

**Studien zu Virulenzeigenschaften typischer und
atypischer uropathogener *Escherichia coli***

**Studies on virulence properties of typical and
atypical uropathogenic *Escherichia coli***



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

vorgelegt von

Roswitha Dorothee Schiller

aus Berlin

Würzburg 2014

Eingereicht am: 25.07.2014

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Alexander Buchberger

1. Betreuer: Prof. Dr. Ulrich Dobrindt

2. Betreuer: Prof. Dr. M. Alexander Schmidt

3. Betreuer: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Jörg Hacker

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Studien zu Virulenzeigenschaften typischer und atypischer uropathogener *Escherichia coli*“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

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

Würzburg, Juli 2014

Roswitha Schiller

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “Studies on virulence properties of typical and atypical uropathogenic *Escherichia coli*” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All source and/or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as a part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg, July 2014

Roswitha Schiller

Contra omnes molestias!

Danksagung

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Ulrich Dobrindt (*Institut für Hygiene, Uniklinikum Münster*) für die Vergabe des interessanten Projektes sowie die stete Förderung und Unterstützung während meiner Zeit als Doktorandin. Ich bedanke mich vor allem für seine Motivation, Kritik und Geduld, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben sowie für das Ermöglichen der Teilnahme an internationalen Symposien.

Für ihre Bereitschaft zur Mitgliedschaft in meinem Prüfungskomitee und die damit verbundene Erstellung des Zweit- und Drittgutachtens möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. M. Alexander Schmidt (*Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung, Universität Münster*) und Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Jörg Hacker (*Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina, Halle*) bedanken.

Prof. Dr. Joachim Morschhäuser (*Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg*) danke ich für die Übernahme der Prüfungsvertretung von Prof. Hacker in meinem Promotionskolloquium.

Zudem bedanke ich mich bei Prof. Hacker und Prof. Dr. Jörg Vogel (*Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg*) für die Zurverfügungstellung des Arbeitsplatzes am IMIB.

Großer Dank gilt Dr. Inga Benz und Prof. M. Alexander Schmidt (*Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung, Universität Münster*) für die Bereitstellung der AIDA-I-spezifischen Plasmide und Antikörper.

Für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen möchte ich mich bei Dr. Michael Mormann (*Institut für Hygiene, Uniklinikum Münster*) bedanken.

Ich danke Dr. Daniel Engel (*Institut für Experimentelle Immunologie, Uniklinikum Bonn*) für die Einweisung in die Arbeit mit dem experimentellen Tiermodell der aufsteigenden Harnwegsinfektion.

Für ihre Unterstützung bei sämtlichen Arbeiten im Tierstall bedanke ich mich ganz herzlich bei Christina Daumberger (*Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg*).

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei der Graduate School of Life Sciences (GSLs) der Universität Würzburg für die Organisation des Graduiertenprogramms und die Möglichkeit der Teilnahme an abwechslungsreichen Workshops. Spezieller Dank gilt hier Dr. Gabi Blum-Oehler und Jenny Braysher, die mir bei administrativen Fragen immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Einen Dank auch an die Mitarbeiter der „Studentischen Statistischen Beratung“ des Lehrstuhls für Mathematik VIII (*Universität Würzburg*) sowie der „Statistischen Beratung“ des Instituts für Biometrie und Klinische Forschung (*Universität Münster*) für gute Anregungen und Tipps hinsichtlich der Datenauswertung.

Den Mitarbeitern des IMIB sowie des Instituts für Hygiene möchte ich für die gute Arbeitsatmosphäre, stete Hilfsbereitschaft und schnelle Lösung technischer Probleme danken.

Allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern der *E. coli*-Arbeitsgruppe, insbesondere Barbara, Ingmar, Andreas und Nadine danke ich für die gute Zeit und die gegenseitige Hilfe und Unterstützung bei der täglichen Laborarbeit.

Ich bedanke mich außerordentlich bei Sabrina, Anja, Christiane und Sandy für ihre stets aufbauenden Worte, wenn es mal nicht so gut lief, sowie für die schöne gemeinsame Zeit am Institut und vor allem auch außerhalb des Labors (z.B. im Pixie's....Sláinte!).

Zum Schluss möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie und meinem Freund Johannes für den festen Glauben an mich sowie die kontinuierliche Unterstützung und Aufmunterung in schwierigen Phasen bedanken und letztlich bei mir selbst für mein Durchhaltevermögen.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
Summary.....	3
1 Einleitung.....	5
1.1 Die Spezies <i>Escherichia coli</i>	5
1.2 Harnwegsinfektionen und uropathogene <i>Escherichia coli</i> (UPEC).....	7
1.2.1 Der uropathogene <i>E. coli</i> Stamm 536.....	12
1.3 Bakterielle Fitness	14
1.4 Das Autotransporteradhäsin Antigen 43 – Virulenz- oder Fitnessfaktor?.....	16
1.4.1 Autotransporterproteine	17
1.4.2 Die AidA-Unterfamilie der Autotransporterproteine	19
1.4.3 Das Autotransporterprotein Antigen 43 (Ag43)	21
1.4.3.1 Posttranslationale Glykosylierung von Ag43	24
1.5 Aufgabenstellung und Zielsetzung	26
2 Materialien.....	29
2.1 Bakterienstämme	29
2.2 Mäuse.....	32
2.3 Plasmide	32
2.4 Oligonukleotide	33
2.5 Chemikalien, Enzyme und Antibiotika.....	33
2.6 Puffer und Lösungen	34
2.7 Nährmedien.....	34
2.8 Antikörper	37
2.9 Molekularbiologische Kits	38
2.10 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	39

3	Methoden	41
3.1	Kultur von Bakterien.....	41
3.1.1	Anzucht und Stammhaltung	41
3.1.2	Bestimmung des Wachstums in Flüssigkulturen	41
3.2	Molekularbiologische und genetische Methoden	41
3.2.1	Isolierung von genomischer DNA aus <i>E. coli</i>	41
3.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	42
3.2.2.1	Isopropanol-Extraktion von Plasmid-DNA	42
3.2.2.2	Phenol-Chloroform-Extraktion von Plasmid-DNA	43
3.2.2.3	Isolierung von Plasmid-DNA mittels kommerziellem Kit.....	43
3.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
3.2.4	Agarosegelelektrophorese.....	44
3.2.5	Gelextraktion	45
3.2.6	DNA-Sequenzierung.....	45
3.2.7	Enzymatische Hydrolyse von DNA	46
3.2.8	Klonierung von DNA.....	46
3.2.9	Herstellung kompetenter Bakterienzellen.....	46
3.2.9.1	Herstellung elektrokompenter Bakterienzellen	46
3.2.9.2	Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen	47
3.2.10	Transformation von Bakterien	47
3.2.10.1	Transformation elektrokompenter Bakterien	47
3.2.10.2	Transformation chemisch kompetenter Bakterien (Hitzeschock).....	47
3.2.11	Herstellung von <i>E. coli</i> Deletionsmutanten	48
3.3	Proteinbiochemische Methoden.....	49
3.3.1	Isolierung von Proteinen.....	49
3.3.1.1	Gesamtzellextrakt.....	49
3.3.1.2	Hitzeextraktion	49
3.3.1.3	Überexpression rekombinanter Proteine	50
3.3.2	Proteinaufreinigung	51
3.3.2.1	Fällung mit Trichloressigsäure	51
3.3.2.2	Nickel-Affinitätschromatographie mit Protino Ni-TED 2000-Säule	51
3.3.2.3	Dialyse von Proteinen	52
3.3.2.4	Aufkonzentrieren von Proteinen	52
3.3.3	Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels Roti-Nanoquant.....	52
3.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	53
3.3.5	Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	54
3.3.6	Western Blot (Immunoblot).....	54

3.3.6.1	Proteintransfer („ <i>semidry blot</i> “)	54
3.3.6.2	Immundetektion	55
3.3.7	Untersuchungen zum Glykosylierungsstatus von Proteinen	56
3.3.7.1	Detektion von Glykoproteinen mit Hilfe kommerzieller Kits	56
3.3.7.2	Untersuchung möglicher Glykoproteine durch Massenspektrometrie	57
3.4	Phänotypische Charakterisierung von Bakterien	58
3.4.1	Wachstumskinetik in LB-Medium und Urin	58
3.4.2	Untersuchung auf Autoaggregation	58
3.4.3	Untersuchung auf Biofilmbildung	58
3.4.4	Motilitätstest auf Schwärmagar	59
3.4.5	Nachweis des <i>rdar</i> -Morphotyps (Curli- und Zelluloseproduktion)	59
3.4.6	Nachweis der Zellulosesynthese	59
3.4.7	Nachweis der Hämolysinproduktion	60
3.4.8	Nachweis der Typ 1-Fimbrien-Expression (Mannose-abhängige Hefeagglutination)	60
3.4.9	Untersuchung auf Colicinproduktion (Colicininhibitions-Test)	60
3.4.10	Untersuchung auf Aerobaktinproduktion	60
3.4.11	Nachweis der Siderophorenbildung in Kulturüberständen („ <i>CAS liquid assay</i> “ nach Schwyn und Neilands (1987))	61
3.5	Experimentelles Mausmodell der aufsteigenden Harnwegsinfektion	61
3.6	Computergestützte Analysen	62
3.7	Statistische Analyse	63
4	Ergebnisse	65
4.1	Untersuchungen zur natürlichen Glykosylierung von Ag43 in <i>E. coli</i> Stamm 536	65
4.1.1	Klonierung, Expression und Isolation von rekombinantem Ag43a und Ag43b	65
4.1.1.1	Klonierung von rekombinantem Ag43a und Ag43b	65
4.1.1.2	Expression und Aufreinigung von rekombinantem Ag43a und Ag43b	67
4.1.2	Untersuchungen zum Glykosylierungsstatus von isoliertem Ag43a und Ag43b	73
4.1.2.1	Analyse mit Hilfe kommerzieller Glykoprotein-Detektionskits	73
4.1.2.2	Massenspektrometrische Untersuchung des Glykosylierungsstatus der isolierten Ag43-Varianten (Nanoelektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (nESI-MS))	77
4.1.3	Überprüfung der künstlichen Glykosylierung von Ag43a in <i>E. coli</i> Stamm 536 DM	82
4.1.4	Untersuchungen zu Expression und Glykosylierung von AIDA-I in <i>E. coli</i> 536 DM, <i>E. coli</i> 536 rDM und <i>E. coli</i> MG1655 $\Delta fim \Delta flu$	84
4.2	Identifizierung und Charakterisierung möglicher Glykosyltransferasen in <i>E. coli</i> Stamm 536	89
4.2.1	Identifizierung putativer GT-kodierender „ <i>open reading frames</i> “ in <i>E. coli</i> Stamm 536	89
4.2.2	Konstruktion der GT-Deletionsmutanten von <i>E. coli</i> 536	91

