

2. Konstruktion und Charakterisierung einer *stx*₂-Mutante im *E. coli*-Stamm

O157:H7 86-24

Die Konstruktion einer isogenen Toxinmutante des Stx₂-produzierenden EHEC-Stamm O157:H7 86-24 und deren Charakterisierung hatten zum Ziel, zur Aufklärung der Rolle des Toxins in der Pathogenese von EHEC beizutragen. Außerdem sollte die Toxinmutante in Kombination mit einem nichttoxischen Fusionsprotein aus beiden Toxinuntereinheiten als Ausgangsstamm für die Konstruktion eines EHEC-Lebendvakzins dienen. Die praktischen Arbeiten an diesem Projekt wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. A. Donohue-Rolfe an der TUFTS University, Veterinary School, North Grafton, USA, durchgeführt.

2.1 Konstruktion des Plasmids pTUV2

Die Konstruktion der isogenen *stx*₂-Mutante wurde durch einen Allelaustausch mit Hilfe Plasmids pTUV2, das hierfür konstruiert wurde, durchgeführt. Im λ -*pir*-abhängigen Suizidvektor pGP704 wurde zusätzlich zur Einführung einer *sacB*-Kassette ein Teil des *stxA*₂-Gens und benachbarter "upstream"-Phagensequenzen mit einem Teil des *stxB*₂-Gens und der anschließenden "downstream"-Sequenzen fusioniert, so daß eine Deletion im zentralen Bereich des *stx*₂-Genclusters entstand (Schematische Darstellung s. Abbildung 15).

Mithilfe von PCR wurden die "upstream"- und die "downstream"-Regionen der zu deletierenden *stx*₂-Region amplifiziert. Die Wahl entsprechender Primer gewährleistete den Einbau zusätzlicher Schnittstellen für Restriktionsenzyme an den Enden der PCR-Produkte, über die deren Klonierung in den Suizidvektor pGP704 erfolgte. Das "upstream"-Produkt wurde mit den Primern UB-2 und UB-3 amplifiziert, es umfaßte die Basenpaare 92 bis 701 der Genkarte für *stx*₂ und hatte eine Länge von 626 bp (inclusive der zusätzlichen Nukleotide für die neuen Restriktionsschnittstellen) (Jackson *et al.*, 1987, GenBank accession no. X07865). Dabei wurden am 5'-Ende eine *Xba*I- und am 3'-Ende eine *Bam*HI-Schnittstelle an die *stx*₂-Sequenz angehängt. Der "downstream"-Bereich wurde mithilfe der Primer FG-1 und FG-2 ab Base 1.291 in *stxB*₂ bis 870 bp "downstream" von FG-1 amplifiziert, was eine Fragmentlänge von 885 bp ergab (inklusive Restriktionsschnittstellen) (Gunzer *et al.*, 1998). Die zusätzlich eingeführten Restriktionsschnittstellen waren am 5'-Ende *Bam*HI- sowie am 3'-Ende *Eco*RI-spezifisch.

Für die Klonierung wurden beide PCR-Produkte und der Vektor pGP704 mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten. Dann wurden die PCR-Fragmente über ihre

*Xba*I- und *Eco*RI-Schnittstellen in den ebenso geschnittenen Vektor ligiert, so daß sich beide Fragmente über ihre noch freien *Bam*HI-geschnittenen Enden verbinden konnten. Das so entstandene Plasmid pTUV1 wurde in den *E. coli* K-12-Stamm SM10*Ipir*, der das vom *pir*-Gen kodierte π -Protein produziert und in dem das Plasmid replizieren kann, transformiert und überprüft. Auf diese Art und Weise wurde ein Plasmid geschaffen, das etwa 0,6 kb "upstream"- und 0,9 kb "downstream"-Sequenzen des *stx*₂-Genclusters einschließlich Teilen der Strukturgene für die A- und die B-Untereinheiten enthält. Die Deletion im zentralen Bereich des Genclusters umfaßt 589 bp und schließt die Sequenzen für die Aminosäure Glutaminsäure 167, die Bestandteil des enzymatisch aktiven Zentrums ist (Jackson *et al.*, 1990), und das gesamte Signalpeptid der B-Untereinheit mit ein.

