mit dem Plasmid pPH8, in dem dies lediglich für das in die entgegengesetzte Richtung transkribierte Gen *fimZ* der Fall ist. Eine mögliche Erklärung dafür ist das Vorhandensein einer Promotorregion (GATAAC) sowie einer Shine-Dalgarno-Box (GAGAU) vor der Translationsinitiationsstelle von *fimD* (vgl. Sequenz im Anhang, Kap. 7.2.1).

4.1.4 Klonierung des *fim* Genclusters aus *E. coli* 536 und IHE3034

Das *E. coli* Typ 1 Fimbrien Gencluster, das sich in Anordnung, Anzahl und Art der einzelnen *fim* Gene von dem aus *Salmonella typhimurium* unterscheidet (s. Kap. 2.2, Abb. 3), ist im Chromosom von pathogenen Stämmen, aber auch im apathogenen *E. coli* K12 Stamm MG1655, dessen Genom vollständig sequenziert wurde (Blattner *et al.*, 1997), enthalten.

Aus den beiden pathogenen *E. coli* Stämmen 536 (UPEC) und IHE3034 (MENEC) wurde das Typ 1 Fimbrien Gencluster in PCRs mittels Primern (536fim1 und 536fim2), die spezifisch an nicht-kodierende DNA Sequenzen nahe des 5'-Endes von *fimA* bzw. des 3'-Endes von *fimH* binden, amplifiziert und anschließend in den Vektor pGEM T-Easy ligiert (Abb. 13). Neben dem *fim* Gencluster enthält der uropathogene *E. coli* Stamm 536 (O6:K15:H31) in seinem Chromosom zusätzliche Gene für verschiedene Virulenzfaktoren, die normalerweise auf Pathogenitätsinseln (PAIs) lokalisiert sind. Bei dem K1 Stamm IHE3034 handelt es sich um ein NBM (newborn meningitis) Isolat.

Für die PCRs wurden die beiden spezifischen Primer 536fim1 und 536fim2 verwendet, so dass das *fim* Gencluster ohne die beiden regulatorischen Gene *fimB* und *fimE*, die Rekombinasen kodieren, amplifiziert wurde. Dieses durch Agarosegelelektrophorese gereinigte PCR-Produkt wurde in den Vektor pGEM T-Easy ligiert (Abb. 13). Eine Überprüfung der daraus resultierenden Plasmide pPH21 (*fimA,I,C,D,F,G,H* aus 536) und pPH22 (*fimA,I,C,D,F,G,H* aus IHE3034) erfolgte durch Restriktionsverdau sowie durch Sequenzierung mit den Primern M13Uni und M13Reverse, die jeweils im Vektoranteil binden.

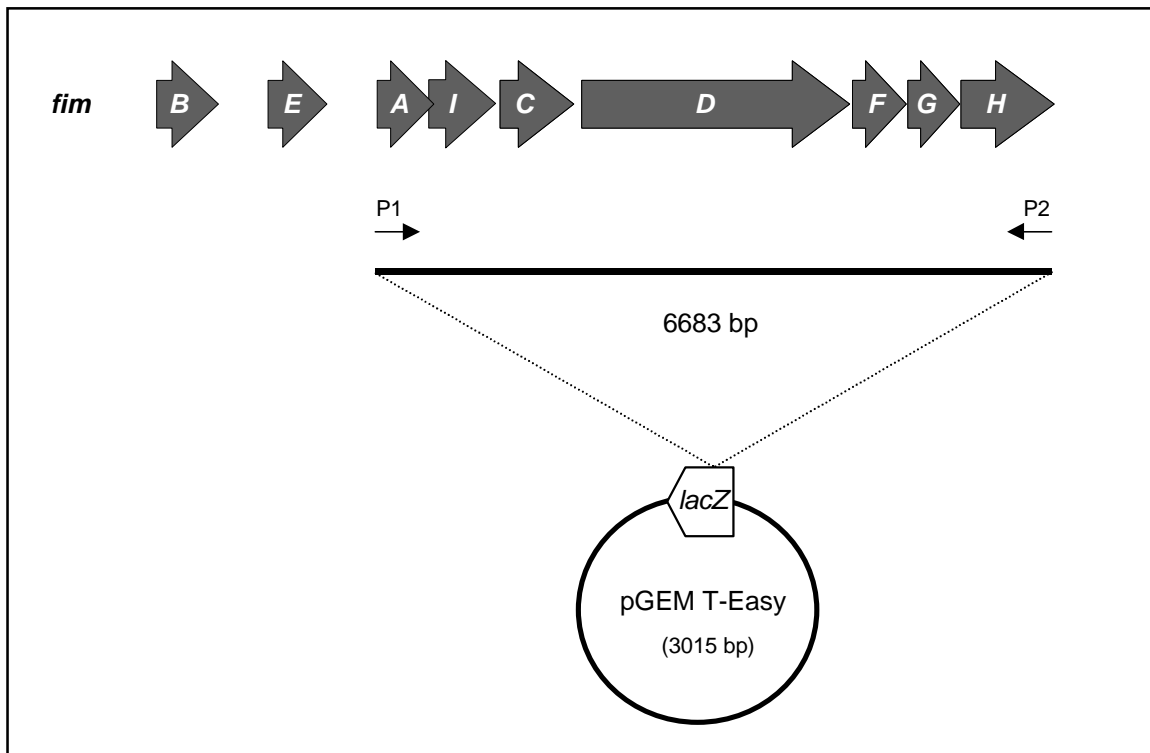


Abb. 13 Amplifizierung und Klonierung des Typ 1 Fimbrien Clusters aus den pathogenen *E. coli* Stämmen 536 und IHE3034. Die grau unterlegten Pfeile geben die relative Größe, Lage und Transkriptionsrichtung der einzelnen Gene an.

P1: Primer 536fim1; P2: Primer 536fim2

Das *fim* Gencluster aus *E. coli* 536 bzw. aus IHE3034 wurde ohne den Promotor für *fimA*, welcher sich auf einem 314 bp großen invertierbaren DNA-Fragment stromaufwärts von *fimA* befindet, amplifiziert (Abb. 13). In den Plasmiden pPH21 und pPH22 befinden sich die jeweiligen PCR-Produkte nicht unter der Kontrolle des *lacZ*-Promotors, so dass mit diesen beiden Plasmiden Funktionsstudien erst nach einer Umklonierung möglich sind.

Zusammenfassung der Ergebnisse in Abschnitt 1

Durch Subklonierung der Invasionsdeterminante aus *C. freundii* 3009 und anschließender Untersuchung der rekombinanten *E. coli* Stämme HB101 bzw. AAEC189 auf ihre Hefeagglutinations- und Invasioneigenschaften hin wurden die für die Invasionsfähigkeit von *C. freundii* notwendigen Gene ermittelt.

Es wurden verschiedene Plasmide zur Herstellung sowie zur in trans Komplementation von *C. freundii* Wildtyp Deletionsmutanten konstruiert.

Hefeagglutinationsstudien zeigten, dass sich auf Plasmidebene nur die Deletionsmutante in trans komplementieren lässt, nicht jedoch die Deletions-Insertionsmutante, bei der sich eine Kanamycin-Kassette in der Deletionsstelle befindet.

Das Typ 1 Fimbrien Gencluster aus den pathogenen *E. coli* Stämmen 536 (UPEC) und IHE3034 (MENEK) wurde ohne die beiden Gene *fimB* und *fimE*, die Rekombinasen kodieren, amplifiziert und in den Vektor pGEM T-Easy ligiert.

4.2 Konstruktion und Teilcharakterisierung von *C. freundii* Wildtypmutanten

Um weitere Hinweise darauf zu erhalten, dass das klonierte und sequenzierte *fim*_{Cr} Gencluster auch im *C. freundii* Wildtyp als Invasionsystem fungiert, wurden *C. freundii* Wildtypmutanten erstellt, in denen der zentrale Teil des *fim* Genclusters deletiert ist. Dabei wurde einerseits der 5´-Bereich von *fimD* mit dem 5´-Bereich von IS10 fusioniert. Andererseits wurde in dieselbe Deletionsstelle eine Kanamycin-Kassette inseriert, so dass eine Deletions-Insertionsmutante erhalten wurde.

4.2.1 Konstruktion und PCR-Analyse der Deletions-Insertionsmutante 3009-dz::*kan*

Für die Herstellung der *C. freundii* Wildtypmutante 3009-dz::*kan* wurde der Stamm 3009 mit dem linearen 4,5 kb *Pst*I Fragment aus Plasmid pPH5 (s. Abb. 10), das eine Kanamycin-Kassette enthält, transformiert (Elektroporation). Die Expression der Kanamycin-Resistenz ist in diesem Fall nur möglich, wenn das lineare Fragment durch homologe Rekombinationen in einem Doppelcrossover-Ereignis erfolgreich in das *Citrobacter* Chromosom integriert wird, bevor es durch wildtypische Restriktionsnukleasen abgebaut wird. Das Ausplattieren auf Kanamycin-haltigen LB-Agarplatten ergab 22 resistente Klone, von denen 3 mittels PCR auf ihren Genotyp hin untersucht wurden.

Die erhaltenen Klone wurden durch PCR-Analyse der chromosomalen DNA auf das Vorhandensein der Kanamycin-Kassette in der generierten Deletionsstelle überprüft. Hierfür wurden die Primerpaare PH45uni2/PH45rev2, PH45uni2/KArev2, PH45rev2/KAuni2, CFfimD1/CFfimD2 und CFfimH1/CFfimH2 verwendet. Die Primer des ersten Paares binden 262 bp stromaufwärts der *Hpa*I (PH45uni2) bzw. 260 bp stromabwärts der *Sna*I Schnittstelle (PH45rev2). Dadurch kann bei den Mutanten ein 1,8 kb DNA-Fragment amplifiziert werden, während für den Wildtyp unter den gewählten PCR-Bedingungen (Elongationszeit = 2 min) das entsprechende PCR-Produkt, das theoretisch eine Größe von 5,4 kb hat, nicht erhalten wird. Zum Nachweis des Einbaus der Kanamycin-Kassette in der gewünschten Stelle im *C. freundii* Chromosom wurden die Primer PH45uni2 und PH45rev2 in weiteren PCRs zusammen mit den Primern KArev2 (Abb. 14, Primerkombination 2) bzw. KAuni2 (Abb. 14, Primerkombination 3) verwendet, die jeweils in der Kanamycin-Kassette binden. Beim Wildtyp sollte mit diesen beiden Primerpaaren kein DNA-Fragment amplifiziert werden, wogegen bei den Mutanten PCR-Produkte der erwarteten Größe (962 bp mit PH45uni2/KArev2 bzw. 1018 bp mit PH45rev2/KAuni2) erhalten wurden (Abb. 14).

Schließlich wurde noch das Fehlen der Gene *fimD* (partiell), *fimH* und *fimZ* in den Mutanten mittels PCRs mit den Primerpaaren CFfimD1/CFfimD2, CFfimH1/CFfimH2 und CFfimZuni/CFfimZrev nachgewiesen. Während beim Wildtyp die erwarteten DNA-Fragmente (1030 bp mit CFfimD1/CFfimD2, 811 bp mit CFfimH1/CFfimH2 bzw. 577 bp mit CFfimZuni/CFfimZrev) amplifiziert werden konnten, wurden für die Mutanten keine PCR-Produkte erhalten. Alle drei Mutanten zeigten in der PCR-Analyse identische Ergebnisse. Daher wurde für die anschließende Southernblot-Analyse (s. Kap. 4.2.3) nur ein Klon verwendet und als 3009-dz::*kan* bezeichnet.

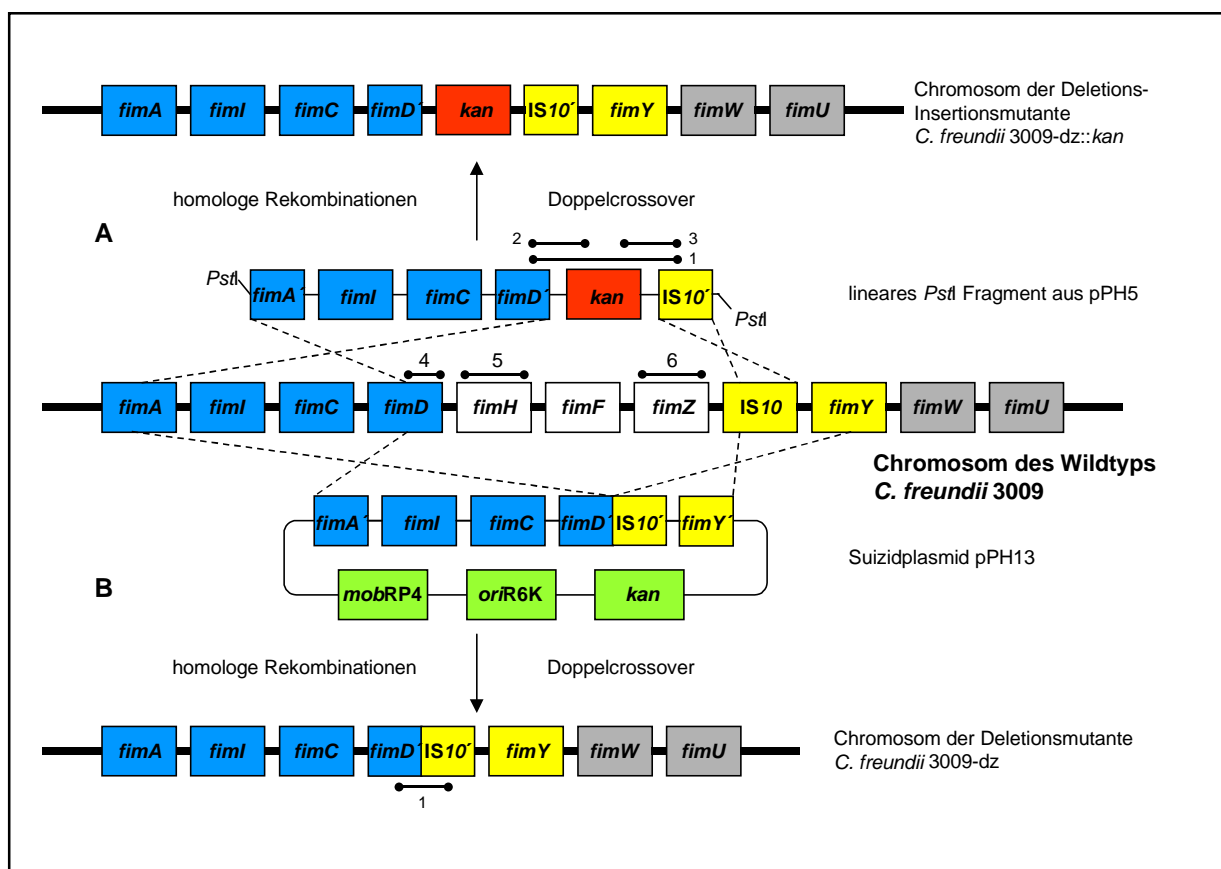


Abb. 14 Schematische Darstellung der Konstruktion der *C. freundii* Wildtypmutanten 3009-dz::*kan* (A) und 3009-dz (B) durch zwei nacheinander stattfindende homologe Rekombinationsereignisse. Die gekennzeichneten Crossover Stellen sind willkürlich gewählt. Die Größe der durch Rechtecke symbolisierten Gene und der durch eine von Punkten begrenzte Linie (●—●) gekennzeichneten PCR-Produkte ist nicht maßstabsgetreu wiedergegeben. Für die Charakterisierung des Genotyps der beiden Wildtypmutanten wurden die folgenden Primerkombinationen verwendet: 1: PH45uni2/PH45rev2; 2: PH45uni2/KArev2; 3: PH45rev2/KAuni2; 4: CFfimD1/CFfimD2; 5: CFfimH1/CFfimH2; 6: CFfimZuni/CFfimZrev.

4.2.2 Konstruktion und PCR-Analyse der Deletionsmutante 3009-dz

Für die Herstellung einer *C. freundii* 3009 Deletionsmutante, in der das Gen *fimD* mit *IS10* fusioniert ist, wurde das Suizidplasmid pPH13 (s. Abb. 11) aus dem Donorstamm *E. coli* S17-1 λ pir in den *C. freundii* Stamm 3009 konjugiert. Das Suizidplasmid pPH13 kann aufgrund des fehlenden Proteins π nicht selbständig in *C. freundii* 3009 replizieren. Durch Selektion auf Kanamycin-haltigen LB-Agarplatten erhält man Klone, in denen nach einer erfolgten homologen Rekombination das komplette Suizidplasmid in den Zielbereich des Chromosoms integriert ist. Fünf dieser Kanamycin-resistenten Klone wurden weiter in LB Medium ohne Selektionsdruck über Nacht kultiviert und fünfmal überimpft. Dabei kann in einem zweiten homologen Rekombinationsschritt (Doppelcrossover) das Suizidplasmid aus dem Chromosom ausgeschnitten werden, wobei entweder der ursprüngliche wildtypische Zustand wieder hergestellt oder der Austausch des Wildtyp-Allels durch den *in vitro* mutierten Genbereich erreicht wird (Abb. 14).

Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurden wieder Kanamycin-sensitiv gewordene Klone mittels PCR untersucht. Mit dem Primerpaar PH45uni2/PH45rev2 ließ sich die gewünschte Deletion durch die Amplifikation eines 522 bp großen DNA-Fragmentes nachweisen. Das Nichtvorhandensein der Gene *fimD* (partiell), *fimH* und *fimZ* wurde wiederum mit den Primerkombinationen CFfimD1/CFfimD2, CFfimH1/CFfimH2 und CFfimZuni/CFfimZrev überprüft (Abb. 14). Die erhaltene Wildtyp Deletionsmutante wurde 3009-dz genannt.

4.2.3 Southernblot-Analyse

Der Genotyp der beiden konstruierten *C. freundii* Wildtyp Mutanten 3009-dz::*kan* und 3009-dz wurde zudem mittels Southernblot-Analyse charakterisiert. Dazu wurde die chromosomale DNA der *C. freundii* Stämme 3009, 3009-dz und 3009-dz::*kan* sowie die DNA von *E. coli* AAEC189 als Negativkontrolle mit den Restriktionsenzymen *Hind*III und *Pst*I gespalten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Anschließend wurde der Blot nacheinander mit vier verschiedenen Sonden hybridisiert.

Durch die Hybridisierung des Blots mit der DNA-Sonde PH1Pst (6,2 kb *Pst*I Fragment aus Plasmid pPH1, auf dem die Gene *fimA* und *fimZ* partiell und *fimI*, *fimC*, *fimD*, *fimH* und *fimF* vollständig enthalten sind) konnten für den Wildtyp 3009 für die mit *Hind*III gesplattene chromosomale DNA, wie erwartet, Banden von 4,2 kb und 3,3 kb detektiert werden (Abb. 15). Die zusätzliche Bande bei 6,2 kb repräsentiert ein DNA-Fragment,

das den Bereich von der *HindIII* Schnittstelle in *fimC* bis hin zur nächsten *HindIII* Schnittstelle im Chromosom stromaufwärts des *fim* Genclusters beinhaltet. Diese Bande war bei allen drei untersuchten *C. freundii* Stämmen zu beobachten. Außerdem trat bei dem mutagenisierten Stamm 3009-dz ein Signal bei 2,6 kb auf, wohingegen die entsprechende Bande für den Stamm 3009-dz::*kan* lediglich 1,7 kb aufwies, was auf eine *HindIII* Schnittstelle im 3'-Ende der Kanamycin-Kassette zurückzuführen ist (s. Abb. 10 und Abb. 15).

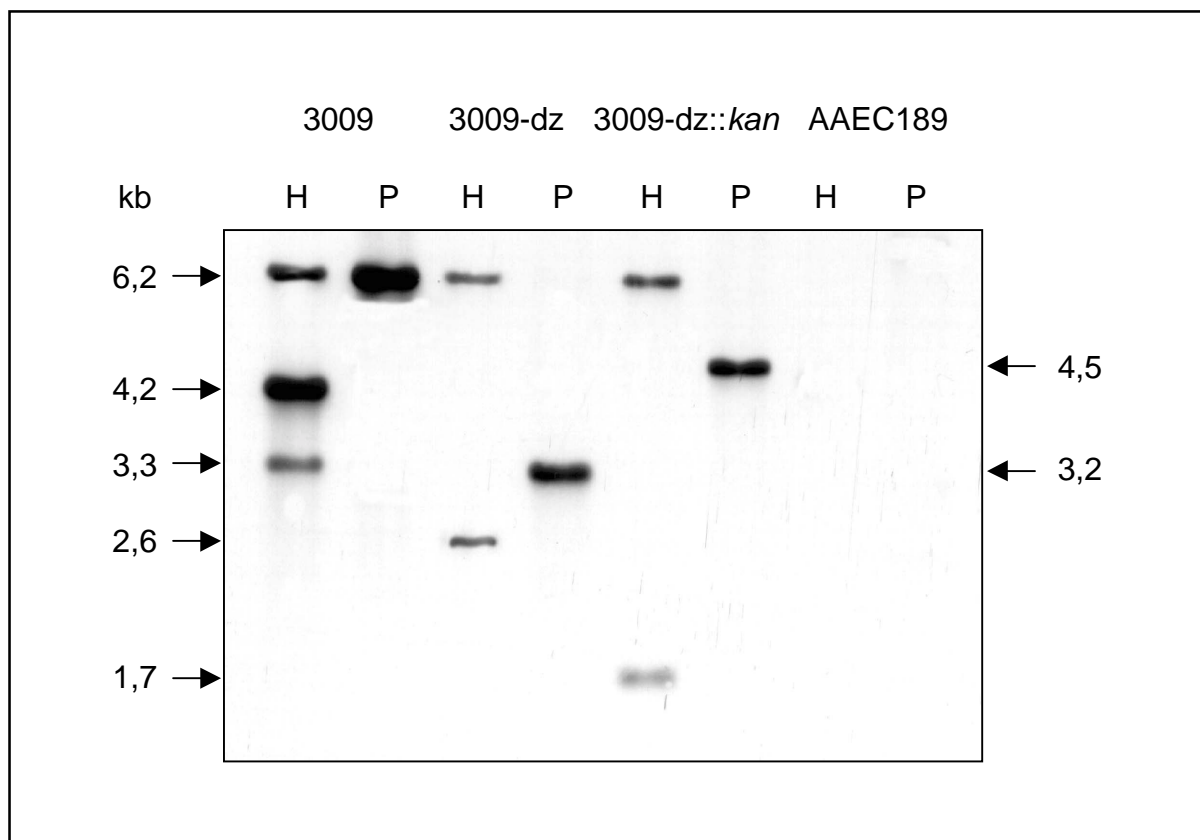


Abb. 15 Southernblot-Analyse der mit *HindIII* (H) und *PstI* (P) gespaltenen chromosomalen DNA der *C. freundii* Stämme 3009 (Wildtyp), 3009-dz und 3009-dz::*kan* sowie des *E. coli* Stammes AAEC189 (Negativkontrolle). Als Sonde wurde PH1Pst (6,2 kb *PstI* Fragment aus Plasmid pPH1) verwendet.

Für die mit *PstI* gesplattene chromosomale DNA wurde für den Wildtyp 3009 das der Sonde entsprechende 6,2 kb große Fragment nachgewiesen. Dagegen konnte für den Stamm 3009-dz ein Signal bei 3,2 kb beobachtet werden, das beim Stamm

3009-dz::*kan* aufgrund der Integration der Kanamycin-Kassette um 1300 bp größer ist. Für den als Negativkontrolle verwendeten *E. coli* AAEC189, in dem das *fim* Gencluster vollständig deletiert wurde (Blomfield *et al.*, 1991), waren keine Signale zu erkennen (Abb. 15).

Die Rehybridisierung desselben Blots mit der PCR generierten, *fimD* spezifischen Sonde CFfimD5/6 ergab lediglich für den Wildtyp 3009 die schon zuvor (Abb. 15) beobachteten Signale bei 4,2 kb (*Hind*III Verdau) bzw. bei 6,2 kb (*Pst*I Verdau) (Abb. 16).

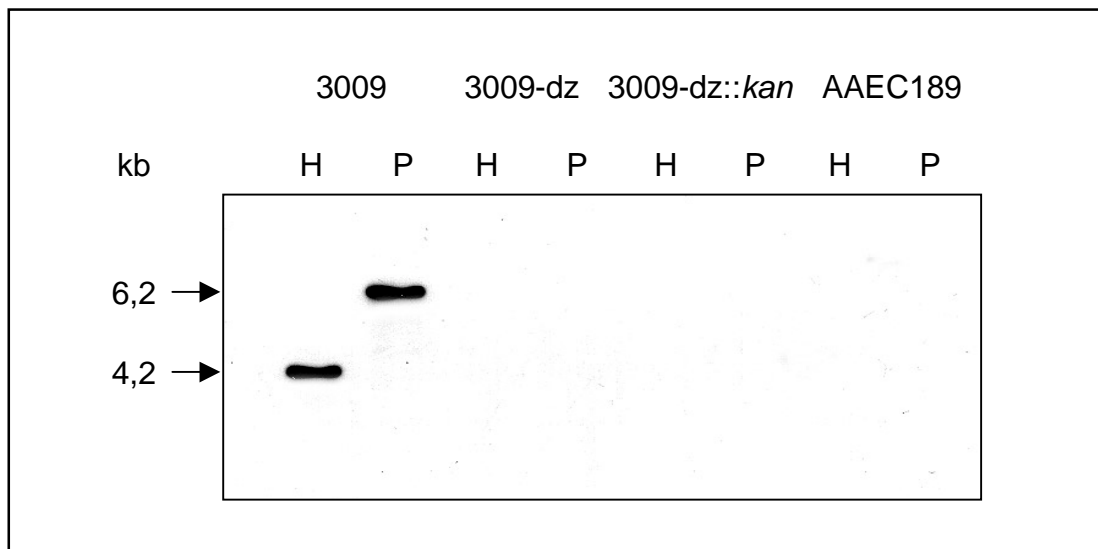


Abb. 16 Southernblot-Analyse der mit *Hind*III (H) und *Pst*I (P) gespaltenen chromosomalen DNA der *C. freundii* Stämme 3009 (Wildtyp), 3009-dz und 3009-dz::*kan* sowie des *E. coli* Stammes AAEC189 (Negativkontrolle). Der Blot wurde mit dem PCR-Produkt CFfimD5/6 (995 bp) als Sonde hybridisiert.

Um die Integration der Kanamycin-Kassette im Chromosom der Mutante 3009-dz::*kan* zu überprüfen, wurde derselbe Blot mit der Sonde Kan-Kass hybridisiert (Abb. 17). Während für die übrigen untersuchten Stämme, wie erwartet, keine Signale zu erkennen waren, wurden für den Stamm 3009-dz::*kan* die schon zuvor bei der Hybridisierung mit dem 6,2 kb *Pst*I Fragment (Abb. 15) beobachteten Banden bei 1,7 kb (*Hind*III Spaltung) bzw. bei 4,5 kb (*Pst*I Spaltung) detektiert (Abb. 17).

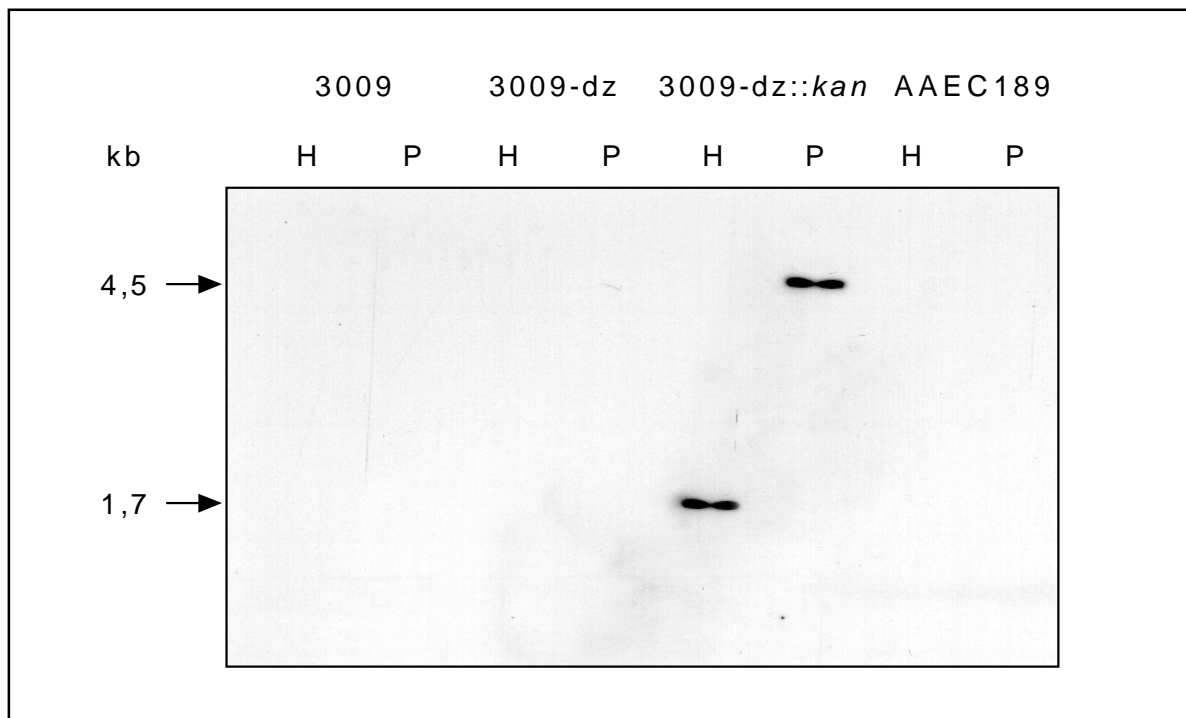


Abb. 17 Southernblot-Analyse der mit *Hind*III (H) und *Pst*I (P) gespaltenen chromosomalen DNA der *C. freundii* Stämme 3009 (Wildtyp), 3009-dz und 3009-dz::*kan* sowie des *E. coli* Stammes AAEC189 (Negativkontrolle). Der Blot wurde mit dem PCR-Produkt Kan-Kass (513 bp) als Sonde hybridisiert.

Schließlich wurde der Blot noch mit einer *IS10* spezifischen Sonde hybridisiert (Abb. 18). Für die mit *Hind*III gesplattene chromosomale DNA des Wildtyps 3009 wurde die erwartete Bande von 3,3 kb detektiert, wohingegen die entsprechenden Signale der Mutanten 3009-dz und 3009-dz::*kan* bei 2,6 kb bzw. bei 2,3 kb zu sehen waren. Im Fall des *Pst*I Verdau lag die für den Wildtyp 3009 erwartete Bande bei 1,5 kb. Dagegen wurde für die Deletionsmutante 3009-dz ein 3,2 kb großes Fragment detektiert, das für den Stamm 3009-dz::*kan* wiederum um 1,3 kb größer ist.

Darüber hinaus wurden für alle drei *C. freundii* Stämme neben den erwarteten Banden noch zusätzliche Banden erhalten, woraus zu schließen ist, dass im Chromosom von *C. freundii* 3009 mehrere *IS10* Kopien vorliegen. Dagegen sollte nach den Ergebnissen dieser Southernblot-Analyse im Chromosom von *E. coli* AAEC189 nur ein *IS10* Element vorhanden sein (Abb. 18).

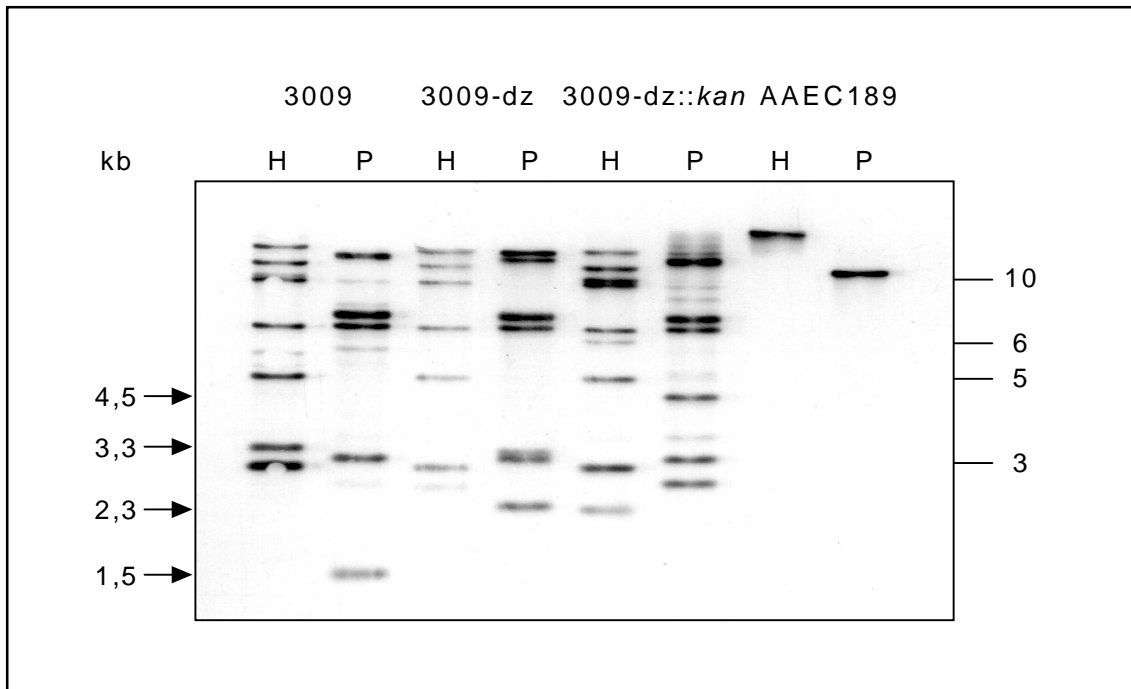


Abb. 18 Southernblot-Analyse der mit *Hind*III (H) und *Pst*I (P) gespaltenen chromosomalen DNA der *C. freundii* Stämme 3009 (Wildtyp), 3009-dz und 3009-dz::*kan* sowie des *E. coli* Stammes AAEC189 (Negativkontrolle). Als Sonde wurde das PCR-Produkt IS10 (922 bp) verwendet.

4.2.4 Komplementation der Deletionsmutante 3009-dz

Zur Komplementation der *C. freundii* Deletionsmutante 3009-dz, in deren Chromosom die *fim*_{Cf} Gene *fimH*, *fimF* und *fimZ* deletiert sowie *fimD* inaktiviert sind, wurde das Plasmid pPH23 (s. Kap. 4.1.3) durch Konjugation aus dem Donorstamm *E. coli* S17-1 in diesen Stamm übertragen.

Als Übertragungsmethode für das Plasmid pPH23 wurde die Konjugation ausgewählt, da in zuvor durchgeführten Untersuchungen festgestellt wurde, dass die nach der Transformation von *C. freundii* 3009 (Elektroporation sowie CaCl₂-Methode) mit verschiedenen Vektoren (pSU19, pACYC177, pUC-4K) erhaltenen Stämme häufig nicht mehr in die humane Blasenepithelzelle T24 invadieren. Eine mögliche Ursache für diese Beobachtung könnte die Selektion auf Bakterienzellen ohne Kapsel bzw. andere Oberflächenstrukturen darstellen, weil solche Bakterienzellen leichter Plasmid-DNA aufnehmen. Dies könnte theoretisch eine veränderte Interaktion dieser Stämme mit den Wirtszellen zur Folge haben.

Die Charakterisierung der Wiederherstellung des wildtypischen Phänotyps von 3009-dzpPH23 erfolgte durch Untersuchung der Hefeagglutinations- (s. Kap. 4.4.1, Tab. 16) und Invasioneigenschaften dieses Stammes (s. Kap. 4.3.1, Abb. 19). Während für die Komplementante *C. freundii* 3009-dzpPH23 auch nach spezieller Kultivierung (Standkultur, mehrmaliges Überimpfen; s. Kap. 3.6.2) kein positives Ergebnis im Hefeagglutinationstest erzielt werden konnte, wurde für diesen Stamm eine relative Invasionsrate in T24 Zellen von 62 % im Vergleich zum Wildtyp *C. freundii* 3009 beobachtet (Altenhöfer, persönliche Mitteilung) (s. Kap. 4.3.1, Abb. 19).

Zusammenfassung der Ergebnisse in Abschnitt 2

Von *C. freundii* 3009 ausgehend wurden zwei Wildtypmutanten konstruiert. Beim Stamm 3009-dz wurde der zentrale Bereich des *fim*_{Cf} Genclusters deletiert. Im Stamm 3009-dz::*kan* ist in dieselbe Deletionsstelle eine Kanamycin-Kassette inseriert.

Der Genotyp der beiden chromosomalen Mutanten 3009-dz und 3009-dz::*kan* wurde mittels PCR- und Southernblot-Analyse charakterisiert und die erwarteten Konstrukte verifiziert.

Die Komplementation der Wildtypmutante 3009-dz erfolgte durch Konjugation des Plasmids pPH23. Die Komplementante 3009-dzpPH23 erreichte in der humanen Blasenepithelzelllinie T24 eine relative Invasionsrate von 62 % im Vergleich zum Wildtyp *C. freundii* 3009.

4.3 Studien zur Invasivität von *C. freundii* 3009 und *E. coli* IHE3034

Die Invasionseffizienzen in verschiedene eukaryontische Zelllinien von *C. freundii* 3009, den beiden Wildtypmutanten 3009-dz und 3009-dz::kan, der Komplementante 3009-dzpPH23, verschiedenen rekombinanten *E. coli* Stämmen und vom NBM Isolat *E. coli* IHE3034 wurden mittels Invasionsassays *in vitro* untersucht. Das Prinzip des Invasionsassays, der auch als Gentamycin-Überlebensassay bezeichnet wird, beruht darauf, dass nach einem bestimmten Zeitraum (Invasionsperiode), der bei den Studien für diese Arbeit 3 h betrug, die extrazellulären Bakterien durch Inkubation in Gentamycin-haltigem Medium abgetötet werden, so dass nur die Bakterien überleben, die zuvor die Wirtszellen invadieren konnten (Elsinghorst, 1994; Tang *et al.*, 1993). Da es sich bei *C. freundii* Stamm 3009 um ein UTI Isolat handelt, wurde in den Invasionsstudien hauptsächlich die humane Harnblasenepithelzelllinie T24 verwendet. Die Internalisierung von *C. freundii* 3009 in T24 Zellen erfolgt rein Mikrotubuli-abhängig (Oelschlaeger *et al.*, 1993). Darüber hinaus wurden Invasionsassays mit aus dem Ileo-Coecum stammenden HCT8 Zellen durchgeführt. Die nicht-invasiven *E. coli* K12 Stämme DH5 α , HB101 und AAEC189 bzw. entsprechende rekombinante Stämme mit den leeren Vektoren dienten als Negativkontrolle. Die als invasive Bakterien bekannten Stämme *Salmonella typhimurium* C17 (Meier *et al.*, 1996) und *Klebsiella pneumoniae* 3091 (Fumagalli *et al.*, 1997) wurden als Positivkontrollen mitgeführt.

4.3.1 Internalisierungsraten verschiedener *C. freundii* 3009 und rekombinanter *E. coli* Stämme

Ausgehend von der Beobachtung, dass die klonierte Invasionsdeterminante aus *C. freundii* 3009 (Plasmid pTO3) nicht-invasiven *E. coli* Stämmen Invasivität vermittelt, sollten die in dieser Arbeit hergestellten bzw. verwendeten Plasmide hinsichtlich ihrer Invasion-vermittelnden Eigenschaften untersucht werden. Dazu wurden die verschiedenen Plasmidkonstrukte in die nicht-invasiven *E. coli* Stämme HB101 und AAEC189 transformiert. Die Invasionseffizienzen der resultierenden Stämme wurden in Invasionsassays mit T24 Zellen ermittelt und mit den für den Wildtyp 3009 sowie für die mit den rekombinanten *E. coli* Stämmen, die das Plasmid pTO3 enthalten, beobachteten Werten verglichen (Tab. 13).

Tab. 13 Absolute Invasionseffizienzen von *C. freundii* 3009 sowie von verschiedenen rekombinanten *E. coli* HB101 und AAEC189 Stämmen für die humane Harnblasen-epithelzelle T24 und Angabe des Verhaltens der jeweiligen Stämme im Hefeagglutinationstest

Stamm	Invasionsrate [%]	Standardabweichung	Mannose-sensitive Hefeagglutination
3009	11,40	± 6,58	+*
HB101pTO3	9,70	± 6,81	+
AAEC189pTO3	6,40	± 4,37	+
HB101pPH1	11,20	± 5,18	+
AAEC189pPH1	8,31	± 4,77	+
HB101pB7-3	5,33	± 2,62	+
AAEC189pAA8	0,02	± 0,03	-
HB101pPH19	0,03	± 0,02	-
AAEC189pPH19	0,11	± 0,06	-
HB101pPH24	0,03	± 0,07	-
AAEC189pPH24	0,12	± 0,03	-
HB101pPH4	0,04	± 0,01	-
AAEC189pPH4	0,13	± 0,10	-
HB101pPH5	0,08	± 0,02	-
AAEC189pPH5	0,24	± 0,18	-
HB101pPH8	0,15	± 0,01	-
AAEC189pPH8	0,32	± 0,11	-
HB101pPH9	0,05	± 0,12	-
AAEC189pPH9	0,09	± 0,01	-
HB101pPH11	0,47	± 0,26	-
AAEC189pPH11	0,26	± 0,14	-
HB101pPH12	0,13	± 0,01	-
AAEC189pPH12	0,22	± 0,21	-
HB101pPH8/pPH11	0,35	± 0,12	+
HB101pPH8/pPH12	0,27	± 0,08	-
HB101pPH9/pPH11	0,15	± 0,07	+
HB101pPH9/pPH12	0,46	± 0,10	-
HB101pBR322	0,01	± 0,01	-
AAEC189pBR322	0,02	± 0,02	-

Stamm	Invasionsrate [%]	Standardabweichung	Mannose-sensitive Hefeagglutination
HB101pSU18	0,01	± 0,01	–
AAEC189pSU18	0,04	± 0,01	–
HB101pSU19	0,05	± 0,04	–
AAEC189pSU19	0,05	± 0,02	–
HB101pT7-3	0,02	± 0,01	–
HB101pBSII	0,02	± 0,01	–
AAEC189pBSII	0,01	± 0,04	–

Es sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängig voneinander im Duplikat durchgeführten Experimenten mit den dazugehörigen Standardabweichungen aufgelistet.

* Bei *C. freundii* 3009 wurde nur nach geeigneter Kultivierung (s. Kap. 3.6.2) ein positives Ergebnis im Hefeagglutinationstest beobachtet.

Lediglich die mit den Plasmiden pPH1 und pB7-3 transformierten *E. coli* Stämme zeigten vergleichbare Invasionsraten zu den rekombinanten *E. coli* Stämmen, die das Plasmid pTO3 enthalten. Die Invasivität-vermittelnde Eigenschaft der Plasmide pTO3, pPH1 und pB7-3 ist unabhängig vom *E. coli* Stammhintergrund (HB101 bzw. AAEC189). Gemeinsames Merkmal dieser Plasmide ist, dass sie die für den Typ 1 Fimbrienaufbau zuständigen Gene (*fimA*, *fimI*, *fimC*, *fimD*, *fimH* und *fimF*) kodieren, während die regulatorischen Gene *fimZ*, *fimY*, *fimW* und *fimU* ganz oder teilweise fehlen (s. Abb. 9, Kap. 4.1.1). Alle übrigen Plasmide waren nicht in der Lage Invasivität zu vermitteln. Die Invasionseffizienzen der entsprechenden rekombinanten Stämme lagen mit Werten von 0,02 % bis 0,47 % deutlich unter den für die rekombinanten Stämme mit pPH1 oder pB7-3 erzielten Raten. Die als Negativkontrollen verwendeten *E. coli* Stämme HB101 bzw. AAEC189, transformiert mit den entsprechenden Vektoren, wurden lediglich zu 0,01 % bis 0,05 % in T24 Zellen internalisiert (Tab. 13).

Erwartungsgemäß zeigten die Stämme mit den mutagenisierten Plasmiden pPH11 und pPH12 sowie die Stämme mit den Komplementationsplasmiden pPH8 und pPH9 keine erhöhte Invasionsfähigkeit, da das *fim*_{Cf} Gencluster auf diesen Plasmiden nur teilweise enthalten ist. Allerdings konnte die Wiederherstellung eines invasiven Phänotyps durch in trans Komplementation der mutagenisierten Plasmide pPH11 und pPH12 mit den

Plasmiden pPH8 und pPH9 (s. Abb. 12) nicht beobachtet werden, obwohl mittels Hefeagglutination zumindest für die rekombinanten HB101 bzw. AAEC189 Stämme, welche die Plasmidkombinationen pPH8/pPH11 oder pPH9/pPH11 enthalten, die Expression eines Mannose-bindenden Adhäsins nachgewiesen wurde (Tab. 13).

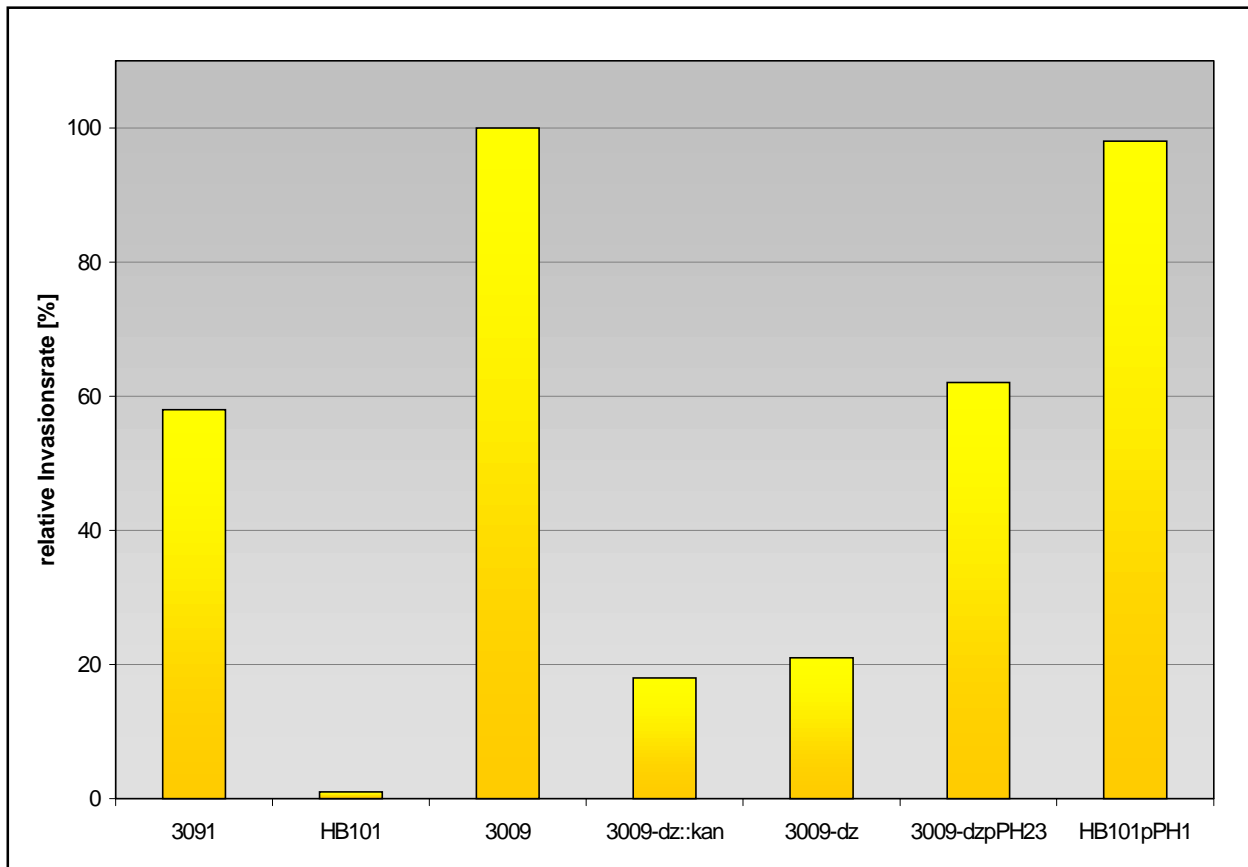


Abb. 19 Relative Internalisierungseffizienzen verschiedener *C. freundii* Stämme, *K. pneumoniae* 3091 (Positivkontrolle), *E. coli* HB101 (Negativkontrolle) und HB101pPH1 in die humane Blasenepithelzelllinie T24. Die Invasionsrate ist definiert als die Anzahl der intrazellulär überlebenden Bakterien (in %) nach Gentamycinbehandlung in Bezug auf die Anzahl der eingesetzten Bakterien (Inokulum). Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Invasionsraten der verschiedenen Stämme in Bezug auf die Internalisierungseffizienz von *C. freundii* 3009 aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Die Invasionsfähigkeit der in dieser Arbeit konstruierten *Citrobacter* Wildtypmutanten 3009-dz und 3009-dz::kan sowie der Komplementante 3009-dzpPH23 wurde in Invasionsassays mit der Blasenepithelzelllinie T24 untersucht (Abb. 19). Im Vergleich zu den absoluten Internalisierungseffizienzen des Wildtyps 3009 (11,4 %) bzw. des rekombinanten *E. coli* HB101pPH1 (11,2 %) waren die für die beiden Wildtypmutanten

3009-dz und 3009-dz::*kan* beobachteten relativen Invasionsraten um ungefähr 80 % erniedrigt. Diese Werte sind jedoch immer noch 20-fach höher als die für den nicht-invasiven *E. coli* HB101 ermittelte Rate, so dass die Invasivität der beiden Mutanten im Vergleich zum Wildtyp 3009 zwar reduziert, aber nicht eliminiert ist. Die für die Komplementante 3009-dzpPH23 beobachtete relative Invasioneffizienz von 62 % im Vergleich zum Wildtyp 3009 (Altenhöfer, persönliche Mitteilung) war gegenüber derjenigen der Mutante 3009-dz signifikant erhöht, so dass für den Stamm 3009-dzpPH23 eine Wiederherstellung des wildtypischen Phänotyps gezeigt werden konnte. Der positive Kontrollstamm *K. pneumoniae* 3091 verhielt sich erwartungsgemäß und zeigte in Bezug auf den Stamm *C. freundii* 3009 eine relative Internalisierungseffizienz von 58 %. Damit liegt die Invasionsrate von *K. pneumoniae* 3091 im Bereich des für die Komplementante 3009-dzpPH23 erhaltenen Wertes.

Tab. 14 Absolute Invasionsraten von *S. typhimurium* C17, *K. pneumoniae* 3091, *E. coli* DH5 α , *C. freundii* 3009 sowie verschiedener rekombinanter *E. coli* HB101 bzw. AAEC189 Stämme und den jeweiligen Vektorkontrollen in die humane Epithelzelllinie HCT8

Stamm	<i>fim</i> Gene	Invasionsrate [%]	Standardabweichung
C17	<i>fim</i> _{St}	41,35	± 39,28
3091	?	40,66	± 18,40
DH5 α	<i>fim</i> _{Ec}	0,31	± 0,10
3009	<i>fim</i> _{Cf}	67,20	± 29,61
HB101pTO3	<i>fim</i> _{Cf} <i>fim</i> _{Ec} *	3,74	± 1,74
AAEC189pTO3	<i>fim</i> _{Cf}	1,48	± 0,88
HB101pPH1	<i>fim</i> _{Cf} A,I,C,D,H,F,Z <i>fim</i> _{Ec} *	1,27	± 0,65
AAEC189pPH1	<i>fim</i> _{Cf} A,I,C,D,H,F,Z	0,73	± 0,57
HB101pPH24	<i>fim</i> _{Cf} A::IS 1,I,C,D,H,F,Z <i>fim</i> _{Ec} *	0,15	± 0,04
AAEC189pPH24	<i>fim</i> _{Cf} A::IS 1,I,C,D,H,F,Z	0,26	± 0,10
HB101pBR322	<i>fim</i> _{Ec} *	0,14	± 0,03

Stamm	<i>fim</i> Gene	Invasionsrate [%]	Standardabweichung
AAEC189pBR322	–	0,18	± 0,11
HB101pSU19	<i>fim</i> _{EC} *	0,05	± 0,04
AAEC189pSU19	–	0,13	± 0,07

Es sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängig voneinander im Duplikat durchgeführten Experimenten mit den dazugehörigen Standardabweichungen aufgelistet.