4.2.3	Phänotypische Charakterisierung der GT-Deletionsmutanten.....	92
4.3	Vergleichsstudien zum uropathogenen Virulenzpotential ausgewählter <i>E. coli</i> Stämme mittels des experimentellen Mausmodells der aufsteigenden Harnwegsinfektion (HWI)	103
4.3.1	Untersuchungen zur <i>in vivo</i> -Virulenz und -Fitness von <i>agn43</i> -Deletionsmutanten des <i>E. coli</i> Stammes 536	103
4.3.1.1	Konstruktion der <i>agn43</i> -Komplementanten	103
4.3.1.2	Untersuchung der <i>in vivo</i> -Virulenz und -Fitness der <i>agn43</i> -Deletionsmutanten und komplementierten Mutanten.....	105
4.3.2	Untersuchung der <i>in vivo</i> -Virulenz und -Fitness von <i>uvrY</i> -Komplementanten des <i>E. coli</i> Stammes 536	107
4.3.3	Untersuchungen zur <i>in vivo</i> -Virulenz und -Persistenz einer <i>pgaABCD</i> -Deletionsmutante des UPEC Stammes UT189.....	108
4.3.4	Untersuchung der <i>in vivo</i> -Virulenz und -Fitness von atypischen UPEC-Isolaten.....	111
4.3.5	Untersuchung der <i>in vivo</i> -Virulenz und -Fitness von STEC O2:H6-Isolaten	113
5	Diskussion	115
5.1	Untersuchung der natürlichen Glykosylierung von Ag43 in <i>E. coli</i> Stamm 536	115
5.1.1	Expression und Isolation von rekombinantem Ag43a und Ag43b.....	115
5.1.2	Untersuchungen zum Glykosylierungsstatus von Ag43a und Ag43b	116
5.1.2.1	Nachweis der Proteinglykosylierung mit Hilfe kommerzieller Glykoprotein-Detektionskits	117
5.1.2.2	Massenspektrometrische Untersuchung des Glykosylierungsstatus der isolierten Ag43-Varianten (Nanoelektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (nESI-MS))	120
5.1.3	Überprüfung der künstlichen Glykosylierung von Ag43a in <i>E. coli</i> Stamm 536 DM.....	125
5.1.4	Untersuchungen zu Expression und Glykosylierung von AIDA-I in <i>E. coli</i> 536 DM, <i>E. coli</i> 536 rDM und <i>E. coli</i> MG1655 $\Delta fim \Delta flu$	126
5.2	Identifizierung und Charakterisierung möglicher Glykosyltransferasen in <i>E. coli</i> Stamm 536	129
5.2.1	Identifizierung putativer GT-kodierender „ <i>open reading frames</i> “ in <i>E. coli</i> Stamm 536 und Generierung von Deletionsmutanten.....	129
5.2.2	Phänotypische Charakterisierung der GT-Deletionsmutanten.....	130
5.3	Vergleichsstudien zum uropathogenen Virulenzpotential ausgewählter <i>E. coli</i> Stämme mittels des experimentellen Mausmodells der aufsteigenden Harnwegsinfektion (HWI)	137
5.3.1	Untersuchung der <i>in vivo</i> -Virulenz und -Fitness von <i>agn43</i> -Deletionsmutanten und komplementierten Mutanten.....	137
5.3.2	Untersuchung der <i>in vivo</i> -Virulenz und -Fitness von <i>uvrY</i> -Komplementanten des <i>E. coli</i> Stammes 536	139

5.3.3	Untersuchungen zur <i>in vivo</i> -Virulenz und -Persistenz einer <i>pgaABCD</i> -Deletionsmutante des UPEC Stammes UTI89.....	141
5.3.4	Untersuchung der <i>in vivo</i> -Virulenz und -Fitness von atypischen UPEC-Isolaten.....	143
5.3.5	Untersuchung der <i>in vivo</i> -Virulenz und -Fitness von STEC O2:H6-Isolaten.....	145
5.4	Abschließende Worte und Ausblick	147
6	Literatur	148
7	Anhang.....	168
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	168
7.2	Oligonukleotide	171
7.3	Ergänzende Ergebnisse der MS-Untersuchung des Glykosylierungsstatus der isolierten Ag43-Varianten (nESI-MS)	175
7.4	Übersicht über die Glykosyltransferasen (GTs) von <i>E. coli</i> Stamm 536	177
7.5	Ergänzende Ergebnisse zur phänotypischen Charakterisierung der GT-Deletionsmutanten	181
7.5.1	Ergebnis der Autoaggregationsstudie.....	181
7.5.2	Ergebnis des „ <i>CAS liquid assays</i> “ nach Schwyn und Neilands (1987)).....	182
7.6	Veröffentlichungen	183
7.6.1	Publikationen	183
7.6.2	Vorträge	183
7.6.3	Posterpräsentationen	183
7.7	Lebenslauf	184

Zusammenfassung

Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre liefern immer mehr Hinweise darauf, dass eine klare Unterscheidung von Fitness- und Virulenzfaktoren in vielen Fällen, insbesondere bei extraintestinal pathogenen *Escherichia coli*, nicht möglich ist. So lässt sich auch bei Harnwegsinfektionen verursachenden *E. coli* den bakteriellen und teils stammspezifischen Faktoren oftmals nicht eindeutig eine typische Virulenz- oder Fitness-assoziierte Funktion zuordnen. Zudem werden in neueren Studien immer häufiger atypische uropathogene Isolate von *E. coli* beschrieben, die in ihrem „Virulenzrepertoire“ deutlich von typischen uropathogenen *E. coli* (UPEC) abweichen, da sie keine klassischen UPEC-Virulenzfaktoren aufweisen. In dieser Arbeit wurden daher Virulenzeigenschaften typischer als auch atypischer UPEC untersucht.

Der Effekt eines bestimmten bakteriellen Faktors auf den Wirtsorganismus wird teilweise indirekt durch sekundäre Modifikation bedingt. Dies offenbart sich beispielsweise am Autotransporterprotein AIDA-I, dessen Konformation durch posttranslationale Glykosylierung stabilisiert wird, wodurch es seine Funktionalität als Adhäsion erhält. Da bisherige Studien zum AIDA-I homologen Autotransporterprotein Antigen 43 (Ag43) auf der Analyse von künstlich glykosyliertem Protein basieren, lag ein Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Untersuchung der natürlichen Glykosylierung von Ag43 in UPEC Stamm 536. Es zeigte sich, dass beide Ag43-Varianten von *E. coli* Stamm 536 natürlicherweise glykosyliert vorliegen, der Grad der Glykosylierung jedoch wesentlich geringer ausfällt als bei natürlich glykosyliertem AIDA-I. Inwieweit die natürliche Glykosylierung von Ag43 zu dessen Funktionalität beiträgt, kann erst durch die Identifizierung der für die Ag43-Glykosylierung verantwortlichen Glykosyltransferase geklärt werden.

Die *in silico*-Analyse des Genoms von UPEC Stamm 536 für potentielle Glykosyltransferasen von Ag43 lieferte neun Kandidatengene. Die Gene wurde teils im Wildtyp-Hintergrund, teils im *rfaH*-negativen Hintergrund von *E. coli* Stamm 536 deletiert und die Mutanten im Anschluss phänotypisch charakterisiert. Die Deletion der Kandidatengene *waaF*, *waaG* und *waaQ*, die für Glykosyltransferasen des LPS-Biosynthesystems kodieren, führte zu den deutlichsten Unterschieden in Bezug auf Motilität, Curli/Zellulose-Produktion, Hämolyseaktivität und Expression von

Typ 1-Fimbrien. Der Einfluss des „*knock-out*“ der Kandidatengene auf die Glykosylierung von Ag43 muss in weiterführenden Studien untersucht werden.