Weiterhin erwies es sich als sinnvoll, in das Plasmid ein System für eine positive Selektion auf den Verlust des Vektors zu integrieren, d.h. ein System, das unter einer spezifischen Selektion bei der Abwesenheit des Vektors Wachstum ermöglicht, nicht aber bei dessen Anwesenheit. Für diesen Zweck wurde das Enzym Levansaccharase ausgewählt, das vom *Bacillus subtilis* Gen *sacB* kodiert wird (Lepesant *et al.*, 1972). Bei Anwesenheit dieses Enzyms auf Saccharose-haltigen Agarplatten wird das Polysaccharid Levan synthetisiert, was eine starke Wachstumsinhibition gram⁻ Stämme mit diesem Gen zur Folge hat (Gay *et al.*, 1983, Gay *et al.*, 1985). Eine entsprechende *Bam*HI-geschnittene *sacB*-Kassette wurde in die *Bgl*II-Schnittstelle des Vektors eingesetzt und das Plasmid wiederum in *E. coli* SM10*Ipir* eingeführt und überprüft. Dieses nun pTUV2 benannte Plasmid wurde für die Konstruktion der *stx*₂-Mutante eingesetzt (siehe Abbildung 15, Plasmidkarte im Anhang).

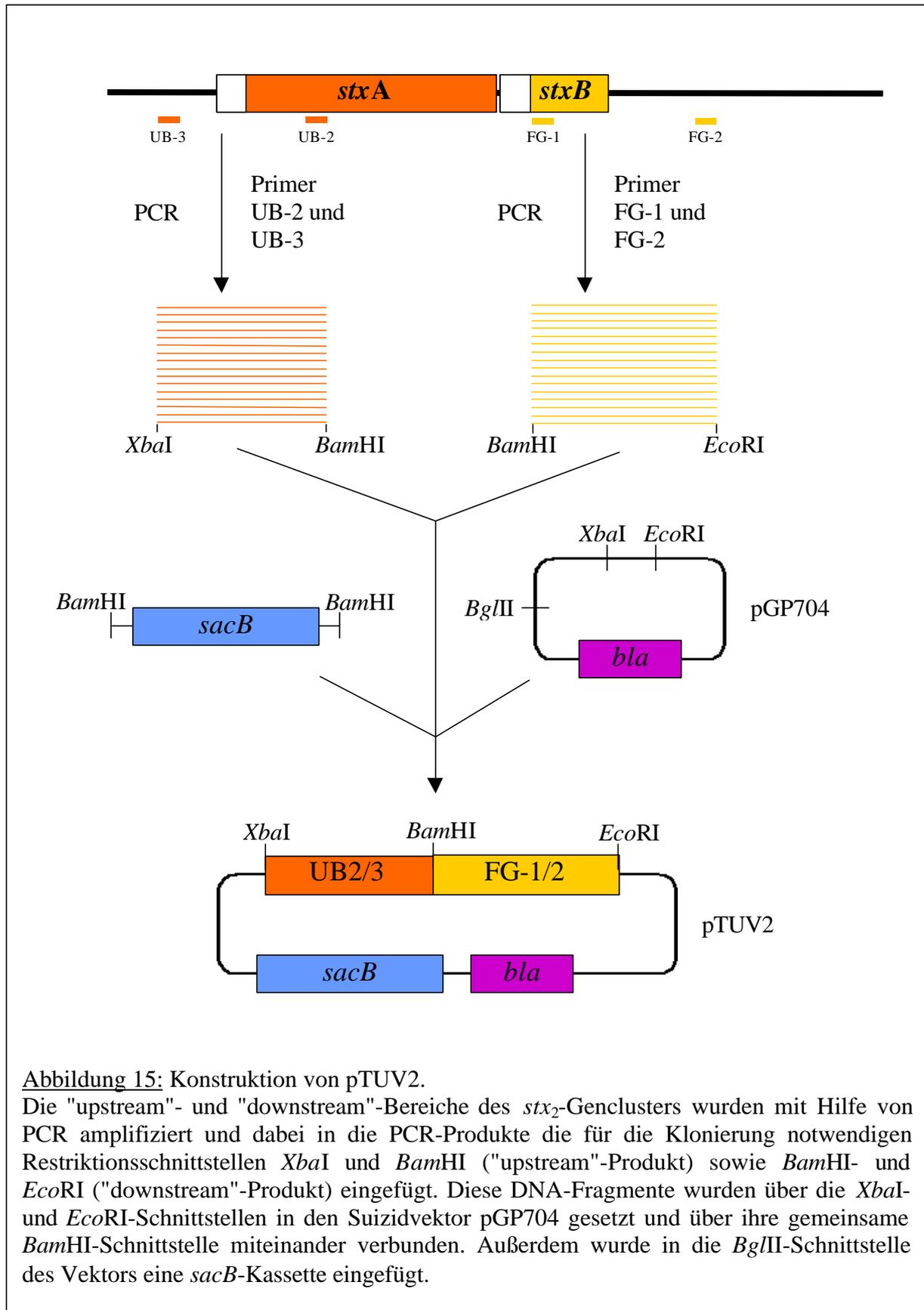


Abbildung 15: Konstruktion von pTUV2.

Die "upstream"- und "downstream"-Bereiche des *stx*₂-Genclusters wurden mit Hilfe von PCR amplifiziert und dabei in die PCR-Produkte die für die Klonierung notwendigen Restriktionsschnittstellen *XbaI* und *BamHI* ("upstream"-Produkt) sowie *BamHI*- und *EcoRI* ("downstream"-Produkt) eingefügt. Diese DNA-Fragmente wurden über die *XbaI*- und *EcoRI*-Schnittstellen in den Suizidvektor pGP704 gesetzt und über ihre gemeinsame *BamHI*-Schnittstelle miteinander verbunden. Außerdem wurde in die *BglIII*-Schnittstelle des Vektors eine *sacB*-Kassette eingefügt.

2.2 Konstruktion der EHEC *stx*₂-Mutante TUV86-1

Für die gezielte Einführung der *stx*₂-Deletion durch homologe Rekombination in den *Stx*₂-produzierenden streptomycinresistenten (Sm^R) EHEC-Stamm O157:H7 86-24 wurde das Plasmid pTUV2 aus dem *E. coli* Donorstamm SM10*Ipir*(pTUV2) in den Rezipienten-EHEC-Stamm konjugiert. Da sich das Plasmid in diesem *E. coli* Wildstamm, dem das π -Protein fehlt, nicht als Episom replizieren kann, wird es sich hier nur dann etablieren, wenn es über die homologen *stx*₂-flankierenden Sequenzen an der Stelle des *stx*₂-Genclusters über ein Einzelcrossover ins Genom integriert. Die Einführung der plasmidkodierten Ampicillin-Resistenz in den streptomycinresistenten EHEC-Stamm erlaubte die Unterscheidung entsprechender EHEC-Kointegranenstämmen von beiden Ausgangsstämmen durch Doppelselektion auf beide Antibiotikaresistenzen. Die Kointegranen wurden genotypisch mittels PCR und Southern-Hybridisierung auf die Integration des Plasmids ins Genom wie im folgenden Kapitel beschrieben überprüft.