* Der nicht-invasive *E. coli* Stamm HB101 enthält zwar das *fim*_{EC} Operon im Chromosom, exprimiert jedoch keine Typ 1 Fimbrien.

Da neben der Blase auch der Gastrointestinaltrakt ein mögliches Reservoir für *C. freundii* darstellen könnte, wurde die aus dem Ileo-Coecum stammende Epithelzelllinie HCT8 für Invasionsstudien mit *C. freundii* 3009 und verschiedenen rekombinanten *E. coli* Stämmen ausgewählt (Tab. 14).

Die Internalisierungseffizienz von *C. freundii* 3009 betrug 67,20 % und lag damit sogar höher als die für die beiden Positivkontrollen *S. typhimurium* C17 und *K. pneumoniae* 3091 ermittelten Werte. Dagegen wiesen die rekombinanten *E. coli* Stämme mit den Plasmiden pTO3 und pPH1 für die HCT8 Zellen sehr niedrige Effizienzen auf, welche zwischen 0,73 % und 3,74 % lagen. Bei der Internalisierung in T24 Zellen zeigten diese rekombinanten Stämme allerdings mit dem Wildtyp 3009 vergleichbare Raten (s. Tab. 13). Für die rekombinanten *E. coli* mit dem Plasmid pPH24, in dem ein IS1 Element in *fimA* inseriert ist, wurden Invasionsraten von 0,15 % bzw. 0,26 % erhalten. Diese Stämme sind daher als nicht-invasiv einzustufen. Der negative Kontrollstamm DH5 α erreichte eine Invasionsrate von 0,31 %. Noch unter diesem Bereich lagen die Werte für die mit den entsprechenden Vektoren transformierten *E. coli* Stämmen HB101 und AAEC189 (Tab. 14).

4.3.2 Einfluss von Kohlenhydraten auf die Invasion von *C. freundii* 3009

Für den ersten Schritt einer erfolgreichen Internalisierung von bakteriellen Erregern, nämlich der Bindung an eukaryontische Wirtszellen, ist das Vorhandensein von spezifischen Rezeptoren auf der Wirtszelle notwendig. Die Zelloberfläche aller Eukaryontenzellen besteht aus einer Kohlenhydrat-reichen Schicht (Glykokalyx), die über Proteine oder Lipide in der Zellmembran verankert ist. Bei den Oligosaccharid-

haltigen Rezeptoren handelt es sich überwiegend um Glykoproteine oder –lipide (Isberg und Leong, 1990; Mengaud *et al.*, 1996).

Um Hinweise auf die Art der Kohlenhydratstrukturen des bei der Internalisierung von *C. freundii* 3009 beteiligten eukaryontischen Rezeptors zu erhalten, wurden Inhibitionsstudien durchgeführt, bei denen der bakterielle Ligand mit einer Kohlenhydratlösung abgesättigt wurde. Dazu wurden die Bakterien vor der Zugabe auf den einschichtigen Zellrasen mit der entsprechenden Kohlenhydratlösung präinkubiert. Für diese Invasionsassays wurden Lösungen von Mannose (100 mM) und Chitinhydrolysat (0,6 mg/ml), einer Mischung aus N-Acetylglucosamin (GlcNAc) Monomeren und Oligomeren, verwendet. Mannose und GlcNAc kommen als Bestandteile von Glykoproteinen oder –lipiden in eukaryontischen Membranen vor. Zudem ist bekannt, dass das Adhäsin FimH an Mannose-haltige Bereiche von Wirtszellrezeptoren bindet (Mulvey, 2002).

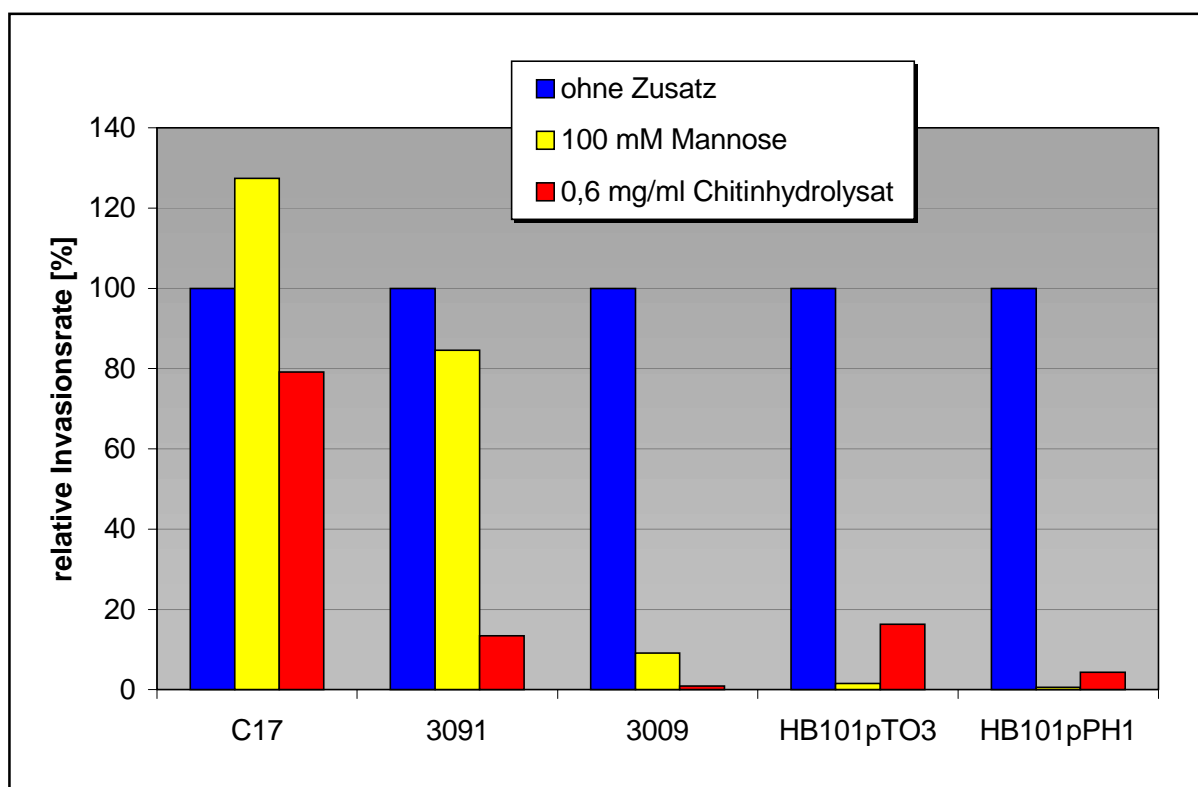


Abb. 20 Effekt von Mannose und Chitinhydrolysat auf die Invasion von *S. typhimurium* C17, *K. pneumoniae* 3091, *C. freundii* 3009 und die rekombinanten *E. coli* HB101pTO3 und HB101pPH1 in die Blasenepithelzelllinie T24. Die Bakterien wurden jeweils mit 100 mM Mannose bzw. 0,6 mg/ml Chitinhydrolysat für 15 min bei Raumtemperatur vorbehandelt. Die entsprechende Substanz war auch während der Invasionsperiode anwesend. Die absolute Invasionsrate ohne Zusatz von Kohlenhydratlösungen wurde als 100 % definiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängig voneinander im Duplikat durchgeführten Experimenten.

Die Internalisierung des Kontrollstammes *S. typhimurium* C17 konnte weder durch Mannose noch durch Chitinhydrolysat inhibiert werden (Abb. 20). Erwartungsgemäß konnte für *K. pneumoniae* 3091 eine Reduktion der Invasionseffizienz durch Chitinhydrolysat gezeigt werden. Die Aufnahme von *C. freundii* 3009 und den beiden rekombinanten *E. coli* Stämmen HB101pTO3 und HB101pPH1 in T24 Zellen wurde sowohl von Mannose als auch von Chitinhydrolysat stark gehemmt (Abb. 20). Die durchschnittlichen Invasionsraten betragen nur noch 0,63 % bis 16,3 % im Vergleich zu den Werten für die unbehandelten Bakterien. Während für Chitinhydrolysat der stärkste inhibitorische Effekt auf die Internalisierung des Wildtyps 3009 beobachtet wurde, erzielte man durch die Vorbehandlung von HB101pTO3 und HB101pPH1 mit Mannose die größte Reduzierung der Invasionsrate dieser beiden rekombinanten *E. coli* Stämme.

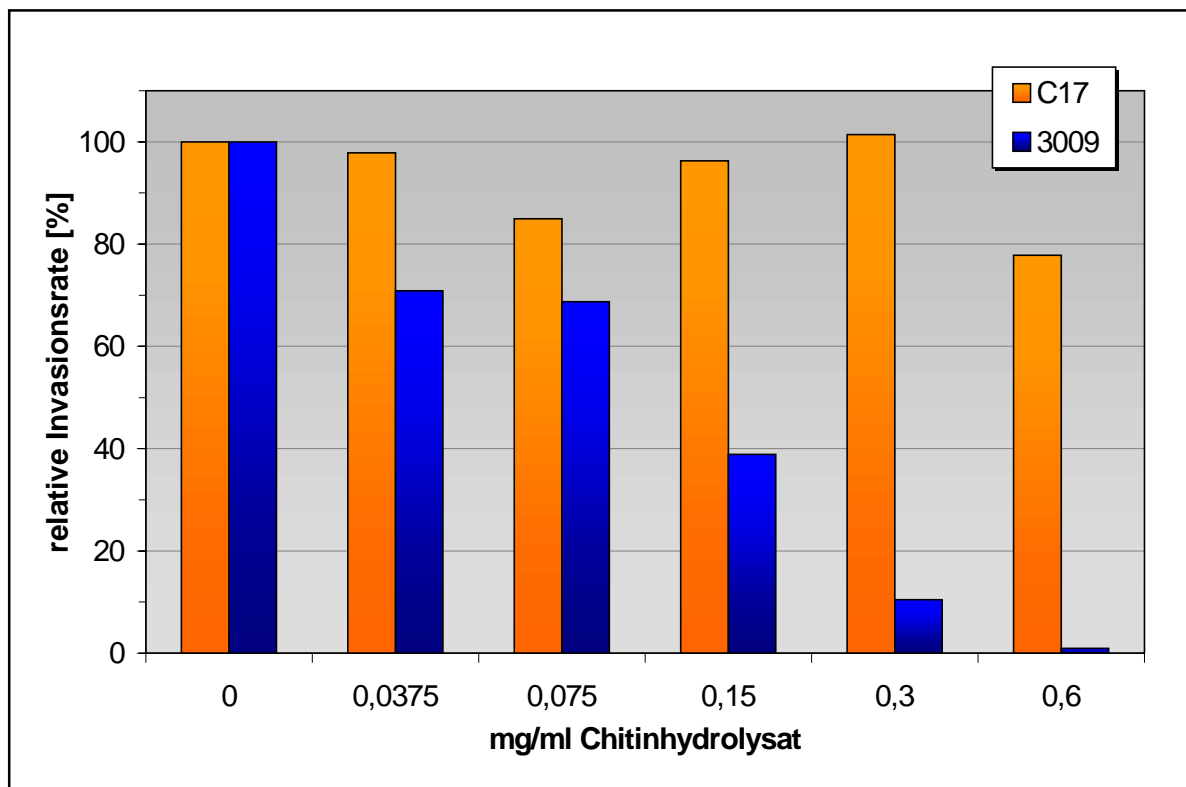


Abb. 21 Konzentrationsabhängiger Effekt von Chitinhydrolysat auf die Internalisierung von *C. freundii* 3009 in T24 Zellen. Die Bakterien wurden mit Chitinhydrolysat für 15 min bei Raumtemperatur vorbehandelt. Außerdem war Chitinhydrolysat auch während der Invasionsperiode anwesend. Die absolute Invasionsrate ohne Zusatz von Kohlenhydratlösungen wurde als 100 % definiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander im Duplikat durchgeführten Experimenten.

Um die Induktion von unspezifischen Effekten zu vermeiden, die gegebenenfalls bei zu hoch gewählten Konzentrationen der Kohlenhydratlösungen auftreten und eventuell eine Internalisierung der Bakterien verhindern könnten, sollte die minimale

Chitinhydrolysatkonzentration ermittelt werden, bei der die Invasion von *C. freundii* 3009 in die Blasenepithelzelllinie T24 noch deutlich gehemmt wird (Abb. 21). Mit steigender Chitinhydrolysatkonzentration nimmt die Internalisierungseffizienz von *C. freundii* 3009 in T24 Zellen stetig ab. Dieser dosisabhängige Effekt liefert Hinweise darauf, dass es sich um eine spezifische, durch Chitinhydrolysat bzw. GlcNAc Reste verursachte Hemmung der Invasion handelt. Die Aufnahme des Kontrollstamms *S. typhimurium* C17 wurde durch Chitinhydrolysat in den für diese Studie verwendeten Konzentrationen nicht beeinträchtigt.

Da die Internalisierungseffizienz der beiden rekombinanten *E. coli* Stämme HB101pTO3 und HB101pPH1 nicht nur durch Mannose, sondern auch durch Chitinhydrolysat deutlich erniedrigt wurde, sollte überprüft werden, ob durch Chitinhydrolysat auch die Hefeagglutination dieser Stämme inhibiert wird. Im Gegensatz zu Mannose konnte die Hefeagglutination von HB101pTO3 und HB101pPH1 mit Chitinhydrolysat aber nicht gehemmt werden.

4.3.3 *In vivo* Experimente mit *C. freundii* 3009

Citrobacter freundii ist an der Entstehung von Gehirnabzessen und Neugeborenen-Meningitis beteiligt (Joaquin *et al.*, 1991; Rae *et al.*, 1991; Tang *et al.*, 1994). Die Fähigkeit zur Invasion und Transzytose eukaryontischer Zellen stellt einen möglichen Mechanismus zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke dar. Die Internalisierung von *C. freundii* 3009 in humane mikrovaskuläre Gehirndothelzellen (HBMEC) wurde bereits nachgewiesen (Badger *et al.*, 1999). In einem Neugeborenen-Ratten-Modell (Huang *et al.*, 1999) sollte nun die Fähigkeit zur Passage der Blut-Hirn-Schranke durch *C. freundii* 3009 und *E. coli* HB101pPH1 in Abhängigkeit von der Präsenz des *fim*_{Cf} Genclusters *in vivo* charakterisiert werden.

Tab. 15 Anzahl der Tiere mit positiven Zerebrospinalflüssigkeitskulturen im Neugeborenen-Ratten-Modell im Vergleich zur gesamten Zahl der infizierten Tiere

Stamm	<i>C. freundii</i> 3009	<i>E. coli</i> HB101pPH1	<i>E. coli</i> HB101pSU19
Anzahl der Tiere positive / infizierte	7 / 10	14 / 20	3 / 14

Bei 70 % der mit *C. freundii* 3009 oder mit *E. coli* HB101pPH1 infizierten Tiere konnten die entsprechenden Bakterien in den Zerebrospinalflüssigkeiten nachgewiesen werden (Tab. 15). Dagegen wurden lediglich in 21 % der mit dem Kontrollstamm HB101pSU19 infizierten Tiere positive Zerebrospinalflüssigkeitskulturen detektiert. Diese Ergebnisse demonstrieren die Fähigkeit von *C. freundii* 3009 sowie des rekombinanten *E. coli* HB101pPH1 die Blut-Hirn-Schranke *in vivo* überwinden zu können. Damit vermittelt die klonierte Invasionsdeterminante aus *C. freundii* 3009, die auf dem Plasmid pPH1 kodiert wird, dem eigentlich nicht-invasiven *E. coli* K12 Stamm HB101 nicht nur Invasivität *in vitro*, sondern auch die Fähigkeit zur Passage der Blut-Hirn-Schranke im Neugeborenen-Ratten-Modell.

4.3.4 Invasionsstudien mit *E. coli* IHE3034

Bei dem Meningitis verursachenden *E. coli* K1 Stamm IHE3034, von dem bekannt ist, dass er verschiedene Epithel- und Endothelzelllinien *in vitro* invadiert und Typ 1 sowie S Fimbrien exprimiert (Meier *et al.*, 1996), sollte untersucht werden, ob die *fim* Determinante, ähnlich wie bei *C. freundii* 3009 (Hess *et al.*, 2000) oder bei UPEC (Martinez *et al.*, 2000), beim Invasionsprozess von IHE3034 eine Rolle spielt. Dazu wurde der Wildtyp durch Einsetzen einer Chloramphenicol-Kassette in das Gen *fimA* mutagenisiert. Gleichzeitig wurde das vollständige *fim*_{EC} Gencluster von IHE3034 in den Vektor pBR322 kloniert und das resultierende Plasmid mit pRPO-1 bezeichnet (Korhonen, persönliche Mitteilung). In der Insertionsmutante IHE3034-2 werden die *fim* Gene stromabwärts von *fimA* aufgrund des polaren Effekts der Chloramphenicol-Kassette nicht mehr transkribiert (Korhonen, persönliche Mitteilung). Nach Transformation des Plasmids pRPO-1 in den nicht-invasiven *E. coli* Stamm HB101 und in die Insertionsmutante IHE3034-2 (zur Komplementation) wurden die erhaltenen Stämme in Invasionsassays auf ihre Invasionsfähigkeit in die humane Blasenepithelzelllinie T24 hin untersucht (Abb. 22).

Die Invasionsrate des Wildtyps IHE3034 betrug im Mittel 1,06 %, was zwar ungefähr 100-fach höher ist als der für die Negativkontrolle ermittelte Wert (0,008 %), aber nicht annähernd an die Invasionsrate des Kontrollstamms *S. typhimurium* C17 (52,1 %) heranreicht. Die Internalisierungseffizienz der Insertionsmutante IHE3034-2, welche keine Typ 1 Fimbrien mehr exprimiert, ist im Vergleich zum Wildtyp um 82 % reduziert, so dass der Stamm IHE3034-2 als nicht-invasiv angesehen wird (Abb. 22). Allerdings konnte durch die Komplementation von IHE3034-2 mit dem Plasmid pRPO-1 ein

invasiver Phänotyp nicht wieder hergestellt werden, obwohl der *E. coli* Stamm IHE3034-2pRPO-1 im Gegensatz zur Insertionsmutante IHE3034-2 eine Mannose-sensitive Hefeagglutination zeigte.

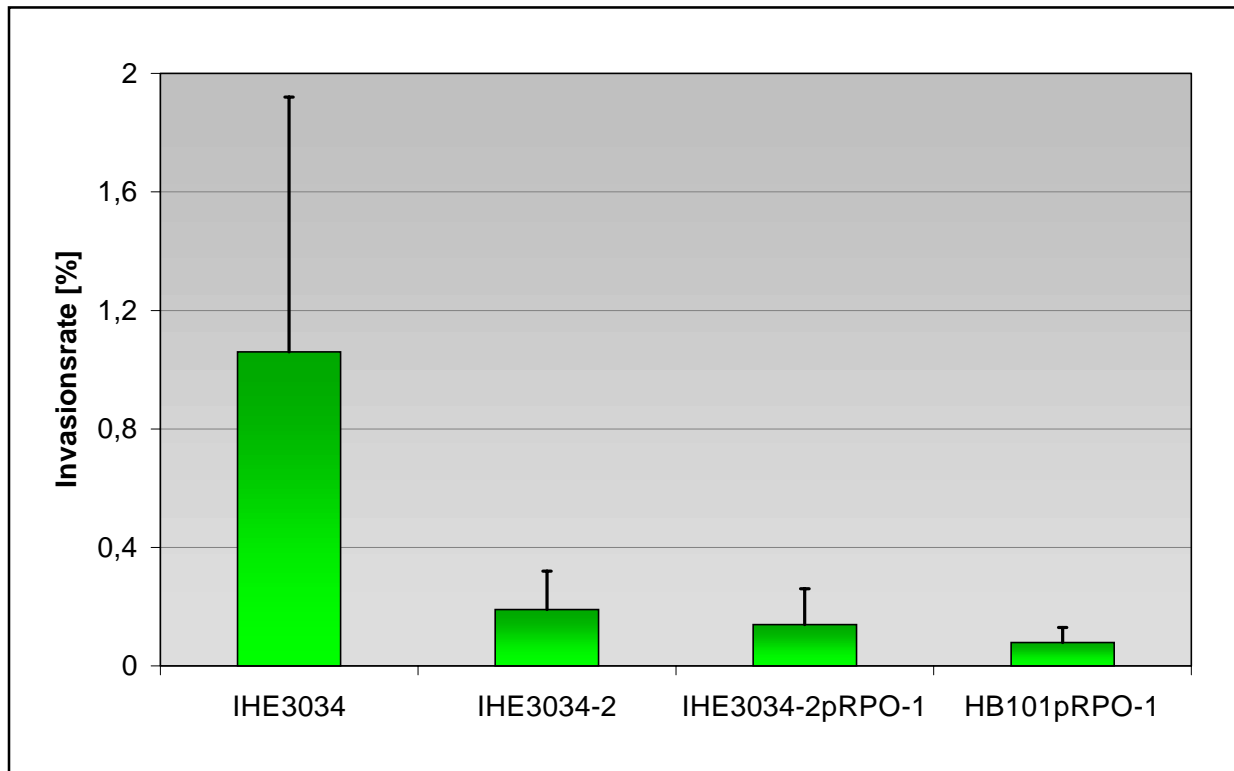


Abb. 22 Invasionseffizienzen verschiedener IHE3034 Stämme und HB101pRPO-1 in die Zelllinie T24. Die Invasionsrate ist definiert als die Anzahl der intrazellulär überlebenden Bakterien (in %) nach Gentamycinbehandlung in Bezug auf die Anzahl der eingesetzten Bakterien (Inokulum). Dargestellt sind die Mittelwerte aus fünf unabhängig voneinander im Duplikat durchgeführten Experimenten. Die Invasionsraten der mitgeführten Kontrollstämme *S. typhimurium* C17 ($52,1 \% \pm 23,0$) und HB101pBR322 ($0,008 \% \pm 0,01$) sind nicht eingezeichnet. Die jeweilige Standardabweichung ist durch Linien über den Balken gekennzeichnet.

Zudem vermittelte das Plasmid pRPO-1, im Gegensatz zur klonierten *fim* Determinante aus *C. freundii* 3009 (Plasmide pTO3 oder pPH1), dem nicht-invasiven *E. coli* Stamm HB101 keine Invasionsfähigkeit. Diese Ergebnisse liefern Hinweise darauf, dass ein intaktes *fim* Gencluster in *E. coli* IHE3034 zwar notwendig aber nicht ausreichend für die Ausprägung der Invasionsfähigkeit ist.

Zusammenfassung der Ergebnisse in Abschnitt 3

C. freundii Stamm 3009 ist invasiv für transformierte menschliche Epithelzellen aus der Harnblase (T24) und dem Ileo-Coecum (HCT8). Die beiden Deletionsmutanten 3009-dz und 3009-dz::kan, denen Teile des *fim*_{Cf} Genclusters fehlen, weisen im Vergleich zum Wildtyp 3009 eine drastisch reduzierte Invasivität auf. Für die Komplementante *C. freundii* 3009-dzpPH23 wurde die Wiederherstellung des invasiven Phänotyps beobachtet.

Die *fim* Determinante in *C. freundii* 3009 ist essentiell für eine effiziente *in vitro* Invasion. Plasmide, welche die klonierte Invasionsdeterminante aus *C. freundii* 3009 vollständig oder teilweise enthalten, verleihen nicht-invasiven *E. coli* K12 Stämmen Invasivität, wenn mindestens die Gene *fim*_{CfA}, *fim*_{CfI}, *fim*_{CfC}, *fim*_{CfD}, *fim*_{CfH} und *fim*_{CfF} kodiert werden. Diese Invasion-vermittelnde Eigenschaft ist unabhängig vom gewählten *E. coli* K12 Stammhintergrund.

Durch die Anwesenheit von Chitinhydrolysat oder Mannose wird die Aufnahme von *C. freundii* 3009 und den rekombinanten *E. coli* Stämmen HB101pTO3 und HB101pPH1 in T24 Zellen inhibiert. Für Chitinhydrolysat wurde ein dosisabhängiger Effekt auf die Internalisierung von *C. freundii* 3009 nachgewiesen.

In *in vivo* Experimenten konnte demonstriert werden, dass sowohl *C. freundii* 3009 als auch *E. coli* HB101pPH1 in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke in einem Neugeborenen-Ratten-Modell zu überwinden.

In Invasionsstudien mit dem MENEK Isolat IHE3034 konnte gezeigt werden, dass für diesen Stamm die *fim*_{Ec} Determinante zwar notwendig, aber nicht hinreichend für die Ausprägung eines invasiven Phänotyps ist.

4.4 Untersuchungen zur Expression von *fim* Genen aus *C. freundii* 3009

Die aus *C. freundii* 3009 klonierte und sequenzierte Invasionsdeterminante weist eine hohe Homologie zum Typ 1 Fimbrien Gencluster von *S. typhimurium* auf. Daher wurde die Expression der *fim*_{Cf} Gene mittels Hefeagglutination, Elektronenmikroskopie, Westernblotanalyse unter Einsatz der Polypeptid-Antiseren anti-Fim_{Cf}F und anti-Fim_{Cf}H sowie radioaktiver Markierung der Proteine untersucht.

4.4.1 Hefeagglutination

Die Mannose-sensitive Hefeagglutination ist die Standardnachweismethode für die funktionelle Expression von Typ 1 Fimbrien. Eine Bakterienzelle, die das Adhäsins FimH an der Oberfläche präsentiert, agglutiniert in einer Bäckerhefelösung sofort die Hefezellen. Die Agglutination kann mit bloßem Auge beobachtet werden. Durch Zugabe einer 100 mM Mannoselösung wird diese Agglutination inhibiert. Dabei sättigt Mannose die Bindungskapazität des an der Spitze der Fimbrien lokalisierten Adhäsins FimH ab, so dass dieses nicht mehr mit den Rezeptoren der Hefezellen interagieren kann.

Für die Wildtypen *E. coli* 536, *S. typhimurium* C17 und *C. freundii* 3009 konnte eine Mannose-sensitive Hefeagglutination beobachtet werden, allerdings für die beiden letztgenannten Stämme nur nach entsprechender Kultivierung (Standkultur, mehrmaliges Überimpfen) und nicht jederzeit reproduzierbar. Die unter denselben Bedingungen angezogenen *Citrobacter* Wildtypmutanten 3009-dz und 3009-dz::kan sowie die Komplementante 3009-dzpPH23 zeigten keine Agglutination (Tab. 16). Ebenso negativ im Hefeagglutinationstest waren die als Negativkontrollen verwendeten Stämme *E. coli* HB101, der zwar noch *fim*_{Ec} Gene im Chromosom enthält, diese aber nicht exprimiert, sowie die rekombinanten *E. coli* HB101 Stämme mit den Vektoren pBR322, pSU19 und pBSII. Die mit den Plasmiden pISF101 (Clegg *et al.*, 1985) bzw. pKL4 (Klemm *et al.*, 1985), die jeweils das Typ 1 Fimbrien Gencluster aus *S. typhimurium* bzw. *E. coli* kodieren, transformierten *E. coli* HB101 zeigten genau wie die Stämme HB101pTO3, HB101pPH1 und HB101pB7-3, welche die Invasionsdeterminante aus *C. freundii* 3009 kodieren, eine Mannose-sensitive Hefeagglutination. Dagegen wurde mit den rekombinanten *E. coli* Stämmen HB101pPH19 (verkürztes *fim*_{Cf}A) und HB101pPH24 (IS1 in *fim*_{Cf}A) keine Agglutination beobachtet (Tab. 16).

Tab. 16 Hefeagglutination verschiedener Bakterienstämme in Gegenwart und Abwesenheit von Mannose

Stamm	Plasmid kodierte <i>fim</i> Gene	Hefeagglutination	
		Hefe	Hefe + 100mM Mannose
<i>S. typhimurium</i> C17	–	+	–
<i>C. freundii</i> 3009	–	+	–
<i>C. freundii</i> 3009-dz	–	–	–
<i>C. freundii</i> 3009-dz:: <i>kan</i>	–	–	–
<i>C. freundii</i> 3009-dzpPH23	<i>fim</i> _{Cf} D,H,F,Z	–	–
<i>E. coli</i> 536	–	+	–
<i>E. coli</i> HB101	–	–	–
HB101pISF101	<i>fim</i> _{St}	+	–
HB101pKL4	<i>fim</i> _{Ec}	+	–
HB101pTO3	<i>fim</i> _{Cf}	+	–
HB101pPH1	<i>fim</i> _{Cf} A,I,C,D,H,F,Z	+	–
HB101pB7-3	<i>fim</i> _{Cf} A,I,C,D,H,F	+	–
HB101pAA8	<i>fim</i> _{Cf} A,I,C,D,H	–	–
HB101pPH19	<i>fim</i> _{Cf} (A),I,C,D,H,F	–	–
HB101pPH24	<i>fim</i> _{Cf} A::IS1,I,C,D,H,F,Z	–	–
HB101pBR322	–	–	–
HB101pSU19	–	–	–
HB101pBSII	–	–	–

* Bei diesen Stämmen wurde nur nach geeigneter Kultivierung (s. Kap. 3.6.2) ein positives Ergebnis im Hefeagglutinationstest beobachtet.

Die Hefeagglutinationsstudien wurden ebenfalls mit *E. coli* AAEC189, in dem das *fim*_{Ec} Gencluster vollständig deletiert ist (Blomfield *et al.*, 1991), als Stammhintergrund durchgeführt. Die Ergebnisse sind nicht aufgelistet, entsprachen aber denjenigen, welche mit den rekombinanten *E. coli* HB101 Stämmen erhalten wurden.

4.4.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Zur Visualisierung von Typ 1 Fimbrienproteinen, die an der Oberfläche der Bakterienzelle zu einem intakten Pilus zusammengebaut sind, wurden Untersuchungen am Transmissionselektronenmikroskop (TEM) durchgeführt. Die Bakterien wurden als Standkulturen angezogen und nach dreimaligem Überimpfen, sowie einem positiven Ergebnis im Mannose-sensitiven Hefeagglutinationstest, auf einem feinen Kupferdrahtnetz mit einer 2 %-igen Uranylacetatlösung kontrastiert.

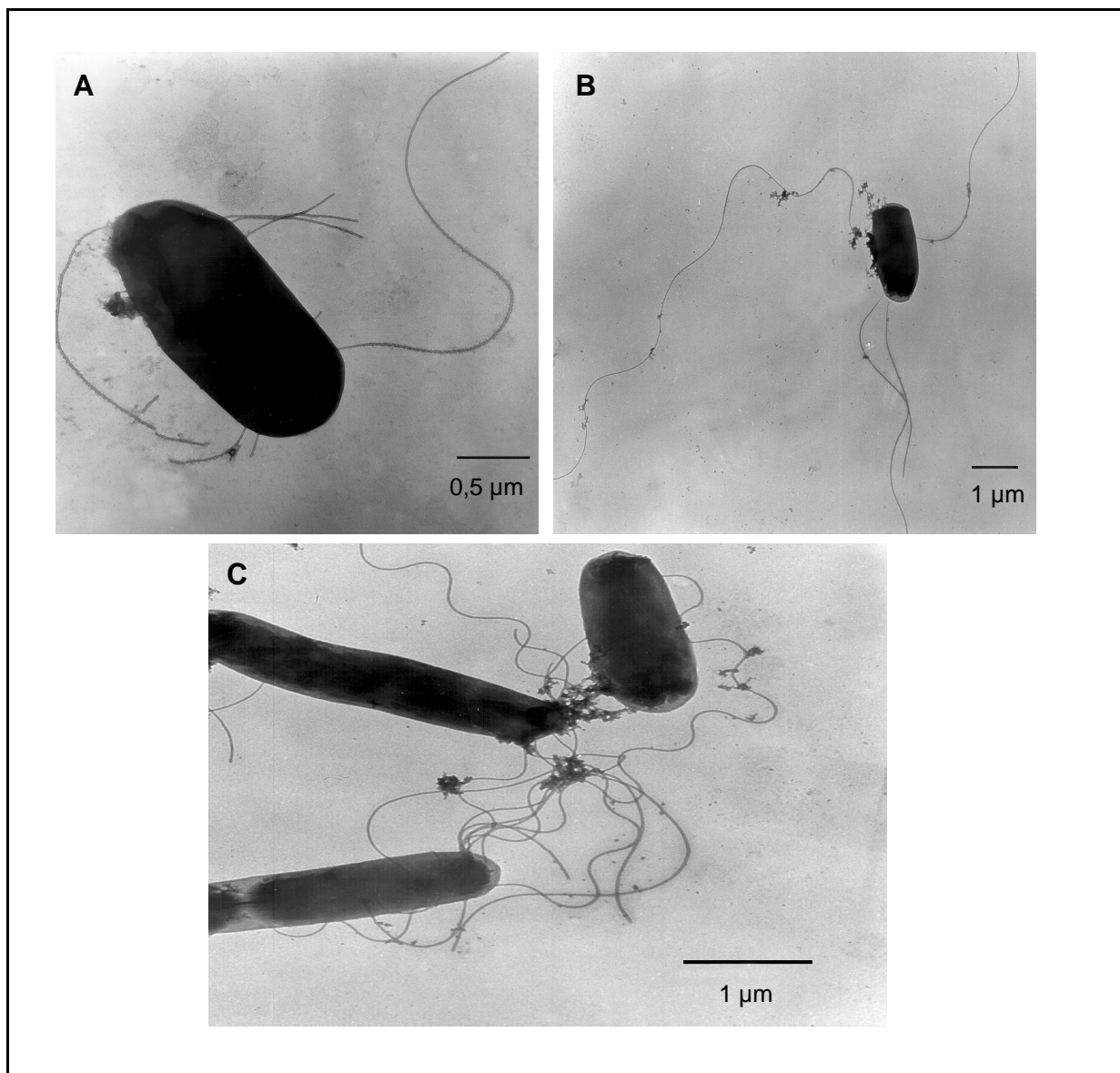


Abb. 23 Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahmen von *C. freundii* 3009 (A) und den rekombinanten *E. coli* Stämmen AAEC189pSU19 (B) und AAEC189pPH1 (C). Die Bakterien wurden mit Uranylacetat kontrastiert. Als Größenmaßstab ist ein schwarzer Balken eingezeichnet.

Weder für den Wildtypstamm *C. freundii* 3009 (Abb. 23A) noch für den rekombinanten *E. coli* Stamm AAEC189pPH1 (Abb. 23C) konnten Typ 1 Fimbrien an der Bakterienoberfläche beobachtet werden. Allerdings wurden in den Präparaten dieser beiden Stämme wie auch in den Präparaten mit dem Kontrollstamm AAEC189pSU19 (Abb. 23B) flagellierte Bakterien detektiert. Interessanterweise wiesen die rekombinanten *E. coli* AAEC189 häufig mehrere Flagellen auf und bildeten zudem größere Bakterienverbände.

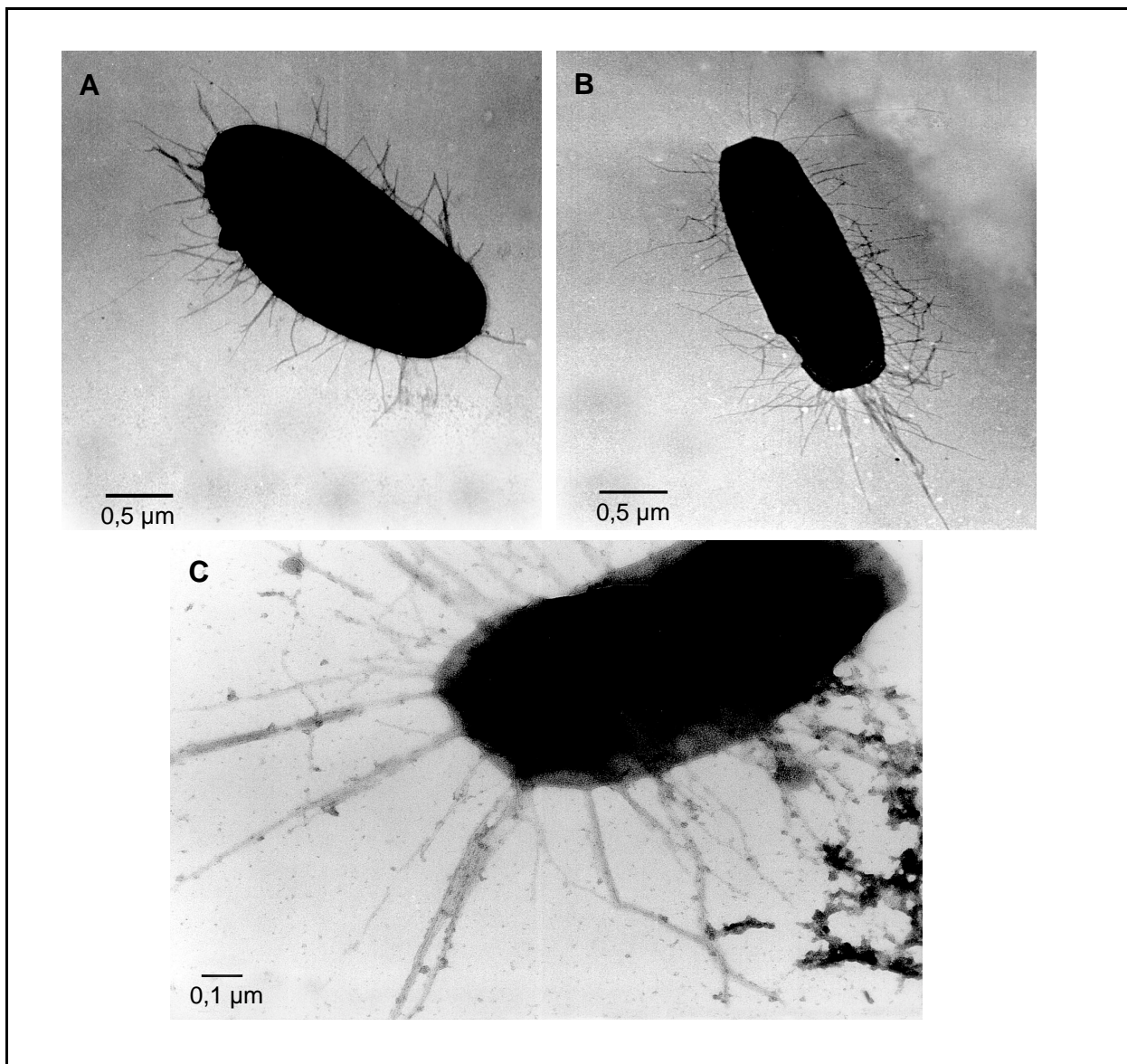


Abb. 24 Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahmen von verschiedenen *E. coli* Stämmen. Die Bakterien wurden mit Uranylacetat kontrastiert. Als Größenmaßstab ist ein schwarzer Balken eingezeichnet. **A:** DH5α; **B:** AAEC189pKL4; **C:** 536.

In Abbildung 24 sieht man fimbrierte Bakterien der Stämme *E. coli* DH5 α (A), *E. coli* AAEC189pKL4 (B) und *E. coli* 536. Die Fimbrien umgeben als haarförmige Strukturen die Bakterienzellen. Während DH5 α und AAEC189pKL4 lediglich Typ 1 Fimbrien exprimieren, verfügt der uropathogene *E. coli* 536 zusätzlich über S und P Fimbrien.

4.4.3 Westernblot-Analyse

Eine weitere Methode, die Expression von Fim Proteinen nachzuweisen, ist die Westernblot-Analyse. Von den dazu verwendeten Stämmen zeigten *C. freundii* 3009, *E. coli* BL21pLysS/pB7-3, DH5 α und AAEC189pPH1 eine positive Mannose-sensitive Hefeagglutination. Die durch Hitze-Extraktion (Khan und Schifferli, 1994) isolierten Oberflächenproteine der zu untersuchenden Bakterienstämme wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und anschließend mit einem polyklonalen Antiserum entwickelt (s. Kap. 3.11.2 und 3.11.3).

Zur Herstellung der Polypeptid-Antiseren anti-Fim_{Cf}F und anti-Fim_{Cf}H wurden anhand der Sequenz der klonierten Invasionsdeterminante aus *C. freundii* 3009 zunächst Polypeptide mit spezifischen Aminosäuresequenzen aus Fim_{Cf}F (LHSDRTRLPLEQAS) bzw. aus Fim_{Cf}H (AGANRPEGINPQTK) synthetisiert. Mit diesen Polypeptiden wurden Kaninchen immunisiert, aus denen anschließend die polyklonalen Antiseren gewonnen wurden.

Der mit dem Antiserum anti-Fim_{Cf}F entwickelte Westernblot ist in Abbildung 25A dargestellt. Fim_{Cf}F mit einem Molekulargewicht von 17 kDa konnte lediglich in den Hitze-extrahierten Proteinen der rekombinanten *E. coli* BL21pLysSpB7-3 (Abb. 25A, Spur 3) und AAEC189pPH1 (Abb. 25A, Spur 6) detektiert werden. Beim Wildtyp *C. freundii* 3009 ist auf dieser Höhe keine Bande zu sehen, statt dessen wurden Signale bei ungefähr 38 kDa und 46 kDa beobachtet. Das Auftreten dieser Signale könnte möglicherweise auf die Bildung von Aggregaten von Fim_{Cf}F mit anderen Fim Untereinheiten zurückgeführt werden, z.B. 17 kDa + 18 kDa = 35 kDa oder 17 kDa + 25 kDa = 42 kDa (vgl. Tab. 17). Bei den Proteinen der rekombinanten *E. coli* Stämme BL21pLysS/pB7-3, BL21pLysS/pT7-3 und AAEC189pPH1 wurden jeweils mehrere Banden in einem Bereich von ca. 30 kDa bis 95 kDa detektiert, während für den *E. coli* K12 Stamm DH5 α nur eine Bande beobachtet wurde. Für die Wildtypmutante *C. freundii* 3009-dz::kan und den Kontrollstamm AAEC189, in dem das *fim*_{EC} Gencluster vollständig aus dem Chromosom deletiert ist (Blomfield *et al.*, 1991), konnten keine Proteinbanden mit dem Antiserum anti-Fim_{Cf}F beobachtet werden.

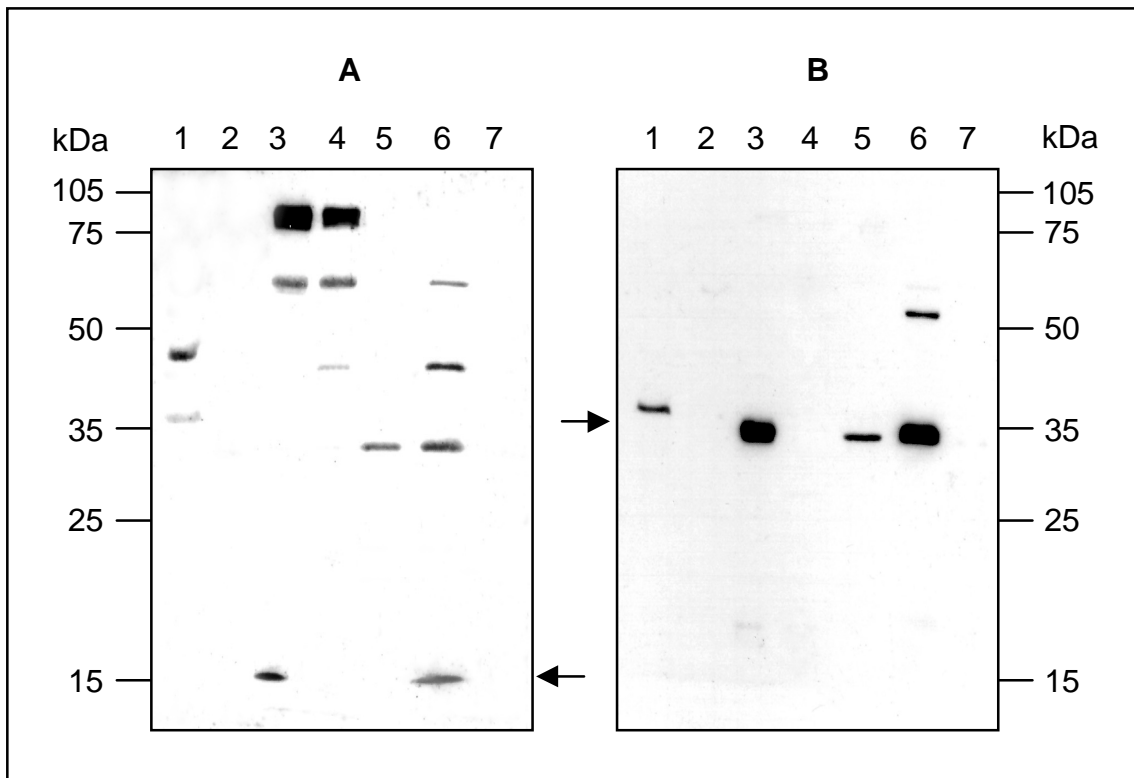


Abb. 25 Westernblot-Analyse verschiedener Stämme mit anti-Fim_{Cf}F (A) bzw. anti-Fim_{Cf}H Antiserum (B). Es wurden die nach Hitze-Extraktion erhaltenen Proteine aufgetragen. Die Banden, die Proteine mit dem erwarteten Molekulargewicht für FimF (17 kDa) bzw. FimH (36 kDa) repräsentieren, sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

1: *C. freundii* 3009; 2: *C. freundii* 3009-dz::kan; 3: *E. coli* BL21pLysS/pB7-3; 4: *E. coli* BL21pLysS/pT7-3; 5: *E. coli* DH5 α ; 6: *E. coli* AAEC189pPH1; 7: *E. coli* AAEC189.

In dem Westernblot mit anti-Fim_{Cf}H wurden für den *C. freundii* Stamm 3009 sowie für die *E. coli* Stämme BL21pLysS/pB7-3, DH5 α und AAEC189pPH1 Proteinbanden auf der Höhe von rund 36 kDa nachgewiesen (Abb. 25B). Auffällig ist, dass die FimH_{Cf} aus dem Wildtyp repräsentierende Bande deutlich über dem für die rekombinanten *E. coli* Stämme BL21pLysS/pB7-3 oder AAEC189pPH1 erhaltenen Signal läuft. Außerdem kreuzreagierte anti-Fim_{Cf}H mit Fim_{Ec}H des *E. coli* K12 Stamms DH5 α . Für den rekombinanten *E. coli* Stamm AAEC189pPH1 wurde zudem eine zusätzliche Bande bei ungefähr 55 kDa beobachtet (Abb. 25B). Es bleibt allerdings unklar, ob es sich dabei um ein Dimer aus Fim_{Cf}H und Fim_{Cf}F handeln könnte (vgl. Tab. 17), weil eine entsprechende Bande im Westernblot mit anti-Fim_{Cf}F (Abb. 25A) nicht beobachtet wurde. Mit den beiden Kontrollstämmen BL21pLysS/pT7-3 und AAEC189 wurden, wie erwartet, keine Proteine detektiert. Für den *E. coli* B Stamm BL21 ist bekannt, dass er keine Fimbrien an der Zelloberfläche exprimiert, wenn er in NB Medium kultiviert wird

(Chart *et al.*, 2000). Im *E. coli* Stamm AAEC189 ist das komplette *fim_{Ec}* Gencluster deletiert (Blomfield *et al.*, 1991).

4.4.4 Radioaktive Markierung von Fim Proteinen

Zur radioaktiven Markierung von Fim Proteinen aus *C. freundii* 3009 wurde ein T7 Phagenexpressionssystem verwendet. In solchen Systemen werden nur die Gene exprimiert, welche sich unter der Kontrolle des T7 Promotors $\Phi 10$ befinden (Tabor und Richardson, 1985). Die Expressionsstudien wurden in Gegenwart einer Mischung aus mit [³⁵S] markiertem Methion und Cystein durchgeführt (s. Kap. 3.12). In Tab. 17 ist die maximale Anzahl der Aminosäuren Methion und Cystein, die als radioaktive Bausteine in die Fim_{Cf} Proteine eingebaut werden können, angegeben.

Tab. 17 Anzahl der Schwefel-haltigen Aminosäuren Methion (mit Ausnahme des Startcodons) und Cystein, die in den im Plasmid pB7-3 kodierten *C. freundii* Fim Proteinen enthalten sind, und Angabe des Molekulargewichts der einzelnen Fim_{Cf} Proteine

Fim Protein	Methion	Cystein	Molekulargewicht
Fim _{Cf} A	3	2	18,7 kDa
Fim _{Cf} I	2	3	18,1 kDa
Fim _{Cf} C	3	0	25,1 kDa
Fim _{Cf} D	9	3	95,5 kDa
Fim _{Cf} H	9	4	36,3 kDa
Fim _{Cf} F	2	2	17,2 kDa

Das Molekulargewicht der Fim_{Cf} Proteine wurde anhand der aus der Nukleotidsequenz der klonierten Fimbriendeterminante aus *C. freundii* Stamm 3009 abgeleiteten Aminosäuresequenz berechnet.

Auf dem *Bam*HI/*Xho*I Fragment aus pTO3 sind die *fim_{Cf}* Gene *fim_{Cf}A*, *fim_{Cf}I*, *fim_{Cf}C*, *fim_{Cf}D*, *fim_{Cf}H* und *fim_{Cf}F* kodiert (s. Abb. 9, Kap. 4.1.1). Dieses Fragment wurde in die Expressionsvektoren pT7-3, in dem das *bla* Gen vom T7 Promotor $\Phi 10$ aus transkribiert wird, sowie in pT7-5 und pT7-6 kloniert (Britta Schulte-Holthausen, unveröffentlichte Ergebnisse). In den resultierenden Plasmiden pB7-3 und pB7-5 stehen die auf dem

*Bam*HI/*Xho*I Fragment lokalisierten *fim*_{Cf} Gene unter der Kontrolle von Φ 10, während sie in pB7-6 in der entgegengesetzten Transkriptionsrichtung vorliegen.