Zur Charakterisierung des uropathogenen Virulenzpotentials verschiedener *E. coli* Stämme *in vivo* hat sich in den letzten Jahren das murine Modell der aufsteigenden Harnwegsinfektion etabliert. Mit Hilfe dieses Modells wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl spezifische Deletionsmutanten prototypischer UPEC als auch atypische *E. coli* Harnwegs isolate bezüglich ihrer Urovirulenz getestet und verglichen. Bei der Untersuchung der klassischen UPEC lag der Fokus auf der möglichen Urovirulenzmodulation durch die folgenden spezifischen Faktoren: dem Autotransporterprotein Ag43, dem „Response regulator“ UvrY, dem Polyketid Colibactin sowie dem Exopolysaccharid poly- β -1,6-N-Acetylglucosamin (PGA). Für Ag43 war bei der Etablierung einer Harnwegsinfektion keine eindeutige Funktion feststellbar. Es ist jedoch denkbar, dass Ag43 zur Langzeitpersistenz im Harnwegstrakt beitragen kann, was in weiteren Studien belegt werden sollte. Die Expression von UvrY in der natürlichen *uvrY*-Deletionsmutante UPEC Stamm 536 ließ keine Erhöhung des Urovirulenzpotentials im Mausmodell erkennen. In diesem Zusammenhang konnte allerdings gezeigt werden, dass die Expression des Genotoxins Colibactin in UPEC Stamm 536 dessen Virulenz signifikant herabsetzte. Die Untersuchungen zur Relevanz des Exopolysaccharids PGA belegen deutlich, dass PGA für die Langzeitpersistenz von *E. coli* im murinen Harnwegstrakt benötigt wird. Für die initiale Kolonisierung scheint PGA hingegen keine Bedeutung zu haben. Für atypische UPEC Isolate, die Charakteristika von STEC und EAEC zeigen und sich in ihrem Virulenzmuster deutlich von prototypischen UPEC unterscheiden, ließ sich im murinen Modell der aufsteigenden Harnwegsinfektion, verglichen mit dem UPEC Modellorganismus 536, ein ähnliches, teils sogar erhöhtes uropathogenes Virulenzpotential nachweisen.

Die Ergebnisse der Arbeit untermauern somit die heutige Vorstellung bezüglich der Entwicklung und Etablierung einer Harnwegsinfektion, dass verschiedene *E. coli* Stämme unterschiedliche (Kontroll-) Mechanismen entwickelt haben, um erfolgreich den Harnwegstrakt kolonisieren und eine Infektion auslösen zu können. Zudem weisen sie darauf hin, dass diese Fähigkeit nicht auf Isolate typischer phylogenetischer UPEC Entwicklungslinien beschränkt und auf das Vorhandensein charakteristischer UPEC Virulenzfaktoren angewiesen ist.

Summary

Research findings over the last years indicate that in many cases, including extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*, a clear distinction between fitness and virulence factors is not possible. Accordingly, the classical distinction of often strain-specific virulence- and fitness-related traits of uropathogenic *E. coli* (UPEC) can often not be made. Furthermore, recent studies describe atypical UPEC isolates. These isolates remarkably differ in their “virulence repertoire” compared to typical UPEC, because they lack classical UPEC-related virulence factors. Therefore, the aim of the present study was the investigation of virulence properties of typical as well as atypical UPEC strains.

The effect of a certain bacterial factor upon the host organism is in part indirectly influenced by secondary modifications. For instance, the conformation of the autotransporter protein AIDA-I is stabilized by posttranslational glycosylation which in turn confers its functionality as an adhesin. Prior studies on the AIDA-I homologous autotransporter protein antigen 43 (Ag43) are based on the analysis of the artificially glycosylated protein. Thus, a key aspect of the current work was to elucidate the naturally occurring glycosylation of Ag43 in UPEC strain 536. For both Ag43 variants of *E. coli* 536 natural glycosylation was detected. However, Ag43 was less glycosylated than naturally glycosylated AIDA-I. The future identification of the glycosyltransferase responsible for natural glycosylation of Ag43 will help to determine the impact of this posttranslational modification on the functionality of Ag43.

In silico analysis of the UPEC strain 536 genome regarding potential glycosyltransferases of Ag43 revealed nine candidate genes. Corresponding deletion mutants of the identified genes were constructed in part in the wild type strain background and in part in the *rfaH*-negative background of UPEC 536. The most prominent differences concerning motility, curli/cellulose production, hemolytic activity and expression of type 1 fimbriae were observed upon deletion of the genes *waaF*, *waaG* or *waaQ* coding for glycosyltransferases of the LPS biosynthesis pathway. The impact of the deleted candidate genes on the glycosylation of Ag43 has to be further investigated.

In recent years the murine model of ascending urinary tract infection was established to characterize the uropathogenic potential of *E. coli* strains *in vivo*. By means of this model

the uropathogenic potential of different specific “knock-out” mutants of prototypic UPEC strains as well as of atypical *E. coli* urinary tract isolates was tested and compared.

The analysis of the impact of specific factors on the uropathogenic potential of classical UPEC strains focused on the autotransporter protein Ag43, the response regulator UvrY, the genotoxin colibactin, and the exopolysaccharide poly- β -1,6-N-acetylglucosamine (PGA). Ag43 did not exhibit a distinct function during the establishment of urinary tract infection in mice. However, it is conceivable that Ag43 can contribute to long-term persistence in the urinary tract, which should be covered in further studies. Expression of UvrY in the natural *uvrY*-negative UPEC strain 536 did not increase the uropathogenic potential. However, expression of the genotoxin colibactin significantly reduced the urovirulence of UPEC strain 536. The exopolysaccharide PGA was shown to contribute to long-term persistence of UPEC in the murine model of urinary tract infection. For the initial colonization of the urinary tract, PGA seems to be dispensable.

The atypical UPEC isolates investigated in this study display typical characteristics of STEC and EAEC and differ significantly in their virulence gene content compared to prototypic UPEC strains. Nevertheless, in the murine model of ascending UTI many atypical UPEC isolates exhibited a comparable and sometimes even increased uropathogenic potential relative to UPEC model strain 536.

The results of this work support the current idea regarding the development and establishment of a urinary tract infection that different *E. coli* strains have evolved diverse (control-) mechanisms to successfully colonize the urinary tract and provoke an infection. In addition, the findings point out that the ability to cause a urinary tract infection is not limited to phylogenetic lineages of classical UPEC isolates and the presence of characteristic UPEC virulence traits.

1 Einleitung

1.1 Die Spezies *Escherichia coli*

Das von Theodor Escherich 1886 beschriebene „*Bacterium coli commune*“, welches 1919 zu seinen Ehren *Escherichia coli* benannt wurde, zählt heute zu den am intensivsten untersuchten Mikroorganismen in der mikrobiologischen und molekularbiologischen Forschung (Neidhardt *et al.*, 1996). *E. coli* Bakterien sind aerob bzw. fakultativ anaerob wachsende, nicht sporulierende, peritrich begeißelte oder unbewegliche, Gram-negative Stäbchenbakterien mit einer Größe von circa 1,1 - 1,5 µm x 2,0 - 6,0 µm. Zu ihren wichtigsten physiologischen Eigenschaften gehört die Fähigkeit, Glucose, Laktose und andere Zucker fermentieren zu können (mittels Ameisensäuregärung oder gemischter Säuregärung). Darüber hinaus sind sie Indol-positiv sowie Oxidase- und Urease-negativ. Generell zeichnen sich wildtypische Vertreter durch geringe Nährstoffansprüche aus und sind leicht auf synthetischen Medien kultivierbar, weswegen *E. coli* zudem als beliebter Modellorganismus in der Molekularbiologie und Mikrobiologie Anwendung findet. Taxonomisch ist *E. coli* der Klasse der Gammaproteobakterien und der Familie der *Enterobacteriaceae* zuzuordnen. Nahe Verwandtschaft besteht zu den Gattungen *Shigella*, *Citrobacter*, *Salmonella* und *Klebsiella*.

E. coli Bakterien zeigen genotypisch sowie phänotypisch eine außerordentliche Diversität. Mit Hilfe von Antigenen, die in den O-spezifischen Seitenketten der LPS-Schicht, in der Kapsel und der Flagelle lokalisiert sind (O-, K- und H-Antigene), lassen sie sich serologisch in zahlreiche Untergruppen und Serovarianten einordnen (Kauffmann, 1965). Verschiedene Serotypen treten zwar gehäuft mit bestimmten klinischen Symptomen auf, jedoch muss nicht das serologisch reaktive Antigen *per se* für die Virulenz des Isolates verantwortlich sein (Zingler *et al.*, 1992).

Von *E. coli* existieren zahlreiche Ökotypen. Normalerweise besiedeln *E. coli* Bakterien als harmlose, kommensale Bewohner den Intestinaltrakt von Menschen und Tieren. Sie gehören zu den ersten Bakterien, die humane Neugeborene nach der Geburt kolonisieren

(Long und Swenson, 1977) und machen später etwa 0,1 - 0,01 % der gesamten Darmflora aus (Todar, 2006). Als Kommensalen schützen sie den Intestinaltrakt des Wirtes vor der Besiedelung durch Pathogene und lösen nur in seltenen Fällen und unter bestimmten Bedingungen Erkrankungen aus (Russo und Johnson, 2003).