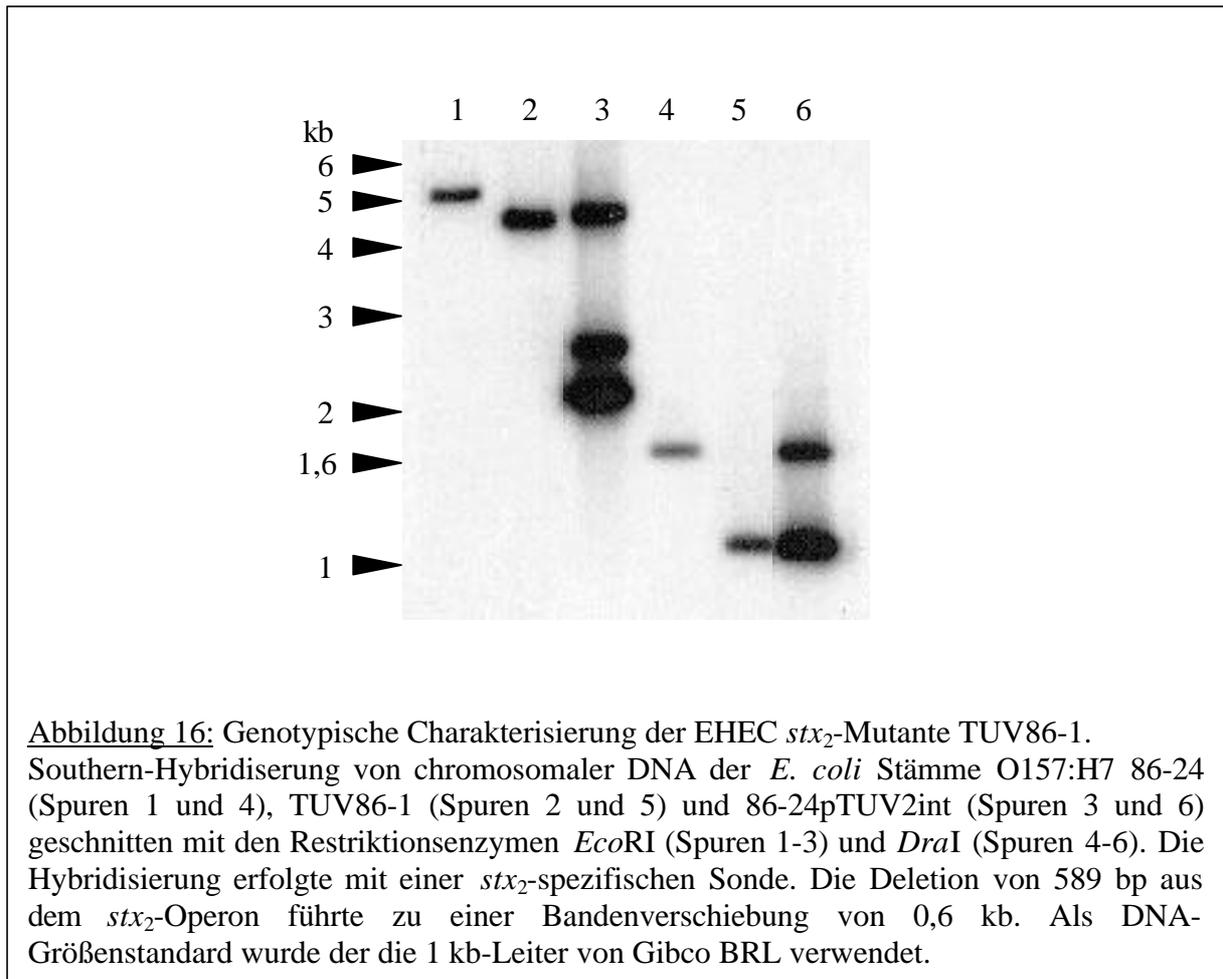
Ausgehend von einem geeigneten Kointegranenstamm war es notwendig, ein zweites Crossover des integrierten Plasmids mit den wildtypischen *stx*₂-Sequenzen zu induzieren, um die Plasmidsequenzen zusammen mit der intakten *stx*₂-Genregion zu deletieren. Zu diesem Zweck wurde ein Kointegranenstamm ohne Selektionsdruck hochgezüchtet und die Kultur anschließend auf 10 % Saccharoseplatten ausplattiert, auf denen in der Kultur verbliebene Kointegranen in ihrem Wachstum gehemmt wurden. Die hochwachsenden Klone wurden zusätzlich auf den Verlust der Ampicillinresistenz überprüft und anschließend genotypisch und phänotypisch charakterisiert.