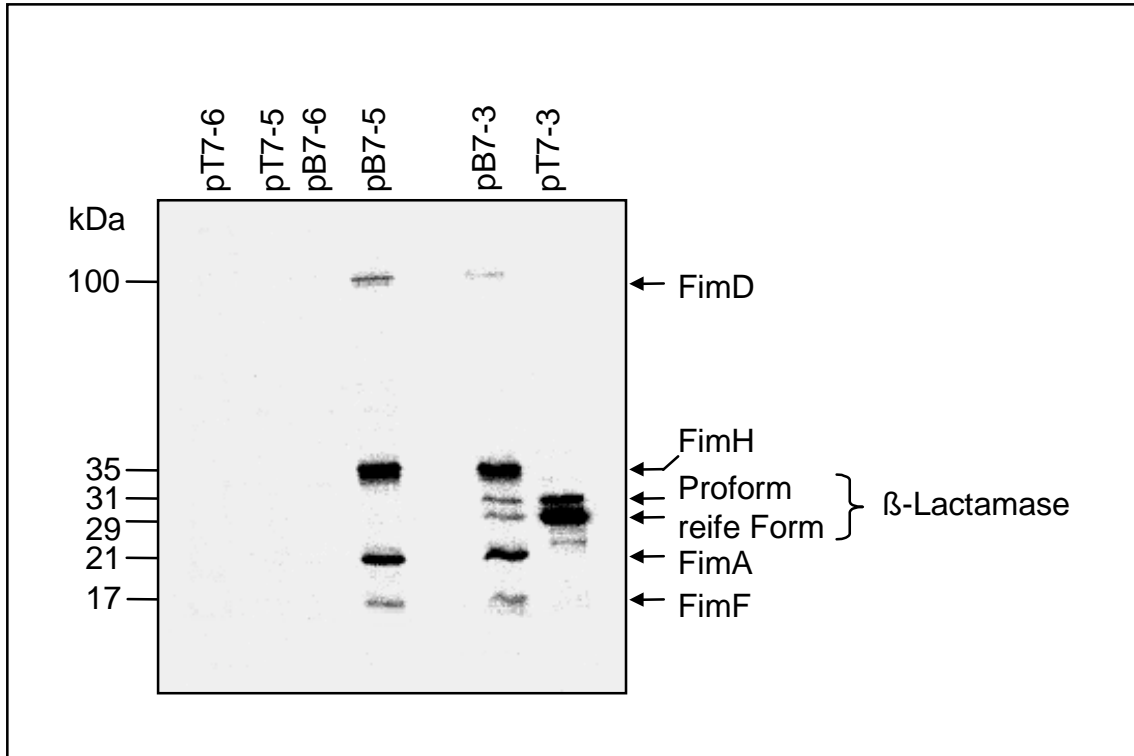


Abb. 26 SDS-Polyacrylamidgel (13 %) mit Gesamtzell-Lysaten von rekombinanten *E. coli* BL21pLysS Stämmen, transformiert mit verschiedenen Plasmiden und den entsprechenden Vektorkontrollen. Die unter der Kontrolle des T7 Promotors Φ 10 transkribierten Gene wurden mit [³⁵S] markiert. Ein Größenstandard ist auf der linken Seite eingezeichnet.

Durch die spezifische radioaktive Markierung von *Fim*_{Cf} Proteinen in einem T7 Expressionssystem konnten Proteine mit einem Molekulargewicht von rund 100 kDa, 35 kDa, 21 kDa und 17 kDa nachgewiesen werden (Abb. 26). Diese Molekulargewichte zeigen eine gute Übereinstimmung mit den für die *Citrobacter* *Fim* Proteine *Fim*_{Cf}D (95,5 kDa), *Fim*_{Cf}H (36,3 kDa) und *Fim*_{Cf}F (17,2 kDa) berechneten Größen. Lediglich die der Hauptuntereinheit *Fim*_{Cf}A (18,7 kDa) zugeordnete Proteinbande bei ca. 21 kDa trat etwas höher als erwartet auf. Die für BL21pLysS/pB7-3 zusätzlichen Banden bei 31 kDa und 29 kDa repräsentieren die Proform und die reife Form der β -Lactamase, die auch vom Vektor pT7-3 kodiert wird. Es wurden keine Signale beobachtet, die *Fim*_{Cf}I (18,1 kDa) oder dem Chaperon *Fim*_{Cf}C (25,1 kDa) zugeordnet werden können. Für die Kontrollstämme BL21pLysS/pT7-5, BL21pLysS/pT7-6 und BL21pLysS/pB7-6 wurden keine radioaktiv markierten Proteine detektiert (Abb. 26).

Zusammenfassung der Ergebnisse in Abschnitt 4

Die Expression des *Citrobacter* Adhäsins Fim_{Cf}H wurde in Hefeagglutinationsstudien für den Wildtyp *C. freundii* 3009 (allerdings nur unter speziellen Anzuchtbedingungen) und die mit den Plasmiden pTO3, pPH1 und pB7-3 transformierten rekombinanten *E. coli* Stämme HB101 und AAEC189 nachgewiesen. Die beiden Wildtypmutanten 3009-dz und 3009-dz::*kan* sowie die Komplementante 3009-dzpPH23 agglutinierten nicht.

Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen konnte nicht bestätigt werden, dass die *Citrobacter* Fim Proteine an der Oberfläche der Bakterienzellen zu einem Pilus zusammengebaut werden.

In Westernblot-Analysen von Hitze-extrahierten Proteinen wurde die Expression des Adhäsins Fim_{Cf}H an der Bakterienoberfläche sowohl für den Wildtyp *C. freundii* 3009 als auch für die rekombinanten *E. coli* Stämme BL21pLysS/pB7-3 und AAEC189pPH1 nachgewiesen. Eine Fim_{Cf}F entsprechende Proteinbande wurde lediglich für die beiden rekombinanten *E. coli* Stämme beobachtet.

Die *Citrobacter* Fim Proteine Fim_{Cf}D, Fim_{Cf}H, Fim_{Cf}A und Fim_{Cf}F konnten mittels radioaktiver Markierung in einem T7 Expressionssystem detektiert werden. Dabei stimmten die beobachteten Molekulargewichte der einzelnen Proteine mit den anhand der abgeleiteten Aminosäuresequenz berechneten Werten gut überein.

4.5 Analyse von Deletionen im Bereich des Typ 1 Fimbrien Genclusters in uropathogenen Patientinnen-Isolaten

In den westlichen Industriestaaten zählen Harnwegsinfektionen zu den häufigsten bakteriellen Infektionskrankheiten. Als wichtigste Erreger von Harnwegsinfektionen werden uropathogene *E. coli* angesehen (Warren, 1996). Bei der Besiedlung des Harntraktes durch UPEC spielen Adhäsine als Virulenzfaktoren eine bedeutende Rolle (Hacker, 1992).

Von Patientinnen mit chronisch rezidivierenden Harnwegsinfektionen wurden klinische Isolate aus Stuhl- und Urinproben isoliert, die von Prof. Dr. R. Fünfstück (Universität Jena) zur Verfügung gestellt wurden. Zunächst wurde die Expression von Typ 1 Fimbrien phänotypisch mittels Hefeagglutination untersucht und anschließend für die nicht-agglutinierenden Isolate das Fehlen von *fim* Genen durch PCR und Kolonie-Hybridisierung genotypisch verifiziert (Brauchle, 2002; Maibaum, 2002).

In dieser Arbeit sollte nun das Ausmaß der Deletion des *fim* Genclusters in den uropathogenen Patientinnen-Isolaten (Stuhl- und Urinproben) genetisch charakterisiert werden, wobei auch die angrenzenden DNA Abschnitte in die Untersuchung einbezogen wurden. Das Vorhandensein bzw. Fehlen von Genen oder nicht-kodierenden DNA Bereichen wurde mittels PCR mit spezifischen Primern ermittelt, die anhand der Sequenz des *E. coli* K12 Stamms MG1655 entworfen wurden. Die rund 13 kb stromaufwärts des *fim* Genclusters lokalisierten Gene *sgcA*, *sgcE*, *sgcR*, *yjhI* und *yjhH* wurden in dieser Studie aus zeitlichen Gründen nicht berücksichtigt. Sie werden aber in einer Folgestudie untersucht. Für die Experimente wurden sechs Isolate von Patientin 1 (Nr. 1-6), drei Isolate von Patientin 11 (Nr. 7-9), ein Isolat von Patientin 6 (Nr. 10) und acht Isolate von Patientin 8 (Nr. 11-18) verwendet, wobei in Isolat Nr. 18 das *fim* Gencluster vollständig vorhanden ist. Als Kontrollstämme dienten zudem die *E. coli* K12 Stämme MG1655, dessen Genom vollständig sequenziert ist und das *fim* Gencluster enthält (Blattner *et al.*, 1997), und AAEC189, in dem das *fim* Gencluster deletiert ist (Blomfield *et al.*, 1991).

Die Ergebnisse der einzelnen PCRs sind in Tab. 19 im Anhang (Kap. 7.4) aufgelistet. Ein graphischer Überblick ist in Abb. 27 dargestellt.

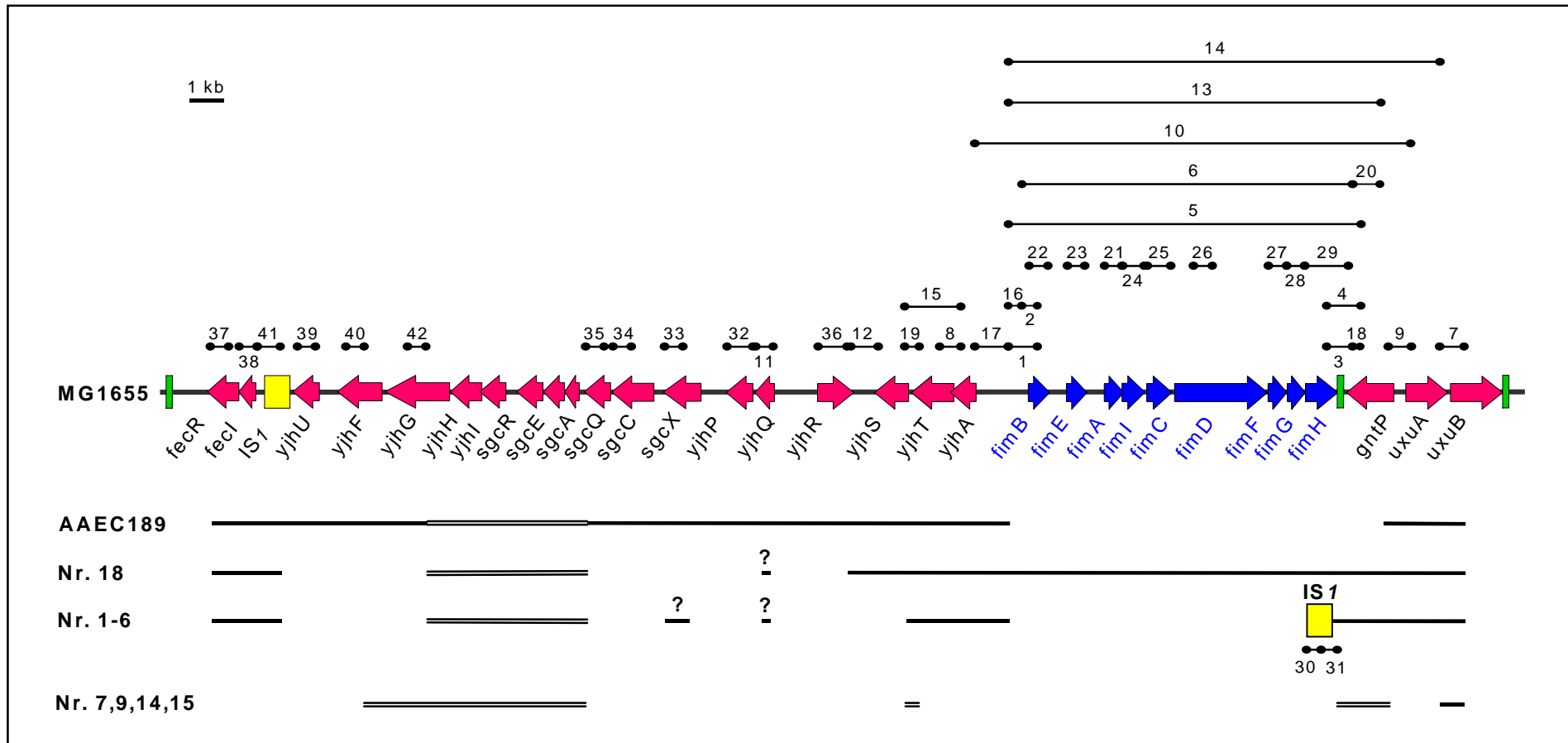


Abb. 27 Charakterisierung von Deletionen im Bereich des Typ 1 Fimbrien Genclusters (*fim*) in uropathogenen Patientinnen-Isolaten mittels PCR-Analyse. Zum Vergleich wurden die beiden apathogenen *E. coli* K12 Stämme MG1655 und AAEC189 verwendet, wobei in letzterem das *fim* Gencluster vollständig deletiert ist (Blomfield *et al.*, 1991). Die Blockpfeile geben die relative Größe, Lage und Transkriptionsrichtung der einzelnen Gene an. Ausgefüllte gelbe Rechtecke markieren eine im Chromosom von MG1655 vorhandene Kopie des *IS1* Elements sowie das in die Deletionsstelle in den Isolaten Nr. 1-6 inserierte *IS1* Element. Im Chromosom von MG1655 vorhandene repetitive Sequenzbereiche werden durch ausgefüllte grüne Rechtecke wiedergegeben. Die Lage der verwendeten Primerkombinationen (s. Tab. 19 im Anhang, Kap. 7.4) ist durch eine von Punkten begrenzte Linie (●—●) gekennzeichnet. Durchgezogene schwarze Linien repräsentieren amplifizierte PCR-Produkte, wobei diejenigen, die nicht die erwartete Größe aufweisen, mit einem Fragezeichen markiert sind. DNA Bereiche, für die keine PCRs durchgeführt wurden, sind durch eine Doppellinie wiedergegeben.

Für den apathogenen *E. coli* K12 Stamm AAEC189 ergab die Untersuchung, dass zusätzlich zum Typ 1 Fimbrien Gencluster noch ungefähr 1,3 kb aus den angrenzenden DNA Abschnitten deletiert sind. Während es sich stromaufwärts des *fim* Genclusters dabei um einen nicht-kodierenden DNA Bereich handelt, wurde durch diese Deletion das stromabwärts liegende Gen *gntP* verkürzt, dessen Genprodukt, eine Gluconat-Permease, für den Transport von kleinen Molekülen, wie z.B. Kohlenhydraten, organischen Säuren oder Alkoholen, zuständig ist (Klemm *et al.*, 1996). Dieses Ergebnis wurde hauptsächlich aus der Größe der mit den Primerpaaren 10, 13 und 14 amplifizierten Produkte sowie aus dem Ausbleiben von PCR-Produkten für die Primerkombinationen 5, 6, 16, 18 und 20 abgeleitet. Mit Ausnahme für diese schon von Blomfield und Mitarbeitern beschriebene Deletion im *E. coli* Stamm AAEC189 (Blomfield *et al.*, 1991) stimmte jeweils die Größe der für die weiteren untersuchten DNA Abschnitte erhaltenen PCR-Produkte von AAEC189 und dem ebenfalls zur Kontrolle mitgeführten *E. coli* K12 Stamm MG1655 überein.

Im Patientinnen-Isolat Nr. 18 konnte das Vorhandensein des *fim* Genclusters in der erwarteten Umgebung im Chromosom durch die PCR-Analyse nachgewiesen werden. Vom stromabwärts von *fim* liegenden Gen *uxuA* bis hin zum stromaufwärts davon liegenden Gen *yjhS* wurden für dieses Isolat PCR-Produkte mit der erwarteten Größe amplifiziert. Mit dem Primerpaar ECyjhR2/ECyjhR3 (36) erhielt man kein PCR-Produkt, dagegen mit den Primern ECyjhQ1/ECyjhQ2 (11) eines, das um 294 bp kleiner als erwartet war (s. Anhang Kap. 7.4, Tab. 19). Von den nachfolgenden Genen stromaufwärts konnten erst wieder *fecI* und *fecR*, die ungefähr 18 kb von *yjhS* entfernt sind, bzw. das benachbarte IS1 Element mittels PCR nachgewiesen werden (Abb. 27), wobei die in diesem Abschnitt lokalisierten Gene *sgcA*, *sgcE*, *sgcR*, *yjhI* und *yjhH* in dieser Studie nicht untersucht wurden. In diesem Bereich des Chromosoms des Patientinnen-Isolats Nr. 18 fanden offensichtlich Rekombinationsereignisse statt, von denen das *fim* Gencluster nicht betroffen war.

Für die Patientinnen-Isolate Nr. 1-6, die alle von Patientin 1 stammen, wurden bei allen durchgeführten PCRs jeweils identische Ergebnisse erhalten (s. Anhang Kap. 7.4, Tab. 19). Stromabwärts des *fim* Genclusters konnte das Vorhandensein der Gene *gntP* und *uxuA* nachgewiesen werden, während stromaufwärts zunächst lediglich mit den Primerpaaren ECyjhT1/ECyjhA1 (8), ECyjhA1/ECyjhS2 (15), ECnogene1ent/ECyjhA2 (17) und ECyjhS2/ECyjhT2 (19) PCR-Produkte mit der erwarteten Größe amplifiziert wurden (Abb. 27). Wie bei Isolat Nr. 18 war das mit der Primerkombination ECyjhQ1/ECyjhQ2 (11) erhaltene PCR-Produkt 294 bp kleiner als erwartet. Dagegen wurde mit den Primern ECsgcX1/ ECsgcX2 (33) ein um 356 bp zu großes PCR-Produkt erhalten. Die *sgcX* stromaufwärts folgenden Gene *sgcC*, *sgcQ*, *yjhG*, *yjhF* und *yjhU* konnten in den Isolaten Nr. 1-6 mittels PCR nicht detektiert werden. Analog zu Isolat

Nr. 18 wurden PCR-Produkte mit der erwarteten Größe mit den Primerpaaren ECfecR1/ECfecR2 (37), ECfecl1/ECfecl2 (38) und ECfecl3/ECIS1F2 (41) amplifiziert. Erwartungsgemäß erhielt man mit Primerpaaren, die spezifisch in den einzelnen *fim* Genen binden, bei den Patientinnen-Isolaten Nr. 1-6 keine PCR-Produkte. Die Deletion des gesamten *fim* Genclusters sollte durch eine PCR mit einem Primerpaar bestätigt werden, bei dem ein Primer im Bereich stromaufwärts und der andere stromabwärts des ursprünglich vorhandenen *fim* Genclusters bindet. Zu diesem Zweck wurde das Primerpaar ECnogene1/ECgntP2 (5) ausgewählt, mit dem allerdings ein um ungefähr 760 bp größeres PCR-Produkt als theoretisch erwartet amplifiziert wurde.

Die Analyse der Sequenzierung des bei den Isolaten Nr. 1-6 mit dem Primerpaar ECnogene1/ECgntP2 (5) amplifizierten, ca. 2,1 kb großen PCR-Produkts, welches zuvor in den Vektor pGEM T-Easy ligiert wurde, ergab, dass in die *fim* Deletionsstelle ein IS1 Element inseriert ist, und zwar 263 bp vor dem Startcodon von *fimB* und 167 bp vor dem Stoppcodon von *fimH* (s. Anhang Kap. 7.2.3). Außerdem wurde für die Isolate Nr. 1-6 das Vorhandensein des IS1 Elements in dieser Deletionsstelle durch die Amplifikation eines 779 bp PCR-Produkts mit der Primerkombination ECfimH4/ECinsB1 (31) nachgewiesen.

Darüber hinaus wurde durch die Sequenzierung dieses PCR-Produkts festgestellt, dass innerhalb des repetitiven Sequenzbereichs stromabwärts von *fimH* die im *E. coli* K12 Stamm MG1655 vorhandene repetitive DNA Sequenz boxC sowie die nachfolgenden 26 bp in den Patientinnen-Isolaten Nr. 1-6 deletiert sind. In diese Deletionsstelle ist die Basenabfolge CGA CAA TCC GAA CA inseriert, die in diesem Bereich nicht im Genom von MG1655 vorkommt (s. Anhang Kap. 7.2.3). Der Homologievergleich („Blast Search“; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>) der Nukleotidsequenz des mit dem Primerpaar ECnogene1/ECgntP2 (5) amplifizierten PCR-Produkts ergibt in diesem Bereich eine sehr gute Übereinstimmung mit der Nukleotidsequenz des *E. coli* Stamms MT78 (O2:K1:H+), der aus der Luftröhre eines Huhns isoliert wurde (NCBI Accession AJ225176; Klemm *et al.*, 1996).

Die Beobachtung, dass für die Patientinnen-Isolate Nr. 1-6 jeweils identische PCR-Ergebnisse erhalten wurden, legte die Vermutung nahe, dass es sich bei diesen Isolaten um identische Klone handelt. Dies wurde auch anhand übereinstimmender Rep-PCR-Bandenmuster der Isolate Nr. 1-6 nachgewiesen (Brauchle, 2002). Eine Rep-PCR wird mit Primern durchgeführt, die an repetitive DNA Sequenzen binden. Da solche repetitiven Sequenzen in unterschiedlichen Abständen voneinander im *E. coli* Genom vorliegen, kann man durch einen Vergleich der Bandenmuster der Rep-PCR-Produkte verschiedene oder identische Isolate eines Stammes identifizieren.

Ebenfalls identische PCR-Ergebnisse wurden für die Patientinnen-Isolate Nr. 7, 9, 14 und 15 erhalten. Allerdings wurde für diese Isolate lediglich mit der Primerkombination ECuxuA1/ECuxuB1 (7) ein PCR-Produkt mit der erwarteten Größe amplifiziert. Bei allen weiteren bisher durchgeführten PCRs wurden keine Produkte erhalten. Dies ist ein Hinweis darauf, dass es sich bei den in diesem Bereich des Genoms auftretenden Rekombinationsereignissen bzw. Umlagerungen um relativ große Deletionen handeln könnte. Nach dem bisherigen Kenntnisstand ist wahrscheinlich in den Patientinnen-Isolaten Nr. 7, 9, 14 und 15 ein chromosomaler DNA Bereich von mindestens 34 kb deletiert.

Weitere Untersuchungen ergaben nachträglich, dass es sich bei den Isolaten Nr. 7 und 9 sowie bei Nr. 14 und 15 jeweils um identische Klone handelt (Brauchle, 2002; Maibaum, 2002).

Für das Patientinnen-Isolat Nr. 8 wurden PCR-Produkte der erwarteten Größe mit den Primerkombinationen ECyjhQ1/ECyjhQ2 (11) und ECfecR1/ECfecR2 (37) amplifiziert. Für alle weiteren PCRs wurden für dieses Isolat keine Produkte erhalten. Bei Isolat Nr. 8 handelt es sich interessanterweise um den einzigen Stamm, für den mit dem Primerpaar ECyjhQ1/ECyjhQ2 (11) das erwartete 494 bp große Fragment amplifiziert werden konnte. Für die Patientinnen-Isolate Nr. 1-6 und Nr. 18 wurde mit dieser Primerkombination ein 200 bp und für die Isolate Nr. 10, 16 und 17 ein 350 bp großes PCR-Produkt erhalten (s. Anhang Kap. 7.4, Tab. 19). Neben diesem PCR-Produkt, das um 150 bp kleiner als erwartet ist, wurde für die Isolate Nr. 10 und Nr. 17 nur noch das erwartete 518 bp PCR-Produkt mit dem Primerpaar ECuxuA1/ECuxuB1 (7) amplifiziert. Dagegen wurden für das Isolat Nr. 16 im Rahmen dieser Studie keine weiteren PCR-Produkte erhalten.

Nachträglich wurde das Patientinnen-Isolat Nr. 16 als *Proteus* und das Isolat Nr. 17 als eine Mischkultur aus *Proteus* und *E. coli* identifiziert (Blum-Oehler, persönliche Mitteilung).

Für das Isolat Nr. 12 wurde neben dem mit dem Primerpaar ECuxuA1/ECuxuB1 (7) amplifizierten Fragment der erwarteten Größe nur noch ein PCR-Produkt mit dem Primerpaar ECfecR1/ECfecR2 (37) erhalten, das allerdings 164 bp größer als theoretisch erwartet war (s. Anhang Kap. 7.4, Tab. 19).

Mit den für diese Untersuchung ausgewählten Primerkombinationen konnten für die Patientinnen-Isolate Nr. 11 und Nr. 13 bisher keine PCR-Produkte amplifiziert werden (s. Anhang Kap. 7.4, Tab. 19).

Insgesamt wurde beobachtet, dass in den Patientinnen-Isolaten Nr. 1-17 alle *fim* Gene fehlen. In den Isolaten Nr. 1-6 sind allerdings noch 167 bp des 3'-Endes von *fimH* vorhanden. Bei den Isolaten Nr. 7, 9, 10, 12, 14, 15 und 17 sollte sich die Grenze der Deletion im DNA Abschnitt stromabwärts des *fim* Genclusters im Bereich des ca. 2 kb

entfernten Gens *uxuA* befinden. Dagegen wurde für die Isolate Nr. 8, 11, 13 und 16 kein PCR-Produkt mit dem Primerpaar EC*uxuA*1/EC*uxuB*1 (7) erhalten.

Eine Grenze der Deletion stromaufwärts des *fim* Genclusters konnte bislang noch nicht eindeutig detektiert werden. Zwar wurde für die Patientinnen-Isolate Nr. 1-6 und 18 das Vorhandensein der im Genom von *E. coli* MG1655 dem *fim* Gencluster benachbarten Gene *yjhA* und *yjhT* nachgewiesen, die im folgenden DNA Bereich lokalisierten Gene fehlten allerdings. Erst für die im Stamm MG1655 dem IS1 Element benachbarten Gene *fecI* und *fecR* wurden mit den Isolaten Nr. 1-6 und 18 positive PCR-Ergebnisse erhalten.

Im Gegensatz dazu wurden mit dem Primerpaar EC*fecI*1/EC*fecI*2 (38) für alle anderen Isolate (Nr. 7-17) keine PCR-Produkte erhalten. Auch mit der Primerkombination EC*fecR*1/EC*fecR*2 (37) wurde lediglich für das Isolat Nr. 8 ein Fragment mit der erwarteten Größe amplifiziert, während das für das Isolat Nr. 12 erhaltene PCR-Produkt um 164 bp zu groß war.

Zusammenfassung der Ergebnisse in Abschnitt 5

Durch PCR-Analyse wurden Deletionsereignisse im Bereich des *fim* Genclusters in uropathogenen Isolaten untersucht, die von Patientinnen mit chronisch rezidivierenden Harnwegsinfektionen stammen.

In den Patientinnen-Isolaten Nr. 1-17 sind zusätzlich zum *fim* Gencluster sowohl benachbarte als auch weiter entfernte DNA Abschnitte deletiert. Bei den Isolaten Nr. 1-6 sind noch 167 bp vom 3'-Ende von *fimH* vorhanden.

Bei den Patientinnen-Isolaten Nr. 1-6 ist in die *fim* Deletionsstelle ein IS1 Element von *E. coli* inseriert, und zwar 263 bp vor dem Startcodon von *fimB* und 167 bp vor dem Stoppcodon von *fimH*.

Die Grenze der Deletion stromabwärts des *fim* Genclusters liegt bei den Patientinnen-Isolaten Nr. 1-6 im 3'-Ende von *fimH* und bei den anderen untersuchten Isolaten, mit Ausnahme der Isolate Nr. 8, 11, 13 und 16, im Bereich des Gens *uxuA*, welches ungefähr 2 kb von *fimH* entfernt ist.

Stromaufwärts des *fim* Genclusters wurden die Gene *fecI* und *fecR*, die ungefähr 23 kb von *fimB* entfernt lokalisiert sind, in den Isolaten Nr. 1-6 und 18 als Grenze der Deletion detektiert. Dagegen konnte für alle anderen Isolate bisher das Ausmaß der Deletion stromaufwärts des *fim* Genclusters noch nicht eindeutig bestimmt werden.

Für die beiden Patientinnen-Isolate Nr. 11 und 13 wurden noch keine K12 spezifischen Gene in der untersuchten genomischen Region nachgewiesen.

5. Diskussion

Citrobacter freundii zählt als harmloser Kommensal zur normalen intestinalen Flora von Menschen und Tieren. Als opportunistisch pathogener Erreger ist *C. freundii* u.a. an der Auslösung von Bakteriämie, Harnwegsinfektionen und Meningitis bei Neugeborenen beteiligt. Die Invasion mit anschließender Transzytose eukaryontischer Zellen stellt einen möglichen Mechanismus dar, um Wirtsbarrieren, wie Uroepithelzellen bzw. die Blut-Hirn-Schranke, zu überwinden (Huang *et al.*, 2000; Toumanen, 1996). Durch die Internalisierung können sich intrazelluläre Bakterien dem Zugriff des Immunsystems sowie der Wirkung von Antibiotika entziehen.

Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass *in vitro* die Aufnahme von *C. freundii* 3009 in das Endosom von Blasenepithelzellen (T24) über einen ausschließlich Mikrotubuli-abhängigen Mechanismus verläuft (Hess *et al.*, 2000; Oelschlaeger *et al.*, 1993). Als genetische Grundlage der Invasionskompetenz von *C. freundii* 3009 wurde eine im Chromosom lokalisierte Invasionsdeterminante identifiziert, die sowohl auf Nukleotid- als auch auf Aminosäureebene eine sehr hohe Identität zum Typ 1 Fimbrien Gencluster von *Salmonella typhimurium* aufweist (Altenhöfer, 2001; Daryab, 1998; Hess *et al.*, 2000; Michaelis, 1999; Reisenauer, 1999).

5.1 Charakterisierung der Invasionsdeterminante aus *C. freundii* 3009

Zur Ermittlung der für die Invasionsfähigkeit von *C. freundii* 3009 relevanten Gene wurden in dieser Arbeit, ausgehend von der klonierten Invasionsdeterminante (Plasmid pTO3), verschiedene Teile der Determinante subkloniert. Anschließend wurden die resultierenden rekombinanten *E. coli* K12 Stämme auf ihre Hefeagglutinations- und Invasionseigenschaften hin untersucht.

Die sukzessive Subklonierung von Plasmid pTO3 ergab, dass die Gene *fimA*, *fimI*, *fimC*, *fimD*, *fimH* und *fimF* ausreichen, um nicht-invasiven *E. coli* HB101 oder AAEC189 Stämmen sowohl Invasivität als auch die Fähigkeit zur Mannose-sensitiven Hefeagglutination zu vermitteln. Diese Gene werden in *S. typhimurium* für den

Transport der Fim Proteine und den Zusammenbau der einzelnen Proteinuntereinheiten benötigt. Die strukturellen Untereinheiten Fim_{St}A, Fim_{St}H und Fim_{St}F werden jeweils als Komplex zusammen mit dem periplasmatischen Chaperon Fim_{St}C zum Usher Fim_{St}D transportiert und dort zu einem Pilus zusammengebaut (Clegg *et al.*, 1987; Knight *et al.*, 2000; Korhonen *et al.*, 1980; Purcell *et al.*, 1987). Lediglich die Funktion von Fim_{St}I ist noch nicht bekannt. Rossolini und Mitarbeiter vermuten, dass es sich bei dem Genprodukt von *fim_{St}I* um ein Homolog von PapH aus *E. coli* handelt. Im P Fimbrien System von *E. coli* kodiert *papH* ein Protein, das bei der Verankerung des Pilus in der Zellmembran sowie bei der Regulierung der Länge des Pilus beteiligt ist (Rossolini *et al.*, 1993).

Eine Inaktivierung von *fim_{Cf}A*, entweder durch Deletion des 5'-Bereichs des Gens (pPH19) oder durch Insertion eines IS1 Elements von *E. coli* (pPH24), resultierte ebenso wie das Vorliegen eines trunkierten *fim_{Cf}F* in Plasmid pAA8 in einem Verlust der Invasions- und der Hefeagglutinationsfähigkeit der entsprechenden rekombinanten *E. coli* Stämme.

Im Gegensatz dazu sind die Gene *fim_{Cf}U*, *fim_{Cf}W*, *fim_{Cf}Y* und *fim_{Cf}Z*, die alle eine regulatorische Funktion ausüben, zumindest auf Plasmidebene für die Vermittlung von Adhäsions- als auch von Invasionseigenschaften entbehrlich. In *S. typhimurium* wird die Expression von Typ 1 Fimbrien mit Fim_{St}Z als transkriptionellem Aktivator, der direkt an den *fim_{St}A* Promotor bindet, und Fim_{St}Y als Koaktivator verstärkt, wohingegen das Produkt von *fim_{St}W* durch Interaktionen mit FimZ als Repressor wirkt (Tinker *et al.*, 2001). Das Gen *fim_{St}U* kodiert eine seltene Arginin tRNA mit dem Anticodon UCU und zeigt eine sehr hohe Homologie zu *argU* von *E. coli* (Tinker und Clegg, 2001; Tinker *et al.*, 2001; Tinker und Clegg, 2000). Durch diese tRNA wird die Aminosäure Arginin an dem seltenen Codon AGA in wachsende Polypeptidketten eingebaut. Da in den drei regulatorischen Genen *fimW*, *fimY* und *fimZ* dieses seltene Arginincodon häufig vorkommt, geht man davon aus, dass die Arginin tRNA_{UCU} eine regulatorische Funktion für diese Gene übernimmt (Clouthier *et al.*, 1998; Saxena und Walker, 1992; Tinker und Clegg, 2001).

Sowohl die Invasions- als auch die Adhäsionsfähigkeit der jeweiligen rekombinanten *E. coli* Stämme wird nicht durch die Abwesenheit der in der *S. typhimurium* *fim* Determinante regulatorische Funktionen ausübenden Genprodukte beeinträchtigt, und zwar unabhängig davon, ob es sich um einen Repressor oder Aktivator für die Expression der *fim* Gene handelt. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass die Kopienzahl der jeweiligen Plasmide in den *E. coli* Bakterienzellen hoch ist. Daher wird angenommen, dass auch in Abwesenheit der ursprünglichen Aktivatoren eine ausreichende Anzahl an *fim_{Cf}* Proteinuntereinheiten vorliegt, um die Präsentation eines funktionellen Adhäsins an der Zelloberfläche zu ermöglichen.

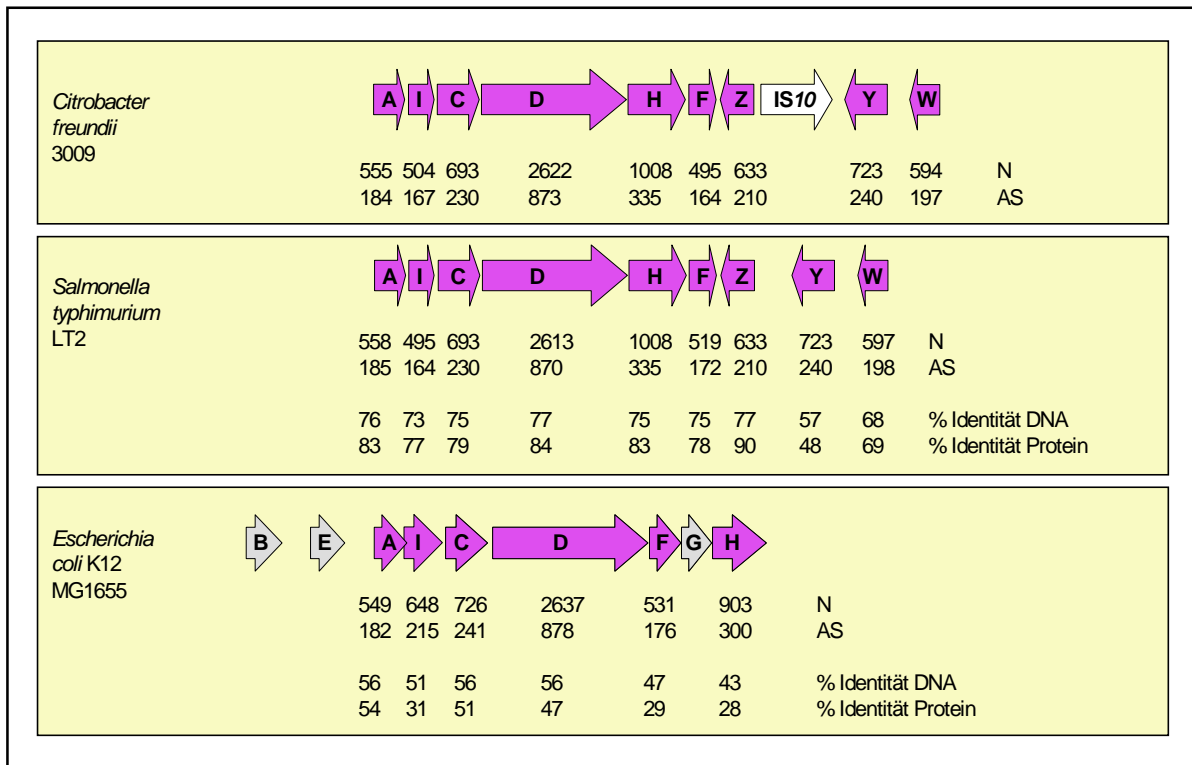


Abb. 28 Vergleich des *fim* Operons von *C. freundii* 3009 mit denen von *S. typhimurium* und *E. coli*. Die *fim* Gencluster von *Citrobacter* und *Salmonella* bestehen aus jeweils 10 ORFs. Die Anordnung der einzelnen *fim* Gene in *C. freundii* und *S. typhimurium* ist identisch, wobei in der *fim* Determinanten von *C. freundii* ein IS10 Element zwischen *fimZ* und *fimY* inseriert ist. Dagegen ist in *E. coli* K12 sowohl die Anzahl als auch die Anordnung und teilweise die Art der *fim* Gene unterschiedlich zur *Citrobacter* *fim* Determinante. Es ist die mit dem Programm CLUSTALW ermittelte Identität der *fim* Gencluster von *C. freundii* verglichen mit *S. typhimurium* bzw. von *C. freundii* verglichen mit *E. coli* K12 angegeben (s. auch Kap. 7.3 im Anhang).

N: Anzahl der Nukleotide; AS: Anzahl der Aminosäuren

Anhand von Homologievergleichen in Datenbanken wurde ermittelt, dass die sich auf der Invasionsdeterminante von *C. freundii* 3009 befindenden Gene eine sehr hohe Übereinstimmung zum *fim* Gencluster von *S. typhimurium* zeigen (Abb. 28). Der Aufbau der beiden Gencluster unterscheidet sich lediglich in der Gegenwart eines IS10 Elements zwischen den Genen *fim_{Cf}Z* und *fim_{Cf}Y* auf der klonierten Invasionsdeterminante aus *Citrobacter*. Mit Ausnahme der regulatorischen Gene *fimY* und *fimW* und deren Produkte weist die *fim* Determinante von *C. freundii* auf Nukleotid- und auch auf Aminosäureebene eine Identität von mindestens 73 % zum *fim* Operon bzw. zu den Fim Proteinen aus *S. typhimurium* auf. Vergleicht man das *fim* Gencluster aus *C. freundii* 3009 mit demjenigen aus *E. coli*, werden dagegen stellenweise erhebliche Unterschiede deutlich. Diese äußern sich nicht nur in der Anzahl, Anordnung

und Art der einzelnen *fim* Gene, sondern auch in der niedrigen Identitätsrate der in beiden Genclustern vorhandenen *fim* Gene (Abb. 28).

Aufgrund der sehr hohen Identität, welche die klonierte Invasionsdeterminante aus *C. freundii* 3009 zu den *fim* Genen von *S. typhimurium* aufweist (Abb. 28), und der Beobachtung, dass die mit dieser Determinante transformierten rekombinanten *E. coli* Stämme in Mannose-sensitiver Art und Weise Hefezellen agglutinieren, ergibt sich die Frage, ob nicht auch andere Adhäsindeterminanten in der Lage sind, Invasivität an ursprünglich nicht-invasive *E. coli* K12 Stämme zu vermitteln. Die Untersuchung der Invasionsfähigkeit von rekombinanten *E. coli* HB101 Stämmen, die entweder das *fim* Gencluster aus *E. coli* 536 (pGB30) (Hacker *et al.*, 1992) bzw. aus *S. typhimurium* (pISF101) (Clegg *et al.*, 1987), das *foc* Gencluster aus *E. coli* AD110 (pPIL110-54) (van Die *et al.*, 1985), das *sfal* Gencluster aus *E. coli* 536 (pANN801-13) (Hacker *et al.*, 1985), das *sfal* Gencluster aus *E. coli* IHE3034 (pAZZ50) (Hacker *et al.*, 1993) oder das *sfr* Gencluster aus *E. coli* BK658 (pMMP658-6) (Pawelzik *et al.*, 1988) exprimieren, ergibt in allen Fällen einen nicht-invasiven Phänotyp (Oelschlaeger, persönliche Mitteilung). Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurden also einzig für die klonierte *fim* Determinante aus *C. freundii* Stamm 3009 neben der schon bekannten Adhärenzfähigkeit auch Invasions-vermittelnde Eigenschaften nachgewiesen. Allerdings ist aus der Literatur bekannt, dass sowohl das Typ 1 Fimbrienadhäsin FimH aus dem uropathogenen *E. coli* Stamm NU14 (Martinez *et al.*, 2000) als auch Dr Fimbrien von *E. coli* IH11128 (Goluszko *et al.*, 1997) und Curli Fasern von *E. coli* O781 (Gophna *et al.*, 2001) eine entscheidende Rolle bei der Internalisierung der Bakterien spielen (s. auch Kap. 5.2).

Um weitere Hinweise zur Bedeutung der *fim_{Cf}* Determinante als Invasionssystem in *C. freundii* 3009 zu erhalten, wurden durch Deletion des zentralen Teils des *fim_{Cf}* Genclusters Wildtypmutanten konstruiert, in denen die Gene *fim_{Cf}D*, *fim_{Cf}H*, *fim_{Cf}F* und *fim_{Cf}Z* nicht mehr funktionell sind. Für die beiden Wildtypmutanten 3009-dz und 3009-dz::*kan* wurde eine im Vergleich zum Wildtyp um 80 % reduzierte Invasionsrate für humane Blasenepithelzellen (T24) ermittelt. Ähnliche Ergebnisse erhielten Bäumler und Mitarbeiter mit einer *S. typhimurium* *fim* Deletionsmutante, die weder an HeLa Zellen adhärierte noch diese invadierte (Bäumler *et al.*, 1996).

Da die für die beiden *C. freundii* Wildtypmutanten 3009-dz und 3009-dz::*kan* ermittelten Invasionsraten immer noch deutlich höher sind als diejenigen des als Kontrollstamm verwendeten, nicht-invasiven *E. coli* HB101, ist es sehr wahrscheinlich, dass *C. freundii* 3009 noch über mindestens ein weiteres Invasionssystem verfügt. Diese Annahme wird zudem durch die Beobachtung bestätigt, dass der Wildtypstamm *C. freundii* 3009 *in vitro* über einen ausschließlich Mikrotubuli-abhängigen Mechanismus humane

Blasenepithelzellen (T24) invadiert (Oelschlaeger *et al.*, 1993), wohingegen die rekombinanten *E. coli* Stämme, transformiert mit Plasmiden, die das *fim*_{Cf} Gencluster enthalten, einen Mikrofilament-abhängigen Internalisierungsweg zeigen (Reisenauer, 1999). Hierbei kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass ein in den nicht-invasiven *E. coli* Stämmen HB101 oder AAEC189 vorhandenes, rudimentäres, Mikrofilament-abhängiges Invasionsystem durch die entsprechenden Plasmide zufälligerweise komplementiert wird.

Unterschiedliche Internalisierungsmechanismen wurden ebenfalls für die Invasion von CHO (chinese hamster ovary) Zellen beobachtet. Im Gegensatz zum Wildtyp *C. freundii* 3009 können die entsprechenden rekombinanten *E. coli* Stämme *in vitro* nicht ihre Internalisierung in CHO Zellen induzieren (Reisenauer, 1999). Möglicherweise ist auf den CHO Zellen ein Rezeptor nicht vorhanden, der für eine Internalisierung über Fim_{Cf}H notwendig ist, so dass die mit dem *fim*_{Cf} Gencluster transformierten *E. coli* diese Zelllinie nicht invadieren können. Darüber hinaus ist bekannt, dass *C. freundii* 3009 in humane Ileo-Coecum Zellen (HCT8) sowohl Mikrotubuli- als auch Mikrofilament-abhängig eindringt (Oelschlaeger *et al.*, 1993; Reisenauer, 1999).

Die Hypothese, dass in *C. freundii* 3009 neben der *fim* Determinante noch andere Invasionsysteme vorhanden sein können, wird durch die Beobachtung unterstützt, dass zwar die Invasionsraten der rekombinanten *E. coli* Stämme HB101pTO3 und HB101pPH1, die die *fim*_{Cf} Determinante tragen, durch Mannose bzw. Chitinhydrolysat, einer Mischung aus GlcNac Monomeren und Oligomeren, reduziert werden, die Hefeagglutination dieser Stämme dagegen nur mit Mannose, nicht aber mit Chitinhydrolysat inhibiert werden kann. Dies legt die Vermutung nahe, dass bei der Adhäsion der Bakterien und dem darauf folgenden Invasionsprozess sowohl unterschiedliche Adhäsine bzw. Invasine als auch verschiedene Zellrezeptoren beteiligt sind. Bis jetzt ist noch nicht bekannt, ob neben der Mannose-bindenden Domäne in FimH in der *fim*_{Cf} Determinante auch ein Genprodukt mit einer Domäne vorhanden ist, welche für die Bindung an GlcNAc Reste von Wirtszellen verantwortlich ist. Offensichtlich lässt sich die Internalisierung von *C. freundii* 3009 sowie der, mit der *fim*_{Cf} Determinanten transformierten, rekombinanten *E. coli* Stämme als ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Adhärenz- und Invasionsfaktoren darstellen.

Entsprechende Beobachtungen machten Bäumlner und Mitarbeiter mit *S. typhimurium* Deletionsmutanten, in denen verschiedene Fimbriendeterminanten ausgeschaltet wurden. Während der *S. typhimurium* Stamm mit einer Mutation im *lpf* (long polar fimbriae) Operon nicht mehr in der Lage ist, HEp-2 Zellen zu invadieren, kann die *S. typhimurium* *fim* Deletionsmutante nicht mehr in HeLa Zellen eindringen (Bäumlner *et al.*, 1996). Diese Resultate verdeutlichen, dass die über unterschiedliche Fimbrien-adhäsine vermittelte Adhärenz an verschiedene Zelllinien Voraussetzung für die Internalisierung von *S. typhimurium* ist.

In diesem Zusammenhang muss darauf hingewiesen werden, dass in dieser Arbeit die Internalisierung von *C. freundii* 3009 in T24 Zellen sowohl durch Mannose als auch durch Chitinhydrolysat inhibiert werden konnte. Dagegen wurde in einer vorhergehenden Versuchsreihe in Anwesenheit von Mannose eine Reduzierung der Invasionsrate von *C. freundii* 3009 nicht beobachtet (Hess *et al.*, 2000). Diese Diskrepanz ist wahrscheinlich auf unterschiedliche Versuchsbedingungen zurückzuführen. Die Vorbehandlung der Bakterien erfolgte jeweils in Zellkulturmedium, das mit den jeweiligen Kohlenhydraten versetzt wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Bakterien in dieser Lösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur präinkubiert, wogegen in der vorhergehenden Versuchsreihe eine 60-minütige Inkubationszeit bei 4°C gewählt wurde. Die Ursache für diese kontroversen Ergebnisse sollte in einer Folgestudie ermittelt werden.

Durch die Komplementation der Wildtypmutante *C. freundii* 3009-dz wurde eine Wiederherstellung des invasiven Phänotyps erreicht. Die Internalisierungsrate der Komplementante 3009-dzpPH23 in T24 Zellen betrug 62 % im Vergleich zum Wildtyp 3009 (Altenhöfer, persönliche Mitteilung). Allerdings konnte für die Komplementante 3009-dzpPH23 auch nach entsprechender Kultivierung (Standkultur, mehrmaliges Überimpfen) keine Agglutination mit Hefezellen beobachtet werden. Als Ursache dafür könnte die für *C. freundii* bekannte Expression einer Vi Kapsel (Ou *et al.*, 1988) in Frage kommen, wodurch sehr wahrscheinlich die über Fim_{Cf}H vermittelte Agglutination von Hefezellen sterisch beeinträchtigt wird. Entsprechende Beobachtungen machten Matatov und Mitarbeiter mit *Klebsiella pneumoniae* Isolaten, bei denen durch die Ausbildung einer Kapsel der Zusammenbau der Typ 1 Fimbrienuntereinheiten an der Zelloberfläche zu einem funktionellen Pilus behindert wurde (Matatov *et al.*, 1999). Da aber mit dem Wildtyp *C. freundii* 3009 eine Hefeagglutination nur nach Anzucht unter speziellen Bedingungen und nicht immer zuverlässig reproduzierbar beobachtet wurde, ist es ebenfalls möglich, dass für die Komplementante die idealen Bedingungen für eine effektive Expression der *fim*_{Cf} Gene noch nicht gefunden wurden (s. auch Kap. 5.3).

Im Gegensatz dazu ergaben die Komplementationsstudien auf Plasmidebene, die mit den *E. coli* Stämmen HB101 und AAEC189, die jeweils die Plasmidpaare pPH8/pPH11 bzw. pPH9/pPH11 enthielten, durchgeführt wurden, positive Ergebnisse im Hefeagglutinationstest. Allerdings konnte ein invasiver Phänotyp nicht wieder hergestellt werden. Diese Beobachtungen lassen sich vermutlich auf einen Gendosis Effekt zurückführen. Aufgrund der unterschiedlichen Vektoranteile (pBS II KS, pSU18) in den verwendeten Plasmiden kann es zu einem ungünstigen Verhältnis der einzelnen *fim*_{Cf} Genprodukte in der Bakterienzelle kommen, wodurch beispielsweise der Zusammenbau des Adhäsins an der Zelloberfläche gestört wird. Dies könnte dazu führen, dass nur

eine geringe Anzahl von Adhäsinen an der Zelloberfläche vorhanden ist, die zwar für eine positive Hefeagglutination ausreicht (ähnlich der Agglutination mit Antikörpern), nicht jedoch für eine erfolgreiche Internalisierung der Bakterien. Dass die Art des Zusammenbaus von verschiedenen Proteinuntereinheiten bzw. die Polymerisation eines einzelnen Adhäsins an der Oberfläche der Bakterienzelle eine entscheidende Rolle für die Funktion spielt, erkennt man am Beispiel des *Yersinia* YadA (*Yersinia adherence protein*). YadA ist ein Homotrimer, das aus rund 45 kDa großen Untereinheiten besteht, welche in der äußeren Membran über den C-Terminus verankert sind. Der N-Terminus weist eine Lollipop ähnliche Struktur auf, mit der die gesamte Bakterienzelle überzogen ist (El Tahir und Skurnik, 2001). Damit bildet das YadA Polymer an der Oberfläche der Bakterien eine Fimbrien-ähnliche Struktur aus. Eine Autoagglutination von *Yersinia* wird nur beobachtet, wenn die Bakterien bei 37°C kultiviert werden. Diese Autoagglutination ist sowohl abhängig von der Lokalisation des Adhäsins YadA an der Zelloberfläche als auch von der korrekten Polymerisation von YadA (Skurnik *et al.*, 1984; Tamm *et al.*, 1993). Ebenso wurde für S Fimbrien von *E. coli* festgestellt, dass bestimmte Fimbrienuntereinheiten einen Einfluss auf den Zusammenbau der Fimbrien und das Ausmaß der Fimbrierung einer Bakterienzelle haben (Schmoll *et al.*, 1989).