Neben dem Vorkommen als kommensaler Keim tritt *E. coli* jedoch auch als pathogener Erreger in Erscheinung. Beim Menschen lassen sich die krankheitsverursachenden *E. coli* Stämme in zwei großen Gruppen zusammenfassen: die intestinal-pathogenen *E. coli* (IPEC), die Erkrankungen mit Darmbeteiligung hervorrufen, und die extraintestinal-pathogenen *E. coli* (ExPEC), die zu Erkrankungen außerhalb des Darms führen (Russo und Johnson, 2003; Kaper *et al.*, 2004; Croxen *et al.*, 2013). Bei den IPEC handelt es sich um obligat pathogene Erreger, während die Stämme der ExPEC als fakultativ pathogen angesehen werden (Köhler *et al.*, 2001). Zur Gruppe der IPEC gehören sechs gut charakterisierte Pathotypen, die aufgrund spezifischer Merkmale untereinander sowie von den kommensalen und extraintestinal-pathogenen *E. coli* abgrenzbar sind: Enteropathogene *E. coli* (EPEC), Shiga Toxin-produzierende *E. coli* (STEC) mit der Untergruppe der enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC), enterotoxische *E. coli* (ETEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) und diffus adhärierende *E. coli* (DAEC). Allen IPEC ist gemein, dass die Infektion über die orale Aufnahme kontaminierter Speisen bzw. kontaminierten Wassers verursacht wird. Zu den von ihnen verursachten Krankheitsbildern zählen vor allem schwere Durchfallerkrankungen (Nataro und Kaper, 1998). Bei den Infektionen durch ExPEC handelt es sich zum größten Teil um Harnwegsinfektionen. Weitere extraintestinale Infektionen durch *E. coli* sind Pneumonie, Wundinfektion, Peritonitis und Neugeborenen-Meningitis (Russo und Johnson, 2003). ExPEC werden zudem häufig als Ursache septischer Krankheitsbilder identifiziert, die oft von einem primären Harnwegsinfekt ausgehen. Anhand der hervorgerufenen Infektion kann die Gruppe der ExPEC in Pathotypen wie uropathogene *E. coli* (UPEC), Neugeborenen-Meningitis-assoziierte *E. coli* (NMEC) und Sepsis-assoziierte *E. coli* (SEPEC) unterteilt werden (Kaper *et al.*, 2004; Croxen und Finlay, 2010).

Die *E. coli* Population lässt sich auf die phylogenetischen ECOR-Hauptgruppen A, B1, B2, C-I bis C-V, D, E und F sowie mehrere kryptische Gruppen aufteilen (Herzer *et al.*, 1990; Johnson und Russo, 2005; Jaureguy *et al.*, 2008; Tenailon *et al.*, 2010; Clermont *et al.*, 2013). Die meisten kommensalen Stämme entfallen dabei auf Gruppe A (Duriez *et al.*,

2001). IPEC-Stämme werden vornehmlich den Gruppen A, B1 und E zugeordnet. Humane ExPEC-Isolate, insbesondere UPEC, sind vor allem mit Gruppe B2 und in geringerem Ausmaß mit Gruppe D assoziiert (Johnson und Russo, 2005).

1.2 Harnwegsinfektionen und uropathogene *Escherichia coli* (UPEC)

Unter einer Harnwegsinfektion (HWI) versteht man eine durch Krankheitserreger verursachte Entzündung der ableitenden Harnwege. Sie ist durch das Vorhandensein von Bakterien im normalerweise sterilen Urin gekennzeichnet. Erkrankungen dieser Art zählen zu den häufigsten Infektionskrankheiten in den Industrieländern und werden meist durch Bakterien, seltener durch andere Erreger wie Pilze oder Protozoen ausgelöst (Hautmann und Huland, 2006; Gerok *et al.*, 2007). In der Regel sind Harnwegsentzündungen aufsteigende (aszendierende) Infektionen, bei denen die Erreger transurethral in die Harnblase gelangen. In seltenen Fällen kann die Infektion jedoch auch durch hämatogene Streuung der Bakterien entstehen (Warren, 1996; Mühldorfer *et al.*, 2001; Abbildung 1).

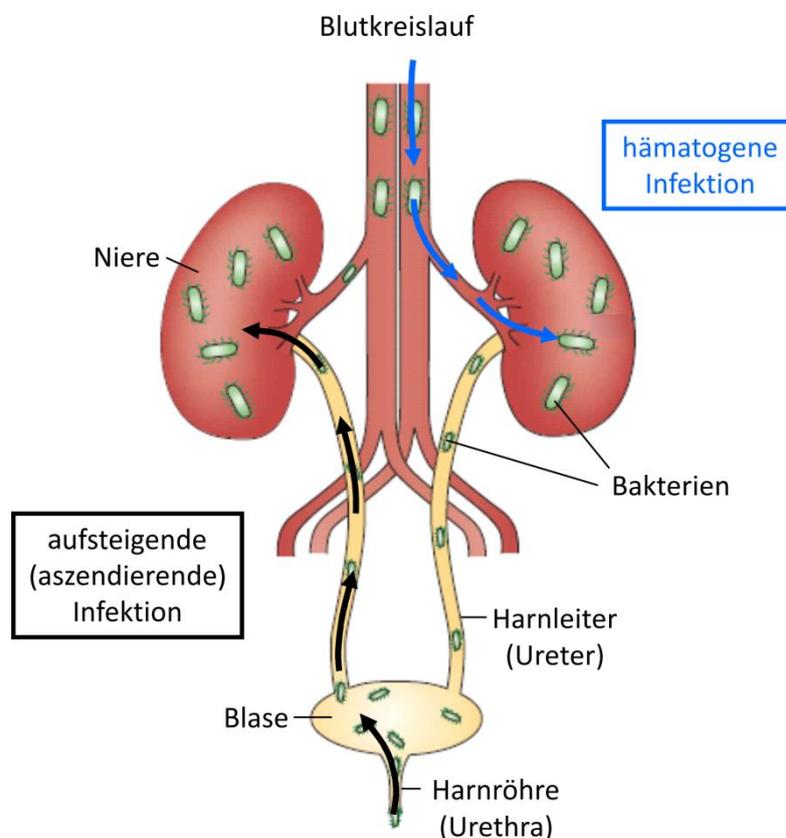


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Harnwegssystems und der möglichen Infektionsformen.
Modifiziert nach Kaper *et al.*, 2004.

Je nach betroffener Infektionsregion wird zwischen Harnröhrenentzündung (Urethritis), Blasenentzündung (Zystitis) bzw. Nierenbeckenentzündung (Pyelonephritis) unterschieden, die alle drei von schmerzhaften Symptomen begleitet werden. Mögliche Komplikationen bei der Pyelonephritis sind die Entwicklung einer Urosepsis oder einer Niereninsuffizienz, was zu einem potentiell lebensgefährlichen Verlauf der Infektion führen kann (Johnson, 1991; Kaper *et al.*, 2004). Von den symptomatischen HWI wird die sogenannte asymptomatische Bakteriurie (ABU) unterschieden. Sie ist durch eine zufällig nachgewiesene, signifikante Anzahl desselben Erregers im Urin (mehr als 10^5 Bakterien/ml) ohne klinische Erscheinungen gekennzeichnet und bedarf in der Regel keiner speziellen Antibiotikatherapie (Hahn *et al.*, 2005).

Begünstigt werden HWI durch Anomalien der Harnwege, Nieren- oder Blasensteine, Urinreflux, Prostatavergrößerungen, Tumore, Schwangerschaft, Blasenkatheter, aber auch *Diabetes mellitus* oder eine durch ungenügende Flüssigkeitszufuhr reduzierte Urinausscheidung (Köhler *et al.*, 2001). Da die kurze Harnröhre bei Frauen das Eindringen von Erregern erleichtert, sind sie in der Regel häufiger von HWI betroffen als Männer (Williams und Schaeffer, 2004). Es ist davon auszugehen, dass mehr als 50 % aller Frauen mindestens einmal in ihrem Leben eine HWI erleiden (Barnett und Stephens, 1997).

Weltweit gelten HWI als die primäre Morbiditätsursache im ambulanten sowie stationären Pflegebereich. Sie stellen die häufigste Indikation für eine antimikrobielle Chemotherapie dar. So schätzt man die Zahl der ärztlich zu behandelnden Fälle allein in Deutschland auf ungefähr zwei Millionen pro Jahr (Hacker und Heesemann, 2000). Die Zahl unkomplizierter Zystitiden wird in den USA auf sieben Millionen und weltweit auf 150 Millionen Fälle pro Jahr geschätzt (Russo und Johnson, 2003). Dadurch entstehen allein in den USA Kosten von ca. 2,3 Milliarden Dollar pro Jahr (Foxman, 2010).

Infektionen der Harnwege werden überwiegend durch *E. coli* Bakterien ausgelöst. Etwa 80 % aller unkomplizierten und 40 % der kompliziert verlaufenden HWI werden von uropathogenen *E. coli* (UPEC) verursacht (Arthur *et al.*, 1989). In der Regel beginnt eine HWI mit der Besiedlung des Darmes durch UPEC, zusätzlich zur kommensalen Flora (Wiles *et al.*, 2008). Dabei treten die UPEC jedoch im Darm nicht als pathogen in Erscheinung. Im Unterschied zu vielen apathogenen, fäkalen *E. coli* Stämmen exprimieren UPEC spezifische Virulenzfaktoren, die ihnen das Kolonisieren und Persistieren in den

Harnwegsorganen ermöglichen. Hierzu zählen Flagellen, Adhäsine, Zytotoxine, extrazelluläre Polysaccharidstrukturen sowie Eisenaufnahmesysteme (Hacker und Heesemann, 2000; Nielubowicz und Mobley, 2010; Tabelle 1).

Tabelle 1: Virulenzfaktoren uropathogener *E. coli*.

Zusammengefasst nach Hacker und Heesemann, 2000; Donnenberg, 2002; Kaper *et al.*, 2004; Henderson *et al.*, 2009; Croxen und Finlay, 2010; Dobrindt, 2010; Nielubowicz und Mobley, 2010; Totsika *et al.*, 2012.