2.3 Genotypische Charakterisierung der EHEC *stx*₂-Mutante TUV86-1

Die genotypische Charakterisierung der EHEC *stx*₂-Mutante TUV86-1 erfolgte mittels PCR und Southern-Hybridisierung. Mithilfe der Primer FG-2 und UB-3 konnte im wildtypischen EHEC-Stamm O157:H7 86-24 ein etwa 2,1 kb großes, die gesamte intakte *stx*₂-Region umfassendes PCR-Fragment amplifiziert werden, dessen Größe im Mutantenstamm TUV86-1 um ca. 0,6 kb auf 1,5 kb verringert war. Der Nachweis des Verlustes der wildtypischen *stx*₂-spezifischen Sequenzen erfolgte mithilfe der Primer SF-1 und SF-2, mit denen im Wildstamm ein 524 bp großes Fragment gebildet wird. Beide Primer binden im Bereich der *stx*₂-Deletion, so daß in der Mutante kein PCR-Fragment mehr produziert werden konnte. Dasselbe Ergebnis erzielte eine PCR mit den *stx*₂-spezifischen Primern SLT-II-1 und SLT-II-2 (Olsvik und Strockbine, 1993), wobei die Bindungsstelle für SLT-II-2 ebenfalls in

der Deletion liegt. Auch der Verlust der *sacB*-Sequenzen wurde durch PCR nachgewiesen. Die *sacB*-spezifischen Primer SF-3 und SF-4 liefern ein 690 bp großes Fragment, das nur in Stämmen, die pTUV2 enthalten, nachweisbar ist, nicht aber im EHEC-Wildstamm und in der Mutante. Auf diese Weise wurde aus einer Vielzahl möglicher Mutanten diejenige isoliert, die den genetischen Anforderungen entsprach.

Zur Überprüfung dieser Ergebnisse wurde mit dem so identifizierten Mutantenstamm eine Southern-Hybridisierung durchgeführt. Hierfür wurde mit den Enzymen *EcoRI* oder *DraI* geschnittene chromosomale DNA der Mutante *E. coli* TUV86-1, des EHEC-Wildstamms O157:H7 86-24 sowie des Kointegranstamms *E. coli* 86-24pTUV2int verwendet. Die *stx*₂-spezifische Hybridisierung erfolgte mit dem ³²P-markierten DNA-Fragment aus einer PCR des EHEC-Stamms 86-24 mit den Primern SLT-II-1 und SLT-II-2, die beide im *stxA*₂-Gen binden. *EcoRI* erkennt Sequenzen außerhalb des *stx*₂-Operons und ergibt mit DNA des EHEC-Wildstamms in einer *stx*₂-spezifischen Southern-Hybridisierung ein ca 4,9 kb großes Fragment. *DraI*-spezifische Schnittstellen liegen innerhalb des *stx*₂-Operons und das entsprechende hybridisierende wildtypische DNA-Fragment hat eine Größe von etwa 1,7 kb. Durch die Deletion von 589 bp sollten sich beide *stx*₂-positiven Fragmente im Mutantenstamm TUV86-1 um ca. 0,6 kb verkürzen, was in einer Southern-Hybridisierung nachgewiesen wurde (s. Abbildung 16). Die mutierten *EcoRI*- bzw. *DraI*-Fragmente wiesen demnach Längen von 4,3 kb bzw. 1,1 kb auf. Im Kointegranstamm *E. coli* 86-24pTUV2int wurden im *DraI*-Verdau beide Fragmente nachgewiesen. Die Analyse *EcoRI*-geschnittener DNA ergab hingegen drei hybridisierende Fragmente, was auf eine Doppelintegration des Plasmids pTUV2 in den Stamm schließen läßt. Das aus dem integrierten Suizidvektor ausgeschnittene, mit der *stx*₂-Sonde hybridisierende Fragment hat eine Größe von 2,1 kb und ist als kleinstes Fragment auf dem Blot zu sehen, die beiden anderen Banden entsprechen den Sequenzen des durchtrennten wildtypischen Ausgangsfragments inklusive Bereichen aus pTUV2.



2.4 Phänotypische Charakterisierung der EHEC *stx*₂-Mutante TUV86-1

Der *E. coli* Stamm TUV86-1 wurde mit seinem Ausgangsstamm O157:H7 86-24 in einer Reihe von phänotypischen Untersuchungen verglichen.