Als Krankheitserreger sind *Citrobacter* spp. u.a. bei der Auslösung von Neugeborenen-Meningitis mit hohen Mortalitätsraten beteiligt (Li *et al.*, 1990; Rae *et al.*, 1991). Die Transzytose von Epithel- und Endothelzellen stellt einen potenziellen Mechanismus zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke dar (Huang *et al.*, 2000). Neuere Untersuchungen beschreiben die Fähigkeit von *C. freundii* 3009, in Endothelzellen aus den Mikrokapillarien des menschlichen Gehirns (HBMEC) *in vitro* eindringen zu können (Badger *et al.*, 1999). In einem Neugeborenen-Ratten-Modell sollte nun untersucht werden, ob sowohl der Wildtyp *C. freundii* 3009 als auch der rekombinante *E. coli* Stamm HB101pPH1 in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke *in vivo* zu überwinden. Die Ergebnisse, dass in diesen *in vivo* Experimenten beide Stämme in der Zerebrospinalflüssigkeit der Tiere nachgewiesen werden konnten, unterstreichen die Relevanz der Invasionsdeterminante *fim_{Cf}* für eine erfolgreiche Invasion von Wirtszellen und somit insgesamt für die Pathogenität von *C. freundii* 3009.

5.2 Adhäsine als Invasine

Die Adhäsion an Wirtszellen stellt für viele pathogene Bakterien einen ersten wichtigen Virulenzmechanismus bei der Kolonisierung von Wirtsgewebe und der anschließenden Etablierung einer Infektion dar. Durch die Expression eines oder mehrerer Adhäsine gelingt es den Bakterien, sich in räumliche Nähe zur Wirtszelle zu bringen und somit die Voraussetzung für anschließende Interaktionen zu schaffen. Außerdem sind adhärierende Mikroorganismen vor dem ausspülenden Effekt von unspezifischen Wirtsabwehrmechanismen, wie Urinfluss, geschützt (Falkow *et al.*, 1992; Oelschlaeger, 2001). Adhäsine sind in der Lage, spezifisch an Wirtszellrezeptoren zu binden. Sie sind entweder Bestandteil von filamentösen Strukturen an der Oberfläche von Bakterien (sogenannte Pili oder Fimbrien) oder bilden nicht-fimbrielle Oberflächenstrukturen (sogenannte afimbrielle bzw. nicht-fimbrielle Adhäsine). Lange Zeit nahm man an, dass für die beiden Vorgänge Adhäsion und anschließende Invasion verschiedene Strukturen auf der Oberfläche der Mikroorganismen verantwortlich sind. Neuere Studien belegen, dass einige Adhäsine neben ihrer klassischen noch eine weitere Funktion zeigen, sie fungieren zusätzlich als Invasine. Dabei kann das Adhäsins selbst komplexe Signalkaskaden sowohl in der Wirtszelle als auch im Bakterium auslösen und letztendlich die Internalisierung der Bakterien in die Wirtszellen induzieren (Abraham *et al.*, 1998; Oelschlaeger, 2001; Svanborg *et al.*, 1999). Prominente Vertreter dieser Klasse von sozusagen bifunktionellen Adhäsinen sind u.a. Afa von pathogenen *E. coli* Stämmen (Jouve *et al.*, 1997), Intimin (Eae) von enterohämorrhagischen und enteropathogenen *E. coli* (Kenny *et al.*, 1997), Dr-II von *E. coli* (Pham *et al.*, 1997), Invasin und YadA von *Yersinia* spp. (Bliska *et al.*, 1993b; El Tahir und Skurnik, 2001; Hoiczky *et al.*, 2000), Opa von *Neisseria* spp. (van Putten *et al.*, 1997; Virji *et al.*, 1996) und Internalin (InIA und InIB) von *Listeria monocytogenes* (Braun *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2000) (s. auch Tab. 18).

Das Adhäsins Fim_{Ec}H eines uropathogenen *E. coli* Stamms (NU14) wurde kürzlich als diejenige Fimbrienuntereinheit identifiziert, die gleichzeitig auch die Internalisierung der Bakterien in humane Blasenepithelzellen vermittelt. Diese zusätzliche Funktion von Fim_{Ec}H als Invasin wurde dabei nicht nur anhand der Invasion von Blasenepithelzellen durch die uropathogenen *E. coli*, sondern auch anhand der Aufnahme von mit Fim_{Ec}H beschichteten Latexkügelchen in die Wirtszellen gezeigt (Martinez *et al.*, 2000; Mulvey, 2002). Die Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass Fim_{Cf}H aus der Invasionsdeterminante von *C. freundii* 3009 ebenfalls über Invasions-vermittelnde Eigenschaften verfügen könnte. Erste Hinweise darauf liefern die in Invasionsassays mit den beiden *C. freundii* Wildtypmutanten 3009-dz und 3009-dz::kan, in welchen die Gene *fim_{Cf}D*, *fim_{Cf}H*, *fim_{Cf}F* und *fim_{Cf}Z* inaktiviert sind, erhaltenen Resultate. Die beiden Deletionsmutanten zeigten im Vergleich zum Wildtyp 3009 eine um 80 % reduzierte Invasionsrate. Um diesen Sachverhalt genau zu klären, müssten allerdings noch

detailliertere Untersuchungen, ähnlich den von Martinez und Mitarbeitern beschriebenen (Martinez *et al.*, 2000), durchgeführt werden.

Tab. 18 Bakterielle fimbrielle und nicht-fimbrielle Adhäsine, die gleichzeitig auch als Invasine fungieren

Spezies	Adhäsion/Invasin	Internalisierungsrezeptor	Krankheit
Fimbrienadhäsine			
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Pilus	48 kDa Protein	Parodontitis
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi	Typ IVB Pilus	CFTR (AS 108-177)	Diarrhö, Bauchtyphus
UPEC	FimH Dr Fimbrien	CD48; Uroplakin Ia/Ib SCR3 von DAF	Harnwegsinfekte Pyelonephritis
<i>E. coli</i>	Curli ¹	?	Sepsis
nicht-fimbrielle Adhäsine			
<i>Bordetella pertussis</i>	FHA	$\alpha_{\text{mac}}\beta_2$ Integrine	Keuchhusten
<i>E. coli</i>	AfaD ²	?	Cystitis
EHEC, EPEC	Intimin (EaeA)	Tir (Hp90)	Diarrhö
<i>Listeria monocytogenes</i>	Internalin A Internalin B	E-Cadherin Met/gC1q-R/p32	Listeriose
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Opa30/50 Opa52 Vitronectin/Opc	Syndecan (Proteoglycan) CD66 $\alpha_v\beta_3$ oder $\alpha_5\beta_1$ Integrine	Gonorrhö (Tripper)
UPEC	Dr-II	SCR-3 von DAF	Harnwegsinfekte
<i>Yersinia</i> spp.	Invasin (Inv) YadA	β_1 Integrine β_1 Integrine	Pest, Adenitis, Sepsis

AS: Aminosäuren; CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; DAF: decay-accelerating factor; FHA: filamentous hemagglutinin; SCR: short consensus repeat; Tir: translocated intimin receptor; YadA: Yersinia adherence protein A

¹ Gophna *et al.*, 2001; ² Jouve *et al.*, 1997
(modifiziert nach Oelschlaeger, 2001)

Während Fim_{Ec}H nur 28 % Identität zu Fim_{Cf}H zeigt, ist Fim_{St}H auf Aminosäurenebene zu 83 % mit Fim_{Cf}H identisch (vgl. Abb. 28). Für Typ 1 Fimbrien von *S. typhimurium* sind bisher noch keine Invasions-vermittelnden Eigenschaften bekannt. Daher wird in weiterführenden Untersuchungen im klonierten *S. typhimurium fim* Gencluster (pISF101) *fim_{St}H* gegen *fim_{Cf}H* aus *C. freundii* 3009 ausgetauscht. Wenn nach Transformation mit diesem Konstrukt ein eigentlich nicht-invasiver *E. coli* Stamm, z.B. HB101 oder AAEC189, einen invasiven Phänotyp zeigt, würde dies die Invasions-vermittelnden Eigenschaften von Fim_{Cf}H demonstrieren.

Das Verständnis der molekularen Wechselwirkungen zwischen bakteriellen Liganden und ihren Wirtszellrezeptoren kann als Basis für die Entwicklung neuer, zielgerichteter, antimikrobieller Wirkstoffe dienen. Solche Wirkstoffe können bei bakteriellen Infektionen als Alternative zur Behandlung mit Antibiotika eingesetzt werden, um dem zunehmenden Auftreten von (multi-)resistenten Erregern weltweit entgegen zu wirken. Die Blockierung der Interaktionen zwischen bakteriellen Adhäsinen und den entsprechenden Wirtszellrezeptoren stellt die Grundlage der sogenannten Anti-Adhäsiven-Therapie dar (Kelly und Younson, 2000; Ofek *et al.*, 1996).

Bei der Prävention und Behandlung von Harnwegserkrankungen steht das Adhäsiv FimH von *E. coli* im Mittelpunkt der Entwicklung verschiedener Konzepte im Rahmen einer Anti-Adhäsiven-Therapie. So beobachteten Aronson und Mitarbeiter, dass durch den Zusatz eines löslichen Wirtszellrezeptor-Analogons die über FimH vermittelte Anheftung der Bakterien an Blasenepithelzellen blockiert wird und somit eine experimentelle Harnwegsinfektion im Maus-Modell verhindert werden kann (Aronson *et al.*, 1979). Ebenfalls in einem Maus-Harnwegsinfektionen-Modell demonstrierten Langermann und Mitarbeiter, dass diejenigen Mäuse, die direkt mit FimH immunisiert wurden, vor einer nachfolgenden Infektion mit *E. coli* geschützt waren (Langermann *et al.*, 1997). Darüber hinaus zeigten Thankavel und Mitarbeiter, dass mit Antikörpern, welche spezifisch gegen die putative Rezeptorbindungsdomäne von FimH gerichtet sind, in einem experimentellen Maus-Modell eine Kolonisierung der Blase mit *E. coli* signifikant gehemmt werden kann (Thankavel *et al.*, 1997).

5.3 Expression von *fim* Genen aus *C. freundii* 3009

Der Nachweis der Expression der *fim_{Cf}* Gene und die ungefähre Bestimmung des Molekulargewichts der entsprechenden Genprodukte sollte der Verifizierung der offenen Leseraster dienen, die anhand der klonierten und sequenzierten Invasionsdeterminante aus *C. freundii* 3009 ermittelt wurden. Da diese Invasionsdeterminante eine hohe Identität zum Typ 1 Fimbrien Operon von *S. typhimurium* zeigt (s. Abb. 28), sollte

darüber hinaus die Lokalisierung der Fim_{Cf} Proteine an der Oberfläche der Bakterienzellen sowie deren mögliche Assemblierung in eine Fimbrienstruktur untersucht werden.

Die Mannose-sensitive Hefeagglutination stellt einen einfachen phänotypischen Nachweis für das Auftreten des Adhäsins FimH an der Oberfläche der Bakterienzelle dar. Diese Agglutination wurde mit den rekombinanten *E. coli* Stämmen, die Plasmide (pTO3, pPH1) enthielten, die das *fim*_{Cf} Gencluster kodieren, eindeutig nachgewiesen. Dagegen gelang dies mit dem Wildtyp *C. freundii* 3009 nur unter speziellen Anzuchtbedingungen (Standkultur, mehrmaliges Überimpfen) und war nicht jederzeit reproduzierbar. Als mögliche Erklärung für das unterschiedliche Verhalten im Hefeagglutinationstest kommt zum einen die eventuell höhere Anzahl von Fim_{Cf}H Untereinheiten auf der Zelloberfläche der rekombinanten *E. coli* Stämme und zum anderen eine sterische Hinderung durch die Vi Kapsel von *C. freundii* 3009 in Frage, was schon in Kap. 5.1 diskutiert wurde.

Darüber hinaus konnten in elektronenmikroskopischen Untersuchungen weder für den Wildtyp *C. freundii* 3009 noch für den rekombinanten *E. coli* AAEC189pPH1 Typ 1 Fimbrien auf der Bakterienoberfläche nachgewiesen werden. Somit ist davon auszugehen, dass die Fim_{Cf} Proteinuntereinheiten an der Zelloberfläche nicht zu einem funktionellen Pilus zusammengebaut werden. Ein ähnlicher Vorgang wird für Typ 1 Fimbrien von *E. coli* beschrieben, bei denen *fim*_{Ec}H aus dem *fim*_{Ec} Gencluster deletiert ist, was zu einer signifikanten Reduzierung der Anzahl der Fimbrien auf der Bakterienoberfläche führt (Schembri *et al.*, 2002). Das Adhäsin Fim_{Ec}H, welches an der Spitze des Pilus lokalisiert ist, gilt als Initiator der Biogenese der Fimbrien mittels „donor-strand complementation“. Man vermutet, dass eine Störung dieser Wechselwirkungen zu einer Akkumulation von nicht zusammengebauten Fimbrienuntereinheiten im Periplasma der Bakterienzelle führt. Dadurch werden wiederum Signaltransduktionskaskaden ausgelöst, welche die *fim* Genexpression (negativ) regulieren (Choudhury *et al.*, 1999; Klemm und Schembri, 2000).

Andererseits könnten möglicherweise Unterschiede in der Aminosäuresequenz der Grund dafür sein, dass die Fim_{Cf} Proteinuntereinheiten im Gegensatz zu denjenigen aus *S. typhimurium* nicht zu einem intakten Pilus an der Zelloberfläche zusammengebaut werden, obwohl die beiden *fim* Gencluster eine hohe Identität zueinander aufweisen (s. Abb. 28). So werden beispielsweise die Genprodukte des *afa-3* (afimbrial adhesin) Genclusters, dessen Nukleotidsequenz zu 98 % identisch ist mit der des Dr Pili Operons, ebenso nicht zu einem Pilus zusammengebaut (Le Bouguenec *et al.*, 1993; Nowicki *et al.*, 1990). Die Ursache dafür ist bisher noch unbekannt.

Das Prinzip, dass durch Punktmutationen in der Nukleotidsequenz von *fim*_{Ec}H durchaus die Eigenschaften des entsprechenden Genprodukts beeinflusst werden können, wurde von Sokurenko und Mitarbeitern demonstriert. Sie stellten fest, dass aufgrund

bestimmter Punktmutationen in *fim_{EcH}* die Bindungskapazität des Adhäsins an Monomannose-Reste der uroepithelialen Glykoproteine verstärkt wird und als Folge davon die Virulenz der Erreger gesteigert werden kann. Dies wird als adaptiver Mechanismus der Mikroorganismen betrachtet, da die Möglichkeit besteht, dass sich auf diese Weise aus ursprünglich harmlosen Dickdarmkommensalen uropathogene *E. coli* Stämme entwickeln können (Sokurenko *et al.*, 1998).

In Elektronenmikroskopiestudien mit den Stämmen *C. freundii* 3009 und *E. coli* AAEC189pPH1 konnte ein Zusammenbau der Fim_{Cf} Proteine zu einem Pilus an der Oberfläche der Bakterien nicht nachgewiesen werden. Allerdings wurden in den Präparaten dieser Stämme viele flagellierte Bakterien beobachtet. Für *S. typhimurium* ist bekannt, dass sich die Expression von Fimbrien und Flagellen wechselseitig beeinflussen. So führt eine erhöhte Expression von FimZ zwar zu übermäßig fimbrierten, aber nicht mehr motilen Bakterien, was auf eine reduzierte Expression des Flagellen-Operons *flhDC* zurückgeführt werden kann (Clegg und Hughes, 2002). Ein ähnliches Verhältnis wird für die Expression von *fim* und *pap* (pyelonephritis associated pili) Genen in *E. coli* berichtet. Über das regulatorische Protein PapB wird die Expression der Typ 1 Fimbrien blockiert, sobald in derselben Bakterienzelle gleichzeitig P Fimbrien gebildet werden (Xia *et al.*, 2000). Ein anderes Beispiel für die entgegengesetzt kontrollierte Expression von bakteriellen Oberflächenstrukturen in *E. coli* stellt die Bildung des Autotransporterproteins Antigen 43 (*flu*) und von Typ 1 Fimbrien dar. Antigen 43 ist in vielen *E. coli* Stämmen für die Autoaggregation der Bakterienzellen verantwortlich (Schembri *et al.*, 2002). In diesem Fall ist bisher allerdings noch nicht eindeutig geklärt, ob sich wirklich die Expression der *fim* und *flu* Gene gegenseitig ausschließt, oder ob statt dessen die zur Autoaggregation notwendigen interzellulären Antigen 43-Antigen 43-Interaktionen durch die Anwesenheit von Typ 1 Fimbrien auf der Bakterienoberfläche beeinträchtigt werden (Hasman *et al.*, 1999). Die zuvor angeführten Beispiele belegen, dass in einer Bakterienzelle niemals alle Oberflächenstrukturen, für die Gene im Chromosom vorhanden sind, gleichzeitig exprimiert werden, was vermutlich auf den dafür notwendigen hohen Aufwand an Energie und biologischem Material zurückzuführen ist. Zu diesem Zweck scheint es eine Art „Zwiesprache“ zwischen den entsprechenden Operons zu geben.

Da es mit Hilfe der Elektronenmikroskopie nicht gelungen ist, zu einem Pilus zusammengebaute Fim_{Cf} Proteinuntereinheiten an der Zelloberfläche von *C. freundii* 3009 und dem rekombinanten *E. coli* Stamm HB101pPH1 nachzuweisen, sollte mittels proteinchemischer Methoden die Expression der Fimbrienuntereinheiten aus *C. freundii* 3009 demonstriert werden. Dies gelang für Fim_{Cf}A, Fim_{Cf}D, Fim_{Cf}F und Fim_{Cf}H mittels radioaktiver Markierung in einem T7 Expressionssystem. Die dadurch ermittelten Molekulargewichte dieser Fim_{Cf} Proteine stimmen mit den anhand der abgeleiteten

Aminosäuresequenz berechneten Werten gut überein. Somit konnten die für diese *fim*_{Cf} Gene durch Sequenzdaten und Homologievergleiche definierten offenen Leseraster bestätigt werden.

Außerdem wurde mit Hilfe der Westerblot-Analyse versucht, die Untereinheiten *Fim*_{Cf}F und *Fim*_{Cf}H an der Oberfläche der Bakterienzellen zu detektieren. Dazu wurden spezifische Polypeptid-Antiseren verwendet. Während mit dieser Methode eine *Fim*_{Cf}F entsprechende Proteinbande lediglich für die beiden rekombinanten *E. coli* Stämme BL21pLysSpB7-3 und AAEC189pPH1 beobachtet wurde, konnte die Expression des Adhäsins *Fim*_{Cf}H zusätzlich auch für den Wildtyp *C. freundii* 3009 nachgewiesen werden. Interessanterweise trat die *Fim*_{Cf}H aus dem Wildtyp repräsentierende Bande bei einem etwas größeren Molekulargewicht als die entsprechenden Signale von *Fim*_{Cf}H aus den rekombinanten *E. coli* Stämmen auf. Dies könnte eventuell ein erster Hinweis auf eine post-translationale Modifikation von *Fim*_{Cf}H im Wildtyp *C. freundii* 3009 sein. In neueren Studien wird zunehmend von der Möglichkeit einer Glykosylierung von prokaryontischen Proteinen berichtet. Dabei handelt es sich vor allem um bakterielle Oberflächenproteine, wie z.B. Pili von *Neisseria meningitidis* (Schäffer *et al.*, 2001; Virji, 1997).

Insgesamt kann die Expression von Fimbrienproteinen auf der Oberfläche einer Bakterienzelle als komplexer Prozess beschrieben werden, der durch vielfältige Faktoren und Signale beeinflusst wird. Dabei handelt es sich sowohl um intrazelluläre Regulationsmechanismen des Organismus selbst als auch um Signale oder Reize aus der Umwelt. Um ein genaueres Verständnis dieser Vorgänge in *C. freundii* 3009 zu erhalten, sollten u.a. die optimalen Kulturbedingungen für eine verstärkte *fim*_{Cf} Expression gefunden werden. Sowohl in *S. typhimurium* als auch in *E. coli* unterliegt die Expression des *fim* Genclusters einer Phasenvariation. Dadurch kann der Anteil fimbrierter Bakterienzellen in einer Population reguliert werden (Clegg *et al.*, 1996; Freitag *et al.*, 1985).

Stentebjerg-Olesen und Mitarbeiter beobachteten mit dem *E. coli* Stamm AAEC350 eine Zunahme der Typ 1 Fimbrienexpression, wenn die Bakterien als Standkultur unter aeroben Bedingungen angezogen wurden (Stentebjerg-Olesen *et al.*, 2000). Neben den Wachstumsbedingungen üben sowohl die Temperatur als auch die Zusammensetzung des Kulturmediums einen Effekt auf die durch Phasenvariation regulierte Expression des *fim*_{EC} Genclusters aus (Gally *et al.*, 1993).

Darüber hinaus stellt beispielsweise der Kontakt mit Wirtszellen ein Umweltsignal dar, das einen Einfluss auf die Genexpression von verschiedenen Adhärenzfaktoren hat. So löst eine Interaktion von *S. typhimurium* mit Epithelzellen die Bildung verschiedener Oberflächenproteine aus (Ginocchio *et al.*, 1994). Auch die Expression der Typ IV Pili (Tfp) von *Neisseria* spp. wird durch Kontakt mit den Wirtszellen reguliert. Hierbei wird

nach dem Anheften der Bakterien an eine Wirtszelle die Retraktion des Pilus eingeleitet (Winther-Larsen und Koomey, 2002).

5.4 Deletion des *fim* Genclusters in uropathogenen Patientinnen-Isolaten

Harnwegsinfektionen zählen in den Industriestaaten zu den am häufigsten auftretenden bakteriellen Infektionen beim Menschen. Die menschliche Darmflora wird dabei als Erregerreservoir angesehen. Uropathogene *E. coli* sind die wichtigsten Erreger von Infektionen im Bereich der Nieren und ableitenden Harnwege. Im Vergleich zu apathogenen *E. coli* Stämmen verfügen UPEC in der Regel über zusätzliche Virulenz- und Fitnessfaktoren, z.B. Adhäsine, Eisenaufnahmesysteme, Kapseln, Toxine oder Serumresistenz (Mühldorfer und Hacker, 1994). Dadurch sind UPEC in der Lage, die verschiedenen wirtsspezifischen Abwehrmechanismen zu überwinden, in den Harntrakt zu gelangen und dort akute Infektionen auszulösen oder sogar zu persistieren (Donnenberg und Welch, 1996).

Die erfolgreiche Etablierung einer Harnwegsinfektion beginnt normalerweise zunächst mit der Kolonisierung der Urethra (Harnröhre). Daran anschließend können UPEC auch die Harnblase besiedeln. Die Anheftung der Erreger an menschliche Uroepithelzellen stellt den ersten wichtigen Schritt im Verlauf einer Harnwegsinfektion dar, weil adhärierende Bakterien in den Harnwegen vor dem auswaschenden Effekt des Urinflusses geschützt sind. Diese Bindungsfähigkeit der Bakterien wird über unterschiedliche Adhäsine vermittelt, die somit als bedeutende Virulenzfaktoren von uropathogenen *E. coli* angesehen werden. Zu den bei UPEC weit verbreiteten Fimbrienadhäsinen zählen Typ 1 und P Fimbrien (Mulvey, 2002; Wullt *et al.*, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen einer umfangreicheren Studie zur Analyse von Virulenzfaktoren in uropathogenen Stuhl- und Urin-Isolaten von Patientinnen mit chronisch rezidivierenden Harnwegsinfektionen (Blum-Oehler, unveröffentlichte Ergebnisse; Brauchle, 2002; Maibaum 2002) 17 dieser uropathogenen Isolate hinsichtlich der Deletion des Typ 1 Fimbrien Genclusters aus dem bakteriellen Genom untersucht. Die PCR-Analyse ergab, dass in den Patientinnen-Isolaten Nr. 1-6 lediglich noch 167 bp vom 3'-Ende von *fimH* vorhanden sind. In den weiteren Isolaten Nr. 7-17 waren mittels PCR keine *fim* Gene mehr nachweisbar. Auch phänotypisch konnte für diese Patientinnen-Isolate keine Typ 1 Fimbrien Expression beobachtet werden, was mittels Mannose-sensitiver Hefeagglutination untersucht wurde. Somit ist davon auszugehen, dass die für diese Studie ausgesuchten uropathogenen Isolate, die sowohl aus Stuhl- als auch aus Urinproben der Patientinnen stammen, nicht mehr in der Lage sind, das Fimbrienadhäsine FimH, welches an der Spitze des Pilus lokalisiert ist, an

der Zelloberfläche zu exprimieren. Damit ist im Genom dieser uropathogenen Patientinnen-Isolate ein Virulenzfaktor nicht mehr vorhanden, der normalerweise für die Kolonisierung der Blase durch UPEC als bedeutend angesehen wird (Langermann *et al.*, 1997; Mulvey *et al.*, 1998; Orndorff und Bloch, 1990; Thankavel *et al.*, 1997).

Die Bedeutung des *fim* Operons für die Virulenz von uropathogenen *E. coli* wurde in zahlreichen Studien untersucht. In einem Maus-Cystitis-Modell konnte die Anheftung des Typ 1 fimbrierten UPEC Isolats NU14 an die Uroepithelzellen der Blase nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden in mit dem isogenen *fimH* negativen Stamm NU14-1 infizierten Blasen keine adhätierenden Bakterien beobachtet. In dieser Studie wurde zudem festgestellt, dass lediglich durch den fimbrierten UPEC Stamm eine Exfoliation der Blasenepithelzellen induziert wird (Mulvey *et al.*, 1998). Die Eliminierung von infizierten und geschädigten Blasenepithelzellen gilt als angeborener Wirtsabwehrmechanismus des Harntrakts. Diese Ergebnisse belegen die bedeutende Rolle, welche die Bindung des Fimbrienadhäsins FimH an die Mannose-haltigen Wirtszellrezeptoren, die auf den lumenalen Blasenepithelzellen präsentiert werden, für die Kolonisierung der Harnblase durch UPEC darstellt.

Auch in anderen Studien wurde gezeigt, dass Typ 1 Fimbrien im Harntrakt *in vivo* einen wichtigen Virulenzfaktor für die Besiedlung sowie die Persistenz von UPEC und damit letztendlich für die Etablierung einer Infektion darstellen. So konnten Connell und Mitarbeiter in einer klinischen Studie mit Kindern, die an einer fiebrigen Harnwegsinfektion erkrankt waren, nachweisen, dass diejenigen *E. coli* (O1:K1:H7) Isolate, welche Typ 1 Fimbrien exprimieren, einen schwereren Krankheitsverlauf hervorrufen als nicht-fimbrierte Isolate desselben Serotyps. Darüber hinaus wurde bei Untersuchungen dieser Isolate in einem Maus-Harnwegsinfektionen-Modell für die Typ 1 fimbrierten Stämme eine stärkere Immunantwort der Wirtszellen beobachtet. Dadurch kann man davon ausgehen, dass die Expression von Typ 1 Fimbrien die Virulenz von uropathogenen *E. coli* Isolat im Harntrakt steigert (Connell *et al.*, 1996). Im Gegensatz dazu wurde bei den in dieser Arbeit untersuchten uropathogenen Isolaten eine Deletion des *fim* Genclusters detektiert, obwohl sie von Patientinnen mit chronisch rezidivierenden Harnwegsinfektionen stammten. Möglicherweise besteht hier ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Typ 1 Fimbrien exprimierenden uropathogenen Stämmen und akuten schweren Krankheitsverläufen einerseits, und dem Vorkommen von überwiegend nicht-fimbrierten Bakterien in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium andererseits.

Bahrani-Mougeot und Mitarbeiter identifizierten mittels „Signature-tagged mutagenesis“ (STM) Typ 1 Fimbrien als unentbehrliche Virulenzdeterminante von UPEC für die Besiedlung des Harntrakts von Mäusen (Bahrani-Mougeot *et al.*, 2002).

Darüber hinaus wurde in zwei Studien die Phasenvariation der Typ 1 Fimbrienexpression von UPEC *in vivo* in einem Maus-Harnwegsinfektionen-Modell

untersucht. Dazu wurde durch PCR-Analyse die Orientierung des 314 bp langen invertierbaren DNA-Fragments (*fim* switch), auf dem der *fimA* Promotor lokalisiert ist, bestimmt (Lim *et al.*, 1998; Struve und Krogfelt, 1999). Struve und Krogfelt beobachteten, dass alle Bakterien, die einen bzw. drei Tage nach der Infektion der Mäuse direkt aus der Blase, der Niere oder dem Urin isoliert wurden, den Promotor in der „an“-Orientierung aufweisen und tatsächlich auch Typ 1 Fimbrien an der Zelloberfläche exprimieren. Anhand dieser Ergebnisse postulierten sie, dass unter den im Harntrakt von Mäusen vorliegenden Bedingungen die Typ 1 Fimbrienexpression von UPEC im Verlauf einer Harnwegsinfektion verstärkt wird (Struve und Krogfelt, 1999). Im Gegensatz dazu betrug in der Studie von Lim und Mitarbeitern die Anzahl der Bakterien, in denen der „*fim* switch“ in der „an“-Orientierung vorliegt, lediglich ungefähr 33 % der Bakterien, die entweder die Blase oder die Niere der Mäuse infiziert haben (Lim *et al.*, 1998). Als mögliche Ursachen für die Diskrepanz in den Ergebnissen der beiden vergleichbaren Untersuchungen kommen zum einen die Verwendung von verschiedenen uropathogenen *E. coli* Stämmen und zum anderen unterschiedliche Vorgehensweisen bei der Präparation und Kultivierung der Bakterien in Frage.

In der Literatur gibt es aber auch Untersuchungen, in denen festgestellt wurde, dass die durch das Fimbrienadhäsion FimH vermittelte bakterielle Bindung an Uroepithelzellen nicht entscheidend zur Kolonisierung des Harntrakts durch UPEC beiträgt. In einem Vergleich des mit asymptomatischer Bakteriurie assoziierten klinischen *E. coli* Isolats 83972 mit einer isogenen *fimH* negativen Mutante wurden hinsichtlich der Fähigkeit zur Besiedlung sowie zur Persistenz dieser beiden Stämme in der humanen Reflexblase (neurogenic bladder) keine signifikanten Unterschiede ermittelt (Hull *et al.*, 2002). Ebenso geht aus einer Studie von Miyazaki und Mitarbeitern mit uropathogenen *E. coli* Isolat aus Patienten mit einer Cystitis hervor, dass sowohl Typ 1, P und S Fimbrien als auch das afimbrielle Adhäsion I, die alle als „klassische“ Virulenzfaktoren von UPEC für die Kolonisierung der Harnblase gelten, *in vitro* für die Adhärenz von UPEC an Blasenepithelzellen nicht unbedingt benötigt werden, da auch diejenigen Isolate, bei denen die entsprechenden Adhäsingene mittels PCR nicht nachgewiesen werden können, an Blasenepithelzellen adhären, und zwar sogar bei Anwesenheit von D-Mannose im Medium (Miyazaki *et al.*, 2002). In einer weiteren Studie ist ein Großteil der klinischen *E. coli* Isolate, die von schwangeren Frauen mit einer Bakteriurie stammen, nicht in der Lage, während der Infektion Typ 1 Fimbrien zu exprimieren, was auf die „aus“-Orientierung des „*fim* switches“ zurückgeführt wurde (Graham *et al.*, 2001).

Diese Diskrepanz in der Literatur bezüglich der Bedeutung von Typ 1 Fimbrien für die Pathogenität von UPEC im Harntrakt lässt sich, abgesehen von vielen anderen Faktoren, grundsätzlich auf die Frage zurückführen, ob die *in vitro* erhaltenen Ergebnisse tatsächlich den Status der Typ 1 Fimbrienexpression im Harntrakt *in vivo*

wiedergeben. Es wurde schon in früheren Untersuchungen festgestellt, dass frisch aus dem Urin von infizierten Patienten isolierte uropathogene Mikroorganismen meistens nicht fimbriert sind und nicht an Uroepithelzellen binden (Harber *et al.*, 1982; Rosenstein *et al.*, 1985). Dagegen wurden auch damals mit sensitiveren Methoden und einer sorgfältigen Auswahl der Patientengruppen Hinweise darauf erhalten, dass UPEC Typ 1 Fimbrien *in vivo* exprimieren und die von ihnen vermittelte Adhärenz an Uroepithelzellen ein relevanter Virulenzfaktor für Bakterien im Verlauf einer Infektion im Harntrakt ist (Ljungh und Wadström, 1983; Ofek *et al.*, 1981; Pere *et al.*, 1987).

Neben der Annahme, dass bezüglich der phänotypischen Expression von Typ 1 Fimbrien *in vitro* Beobachtungen nur eingeschränkt auf die *in vivo* vorliegenden Bedingungen übertragen werden können, beeinflussen auch eine Reihe von wirtsspezifischen Faktoren die durch Phasenvariation kontrollierte Fimbrienexpression. Die Sekretion von inhibitorisch wirksamen Substanzen (z.B. THP) und der Schleim, der die Uroepithelzellen bedeckt und u.a. sekretorisches IgA enthält, sind als lokale Wirtsabwehrmechanismen bekannt, um eine über das Adhäsin FimH vermittelte Anheftung von Mikroorganismen an die Epithelzellen im Harntrakt zu verhindern (Mulvey *et al.*, 2000; Schilling *et al.*, 2001a).

Graham und Mitarbeiter berichten, dass sich aufgrund physiologischer Veränderungen während einer Schwangerschaft das Risiko, an einer Bakteriurie zu erkranken, erhöht (Graham *et al.*, 2001). Außerdem wurde beobachtet, dass Typ 1 fimbrierte UPEC besser an Uroepithelzellen von Frauen mit Diabetes mellitus binden als an die entsprechenden Zellen von Nicht-Diabetikerinnen (Geerlings *et al.*, 2002).

Zusammenfassend lässt sich aus diesen unterschiedlichen Daten ableiten, dass der Verlauf einer Harnwegsinfektion einen komplexen Prozess darstellt, der aus einer Vielzahl von Interaktionen zwischen dem Wirt und dem pathogenen Mikroorganismus besteht. Für eine erfolgreiche Kolonisierung der Harnblase mit anschließender Etablierung einer Infektion müssen sich UPEC an die jeweiligen wirtsspezifischen Abwehrmechanismen anpassen können. Dies gelingt uropathogenen Keimen beispielsweise durch die gezielte Expression von unterschiedlichen Virulenzfaktoren zu verschiedenen Zeiten bzw. an verschiedenen Orten (Bahrani-Mougeot *et al.*, 2002).

In *E. coli* und anderen Enterobakterien zählen Typ 1 Fimbrien zu den weit verbreiteten bakteriellen Adhäsinen. Das *fim* Gencluster ist im Chromosom nahezu aller pathogenen und auch apathogenen *E. coli* Stämme vorhanden. Somit ist die Wahrscheinlichkeit sehr groß, dass das Immunsystem eines Patienten mit einer Harnwegsinfektion schon vor der eigentlichen Infektion mit einem Typ 1 Fimbrien exprimierenden Mikroorganismus in Kontakt kam. Daher bieten Typ 1 Fimbrienadhäsine dem Wirt eine Möglichkeit, pathogene Bakterien selektiv zu eliminieren.

Um sich der Immunantwort durch den Wirt zu entziehen, kann also der Verlust des Virulenzfaktors Typ 1 Fimbrien Vorteile für den uropathogenen Erreger bringen, sobald sich dieser im Harntrakt bzw. in der Harnblase etabliert hat (Hacker *et al.*, 1990). Zu Beginn einer Infektion profitieren UPEC wahrscheinlich von der Fähigkeit, an die Mannose-haltigen Rezeptoren der Uroepithelzellen adhären zu können. In einer späteren Phase der Infektion bringt der Verlust dieser Bindungsfähigkeit den Erregern jedoch den Vorteil, nicht an die Mannose-haltigen Rezeptoren auf Phagozyten binden zu können (Ofek *et al.*, 1981). Über das Fimbrienadhäsion FimH wird z.B. eine Bindung an den CD11/18 Komplex auf der Oberfläche von Leukozyten und Makrophagen vermittelt. Dadurch wird die Elimination fimbrierter Mikroorganismen aus der Blutbahn erleichtert und es kann eine systemische Infektion verhindert werden (Mühldorfer und Hacker, 1994).

Als Schutz vor einer Immunantwort des Wirtsorganismus würde es eigentlich ausreichen, wenn die pathogenen Erreger die durch Phasenvariation kontrollierbare Expression der Typ 1 Fimbrien einstellen, sobald diese nicht mehr für den weiteren Infektionsverlauf oder für eine Persistenz benötigt werden. Bei den in dieser Arbeit verwendeten uropathogenen Isolaten wurde jedoch die Deletion des *fim* Genclusters sowie angrenzender DNA Bereiche aus dem bakteriellen Chromosom nachgewiesen. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass sich durch die Verkleinerung des Genoms die Generationszeit der Bakterien verkürzt, was den uropathogenen Erregern einen Selektionsvorteil bezüglich des Überlebens im Harntrakt verschafft (Blum *et al.*, 1994). Eine Studie von Gordon und Riley liefert Hinweise darauf, dass eine kürzere Verdopplungszeit von UPEC eine essentielle Rolle für die Etablierung einer Infektion bzw. für die Persistenz der Bakterien spielt (Gordon und Riley, 1992).

Ebenso könnte der große Bedarf an Energie und biologischem Material, die für den Zusammenbau eines Pilus benötigt werden, eine mögliche Ursache für die Deletion von im aktuellen Infektionsstadium nicht mehr benötigten Virulenzgenen darstellen. An der Zelloberfläche eines fimbrierten Bakteriums sind bis zu 500 Fimbrien vorhanden. Da jede einzelne Fimbrie aus rund 1000 Hauptuntereinheiten (FimA) besteht, sind dies ungefähr 500000 strukturelle Proteine. Diese Anzahl entspricht schätzungsweise 8 % der gesamten zellulären Proteine eines Bakteriums (Schembri *et al.*, 2002).

Ein weiterer Erklärungsansatz für die Deletion des *fim* Genclusters aus dem Chromosom könnte die Tatsache sein, dass die in dieser Arbeit charakterisierten uropathogenen Isolate von Patientinnen mit chronischen Harnwegsinfektionen stammen. Es ist bekannt, dass in fortgeschrittenen Krankheitsstadien bei über Jahre chronisch rezidivierenden Verläufen die Wahrscheinlichkeit steigt, *E. coli* Stämme im Urin nachweisen zu können, denen die im allgemeinen mit Harnwegsinfektionen assoziierten Pathogenitätsfaktoren fehlen (Blum *et al.*, 1994). Neben dem Schutz vor Wirtsabwehrmechanismen ist der Verlust von Virulenzfaktoren in diesem Fall auch darauf zurückzuführen, dass die Immunabwehr von chronisch erkrankten Patientinnen

oftmals verändert bzw. geschwächt ist, so dass der Selektionsdruck für die Expression von Virulenzgenen vermindert ist. So wurde von Fünfstück und Mitarbeitern festgestellt, dass mit anhaltender Persistenz der Bakterien im Harntrakt deren Virulenz abnimmt (Fünfstück *et al.*, 1997). Weiterhin wurde beobachtet, dass im Vergleich zu uropathogenen Isolaten von akuten Infektionsereignissen bei Patientinnen mit einem durch ständige Infektionen vorgeschädigten Harntrakt auch Erreger mit einer geringeren Anzahl an Pathogenitätsfaktoren eine Infektion auslösen können (Brauchle, 2002; Maibaum, 2002). In diesem Zusammenhang ist es eventuell erklärbar, warum in allen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten uropathogenen Isolaten offenbar eine Deletion des *fim* Genclusters aus dem Genom, was normalerweise ein irreversibler Vorgang ist, der möglichen Alternative in Form einer Phasenvariation der Fimbrienexpression vorgezogen wurde.

Betrachtet man den durch chronisch rezidivierende Krankheitsverläufe vorgeschädigten Harntrakt sowie einen eventuell geschwächten Immunstatus der Patientinnen als eine Art neue Virulenznische, so kann die Deletion des *fim* Genclusters aus dem Genom der in dieser Arbeit untersuchten UPEC Isolate Teil eines patho-adaptiven (d.h. die Pathogenität des Erregers verstärkenden) Mechanismus sein. Typ 1 Fimbrien werden ubiquitär sowohl von pathogenen als auch von apathogenen *E. coli* exprimiert. Jedoch verursacht nur eine geringe Anzahl dieser *E. coli* Stämme tatsächlich Harnwegsinfektionen. Mutationen können den Bakterien einen uropathogenen Phänotyp verleihen, wodurch diese dann in der Lage sind, einen Tropismus für die Bedingungen in der neuen Virulenznische zu entwickeln, d.h. dort vorhandene Nährstoffe zu nutzen, Wirtsabwehrmechanismen zu entgehen und schließlich eine optimale Fitness zu erreichen.

Grundsätzlich gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten für die Entwicklung eines pathogenen Phänotyps. Einerseits können Bakterien z.B. über einen horizontalen Gentransfer zusätzliche Gene erwerben, die spezifische Virulenzfaktoren kodieren. Andererseits können sich durch geeignete Modifizierung (z.B. Punktmutationen) bzw. Deletion von vorhandenen Genen oder Genclustern neue Bakterienvarianten entwickeln, die dadurch einen Selektionsvorteil gegenüber den ursprünglichen Stämmen aufweisen (Sokurenko *et al.*, 1999). Im Genom pathogener *E. coli* sind zusätzlich zum sogenannten Kerngenom virulenzassoziierte Gene vorhanden. Diese verschiedene Virulenz- und Fitnessfaktoren (z.B. Adhäsine, Eisenaufnahmesysteme, Stoffwechsellenzyme) kodierenden Gene sind häufig auf mobilen genetischen Elementen wie Plasmiden, Bakteriophagen oder Pathogenitätsinseln (PAIs) lokalisiert (Groisman und Ochman, 1996; Hacker und Kaper, 2000). Im Gegensatz zu beispielsweise P und S Fimbrien, die auf einer Pathogenitätsinsel kodiert werden, befindet sich das Typ 1 Fimbrien Gencluster jedoch im Kerngenom nahezu aller *E. coli* Stämme (Oelschlaeger *et al.*, 2002b).

Da neben dem Typ 1 Fimbrien Gencluster in allen untersuchten uropathogenen Isolaten im Vergleich zur Sequenz des apathogenen *E. coli* K12 Stamms MG1655 auch angrenzende DNA Abschnitte fehlen, liegt die Annahme nahe, dass es sich um eine relativ große Deletion in diesem DNA Bereich handelt. Während sich in einem Großteil der untersuchten uropathogenen Isolate ca. 1,9 kb stromabwärts des *fim* Genclusters wieder die erwarteten Gene nachweisen ließen, konnte die Grenze der Deletion stromaufwärts des *fim* Genclusters bisher nicht eindeutig bestimmt werden. Lediglich in den Patientinnen-Isolaten Nr. 1-6 und Nr. 18 wurden die Gene *fecI* und *fecR*, welche sich im K12 Genom ungefähr in einem Abstand von 23 kb stromaufwärts von *fimB* befinden, mittels PCR detektiert. Allerdings bleibt unklar, ob die in diesen Isolaten nachgewiesenen *fec* Gene tatsächlich wie im *E. coli* Stamm MG1655 in der Nachbarschaft des *fim* Operons lokalisiert sind. Für die beiden Isolate Nr. 11 und Nr. 13 konnten bislang noch keine K12 spezifischen Gene im untersuchten Genombereich nachgewiesen werden.

Die Suche nach K12 spezifischen Genen in dieser chromosomalen Region sollte fortgesetzt werden, um die Größe der Deletion genau zu ermitteln und darüber hinaus herauszufinden, ob diese Deletion in den UPEC Isolaten überwiegend nach einem einheitlichen Mechanismus verläuft. Schließlich sollte auch die Kenntnis der Art der zusätzlich zum *fim* Gencluster deletierten Gene dazu beitragen, eine Aussage darüber treffen zu können, ob es sich bei diesem Deletionsereignis um einen rein zufälligen oder um einen gezielten patho-adaptiven Prozess handelt.

In einer Reihe neuerer Studien finden sich Hinweise darauf, dass nicht nur die Aufnahme von Virulenzgenen eine wichtige Rolle für die Ausprägung neuer Pathotypen spielt, sondern ebenso die Deletion von Genen oder sogar genomischen Regionen (Dobrindt und Hacker, 2001; Foreman-Wykert und Miller, 2003; Mira *et al.*, 2001; Ochman und Moran, 2001). Der Verlust von Genen in Zusammenhang mit der Evolution von virulenten Bakterienstämmen wird bislang auf zwei unterschiedliche Ursachen zurückgeführt.

Auf der einen Seite existieren anscheinend sogenannte anti-Virulenzgene, die auf bisher noch nicht aufgeklärte Art und Weise die Virulenz von pathogenen Mikroorganismen reduzieren (Foreman-Wykert und Miller, 2003; Mouslim *et al.*, 2002). Im Genom von *Shigella* spp., den Erregern der Ruhr (Dysenterie), sind beispielsweise die Gene *ompT* (kodiert eine Oberflächenprotease) und *cadA* (kodiert eine Lysin-Decarboxylase) nicht vorhanden. Dagegen sind diese beiden Gene in den den Shigellen phylogenetisch nahe verwandten apathogenen *E. coli* K12 Stämmen präsent. Die Expression dieser beiden Gene in einem *Shigella* Stamm resultierte jeweils in einer Attenuierung der Virulenz des Stammes. Im Fall von *cadA* wurde eine Inhibierung der Enterotoxin-Aktivität und für die Anwesenheit von *ompT* eine verminderte intrazelluläre Ausbreitung festgestellt (Day *et al.*, 2001; Maurelli *et al.*, 1998; Nakata *et al.*, 1993).

Auf der anderen Seite wird die Deletion von Genen aus dem Genom von pathogenen Mikroorganismen als zur Aufnahme von „fremder“ DNA komplementärer Mechanismus betrachtet, um die Größe des Genoms konstant klein zu halten und so eine effiziente bzw. konkurrenzfähige Replikation der Bakterien unter verschiedensten Bedingungen zu ermöglichen (Mira *et al.*, 2001). Dadurch ist es erklärbar, dass die Größe des Genoms von pathogenen Bakterien konstant bleibt und nur sehr wenige nicht-funktionelle Sequenzen enthält, obwohl der Erwerb von Virulenzgenen über einen horizontalen Gentransfer bei der Evolution neuer Pathotypen eine wesentliche Rolle spielt.

Bei der in dieser Arbeit charakterisierten Deletion des Typ 1 Fimbrien Genclusters sowie angrenzender DNA Bereiche in uropathogenen Isolaten könnte es sich also durchaus um einen patho-adaptiven Mechanismus handeln, der neuen genetischen Varianten ein Überleben unter einer neuen Selektionsbedingung (möglicherweise vorgeschädigter Harntrakt der chronisch kranken Patientinnen) sichert. Das Vorhandensein von repetitiven Sequenzen („repetitive extragenic palindromic element“ und *boxC*) und eines *IS1* Elements von *E. coli* in unmittelbarer Nachbarschaft zum *fim* Gencluster, sowie bei den Patientinnen-Isolaten Nr. 1-6 die Insertion eines *IS1* Elements in die *fim* Deletionsstelle, weisen auf eine hohe Wahrscheinlichkeit für Rekombinationsereignisse (DNA Umlagerungen bzw. Deletionen) in dieser chromosomalen Region hin. Insgesamt spiegelt die Genomvariabilität innerhalb verschiedener UPEC Isolate die Fähigkeit der Bakterien wieder, sich an die unterschiedlichen Bedingungen in den zahlreichen Nischen des Wirtsorganismus zu adaptieren. Interessanterweise ist im Gegensatz zu den in dieser Arbeit untersuchten uropathogenen Isolaten, die von chronisch erkrankten Patientinnen stammen, das *fim* Gencluster im Chromosom der uropathogenen *E. coli* Stämme 536 (Hacker *et al.*, 1992) und CFT073, dessen Genomsequenz erst kürzlich veröffentlicht wurde, vorhanden (Welch *et al.*, 2002).

Ein umfassendes Verständnis der sich im Verlauf einer Infektion möglicherweise verändernden Interaktionen zwischen pathogenen Mikroorganismen und der Wirtsabwehr, sowie die Identifizierung von bakteriellen Virulenzfaktoren und Komponenten des Immunsystems, die zur Eliminierung von pathogenen Erregern beitragen und letztendlich eine Infektion verhindern, stellt die Grundlage zur Entwicklung neuer anti-mikrobieller Wirkstoffe und diagnostischer Methoden dar. Komplizierte Harnwegsinfektionen mit einem chronischen Verlauf sind nur schwer mit Antibiotika therapierbar, weil UPEC in der Blase auch unter Antibiotika-Behandlung persistieren können (Mulvey *et al.*, 2000). Außerdem rufen Antibiotika Nebenwirkungen hervor und können das Auftreten multiresistenter Bakterienstämme bewirken, so dass für eine dauerhafte Reinfektionsprophylaxe nach alternativen Behandlungsmethoden gesucht werden sollte.

6. Literatur

- Abraham, J. M., C. S. Freitag, J. R. Clements, and B. I. Eisenstein.** 1985. An invertible element of DNA controls phase variation of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A. **82**(17):5724-5727.
- Abraham, S. N., A. B. Jonsson, and S. Normark.** 1998. Fimbriae-mediated host-pathogen cross-talk. Curr Opin Microbiol. **1**(1):75-81.
- Adam, T., M. Arpin, M. C. Prevost, P. Gounon, and P. J. Sansonetti.** 1995. Cytoskeletal rearrangements and the functional role of T-plastin during entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells. J Cell Biol. **129**(2):367-381.
- Ahrens, R., M. Ott, A. Ritter, H. Hoschützky, T. Bühler, F. Lottspeich, G. J. Boulnois, K. Jann, and J. Hacker.** 1993. Genetic analysis of the gene cluster encoding nonfimbrial adhesin I from an *Escherichia coli* uropathogen. Infect Immun. **61**(6):2505-2512.
- Alliluev, A. P., O. V. Kotelnikova, S. A. Korneeva, N. G. Fish, and L. I. Kulinich.** 1988. Protective properties of Vi-antigen preparations as dependent on their adhesin content. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. **12**:21-26.
- Altenhöfer, A.** 2001. Identifizierung Invasions-relevanter Gene aus *Citrobacter freundii*. Diplomarbeit. Universität Würzburg.
- Amyere, M., M. Mettlen, P. Van Der Smissen, A. Platek, B. Payrastre, A. Veithen, and P. J. Courtoy.** 2002. Origin, originality, functions, subversions and molecular signalling of macropinocytosis. Int J Med Microbiol. **291**(6-7):487-494.
- Aronson, M., O. Medalia, L. Schori, D. Mirelman, N. Sharon, and I. Ofek.** 1979. Prevention of colonization of the urinary tract of mice with *Escherichia coli* by blocking of bacterial adherence with methyl α -D-mannopyranoside. J Infect Dis. **139**(3):329-332.
- Badger, J. L., M. F. Stins, and K. S. Kim.** 1999. *Citrobacter freundii* invades and replicates in human brain microvascular endothelial cells. Infect Immun. **67**(8):4208-4215.
- Bahrani-Mougeot, F. K., E. L. Buckles, C. V. Lockett, J. R. Hebel, D. E. Johnson, C. M. Tang, and M. S. Sonnenberg.** 2002. Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants in the murine urinary tract. Mol Microbiol. **45**(4):1079-1093.
- Bahrani-Mougeot, F. K., S. Pancholi, M. Daoust, and M. S. Sonnenberg.** 2001. Identification of putative urovirulence genes by subtractive cloning. J Infect Dis. **183**(Suppl 1):S21-S23.
- Baorto, D. M., Z. Gao, R. Malaviya, M. L. Dustin, A. van der Merwe, D. M. Lublin, and S. N. Abraham.** 1997. Survival of FimH-expressing enterobacteria in macrophages relies on glycolipid traffic. Nature. **389**(6651):636-639.
- Barnhart, M. M., J. S. Pinkner, G. E. Soto, F. G. Sauer, S. Langermann, G. Waksman, C. Frieden, and S. J. Hultgren.** 2000. PapD-like chaperones provide the missing information for folding of pilin proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. **97**(14):7709-7714.
- Bartolome, B., Y. Jubete, E. Martinez, and F. de la Cruz.** 1991. Construction and properties of a family of pACYC184-derived cloning vectors compatible with pBR322 and its derivatives. Gene. **102**(1):75-78.