Virulenzfaktor	Gen(e)	Funktion / Effekt
Flagelle	<i>fli, flg</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Motilität (Kolonisierung und Verbreitung im Wirt) - Invasion in Nierenepithelzellen - Modulation der Entzündungsreaktion (IL-8-Expression, TLR 5-Aktivierung)
Adhäsine:		
Typ 1-Fimbrien	<i>fimA-H</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Adhäsion an Uroepithelzellen durch Erkennung mannoselhaltiger Glykoproteinrezeptoren (z.B. Uroplakin 1a) - Invasion - Biofilmbildung
P-Fimbrien (Pyelonephritis-assozierte Fimbrien)	<i>papA-K</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Adhäsion an Nierenepithelzellen durch Erkennung der Glykosphingolipide Gb3Cer und Gb4Cer - Induktion der Zytokinexpression / Entzündungsreaktion
S-Fimbrien	<i>sfaA-G</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Adhäsion an Uroepithelzellen durch Erkennung sialinsäurehaltiger Rezeptoren (z.B. Adhäsion an das Tamm-Horsfall-Glykoprotein (THP))
F1C-Fimbrien	<i>focA-G</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Adhäsion an Uroepithelzellen durch Erkennung von Galactosylceramid-Resten - Adhäsion an Nierenepithelzellen durch Bindung an Gb3Cer
Afa-/Dr-Adhäsine (Nicht-Fimbrien-Adhäsine)	<i>afa/dra</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Adhäsion an Uroepithelzellen, polymorphkernige Leukozyten (PMN), Typ-IV-Kollagen, Dr^a-Blutgruppen-Antigene des Moleküls CD55 (DAF) und an Zelladhäsionsmoleküle der „Carcino-embryonalen Antigen-Familie“ (CEACAM)
Curli (dünne aggregative Fimbrien)	<i>csgA-G</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Adhäsion an extrazelluläre Matrix und Serumproteine, wie Laminin, Fibronectin, Plasminogen und den MHC-I-Komplex - keine eindeutige Ligandenspezifität

Tabelle 1: Virulenzfaktoren uropathogener *E. coli*. (Fortsetzung)

Zusammengefasst nach Hacker und Heesemann, 2000; Donnenberg, 2002; Kaper *et al.*, 2004; Henderson *et al.*, 2009; Croxen und Finlay, 2010; Dobrindt, 2010; Nielubowicz und Mobley, 2010; Totsika *et al.*, 2012.

Virulenzfaktor	Gen(e)	Funktion / Effekt
Autotransporteradhäsine:		
Antigen 43 (Ag43)	<i>agn43</i>	- diffuse Adhäsion - Autoaggregation - Biofilmbildung
UpaG („uropathogenic autotransporter“)	<i>upaG</i>	- Adhäsion an Blasenepithelzellen und extrazelluläre Matrix - Zellaggregation - Biofilmbildung
Toxine:		
α-Hämolyisin	<i>hlyA</i>	- Rtx („repeats in toxin“)-Toxin - Zellyse von Erythrozyten, Leukozyten und Uroepithelzellen - Invasion - Induktion der Zytokinproduktion / Entzündungsreaktion
CNF1 (zytotoxischer Nekrosefaktor 1)	<i>cnf1</i>	- Apoptose in Blasenepithelzellen - Invasion - Modulation der Entzündungsreaktion
Sat („secreted autotransporter toxin“)	<i>sat</i>	- Autotransporter-Serinprotease - zytopathischer Effekt in Uroepithelzellen - Vakuolisierung - Läsionen in interzellulären Verbindungen („tight junctions“) - Modulation der Entzündungsreaktion
Vat („vacuolating autotransporter toxin“)	<i>vat</i>	- Autotransporter-Serinprotease - zytopathischer Effekt in Uroepithelzellen - Vakuolisierung
Siderophorsysteme:		
Enterobaktin	<i>entA-F / febA</i>	- Eisenaufnahmesysteme, die dazu beitragen, eine Limitierung des essentiellen Metalls Eisen im Wirt zu vermeiden
Aerobaktin	<i>iucA-D / iutA</i>	
Yersiniabaktin	<i>ybtSETU, irp1, irp2 / fyuA</i>	
Salmochelin	<i>iroB,E / iroN</i>	
Hämrezeptor	<i>chuA</i>	- Eisenaufnahme

Tabelle 1: Virulenzfaktoren uropathogener *E. coli*. (Fortsetzung)

Zusammengefasst nach Hacker und Heesemann, 2000; Donnenberg, 2002; Kaper *et al.*, 2004; Henderson *et al.*, 2009; Croxen und Finlay, 2010; Dobrindt, 2010; Nielubowicz und Mobley, 2010; Totsika *et al.*, 2012.

Virulenzfaktor	Gen(e)	Funktion / Effekt
Extrazelluläre Polysaccharide:		
O-Antigen (LPS-Schicht)	<i>rfb</i> (bzw. <i>wb</i> *)	- Serumresistenz - Hemmung der Rezeptor-vermittelten Phagozytose durch Makrophagen - Induktion der Zytokinproduktion (IL-1, IL-6, TNF α)
Kapsel-Polysaccharide	<i>kps, neu</i>	- „Protektine“ - Antigen-Mimikry (Schutz vor gezielter Immunantwort) - Serumresistenz
Colansäure (M-Antigen)	<i>wca</i>	- Strukturkomponenten der extrazellulären Matrix - Biofilmbildung - Adhäsion
Zellulose	<i>bcs</i>	
PGA (Poly- β -1,6-N-Acetylglucosamin)	<i>pgaA-D</i>	

(**DAF**: „decay-accelerating factor“, **Gb3Cer**: Globotriaosylceramid, **Gb4Cer**: Globotetraosylceramid, **IL**: Interleukin, **LPS**: Lipopolysaccharid, **MHC-I-Komplex**: Haupthistokompatibilitätskomplex I, **TLR**: „Toll-like-Rezeptor“, **TNF**: Tumornekrosefaktor)

Die Gene der Virulenzfaktoren uropathogener *E. coli* können auf Plasmiden oder Bakteriophagen lokalisiert sein; in den meisten Fällen sind die Virulenzfaktoren jedoch im Bakterienchromosom auf besonderen genetischen Elementen, den sogenannten „Pathogenitätsinseln“ (PAIs) kodiert (Hacker *et al.*, 1990; Mühldorfer und Hacker, 1994). Bei den PAIs handelt es sich um genomische Bereiche mit einer Größe von 10-200 kb, die für wenigstens einen Virulenzfaktor kodieren, häufig mit tRNA-Genen assoziiert vorliegen und von repetitiven Elementen („direct repeats“) oder Insertionssequenzen (IS) flankiert werden. Zudem sind sie oft zusammen mit (kryptischen) Fragmenten von mobilen genetischen Elementen (z.B. Integrasen, Transposasen) organisiert und besitzen einen vom übrigen Genom abweichenden GC-Gehalt. Diese Charakteristika unterstützen die bis heute gültigen Annahme, dass PAIs aus verschiedenen mobilen genetischen Elementen zusammengesetzt sind, die durch so genannten horizontalen Gentransfer erworben wurden (Hacker und Kaper, 2000; Dobrindt *et al.*, 2002) und dem Wirtsbakterium einen selektiven Vorteil verleihen. Aufgrund ihrer Eigenschaft instabil zu sein und aus dem

Kernchromosom deletieren zu können, gehören PAIs genauso wie Plasmide, Prophagen, Transposons, Integrons oder IS-Elemente zum flexiblen Genpool von Mikroorganismen (Dobrindt *et al.*, 2002; Hochhut *et al.*, 2005).

Während der akuten Phase einer HWI sind UPEC teilweise in der Lage, über die Typ 1-Fimbrien-vermittelte Adhäsion in die Epithelzellen der Blase einzudringen. Im Zytoplasma dieser Zellen kommt es daraufhin zu einer rasanten Vermehrung der Bakterien mit anschließender Ausbildung biofilmartiger Strukturen („*intracellular bacterial communities*“ (ICBs); Mulvey *et al.*, 2001). Die Organisation der Bakterien in intrazellulären Biofilmen schützt sowohl vor der Immunantwort des Wirts als auch vor einer möglichen Antibiotikaeinwirkung. Nach dem Heranreifen der IBCs und dem „Aufbrechen“ der invadierten Urothelzellen gelangen die Bakterien erneut in die Harnwege und manifestieren so die akute Infektion (Anderson *et al.*, 2003, Rosen *et al.*, 2007; Hannan *et al.*, 2012). Die Invasion der Urothelzellen durch UPEC führt nicht nur zur Etablierung des Akutstadiums, sondern ist zu einem späteren Infektionszeitpunkt auch für die Entwicklung einer Persistenz ausschlaggebend. Hierbei bilden sich in den späten Endosomen der Urothelzellen kleine rosettenförmiger Anordnungen von UPEC-Bakterien („*quiescent intracellular reservoirs*“ (QIRs)), die in den Zellen lange Zeit überdauern können, ohne eine entzündliche Reaktion des Wirtes auszulösen oder erfolgreich durch Antibiotika behandelbar zu sein (Mysorekar und Hultgren, 2006; Hannan *et al.*, 2012). Aus diesen intrazellulären Reservoirs werden UPEC-Bakterien oft erst Monate später freigesetzt und können so eine erneute HWI verursachen.