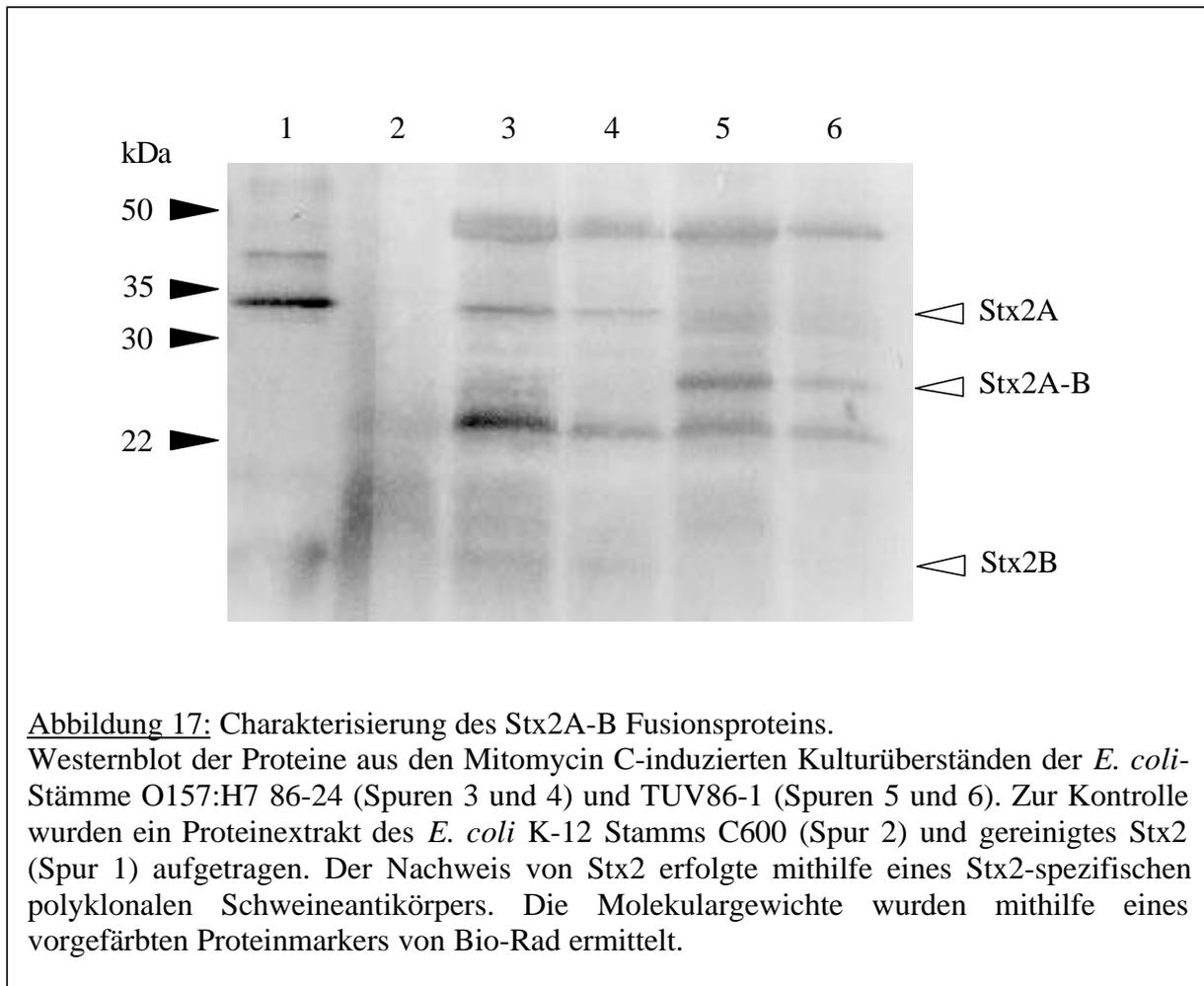
Zunächst wurde überprüft, ob der mutierte Bakteriophage noch replikationsfähig war. Zu diesem Zweck wurde der *E. coli* Stamm TUV86-1 mit UV-Licht behandelt und diese Kultur einem Phagen-Plaques-Test unterworfen. Es stellte sich heraus, daß der mutierte Bakteriophage noch induzierbar war und den *E. coli* K-12 Stamm C600 infizieren konnte, was zur Bildung kleiner trüber Plaques im *E. coli* C600-Rasen führte, die denen des wildtypischen Phagen ähnlich waren. Ein Plaques wurde gepickt, in Medium suspendiert und die Suspension ausplattiert. Die hochgewachsenen Klone wurden in einer Kolonie-Hybridisierung mit der *stx*₂-spezifischen ³²P-markierten Sonde aus einem PCR-Produkt mit den Primern SLT-II-1 und SLT-II-2 im EHEC-Wildstamm 86-24 auf die Anwesenheit von Phagensequenzen getestet. Die positiven Klone wurden mehrfach vereinzelt und nochmals in einer PCR mit den Primern FG-2 und UB-3 überprüft, die das erwartete *stx*₂-Fragment mit der 0,6 kb Deletion