- Bäumler, A. J., R. M. Tsolis, and F. Heffron.** 1996. Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun.* **64**(5):1862-1865.
- Berger, H., J. Hacker, A. Juarez, C. Hughes, and W. Goebel.** 1982. Cloning of the chromosomal determinants encoding hemolysin production and mannose-resistant hemagglutination in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **152**(3):1241-1247.
- Bermudez, L. E., and J. Goodman.** 1996. *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within type II alveolar cells. *Infect Immun.* **64**(4):1400-1406.
- Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao.** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science.* **277**(5331):1453-1474.
- Bliska, J. B., J. E. Galan, and S. Falkow.** 1993a. Signal transduction in the mammalian cell during bacterial attachment and entry. *Cell.* **73**(5):903-920.
- Bliska, J. B., M. C. Copass, and S. Falkow.** 1993b. The *Yersinia pseudotuberculosis* adhesin YadA mediates intimate bacterial attachment to and entry into HEp-2 cells. *Infect Immun.* **61**(9):3914-3921.
- Blomfield, I. C., M. S. McClain, and B. I. Eisenstein.** 1991. Type 1 fimbriae mutants of *Escherichia coli* K12: characterization of recognized afimbriate strains and construction of new *fim* deletion mutants. *Mol Microbiol.* **5**(6):1439-1445.
- Blum, G., M. Ott, A. Lischewski, A. Ritter, H. Imrich, H. Tschäpe, and J. Hacker.** 1994. Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. *Infect Immun.* **62**(2):606-614.
- Bolivar, F., R. L. Rodriguez, P. J. Greene, M. C. Betlach, H. L. Heyneker, and H. W. Boyer.** 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene.* **2**(2):95-113.
- Bonadio, M., M. Meini, P. Spitaleri, and C. Gigli.** 2001. Current microbiological and clinical aspects of urinary tract infections. *Eur Urol.* **40**(4):439-444.
- Borovsky, Z., M. Tarshis, P. Zhang, and S. Rottem.** 1998. Protein kinase C activation and vacuolation in HeLa cells invaded by *Mycoplasma penetrans*. *J Med Microbiol.* **47**(10):915-922.
- Boudeau, J., A. L. Glasser, E. Masseret, B. Joly, and A. Darfeuille-Michaud.** 1999. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect Immun.* **67**(9):4499-4509.
- Boyd, E. F., and D. L. Hartl.** 1999. Analysis of the type 1 pilin gene cluster *fim* in *Salmonella*: its distinct evolutionary histories in the 5' and 3' regions. *J Bacteriol.* **181**(4):1301-1308.
- Boyer, H. W., and D. Roulland-Dussoix.** 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* **41**(3):459-472.
- Brauchle, L.** 2002. Molekulare Untersuchungen zum Vorkommen von Pathogenitätsfaktoren bei *Escherichia coli* Isolaten aus Stuhl und Urin von Frauen mit chronisch rezidivierenden Harnwegsinfektionen. Medizinische Doktorarbeit. Universität Würzburg.
- Braun, L., S. Dramsi, P. Dehoux, H. Bierne, G. Lindahl, and P. Cossart.** 1997. InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Mol Microbiol.* **25**(2):285-294.
- Braun, L., B. Ghebrehiwet, and P. Cossart.** 2000. gC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*. *Embo J.* **19**(7):1458-1466.
- Braun, L., H. Ohayon, and P. Cossart.** 1998. The InlB protein of *Listeria monocytogenes* is sufficient to promote entry into mammalian cells. *Mol Microbiol.* **27**(5):1077-1087.
- Braun, V.** 2001. Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria. *Int J Med Microbiol.* **291**(2):67-79.

- Bruehl, C. L., and R. Listernick.** 1992. *Citrobacter freundii* septic arthritis. *J Paediatr Child Health.* **28**(5):402-403.
- Buchwalow, I. B., M. Brich, and S. H. Kaufmann.** 1997. Signal transduction and phagosome biogenesis in human macrophages during phagocytosis of *Mycobacterium bovis* BCG. *Acta Histochem.* **99**(1):63-70.
- Bullitt, E., C. H. Jones, R. Striker, G. Soto, F. Jacob-Dubuisson, J. Pinkner, M. J. Wick, L. Makowski, and S. J. Hultgren.** 1996. Development of pilus organelle subassemblies *in vitro* depends on chaperone uncapping of a beta zipper. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**(23):12890-12895.
- Calvin, N. M., and P. C. Hanawalt.** 1988. High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol.* **170**(6):2796-2801.
- Celli, J., and B. B. Finlay.** 2002. Bacterial avoidance of phagocytosis. *Trends Microbiol.* **10**(5):232-237.
- Ceppek, K. L., S. K. Shaw, C. M. Parker, G. J. Russell, J. S. Morrow, D. L. Rimm, and M. B. Brenner.** 1994. Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the $\alpha E\beta 7$ integrin. *Nature.* **372**(6502):190-193.
- Chart, H., H. R. Smith, R. M. La Ragione, and M. J. Woodward.** 2000. An investigation into the pathogenic properties of *Escherichia coli* strains BLR, BL21, DH5 α and EQ1. *J Appl Microbiol.* **89**(6):1048-1058.
- Choudhury, D., A. Thompson, V. Stojanoff, S. Langermann, J. Pinkner, S. J. Hultgren, and S. D. Knight.** 1999. X-ray structure of the FimC-FimH chaperone-adhesin complex from uropathogenic *Escherichia coli*. *Science.* **285**(5430):1061-1066.
- Cirillo, D. M., R. H. Valdivia, D. M. Monack, and S. Falkow.** 1998. Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Mol Microbiol.* **30**(1):175-188.
- Clark, M. A., B. H. Hirst, and M. A. Jepson.** 1998. M-cell surface $\beta 1$ integrin expression and invasion-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infect Immun.* **66**(3):1237-1243.
- Clegg, S., L. S. Hancox, and K. S. Yeh.** 1996. *Salmonella typhimurium* fimbrial phase variation and FimA expression. *J Bacteriol.* **178**(2):542-545.
- Clegg, S., and K. T. Hughes.** 2002. FimZ is a molecular link between sticking and swimming in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol.* **184**(4):1209-1213.
- Clegg, S., S. Hull, R. Hull, and J. Pruckler.** 1985. Construction and comparison of recombinant plasmids encoding type 1 fimbriae of members of the family *Enterobacteriaceae*. *Infect Immun.* **48**(2):275-279.
- Clegg, S., B. K. Purcell, and J. Pruckler.** 1987. Characterization of genes encoding type 1 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, and *Serratia marcescens*. *Infect Immun.* **55**(2):281-287.
- Clouthier, S. C., S. K. Collinson, A. P. White, P. A. Banser, and W. W. Kay.** 1998. tRNA^{Arg} (*fimU*) and expression of SEF14 and SEF21 in *Salmonella enteritidis*. *J Bacteriol.* **180**(4):840-845.
- Collazo, C. M., and J. E. Galan.** 1997. The invasion-associated type-III protein secretion system in *Salmonella* – a review. *Gene.* **192**(1):51-59.
- Connell, H., W. Agace, P. Klemm, M. Schembri, S. Marild, and C. Svanborg.** 1996. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**(18):9827-9832.
- Cornelis, G. R.** 2000. Molecular and cell biology aspects of plague. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**(16):8778-8783.
- Daryab, N.** 1997. Charakterisierung einer Invasionsdeterminante aus *Citrobacter freundii*. Diplomarbeit. Universität Würzburg.

- Daryab, N., C. A. Wass, J. L. Badger, K. S. Kim, and T. A. Oelschlaeger.** 1999. Presented at the 99th ASM General Meeting, Chicago, Illinois, 30.05.-03.06.99.
- Day, W. A., Jr., R. E. Fernandez, and A. T. Maurelli.** 2001. Pathoadaptive mutations that enhance virulence: genetic organization of the *cadA* regions of *Shigella* spp. *Infect Immun.* **69**(12):7471-7480.
- de Lorenzo, V., and K. N. Timmis.** 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol.* **235**:386-405.
- Deng, W., Y. Li, B. A. Vallance, and B. B. Finlay.** 2001. Locus of enterocyte effacement from *Citrobacter rodentium*: sequence analysis and evidence for horizontal transfer among attaching and effacing pathogens. *Infect Immun.* **69**(10):6323-6335.
- Dobrindt, U., and J. Hacker.** 2001. Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. *Curr Opin Microbiol.* **4**(5):550-557.
- Dodson, K. W., F. Jacob-Dubuisson, R. T. Striker, and S. J. Hultgren.** 1993. Outer-membrane PapC molecular usher discriminately recognizes periplasmic chaperone-pilus subunit complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**(8):3670-3674.
- Dodson, K. W., J. S. Pinkner, T. Rose, G. Magnusson, S. J. Hultgren, and G. Waksman.** 2001. Structural basis of the interaction of the pyelonephritic *E. coli* adhesin to its human kidney receptor. *Cell.* **105**(6):733-743.
- Donnenberg, M. S.** 2000. Pathogenic strategies of enteric bacteria. *Nature.* **406**(6797):768-774.
- Donnenberg, M. S., A. Donohue-Rolfe, and G. T. Keusch.** 1990. A comparison of HEp-2 cell invasion by enteropathogenic and enteroinvasive *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* **57**(1-2):83-86.
- Donnenberg, M. S., A. Donohue-Rolfe, and G. T. Keusch.** 1989. Epithelial cell invasion: an overlooked property of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) associated with the EPEC adherence factor. *J Infect Dis.* **160**(3):452-459.
- Donnenberg, M. S., and R. A. Welch.** 1996. Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli*, p. 135-174. *In* H. L. T. Mobley and J. W. Warren (eds.), *Urinary tract infections: molecular pathogenesis and clinical management.* American Society for Microbiology Press, Washington, DC.
- Dorman, C. J., and C. F. Higgins.** 1987. Fimbrial phase variation in *Escherichia coli*: dependence on integration host factor and homologies with other site-specific recombinases. *J Bacteriol.* **169**(8):3840-3843.
- Dramsi, S., I. Biswas, E. Maguin, L. Braun, P. Mastroeni, and P. Cossart.** 1995. Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of InlB, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol Microbiol.* **16**(2):251-261.
- Dramsi, S., and P. Cossart.** 1998. Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **14**:137-166.
- Duguid, J. P., S. Clegg, and M. I. Wilson.** 1979. The fimbrial and non-fimbrial haemagglutinins of *Escherichia coli*. *J Med Microbiol.* **12**(2):213-227.
- Eisenstein, B. I., D. S. Sweet, V. Vaughn, and D. I. Friedman.** 1987. Integration host factor is required for the DNA inversion that controls phase variation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **84**(18):6506-6510.
- El Tahir, Y., and M. Skurnik.** 2001. YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin. *Int J Med Microbiol.* **291**(3):209-218.
- Elsinghorst, E. A.** 1994. Measurement of invasion by gentamicin resistance. *Methods Enzymol.* **236**:405-420.
- Elsinghorst, E. A., L. S. Baron, and D. J. Kopecko.** 1989. Penetration of human intestinal epithelial cells by *Salmonella*: molecular cloning and expression of *Salmonella typhi* invasion determinants in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86**(13):5173-5177.

- Elsinghorst, E. A., and D. J. Kopecko.** 1992. Molecular cloning of epithelial cell invasion determinants from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **60**(6):2409-2417.
- Emödy, L., J. Heesemann, H. Wolf-Watz, M. Skurnik, G. Kapperud, P. O'Toole, and T. Wadstrom.** 1989. Binding to collagen by *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*: evidence for *yopA*-mediated and chromosomally encoded mechanisms. *J Bacteriol.* **171**(12):6674-6679.
- Emori, T. G., and R. P. Gaynes.** 1993. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev.* **6**(4):428-442.
- Ewanowich, C. A., A. R. Melton, A. A. Weiss, R. K. Sherburne, and M. S. Pepler.** 1989. Invasion of HeLa 229 cells by virulent *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* **57**(9):2698-2704.
- Fällman, M., F. Deleuil, and K. McGee.** 2002. Resistance to phagocytosis by *Yersinia*. *Int J Med Microbiol.* **291**(6-7):501-509.
- Falkow, S.** 1991. Bacterial entry into eukaryotic cells. *Cell.* **65**(7):1099-1102.
- Falkow, S.** 1997. What is a pathogen. *ASM News.* **63**(7):359-365.
- Falkow, S., R. R. Isberg, and D. A. Portnoy.** 1992. The interaction of bacteria with mammalian cells. *Annu Rev Cell Biol.* **8**:333-363.
- Fincher, R. M., M. W. Jackson, and A. Q. Fischer.** 1990. *Citrobacter freundii*: a newly reported cause of pyomyositis. *Am J Med Sci.* **299**(5):331-333.
- Finlay, B. B., and P. Cossart.** 1997. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science.* **276**(5313):718-725.
- Finlay, B. B., and S. Falkow.** 1989. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol Rev.* **53**(2):210-230.
- Finlay, B. B., and S. Falkow.** 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* **61**(2):136-169.
- Finlay, B. B., and S. Falkow.** 1988. Comparison of the invasion strategies used by *Salmonella choleraesuis*, *Shigella flexneri* and *Yersinia enterocolitica* to enter cultured animal cells: endosome acidification is not required for bacterial invasion or intracellular replication. *Biochimie.* **70**(8):1089-1099.
- Finlay, B. B., and S. Falkow.** 1990. *Salmonella* interactions with polarized human intestinal Caco-2 epithelial cells. *J Infect Dis.* **162**(5):1096-1106.
- Finlay, B. B., B. Gumbiner, and S. Falkow.** 1988. Penetration of *Salmonella* through a polarized Madin-Darby canine kidney epithelial cell monolayer. *J Cell Biol.* **107**(1):221-230.
- Finlay, B. B., S. Ruschkowski, and S. Dedhar.** 1991. Cytoskeletal rearrangements accompanying *Salmonella* entry into epithelial cells. *J Cell Sci.* **99**(2):283-296.
- Firon, N., I. Ofek, and N. Sharon.** 1984. Carbohydrate-binding sites of the mannose-specific fimbrial lectins of enterobacteria. *Infect Immun.* **43**(3):1088-1090.
- Foreman-Wykert, A. K., and J. F. Miller.** 2003. Hypervirulence and pathogen fitness. *Trends Microbiol.* **11**(3):105-108.
- Foxman, B.** 2002. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am J Med.* **113**(Suppl 1A):5S-13S.
- Foxman, B., R. Barlow, H. D'Arcy, B. Gillespie, and J. D. Sobel.** 2000. Urinary tract infection: self-reported incidence and associated costs. *Ann Epidemiol.* **10**(8):509-515.
- Foxman, B., L. Zhang, K. Palin, P. Tallman, and C. F. Marrs.** 1995. Bacterial virulence characteristics of *Escherichia coli* isolates from first-time urinary tract infection. *J Infect Dis.* **171**(6):1514-1521.
- Francis, C. L., T. A. Ryan, B. D. Jones, S. J. Smith, and S. Falkow.** 1993. Ruffles induced by *Salmonella* and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. *Nature.* **364**(6438):639-642.

- Frankel, G., A. D. Phillips, M. Novakova, H. Field, D. C. Candy, D. B. Schauer, G. Douce, and G. Dougan. 1996. Intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* restores murine virulence to a *Citrobacter rodentium eaeA* mutant: induction of an immunoglobulin A response to intimin and EspB. *Infect Immun.* **64**(12):5315-5325.
- Freitag, C. S., J. M. Abraham, J. R. Clements, and B. I. Eisenstein. 1985. Genetic analysis of the phase variation control of expression of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **162**(2):668-675.
- Fumagalli, O., B. D. Tall, C. Schipper, and T. A. Oelschlaeger. 1997. N-glycosylated proteins are involved in efficient internalization of *Klebsiella pneumoniae* by cultured human epithelial cells. *Infect Immun.* **65**(11):4445-4451.
- Fünfstück, R., N. Jacobsohn, H. Tschäpe, and G. Stein. 1997. Beeinflusst der ABO-, P1- und Lewis-Blutgruppenstatus von Patienten mit nicht-obstruktiver chronischer Pyelonephritis die Uropathogenität von *E. coli*?, p. 157-168. In R. Fünfstück, E. Straube, and G. Stein (eds.), Harnwegsinfektion. Pathogenetische, klinische und therapeutische Aspekte. Pabst Science Publishers, Lengerich, Germany.
- Gaillard, J. L., P. Berche, C. Frehel, E. Gouin, and P. Cossart. 1991. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell.* **65**(7):1127-41.
- Gaillard, J. L., P. Berche, J. Mounier, S. Richard, and P. Sansonetti. 1987. *In vitro* model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect Immun.* **55**(11):2822-2829.
- Gaillard, J. L., and B. B. Finlay. 1996. Effect of cell polarization and differentiation on entry of *Listeria monocytogenes* into the enterocyte-like Caco-2 cell line. *Infect Immun.* **64**(4):1299-1308.
- Galan, J. E. 1996. Molecular and cellular bases of *Salmonella* entry into host cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* **209**:43-60.
- Galan, J. E., and D. Zhou. 2000. Striking a balance: modulation of the actin cytoskeleton by *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**(16):8754-8761.
- Gally, D. L., J. A. Bogan, B. I. Eisenstein, and I. C. Blomfield. 1993. Environmental regulation of the *fim* switch controlling type 1 fimbrial phase variation in *Escherichia coli* K-12: effects of temperature and media. *J Bacteriol.* **175**(19):6186-6193.
- Garcia-del Portillo, F., and B. B. Finlay. 1994. *Salmonella* invasion of nonphagocytic cells induces formation of macropinosomes in the host cell. *Infect Immun.* **62**(10):4641-4645.
- Geerlings, S. E., R. Meiland, and A. I. M. Hoepelman. 2002. Pathogenesis of bacteriuria in women with diabetes mellitus. *Int J Antimicrob Agents.* **19**(6):539-545.
- Giampapa, C. S., S. N. Abraham, T. M. Chiang, and E. H. Beachey. 1988. Isolation and characterization of a receptor for type 1 fimbriae of *Escherichia coli* from guinea pig erythrocytes. *J Biol Chem.* **263**(11):5362-5367.
- Giannella, R. A., O. Washington, P. Gemski, and S. B. Formal. 1973. Invasion of HeLa cells by *Salmonella typhimurium*: a model for study of invasiveness of *Salmonella*. *J Infect Dis.* **128**(1):69-75.
- Ginocchio, C. C., and J. E. Galan. 1995. Functional conservation among members of the *Salmonella typhimurium* InvA family of proteins. *Infect Immun.* **63**(2):729-732.
- Ginocchio, C. C., S. B. Olmsted, C. L. Wells, and J. E. Galan. 1994. Contact with epithelial cells induces the formation of surface appendages on *Salmonella typhimurium*. *Cell.* **76**(4):717-724.
- Giron, J. A., A. S. Ho, and G. K. Schoolnik. 1991. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science.* **254**(5032):710-713.
- Goebel, W., and R. Gross. 2001. Intracellular survival strategies of mutualistic and parasitic prokaryotes. *Trends Microbiol.* **9**(6):267-273.
- Goldberg, M. B. 2001. Actin-based motility of intracellular microbial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev.* **65**(4):595-626.

- Goldhar, J., R. Perry, J. R. Golecki, H. Hoschützky, B. Jann, and K. Jann.** 1987. Nonfimbrial, mannose-resistant adhesins from uropathogenic *Escherichia coli* O83:K1:H4 and O14:K?:H11. *Infect Immun.* **55**(8):1837-1842.
- Goluszko, P., V. Popov, R. Selvarangan, S. Nowicki, T. Pham, and B. J. Nowicki.** 1997. Dr fimbriae operon of uropathogenic *Escherichia coli* mediate microtubule-dependent invasion to the HeLa epithelial cell line. *J Infect Dis.* **176**(1):158-167.
- Gophna, U., M. Barlev, R. Seiffers, T. A. Oelschlaeger, J. Hacker, and E. Z. Ron.** 2001. Curli fibers mediate internalization of *Escherichia coli* by eukaryotic cells. *Infect Immun.* **69**(4):2659-2665.
- Gordon, D. M., and M. A. Riley.** 1992. A theoretical and experimental analysis of bacterial growth in the bladder. *Mol Microbiol.* **6**(4):555-562.
- Graham, D. R., R. L. Anderson, F. E. Ariel, N. J. Ehrenkranz, B. Rowe, H. R. Boer, and R. E. Dixon.** 1981. Epidemic nosocomial meningitis due to *Citrobacter diversus* in neonates. *J Infect Dis.* **144**(3):203-209.
- Graham, J. C., J. B. S. Leathart, S. J. Keegan, J. Pearson, A. Bint, and D. L. Gally.** 2001. Analysis of *Escherichia coli* strains causing bacteriuria during pregnancy: selection for strains that do not express type 1 fimbriae. *Infect Immun.* **69**(2):794-799.
- Grassme, H. U., R. M. Ireland, and J. P. van Putten.** 1996. Gonococcal opacity protein promotes bacterial entry-associated rearrangements of the epithelial cell actin cytoskeleton. *Infect Immun.* **64**(5):1621-1630.
- Greenberg, S.** 2001. Diversity in phagocytic signalling. *J Cell Sci.* **114**(6):1039-1040.
- Greiffenberg, L., W. Goebel, K. S. Kim, I. Weiglein, A. Bubert, F. Engelbrecht, M. Stins, and M. Kuhn.** 1998. Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: InlB-dependent invasion, long-term intracellular growth, and spread from macrophages to endothelial cells. *Infect Immun.* **66**(11):5260-5267.
- Grimberg, J., S. Maguire, and L. Belluscio.** 1989. A simple method for the preparation of plasmid and chromosomal *E. coli* DNA. *Nucleic Acids Res.* **17**(21):8893.
- Groisman, E. A., and H. Ochman.** 1993. Cognate gene clusters govern invasion of host epithelial cells by *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri*. *Embo J.* **12**(10):3779-3787.
- Groisman, E. A., and H. Ochman.** 1996. Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell.* **87**(5):791-794.
- Grützkau, A., C. Hanski, H. Hahn, and E. O. Riecken.** 1990. Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria. *Gut.* **31**(9):1011-1015.
- Guarino, A., G. Capano, B. Malamisura, M. Alessio, S. Guandalini, and A. Rubino.** 1987. Production of *Escherichia coli* STa-like heat-stable enterotoxin by *Citrobacter freundii* isolated from humans. *J Clin Microbiol.* **25**(1):110-114.
- Guarino, A., R. Giannella, and M. R. Thompson.** 1989. *Citrobacter freundii* produces an 18-amino-acid heat-stable enterotoxin identical to the 18-amino-acid *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (ST Ia). *Infect Immun.* **57**(2):649-652.
- Guerinot, M. L.** 1994. Microbial iron transport. *Ann Rev Microbiol.* **48**:743-772.
- Guyer, D. M., I. R. Henderson, J. P. Nataro, and H. L. T. Mobley.** 2000. Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **38**(1):53-66.
- Guyer, D. M., S. Radulovic, F. E. Jones, and H. L. T. Mobley.** 2002. Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. *Infect Immun.* **70**(8):4539-4546.
- Guzman, C. A., M. Rohde, T. Chakraborty, E. Domann, M. Hudel, J. Wehland, and K. N. Timmis.** 1995. Interaction of *Listeria monocytogenes* with mouse dendritic cells. *Infect Immun.* **63**(9):3665-3673.

- Hacker, J.** 1990. Genetic determinants coding for fimbriae and adhesins of extraintestinal *Escherichia coli*. *Curr Top Microbiol Immunol.* **151**:1-27.
- Hacker, J.** 1992. Role of fimbrial adhesins in the pathogenesis of *Escherichia coli* infections. *Can J Microbiol.* **38**(7):720-727.
- Hacker, J.** 2000. Adhäsine, p. 51-55. *In* J. Hacker and J. Heesemann (eds.), *Molekulare Infektionsbiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Hacker, J., L. Bender, M. Ott, J. Wingender, B. Lund, R. Marre, and W. Goebel.** 1990. Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur *in vitro* and *in vivo* in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microb Pathog.* **8**(3):213-225.
- Hacker, J., and J. B. Kaper.** 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol.* **54**:641-679.
- Hacker, J., H. Kestler, H. Hoschützky, K. Jann, F. Lottspeich, and T. K. Korhonen.** 1993. Cloning and characterization of the S fimbrial adhesin II complex of an *Escherichia coli* O18:K1 meningitis isolate. *Infect Immun.* **61**(2):544-550.
- Hacker, J., M. Ott, G. Blum, R. Marre, J. Heesemann, H. Tschäpe, and W. Goebel.** 1992. Genetics of *Escherichia coli* uropathogenicity: analysis of the O6:K15:H31 isolate 536. *Zentralbl Bakteriol.* **276**(2):165-175.
- Hacker, J., G. Schmidt, C. Hughes, S. Knapp, M. Marget, and W. Goebel.** 1985. Cloning and characterization of genes involved in production of mannose-resistant, neuraminidase-susceptible (X) fimbriae from a uropathogenic O6:K15:H31 *Escherichia coli* strain. *Infect Immun.* **47**(2):434-440.
- Hagberg, L., U. Jodal, T. K. Korhonen, G. Lidin-Janson, U. Lindberg, and C. Svanborg Eden.** 1981. Adhesion, hemagglutination, and virulence of *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Infect Immun.* **31**(2):564-570.
- Hale, T. L., R. E. Morris, and P. F. Bonventre.** 1979. *Shigella* infection of henle intestinal epithelial cells: role of the host cell. *Infect Immun.* **24**(3):887-894.
- Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* **166**(4):557-580.
- Hansen, N. J., P. Kristensen, J. Lykke, K. K. Mortensen, and B. F. Clark.** 1995. A fast, economical and efficient method for DNA purification by use of a homemade bead column. *Biochem Mol Biol Int.* **35**(3):461-465.
- Hanson, M. S., and C. C. Brinton, Jr.** 1988. Identification and characterization of *E. coli* type-1 pilus tip adhesion protein. *Nature.* **332**(6161):265-268.
- Harber, M. J., S. Chick, R. Mackenzie, and A. W. Asscher.** 1982. Lack of adherence to epithelial cells by freshly isolated urinary pathogens. *Lancet.* **1**(8272):586-588.
- Hasman, H., T. Chakraborty, and P. Klemm.** 1999. Antigen-43-mediated autoaggregation of *Escherichia coli* is blocked by fimbriation. *J Bacteriol.* **181**(16):4834-4841.
- Heesemann, J., and J. Hacker.** 2000. Die medizinisch bedeutendsten Krankheitserreger, p. 5-23. *In* J. Hacker and J. Heesemann (eds.), *Molekulare Infektionsbiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Hensel, M., J. E. Shea, S. R. Waterman, R. Mundy, T. Nikolaus, G. Banks, A. Vazquez-Torres, C. Gleeson, F. C. Fang, and D. W. Holden.** 1998. Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol Microbiol.* **30**(1):163-174.
- Hermant, D., R. Menard, N. Arricau, C. Parsot, and M. Y. Popoff.** 1995. Functional conservation of the *Salmonella* and *Shigella* effectors of entry into epithelial cells. *Mol Microbiol.* **17**(4):781-789.
- Herrmann, B., and L. G. Burman.** 1985. Pathogenesis of *Escherichia coli* cystitis and pyelonephritis: apparent lack of significance of bacterial motility and chemotaxis towards human urine. *Infection.* **13**(1):4-7.

- Hess, P., N. Daryab, K. Michaelis, A. Reisenauer, and T. A. Oelschlaeger. 2000. Type 1 pili of *Citrobacter freundii* mediate invasion into host cells. *Adv Exp Med Biol.* **485**(6):225-235.
- Hicks, S., G. Frankel, J. B. Kaper, G. Dougan, and A. D. Phillips. 1998. Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to pediatric intestinal tissue *in vitro*. *Infect Immun.* **66**(4):1570-1578.
- Hodges, G. R., C. E. Degener, and W. G. Barnes. 1978. Clinical significance of *Citrobacter* isolates. *Am J Clin Pathol.* **70**(1):37-40.
- Hoiczky, E., A. Roggenkamp, M. Reichenbecher, A. Lupas, and J. Heesemann. 2000. Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *Embo J.* **19**(22):5989-5999.
- Hooton, T. M. 2001. Recurrent urinary tract infection in women. *Int J Antimicrob Agents.* **17**(4):259-268.
- Hooton, T. M., and W. E. Stamm. 1997. Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infection. *Infect Dis Clin North Am.* **11**(3):551-581.
- Houng, H. S., K. F. Noon, J. T. Ou, and L. S. Baron. 1992. Expression of Vi antigen in *Escherichia coli* K-12: characterization of ViaB from *Citrobacter freundii* and identity of ViaA with RcsB. *J Bacteriol.* **174**(18):5910-5915.
- Huang, S. H., Y. H. Chen, Q. Fu, M. F. Stins, Y. Wang, C. Wass, and K. S. Kim. 1999. Identification and characterization of an *Escherichia coli* invasion gene locus, *ibeB*, required for penetration of brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun.* **67**(5):2103-2109.
- Huang, S. H., M. F. Stins, and K. S. Kim. 2000. Bacterial penetration across the blood-brain barrier during the development of neonatal meningitis. *Microbes Infect.* **2**(10):1237-1244.
- Huang, S. H., and A. Y. Jong. 2001. Cellular mechanisms of microbial proteins contributing to invasion of the blood-brain barrier. *Cell Microbiol.* **3**(5):277-287.
- Hueck, C. J., M. J. Hantman, V. Bajaj, C. Johnston, C. A. Lee, and S. I. Miller. 1995. *Salmonella typhimurium* secreted invasion determinants are homologous to *Shigella* Ipa proteins. *Mol Microbiol.* **18**(3):479-490.
- Hull, R. A., W. H. Donovan, M. Del Terzo, C. Stewart, M. Rogers, and R. O. Darouiche. 2002. Role of type 1 fimbria- and P fimbria-specific adherence in colonization of the neurogenic human bladder by *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **70**(11):6481-6484.
- Hull, R. A., R. E. Gill, P. Hsu, B. H. Minshew, and S. Falkow. 1981. Construction and expression of recombinant plasmids encoding type 1 or D-mannose-resistant pili from a urinary tract infection *Escherichia coli* isolate. *Infect Immun.* **33**(3):933-938.
- Hung, D. L., and S. J. Hultgren. 1998. Pilus biogenesis via the chaperone/usher pathway: an integration of structure and function. *J Struct Biol.* **124**(2-3):201-220.
- Hung, D. L., S. D. Knight, R. M. Woods, J. S. Pinkner, and S. J. Hultgren. 1996. Molecular basis of two subfamilies of immunoglobulin-like chaperones. *Embo J.* **15**(15):3792-3805.
- Iretton, K., B. Payrastre, and P. Cossart. 1999. The *Listeria monocytogenes* protein InlB is an agonist of mammalian phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem.* **274**(24):17025-17032.
- Isberg, R. R. 1991. Discrimination between intracellular uptake and surface adhesion of bacterial pathogens. *Science.* **252**(5008):934-938.
- Isberg, R. R., and S. Falkow. 1985. A single genetic locus encoded by *Yersinia pseudotuberculosis* permits invasion of cultured animal cells by *Escherichia coli* K-12. *Nature.* **317**(6034):262-264.
- Isberg, R. R., Z. Hamburger, and P. Dersch. 2000. Signaling and invasin-promoted uptake via integrin receptors. *Microbes Infect.* **2**(7):793-801.
- Isberg, R. R., and J. M. Leong. 1990. Multiple β 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell.* **60**(5):861-871.

- Isberg, R. R., D. L. Voorhis, and S. Falkow.** 1987. Identification of invasins: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell*. **50**(5):769-778.
- Jagnow, G., K. Haider, and P. C. Ellwardt.** 1977. Anaerobic dechlorination and degradation of hexachlorocyclohexane isomers by anaerobic and facultative anaerobic bacteria. *Arch Microbiol*. **115**(3):285-292.
- Jepson, M. A., and M. A. Clark.** 1998. Studying M cells and their role in infection. *Trends Microbiol*. **6**(9):359-365.
- Jepson, M. A., B. Kenny, and A. D. Leard.** 2001. Role of *sipA* in the early stages of *Salmonella typhimurium* entry into epithelial cells. *Cell Microbiol*. **3**(6):417-426.
- Jerse, A. E., J. Yu, B. D. Tall, and J. B. Kaper.** 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **87**(20):7839-7843.
- Joaquin, A., S. Khan, N. Russel, and N. al Fayez.** 1991. Neonatal meningitis and bilateral cerebellar abscesses due to *Citrobacter freundii*. *Pediatr Neurosurg*. **17**(1):23-24.
- Johnson, J. R.** 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev*. **4**(1):80-128.
- Johnson, J. R., A. L. Stell, F. Scheutz, T. T. O'Bryan, T. A. Russo, U. B. Carlino, C. Fasching, J. Kavle, L. Van Dijk, and W. Gastra.** 2000. Analysis of the F antigen-specific *papA* alleles of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* using a novel multiplex PCR-based assay. *Infect Immun*. **68**(3):1587-1599.
- Jones, B., L. Pascopella, and S. Falkow.** 1995a. Entry of microbes into the host: using M cells to break the mucosal barrier. *Curr Opin Immunol*. **7**(4):474-478.
- Jones, C. H., P. N. Danese, J. S. Pinkner, T. J. Silhavy, and S. J. Hultgren.** 1997. The chaperone-assisted membrane release and folding pathway is sensed by two signal transduction systems. *Embo J*. **16**(21):6394-6406.
- Jones, C. H., J. S. Pinkner, A. V. Nicholes, L. N. Slonim, S. N. Abraham, and S. J. Hultgren.** 1993. FimC is a periplasmic PapD-like chaperone that directs assembly of type 1 pili in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **90**(18):8397-8401.
- Jones, C. H., J. S. Pinkner, R. Roth, J. Heuser, A. V. Nicholes, S. N. Abraham, and S. J. Hultgren.** 1995b. FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the *Enterobacteriaceae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**(6):2081-2085.
- Jouve, M., M. I. Garcia, P. Courcoux, A. Labigne, P. Gounon, and C. Le Bouguenec.** 1997. Adhesion to and invasion of HeLa cells by pathogenic *Escherichia coli* carrying the *afa-3* gene cluster are mediated by the AfaE and AfaD proteins, respectively. *Infect Immun*. **65**(10):4082-4089.
- Kaniga, K., D. Trollinger, and J. E. Galan.** 1995a. Identification of two targets of the type III protein secretion system encoded by the *inv* and *spa* loci of *Salmonella typhimurium* that have homology to the *Shigella* IpaD and IpaA proteins. *J Bacteriol*. **177**(24):7078-7085.
- Kaniga, K., S. Tucker, D. Trollinger, and J. E. Galan.** 1995b. Homologs of the *Shigella* IpaB and IpaC invasins are required for *Salmonella typhimurium* entry into cultured epithelial cells. *J Bacteriol*. **177**(14):3965-3971.
- Kaniga, K., J. Uralil, J. B. Bliska, and J. E. Galan.** 1996. A secreted protein tyrosine phosphatase with modular effector domains in the bacterial pathogen *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol*. **21**(3):633-641.
- Kelly, C. G., and J. S. YOUNSON.** 2000. Anti-adhesive strategies in the prevention of infectious disease at mucosal surfaces. *Expert Opin Investig Drugs*. **9**(8):1711-1721.
- Kenny, B., R. DeVinney, M. Stein, D. J. Reinscheid, E. A. Frey, and B. B. Finlay.** 1997. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell*. **91**(4):511-520.

- Kenny, B., and B. B. Finlay.** 1995. Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**(17):7991-7995.
- Khan, A. S., and D. M. Schifferli.** 1994. A minor 987P protein different from the structural fimbrial subunit is the adhesin. *Infect Immun.* **62**(10):4233-4243.
- Khashe, S., and J. M. Janda.** 1996. Iron utilization studies in *Citrobacter* species. *FEMS Microbiol Lett.* **137**(2-3):141-146.
- Klemm, P.** 1992. FimC, a chaperone-like periplasmic protein of *Escherichia coli* involved in biogenesis of type 1 fimbriae. *Res Microbiol.* **143**(9):831-838.
- Klemm, P.** 1986. Two regulatory *fim* genes, *fimB* and *fimE*, control the phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *Embo J.* **5**(6):1389-1393.
- Klemm, P., and G. Christiansen.** 1990. The *fimD* gene required for cell surface localization of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Mol Gen Genet.* **220**(2):334-338.
- Klemm, P., B. J. Jorgensen, I. van Die, H. de Ree, and H. Bergmans.** 1985. The *fim* genes responsible for synthesis of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*, cloning and genetic organization. *Mol Gen Genet.* **199**(3):410-414.
- Klemm, P., and K. A. Krogfelt.** 1994. Type 1 fimbriae of *Escherichia coli*, p. 9-26. In P. Klemm (ed.), *Fimbriae: adhesion, genetics, biogenesis, and vaccines*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Klemm, P., and M. A. Schembri.** 2000. Bacterial adhesins: function and structure. *Int J Med Microbiol.* **290**(1):27-35.
- Klemm, P., S. Tong, H. Nielsen, and T. Conway.** 1996. The *gntP* gene of *Escherichia coli* involved in gluconate uptake. *J Bacteriol.* **178**(1):61-67.
- Kline, M. W., S. L. Kaplan, E. P. Hawkins, and E. O. Mason, Jr.** 1988a. Pathogenesis of brain abscess formation in an infant rat model of *Citrobacter diversus* bacteremia and meningitis. *J Infect Dis.* **157**(1):106-112.
- Kline, M. W., E. O. Mason, Jr., and S. L. Kaplan.** 1988b. Characterization of *Citrobacter diversus* strains causing neonatal meningitis. *J Infect Dis.* **157**(1):101-105.
- Knight, S. D., J. Berglund, and D. Choudhury.** 2000. Bacterial adhesins: structural studies reveal chaperone function and pilus biogenesis. *Curr Opin Chem Biol.* **4**(6):653-660.
- Kolb-Mäurer, A., I. Gentshev, H. W. Fries, F. Fiedler, E. B. Bröcker, E. Kämpgen, and W. Goebel.** 2000. *Listeria monocytogenes* infected human dendritic cells: uptake and host cell response. *Infect Immun.* **68**(6):3680-3688.
- Kolter, R., M. Inuzuka, and D. R. Helinski.** 1978. Trans-complementation-dependent replication of a low molecular weight origin fragment from plasmid R6K. *Cell.* **15**(4):1199-1208.
- Korhonen, T. K., K. Lounatmaa, H. Ranta, and N. Kuusi.** 1980. Characterization of type 1 pili of *Salmonella typhimurium* LT2. *J Bacteriol.* **144**(2):800-805.
- Korhonen, T. K., M. V. Valtonen, J. Parkkinen, V. Väisänen-Rhen, J. Finne, F. Orskov, I. Orskov, S. B. Svenson, and P. H. Mäkelä.** 1985. Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis. *Infect Immun.* **48**(2):486-491.
- Kreft, J., and J. A. Vazquez-Boland.** 2001. Regulation of virulence genes in *Listeria*. *Int J Med Microbiol.* **291**(2):145-157.
- Krogfelt, K. A.** 1991. Bacterial adhesion: genetics, biogenesis, and role in pathogenesis of fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. *Rev Infect Dis.* **13**(4):721-735.
- Kuehn, M. J., J. Heuser, S. Normark, and S. J. Hultgren.** 1992. P pili in uropathogenic *E. coli* are composite fibres with distinct fibrillar adhesive tips. *Nature.* **356**(6366):252-255.

- Kuehn, M. J., F. Jacob-Dubuisson, K. Dodson, L. Slonim, R. Striker, and S. J. Hultgren.** 1994. Genetic, biochemical, and structural studies of biogenesis of adhesive pili in bacteria. *Methods Enzymol.* **236**:282-306.
- Kuhn, M.** 1998. The microtubule depolymerizing drugs nocodazole and colchicine inhibit the uptake of *Listeria monocytogenes* by P388D1 macrophages. *FEMS Microbiol Lett.* **160**(1):87-90.
- Kuhn, M., and W. Goebel.** 1995. Molecular studies on the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Genet Eng.* **17**:31-51.
- Kuhnert, P., J. Hacker, I. Mühldorfer, A. P. Burnens, J. Nicolet, and J. Frey.** 1997. Detection system for *Escherichia coli*-specific virulence genes: absence of virulence determinants in B and C strains. *Appl Environ Microbiol.* **63**(2):703-709.
- Kukkonen, M., T. Raunio, R. Virkola, K. Lähteenmäki, P. H. Mäkelä, P. Klemm, S. Clegg, and T. K. Korhonen.** 1993. Basement membrane carbohydrate as a target for bacterial adhesion: binding of type I fimbriae of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* to laminin. *Mol Microbiol.* **7**(2):229-237.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**(259):680-685.
- Lamont, R. J., A. Chan, C. M. Belton, K. T. Izutsu, D. Vassel, and A. Weinberg.** 1995. *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun.* **63**(10):3878-3885.
- Langermann, S., R. Mollby, J. E. Burlein, S. R. Palaszynski, C. G. Auguste, A. DeFusco, R. Strouse, M. A. Schenerman, S. J. Hultgren, J. S. Pinkner, J. Winberg, L. Guldevall, M. Soderhall, K. Ishikawa, S. Normark, and S. Koenig.** 2000. Vaccination with FimH adhesin protects cynomolgus monkeys from colonization and infection by uropathogenic *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* **181**(2):774-778.
- Langermann, S., S. Palaszynski, M. Barnhart, G. Auguste, J. S. Pinkner, J. Burlein, P. Barren, S. Koenig, S. Leath, C. H. Jones, and S. J. Hultgren.** 1997. Prevention of mucosal *Escherichia coli* infection by FimH-adhesin-based systemic vaccination. *Science.* **276**(5312):607-611.
- Le Bouguenec, C., M. I. Garcia, V. Ouin, J. M. Desperrier, P. Gounon, and A. Labigne.** 1993. Characterization of plasmid-borne *afa-3* gene clusters encoding afimbrial adhesins expressed by *Escherichia coli* strains associated with intestinal or urinary tract infections. *Infect Immun.* **61**(12):5106-5114.
- Lecuit, M., H. Ohayon, L. Braun, J. Mengaud, and P. Cossart.** 1997. Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. *Infect Immun.* **65**(12):5309-5319.
- Li, J., J. M. Musser, P. Beltran, M. W. Kline, and R. K. Selander.** 1990. Genotypic heterogeneity of strains of *Citrobacter diversus* expressing a 32-kilodalton outer membrane protein associated with neonatal meningitis. *J Clin Microbiol.* **28**(8):1760-1765.
- Lim, J. K., N. W. Gunther IV., H. Zhao, D. E. Johnson, S. K. Keay, and H. L. T. Mobley.** 1998. *In vivo* phase variation of *Escherichia coli* type 1 fimbrial genes in women with urinary tract infection. *Infect Immun.* **66**(7):3303-3310.
- Lingnau, A., E. Domann, M. Hudel, M. Bock, T. Nichterlein, J. Wehland, and T. Chakraborty.** 1995. Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD *inlA* and *inlB* genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms. *Infect Immun.* **63**(10):3896-3903.
- Lipsky, B. A., E. W. Hook, 3rd, A. A. Smith, and J. J. Plorde.** 1980. *Citrobacter* infections in humans: experience at the Seattle Veterans Administration Medical Center and a review of the literature. *Rev Infect Dis.* **2**(5):746-760.
- Ljungh, A., and T. Wadström.** 1983. Fimbriation of *Escherichia coli* in urinary tract infections. Comparisons between bacteria in the urine and subcultured bacterial isolates. *Curr Microbiol.* **8**:263-268.
- Lund, B., F. Lindberg, B. I. Marklund, and S. Normark.** 1987. The PapG protein is the α -D-galactopyranosyl-(1-4)- β -D-galactopyranose-binding adhesin of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **84**(16):5898-5902.

- Luperchio, S. A., and D. B. Schauer.** 2001. Molecular pathogenesis of *Citrobacter rodentium* and transmissible murine colonic hyperplasia. *Microbes Infect.* **3**(4):333-340.
- Machesky, L.** 1996. Plasmid preparations with diatomaceous earth. *Methods Mol Biol.* **58**:269-272.
- MacMillan, R. D.** 2001. Complicated urinary tract infections in patients with voiding dysfunction. *Can J Urol.* **8**(Suppl 1):13-17.
- Maibaum, M.** 2002. Molekulargenetische Untersuchungen zur Persistenz und Genomvariabilität von *Escherichia coli* Isolaten von Patientinnen mit chronisch rezidivierenden Harnwegsinfektionen. Medizinische Doktorarbeit. Universität Würzburg.
- Makino, S., J. P. van Putten, and T. F. Meyer.** 1991. Phase variation of the opacity outer membrane protein controls invasion by *Neisseria gonorrhoeae* into human epithelial cells. *Embo J.* **10**(6):1307-1315.
- Malaviya, R., Z. Gao, K. Thankavel, P. A. van der Merwe, and S. N. Abraham.** 1999. The mast cell tumor necrosis factor α response to FimH-expressing *Escherichia coli* is mediated by the glycosyl-phosphatidylinositol-anchored molecule CD48. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**(14):8110-8115.
- Malaviya, R., T. Ikeda, E. Ross, and S. N. Abraham.** 1996. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF- α . *Nature.* **381**(6577):77-80.
- Marra, A., and R. R. Isberg.** 1996. Common entry mechanisms. *Bacterial pathogenesis.* *Curr Biol.* **6**(9):1084-1086.
- Martinez, J. J., and S. J. Hultgren.** 2002. Requirement of Rho-family GTPases in the invasion of Type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.* **4**(1):19-28.
- Martinez, J. J., M. A. Mulvey, J. D. Schilling, J. S. Pinkner, and S. J. Hultgren.** 2000. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *Embo J.* **19**(12):2803-2812.
- Maruta, K., M. Ogawa, H. Miyamoto, K. Izu, and S. I. Yoshida.** 1998. Entry and intracellular localization of *Legionella dumoffii* in Vero cells. *Microb Pathog.* **24**(2):65-73.
- Matatov, R., J. Goldhar, E. Skutelsky, I. Sechter, R. Perry, R. Podschun, H. Sahly, K. Thankavel, S. N. Abraham, and I. Ofek.** 1999. Inability of encapsulated *Klebsiella pneumoniae* to assemble functional type 1 fimbriae on their surface. *FEMS Microbiol Lett.* **179**(1):123-130.
- Maurelli, A. T., R. E. Fernandez, C. A. Bloch, C. K. Rode, and A. Fasano.** 1998. "Black holes" and bacterial pathogenicity: a large genomic deletion that enhances the virulence of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**(7):3943-3948.
- McClain, M. S., I. C. Blomfield, and B. I. Eisenstein.** 1991. Roles of *fimB* and *fimE* in site-specific DNA inversion associated with phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **173**(17):5308-5314.
- McCormick, B. A., S. P. Colgan, C. Delp-Archer, S. I. Miller, and J. L. Madara.** 1993. *Salmonella typhimurium* attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signalling to subepithelial neutrophils. *J Cell Biol.* **123**(4):895-907.
- McDaniel, T. K., K. G. Jarvis, M. S. Sonnenberg, and J. B. Kaper.** 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**(5):1664-1668.
- Meier, C., T. A. Oelschlaeger, H. Merkert, T. K. Korhonen, and J. Hacker.** 1996. Ability of *Escherichia coli* isolates that cause meningitis in newborns to invade epithelial and endothelial cells. *Infect Immun.* **64**(7):2391-2399.
- Menard, R., C. Dehio, and P. J. Sansonetti.** 1996. Bacterial entry into epithelial cells: the paradigm of *Shigella*. *Trends Microbiol.* **4**(6):220-226.
- Mengaud, J., H. Ohayon, P. Gounon, R. M. Mege, and P. Cossart.** 1996. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell.* **84**(6):923-932.

- Michaelis, K.** 1999. Biochemische und molekularbiologische Charakterisierung einer Fimbrien-determinante aus *Citrobacter freundii*. Diplomarbeit. Universität Würzburg.
- Miki, K., K. Tamura, R. Sakazaki, and Y. Kosako.** 1996. Re-speciation of the original reference strains of serovars in the *Citrobacter freundii* (Bethesda-Ballerup group) antigenic scheme of West and Edwards. *Microbiol Immunol.* **40**(12):915-921.
- Miller, V. L., and S. Falkow.** 1988. Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Infect Immun.* **56**(5):1242-1248.
- Mira, A., H. Ochman, and N. A. Moran.** 2001. Deletional bias and the evolution of bacterial genomes. *Trends Genet.* **17**(10):589-596.
- Miyazaki, J., W. Ba-Thein, T. Kumao, M. O. Yasuoka, H. Akaza, and H. Hayshi.** 2002. Type 1, P and S fimbriae, and afimbrial adhesin I are not essential for uropathogenic *Escherichia coli* to adhere to and invade bladder epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **33**(1):23-26.
- Moon, H. W., S. C. Whipp, R. A. Argenzio, M. M. Levine, and R. A. Giannella.** 1983. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect Immun.* **41**(3):1340-1351.
- Morzejko, E., E. Panek, J. Skala, T. M. Lachowicz, and S. Cebrat.** 1989. Genetic properties of plasmids isolated from pathogenic strain of *Citrobacter freundii*. *Acta Microbiol Pol.* **38**(2):159-170.
- Moulder, J. W.** 1985. Comparative biology of intracellular parasitism. *Microbiol Rev.* **49**(3):298-337.
- Mouslim, C., F. Hilbert, H. Huang, and E. A. Groisman.** 2002. Conflicting needs for a *Salmonella* hypervirulence gene in host and non-host environments. *Mol Microbiol.* **45**(4):1019-1027.
- Mühldorfer, I., and J. Hacker.** 1994. Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. *Microb Pathog.* **16**(3):171-181.
- Müller, S., T. Hain, P. Pashalidis, A. Lingnau, E. Domann, T. Chakraborty, and J. Wehland.** 1998. Purification of the *inlB* gene product of *Listeria monocytogenes* and demonstration of its biological activity. *Infect Immun.* **66**(7):3128-3133.
- Mullis, K. B., and F. A. Faloona.** 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**:335-350.
- Mulvey, M. A.** 2002. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.* **4**(5):257-271.
- Mulvey, M. A., Y. S. Lopez-Boado, C. L. Wilson, R. Roth, W. C. Parks, J. Heuser, and S. J. Hultgren.** 1998. Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science.* **282**(5393):1494-1497.
- Mulvey, M. A., J. D. Schilling, and S. J. Hultgren.** 2001. Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infect Immun.* **69**(7):4572-4579.
- Mulvey, M. A., J. D. Schilling, J. J. Martinez, and S. J. Hultgren.** 2000. Bad bugs and beleaguered bladders: interplay between uropathogenic *Escherichia coli* and innate host defenses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**(16):8829-8835.
- Nakata, N., T. Tobe, I. Fukuda, T. Suzuki, K. Komatsu, M. Yoshikawa, and C. Sasakawa.** 1993. The absence of a surface protease, OmpT, determines the intercellular spreading ability of *Shigella*: the relationship between the *ompT* and *kcpA* loci. *Mol Microbiol.* **9**(3):459-468.
- Neutra, M. R., N. J. Mantis, A. Frey, and P. J. Giannasca.** 1999. The composition and function of M cell apical membranes: implications for microbial pathogenesis. *Semin Immunol.* **11**(3):171-181.
- Newman, J. V., B. A. Zabel, S. S. Jha, and D. B. Schauer.** 1999. *Citrobacter rodentium* *espB* is necessary for signal transduction and for infection of laboratory mice. *Infect Immun.* **67**(11):6019-6025.
- Nicolle, L. E.** 2002. Resistant pathogens in urinary tract infections. *J Am Geriatr Soc.* **50**(7, Suppl): S230-S235.