1.2.1 Der uropathogene *E. coli* Stamm 536

Der uropathogene Stamm *E. coli* 536 (O6:K15:H31) wurde vor etwa dreißig Jahren aus einem Patienten mit akuter Pyelonephritis isoliert (Berger *et al.*, 1982). Die vollständige Sequenzierung seines Genoms gelang 2006 (Brzuszkiewicz *et al.*, 2006). Der Stamm entwickelte sich seitdem zu einem Modellorganismus für Analysen zur Genomstruktur und Evolution uropathogener Erreger. Bisher konnten für ihn sieben PAIs beschrieben werden (Brzuszkiewicz *et al.*, 2006). Die bis jetzt identifizierten Virulenzfaktoren sind in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

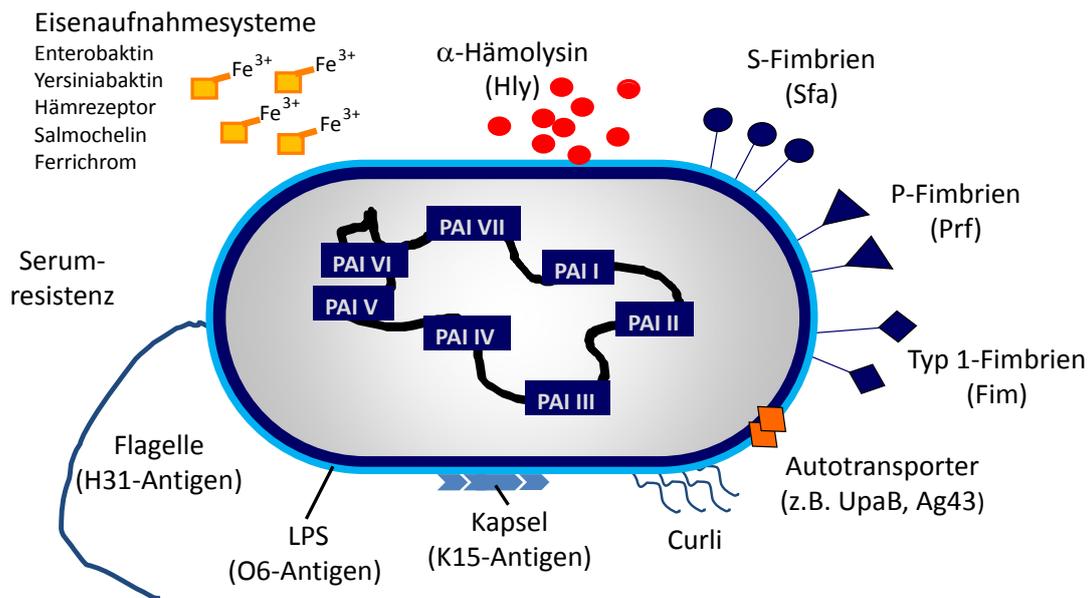


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Virulenzfaktoren von *E. coli* Stamm 536.
 Modifiziert nach J. Hacker.

Bakterien des Stammes *E. coli* 536 sind in der Lage, verschiedene Adhäsine (z.B. Typ 1-Fimbrien, P-Fimbrien, S-Fimbrien oder Curli) auszubilden, die bei der Besiedlung des Urogenitaltrakts eine wichtige Rolle spielen (Hacker *et al.*, 1992; Dobrindt *et al.*, 2001). Des Weiteren exprimieren sie zwei Orthologe des Autotransporteradhäsins Antigen 43 (Ag43), welche die Autoaggregation fördern und neben anderen Faktoren wie Flagelle und den verschiedenen Fimbrientypen zur Biofilmbildung beitragen (Emödy *et al.*, 2003; Beloin *et al.*, 2006). Biofilmbildung schützt Bakterien vor mechanischen Einflüssen, die z.B. durch den Harnfluss im Urogenitaltrakt auf sie einwirken, und führt zu einer erhöhten Resistenz gegenüber dem Immunsystem des Wirtes und Antibiotikatherapien. Weitere wichtige Virulenzfaktoren von *E. coli* 536 sind α -Hämoly-sin, die LPS-Schicht (Serumresistenz), das K15-Kapselantigen sowie verschiedene Eisenaufnahmesysteme (Hacker *et al.*, 1992). Durch koordinierte Expression seiner Virulenz-assoziierten Gene gelingt es *E. coli* Stamm 536, die unspezifischen sowie adaptiven Mechanismen der Immunabwehr erfolgreich zu umgehen, sich in einer nährstoffarmen Umgebung (z.B. bei Eisenmangel) zu vermehren und die Epithelien des Urogenitaltrakts zu besiedeln (Kaper *et al.*, 2004).

1.3 Bakterielle Fitness

Die erfolgreiche Besiedelung eines Lebensraumes setzt bei allen Organismen der Biosphäre eine entsprechende Anpassung an gegebene Umweltfaktoren voraus. Auch Bakterien sind an bestimmte ökologische Nischen angepasst und dadurch in der Lage, sich in ihnen erfolgreich zu etablieren. Eigenschaften, die das Überleben und die Verbreitung eines Organismus in einer bestimmten ökologischen Nische erhöhen, werden allgemein als Fitnessfaktoren bezeichnet (Preston *et al.*, 1998). So weisen z.B. kolonisierende Bakterien in der Regel Eigenschaften auf, die ihnen eine enge Interaktion mit dem jeweiligen Wirtsorganismus ermöglichen. Zu nennen wäre in diesem Zusammenhang vor allem die Fähigkeit, bestimmte Adhäsine und/oder Fimbrien auszubilden. Mit Hilfe dieser Strukturen kann eine Anheftung der Bakterien an den Wirt erfolgen, was den Bakterien in der Nische „Wirtsoberfläche“ einen Vorteil verschafft.

Während ein Wirtsorganismus von den meisten Aktivitäten der normalen bakteriellen Flora profitiert bzw. zumindest keinen Schaden nimmt, sind pathogene Bakterien in der Lage, Krankheiten auszulösen. Die bakterielle Fitness der pathogenen Mikroorganismen beruht maßgeblich auf den ihnen eigenen Virulenzfaktoren. Unter dem Begriff „Virulenzfaktoren“ versteht man seit 1999 alle Eigenschaften von Mikroorganismen, die es ihnen ermöglichen, eine spezielle Nische im Wirt zu besiedeln, das Immunsystem des Wirtes zu umgehen bzw. zu beeinflussen und einen Krankheitsprozess auszulösen (Fives-Taylor *et al.*, 1999). Inzwischen konnten jedoch viele dieser Virulenzfaktoren auch in nicht-pathogenen Mikroorganismen nachgewiesen werden. Dies trifft z.B. auf diverse Adhäsine, Oberflächenstrukturen, Resistenzen, Sekretionssysteme oder Abbaueigenschaften zu, die in Pathogenen zwar die Virulenz erhöhen, für Nicht-Pathogene jedoch in deren eigenen ökologischen Kontext ebenfalls einen Vorteil darstellen, also ihre Fitness erhöhen (Dobrindt *et al.*, 2003; Brüssow *et al.*, 2004; Hill, 2012; Abbildung 3).

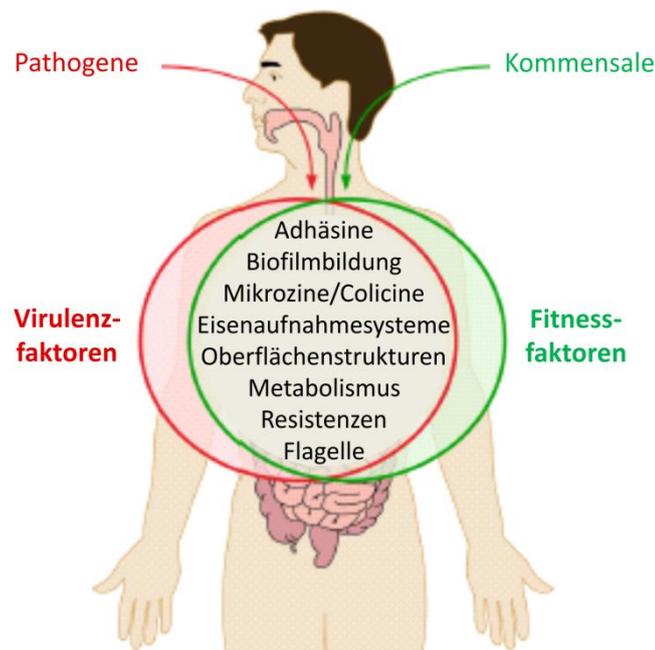


Abbildung 3: Schematische Darstellung verschiedener Überschneidungspunkte zwischen Virulenz- und Fitnessfaktoren von Bakterien.

Modifiziert nach Hill, 2012.

Als Beispiel kann das Siderophor Yersiniabaktin angeführt werden, das in bestimmten Bakterien in direktem Zusammenhang mit Virulenz steht, aber auch in nicht-pathogenen Spezies vorkommt. Für Yersiniabaktin, welches auf der „High Pathogenicity Island“ (HPI) von *Yersinia spp.* kodiert ist (Carniel *et al.*, 1996), wurde gezeigt, dass es für die Virulenz von *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* Serotyp O1 und *Y. enterocolitica* Biotyp 1B im Mausmodell notwendig ist (Carniel, 1999). Im Gegensatz dazu konnte Yersiniabaktin in *E. coli* Stamm 536 (kodiert auf PAI IV) keine Erhöhung der Virulenz zugeschrieben werden (Brzuszkiewicz *et al.*, 2006). Da auch der nicht-pathogene probiotische *E. coli* Stamm Nissle 1917 die HPI besitzt und Yersiniabaktin exprimiert, kann das Siderophor nicht als „echter“ Virulenzfaktor bezeichnet werden, sondern besser als Fitnessfaktor.