ergaben. Auf diese Weise wurde nachgewiesen, daß der mutierte Bakteriophage aus der *E. coli*-Toxinmutante TUV86-1 intakt ist.

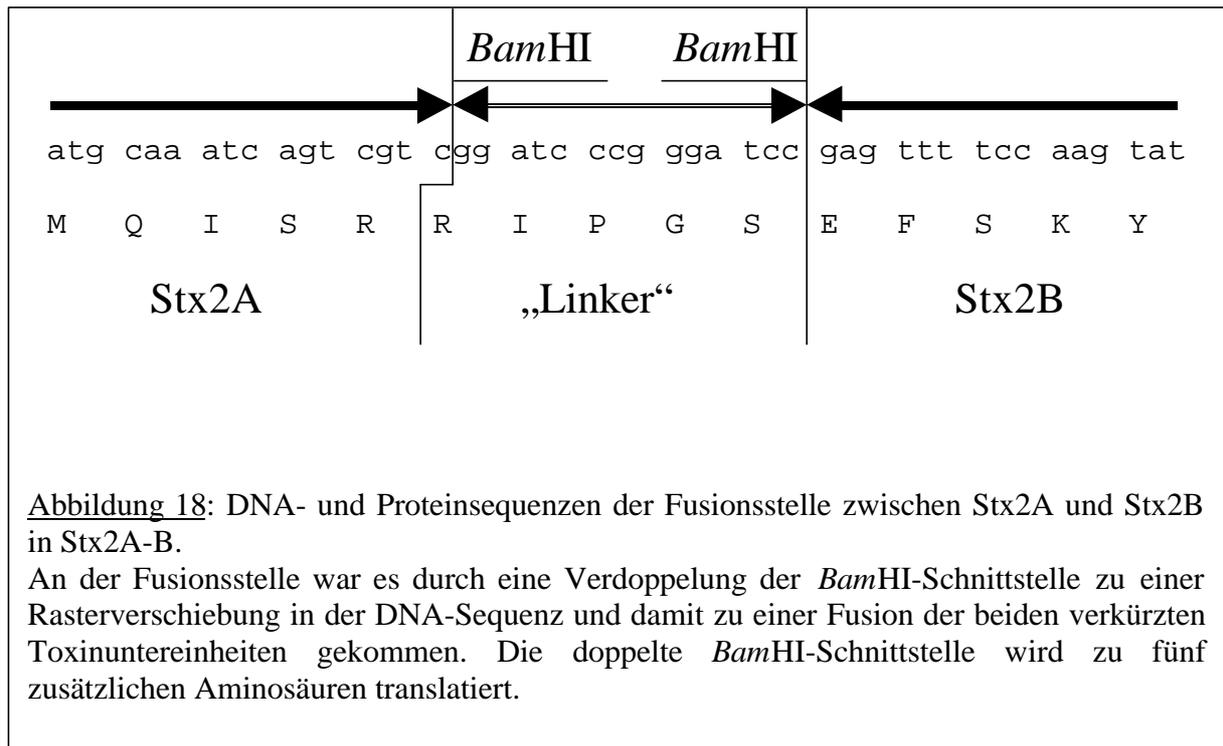
Weiterhin wurde die EHEC-Toxinmutante auf den Verlust ihrer Cytotoxizität im [³H]Leucin-Inkorporationsassay (Keusch *et al.*, 1988) mit HeLa-Zellen getestet. Die Inkubation der Zellen erfolgte mit Zellkulturüberständen und Periplasma-Extrakten aus Mitomycin C-induzierten und nichtinduzierten Kulturen der *E. coli*-Stämme O157:H7 86-24 und TUV86-1. Im Gegensatz zu den Extrakten aus dem Wildstamm zeigten weder Überstand noch Periplasmaextrakt der *stx*₂-Mutante cytotoxische Wirkung auf die HeLa-Zellen. Zusätzlich wurde die Mutante in einem Toxin-Sandwich-ELISA (Acheson *et al.*, 1989) auf die Produktion von Stx2 getestet. In diesem System wird Stx2 von dem monoklonalen Antikörper 4D1, der spezifisch ist für die B-Untereinheiten von Stx und Stx2 (Donohue-Rolfe *et al.*, 1989), in Kombination mit polyklonalem Stx2-spezifischem Kaninchenantiserum (Donohue-Rolfe *et al.*, 1984) detektiert. Auch hier konnten keinerlei Stx2-spezifischen Antigene nachgewiesen werden.