- Nowicki, B., A. Labigne, S. Moseley, R. Hull, S. Hull, and J. Moulds.** 1990. The Dr hemagglutinin, afimbrial adhesins AFA-I and AFA-III, and F1845 fimbriae of uropathogenic and diarrhea-associated *Escherichia coli* belong to a family of hemagglutinins with Dr receptor recognition. *Infect Immun.* **58**(1):279-281.
- Ochman, H., and N. A. Moran.** 2001. Genes lost and genes found: evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. *Science.* **292**(5519):1096-1099.
- Oelschlaeger, T.** 1994. Invasivität – ein potentieller Virulenzfaktor fakultativ intrazellulärer Bakterien. *BioEngineering.* **5**:20-25.
- Oelschlaeger, T. A.** 2001. Adhesins as invasins. *Int J Med Microbiol.* **291**(1):7-14.
- Oelschlaeger, T. A., T. J. Barrett, and D. J. Kopecko.** 1994. Some structures and processes of human epithelial cells involved in uptake of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strains. *Infect Immun.* **62**(11):5142-5150.
- Oelschlaeger, T. A., U. Dobrindt, and J. Hacker.** 2002a. Virulence factors of uropathogens. *Curr Opin Urol.* **12**(1):33-38.
- Oelschlaeger, T. A., U. Dobrindt, and J. Hacker.** 2002b. Pathogenicity islands of uropathogenic *E. coli* and the evolution of virulence. *Int J Antimicrob Agents.* **19**(6):517-521.
- Oelschlaeger, T. A., P. Guerry, and D. J. Kopecko.** 1993. Unusual microtubule-dependent endocytosis mechanisms triggered by *Campylobacter jejuni* and *Citrobacter freundii*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**(14):6884-6888.
- Oelschlaeger, T. A., and J. Hacker.** 1998. Urinary tract infections: important bacteria, virulence factors and development of resistance. *Adv Clin Exp Med.* **7**(1):33-40.
- Oelschlaeger, T. A., A. S. Khan, C. Meier, and J. Hacker.** 1997. Receptors and ligands in adhesion and invasion of *Escherichia coli*. *Nova Acta Leopoldina.* **NF 75**(301):195-205.
- Oelschlaeger, T. A., and D. J. Kopecko.** 2000. Microtubule dependent invasion pathways of bacteria. *Subcell Biochem.* **33**:3-19.
- Oelschlaeger, T. A., and B. D. Tall.** 1997. Invasion of cultured human epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae* isolated from the urinary tract. *Infect Immun.* **65**(7):2950-2958.
- Oelschlaeger, T. A., and B. D. Tall.** 1996. Uptake pathways of clinical isolates of *Proteus mirabilis* into human epithelial cell lines. *Microb Pathog.* **21**(1):1-16.
- Ofek, I., J. Goldhar, Y. Keisari, and N. Sharon.** 1995. Nonopsonic phagocytosis of microorganisms. *Annu Rev Microbiol.* **49**(1):239-276.
- Ofek, I., I. Kahane, and N. Sharon.** 1996. Toward anti-adhesion therapy for microbial diseases. *Trends Microbiol.* **4**(8):297-299.
- Ofek, I., D. Mirelman, and N. Sharon.** 1977. Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. *Nature.* **265**(5595):623-625.
- Ofek, I., A. Mosek, and N. Sharon.** 1981. Mannose-specific adherence of *Escherichia coli* freshly excreted in the urine of patients with urinary tract infections, and of isolates subcultured from the infected urine. *Infect Immun.* **34**(3):708-711.
- Orndorff, P. E., and C. A. Bloch.** 1990. The role of type 1 pili in the pathogenesis of *Escherichia coli* infections: a short review and some new ideas. *Microb Pathog.* **9**(2):75-79.
- Ou, J. T., L. S. Baron, F. A. Rubin, and D. J. Kopecko.** 1988. Specific insertion and deletion of insertion sequence 1-like DNA element causes the reversible expression of the virulence capsular antigen Vi of *Citrobacter freundii* in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **85**(12):4402-4405.
- Pak, J., Y. Pu, Z. T. Zhang, D. L. Hasty, and X. R. Wu.** 2001. Tamm-Horsfall protein binds to type 1 fimbriated *Escherichia coli* and prevents *E. coli* from binding to uroplakin Ia and Ib receptors. *J Biol Chem.* **276**(13):9924-9930.

- Pallesen, L., O. Madsen, and P. Klemm.** 1989. Regulation of the phase switch controlling expression of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **3**(7):925-931.
- Parkkinen, J., and T. K. Korhonen.** 1989. Binding of plasminogen to *Escherichia coli* adhesion proteins. *FEBS Lett.* **250**(2):437-440.
- Pawelzik, M., J. Heesemann, J. Hacker, and W. Opferkuch.** 1988. Cloning and characterization of a new type of fimbria (S/F1C-related fimbria) expressed by an *Escherichia coli* O75:K1:H7 blood culture isolate. *Infect Immun.* **56**(11):2918-2924.
- Penfold, R. J., and J. M. Pemberton.** 1992. An improved suicide vector for construction of chromosomal insertion mutations in bacteria. *Gene.* **118**(1):145-146.
- Pepe, J. C., and V. L. Miller.** 1993. *Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**(14):6473-6477.
- Pere, A., B. Nowicki, H. Saxen, A. Siitonen, and T. K. Korhonen.** 1987. Expression of P, type-1, and type-1C fimbriae of *Escherichia coli* in the urine of patients with acute urinary tract infection. *J Infect Dis.* **156**(4):567-574.
- Pham, T. Q., P. Goluszko, V. Popov, S. Nowicki, and B. J. Nowicki.** 1997. Molecular cloning and characterization of Dr-II, a nonfimbrial adhesin-I-like adhesin isolated from gestational pyelonephritis-associated *Escherichia coli* that binds to decay-accelerating factor. *Infect Immun.* **65**(10):4309-4318.
- Ponniah, S., R. O. Endres, D. L. Hasty, and S. N. Abraham.** 1991. Fragmentation of *Escherichia coli* type 1 fimbriae exposes cryptic D-mannose-binding sites. *J Bacteriol.* **173**(13):4195-4202.
- Pouttu, R., T. Puustinen, R. Virkola, J. Hacker, P. Klemm, and T. K. Korhonen.** 1999. Amino acid residue Ala-62 in the FimH fimbrial adhesin is critical for the adhesiveness of meningitis-associated *Escherichia coli* to collagens. *Mol Microbiol.* **31**(6):1747-1757.
- Pratt, L. A., and R. Kolter.** 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol.* **30**(2):285-293.
- Purcell, B. K., J. Pruckler, and S. Clegg.** 1987. Nucleotide sequences of the genes encoding type 1 fimbrial subunits of *Klebsiella pneumoniae* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* **169**(12):5831-5834.
- Rae, C. E., A. Fazio, and J. P. Rosales.** 1991. Successful treatment of neonatal *Citrobacter freundii* meningitis with ceftriaxone. *Dicp.* **25**(1):27-29.
- Rankin, S., R. R. Isberg, and J. M. Leong.** 1992. The integrin-binding domain of invasin is sufficient to allow bacterial entry into mammalian cells. *Infect Immun.* **60**(9):3909-3912.
- Reisenauer, A.** 1999. Charakterisierung der Invasionsdeterminante aus *Citrobacter freundii* 3009 und des korrespondierenden eukaryontischen Internalisierungsrezeptors. Diplomarbeit. Universität Würzburg.
- Roberts, J. A., B. I. Marklund, D. Ilver, D. Haslam, M. B. Kaack, G. Baskin, M. Louis, R. Mollby, J. Winberg, and S. Normark.** 1994. The Gal(α 1-4)Gal-specific tip adhesin of *Escherichia coli* P-fimbriae is needed for pyelonephritis to occur in the normal urinary tract. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**(25):11889-11893.
- Ronald, A.** 2002. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *Am J Med.* **113**(Suppl 1A):14S-19S.
- Rose, R. E.** 1988a. The nucleotide sequence of pACYC177. *Nucleic Acids Res.* **16**(1):356.
- Rose, R. E.** 1988b. The nucleotide sequence of pACYC184. *Nucleic Acids Res.* **16**(1):355.
- Rosenshine, I., and B. B. Finlay.** 1993. Exploitation of host signal transduction pathways and cytoskeletal functions by invasive bacteria. *Bioessays.* **15**(1):17-24.
- Rosenshine, I., S. Ruschkowski, M. Stein, D. J. Reinscheid, S. D. Mills, and B. B. Finlay.** 1996. A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation. *Embo J.* **15**(11):2613-2624.

- Rosenstein, I. J., D. Grady, J. M. Hamilton-Miller, and W. Brumfitt. 1985. Relationship between adhesion of *Escherichia coli* to uro-epithelial cells and the pathogenesis of urinary infection: problems in methodology and analysis. *J Med Microbiol.* **20**(3):335-344.
- Rosqvist, R., I. Bolin, and H. Wolf-Watz. 1988. Inhibition of phagocytosis in *Yersinia pseudotuberculosis*: a virulence plasmid-encoded ability involving the Yop2b protein. *Infect Immun.* **56**(8):2139-2143.
- Rosqvist, R., S. Hakansson, A. Forsberg, and H. Wolf-Watz. 1995. Functional conservation of the secretion and translocation machinery for virulence proteins of *Yersiniae*, *Salmonellae* and *Shigellae*. *Embo J.* **14**(17):4187-4195.
- Rossolini, G. M., P. Muscas, A. Chiesurin, and G. Satta. 1993. Analysis of the *Salmonella fim* gene cluster: identification of a new gene (*fimI*) encoding a fimbrin-like protein and located downstream from the *fimA* gene. *FEMS Microbiol Lett.* **114**(3):259-265.
- Russell, P. W., and P. E. Orndorff. 1992. Lesions in two *Escherichia coli* type 1 pilus genes alter pilus number and length without affecting receptor binding. *J Bacteriol.* **174**(18):5923-5935.
- Russo, T. A., A. Stapleton, S. Wenderoth, T. M. Hooton, and W. E. Stamm. 1995. Chromosomal restriction fragment length polymorphism analysis of *Escherichia coli* strains causing recurrent urinary tract infections in young women. *J Infect Dis.* **172**(2):440-445.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* **239**(4839):487-491.
- Sakazaki, R. 1984. Genus IV. *Citrobacter*, p. 458-461. In N. R. Krieg and J. G. Holt (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. The Williams & Wilkins Co, Baltimore.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Samonis, G., E. Anaissie, L. Elting, and G. P. Bodey. 1991. Review of *Citrobacter* bacteremia in cancer patients over a sixteen-year period. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **10**(6):479-485.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **74**(12):5463-5467.
- Sansonetti, P. J., J. Mounier, M. C. Prevost, and R. M. Mege. 1994. Cadherin expression is required for the spread of *Shigella flexneri* between epithelial cells. *Cell.* **76**(5):829-839.
- Sansonetti, P. J., and A. Phalipon. 1999. M cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: mechanisms of interaction, consequences for the disease process. *Semin Immunol.* **11**(3):193-203.
- Sansonetti, P. J., A. Ryter, P. Clerc, A. T. Maurelli, and J. Mounier. 1986. Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa cells: lysis of the phagocytic vacuole and plasmid-mediated contact hemolysis. *Infect Immun.* **51**(2):461-469.
- Sauer, F. G., M. Barnhart, D. Choudhury, S. D. Knight, G. Waksman, and S. J. Hultgren. 2000. Chaperone-assisted pilus assembly and bacterial attachment. *Curr Opin Struct Biol.* **10**(5):548-556.
- Sauer, F. G., K. Fütterer, J. S. Pinkner, K. W. Dodson, S. J. Hultgren, and G. Waksman. 1999. Structural basis of chaperone function and pilus biogenesis. *Science.* **285**(5430):1058-1061.
- Saulino, E. T., E. Bullitt, and S. J. Hultgren. 2000. Snapshots of usher-mediated protein secretion and ordered pilus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**(16):9240-9245.
- Saulino, E. T., D. G. Thanassi, J. S. Pinkner, and S. J. Hultgren. 1998. Ramifications of kinetic partitioning on usher-mediated pilus biogenesis. *Embo J.* **17**(8):2177-2185.
- Saxena, P., and J. R. Walker. 1992. Expression of *argU*, the *Escherichia coli* gene coding for a rare arginine tRNA. *J Bacteriol.* **174**(6):1956-1964.

- Schäfer, A., A. Tauch, W. Jäger, J. Kalinowski, G. Thierbach, and A. Pühler.** 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*. **145**(1):69-73.
- Schäffer, C., M. Graninger, and P. Messner.** 2001. Prokaryotic glycosylation. *Proteomics*. **1**(2):248-261.
- Schagger, H., H. Aquila, and G. Von Jagow.** 1988. Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Anal Biochem*. **173**(1):201-205.
- Schauer, D. B., and S. Falkow.** 1993a. Attaching and effacing locus of a *Citrobacter freundii* biotype that causes transmissible murine colonic hyperplasia. *Infect Immun*. **61**(6):2486-2492.
- Schauer, D. B., and S. Falkow.** 1993b. The *eae* gene of *Citrobacter freundii* biotype 4280 is necessary for colonization in transmissible murine colonic hyperplasia. *Infect Immun*. **61**(11):4654-4661.
- Schembri, M. A., E. V. Sokurenko, and P. Klemm.** 2000. Functional flexibility of the FimH adhesin: insights from a random mutant library. *Infect Immun*. **68**(5):2638-2646.
- Schembri, M. A., D. W. Ussery, C. Workman, H. Hasman, and P. Klemm.** 2002. DNA microarray analysis of *fim* mutations in *Escherichia coli*. *Mol Genet Genomics*. **267**(6):721-729.
- Schilling, J. D., and S. J. Hultgren.** 2002. Recent advances into the pathogenesis of recurrent urinary tract infections: the bladder as a reservoir for uropathogenic *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents*. **19**(6):457-460.
- Schilling, J. D., M. A. Mulvey, and S. J. Hultgren.** 2001a. Dynamic interactions between host and pathogen during acute urinary tract infections. *Urology*. **57**(6, Suppl 1):56-61.
- Schilling, J. D., M. A. Mulvey, and S. J. Hultgren.** 2001b. Structure and function of *Escherichia coli* type 1 pili: new insight into the pathogenesis of urinary tract infections. *J Infect Dis*. **183**(Suppl 1):S36-S40.
- Schmidt, H., M. Montag, J. Bockemühl, J. Heesemann, and H. Karch.** 1993. Shiga-like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples. *Infect Immun*. **61**(2):534-543.
- Schmidt, M. A.** 1994. Nonfimbrial adhesins of *Escherichia coli*, p. 85-96. In P. Klemm (ed.), *Fimbriae: adhesion, genetics, biogenesis, and vaccines*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Schmoll, T., H. Hoschützky, J. Morschhäuser, F. Lottspeich, K. Jann, and J. Hacker.** 1989. Analysis of genes coding for the sialic acid-binding adhesin and two other minor fimbrial subunits of the S-fimbrial adhesin determinant of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. **3**(12):1735-1744.
- Schubert, S., S. Cuenca, D. Fischer, and J. Heesemann.** 2000. High-pathogenicity island of *Yersinia pestis* in Enterobacteriaceae isolated from blood cultures and urine samples: prevalence and functional expression. *J Infect Dis*. **182**(4):1268-1271.
- Schulze-Koops, H., H. Burkhardt, J. Heesemann, K. von der Mark, and F. Emmrich.** 1992. Plasmid-encoded outer membrane protein YadA mediates specific binding of enteropathogenic *Yersiniae* to various types of collagen. *Infect Immun*. **60**(6):2153-2159.
- Sedlak, J.** 1973. Present knowledge and aspects of *Citrobacter*. *Curr Top Microbiol Immunol*. **62**:41-59.
- Sharon, N., and I. Ofek.** 2000. Safe as mother's milk: carbohydrates as future anti-adhesion drugs for bacterial diseases. *Glycoconj J*. **17**(7-9):659-664.
- Sheehan, B., C. Kocks, S. Dramsi, E. Guin, A. D. Klarsfeld, J. Mengaud, and P. Cossart.** 1994. Molecular and genetic determinants of the *Listeria monocytogenes* infectious process. *Curr Top Microbiol Immunol*. **192**:187-216.
- Shen, Y., M. Naujokas, M. Park, and K. Ireton.** 2000. InlB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell*. **103**(3):501-510.
- Siebers, A., and B. B. Finlay.** 1996. M cells and the pathogenesis of mucosal and systemic infections. *Trends Microbiol*. **4**(1):22-29.

- Simon, R., U. Priefer, and A. Pühler.** 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *BioTechnology*. **1**:784-791.
- Skerman, V. B. D., V. McGowan, and P. H. A. Sneath.** 1980. Approved lists of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol*. **30**:225-420.
- Skurnik, M., I. Bolin, H. Heikkinen, S. Piha, and H. Wolf-Watz.** 1984. Virulence plasmid-associated autoagglutination in *Yersinia* spp. *J Bacteriol*. **158**(3):1033-1036.
- Skurnik, M., and H. Wolf-Watz.** 1989. Analysis of the *yopA* gene encoding the Yop1 virulence determinants of *Yersinia* spp. *Mol Microbiol*. **3**(4):517-529.
- Small, P. L., R. R. Isberg, and S. Falkow.** 1987. Comparison of the ability of enteroinvasive *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pseudotuberculosis*, and *Yersinia enterocolitica* to enter and replicate within HEp-2 cells. *Infect Immun*. **55**(7):1674-1679.
- Sokurenko, E. V., V. Chesnokova, R. J. Doyle, and D. L. Hasty.** 1997. Diversity of the *Escherichia coli* type 1 fimbrial lectin. Differential binding to mannosides and uroepithelial cells. *J Biol Chem*. **272**(28):17880-17886.
- Sokurenko, E. V., V. Chesnokova, D. E. Dykhuizen, I. Ofek, X. R. Wu, K. A. Krogfelt, C. Struve, M. A. Schembri, and D. L. Hasty.** 1998. Pathogenic adaptation of *Escherichia coli* by natural variation of the FimH adhesin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**(15):8922-8926.
- Sokurenko, E. V., H. S. Courtney, S. N. Abraham, P. Klemm, and D. L. Hasty.** 1992. Functional heterogeneity of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. *Infect Immun*. **60**(11):4709-4719.
- Sokurenko, E. V., D. L. Hasty, and D. E. Dykhuizen.** 1999. Pathoadaptive mutations: gene loss and variation in bacterial pathogens. *Trends Microbiol*. **7**(5):191-195.
- Soto, G. E., K. W. Dodson, D. Ogg, C. Liu, J. Heuser, S. Knight, J. Kihlberg, C. H. Jones, and S. J. Hultgren.** 1998. Periplasmic chaperone recognition motif of subunits mediates quaternary interactions in the pilus. *Embo J*. **17**(21):6155-6167.
- Soto, G. E., and S. J. Hultgren.** 1999. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J Bacteriol*. **181**(4):1059-1071.
- Southern, E. M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*. **98**(3):503-517.
- St. Geme, J. W., 3rd, and S. Falkow.** 1990. *Haemophilus influenzae* adheres to and enters cultured human epithelial cells. *Infect Immun*. **58**(12):4036-4044.
- Stamey, T. A., and C. C. Sexton.** 1975. The role of vaginal colonization with *enterobacteriaceae* in recurrent urinary infections. *J Urol*. **113**(2):214-217.
- Steele-Mortimer, O., L. A. Knodler, and B. B. Finlay.** 2000. Poisons, ruffles and rockets: bacterial pathogens and the host cell cytoskeleton. *Traffic*. **1**(2):107-118.
- Steiner, T.** 1998. Molekularbiologische Charakterisierung von Pathogenitätsinseln virulenter Enterobakterien. Diplomarbeit. Universität Würzburg.
- Stentebjerg-Olesen, B., T. Chakraborty, and P. Klemm.** 2000. FimE-catalyzed off-to-on inversion of the type 1 fimbrial phase switch and insertion sequence recruitment in an *Escherichia coli* K-12 *fimB* strain. *FEMS Microbiol Lett*. **182**(2):319-325.
- Stins, M. F., J. Badger, and K. S. Kim.** 2001. Bacterial invasion and transcytosis in transfected human brain microvascular endothelial cells. *Microb Pathog*. **30**(1):19-28.
- Strömberg, N., B. I. Marklund, B. Lund, D. Ilver, A. Hamers, W. Gaastra, K. A. Karlsson, and S. Normark.** 1990. Host-specificity of uropathogenic *Escherichia coli* depends on differences in binding specificity to Gal α 1-4Gal-containing isoreceptors. *Embo J*. **9**(6):2001-2010.
- Struve, C., and K. A. Krogfelt.** 1999. *In vivo* detection of *Escherichia coli* type 1 fimbrial expression and phase variation during experimental urinary tract infection. *Microbiology*. **145**(10):2683-2690.

- Studier, F. W.** 1991. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol.* **219**(1):37-44.
- Svanborg, C., G. Godaly, and M. Hedlund.** 1999. Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. *Curr Opin Microbiol.* **2**(1):99-105.
- Svenson, S. B., H. Hultberg, G. Kallenius, T. K. Korhonen, R. Mollby, and J. Winberg.** 1983. P-fimbriae of pyelonephritogenic *Escherichia coli*: identification and chemical characterization of receptors. *Infection.* **11**(1):61-67.
- Swanson, J. A., and S. C. Baer.** 1995. Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends Cell Biol.* **5**(3): 89-93.
- Swenson, D. L., K. J. Kim, E. W. Six, and S. Clegg.** 1994. The gene *fimU* affects expression of *Salmonella typhimurium* type 1 fimbriae and is related to the *Escherichia coli* tRNA gene *argU*. *Mol Gen Genet.* **244**(2):216-218.
- Tabor, S., and C. C. Richardson.** 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **82**(4):1074-1078.
- Tamm, A., A. M. Tarkkanen, T. K. Korhonen, P. Kuusela, P. Toivanen, and M. Skurnik.** 1993. Hydrophobic domains affect the collagen-binding specificity and surface polymerization as well as the virulence potential of the YadA protein of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol.* **10**(5):995-1011.
- Tang, L. M., S. T. Chen, and T. N. Lui.** 1994. *Citrobacter* meningitis in adults. *Clin Neurol Neurosurg.* **96**(1):52-57.
- Tang, P., V. Foubister, M. G. Pucciarelli, and B. B. Finlay.** 1993. Methods to study bacterial invasion. *J Microbiol Methods.* **18**:227-240.
- Tewari, R., J. I. MacGregor, T. Ikeda, J. R. Little, S. J. Hultgren, and S. N. Abraham.** 1993. Neutrophil activation by nascent FimH subunits of type 1 fimbriae purified from the periplasm of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **268**(4):3009-3015.
- Thanassi, D. G., E. T. Saulino, and S. J. Hultgren.** 1998a. The chaperone/usher pathway: a major terminal branch of the general secretory pathway. *Curr Opin Microbiol.* **1**(2):223-231.
- Thanassi, D. G., E. T. Saulino, M. J. Lombardo, R. Roth, J. Heuser, and S. J. Hultgren.** 1998b. The PapC usher forms an oligomeric channel: implications for pilus biogenesis across the outer membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**(6):3146-3151.
- Thankavel, K., B. Madison, T. Ikeda, R. Malaviya, A. H. Shah, P. M. Arumugam, and S. N. Abraham.** 1997. Localization of a domain in the FimH adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae capable of receptor recognition and use of a domain-specific antibody to confer protection against experimental urinary tract infection. *J Clin Invest.* **100**(5):1123-1136.
- Thankavel, K., A. H. Shah, M. S. Cohen, T. Ikeda, R. G. Lorenz, R. Curtiss, and S. N. Abraham.** 1999. Molecular basis for the enterocyte tropism exhibited by *Salmonella typhimurium* type 1 fimbriae. *J Biol Chem.* **274**(9):5797-5809.
- Tinker, J. K., and S. Clegg.** 2000. Characterization of FimY as a coactivator of type 1 fimbrial expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun.* **68**(6):3305-3313.
- Tinker, J. K., and S. Clegg.** 2001. Control of FimY translation and type 1 fimbrial production by the arginine tRNA encoded by *fimU* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol.* **40**(3): 757-768.
- Tinker, J. K., L. S. Hancox, and S. Clegg.** 2001. FimW is a negative regulator affecting type 1 fimbrial expression in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol.* **183**(2):435-442.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **76**(9): 4350-4354.
- Tuomanen, E.** 1996. Entry of pathogens into the central nervous system. *FEMS Microbiol Rev.* **18**(4):289-299.

- van Die, I., B. van Geffen, W. Hoekstra, and H. Bergmans. 1985. Type 1C fimbriae of a uropathogenic *Escherichia coli* strain: cloning and characterization of the genes involved in the expression of the 1C antigen and nucleotide sequence of the subunit gene. *Gene*. **34**(2-3):187-196.
- Van Nhieu, G. T., E. Caron, A. Hall, and P. J. Sansonetti. 1999. IpaC induces actin polymerization and filopodia formation during *Shigella* entry into epithelial cells. *Embo J*. **18**(12):3249-3262.
- Van Nhieu, G. T., and P. J. Sansonetti. 1999. Mechanism of *Shigella* entry into epithelial cells. *Curr Opin Microbiol*. **2**(1):51-55.
- van Oss, C. J. 1986. Phagocytosis: an overview. *Methods Enzymol*. **132**:3-15.
- van Putten, J. P., S. F. Hayes, and T. D. Duensing. 1997. Natural proteoglycan receptor analogs determine the dynamics of Opa adhesin-mediated gonococcal infection of Chang epithelial cells. *Infect Immun*. **65**(12):5028-5034.
- Vazquez-Boland, J. A., M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Dominguez-Bernal, W. Goebel, B. Gonzalez-Zorn, J. Wehland, and J. Kreft. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev*. **14**(3):584-640.
- Vazquez-Torres, A., and F. C. Fang. 2000. Cellular routes of invasion by enteropathogens. *Curr Opin Microbiol*. **3**(1):54-59.
- Virji, M. 1997. Post-translational modifications of meningococcal pili. Identification of common substituents: glycans and α -glycerophosphate – a review. *Gene*. **192**(1):141-147.
- Virji, M., K. Makepeace, D. J. Ferguson, and S. M. Watt. 1996. Carcinoembryonic antigens (CD66) on epithelial cells and neutrophils are receptors for Opa proteins of pathogenic *Neisseriae*. *Mol Microbiol*. **22**(5):941-950.
- Wagenlehner, F. M., A. Niemetz, A. Dalhoff, and K. G. Naber. 2002. Spectrum and antibiotic resistance of uropathogens from hospitalized patients with urinary tract infections: 1994-2000. *Int J Antimicrob Agents*. **19**(6):557-564.
- Warren, J. W. 1996. Clinical presentations and epidemiology of urinary tract infections, p. 3-27. In H. L. T. Mobley and J. W. Warren (eds.), *Urinary tract infections: molecular pathogenesis and clinical management*. American Society for Microbiology Press, Washington, DC.
- Welch, R. A., V. Burland, G. Plunkett, 3rd, P. Redford, P. Roesch, D. Rasko, E. L. Buckles, S. R. Liou, A. Boutin, J. Hackett, D. Stroud, G. F. Mayhew, D. J. Rose, S. Zhou, D. C. Schwartz, N. T. Perna, H. L. Mobley, M. S. Donnenberg, and F. R. Blattner. 2002. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**(26):17020-17024.
- Winther-Larsen, H. C., and M. Koomey. 2002. Transcriptional, chemosensory and cell-contact-dependent regulation of type IV pilus expression. *Curr Opin Microbiol*. **5**(2):173-178.
- Wizemann, T. M., J. E. Adamou, and S. Langermann. 1999. Adhesins as targets for vaccine development. *Emerg Infect Dis*. **5**(3):395-403.
- Wolff, C., I. Nisan, E. Hanski, G. Frankel, and I. Rosenshine. 1998. Protein translocation into host epithelial cells by infecting enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. **28**(1):143-155.
- Wooldridge, K. G., and P. H. Williams. 1993. Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. **12**(4):325-348.
- Wullt, B., G. Bergsten, H. Connell, P. Röllano, N. Gebretsadik, L. Hang, and C. Svanborg. 2001a. P-fimbriae trigger mucosal responses to *Escherichia coli* in the human urinary tract. *Cell Microbiol*. **3**(4):255-264.
- Wullt, B., G. Bergsten, H. Connell, P. Röllano, N. Gebretsadik, R. Hull, and C. Svanborg. 2000. P fimbriae enhance the early establishment of *Escherichia coli* in the human urinary tract. *Mol Microbiol*. **38**(3):456-464.

- Wullt, B., G. Bergsten, M. Samuelsson, N. Gebretsadik, R. Hull, and C. Svanborg.** 2001b. The role of P fimbriae for colonization and host response induction in the human urinary tract. *J Infect Dis.* **183** (Suppl 1):S43-S46.
- Wullt, B., G. Bergsten, M. Samuelsson, and C. Svanborg.** 2002. The role of P fimbriae for *Escherichia coli* establishment and mucosal inflammation in the human urinary tract. *Int J Antimicrob Agents.* **19**(6):522-538.
- Xia, Y., D. Gally, K. Forsman-Semb, and B. E. Uhlin.** 2000. Regulatory cross-talk between adhesin operons in *Escherichia coli*: inhibition of type 1 fimbriae expression by the PapB protein. *Embo J.* **19**(7):1450-1457.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* **33**(1):103-119.
- Yeh, K. S., L. S. Hancox, and S. Clegg.** 1995. Construction and characterization of a *fimZ* mutant of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* **177**(23):6861-6865.
- Young, V. B., S. Falkow, and G. K. Schoolnik.** 1992. The invasin protein of *Yersinia enterocolitica*: internalization of invasin-bearing bacteria by eukaryotic cells is associated with reorganization of the cytoskeleton. *J Cell Biol.* **116**(1):197-207.
- Young, V. B., V. L. Miller, S. Falkow, and G. K. Schoolnik.** 1990. Sequence, localization and function of the invasin protein of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol.* **4**(7):1119-1128.
- Zhou, D., and J. E. Galan.** 2001. *Salmonella* entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins. *Microbes Infect.* **3**(14-15):1293-1298.
- Zhou, D., M. S. Mooseker, and J. E. Galan.** 1999. Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. *Science.* **283**(5410):2092-2095.
- Zhou, G., W. J. Mo, P. Sebbel, G. Min, T. A. Neubert, R. Glockshuber, X. R. Wu, T. T. Sun, and X. P. Kong.** 2001. Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: evidence from *in vitro* FimH binding. *J Cell Sci.* **114**(22):4095-4103.

7. Anhang

7.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ap	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
Ci	Curie
Cm	Chloramphenicol
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	direct repeat
EBSS	Earle´s balanced salt solution
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EPEC	enteropathogene <i>E. coli</i>
ETEC	enterotoxische <i>E. coli</i>
FCS	fötale Kälberserum
<i>fim</i> _{Cf}	<i>fim</i> Gencluster von <i>Citrobacter freundii</i> 3009
<i>fim</i> _{Ec}	<i>fim</i> Gencluster von <i>Escherichia coli</i>
<i>fim</i> _{St}	<i>fim</i> Gencluster von <i>Salmonella typhimurium</i>
ges.	gesättigt
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
Gm	Gentamycin
h	Stunde
HBMEC	human brain microvascular endothelial cells
IS	Insertionssequenz
IR	inverted repeat

Km	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LEE	locus of enterocyte effacement
MCS	multiple cloning site
MENEC	Meningitis-auslösende <i>E. coli</i>
MF	Mikrofilament
min	Minute
MT	Mikrotubuli
MW	Molekulargewicht
NBM	Neugeborenenmeningitis
ne	nicht-essentiell
PAA	Polyacrylamid
Pai	Pathogenitätsinsel
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
Prf	P related fimbriae
r	Resistenz
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
Sfa	S Fimbrienadhäsion
Tab	Tabelle
Tc	Tetracyclin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
UPEC	uropathogene <i>E. coli</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTI	Urogenitaltraktinfektionen
ÜN	über Nacht
ÜNK	über Nacht Kultur
Vol.	Volumen

7.2 Sequenzen

7.2.1 *C. freundii* 3009 *fim* Gencluster

Die DNA Sequenz des *fim* Genclusters aus *C. freundii* Stamm 3009 wurde in eine Datenbank (EMBL Nucleotide Sequence Database) eingegeben und ist unter der Accession Nr. AJ508060 eingetragen.

```

FEATURES             Location/Qualifiers
    source             1..10946
                       /organism="Citrobacter freundii"
                       /mol_type="genomic DNA"
                       /strain="3009"
                       /db_xref="taxon:546"
    gene              49..603
                       /gene="fimA gene"
    CDS                49..603
                       /gene="fimA gene"
                       /codon_start=1
                       /transl_table=11
                       /product="major fimbrial subunit"
                       /protein_id="CAD56970.1"
                       /db_xref="GI:27525444"
                       /translation="MKRKLMTSSVIASLMLVAGAAVAADPVSVSGGTVHFEGELVNAA
CAVSTQSSDQVVTLGQYRTASFAAVGDTTAQIPFSIVLNDCDPKVAATAAVAFSGQSD
ITNNNLLAVTSADNGTTASGVGIEILDNTSTALKPDGATFSTAQALVEGTNTLRF SAR
YKATATSATPGQANADATFIMKYE"
    gene              711..1214
                       /gene="fimI gene"
    CDS                711..1214
                       /gene="fimI gene"
                       /codon_start=1
                       /transl_table=11
                       /product="fimbrial protein"
                       /protein_id="CAD56971.1"
                       /db_xref="GI:27525445"
                       /translation="MLCVLPVFAHTVILESGRLHLRGQLVNGACTVATDSQNLRVQMG
QYRTNAFSGTGSFASTSVPFSLRLTSCSSDVYDHVGIAFAGVTPAEDPQVFLASGDAS
AASGIGLALFDQRQRQIIPNALPLHYAPIITQEMTFHFTARYRAVSENITPGTLRS DV
WFTLVYP"
    gene              1256..1948
                       /gene="fimC gene"
    CDS                1256..1948
                       /gene="fimC gene"
                       /codon_start=1
                       /transl_table=11
                       /product="fimbrial chaperone protein"
                       /protein_id="CAD56972.1"

```

```

/db_xref="GI:27525446"
/translation="MFNYLKSGFILLFLFPVASVQAAGGIALGATRVIYPADAKQTS
LSISNSDTKERYLVNSWIENSAGVKEKSFVVTPLPFVSEPKSENTLR I IYAGVPLPKD
RESLFWMNVKAIPSVNKNLSLEGKNVLQLAILSR IKLFVRPNL PQIPEDAPGMLTF SR
SGNHLKINNPSAYYVTLVNLNVGKTKVDNVMVAPKSDAQVLLPTGVQGNVTFQTVNDY
GAVTPAQTVSVR"
gene      1957..4578
          /gene="fimD gene"
CDS      1957..4578
          /gene="fimD gene"
          /codon_start=1
          /transl_table=11
          /product="outer membrane usher protein"
          /protein_id="CAD56973.1"
          /db_xref="GI:27525447"
          /translation="MNKTTYFPGVTPPLAGVALSTLAALFPSLSHGESYFNPAF
LSADTATVADLSRFEKGNHQPEGVYRVDIWRNDEFVATQDIRFTTSAGKAGEKSGGLM
PCFGLDWVKRLGVNIAAFPALSKDANDTCINLPEAIPGSEIAFDFSTLRLNVSLPQAS
MLNSARGYIPPEEWDEGIPAALVNYSFTGSRGSDTDSYFLSMLSGLNYGPWRLRNNGA
WSYSKGDGYHSQSWKNIGTWLQRAI I PLKGELVMGDSNTGNDVFDVSVGFRGARLYSSD
SMYPDSLQGYAPTVRGIARTAAKLTIRQNGYVIYQSYVSPGAFSITDLNPTSSSGDLE
VTVDEKDG SQRYTVPYSTVPLLQREGRFKYD VVAGDFRSGNSQQSSPFFFQGTLIAG
LPEGYTAYGGTQLASRYTAVVLGTGRNLGDWGA VSVDLTHARSQLADDSTHQGQSLRF
LYAKSLNFGTNTFQLLGYRYSTRGFYTLDDVAYRSMEGYEYEDSEG NRHDVDPVKS Y
HNLSYSKGRFQINISQNLGDYGS LYVSGSQQTYWNTSDTNTWYQLGYASGWQGISYS
LSWSWNE SVGISDTRIVAFNMSIPFLLSGRRYSRDSAFDRTYATFNANRNSNGQNS
WQSGIGGTL DGRNLSYSVNQGHSS TNGYSGNASANWQAAYGTLGVGYNYDRDQHDYN
WQLSGGVVGHADGITLSQPLGDTNVL I KAPGAQGVRIENQ TGVQTDWRGYAVMPYATV
YRYNRVALD TNSMNNNTDVENNVSSVPTQ GALVRAAFDTRIGVRALITAKHAGKVPV
FGSIVRENTSGV TSMVGEDGQIYLSGLPLKGELLIQWGEGANARC VARYALPEESLKQ
AVTLTNTCESPTARQE"
gene      4583..5590
          /gene="fimH gene"
CDS      4583..5590
          /gene="fimH gene"
          /codon_start=1
          /transl_table=11
          /product="fimbrial adhesin subunit"
          /protein_id="CAD56974.1"
          /db_xref="GI:27525448"
          /translation="MKRQTGLLLGSALLLMAHSSWATVCHNSNGTPTDVFYDL SNVFN
SSNNQPGQVVTLP EKSGWIGVNATCPAGTSVNYTYRSYVTELPVQSTEGGFQYLK LND
YLLGAMSITDSYAGLFYPPRNYIRMGTHPNVSKQQPFGVMDSKLVFKLKVIRSF INMV
PIPRQTMFSVYVTTSTGDALSTPVYTI SYSGKVEVPQ NCEVNAGQIVEFDFGDIGASL
FSKAGAGNRPEGINPQTKTVAIKCTNVA AQAYLTMRVEAEKATGQMMVSDNPD LGFIV
ADSSGNPLTPNNLSSNIPFQLDDNAAARV GIRA WPVSVTGNKPTEGPFTARGYL RVDY
D"
gene      5625..6119
          /gene="fimF gene"
CDS      5625..6119
          /gene="fimF gene"
          /codon_start=1

```

```

/transl_table=11
/product="major fimbrial subunit"
/protein_id="CAD56975.1"
/db_xref="GI:27525449"
/translation="MVSLLTFFSSLGHASSSLGEINIELRGNVVDFTCAVIASDSNKSVE
ELGTWPTKQLQTSQDTPQVAFTLKLEGCPGASITFSGTPAPGTTLLALDDAVMAQ
KVAIELHSDRTRLPLEQASQAVGIDENGNATLTFANYIALADGVQPGVARADATFM
INYN"
gene      complement(6169..6801)
          /gene="fimZ gene"
CDS       complement(6169..6801)
          /gene="fimZ gene"
          /codon_start=1
          /transl_table=11
          /product="putative regulatory protein"
          /protein_id="CAD56976.1"
          /db_xref="GI:27525450"
          /translation="MKPASVIIMDEHPIVRMSIEVLLLEKNSNIQVVLKTDSDRTAIEH
LRTYPVDLVILDIELPGSDGFTLLKRIKSLQEKTRVFLFLSSKSESYAGRAIRAGANG
FVSKRKDLNDIYNAVKMILSGYSFFPSDTLNFINNINAQKGVLDNDMPLSNREVTVLRV
LANGLSNKEIAEQLLLSNKTISAHKANIYSKLGHTIVELIDYAKMHELM"
repeat_region 7031..8358
              /insertion_seq="IS10"
repeat_region 7031..7053
              /note="left terminal repeat"
              /rpt_type=INVERTED
              /rpt_type=TERMINAL
gene          7138..8346
              /gene="tnp"
CDS          7138..8346
              /gene="tnp"
              /note="part of IS10"
              /codon_start=1
              /transl_table=11
              /product="transposase"
              /protein_id="CAD56977.1"
              /db_xref="GI:27525451"
              /translation="MCELDILHDSLYQFCPELHLKRLNSLTLACHALLDCKTLTLTEL
GRNLPTKARTKHNIKRIDRLLGNRHLHKERLAVYRWHASFICSGNTMPIVLVDWSDIR
EQKRLMVLRSVALHGRSVTLYEKAFPLSEQSKKAHDQFLADLASILPSNTTPLIVS
DAGFKVPWYKSVEKLGWYLSRVRGKVQYADLGAENWKPI SNLHDMSSSHSKTLGYKR
LTKSNPISCQILLYKSRSKGRKNQRSTRTHCHHPSPKIYSASAKEPWVLTNLPVEIR
TPKQLVNIYSKRMQIEETFRLDKSPAYGLRLHRSRTSSSERFDIMLLIALMLQLTCWL
AGVHAQKQGWDKHFQANTVNRNRNVLSTVRLGMEVLRHSGYTTITRELLVAATLLAQN
LFTHGVALGKL"
repeat_region 8337..8358
              /note="right terminal repeat"
              /rpt_type=INVERTED
              /rpt_type=TERMINAL
gene          complement(8727..9449)
              /gene="fimY gene"
CDS          complement(8727..9449)

```

7. Anhang

```

        /gene="fimY gene"
        /codon_start=1
        /transl_table=11
        /product="regulatory protein"
        /protein_id="CAD56978.1"
        /db_xref="GI:27525452"
        /translation="MHSAKRRDRYRRIRNTNCTWQYPHCTSQVFDRLLEYLAQKLEYTL
PDDTISQAIITTDYILAYALSRHLFSGTRTAVFQSVESALPSMQEPVISQLVIDIESL
TLPYFDILERLRQLIRQRNDIQIFIMLSSRDEDLTTFFISLSGPFYILSHNLRLPEVRH
ALLSPVPDYIHSRRINQLDWEMIALLLQGNSLKKIALLQTQPYHRIIYRLNQLITRLG
LPSRQRFLHLIHRLNVTSLHLI"
gene      complement(9835..10428)
        /gene="fimW gene"
CDS       complement(9835..10428)
        /gene="fimW gene"
        /codon_start=1
        /transl_table=11
        /product="regulatory protein"
        /protein_id="CAD56979.1"
        /db_xref="GI:27525453"
        /translation="MLSIAIKEENSHFEHGLKIIISHLSNQWHQEICFLPVENIDRAD
IAFISLDEDWLSADCYQIPIHTRRQYRVVICNRNDKDKLMFRPCLYMLPLIYREDDVE
EMTKKLVPIQKRALRSNVPATICHYCTTRNFSVDERKFLMFLASGYTLAETAHLLSI
SDLQAKATRRGIMKKLHVKNQQFLRYIRAHLNLFQN"
gene      10682..10758
        /gene="tRNA-Arg"
tRNA      10682..10758
        /gene="tRNA-Arg"
        /product="tRNA-Arg"
        /note="codon recognized: AGA"
        /anticodon=(pos:10716..10718,aa:Arg)
BASE COUNT      2796 a    2546 c    2793 g    2811 t
ORIGIN

```

```

    1 gatcccgtag gatgctggag ccggatgtgt gtaattcaag ggaaatccat gaaacgtaaa
   61 ttaatgacct cttctgttat tgccagcctg atggttagtcg caggtgctgc ggttgtagcc
  121 gatccggtaa gcgtagagcgg ccggtactgtg cattttgaag gtgaactggt caatgcagcc
  181 tgtgcagtca gtactcagtc atccgatcag gttgtcacct taggccagta tcgtactgcc
  241 agttttgccg cagtaggtga tacaacggca caaattccgt tctccatcgt gctgaacgat
  301 tgtgatccga aagttgctgc aaccgcagcc gttgctttct ctggtcaatc cgatattacc
  361 aacaacaacc tgctggctgt cacttctgca gataacggta ccaactgccag cgggtgctggg
  421 attgaaattc tggacaatac gtccaccgcg ctgaagccag atggtgccac cttctctacc
  481 gctcaggctc tggtagaagg gaccaacacc ctgcgtttct ctgcgcgta caaagccact
  541 gccaccagcg ctacgcgggg tcaggcaaat gccgacgcga cgttcacatc gaagtacgaa
  601 taagccgttt tgatttgctc aaggatgacg ttcgcctcac tggatgaggc aatttcggg
  661 gatgatgaag gatgcggcag atgatagga aaggcgtggc gctggcggga atgctgtgctg
  721 tactgcctgt gtttgacat acggtaatac tggaaagtgg ccgccttcac ttacgggggc
  781 agctcgtcaa tgggtgcctgc acggctcgcta ctgacagcca aaatttgctg gtgcaaatgg
  841 ggcagtatcg caccaatgct ttctccggga cggggagctt tgctctacc agcgtgccgt
  901 tttcactgct cttaacgtca tgcagctccg atgtttatga ccacgttggg attgctgttg
  961 caggcgtgac gccagcggaa gatccgcagg tgttccttgc cagtggagat gcgtctgctg
 1021 cttcggggat cggcctggcg ttatttgacc agcgcacaac gcaattatt ccgaacgcgc

```

1081 tgccgcttca ttatgcccgg attataacgc aagagatgac gtttcatttc actgctcgtt
1141 atcgggctgt ctcgaaaat ataacgccgg gaacgcttcg ttcagacgtg tggtttacgt
1201 tggtttatcc ctgatttatt tccaacgat aatcacacca aaggatattg tagctatggt
1261 taattatcta aatcagggtt ttatcctttt actgttctta tttcctggtg ccagtggtca
1321 ggctgccgga ggcattgcat taggcgctac ccgtgttatt tatccagccg atgccaaaca
1381 aacgtcactg tctattagca atagtgatac caaagaacgt tacctggcca attcatggat
1441 tgagaatagc gcagggtgta aagaaaaatc gtttgtgggt acacctccgt tgtttgtcag
1501 cgagcccaaa agcgaaaaaca cgttgccgat tatctatgca ggtgttccgt tgcccaaaga
1561 tcgtgagtcg ctgttctgga tgaacgtaaa agccattccg tcagtcaata aaaacagcct
1621 tgagggcaaa aacgttctgc aactggcgat tctgtcccgc atcaagcttt tcgtccgtcc
1681 gaataatttg ccgcaaatcc cggagatgac cccgggggatg ctgacgtttt cccgttcagg
1741 caaccacctg aaaattaaca atccgtcagc gtattacgtc acgttgggtca atctcaacgt
1801 ggggaaaacg aaggtcgata acgtgatggt tgcaccgaaa agcgatgcgc aggttctggt
1861 gccaacaggc gtgcagggca acgttacggt ccagacggtc aatgattatg gcgctgtgac
1921 cccggcccaa acggttagcg tgcgttgaga taactgatga ataagacaac gtattttcct
1981 ggcctgtttc cgggggttac gccaccgctg gcgggggtgg cgttgtccac gctggcggcg
2041 ctctttccct cttaagcca tggtgaaagc tattttaatc cggccttttt atctgcggat
2101 acggcaaccg tggcggattt atcacgtttt gaaaaaggta atcaccagcc tgaagggtt
2161 tatcgcgtgg atatctggcg caatgatgag tttgtggcta ctcaggatat tcgttttacg
2221 accagcgcgg gaaaagccgg ggagaagtcc ggtgggctga tgccgtgttt tgggctcgac
2281 tgggtgaagc gccttggcgt caatatcgcc gcgtttccgg cactcagtaa ggatgcgaac
2341 gatacctgca tcaatctacc agaggcgatt ccaggcagcg agattgcgtt tgatttttct
2401 accctgcgac taaacgtcag cctgccgcag gcgtcgatgt taaacagcgc gcgtggctat
2461 attccaccgg aagagtggga tgaaggcatc ccggctgcgc tggttaacta cagtttcacc
2521 ggcagccgcg ggagtgatac ggacagctat ttcttaagta tgctcagtggt cctgaactat
2581 ggcccctggc gcttgagaaa taacggcgca tggagctatt ccaaagggtga cgggtatcac
2641 tcacaaagct ggaaaaacat cggcacatgg cttcagcgcg cgattatccc gctgaagggc
2701 gagctggtga tgggtgacag caacaccggc aacgacgttt ttgacagcgt cggatttcgc
2761 ggggcgcggc tctattcctc agacagtatg tatcccgaca gcttacaggg ctacgcgcct
2821 accgttcgcg gtattgcgcg aacagcggca aagctaacca ttcgtcagaa tggctatgtg
2881 atttatcaaa gctatgtttc accgggcgct ttctcgataa ccgatctcaa cccgacgtca
2941 tccagcgggtg accttgaggt gacggtggac gaaaaggacg gcagccaaca gcgctatacg
3001 gtgccgtact ccacggttcc cttgttacia cgagaagggc gtttcaaata tgacgtggtc
3061 gcaggggatt ttcgcagcgg caatagccaa caatcttctc cattcttttt ccagggaaaca
3121 ttaattgctg ggttaccaga aggtacacc gcttacggcg gtacgcagtt ggctcacgc
3181 tacagggcgg tggttttagg caccggccga aacctggggg actggggggc ggtttctgtc
3241 gatctgacct atgcccgcag ccaactggcg gatgacagta cacaccaggg gcagtcattg
3301 cgttttctat atgcgaaatc gctgaacaat tttggcacca actttcagtt gttgggatat
3361 cgctactcta cgcgtggttt ctataccctc gacgatgtgg cgtatcgag tatggaaggc
3421 tatgagtacg aatacgacag cgagggcaat cgccacgatg tgcccgatgt gaagagttac
3481 cacaacctga gctacagcaa aaagggccgt ttccagataa acatttcgca gaatctgggg
3541 gattacggat cgctgtatgt ctcggttagt cagcaaacgt actggaatac ctcagacacc
3601 aatacctggt atcaactggg ctatgccagc ggctggcaag gtattagcta ttcactctcc
3661 tggctcgtgga atgaatcggg tggcatctcc gacaccgacc gtattgtcgc gttcaatatg
3721 tcaataccgt tcagcctgct gagcggacgg cgtactcgc gagatagcgc cttcgatcgc
3781 acctacgcca cctttaatgc taaccgtaat agcaatggac aaaatagctg gcagagcggg
3841 atcggcggta cgttctggtg tggacgcaac ctgagctaca gcgtgaatca ggggcacagc
3901 agcaccaatg gctacagcgg aaacgccagt gccaaactggc aggcggccta tggcacgctg
3961 ggcgtgggat acaactacga tcgcgatcag catgactaca actggcaact ctctggcggc
4021 gtgggtgggg atgccgatgg cattacgctc agtcagcctc tgggtgatac caatgtgctg
4081 attaaagcgc ctggcgcaca ggggtgtgcgg atagaaaacc agaccggcgt tcaaaccgac
4141 tggcgtggat acgcggtgat gccgtatgcc accgtctatc gctataaccg tgtcgcgtta