Auch Virulenzfaktoren uropathogener *E. coli* sind häufig in kommensalen *E. coli* Stämmen zu finden. Hierbei können beispielsweise neben Mikrozininen und Siderophoren auch Toxine wie α -Hämolysin oder CNF1 genannt werden (Hejnova *et al.*, 2005). Diese Beobachtung gilt ebenso für die gemeinhin als Virulenzfaktor angesehenen Typ 1-Fimbrien: Da Typ 1-Fimbrien unter anderem die Adhäsion an Epithelzellen vermitteln, sind sie natürlich für die Initiation einer HWI von Bedeutung und werden in den

uropathogenen *E. coli* Stämmen 536, J96, UTI89 und CFT073 exprimiert. Ihre Expression konnte jedoch auch im probiotischen Stamm Nissle 1917 und im apathogenen Stamm MG1655 nachgewiesen werden. In beiden *E. coli* Stämmen steigern die Typ 1-Fimbrien ohne pathogene Auswirkung die Fitness der Bakterien (Blomfield *et al.*, 1991; Mobley *et al.*, 1993; Blum *et al.*, 1995a; Blum *et al.*, 1995b; Chen *et al.*, 2006).

Inzwischen lassen sich viele Komponenten, die die Virulenz von Pathogenen erhöhen bzw. diese in bestimmten Wirten erst zu solchen machen, auch in nicht-pathogenen Mikroorganismen detektieren. Da sie dort ebenfalls einen Beitrag zur bakteriellen Fitness leisten, kann eine eindeutige Unterscheidung zwischen „echten Virulenzfaktoren“ und möglichen Fitnessfaktoren oft nicht getroffen werden. Nachfolgend werden mit dem Begriff Virulenzfaktoren nur noch solche Eigenschaften von Bakterien bezeichnet, die sich ausschließlich in Pathogenen nachweisen lassen und direkt für die pathologische Schädigung des Wirtes verantwortlich sind. Alle weiteren Merkmale/Fähigkeiten, die sich sowohl in Pathogenen als auch in Kommensalen vorteilhaft auf die bakterielle Lebensfähigkeit auswirken, sind im Folgenden als Fitnessfaktoren anzusehen.

Diese Verschiebung in der Bezeichnung – von Virulenzfaktor hin zu Fitnessfaktor – begründet sich unter anderem in der Geschichte und Entwicklung der mikrobiologischen Forschung. Der Schwerpunkt der Forschung lag lange Zeit exklusiv auf den pathogenen Erregern. Viele der Strukturen und Mechanismen, die die bakterielle Fitness fördern, wurden daher zuerst in Pathogenen entdeckt und somit als „Virulenzfaktoren“ beschrieben. Inzwischen ermöglichen die Fortschritte in Untersuchungsmethodik und Genomsequenzierung auch eine verstärkte Ausrichtung des Forschungsfokus auf kommensale und probiotische Bakterien. Durch den so gegebenen ständigen Zuwachs an Informationen können auch zukünftig mögliche Begriffs-/Definitionsänderungen nicht ausgeschlossen werden.

1.4 Das Autotransporteradhäsins Antigen 43 – Virulenz- oder Fitnessfaktor?

Wie in Abschnitt 1.3 erläutert, ist die Einordnung bakterieller Eigenschaften in die Kategorien Virulenz- bzw. Fitnessfaktoren nicht immer eindeutig möglich. Auch im Fall des Autotransporteradhäsins Antigen 43 (Ag43) wurde bis heute keine endgültige

Zuordnung vorgenommen. Dies liegt zum einen daran, dass Ag43 sowohl von pathogenen als auch von kommensalen *E. coli* Stämmen exprimiert wird, wodurch es zumindest als „echter Virulenzfaktor“ ausgeschlossen werden kann. Zum anderen ist die biologische Funktion von Ag43 noch nicht abschließend geklärt.

Für die genauere Erörterung der Frage, ob Ag43 nun eher Charakteristika eines Virulenzfaktors oder eines Fitnessfaktors aufweist, werden nachfolgend Autotransporterproteine im Allgemeinen und das Protein Ag43 im Speziellen näher betrachtet.

1.4.1 Autotransporterproteine

Seit der Entdeckung des ersten Autotransporterproteins vor mehr als 20 Jahren ist die Gruppe der charakterisierten Autotransporter kontinuierlich gewachsen und repräsentiert derzeit die größte Proteinfamilie in Gram-negativen Bakterien (Benz und Schmidt, 2011). Für *E. coli* konnten bisher mehr als 18 verschiedene Autotransporterproteine beschrieben werden (Zude *et al.*, 2013). Autotransporter sind Zelloberflächen-assoziierte bzw. sekretierte Proteine, deren Transport über die Zellmembranen des Bakteriums nach dem Prinzip des Typ-V-Sekretionsmechanismus (Va) erfolgt. Die Proteine der Autotransporterfamilie zeichnen sich alle durch eine charakteristische strukturelle Organisation aus, die sich in drei Hauptdomänen unterteilen lässt: (1) eine N-terminale Signalsequenz, die den Sec-abhängigen Transport über die innere Membran ins Periplasma initiiert, (2) die interne α - oder „passenger“-Domäne, welche das eigentliche funktionelle Motiv des Proteins beinhaltet, sowie (3) die C-terminale β - oder Translokator-Domäne, die in die äußere Membran inseriert und den Transport der α -Domäne auf die bakterielle Oberfläche ermöglicht (Desvaux *et al.*, 2004; Dautin und Bernstein, 2007; Benz und Schmidt, 2011).

Die Translokator-Domäne ist bei den klassischen monomeren Autotransportern etwa 300 Aminosäuren lang, besitzt die Charakteristika eines integralen β -„barrel“-Membranproteins und faltet sich in der äußeren Membran in zwölf β -Stränge (Maurer *et al.*, 1999; Oomen *et al.*, 2004). Aufgrund ihrer Transportfunktion liegt sie in allen Autotransporterproteinen hoch konserviert vor (Barnard *et al.*, 2007; Dautin und Bernstein, 2007). Die „passenger“-Domänen der verschiedenen Autotransporter weisen dagegen eine sehr hohe Sequenzvielfalt auf. Sie bestimmen die individuellen Eigenschaften des jeweiligen Autotransporters und umfassen ein breites Funktionsspektrum, das z.B. von unterschied-

lichen enzymatischen Aktivitäten (Proteasen, Esterasen oder Lipasen) oder der Vermittlung einer Aktin-abhängigen Bakterienbewegung bis hin zur Funktion als Adhäsion oder Toxin reicht (Henderson und Nataro, 2001; Dautin und Bernstein, 2007).

Die Sekretion der Autotransporter erfolgt grob betrachtet in drei Schritten: Zunächst leitet die Signalsequenz den Sec-abhängigen Transport des Proteins über die innere Membran ein und wird danach im Periplasma proteolytisch abgespalten. Die Translokator-Domäne bildet anschließend eine Pore (β -„barrel“) in der äußeren Membran aus, durch die die „passenger“-Domäne an die Zelloberfläche gelangt (Henderson *et al.*, 2004). Je nach Autotransporter-Subtyp bleibt die α -Domäne nun mit der membran-integralen β -Domäne kovalent verbunden (z.B. beim Adhäsion Hia aus *Haemophilus influenzae*; St. Geme und Cutter, 2000) oder wird durch proteolytische Prozessierung von der β -Domäne getrennt. Durch Letzteres kann die α -Domäne entweder frei ins extrazelluläre Milieu diffundieren (z.B. bei der IgA1-Protease aus *Neisseria gonorrhoeae*; Pohlner *et al.*, 1987) oder aber über nichtkovalente Bindung mit der β -Domäne assoziiert bleiben (z.B. beim Adhäsion AIDA-I aus *E. coli*; Benz und Schmidt, 1992).

Die Bezeichnung „Autotransporter“ begründete sich auf der ursprünglichen Annahme, dass alle benötigten Informationen für den eigenen energieunabhängigen Membrantransport in der Primärstruktur des Proteins determiniert sind und der Transport ohne die Hilfe akzessorischer Proteine erfolgt (Henderson *et al.*, 1998; Henderson *et al.*, 2004). Inzwischen wurde jedoch gezeigt, dass für die Sekretion vieler Autotransporterproteine zusätzliche Faktoren wie die periplasmatischen Chaperone SurA, Skp und DegP sowie die β -„barrel assembly machinery“, auch BAM-Komplex genannt, erforderlich sind (Ieva und Bernstein, 2009; Knowles *et al.*, 2009; Rossiter *et al.*, 2011). Wie genau diese Faktoren am Transport beteiligt sind, ist noch nicht eindeutig geklärt. Es wird angenommen, dass die Chaperone die „passenger“-Domäne im Periplasma in transportfähigem Zustand halten, ihre Fehlfaltung verhindern und das gesamte Protein an den BAM-Komplex herantransportieren. Durch Interaktion mit dem BAM-Komplex wird dann die β -Domäne des Autotransporterproteins in die äußere Membran eingebaut. Vor kurzem wurde ein weiterer Proteinkomplex, das „transport and assembly“-Modul (TAM) beschrieben. Dies Modul scheint ebenfalls für die effiziente Sekretion einiger Autotransporter notwendig zu sein, da z.B. *E. coli*-TAM-Deletionsmutanten nicht in der Lage sind, die Adhäsine Ag43 und EhaA zu sekretieren (Selkrig *et al.*, 2012; Donnenberg, 2013; Gruss *et al.*, 2013). Die

genaue Funktionsweise ist jedoch auch hier noch nicht endgültig geklärt. Abbildung 4 gibt eine schematische Zusammenfassung über den Ablauf der Autotransportersekretion wieder.