2.5 Charakterisierung des Stx2A-B Fusionsproteins

Kulturen der *E. coli*-Stämme O157:H7 86-24 und TUV86-1 wurden mit Mitomycin C induziert, die Überstände isoliert und die löslichen Proteine mit Ammoniumsulfat gefällt. Mit Hilfe eines Stx2-spezifischen polyklonalen Schweineantikörpers wurde im Westernblots der Nachweis für die Abwesenheit von intaktem Stx2 in Zellkulturüberständen von *E. coli* TUV86-1 erbracht. Im Vergleich zum Wildstamm war der Verlust der Stx2-spezifischen Banden von 32 kDa und 7,7 kDa zu beobachten. An deren Stelle trat in der Mutante ein neues 24 kDa großes Protein in Erscheinung, das sich als ein Fusionsprotein aus den durch die Deletion verkürzten A- und B-Untereinheiten des Toxins erwies (s. Abbildung 17).



Eine Sequenzanalyse des Plasmids pTUV2 mit dem Primer FG-5 zeigte, daß das Protein durch eine Verdoppelung der *Bam*HI-Schnittstelle an der Fusionsstelle zwischen "upstream"- und "downstream"-PCR-Fragment zustande gekommen war. Die N-terminalen 154 Aminosäuren der 319 Aminosäuren großen nichtprozessierten StxA2-Untereinheit (48,3 %) fusionierten mit den C-terminalen 62 Aminosäuren der normalerweise 89 Aminosäuren langen nichtprozessierten StxB2-Untereinheit (69,7 %). Die Deletion umfaßte dabei den enzymatisch aktiven Bereich und den C-Terminus von StxA2 und etwas mehr als die Leadersequenz von StxB2. An der Fusionsstelle wurde die Sequenz der verdoppelten *Bam*HI-Schnittstelle zu 5 zusätzlichen Aminosäuren translatiert (s. Abbildung 18). Das Fusionsprotein hat eine Gesamtlänge von 221 Aminosäuren, die rechnerisch 24,31 kDa entsprechen, was der Größe des auf dem Blot in Erscheinung tretenden Proteins entspricht. Es ist nicht cytotoxisch und wird von polyklonalem anti-Stx2-Schweineantikörper erkannt (s. Abbildung 17).



Zusammenfassung

Aus dem EHEC-Stamm O157:H7 86-24 wurde die isogene *stx*₂-Mutante TUV86-1 konstruiert. Die Deletion umfaßt 589 bp aus dem zentralen Bereich des *stx*₂-Genclusters und wurde mittels PCR und Southern Hybridisierung bestätigt. Dabei fusionierte der C-Terminus des verkürzten StxA2 mit dem N-terminalen Bereich von StxB2, wobei das enzymatisch aktive Zentrum der A-Untereinheit und wenig mehr als die Leadersequenz der B-Untereinheit verloren gingen. *E. coli* TUV 86-1 zeigte im [³H]Leucin-Inkorporationsassay keinerlei Zytotoxizität mehr gegen HeLa-Zellen. Das produzierte Fusionsprotein wurde im Westenblot von Schweineantiserum immunologisch erkannt, konnte aber im ELISA nicht nachgewiesen werden. Der mutierte Bakteriophage war intakt, er war noch fähig zu Induktion, Infektion und Lysogenisierung eines Wirtsstamms.