4201 gacaccaact ccatgaacaa caataccgat gtggaaaata acgtcagcag cgtagtacca
 4261 acgcaagggg cgctgggtgcg agctgctgtt gatacacgaa tcgggtgtgcg ggcgctgatt
 4321 accgccaaac atgccggtaa acccgtgccg tttggctcta ttgtgcggga aaacaccagt
 4381 ggcgtgacca gtatgggtggg cgaagacggg caaatattatc tcagtgggtct gccgctaaaa
 4441 ggcgagttgc tgatccaatg gggggaaggg gcaaacgctc gctgcgtggc gcgctatgcc
 4501 ttgcctgagg agagtctgaa acaggcgggt acgctcacga acgtgacgtg cgaatctcca
 4561 acggcacgac aggaataata cgatgaaaag acaaacgggt ttgttactgg gaagcgcttt
 4621 actgctgatg gcacattcgt catgggagac ggtctgccat aactcgaatg gcacgccaac
 4681 ggatgttttt tacgatttgt cgaatgtctt taacagcagc aacaaccagc cgggacaggt
 4741 ggtaacgtta ccggaaaaat cgggctggat tggcgtgaat gccacctgtc cggccggaac
 4801 gtcggtgaat tacacctacc gaagctatgt cactgaactt ccggtgcaaa gtaccgaggg
 4861 cggttttcag tatctgaagc tcaatgacta cctgctggga gccatgagca tcaccgacag
 4921 ctatgccggg ttgtttttatc ctccgcgtaa ttatatccgc atggggactc accccaacgt
 4981 atcgaaacag cagccttttg gcgtaatgga ttcaaagctg gtgtttaaac tcaaagtgat
 5041 ccgctcgttt ataacatgg ttccgattcc gcgtcagacg atgttcagcg tctatgtcac
 5101 gaccagtacc ggagatgctc taagcacgcc ggtgtacacc atcagctaca gcggtaaggt
 5161 ggaggttcca caaaactgtg aggtgaacgc cgggcagatt gttgagtttg attttggcga
 5221 tattggcgca tcggtgttta gcaaggcggg ggcaggaaac cggcccgaag gcattaatcc
 5281 gcagacaaa accgtggcga taaaatgcac caacgtcgc gcacaggcct acttgaccat
 5341 gcgtgtagag gctgagaaaag ccaccggaca aatgatggtt tctgacaacc cggatttagg
 5401 ttttatcgtc gccgatagca gtggtaaccc gctgacgct aacaatttgt ccagcaatat
 5461 cccatttcaa ttggatgata acgccgcagc cagggtcgggt atccgggcat ggccggtcag
 5521 cgtgacgggg aataaaccta ccgaagggcc ttttacggct cgtggttatc tgcgagtgga
 5581 ttatgactaa caagcaaacg ccattcgcag gggcgttct ggcgatgggtg tcctgctaa
 5641 cattcagttc gttgggcat gcctcctcgt cgtcggggga aatcaatatt gagctcgtg
 5701 gcaacgtggt ggactttacc tgtgcggtga ttgccagcga cagcaataag tcggtggagt
 5761 tggggacctg gccgacaaag cagcttcaga ccagcggaga taccactcaa ccggtcgcgt
 5821 ttacgctgaa gcttgaaggt tgcccgcgg gatccgcac gataacgttt tccggtactc
 5881 cggctccggg cacgacgctg ttggcgttg atgatcgggt catggcaca aaggtggcga
 5941 ttgaactgca cgacagcgat cgtacgcgat taccgctcga acaggcagc caggccgtgg
 6001 ggattgatga gaacggcaat gccacgctga cctttttcgc caactatata gcgttagccg
 6061 atggagttca gcctggcgtc gccagggctg atgccacgtt tatgattaac tataattaat
 6121 caataagctg acaaaacgct cccgaacgac atctcgcgg gagtgttatt acattaactc
 6181 atgcattttt gcataatcga tcagctcaac gatggtgtgc aaccgcagct tggagttagat
 6241 attcgccttg tgagcgctaa tcgtttttatt gctgagtaac aactgttcag caatttcctt
 6301 attggacaga ccgtttgcca gataacgcaa aaccgtaacc tcgcggttag agagcggcat
 6361 gtcattcagc acaccttttt gtgcgtttat attgttaatg aaattaaggg tgtccgacgg
 6421 gaaaaagaa tatcccgata aaatcatttt tactgcattg tagatatcat tgagatcctt
 6481 tcgtttactg acaaaacat ttgcaccggc cgggatagca cggccggcat aaaaagactc
 6541 cgatttggaa gagagaaaca gcaccgagt tttctcctgc agagacttta ttctcttgag
 6601 taatgtaaat ccatccgaac caggtagttc aatatccagg atgacaagat cgaccgggta
 6661 tgtgagcagg tgttctattg ccgtacggct gtcgtcgggt ttcaatacta cctgaatatt
 6721 actgtttttc tcgagtagta cttctatcga cattctgaca ataggggtgt cgtccataat
 6781 gataacggat gctggtttca ttgttgatg cctcaaactg tttgcgtatc ttgcgaatth
 6841 gataaaacat caggcgttat aatattgtca aatagccaag aattgttctg cgggaaacc
 6901 gaataaata ttttcatcc ttgtttatcc ggttgttctt ctgcagaaca atgaatttgt
 6961 ggaaaatcca tttcacaccg ggaaaactaa caattaatca ggaaactgtg gggattatac
 7021 ctgctctggt ctgatgaatc ccctaataatg tttggtaaaa atcattaagt taaggtggat
 7081 acacatcttg tcatatgatc aaatggtttc gcgaaaaatc aataatcaga caacaagatg
 7141 tgcaactcga atattttaca cgactctctt taccaattct gccccgaatt aacttaaaa
 7201 cgactcaaca gcttaacgtt ggcttgccac gcattacttg actgtaaaac tctcactctt
 7261 accgaacttg gccgtaacct gccaaccaaa gcgagaacaa aacataacat caaacgaatc

7321 gaccgattgt taggtaatcg tcacctccac aaagagcgac tcgctgtata ccgttggcat
7381 gctagcttta tctgttcggg caatac gatg cccattgtac ttgttgactg gtctgatatt
7441 cgtgagcaaa aacgacttat ggtattgcga gcttcagtcg cactacacgg tcgttctggt
7501 actctttatg agaaagcggt cccgctttca gagcaatggt caaagaaagc tcatgaccaa
7561 tttctagccg accttgcgag cattctaccg agtaacacca caccgctcat tgtcagtgat
7621 gctggcttta aagtgccatg gtataaatcc gttgagaagc tgggttggtta ctggttaagt
7681 cgagtaagag gaaaagtaca atatgcagac ctaggagcgg aaaactggaa acctatcagc
7741 aacttacatg atatgtcatc tagtcactca aagactttag gctataagag gctgactaaa
7801 agcaatccaa tctcatgcca aattctattg tataaatctc gctctaaagg ccgaaaaaat
7861 cagcgctcga cacggactca ttgtcaccac ccgtcaccta aaatctactc agcgtcggca
7921 aaggagccat gggttctagc aactaactta cctggtgaaa ttcgaacacc caaacaactt
7981 gttaatatct attcgaagcg aatgcagatt gaagaaacct tccgagactt gaaaagtcct
8041 gcctacggac taggcctacg ccatagccga acgagcagct cagagcgttt tgatatcatg
8101 ctgctaateg ccctgatgct tcaactaaca tgttggcttg cgggcttca tgcctcagaaa
8161 caaggttggg acaagcactt ccaggctaac acagtcagaa atcgaaacgt actctcaaca
8221 gtctcgcttag gcatggaagt tttgcccgtat tctggctaca caataacaag ggaagactta
8281 ctctgtggctg caaccctact agctcaaaat ttattcacac atggttacgc tttggggaaa
8341 ttatgagggg atctctcagt gctctgttct ttcggaaaag acttacaaca tcccgttgt
8401 taatgtcagt taggatattc tgaagatcc agatgtggtta atgactattg gtagtattta
8461 tctgcagttc gaattatggc agattgaaaa ttttttttaa atagtaaaaa cgatacaata
8521 aaccaattgt ttaggttttg ttaagactgc aattaggtt ttttatattg aaatgcacag
8581 aatcagtaag gttaagtgtg acagtgccac caggcataat accaggaata gttgtaata
8641 ttaaatatth gtaaaaatta gatctttttt cttattcaag aataagtagt ttcttaaaaa
8701 atcttatcgc acataggggt atggtgttaa attaaatgaa gagaggtaac gttgagggcg
8761 tgtatcagat gcaaaaagcg ttgtctgctg ggtaacccca ggcgcgtaat caattgggtc
8821 agtcgataga tgatacggtg gtagggttgt gtttgtaaca atgcaatctt ttttaaggag
8881 ttaccttgta aaagtaaggc aatcatctcc caatcgagct gatttatgcy tctggaatga
8941 atatagtcag gaaccggcga taataaggcg tgacgcacct ccggaaggcg taaattgtgt
9001 gataggatat aaaatggacc ggatagtga ataaaggtag tcaggcttc atcacgactg
9061 gaaagcatta tgaagatctg gatgtcatta cgctgcctaa ttagctggcg caaacgttca
9121 agtatatcga aataggggag tgttaagctt tctatgtcaa tcaactactg gctaattact
9181 ggttcttgca tgctgggtaa ggccgactca acgctctgga agaccgccgt acgtgtgctt
9241 gagaataaat gtcgacttaa cgcgtaggccc aggtagtagt ctggtgtaat tatcgcctga
9301 gatatagtgt cgtccggtaa tgtgtattcg agtttttgcy ccagatactc gagccgggtca
9361 aatacttgtg aggtacagtg gggatattgc caggtacagt tagtgtttcg tatgcggcga
9421 tagcgggtccc ggcgttttgc gctgtgcate cttttccatt ccatctctgt tgcggcaggt
9481 ctggataaat tgctgactat aaacatccct gacccaaatt tttgccagcy taaaggtaaa
9541 tgcctttgtg ccgttgggtt tcagacttc aacaatcacc agactggcaa ttgcgtatcc
9601 catcagaata atctgcccga agttttctga tgtcttactc aatgcccгаа agatcgtttt
9661 atccagttca acctctctct gatattagat aaaatattac cgggtgtgtc tttctgttac
9721 cccggaata gtatggctgg attattctgg caggcagagg ataggtaacag taggagtcga
9781 tacttaateg aggatgagat atttctcaat aaaaattagg cagagatacc ccgtctaatt
9841 ttgtagaaaa ttcagatggg cgcggatgta tcttaagaat tgctgatcgt ttttcacatg
9901 cagctttttc attatgccgc ggcgggtcgc tttggcctga agatcgttta ttgagagtaa
9961 gtgagccgtt tcggctaagg tatatccgct ggcgagaaac attaagaact tgcgttcgct
10021 gacagaaaag ttgcccggtag tgcagtaatg gcagatagtt gcaggcaagt tgctgcgcag
10081 cgcagttttt tgcaggatgg ggactaattt tttagtcatt tctcaacgt catcttcccg
10141 atagatcagc ggcaacatgt acaggcaggg ccggaacatc agcttatctt tatcatttct
10201 gttgcagatg acaaccgggt attggcggcg ggtatggatc ggaatctgat agcaatcggc
10261 gctgagccaa tcttcatcca gggagataaa tgcgatgtca gcgcgatcga tattctcgac
10321 aggtaaaaag cagatctcct gatgccactg atttgacaga tgggagatga tgattttcag
10381 tccatgttcg aagtgactgt tttcttctt gatggcgata cttaacatta aagagttcct

10441 gaaccactgg aggggtaagg gaatgttaag caaaatcata aatattctaa atacatgtat
 10501 ccttaaactct ggcgtttcgt gggctgagtt gttaccaggt gatttctctgg atacccttga
 10561 acaagcagaa aaaatcaaca ttcgtacact tcgccagcaa ctgaaataaa aggcattgac
 10621 tcagcaggcg ctgaccgtat aattcacgcyg tttcatctgc atgaagtaat cacttcgcaa
 10681 tgcgccctta gctcagttgg atagagcaac ggccttctaa gccgtaggtc gtaggttcga
 10741 atcctacagg gcggtaccatt caaagttagt ccctatgctc agcttcaacg caccgttacg
 10801 cgcgggacgg tttttctgct tccagccaac gttctacctc ataaagactt tgttggatct
 10861 cctctctgag tgaaaaatca cccaacggct gctgttcaag tgctgcacac atcgtgctgg
 10921 ctgagcgcat tcccatgctg gcgcag

7.2.2 IS1 in *fim_{Cf}A* von Plasmid pPH24

1 TCCGAAAGTT GCTGCAACCG CAGCCGTTGC TTTCTCTGGT CAATCCGATA
 51 TTACCAACAA CAACCTGCTG GCTGTCACCT CTGCAGATAA CGGTACCACG
 101 **GTAATGACTC** **CAACTT**ATTG ATAGTGTTTT ATG TTCAGAT AATGCCCGAT
 151 GACTTTGTCA TGCAGCTCCA CCGATTTTGA GAACGACAGC GACTTCCGTC
 201 CCAGCCGTGC CAGGTGCTGC CTCAGATTCA GGTTATGCCG CTCAATTCGC
 251 TGCATATATC GCTTGCTGAT TACGTGCAGC TTTCCCTTCA GCGGGGATTC
 301 ATACAGCGGC CAGCCATCCG TCATCCATAT CACCACGTCA AAGGGTGACA
 351 GCAGGCTCAT AAGACGCCCC AGCGTCGCCA TAGTGCGTTC ACCGAATACG
 401 TGCGCAACAA CCGTCTTCCG GAGACTGTCA TACGCGTAAA ACAGCGCAGG
 451 CTGGCGCGAT TTAGCCCCGA CATAGCCCCA CTGTTTCGTCC ATTTCCGCGC
 501 AGACGATGAC GTCACTGCCC GGCTGTATGC GCGAGGTTAC CGACTGCGGC
 551 CTGAGTTTTT TAAGTGACGT AAAATCGTGT TGAGGCCAAC GCCCATAATG
 601 CGGGCTGTTG CCCGGCATCC AACGCCATTC ATGGCCATAT CAATGATTTT
 651 CTGGTGCGTA CCGGGTTGAG AAGCGGTGTA AGTGAAGTGC AGTTGCCATG
 701 TTTTACGGCA GTGAGAGCAG AGATAGCGCT GATGTCCGGC GGTGCTTTTG
 751 CCGTTACGCA CCACCCCGTC AGTAGCTGAA CAGGAGGGAC AGCTGATAGA
 801 AACAGAAGCC ACTGGAGCAC CTCAAAAACA CCATCATAACA CTAAATCAGT
 851 **AAGTTGGCAG** **CATCACC****CGG** **TACCAC**TGCC AGCGGTGTCG GGATTGAAAT
 901 TCTGGACAAT ACGTCCACCG CGCTGAAGCC AGATGGTGCC ACCTTCTCTA
 951 CCGCTCAGGC TCTGGTAGAA GGGACCAACA CCCTGCGTTT CTCTGCGCGT
 1001 TACAAAGCCA CTGCCACCAG CGCTACGCCG GGTCAGGCAA ATGCCGACGC
 1051 GACGTTTCATC ATGAAGTACG **AATAA**

- *Pst*I Schnittstelle
- flankierende IR
- direkte Sequenzverdopplung am Integrationsort
- Stoppcodon *fim_{Cf}A*

7.2.3 IS1 in der *fim* Deletionsstelle der uropathogenen Patientinnen-Isolate Nr. 1-6

Das mit dem Primerpaar ECnogene1/ECgntP2 amplifizierte PCR-Produkt wurde in den Vektor pGEM T-Easy ligiert und anschließend mit den Primern M13Uni und M13Reverse, die jeweils im Vektor binden, sowie mit den Primern ECinsB1 und ECfimH4 sequenziert.

```

1  ACTCAAGCTA TGCATCCAAC GCGTTGGGAG CTCTCCCATA TGGTCGACCT
51  GCAGGCGGCC GCGAATTCAC TAGTGATAGG TTTGTGGCTT GTAAGTGGTC
101 ACTTCTGAAG TCGATCTGGA GAGGCTTGTT GATGTTGGTG TTTTCAGGGT
151 GATGCTTCAC TTAGTTTGTG TGCCGTATCG CCCGGCGAAC AGCTGTGATT
201 GAGGAAGGTT TAAGTCGTAG TGACCAAAGC TATATTTACC AACGGATGCA
251 GATGAAAAAA TCGTTTCCTG CTTTCCCCCA TATCTCCATG ATAAAAAGGA
301 ATGTAACAAT CTCATGGTCT AACTGACGA ACCAGCAGGA ATAATAGCTA
351 GGGACCTAAG AATTAGCATG ATAATAGCCA CTAAGAAATT ACTGCGTTCC
401 ATGAAATAGC CATTTTGTGG GAAATGGAGT TGACTAATAA TGTCATATGT
451 GAGACGGCTA GTTGAGCGAA TATTAAATTT TGCTGAATTT TTTATGTTGA
501 TTTTACTTGT TACAGAACAT ATCACATGAT ATATAGATAA GATTAGTTGG
551 GTAATGACTC CAACTTATTG ATAGTGTTTT ATGTTTCAGAT AATGCCCGAT
601 GACTTTGTCA TGCAGCTCCA CCGATTTTGA GAACGACAGC GACTTCCGTC
651 CCAGCCGTGC CAGGTGCTGC CTCAGATTCA GGTTATGCCG CTCAATTCGC
701 TCGGTATATC GCTTGCTGAT TACGTGCAGC TTTCCCTTCA GGCGGGATTC
751 ATACAGCGGC CAGCCATCCG TCATCCATAT CACCACGTCA AAGGGTGACA
801 GCAGGCTCAT AAGACGCCCC AGCGTCGCCA TAGTGCGTTC ACCGAATACG
851 TGCGCAACAA CCGTCTTCCG GAGACTGTCA TACGCGTAAA ACAGCCAGCG
901 CTGGCGCGAT TTAGCCCCGA CATAGCCCCA CTGTTTCGTCC ATTTCCGCGC
951 AGACGATGAC GTCACTGCCC GGCTGTATGC GCGAGGTTAC CGACTGCGGC
1001 CTGAGTTTTT TAAGTGACGT AAAATCGTGT TGAGGCCAAC GCCCATAATG
1051 CGGGCTGTTG CCCGGCATCC AACGCCATTC ATGGCCATAT CAATGATTTT
1101 CTGGTGCGTA CCGGGTTGAG AAGCGGTGTA AGTGAAGTGC AGTTGCCATG
1151 TTTTACGGCA GTGAGAGCAG AGATAGCGCT GATGTCCGGC GGTGCTTTTG
1201 CCGTTACGCA CCACCCCGTC AGTAGCTGAA CAGGAGGGAC AGCTGATAGA
1251 AACAGAAGCC ACTGGAGCAC CTCAAAAACA CCATCATAA CTAAATCAGT
1301 AAGTTGGCAG CATCACCAG TTGACGCGCA ACGGTACGAT TATTCCAGCG
1351 AATAACACGG TATCGTTAGG AGCAGTAGGG ACTTCGGCGG TGAGTCTGGG
1401 ATTAACGGCA AATATATGCAC GTACCGGAGG GCAGGTGACT GCAGGGAATG
1451 TGCAATCGAT TATTGGCGTG ACTTTTGTTT ATCAATAAAG AAATCACAGG
1501 GCATTGCTAA TGCAGGTACG CAATATTACC TGAAGCTAAA AACCTGCACG
1551 TTAGCCCTTT GTAGGCCAGA TAAGACGCGT CAGCGTCGCA TCTGGCATAA
1601 ACAAAGCGCA CTTTGC CGAC AATCCGAACA GAGCCCGCCA TTGGCAGGCT
1651 CTGGTGTCTT TTTACGCTAC CATGCTAATA ATCAACACAA TAATCAGCCC

```

```

1701 AACCACGGAG TTGACCAGCT CCAGCAGTCC CCAGGTTTTTC AACGTGTCTT
1751 TTACCGACAG GTCAAAGTAA CCTTTGAACA GCCAGAATGA GGCATCATT
1801 ATGTGGGTGA GGGTGTGGA ACCCGCAGCC GTCGCCAGTA CCAGCAGCGC
1851 CGGATTCACG CCAACCAGCT GACCGGTTGC TGGATCAAGG ATTGCAGCAC
1901 TGATAATCCC GGCGGCGGTC ATCGCCGAAA CGACACCCTG ACCCGTCCGC
1951 AGACGAATTA GCACAGTGAT CAGCCATGCC ATAATGTAGG GCGAGATATT
2001 GCCGTGGGAC ATCAACATGC CGAAATCGAA TTCCCGCGGC CGCCATGGCG
2051 GCCGGGAGCA TGCGACGTCG GGCCCAATTC GCCC

```

- Primer ECnogene1 (79-100), ECinsB1 (663-680), ECfimH4 (1431-1414), ECgntP1 (1732-1713), ECgntP2 (2023-2004)
- flankierende IR
- 3'-Ende von *fim_{Ec}H*
- repetitive Sequenz (repetitive extragenic palindromic element)
- inserierte, K12 fremde Basenfolge
- Stoppcodon *gntP*

7.3 Sequenzvergleich der *fim* Gencluster von *C. freundii*, *S. typhimurium* und *E. coli*

Die DNA Sequenzen sowie die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen der *fim* Gencluster von *C. freundii*, *S. typhimurium* und *E. coli* wurden mit Hilfe des Programmes ClustalW Multiple Sequence Alignment (BCM Search Launcher) miteinander verglichen.

FimA

```

S.t. 1 -MRHKLMTSTIASLMFVAGAAVAADPTPVSVSGGTIHFEGKLVNAACAVSTKSADQTVTL
C.f. 1 MKRKLMTSSVIAASLMLVAGAAVAADP--VSVSGGTVHFEGELVNAACAVSTQSSDQVVTL
E.c. 1 MKIKTLAIIVLSALSLSSTAALAAAT---TVNGGTVHFKEVVNAACAVDAGSVDQTVQL

S.t. 60 GQYRTASFTIAGNTTAQVPFSIVLNDCPKVAANA AVAFSGQADNTNPNLLAVSSADNST
C.f. 59 GQYRTASFAAVGDTTAQIPFSIVLNDCPKVAATA AVAFSGQSDITNNLLAVTSADNGT
E.c. 58 GQVRTASLAQEGATSSAVGFNIQLNDCDTNVASKAAVAFLGTAIDAGHTNVLLALQSSAAG

S.t. 120 TATGVGIEILDNTSSPLKPDGATFSAKQSLVEGTNTRLRFTARYKATAAATTPGQANADAT
C.f. 119 TASGVGIEILDNTSTALKPDGATFSTAQALVEGTNTRLRFSARYKATATSATPGQANADAT
E.c. 118 SATNVGVQILDRTGAALTLDGATFSSETLLNNGTNTIPFQARYFATG-AATPGAANADAT

S.t. 180 FIMKYE
C.f. 179 FIMKYE
E.c. 177 FKVQYQ

```

FimC

S.t. 1 -----MLNSIKVGFIVLLTLFTSLNVQAAG----GIALGATRVIYPSAAKQTSLAISN
 C.f. 1 -----MFNYLKS GFILLFLFPVASVQAAG----GIALGATRVIYPADAKQTSLSISN
 E.c. 1 VSNKNVNVRKSEITFCLLAGILMFMMAMVAGRAEAGVALGATRVIYPAGQKQEQQLAVIN

S.t. 50 SDTQERYLVNSWIENNAGQKEKTFIVTPPLFVSEPKSENTLRRIYAG-QPLPGDRESLFW
 C.f. 50 SDTKERYLVNSWIENSAGVKEKSFVVTPLFVSEPKSENTLRRIYAG-VPLPKDRESLFW
 E.c. 61 NDENSTYLIQSWVENADGVKDRFIVTPPLFAMKGGKENTLRILDATNNQLPQDRESLFW

S.t. 109 MNVKAIPSVDKSHIEGKNVLQLAAILSRIKLFVRPANLPQTPEDAPTLKFSRVGNHLKIT
 C.f. 109 MNVKAIPSVNKNLSLEGKNVLQLAAILSRIKLFVRPNLNPQIPEDAPGMLTFSRSGNHLKIN
 E.c. 121 MNVKAIPSMDKSKLIT-ENTLQLAII SRIKLYRPAKIALPDDQAAEKLRFRRSANSITLI

S.t. 169 NPSAYYLTLVNISVGAKKIDNVMIAPKSDMQIPLPTGAQGNVTFQSVNDYGALTSATFAS
 C.f. 169 NPSAYYVTLVNLNVGKTKVDNVMVAPKSDAQVLLPTGVQGNVTFQTVNDYGAVTPAQTVS
 E.c. 180 NPTPYYLTVTELNAGTRVLENALVPPMGESTVKLPSDAGSNITYRTINDYGALTPKMTGV

S.t. 229 LG
 C.f. 229 VR
 E.c. 240 ME

FimD

S.t. 1 -----MKKTTWFAGRFPGYVSPVLSVALSVLAALCPLTSRGESEYFNPAFLSADTAS
 C.f. 1 -----MNKTTYFPGLFPGVTPPLAGVALSTLAALFPLSLSHGESYFNPAFLSADTAT
 E.c. 1 MSYLNLRLYQRNTQCLHIRKHRLAGFFVRLVVAACAFAAQAPLSSADLYFNPRFLADDPQA

S.t. 52 VADLSRFEEKGNHQPPGIYRVDIWRNDEFVATQDIRFEAGAVGTGDKSGGLMPCFTPEWIK
 C.f. 52 VADLSRFEEKGNHQPEGVYRVDIWRNDEFVATQDIRFTTSAGKAGEKSGGLMPCFGLDWVK
 E.c. 61 VADLSRFENGQELPPGTIRVDIYLNNGYMATRDVTFNT-----GDSEQGI VPCLTTRAQLA

S.t. 112 RLGVNIAAFPVSDKGVDTTCIHLPEKIPGAEVAFDFASMRNLNLSLPQASILNSARGYIPP
 C.f. 112 RLGVNIAAFPALSKDANDTCINLPEAIPGSEIAFDFSTLRNLVSLPQASMLNSARGYIPP
 E.c. 116 SMGLNTASVAGMNLADACVPLTTMVQDATAHLDVCGQRLNLTIPQAFMSNRARGYIPP

S.t. 172 EEWDEGIPAALINYSFTGS-----RGTDSDSYFLSLLSGLNYGPWRLRNNGAWNYSKGD-
 C.f. 172 EEWDEGIPAALVNYSFTGS-----RGSDDSYFLSMLSGLNYGPWRLRNNGAWSYKGD-
 E.c. 176 ELWDPGINAGLLNYNFSGNSVQNRIGGNSHYAYLNLQSGLNIGAWRLRDNTTWSYNSDDR

S.t. 226 -GYHSQRWNNIGTWVQRAIIPKSELVMGDSNTGNDVFDSEGFGRGARLYSSDNMYPDSLQ
 C.f. 226 -GYHSQSWKNIGTWLQRAIIPKSELVMGDSNTGNDVFDSEGFGRGARLYSSDNMYPDSLQ
 E.c. 236 SSGSKNKWQHINTWLERDIIPLRSLTLGDGYTQGDIFDGINFRGAQLASDDNMLPDSLQ

S.t. 285 GYAPTVRGIARTAAKLTIRQNGYVIYQSYVSPGAFATIDLNPTSSSGDLEVTVDKDGSO
 C.f. 285 GYAPTVRGIARTAAKLTIRQNGYVIYQSYVSPGAFSITIDLNPTSSSGDLEVTVDKDGSO
 E.c. 296 GFAPVIHGIARGTAQVTIKQNGYDIYNSTVPPGPFITINDIYAAGNSGDLOVTIKEADGST

S.t. 345 QRYTVPYSTVPLLQREARVKYDLVAGDFRSGNSQQSSPFFFQGTVIAGLPAGLITAYGGTQ
 C.f. 345 QRYTVPYSTVPLLQREGRFKYDVVAGDFRSGNSQQSSPFFFQGTTLIAGLPAGLITAYGGTQ
 E.c. 356 QIFTVPYSSVPLLQREGHTRYISITAGEYRSGNAQQEKTRFFQSTLHGLPAGWITAYGGTQ

S.t. 405 LADRYRAVVVGAGRNLGDWGAVSVDVTHARSQ LADDSTHQGQSLRFLYAKSLNNGTNTFQ
 C.f. 405 LASRYTAVVLGTGRNLGDWGAVSVDLTHARSQ LADDSTHQGQSLRFLYAKSLNNGTNTFQ
 E.c. 416 LADRYRAFNFVGIKKNMGALGALSVDMTQANSTLPPDSDQHDGQSVRFLYLNKSLNESGNTIQ

S.t. 465 LLGYRYSTRGFYTLDDVAYRSMEGYDYEYDSGRRHKVPVAQSYHNLRYSKKGRFQVNIIS
 C.f. 465 LLGYRYSTRGFYTLDDVAYRSMEGYEYDYSEGNRHDVDPVKSYPHNLRYSKKGRFQVNIIS
 E.c. 476 LVGYRYSTSGYFNFAADTTYSRMNGYNIET-QDQVIQVKPKFTDYNNLAYNKRKGLQLTIVT

S.t. 525 QNLGDYGSYLXSGSQQNYWNTADTNTWYQLGYASGWQGISYSLSWSWSESVGS SSGADRIL
 C.f. 525 QNLGDYGSYLXSGSQQTYWNTSDTNTWYQLGYASGWQGISYSLSWSWSESVGISDTDRIV
 E.c. 535 QQLGRTSTLYLXSGSHQTYWGTSNVDEQFQAGLNTAFEDINWTLXSYSLTKNAWQKGRDQML

S.t. 585 AFNMSVPFSLITGRRYARDTILDRTYATFNANRNRDGDNSWQTGVGGTLEGRNLSYSVT
C.f. 585 AFNMSIPFSLISGRRYSRDSAFDRTYATFNANRNSNGQNSWQSGTGGTLLDGRNLSYSVN
E.c. 595 ALNVNIPFSHWLRS--DSKSQWRHASASYSMSHDLNGRMTNLAGVYGTLLDNNLSYSVQ

S.t. 645 QGRSS----SNGYSGSASASWQATYGTLVGVYNYDRDQHDYNWQLSGGVVGHADGITFSQ
C.f. 645 QGHSS----TNGYSGNASANWQAAAYGTLVGVYNYDRDQHDYNWQLSGGVVGHADGITLSQ
E.c. 653 TGYAGGGDGNSGSTGYATLNRYGGYGNANTIGYSHSDDIKQLYYGVSGGVLAHANGVTLGQ

S.t. 701 PLGDTNVLKAPGAKGVRIENQTVKTDWRGYAVMPYATVYRYNRVALDTNTMDNHTDVE
C.f. 701 PLGDTNVLKAPGAQGVRIENQTVQTDWRGYAVMPYATVYRYNRVALDTNSMNNNTDVE
E.c. 713 PLNDTVVLVKAPGAKDAKVENQTVGRVTDWRGYAVLPHYATEYRENVALDTNTLADNVLDL

S.t. 761 NNVSSVVPTEGALVRAAFDTRIGVRAIITARLGGPPLPFGAIVRETASGITSMVGDGQI
C.f. 761 NNVSSVVPTEGALVRAAFDTRIGVRALITAKHAGKVPFGSIVRENTISGVTSMVGEDGQI
E.c. 773 NAVANVVPTRGATVRAEFKARVGIKLLMLTLTHNNKPLPFGAMVTSESSQSSGIVADNGQV

S.t. 821 YLSGLPLKGELFIQWGEKGNARCIAPYALAEDSLKQAITIASATCIRPAS---
C.f. 821 YLSGLPLKGEILLIQWGEKANARCVARYALPEESLKQAVTLLTNVTCESEPTARQE
E.c. 833 YLSGMPLAGKVQVKWGEENAHCVANVQLPPESQQQLLTQLSAECCR-----

FimF

S.t. 1 MILRFVFIATGCVLFSPLSQANSSSLGEVNIELRGNVVDFTCAVVAGDSNKSVINLGTWPTK
C.f. 1 -----MVSLLTFSSLGHASSSLGEINIELRGNVVDFTCAVIASDSNKSVELGTWPTK
E.c. 1 ---MRNKPFYLLCAFLWLAVSHALAADSTITIRGYVRDNGCSVAAESTNFTVLDLMENAAK

S.t. 61 QLHAAGDATQPVAFSLKLEGCPPGSASITFSGTPAPG---TALLALADTAMAOK-LATEI
C.f. 53 QLQTSGDTTQPVAFILKLEGCPPGSASITFSGTPAPG---TLLALDDAVMAOK-VAIEL
E.c. 58 QFNNICATTPVVPFRILLSPCGNAVSAVKVGFTGVADSHNANLLALENTVSAASGLGIQL

S.t. 117 RDGDQRRRLPLEQASKAVDIDNNGN---ATLKFYANYIALADGVQPGLANADATFLINYN
C.f. 109 HSDRTRLPLEQASQAVGIDENGN---ATLTFYANYIALADGVQPGVARADATFMINYN
E.c. 118 LNEQQNQIPLNAPSSALSWTTLTPGKPNLTFYARLMATQVPVVTAGHINATATFTLEYQ

FimH

S.t. 1 MKIYSALLLAGTALFFTHPALATVCRNSNGTATDIFYDLSDVFTISGNNQPGQVVTLEPKS
C.f. 1 MKRQTGLLLGSALLLMAHSSWATVCHNSNGTPTDVFYDLSNVFNSSNNQPGQVVTLEPKS
E.c. 1 -MKRVITLFAVLLMGWSVNAWSFACKTANGTAIPIGGGSANVY---VNLAPVVNVGQNLV

S.t. 61 AWVGVNATCPAGTTVNYTYRSYVSELPVQSTEGNFKYLKLNLYLLGAMSI TDSVAGVSYF
C.f. 61 GWVGVNATCPAGTSVNYTYRSYVTELPVQSTEGGFQYLKLNLYLLGAMSI TDSYAGLFFYP
E.c. 57 VDLSTQIFCHN--DYPEITIDYVTLQSGSAYGG-----VLSNFSCTVKYSGSSYP

S.t. 121 PRNYILMGVDYNVSQKPFQVQDSKLVFKLKVIRPFINMVTIPRQTMFTVYVTTSTGDAL
C.f. 121 PRNYIRMGTHPNVSKQPFQVQDSKLVFKLKVIRSFINMVTIPRQTMFSVYVTTSTGDAL
E.c. 105 -----FPITTS---ETPRVVYNSRTDKPWPVALYLT----PVSSAGGVAIKAGSLIAV

S.t. 181 STPVYTISYSG-KVEVPQNCENVAGQVVEFDGDFGASLFSQAGAGNRPQGVTPQTKTIA
C.f. 181 STPVYTISYSG-KVEVPQNCENVAGQIVEFDGDFGASLFSKAGAGNRPEGINPQTKTVA
E.c. 150 LILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNVVDVPTGGCDVSARDVIVTLP--DYPGSPVPIPLTVY

S.t. 240 IKCTNVAAQAYLSMRLEAEKASQAMVSDNPD LGFVAVANSNGTPLTPNNLSSKIPFHLDD
C.f. 240 IKCTNVAAQAYLTMRVEAEKATGQMMVSDNPD LGFIVADSSGNPLTPNNLSSNIPFQLDD
E.c. 208 CAKSONLGYYSGLTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIPANN--TVSLGAVG

S.t. 300 NAAARVGIRAWPISVTGIKPAEGPFTARGYL RVDYD
C.f. 300 NAAARVGIRAWPVSVTGNKPTGEPFTARGYL RVDYD
E.c. 266 TSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQ-

FimI

S.t. 1 -----MSPVIAHA-----
 C.f. 1 -----MLCVLPVFAHT-----
 E.c. 1 VLLMRMRPSRFSINNLPRFRDVTIGRDAHPCAIKITMKRKRFLFLIASLLPMPFALAGNKWN

S.t. 9 VMVESGRVHLRGQLVNGGCAVATESQNLRVLMGQYRTNAFTGPGSFAPVSVPFSLRLIISC
 C.f. 12 VILESGRLHLRGQLVNGACTVATDSQNLRVOMGQYRTNAFSGTGSFASTSVPFSLRLITSC
 E.c. 61 TTLPGGNMQFQGVIIAETCRIEAGDKQMTVNMGOISSNRFHAVG-EDSAPVPEVLIHLREC

S.t. 69 SAEVWRHVGIAGVTPAEDPHVFLASGEGIGNAGIGLALFDQQORQIIPNLLPLHYTPPI
 C.f. 72 SSDVYDHVGIAGVTPAEDPQVFLASGDASAASGIGLALFDQRORQIIPNALPLHYAPI
 E.c. 120 STVVSERVGVAFHGVADGKNPDVLSVGEVPGIATNIGVALFDDEGNLVPINRPPANWKRI

S.t. 129 LTSEMTLHFTARYRAISENMTPGRIHSEVWFTLVYP
 C.f. 132 ITQEMTFHFTARYRAVSENIITPGTLRSDVWFTLVYP
 E.c. 180 YSGSTSLHFTAKYRATGRRVTGCIANAQAWFSLTYQ

FimW

S.t. 1 MLRIAIKEQNSHFEHGLKIIIMTRLANQWQOKIDFLPPEEIDNADIAFIALDDDWFSAGCY
 C.f. 1 MLSTAIKEENSHFEHGLKIIISHLSNQWHQEIICFLPVENIDRADIAFISLDEDWLSADCY

S.t. 61 QIPMHTQHQLRAIICNKCDKEKLMFRPCLYMLPHIYREDDVEEITRKMILITLHKRALRHS
 C.f. 61 QIPIHTRRQYRVVICNRNDKDKLMFRPCLYMLPLIYREDDVEEMTKKLVPILOKRALRSN

S.t. 121 VPSGICHYCTTRHFSVTERHLKLIASGYHLSETAALLSLSEEQTKSLRRSITMRKLVKTI
 C.f. 121 VPATICHYCTTRNFVSDERKFLMFLASGYTLAETAHLLSISDLQAKATRRTGIMKLVKVN

S.t. 181 EQQFLKYIRVNLHFLLSK
 C.f. 181 DQQFLRYIRAHNLNQLN-

FimY

S.t. 1 MRSVPRRERHRRLRNAKDCACRYHSPTQIFDRLELLNQQLNYALPVGITISQAIITTDNY
 C.f. 1 MHSAKRRDRYRIRNTN-CTWQYPHCTSQVDFDRLEYLAQKLEYTLPDDTISQAIITTDYY

S.t. 61 LGYSLSHYLFSGKRRTAAFRSLDDISLWIEKGSRLQIIVDMEALPVSCIEALNQLRALSWQ
 C.f. 60 LAYALSRHLFSGTRTAVFQSVESALPSMQEPVISQLVIDIESLTLPYFDILERLRLQIRQ

S.t. 121 QSDIQIYLLVSDKTSAITQFIRMAGRFFVLSRRQNLASVREALLSASKPRISES-FSRTD
 C.f. 120 RNDIQIFIMLSSRDEDLITTFISLSGPFYILSHNLRLEPEVRHALLSPVPDYIHSRRINQLD

S.t. 180 WLMIETLAQGASLKEIARQQSVPYHRVVYRLKQLITLNLPHRQSFRLRIQQLNVTFHDIT
 C.f. 180 WEMIALLLQGNLKKIALLQTPYHRIIYRLNQLITRILGLPSRQRFLLHLIHRNLNVTSLHL

S.t. 240 F
 C.f. 240 I

FimZ

S.t. 1 MKPASVIIMDEHPIVRMSIEVLLGKNSNIQVVLKTDDSRTAIEYLRTPVDLVILDIELP
 C.f. 1 MKPASVIIMDEHPIVRMSIEVLLGKNSNIQVVLKTDDSRTAIEHLRTPVDLVILDIELP

S.t. 61 GTDGFLLKRIKSIQEHTRILFLSSKSEAFYAGRAIRAGANGFVSKRKDLNDIYNAVKMI
 C.f. 61 GSDGFLLKRIKSLQEKTRVFLFLSSKSESFYAGRAIRAGANGFVSKRKDLNDIYNAVKMI

S.t. 121 LSGYSFFPSETLNFISNTRTPKGGHDMPLSNREVTVLRYLANGMSNKEIAEQLLLSNKT
 C.f. 121 LSGYSFFPSETLNFINNINAQKGVLDNMDPLSNREVTVLRYLANGLSNKEIAEQLLLSNKT

S.t. 181 ISAHKANIFSKLGLHSIVELIDYAKSHELL
 C.f. 181 ISAHKANIYSKLGLHTIVELIDYAKMHELM

fimA

S.t. 1 ATGAGACATAAATTAATGACCTCTA-CT---ATTGC-GAGTCTGATGTTTGTCCGTGGCCG
 C.f. 1 ATGAAACGTAAATTAATGACCTCTT-CTGTTATTGC-CAGCCTGATGTTAGTCGCAGGTG
 E.c. 1 ATGA-----AAATTA--AACTCTGGCAATCGTTGTTCTGTCCGGCTCTGTCCCTCAGTTC

S.t. 56 --CAGCGGTTGCGGCTGATCCCTACCTCCGGTGAGCGTGAGTGGCGGTAATTCATTTTGA
 C.f. 59 --CTGCGGTTGCGAGCCGA-----TCCGGTAAGCGTGAGCGCGGTAATTCATTTTGA
 E.c. 54 TACAGCGGCTCTGGCCG-----TGCCACGACGGTTAATGGTGGGACCGTTTCACTTTAA

S.t. 114 AGGTAACTGGTAAATGCAGCCTGTGCCGTCAGCACTAAATCCGCCGATCAAACGGTGAC
 C.f. 111 AGGTGAACTGGTCAATGCAGCCTGTGCAGTCAGTACTCAGTCATCCGATCAGGTTGTCCAC
 E.c. 108 AGGGAAAGTTGTAAACGCCCGCTTGCCGAGTTGATGCAGGCTCTGTTGATCAAACCGTTCA

S.t. 174 GCTGGGTCAATACCGTACCGCCAGCTTTACGGCGATTGGTAATACGACTGCCAGGTGCC
 C.f. 171 CTTAGGCCAGTATCGTACTGCCAGTTTTGCGCAGTAGGTGATAACAACGGCAAAAATTC
 E.c. 168 GTTAGGACAGGTTCTGACCGCATCGCTGGCACAGGAAGGACCAACAGTTCTGCTGTCGG

S.t. 234 TTTCTCCATCGTCTGAATGACTGCGATCCGAAAGTGGCGGCCAACGCTGCCGTGGCTTT
 C.f. 231 GTTCTCCATCGTGCTGAAACGATTGTGATCCGAAAGTTGCTGCAACCGCAGCCGTTGCTTT
 E.c. 228 TTTTAAACATTCAGCTGAATGATTGCGATACCAATGTTGCATCTAAAGCCGCTGTTGCC

S.t. 294 CTCTGGTCAGGCA---GATAACACCAACCCTAATTGCTGGCTGTCTCCTCTGCGGACAA
 C.f. 291 CTCTGGTCAATCC---GATATTACCAACAACAACCTGCTGGCTGTCACTTCTGCAGATAA
 E.c. 288 TTTAGGTACGGCGATTGATGCGGGTCATACCAACGTTCTGGCTCTGCAGAGTTCAGCTGC

S.t. 351 TAGCACTACCGCAACCGGCGTCCGGGATTGAGATTCTTGATTAATACCTCTTCACCGTTGAA
 C.f. 348 CCGTACCACCTGCCAGCGGTGTCCGGGATTGAAATTCTGGACAATACGTCCACCCGCGTGA
 E.c. 348 -GGG--TAGCGCAACAAACGTTGGTGTGCAGATCTGGACAGAACGGTCTGCTGCGCTGAC

S.t. 411 GCCGACGGCGCGACCTTCTCGGCGAAGCAGTTCGCTGGTTGAAGGCACCAATACGCTGCC
 C.f. 408 GCCAGATGGTGCACCTTCTCTACCGCTCAGGCTCTGGTGAAGGGACCAACACCCCTGCC
 E.c. 405 GCTGGATGGTGGCAGATTTAGTTTCAAAAACAACCTGAATAACGGAAACCAATACCAATTC

S.t. 471 TTTTACCGCACGCTATAAGGCAACCGCCGCCGCCACGACGCCAGGCAGGCTAATGCCGA
 C.f. 468 TTTCTCTGCGCGTTACAAAGCCACTGCCACCAGCGCTACGCCGGGTGAGGCAAAATGCCGA
 E.c. 465 GTTCAGGCGCGTTATTTTGAACCGGGGCCG---CAACCCGGGTGCTGCTAATGCCGA

S.t. 531 CGCCACCTTTATCATGAAATACGAATAA
 C.f. 528 CGCGACGTTTCATCATGAAGTACGAATAA
 E.c. 522 TGCGACCTTCAAGGTTTCAGTATCAATAA

fimC

S.t. 1 -----ATGCTGAATAGTATAAAAAGTAGGCTTTATTGT-
 C.f. 1 -----ATGTTTAAATTATCTAAAATCAGGTTTTATCCT-
 E.c. 1 GTGAGTAATAAAAACGTCAATGTAAGGAAATCGCAGGAAATAACATTCTGCTTGTGGCA

S.t. 33 --TCTTCTCACGTTATTTAC--T-TCGCTGAACGTACAGGCGCGGGGGGATTGCATTA
 C.f. 33 --TTTACTGTTCTTATTTCC--TGTTGCC-AGTGTTCAGGCTGCCGGAGGCATTGCATTA
 E.c. 61 GGTATCCTGATGTTTATGGCAATGATGGTTGCCGGACGCGCTGAAGCGGGAGTGGCTTA

S.t. 88 GCGGCCACGCGCGTTATTTATCCCTCGGCGGCGAAGCAGACTTCTCTGGCAATCAGTAA
 C.f. 88 GCGGCTACCCGTTGTTATTTATCCAGCCGATGCCAAAACAACGTCACTGTTCTATTAGCAAT
 E.c. 121 GGTGCGACTCGCGTAATTTATCCGGCAGGGCAAAAACAAGAGCAACTTCCCGTGACAAAT

S.t. 148 AGCGATACTCA-AGAACGTTACCTCGTCAATTCATGGATCGAAAATAACGCTGGCGCAGAA
 C.f. 148 AGTGATACCAA-AGAACGTTACCTGGTCAATTCATGGATTGAGAATAGCGCAGGTGTTAA
 E.c. 181 AATGATCAAAATAGTACCT-ATTTAATTCATCATGGGTGGAAAATGCCGATGGTGT-AA

S.t. 207 AGAAAAACGTTT-ATCGTTACGCCCTTTATTGTCAGCGAGCCCAAAAGTGAAAACA
C.f. 207 AGAAAAATCGTTT-GTGGTTACACCTCCGTTGTTTGTGTCAGCGAGCCCAAAAGCGAAAACA
E.c. 239 AGGATGGTCGTTTTATCGTGACGCCTCCTCTGTTTTGCGATGAAGGGAAAAAAGAGAAATA

S.t. 266 CGCTGCGTATTATCTACGCCGGGCAA---CCGCTACCCGGGGATCGGGAGTCGTTATTCT
C.f. 266 CGTTGCGTATTATCTATGCAGGTGTT---CCGTTGCCCAAAGATCGTGAGTCCGCTGTTCT
E.c. 299 CCTTACGTATTCTTGATGCAACAAATAACCAATTGCCACAGGACCGGGAAAGTTATTCT

S.t. 323 GGATGAACGTGAAAGCCATCCCGTCGGTCGATAAAAAGTCATATTGAAGGAAAAACGTTG
C.f. 323 GGATGAACGTAAAAGCCATTCCGTCAGTCAATAAAAACAGCCCTTGAGGGCAAAAACGTTG
E.c. 359 GGATGAACGTTAAAGCGATTCCGTCATGGATAAAT-CAAAATTGACTGAGAATACG--C

S.t. 383 TGCAACTGGCGATTCTGTGCGCATCAAAGTTCGTCGTCGGGGAATTTGCCGAGA
C.f. 383 TGCAACTGGCGATTCTGTCCCAGCATCAAGCTTTTCGTCGTCGGGAATAATTTGCCGAAA
E.c. 416 TACAGCTCGCAATTATCAGCCGCATTAAACTGTACTATCGCCGGCTAAATTAGCGTTGC

S.t. 443 CGCCGGAAGACCGCCGACCTTGCTGAAATTTTCCCGTTCGGCAACCATCTCAAGATAA
C.f. 443 TCCCGGAAGATGCCCGGGGATGCTGACGTTTTCCCGTTCAGGCAACCACTGAAAATTA
E.c. 476 CACCCGATCAGGCCGCAGAAAATTAAGATTTTCGTTCGTAGCGCGAATTCCTGACCGCTGA

S.t. 503 CCAACCCATCTGCTTATTACCTCAGCTGGTCAATATCAGCGTGGGCGGAAAAAGATTG
C.f. 503 ACAATCCGTCAGCGTATTACGTCACGTTGGTCAATCTCAACGTGGGGAAAACGAAGGTG
E.c. 536 TTAACCCGACACCCCTATTACCTGACGGTAACAGAGTTGAATGCCGGAACCCGGTTCTTG

S.t. 563 ATAACGTGATGATCGCGCAAAAAGCGACATGCA-AATTCCCTTACCGACTGGCGCGCAG
C.f. 563 ATAACGTGATGGTTGCACCGAAAAGCGATCGCA-GGTTCTGTTGCCAACAGGCGTGCAG
E.c. 596 AAAATGCATTGGTGCCTCCAATGGGCGAAA-GCACGGTTAAATTGCCTTCTGA--TGCAG

S.t. 622 G--GCAACGTGACATTTGAGTCCGTCATGATTACGGCGATTGACGTGGCGGACAAACGG
C.f. 622 G--GCAACGTTACGTTCCAGACGGTCAATGATTATGGCGCTGTGACCCCGGCCAAAACGG
E.c. 653 GAAGCAATATTACTTACCGAACAAATAAATGATTATGGCGCACTTACCCCAAAAATGACGG

S.t. 680 CCAGTCTCGGTTAA
C.f. 680 TTAGCGTCCGTTGA
E.c. 713 GCGTAATGGAATAA

fimD

S.t. 1 -----ATGAAG--AAGAC-----AACCTGGTTTGCAAGGCGATTTCCTGG
C.f. 1 -----ATGAAT--AAGAC-----AACGTATTTTCTGGCCTGTTCCGGG
E.c. 1 ATGTCATATCTGAATTTAAGACTTTACCAGCGAAACACACAATGCTTGCATATTTCGTAAG

S.t. 39 CTATGTATCACCG---TTAAGCAGCGTGGCGCTGTGCG---GTGCTGGCGGCGCTGTGTC-
C.f. 39 GGTTACCGCCACCG---CTGGCGGGGGTGGCGTTGTCC---ACGCTGGCGGCGCTCTTTC-
E.c. 61 CATCGTTTGGCTGGTTTTTTTTGTCCGACTCGTTGTGCGCCTGTGCTTTTGCAGGACAGGCA

S.t. 92 CGCTGACGAGCCGCGGCGAAAGTTATTTCAACCCCTGCGTTTTTTGTGGCGGATACCGCGT
C.f. 92 CCTCTTTAAGCCATGGTGAAGCTATTTAATCCGGCCTTTTTATCTGCGGATACGGCAA
E.c. 121 CCTTTGTCAATC--TGCCGACCTCTATTTAATCCGCGCTTTTTAGCGGATGATCCCAGG

S.t. 152 CCGTGGCGGATTTATCTCGCTTTGAAAAAGGTAATCATCAGCCTCCCGGTATTTACCGGG
C.f. 152 CCGTGGCGGATTTATCACGTTTTGAAAAAGGTAATCACAGCCTGAAGGTGTTATCGCG
E.c. 179 CTGTGGCCGATTTATCGGTTTTGAAAAATGGGCAAGAAATTAACCGCCAGGACCGTATCGCG

S.t. 212 TGGATATCTGGCGTAACGACGAATTCGTAGCGACGCAGGATATTGTTTTGAGCGGGGG
C.f. 212 TGGATATCTGGCGCAATGATGAGTTTGTGGCTACTCAGGATATTGTTTTACGACGAGCG
E.c. 239 TCGATATCTATTTGAATAATGTTATATGGCAACCGCTGATGTCACATTTAATACGGGG

S.t. 272 CCGTGGGCAACCGGCGATAAATCCGGCGGCTGATGCCCTGTTTTACACCGGAGTGGATTAA
C.f. 272 CGGGAAAAGCCGGGGAGAACTCCGGTGGGCTGATGCCCTGTTTTGGGCTCGACTGGGTGA
E.c. 299 ACAGTGAA-CAAGGGATTGTTCC--CTGCCTGACAC-----GCGCGCAACTCGCC--

S.t. 332 AACGGCTGGGCGTGAATACCGCGGC-GTTCCTTGT-CTCAGATAAAG--GCGT-CGATAC
C.f. 332 AGCGCCTTGGCGTCAATATCGCCGC-GTTTCCGGCACTCAG-TAAGGATGCGAACGATAC
E.c. 346 --ACTATGGGCTGAATACGGCTTCTGTGCGCGGTATGAATCTGCTG--CGGATGATGC

S.t. 387 CACGTGTAT-TCACCTTCCGAGAAAATCCCGGGCGCGGAGGTGCGGT-TGGATTTCCGG
 C.f. 390 C---TGCAT-CAATCTACCAGAGGCGATTCCAGGCAGCGAGATTGCGT-TTGATTTTCT
 E.c. 402 C---TGTGTGCCATTAACCACAATGG--TCCAGGACGCTACTGCGCATCTGGATGTTGGT

S.t. 445 TCGATGCGCTTAAACATTAGCTTGCCGCGAGGCGTCATTGCTCAACAGCGCGCGTGGCTAT
 C.f. 445 ACCCTGCGACTAAACCTCAGCCTGCCGCGAGGCGTCGATGTTAAACAGCGCGCGTGGCTAT
 E.c. 457 CAGCAGCGACTGAACCTGACGATCCCTCAGGCATTTATGAGTAATCGCGCGCGTGGTTAT

S.t. 505 ATCCCGCCGGAAGAGTGGGATGAAGGATACC CGCCGCACTCATTAAATTACAGTTTACC
 C.f. 505 ATTCCACCGGAAGAGTGGGATGAAGGCATCCCGGCTGCGCTGGTTAACTACAGTTTACC
 E.c. 517 ATTCCTCCTGAGTTATGGGATCCCGGTATTAATGCCGGATTGCTCAATTATAATTTACGC

S.t. 565 GGTAGCCGCG---GAA-CAGACAGCG---ATAGCTATTTT-----TTGAGTCTGCTG
 C.f. 565 GGCAGCCGCG---GCA-GTGATACGG---ACAGCTATTTT-----TTAAGTATGCTC
 E.c. 577 GGAAATAGTGTACAGAATCGGATTGGGGGTAACAGCCATTATGCATATTTAAACTACAG

S.t. 610 AGTGGCTTGAACATATGGCCCTGGCGGTTGCGTAATAACGGAGCCTGGAACTATTCCGAAA
 C.f. 610 AGTGGCTTGAACATATGGCCCTGGCGGTTGAGAAAATAACGGCGCATGGAGCTATTCCAAA
 E.c. 637 AGTGGGTTAAATATTGGTGGCTGGCGTTTACGCGACAATACCACTGGAGTTATAACAGT

S.t. 670 GGGGACGGCT-ATCAT-TCGCAACGCT----GGAACAACATTGGCACCTGGGTACAGCGC
 C.f. 670 GGTGACGGGT-ATCAC-TCACAAAGCT----GGAAAAACATCGGCACATGGCTTACAGCGC
 E.c. 697 AGCGACAGATCATCAGGTAGCAAAAATAAATGGCAGCATATCAATACCTGGCTTGAGCGA

S.t. 724 GCCATCATTCGGCTAAAAGCGAACTGGTCATGGGGGACAGCAATACCGGGAACGATGTT
 C.f. 724 GCGATTATCCCGCTGAAGGGCGAGCTGGTGATGGGTGACAGCAAACACCGGCAACGACGTT
 E.c. 757 GACATAATACCGTTACGTTCCCGGCTGACGCTGGGTGATGGTTATACTCAGGGCGATATT

S.t. 784 TTTCGACAGCTTCGGCTTTCGCGGAGCGCGGCTGTACTCTTCTGACAATATGTATCCCGAT
 C.f. 784 TTTCGACAGCGTCGGATTTTCGCGGGGCGCGGCTCTATTCTCAGACATATGTATCCCGAC
 E.c. 817 TTTCGATGGTATTAACTTTCGCGGCGCACAAATGGCCTCAGATGACAATATGTTACCCGAT

S.t. 844 AGCCTGCAGGGCTACGCCCCACGGTTAGAGGAATCGCCCGGACGGCGGCAAAGCTGAGC
 C.f. 844 AGCTTACAGGGCTACGCGCCTACCGTTTCGCGGTATTGCGCGAACAGCGGCAAAGCTAAC
 E.c. 877 AGTCAAAGAGGATTTGCCCGGTGATCCACGGTATTGCTCGTGGTACTGCACAGGTCACT

S.t. 904 ATACGACAGAACGGGTATGTTATCTACCAAAGCTATGTGTCCCGGGCGCTTTTCGATTT
 C.f. 904 ATTCGTTCAGAAATGGCTATGTGATTTATCAAAGCTATGTTTCACCGGGCGCTTTCTCGATA
 E.c. 937 ATTAACAATAATGGGTATGACATTTATAATAGTACGGTGCCACCGGGGCTTTTACCATC

S.t. 964 ACCGATCTTAATCCTACCTCTTCCAGCGGCACCTTGAGGTGACGGTAGATGAAAAAGAC
 C.f. 964 ACCGATCTCAAACCGACGTCATCCAGCGGTGACCTTGAGGTGACGGTGGACGAAAAAGAC
 E.c. 997 AACGATATCTATGCCGAGGTAATAGTGGTGACTTGCAGGTAACGATCAAAGAGGCTGAC

S.t. 1024 GGTAGCCAACAACGTTACACGGTGCCTTACTCTACC GTTCCGCTATTGACAGCGTGAGGCC
 C.f. 1024 GGCAGCCAACAGCGCTATACGGTGCCTACTCCACGGTTCCTTGTTCAACGAGAAGGG
 E.c. 1057 GGCAGCACCCAGATTTTTTACCCTACCTATTCTGTCAGTCCCGCTTTTGCAACGTGAAGGG

S.t. 1084 AGGCTGAAGTATGACCTGGTGGCCGGGGATTTTCGAGCGGCAATAGTCAGCAGTCTTCG
 C.f. 1084 CGTTTCAAATATGACGTGGTTCGAGGGGATTTTCGAGCGGCAATAGCCAACAATCTTCT
 E.c. 1117 CATACTCGTTATTCCATTACGGCAGGAGAATACCGTAGTGGAAATCGCAGCAGGAAAAA

S.t. 1144 CCATTCTTTTTCCAGGGAACCGCTGATTGCCGGCCTGCCTGCGGGGCTGACGGCTTACGGC
 C.f. 1144 CCATTCTTTTTCCAGGGAACATTAATTGCTGGGTTACCAGAAGGCTACACCGCTTACGGC
 E.c. 1177 ACCCGCTTTTTCCAGAGTACATTACTCCACGGCCTTCCGGCTGGCTGGACAATATATGGT

S.t. 1204 GGTACGCAACTTCCGATCGTTACCGTGCCGTGGTGGTGGGGGGGGGCGAAATTTGGGC
 C.f. 1204 GGTACGCAACTTGGCCCTCAGCTACACGCGGCTGGTTTTAGGCACCGGCGGAAACCTGGGG
 E.c. 1237 GGAACGCAACTGGCGGATCGTTATCGTGCTTTTAATTTCCGGTATCGGGAAAAACATGGGG

S.t. 1264 C-ACTGGGGAGCCGTGTGCTTATGTGCACACATGCGCGTAGCCAACCTGGCAGATGACAG
 C.f. 1264 G-ACTGGGGGGCGGTTTCTGTGATCTGACCCATGCCCGGAGCCAACCTGGCGGATGACAG
 E.c. 1297 GCAGTGGGC-GCTCTGTCTGTGGATATGACGAGGCTAATTTCCACACTTCCCGATGACAG

S.t. 1323 CACCATCAGGGGCAATCGTTGCGTTTTTCTGTACGCCAAATCGCTGAATAAATTACGGGAC
 C.f. 1323 TACACACCAGGGGCGATCATTGCGTTTTTCTATATGCGAAATCGCTGAACAATTTTGGCAC
 E.c. 1356 TCAGCATGACGGACAATCGGTGCGTTTTTCTCTATAACAATCGCTCAATGAATCAGGCAC

S.t. 1383 TAATTTTCAATTGCTGGGTTACCGCTATTCACGCGCGGATTTTACACCCTGGATGATGT
C.f. 1383 CAACTTTCAGTTGTTGGGATATCGCTACTCTACGCGTGGTTTCTATACCCTCGACCGATGT
E.c. 1416 GAATATTCAGTTAGTGGGTTACCGTTATTCGACACGCGGATATTTAATTTCCGCTGATAC

S.t. 1443 GGCATATCGCAGTATGGAAGGGTACGACTACGAATACGATAGCGACGGACCGCCCATAA
C.f. 1443 GGCGTATCGCAGTATGGAAGGGCTATGAGTACGAATACGACAGCGAGGGCAATCGCCACGA
E.c. 1476 AACATACAGTCCGAATGAATGGCTACAACATTGAA-AC-ACAG-GACGGAGTTATT CAGGT

S.t. 1503 AGTGCCGGTGGCGCAGAGCTACCACAATCTCCGCTACAGCAAAAAAGGCCGCTTTCAGGT
C.f. 1503 TGTGCCCGATGTGAAGAGTTACCACAACCTGAGCTACAGCAAAAAAGGCCGCTTTCAGAT
E.c. 1533 TAAGCCGAAATTCACCGACTATTACAACCTCGCTTATAACAAACCGCGGAAATTACAAC

S.t. 1563 CAATATTTTCGCAAAATCTGGGGGATTACGGGTCACTGTATCTTTCGGCAGTCAACAAAA
C.f. 1563 AAACATTTTCGCAAAATCTGGGGGATTACGGATCGCTGTATGTCTCGGGTAGTCAGCAAAAC
E.c. 1593 CACCGTTACTCAGCAACTCGGGCGCACATCAACACTGTATTTGAGTGGTAGCCATCAAAAC

S.t. 1623 TTACTGGAATACGGCGGATACCAATACCTGGTATCAACTGGGATACGCCAGTGGATGGCA
C.f. 1623 GTACTGGAATACCTCAGACACCAATACCTGGTATCAACTGGGCTATGCCAGCGGCTGGCA
E.c. 1653 TTATTGGGGAACGAGTAATGTTCGATGAGCAATTC CAGGCTGGATTAATACTGCGTTCCA

S.t. 1683 AGGCATAAGTTATTTCGCTGTCATGGT-CGTGGAGCGAGTCGGTGGGGAGCTCAGGCGCCG
C.f. 1683 AGGTATTAGCTATTCACTCTCCTGGT-CGTGGAAATGAATCGGTTGGCATCTCCGACACCG
E.c. 1713 AGATATCAACTGGACGCTCAGCTATAGCCTGACGAAAAACGCTGGCAAAAAAGCAGG-G

S.t. 1742 ACCGCATTCTGGCATTCAATATGTCCGTTCCGTTTAGCGTTCTGACCGGACGGCGTTATG
C.f. 1742 ACCGTATTGTTCGGTTCAATATGTCAATACCGTTTCAGCCTGCTGAGCGGACGGCGCTACT
E.c. 1772 ATCAGATGTTAGCGCTTAACGTCAATATTCCTTTCAGCC-----ACTGG-CTGCGTTCTG

S.t. 1802 CGCG-CGACACTATTCTTGATCGTACTTATGCCACGTTTA--ACGCCAACCGCAACCGCG
C.f. 1802 CGCG-AGATAGCGCCTTCGATCGCACCTACGCCACCTTTA--ATGCTAACCGTAATAAGCA
E.c. 1826 ACAGTAAATCTCAGTGGCGA-CATGCCAGTGCCAGCTACAGCATGTCACAGC--ATCTCA

S.t. 1859 ACGGCGACAATAGCTGGCAGACCGGCGTGGGCGGCACACTTCTGGAAGGACGTAATCTGA
C.f. 1859 ATGGACAAAATAGCTGGCAGAGCGGGATCGGCGGTACGTTGCTGGATTGGACGCAACCTGA
E.c. 1883 ACGGTCCGATGACCAATCTGGCTGGTGTATACGGTACGTTGCTGGAAGACAACAACCTCA

S.t. 1919 GCTACAGCGTG-ACGCAAG----GGCGTAGCAGTAGCAATGGTTATAGCGGCA-----
C.f. 1919 GCTACAGCGTG-AATCAGG----GGCACAGCAGCACCAATGGCTACAGCGGAA-----
E.c. 1943 GCTATAGCGTGCAAAACCGGCTATGCCGGGGGAG--GCATGGAAATAGCGGAAGTACAGG

S.t. 1967 --CGCCAGCGCT-AGCTGGCAGGGCAGCTATGGCAGCTGGGCGTGGGATATAACTA--
C.f. 1967 --ACGCCAGTGGC-AACTGGCAGGGCGCTATGGCAGCTGGGCGTGGGATACAACTA--
E.c. 2001 CTACGCCA-CGCTGAATTTATCGCGGTGGTTACGGCAATGCCAATATCGGTTACAGCCATA

S.t. 2022 -CGATCGCGATCAGCATGACTATAACTGGCAACTTTCGGCGGGCGTGGTGGTTCATGCGG
C.f. 2022 -CGATCGCGATCAGCATGACTACAACTGGCAACTCTCTGGCGGGCGTGGTGGGGCATGCGG
E.c. 2060 GCGATGATATTAAGCAGCTCTATTACGG---AGTCAGCGGTGGGGTACTGGCTCATGCCA

S.t. 2081 ATGGTATTACGTTTAGCCAACCGTTGGGGGATACCAATGTCTTGATTAAAGCGCCGGGAG
C.f. 2081 ATGGCATTACGCTCAGTCAGCCTCTGGGTGATACCAATGTGCTGATTAAAGCGCCTGGCG
E.c. 2117 ATGGCGTAACGCTGGGGCAGCCGTTAAACGATACGGTGGTGGCTTCTTAAAGCGCCTGGCG

S.t. 2141 CGAAAGGCGTGCCCATCGAAAACCAGACCGGGCGTGAAAACGGACTGGCGGGCTATGCGG
C.f. 2141 CACAGGGTGTGCGGATAGAAAACCAGACCGGGCGTTCAAACCGACTGGCGTGGATACGCGG
E.c. 2177 CAAAAGATGCAAAAGTCGAAAACCAGACCGGGGTGCGTACCAGACTGGCGTGGTTATGCCG

S.t. 2201 TAATGCCCTACGCCACGGTATATCGCTATAACCGCGTTCGGGTTAGATACCAACACGATGG
C.f. 2201 TGATGCCGTATGCCACCGTCTATCGCTATAACCGTGTTCGGGTTAGACACCAACTCCATGA
E.c. 2237 TGCTGCCCTTATGCCACTGAATATCGGGAAAATAGAGTGGCGCTGGATACCAATACCCTGG

S.t. 2261 ACAACCATACCGATGTCGAAAATAACGTCAGCAGCGTAGTCCGACAGAGGGCGCGCTGG
C.f. 2261 ACAACAATACCGATGTGAAAATAACGTCAGCAGCGTAGTACCAACGCAAGGGGGCGCTGG
E.c. 2297 CTGATAACGTCGATTTAGATAACCGGTTGCTAACGTTGTTCCCACTCGTGGGGCGATCG

S.t. 2321 TGCGCGCCGCTTTTGATACCGGATAGGCGTAAGGGCAATCATTACCGCGAGGCTTGCGG
C.f. 2321 TGCGAGCTGCGTTTGATACCGAATCGGTGTTCGGCGCTGATTACCGCGAAAACATGCCG
E.c. 2357 TGCGAGCAGAGTTTAAAGCGCGCGTTGGGATAAAAACCTGCTCATGACGCTGACCCACAATA

S.t. 2381 GACGTCCGTTACCGTTTGGCGGATAGTACGAGAAACCGCCAGCGCATTACCAGTATGG
C.f. 2381 GTAAACCCGTGCCGTTTGGCTCTATTGTGCGGAAAAACACCAGTGGCGTGACCAGTATGG
E.c. 2417 ATAAGCCGCTGCCGTTTGGGGCGATGGTGACATCAGAGAGTAGCCAGAGTAGCGGCATTG

S.t. 2441 TCGGCGATGATGGGCAAATTTATCTGAGCGGCTTGCCGCTAAAAGGTGAACCTGTTTCATCC
C.f. 2441 TGGGCGAAGACGGGCAAATTTATCTCAGTGGTCTGCCGCTAAAAGGCGAGTTGCTGATCC
E.c. 2477 TTGCGGATAATGGTCAGGTTTACCTCAGCGGAAATGCCCTTAGCGGGAAAAGTTTCAGGTGA

S.t. 2501 AGTGGGGAGAGGGGAAAAACGCGCGTGTATCGCCCTTACGCCCTGGCGGAGGATAGCC
C.f. 2501 AATGGGGGAAGGCGCAAACGCTCGCTGCGTGGCGCGCTATGCCCTGCCCTGAGGAGAGTC
E.c. 2537 AATGGGGAGAAGAGGAAAATGCTCACTGTGTGCCAATTATCAAATGCCACCAAGAGAGTC

S.t. 2561 TGAAGCAGGCGATTACGATAGCCAGCGCAACCTGTATCCGTCCGGCGTCATAA-----
C.f. 2561 TGAAACAGGCGGTGACGCTCACGAACGTGACGTGCCAATCTCCAACGGCACGCACAGGAAT
E.c. 2597 AGCAGCAGTTATTAAC-CCAGCTATC---AGCTGAATGTCGTTAA-----

S.t. --
C.f. 2621 AA
E.c. --

fimF

S.t. 1 ATGATCCTTCGGCGCGTTTTTCATCGCTATCGGTTGTGTTTTGTTTCAGCC--CGCTGAGTC
C.f. 1 -----AT-GGTGTCCCTGCTAACA--TTCAGTT--CGTTGGGCC
E.c. 1 ATGAGAAACAACC--TTTTTAT--CT-TCTGTGCGCTTTTTTGTGCTGGCGGTGAGTC

S.t. 59 AGGCCAACTCATCTCTGGGCGAAGTGAATATTGAACTGCGCGGTAACGTGGTGGATTTTA
C.f. 35 ATGCCCTCCTCGTGCCTGGGGGAAATCAATATTGAGCTGCGTGGCAACGTGGTGGACTTTA
E.c. 56 ACGCTT--T---GGCTGCG-GATAGCACGATTACTATCCGCGGCTATGTCAGGGATAACC

S.t. 119 CCTGCGCCGTGGTGGCGGGCGACAGTAACAAGTCCGGTTAACCTCG-GCACCTGGCCGACA
C.f. 95 CCTGTGCGGTGATTGCCAGCGACAGCAATAAGTCCGGTGGAGTTGG-GGACCTGGCCGACA
E.c. 110 GCTGTAGTGTGGCCGCTGAATCAACCAATTTTACTGTTGATCTGATGGAAAACGGG-CG

S.t. 178 AAACAGCTTCACGCCCGCGGTGACGCTACGCAACCGGTAAGCCTTTAGCTTAAAACTTGAA
C.f. 154 AAGCAGCTTCAGACCAGCGGAGATACCACTCAACCGGTCCGCTTTACGCTGAAGCTTGAA
E.c. 169 AAGCAATTTAACAACATTGGCGCGACGACTCCTGTTGTTCCATTTTCGTATTTTCTGTCA

S.t. 238 G---GTTGCCCGCCGGGCTCGGC-GTCTA--TAACGTTTTCCGGGACGCCAGCGCCCGGC
C.f. 214 G---GTTGCCCGCCGGGATCCGC-ATCGA--TAACGTTTTCCGGTACTCCGCTCCGGGC
E.c. 229 CCCTGTGGTAATGCCGTTTCTGCGTAAAGGTTGGGTTTACTGGCGTTGCAGATAGCCAC

S.t. 292 A---CGGCATTACTGGCGCTTGCTGATACGGC---AATGGCGCAAAAAGTGGCGATTGAA
C.f. 268 A---CGACGCTGTTGGCGCTTGATGATGCGGT---CATGGCACAAAAGTGGCGATTGAA
E.c. 289 AATGCCAACCTGCTTGCACCTTGAATAACGGTGTCAAGCGCTTCGGGACTGGGAATACAG

S.t. 346 ATTCCGATGGCGATCA-ACGTCGATTGCCACTTGAA----CAG-GCCAGCAAGGCCGT
C.f. 322 CTGCACGACAGCGATCGTACG-CGATTACCGCTCGAA----CAG-GCCAGCCAGGCCGT
E.c. 349 CTTCTGAATGAGCAGCA-AAATCAAATACCCCTTAATGCTCCATCGTCCGCGCTTTCCGT

S.t. 400 GATATTGACAACAACGGCAATGCTA----CCCTGAAAATCTATGCGAA-CTATATCGGCT
C.f. 376 GCGATTGATGAGAACGGCAATGCCA----CGCTGACCTTTTTTCGCCAA-CTATATCGCGT
E.c. 408 GACCACCTGACGCGGGGTAACCAATAACGCTGAATTTTACGCCCGGCTA-ATGGCGA

S.t. 455 TAGCCGATGGCGTGCA--GCCCGGACTTGCTAACCGCGGATGCGACCTTCCTGATCAATTA
C.f. 431 TAGCCGATGGAGTTCA--GCCTGGCGTCCGACGGGCTGATGCCACGTTTATGATTAACCTA
E.c. 467 CA-CAGGTGCCGTGTCACCTGCGGGGCATATC-AATGCCACGGCTACCTTCACTCTTGAATA

S.t. 513 CAATTAG
C.f. 489 TAATTAA
E.c. 525 TCAGTAA

fimH

S.t. 1 ATGAAAATATACTCAGCGCTATTGCTGGCGGGGACCGCGCTCTTTTCACCCATCCCGG
C.f. 1 ATGAAAAGACAAACGGGTTTGTACTGGGAAGCGCTTTACTGCTGATGGCACATTCGTCA
E.c. 1 -----ATGAAACG--AGTTA

S.t. 61 CTGGCGACGGTTTGCCGTAATTCAAACGGGACGGCGACCGATATCTTTTACGACCTGTCA
C.f. 61 TGGGCGACGGTCTGCCATAACTCGAATGGCACGCCAACGGATGTTTTTTACGATTTGTCC
E.c. 14 TTACC--CTGTTTGCTGTACTGCTGATGGGCTGGT--CGG-----TAAATGCCTGGTCA

S.t. 121 GATGTTTTTCACAGCGGCAATAATCAGCCGGGACAGGTGGTGACCGTGC CGGAAAAATCA
C.f. 121 AATGCTTTTAAACAGCAGCAACAACCAGCCGGGACAGGTGGTAACGTTACCGGAAAAATCG
E.c. 64 TTCGCCTGTAAAACCGCCAAT-----GGTACCCTATCCCTATTGGCGGTGGCAGC-

S.t. 181 GCTTGGGTGGCGTAAACGCCACGTGCCGGGGGGGACAAACGGTGAATTATACCTAC--CG
C.f. 181 GGCTGGATTGGCGTGAATGCCACCTGTCCGGCCGGAACGTCGGTGAATTACACCTAC--CG
E.c. 115 GCCAATGTTTATGTA--CCTTGC GCCCGTCTGTAATGTGGGGCAAA--ACCTCGTCC

S.t. 240 AAGCTATGTATCAGAATTACCGGTACAAAGTACCGAAGGAAATTTTAAATACCTCAAGTT
C.f. 240 AAGCTATGTCACTGAACCTCCGGTGCAAAGTACCGAGGGCGGTTTTTTCAGTATCTGAAGCT
E.c. 170 TGGATCTTTCCAGCAAAATCTTTTGCCA--TAACGA-----TTATCCGGAAACCA---T

S.t. 300 GAATGACTACCTTCTGGGCGCGATGAGCATCACCGATAGTGTCCCTGGCGTATCTTATCC
C.f. 300 CAATGACTACCTGCTGGGAGCCATGAGCATCACCGACAGCTATGCCGGGTTGTTTTTATCC
E.c. 219 TACAGACTATGT-CACACTGCAACGAGGCTCCGGC-----TTATGGCGGCGTGT--TATC-

S.t. 360 GCCCGTAACATATATCTCATGGGCGTCCGACTATAACGTGTCCGAGCAAAAGCCGT---T
C.f. 360 TCCGCGTAATTATATCCGCATGGGGACTCACCCAACGTATCGAAACAGCAGCCTT---T
E.c. 270 -----TAATT-TTTCC---GGG-----ACCGTAAAATATAGTGGCAGTAGCTATCCAT

S.t. 417 TGGCGTGCAGGACTCAAA-GCTGG---TTTTTA-AATTAAAAGTGATACGGCCTTTTAT
C.f. 417 TGGCGTAATGGATTCAAA-GCTGG---TGTTTA-AACTCAAAGTGATCCGCTCGTTTAT
E.c. 314 TTCCCTACCACCAGCGAAACGCCGCGCGTGTGTTTATAAATTCGA---GA-ACGGA-----

S.t. 471 TAATATGGTGACGATCCCTCGCCAGACAATGTTTACCGTCTATGTGACGACCTCTACCGG
C.f. 471 TAACATGGTTCCGATTCGGCGTCAGACGATGTTGAGCGTCTATGTGACGACCAGTACCGG
E.c. 363 TAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTA-----TTTGACCGCTGTG-----AGCAGTCCGGG

S.t. 531 CGACCGCTTGAGCACGCCGGTATATACCATTAGCTACAGCGGCAAAAGTGGAAGTGCCGCA
C.f. 531 AGATGCGCTAAGCACGCCGGTGTACACCATCAGCTACAGCGGTAAGGTGGAGGTTCCACA
E.c. 411 CGGGGTGGCGATTAAAGCTGGCT----CATTAAATTGCCGTGCTTATTTTGCAGACAGACCA

S.t. 591 A-AACTGTGAAGTGAATGCCGGACAGGTCGTGGAGTTTGATTTCCGGGATATCGGGCGGT
C.f. 591 A-AACTGTGAGGTGAACGCCGGGACAGATTGTTGAGTTTGATTTGGCGATATTGGCGCAT
E.c. 467 ACAACTATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGG

S.t. 650 CGTTATTTAGTCAGGCGGGGGC-GGGTAATCGTCCGCAAGG---CGTCACGCCGCAAAC
C.f. 650 CGTTGTTTAGCAAGGCGGGGGC-AGGAAACCGGCCCGAAGG---CATTAAATCCGCAGAC
E.c. 527 TGGTGCCTA--CTGGCGGCTGCGATGTTTCTGCTCGTGATGTACCGTTACTCTGCCG--

S.t. 705 GAAAACCAATTGCTATCAAATGTACCAACGTCCGGCGCGCAGGCCTATTTATCGATGCGGCT
C.f. 705 CAAAACCGTGGCGATAAAATGCACCAACGTCCGGCACAGGCCTACTTGACCATGCGTGT
E.c. 583 GACTACCCTGG---TTCAGTG--CCAAT-TCCTCTTACCGTT-TATTGTCCGAAAAGCCA

S.t. 765 TGA---AGCCGAAAAGCCCTCAGG-GCAGGCGATGGTGTCCGATAATCCGGATTTAGGCT
C.f. 765 AGA---GGCTGAGAAAGCCACCGG-ACAAATGATGGTTTCTGACAACCCGGATTTAGGTT
E.c. 636 AAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAAACCGCAGATG-CGGGCAACTCGATTTTACCA

S.t. 821 TTGTGTTTGGCTAATAGCAACGGTACGCCGCTTACACCCAAATAATTTGTGCGAGTAAAAATC
C.f. 821 TTATCGTCGCCGATAGCAGTGGTAACCCGCTGACGCCTAACAATTTGTCCAGCAATATCC
E.c. 695 ATACCG-CGTCTGTTTTACCTGCACAGGGC-GTCGGCGTACAGTT-GACCGCAACCGGTA

S.t. 881 CGTTTCATCTTGATGATAACGCCCGCCG--TCGC---GTAGGTATTCCCGCCTGGCCAA
C.f. 881 CATTTCAATTGGATGATAACGCCCGCAGC--CAGG---GTGGTATTCCGGCATGGCCGG
E.c. 752 CGATTATTCAGCGAATAACACGGTATCGTTAGGAGCAGTAGGGACTTCGCC--GGTGAG

S.t. 935 TCAGCG--TGACGGGGATTAA---ACCGCGCGGAAGGGCCGTTTACTGCGCG-----
 C.f. 935 TCAGCG--TGACGGGGGAATAA---ACCTACCGAAGGGCCTTTACTGGCTCG-----
 E.c. 810 TCTGGGATTAAACGGCAAATTATGCACGTACCGGAGGGCAGGTGACTGCAGGGGAATGTGCA

S.t. 981 --CGGCATATCTACGAG----TCGATTATGATTAA
 C.f. 981 --TGGTTATCTGCGAG----TGGATTATGACTAA
 E.c. 870 ATCGATTATTGGCGTGACTTTTGTTTATCAATAA

fimI

S.t. 1 -----
 C.f. 1 -----
 E.c. 1 GTGCTGCTAATGCGGATGCGACCTTCAAGGTTTCAAGTATCAATAACCTACCCAGGTTTCAGG

S.t. 1 -----
 C.f. 1 -----
 E.c. 61 GACGTCATTACGGGCAGGGATGCCACCCCTTGTGCGATAAAAAATAACGATGAAAAGGAAG

S.t. 1 -----ATGTCGCCCGTCAATTGCGCACCG--GGTAATGG--TGGAGA
 C.f. 1 -----ATGCTGTGCGTACTGCCTGTGTTTGACATAC--GGTAATAC--TGGAAA
 E.c. 121 AGATTATTTCTATTAGCGTCTGTGCTGCCAATGTTTGTCTCTGGCCGGAAATAAATGGAAT

S.t. 38 -----GCCGGC--GTGTTACCTGCGCGGACAACCTGGTCA--ATGGCGG-----CTGC
 C.f. 47 -----GTGGCC--GCCTTCACTTACGGGGGACGCTCGTCA--ATGGTGC-----CTGC
 E.c. 181 ACCACGTTGCCCGCGGAAATATGCAATTTTACGGGCGTCATTATTGCGGAAACTTGCCTGG

S.t. 82 GCTGTGCGCCACAGAAAGCCAGAATTTGCGCGTATTGATGGGACAGTACCGCACGAAT--GC
 C.f. 91 ACGGTGCGCTACTGACAGCCAAAATTTGCGGGTGCAAAATGGGGCAGTATTCGCACCAAT--GC
 E.c. 241 ATTGAAGCCCGTGATAAAACAAA---TGACGGTCAATATGGGGCAAATCAGCAGTAACCGG

S.t. 141 GTTTACCGGTCCTGGCAGCTTCGCTCCCCTCAGCGTTCATTTTGGTTACGGTTAATCTCTC
 C.f. 150 TTTCTCCGGGACGGGGAGCTTTGCCTCTACCAGCGTGCCGTTTCACTGCGCTTAACGCTC
 E.c. 298 TTTCAATGCGGTTGGGGAAGATAGCGC--ACCG--GTGCCTTTTGTATTTCATTTACCGGA

S.t. 201 CTGTAGCCCGGAGGTCTGGCGTCATGTGCGCATTGCGTTCGCGGGCTTACGCCTGCGGA
 C.f. 210 ATGCAGCTCCGATGTTTATGACCACGTTGGGATTGCGTTCGAGGCGTGACGCCACGGGA
 E.c. 354 ATGTAGCACGGTGGTGAGTGAACGTGTAGGTGTGCGGTTTACCGTGTCCGGATGGTAA

S.t. 261 AGATCCCATGTTTTTCTGGCCAGCGGCGAGG--GTAT--CGGTA--ATGCCGGAATCGGCCT
 C.f. 270 AGATCCGCAGGTGTTCTTGCCAGTGGAGATGCGTCTGCGG--CTTCCGGGATCGGCCT
 E.c. 414 AAATCCGGATGTG---CTTCCGTGGGAGAGGGGCCAGGGATAGCCACCAATATTGGCGT

S.t. 318 GGCATTATTTGATGACCAGCAGCGGCAAATCATACTA--ACACG--TTACCGCTTCATT
 C.f. 327 GCGTTATTTGACCAGCGCCAACGGCAAATTTATCCGA--ACGCG--CTGCCGCTTCATT
 E.c. 471 AGCGTTGTTTATGATGAT---GAAGGAAACCTCGTACCGATTAATCGTCTCCAGCAAATG

S.t. 374 --ACACGCCCATTTTAACGTCAGAAATGACTTTGCATTTTACTGCCCGCTATCGGGCAATT
 C.f. 383 --ATCGCCGATTATAACGCAAGAGATGACGTTTCAATTTCACTGCTCGTTATCGGGCTGTC
 E.c. 528 GAAACGGCTTTTATTACGGCTCTACTT--CGCTACATTTATCGCCAAATATCGTGCTACC

S.t. 433 TCAGAAAATATGAC--GCCGGGACGAATTCATTACAGAAAGTGTGGTTTACGCTGGTTTACCC
 C.f. 442 TCGGAAAATATAAC--GCCGGGAACGCTTCTGTTACAGACGTTGTGGTTTACGTTGGTTTATCC
 E.c. 586 GGCCGTCGGGTTACTGGCGGCATCGCCA--ATGCCAGGCTTGGTTCTCTTTAACTTATCA

S.t. 492 ATGA
 C.f. 501 CTGA
 E.c. 645 GTAA

fimW

S.t. 1 ATGCTGCGTATCGCTATTAAAGGAACAAAACAGTCACTTTGAGCATGGGTTGAAAATCATC
C.f. 1 ATGTTAAGTATCGCCATCAAGGAAGAAAACAGTCACTTCGAAACATGGACTGAAAATCATC

S.t. 61 ATGACGCGTCTGGCGAATCAATGGCAGCAGAAAATTGACTTTCTGCCGCCAGAAGAGATA
C.f. 61 ATCTCCATCTGTCAAATCAGTGGCATCAGGAGATCTGCTTTTACCTGTGAGAAATATC

S.t. 121 GATAATGCCGATATCGCTTTTCTGGCCCTGGATGATGATTGGTTCAGCGCTGGCTGTAT
C.f. 121 GATCGCGCTGACATCGCATTTATCTCCCTGGATGAA GATTGGCTCAGCGCCGATTGCTAT

S.t. 181 CAGATACCTATGCATACCCAACATCAGCTACGGGCGATTATTTGTAATAAATCGGATAAA
C.f. 181 CAGATTCCGATCCATACCCGCCGCAATACCGGGTTGTCACTCTGCAACAGAAATGATAAA

S.t. 241 GAAAAGCTCATGTTCCAGACCATGTCTGTATATGCTGCCGCATATTTATCGGGAAGATGAT
C.f. 241 GATAAGCTGATGTTCCGGCCCTGCCTGTACATGTTGCCGCTGATCTATCGGGAAGATGAC

S.t. 301 GTTGAAGAAATTACCCGGAAAATGATATTGATCTTACATAAACGAGCGCTTCGACATAGC
C.f. 301 GTTGAGGAAATGACTAAAAAATTAGTCCCCATCTGC AAAACGTCGCTGCGCAGCAAC

S.t. 361 GTCCCTTCTGGCATTGCCACTACTGCACGACTCGTCATTTTTCAGTAA CAGAACGTCAC
C.f. 361 GTGCCTGCAACTATCTGCCATTACTGCACTACC CGCAACTTTTCTGTCCAGCAACGCAAG

S.t. 421 CTGTTAAACTGATCGCCAGCGGTTATCATTTAAGCGAAACGGCCGCTTTACTTTCACTT
C.f. 421 TTCTTAATGTTTCTCGCCAGCGGATATACCTTAGCCGAAACGGCTCACTTACTTCAATA

S.t. 481 TCTGAAGAGCAGAC-AAAGTCACTCCGCCGAGCATATGCGAAAATTCATGTTAAAA
C.f. 481 AGCGATCTTCAGGCCAAAGCGAC-CCGCCCGGCATAATGAAAAAGCTGCATGTGAAAA

S.t. 540 GGAGCAGCAGTTTAAAAATATATTAGAGTTAACCTTCATTTCTTACTCAGTAAGTAA
C.f. 540 CGATCAGCAATTCTTAAGATACATCCGCGCCCATCTGAATTTCTACAAAATTAG---

fimY

S.t. 1 ATGCGCAGCGTACCACGCAGGGAAAGACACCGCCGTTTAAAGAAATGCTAAAGACTGCGCC
C.f. 1 ATGCACAGCGCAAAACGCCGGGACCGCTATCGCCGCATACGAAACACTAA---CTGTACC

S.t. 61 TGCCGTTATCACTCTCCAACGCCGCAGATATTTGATCGCCTTGAGTTACTGAACCAACAG
C.f. 58 TGGCAATATCCCACTGTACTCACAAGTATTTGACCGGCTCGAGTATCTGGCGCAAAA

S.t. 121 CTCAATTATGCCTTGCCGGTTGGTATCATTCTCAGGCAATAATTACAACAGACTACTAC
C.f. 118 CTGCAATACACATTACCGGACGACACTATATCTCAGGCGATAAATTACAACAGACTACTAC

S.t. 181 CTCCGCTATTCAATTGAGTCACTACTTATTTTCCGAAAACGTACCGCAGCATTCC-GCTC
C.f. 178 CTGGCCTACCGGTTAAGTGCACATTTATTCTCAGGCACACGTACGGCGGCTTCCAGAGC

S.t. 240 ATT-AGATGACATTTCTTTG--TGGATTGAAAAGGGGTCCGCTCAGACAACTGATTGTAGA
C.f. 238 GTTGAGTCGGCCTTACCAGCATGCAAGAACCAGTAATTAGCCAGTTAG-TGATTG-ACA

S.t. 297 TATGGAGGCGCTACCTGTCTCCTGTATTGAGGCGCTTAACCAGCTACGCGCGCTCAGTTG
C.f. 296 TA-GAAAGCT-TAACACTCCCTATTTTCGATATACTTGAACGTTTGGCGCAGCTAATTAG

S.t. 357 GCAACAAAGCGATATCCAGATTTACCTGCTGGTATCA-----GATAAA-ACCTCCGCTA
C.f. 354 GCAGCGTAATGACATCCAGATCTTCATAATGCTTTCCAGTCTGTGATGAAGACCTGA-CTA

S.t. 410 TAACACAGTTTATCCGTATGGCTGGGCGTTTTTTTGTCTGTGCGGACGACAAAATCTGG
C.f. 413 C---CTTTATTTCACTAT--CCGGTCCATTTTATATCCTATCAC-ACAATTTACGCGCTT

S.t. 470 CCTCAG-TACGCGAAGCCTTGTATCAGCC---TCCAAAACCTCGCTTATCGGAAA-GCTT
C.f. 466 CCGGAGGTGCGTCACGCCTTATTATC-GCCGGTTCCCTGACTATATTCAATTCAGACGCAT

S.t. 525 TAGCCGTA CTGACTGGTTGATGATTGAA--ACTTTAGCGCAAGGCGCCTCTTAAAAAGAA
C.f. 525 AAATCAGCTCGATTGGGAGATGATTGCCTTACTTTTA--CAAGGTAACCTCTTAAAAAAG

S.t. 583 ATAGCAC-GTCAGCAAAGCGTACCTTATCATCGTGTAGTTTACCGGCTTAAACAACCTTAT
C.f. 583 ATTGCATGTGTA-CAAACACAACCCTACCACCGTATCATCTATCGACTGAACCAATTGAT

S.t. 642 CACCCTCCTTAACCTTCCCACAGGCAAAGCTTTCTTCGGCTGATCCAGCAGCTAAACGT
 C.f. 642 TACGCGCCTGGGGTTACCCAGCAGACAACGCTTTTTTGCATCTGATACACCGCCTCAACGT

S.t. 702 TACTTTCCACGACATTT--TTTAA
 C.f. 702 TACCT--CTCTTCATTTAATTTAA

fimZ

S.t. 1 ATGAAACCTGCATCTGTTATCATTATGGACGAACACCCTATTGTAAGAATGTCGATCGAA
 C.f. 1 ATGAAACCAGCATCCGTTATCATTATGGACGAACACCCTATTGTCAGAATGTCGATAGAA

S.t. 61 GTTTTACTCGGTAAAAATAGCAATATTCAGGTTGTCTTGAAAACGGATGATAGCCGAACA
 C.f. 61 GTACTACTCGAGAAAAACAGTAATATTCAGGTAATATTGAAAACCGACGACAGCCGTACG

S.t. 121 GCGATAGAGTATCTGCGCACTTATCCTGTTGACCTTGTGTCATTCTGGATATTGAATTACCG
 C.f. 121 GCAATAGAACACCTGCGCACATACCCGGTCGATCTTGTGTCATCTGGATATTGAATTACCT

S.t. 181 GGCACCGACGGCTTTACCTTACTTAAACGAATCAAATCTATCCAGGAACATACCCGGATA
 C.f. 181 GGTTCGGATGGATTTACATTACTCAAGAGAATAAAGTCTCTGCAGGAGAAAACCTCGGGTG

S.t. 241 CTTTTTTTTATCGTCGAAATCAGAGGCTTTTTTATGCCGGAAAGCAATAAGAGCGGGCGCA
 C.f. 241 CTGTTTTCTCTTCCAAATCGGAGTCTTTTTTATGCCGGGCGTGCTATCCGGGCCGGTGCA

S.t. 301 AACGGATTTGTAAGTAAACGCAAAGACCTCAATGATATTTATAATGCGGTAAAAATGATT
 C.f. 301 AATGGTTTTGTCCAGTAAACGAAAGGATCTCAATGATATCTACAATGCAGTAAAAATGATT

S.t. 361 TTATCCGGCTATTCTTTTTTCCCATCTGAGACGCTTAATTTTCATCAGTAATACCCGTACC
 C.f. 361 TTATCCGGATATTCTTTTTTCCCCTCGGACACCCTTAATTTTCATTAACAATAAACCACA

S.t. 421 CCCAAAGGCGGGCACCATGATATGCCACTATCTAACCGCGAAGTTACCGTGCTGCGCTAT
 C.f. 421 CAAAAGGTGTGCTGAATGACATGCCGCTCTCTAACCGCGAGGTTACGGTTTTGCGTTAT

S.t. 481 CTGGCCAATGGAATGTCTAACAAAGAAATTGCCGAGCAACTTTTATTGAGTAAACAAGACT
 C.f. 481 CTGGCAAACGGTCTGTCCAATAAGGAAATTGCTGAACAGTTGTTACTCAGCAATAAAACG

S.t. 541 ATCAGCGCGCATAAAGGCCAATATATTTCTAAACTTGGCCTTCACTCTATCGTTGAGCTT
 C.f. 541 ATTAGCGCTCACAAAGGCCAATATCTACTCCAAGCTCGGGTTGCACACCATCGTTGAGCTG

S.t. 601 ATCGATTACGCCAAATCACACGAATTATTGTAA
 C.f. 601 ATCGATTATGCAAAAATGCATGAGTTAATGTAA

■ identische Bereiche
 ■ homologe Bereiche

7.4 PCR Ergebnisse zur Analyse von Deletionen im Bereich des *fim* Genclusters in uropathogenen Patientinnen-Isolaten

In Tab. 19 sind die Ergebnisse der einzelnen PCRs mit den verschiedenen Primerkombinationen aufgeführt. Ein graphischer Überblick ist in Abb. 27 (s. Kap. 4.5) wiedergegeben.

Tab. 19 PCR Ergebnisse zur Charakterisierung von Deletionen im Bereich des *fim* Genclusters in uropathogenen Isolaten aus Patientinnen mit chronisch rezidivierenden Harnwegsinfektionen

Nr.	Primerpaar	erwartete PCR Produkte in bp		amplifizierte PCR Produkte in bp																				
		MG1655	Δfim^a	MG1655	AAEC189	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
1	ECnogene1 ECfimB3	1085	—	1085	—	—	—	—	—	—	—	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1085	
2	ECnogene2 ECfimB3	523	—	523	—	—	—	—	—	—	—	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	523	
3	ECfimH3 ECgntP1	566	—	566	—	—	—	—	—	—	—	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	566	
4	ECfimH3 ECgntP2	857	—	857	—	—	—	—	—	—	—	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	857	
5	ECnogene1 ECgntP2	10092	1338	— ^b	—	2100	2100	2100	2100	2100	2100	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
6	ECnogene2 ECgntP1	9239	485	— ^b	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	— ^b	
7	ECuxuA1 ECuxuB1	518	518	518	518	518	518	518	518	518	518	518	—	518	518	—	518	—	518	518	—	518	518	
8	ECyjhT1 ECyjhA1	603	603	603	603	603	603	603	603	603	603	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	603	
9	ECgntP4 ECuxuA2	520	520	520	520	520	520	520	520	520	520	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	520	
10	ECyjhA2 ECuxuA2	12266	3512	— ^b	2200	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
11	ECyjhQ1 ECyjhQ2	494	494	494	494	200	200	200	200	200	200	—	500	—	350	—	—	—	—	—	—	350	350	200

Nr.	Primerpaar	erwartete PCR Produkte in bp		amplifizierte PCR Produkte in bp																			
		MG1655	Δfim^a	MG1655	AAEC189	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
12	ECyjhR1 ECyjhS1	712	712	712	712	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	712
13	ECnogene1 ECgntP3	10712	1957	— ^b	690	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
14	ECnogene1 ECuxuA2	11494	2739	— ^b	1500	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
15	ECyjhA1 ECyjhS2	1567	1567	1567	1567	1567	1567	1567	1567	1567	1567	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1567
16	ECnogene2ent ECnogene1	583	583	583	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	583
17	ECnogene1ent ECyjhA2	795	795	795	795	795	795	795	795	795	795	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	795
18	ECgntP1ent ECgntP2	311	311	311	—	311	311	311	311	311	311	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	311
19	ECyjhS2 ECyjhT2	280	280	280	280	280	280	280	280	280	280	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	280
20	ECgntP1ent ECgntP3	910	910	910	—	910	910	910	910	910	910	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	910
21	ECfimA1 ECfimA2	528	—	528	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	528
22	ECfimBuni ECfimBrev	560	—	560	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	560
23	ECfimE1 ECfimE2	503	—	503	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	503
24	ECfimI1 ECfimI2	529	—	529	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	529

Nr.	Primerpaar	erwartete PCR Produkte in bp		amplifizierte PCR Produkte in bp																			
		MG1655	Δfim^a	MG1655	AAEC189	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
25	ECfimC1 ECfimC2	536	—	536	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	536
26	ECfimD1 ECfimD2	524	—	524	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	524
27	ECfimF1 ECfimF2	456	—	456	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	456
28	ECfimG1 ECfimG2	484	—	484	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	484
29	ECfimH1 ECfimH2	1225	—	1225	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1225
30	ECinsA ECinsB	603 ^c	603 ^c	603 ^c	603 ^c	603 ^c	603 ^c	603 ^c	603 ^c	603 ^c	603 ^c	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
31	ECfimH4 ECinsB1	—	779 ^d	—	—	779	779	779	779	779	779	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
32	ECyjhP1 ECyjhP2	546	546	546	546	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
33	ECsgcX1 ECsgcX2	544	544	544	544	900	900	900	900	900	900	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
34	ECsgcC1 ECsgcC2	521	521	521	521	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
35	ECsgcQ1 ECsgcQ2	493	493	493	493	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
36	ECyjhR2 ECyjhR3	797	797	797	797	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
37	ECfecR1 ECfecR2	536	536	536	536	536	536	536	536	536	536	—	536	—	—	—	700	—	—	—	—	—	536

Nr.	Primerpaar	erwartete PCR Produkte in bp		amplifizierte PCR Produkte in bp																			
		MG1655	Δfim^a	MG1655	AAEC189	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
38	ECfecl1 ECfecl2	504	504	504	504	504	504	504	504	504	504	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	504
39	ECyjhU1 ECyjhU2	563	563	563	563	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
40	ECyjhF1 ECyjhF2	542	542	542	542	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
41	ECfecl3 ECIS1F2	611	611	611	611	611	611	611	611	611	611	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	611
42	ECyjhG1 ECyjhG2	542	542	542	542	—	—	—	—	—	—	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	—

^a wenn das *fim* Gencluster vom Startcodon von *fimB* bis zum Stoppcodon von *fimH* deletiert wäre

^b Amplifikation des erwarteten PCR Produkts ist bei gewählter Elongationszeit nicht möglich

^c mehrere IS1 Kopien im *E.coli* Genom vorhanden

^d gilt nur für die Patientinnen-Isolate Nr. 1-6

nd: nicht durchgeführt

7.5 Publikationen und Tagungsbeiträge

Hess, P., Daryab, N., Michaelis, K., Reisenauer, A., Oelschlaeger, T.A. (2000). Type 1 pili of *Citrobacter freundii* mediate invasion into host cells. Adv. Exp. Med. Biol. 485 (6): 225-235.

Hess, P., Altenhöfer, A., Khan, A. S., Daryab, N., Kim, K. S., Hacker, J., Oelschlaeger, T. A. (2003). A *Salmonella fim*-homologue in *Citrobacter freundii* mediates invasion *in vitro* and crossing of the blood brain barrier in the rat pub model. Infect. Immun. Eingereicht.

Vorträge

Hess, P., Hacker, J., Oelschlaeger, T.A. (1999). Eine Typ 1 Fimbriendeterminante aus *Citrobacter freundii* Stamm 3009 vermittelt Invasivität. 4. Minisymposium „Mikrobielle Pathogenität“, Burg Rothenfels, Deutschland, 18.–20.06.1999.

Hess, P., Daryab, N., Michaelis, K., Reisenauer, A., Oelschlaeger, T.A. (1999). Type 1 pili of *Citrobacter freundii* mediate invasion into host cells. FEMS Symposium, Genes and proteins underlying microbial urinary tract virulence. Basic aspects and applications, Pecs, Ungarn, 16.–19.09.1999.

7.6 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Petra Hess
geboren am: 01.11.1969 in Diez/Lahn
Familienstand: ledig

Schulbildung

1976 – 1980 Grundschule in Hahnstätten
1980 – 1989 Gymnasium in Diez; Abschluss: Abitur

Hochschulausbildung

1989 – 1996 Studium der Chemie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

11/95 – 09/96 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biotechnologie, Universität Würzburg, Prof. Dr. U. Zimmermann

09/97 – 04/98 Praktikum am Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg, Dr. T. A. Oelschlaeger

seit 05/98 Promotion am Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg, Prof. Dr. Dr. h.c. J. Hacker