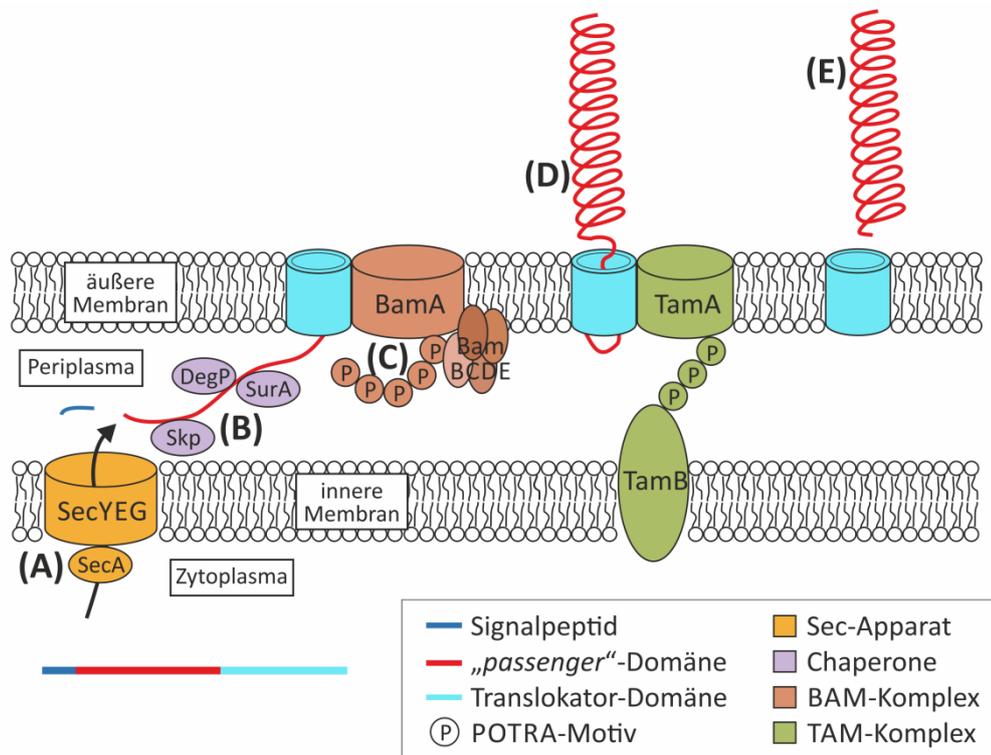


Abbildung 4: Generelles Modell der Autotransportersekretion.

- (A) Die Signalsequenz vermittelt den Sec-abhängigen Transport über die innere Membran.
 - (B) Nach dem Eintritt ins Periplasma zeigen viele Autotransporter eine Interaktion mit periplasmatischen Chaperonen, die die „passenger“-Domäne in transportfähigem Zustand halten.
 - (C) Die β -Domäne des Autotransporters wird durch Interaktion mit dem BAM-Komplex in die äußere Membran eingebaut.
 - (D) Durch die so gebildete Pore wird der Transport der „passenger“-Domäne auf die Zelloberfläche vermittelt, wobei vermutlich der TAM-Komplex eine entscheidende Rolle spielt.
 - (E) Die „passenger“-Domäne bleibt entweder kovalent an die β -Domäne gebunden oder wird abgespalten und sekretiert.
- Modifiziert nach Donnenberg, 2013.

1.4.2 Die AidA-Unterfamilie der Autotransporterproteine

In *E. coli* lassen sich die Autotransporterproteine AIDA-I, TibA und Ag43 aufgrund hoher Sequenzhomologie in der Translokator-Domäne und dem Vorhandensein repetitiver Aminosäure-Motive in der „passenger“-Domäne einer gemeinsamen Gruppe, der AidA-Unterfamilie, zuordnen (Henderson und Nataro, 2001).

Das namensgebende Protein dieser Unterfamilie ist AIDA-I, das „adhesin involved in diffuse adherence“, ein Adhäsion, das von einer Klasse der DAEC exprimiert wird

(Charbonneau und Mourez, 2007). AIDA-I vermittelt in diesen Bakterienstämmen die Adhärenz an eine Reihe von humanen und nichthumanen Zelltypen. Neben seiner Funktion als Adhäsine ist es zudem an der Invasion von Epithelzellen sowie an der bakteriellen Autoaggregation und Biofilmbildung beteiligt (Benz und Schmidt, 1992; Sherlock *et al.*, 2004; Charbonneau *et al.*, 2006). Seine volle Funktionsfähigkeit erhält AIDA-I erst nach O-Glykosylierung der α -Domäne durch die Glykosyltransferase Aah („*autotransporter adhesin heptosyltransferase*“). Dieses AIDA-I-spezifische Enzym wird vom *aah*-Gen kodiert, welches im Genom unmittelbar stromaufwärts des *aidA*-Gens liegt und mit diesem ein Operon bildet. Die Regulationsmechanismen des Operons sind jedoch noch nicht genau bekannt (Benz und Schmidt, 2001; Benz *et al.*, 2010). Bei der Glykosylierung durch Aah werden im Zytoplasma Heptose-Einheiten auf bestimmte Serin- und Threoninreste der AIDA-I- α -Domäne übertragen. Die hierfür benötigten ADP-Glycero-Mannoheptose-Bausteine stammen ursprünglich aus dem LPS-Biosyntheseweg. Mittels massenspektrometrischer (MS-) Analyse konnten für AIDA-I bis heute 16 mögliche Glykosylierungsstellen beschrieben werden. Zudem zeigten die AIDA-I-Proteinproben in der MS-Analyse eine Größenverteilung, die auf eine heterogene Glykosylierung, d.h. auf Schwankungen im Besetzungsgrad der Glykosylierungsstellen hinweist. Die maximal mögliche Anzahl von an AIDA-I gebundenen Heptosen wird auf 19 geschätzt (Moormann *et al.*, 2002; Charbonneau *et al.*, 2007). Bei AIDA-I ist die Glykosylierung in erster Linie für die Stabilität und die richtige Konformation des Proteins erforderlich und damit nur indirekt für seine Funktion als Adhäsine; auf den eigentlichen Adhäsionsschritt bzw. auf die Autoaggregation hat die Glykosylierung keinen Einfluss (Benz und Schmidt, 2001; Charbonneau *et al.*, 2007; Charbonneau und Mourez, 2008).

Das Autotransporterprotein TibA, das von einigen ETEC exprimiert wird, gehört ebenfalls zur AidA-Unterfamilie. TibA („*enterotoxigenic invasion locus B*“-A-Protein) vermittelt wie AIDA-I die Adhäsion an und Invasion in humane Epithelzellen sowie bakterielle Autoaggregation und Biofilmbildung. Ebenso ist es erst nach O-Glykosylierung der α -Domäne im Zytoplasma voll funktionsfähig. Die Proteinmodifikation erfolgt hier durch die Glykosyltransferase TibC, deren Genlocus im Genom unmittelbar stromaufwärts von *tibA* liegt (Lindenthal und Elsinghorst, 1999; Sherlock *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu AIDA-I ist die Glykosylierung bei TibA für seine Funktion als Adhäsine und Invasine notwendig, für

Autoaggregation und Biofilmbildung wird sie jedoch nicht benötigt (Lindenthal und Elsinghorst, 2001; Sherlock *et al.*, 2005).

Moormann *et al.* (2002) konnten durch den Vergleich der Aminosäuresequenzen von Aah und TibC zeigen, dass die beiden Glykosyltransferasen auf Proteinebene zu 69,2 % identisch sind. Aufgrund dieser hohen Homologie erscheint ihre Beobachtung, dass AIDA-I auch von TibC erfolgreich glykosyliert werden kann, nicht überraschend.

Ein weiteres Mitglied der AidA-Unterfamilie ist das Autotransporterprotein Antigen 43 (Ag43), welches im nächsten Abschnitt genauer beschrieben wird.

1.4.3 Das Autotransporterprotein Antigen 43 (Ag43)

Das Autotransporterprotein Antigen 43 (Ag43), welches ebenfalls zur AidA-Unterfamilie gehört, gilt als das am häufigsten vorkommende Oberflächenprotein in *E. coli*. 1980 wurde es zunächst aufgrund seiner Fähigkeit, bakterielle Autoaggregation zu vermitteln, beschrieben. Diese kann makroskopisch als Ausflockung („fluffing“) und Absetzen von Zellen in statischen Flüssigkulturen visualisiert werden, was zum ursprünglichen Namen *flu* des zugehörigen genetischen Locus führte (Diderichsen, 1980). Später stellte sich heraus, dass das in einer unabhängigen Studie identifizierte Außenmembran-assoziierte Antigen 43 das Produkt des Gens *flu* ist (Owen *et al.*, 1987; Henderson *et al.*, 1997). Somit ist sowohl *flu* als auch *agn43* als Bezeichnung des Gens in der Literatur gebräuchlich.

Die Expression von Ag43 ist im Gegensatz zu AIDA-I und TibA phasenvariabel und gekennzeichnet durch die möglichen Zustände „ON“ und „OFF“. In *E. coli* K-12 beträgt die Umschaltrate ungefähr 10^{-3} pro Zelle und Generation. Die Phasenvariation beruht auf dem abgestimmten Zusammenwirken des oxidativen Stressregulators OxyR, der durch Binden an die *agn43*-Promotorregion die Transkription verhindert (negative Regulation), und der Dam-Methylase, die die drei GATC-Bereiche in der *agn43*-Promotorregion methyliert und somit die Bindung des Repressors unmöglich macht (positive Regulation) (Waldron *et al.*, 2002; Wallecha *et al.*, 2002; Schembri *et al.*, 2003).

In *E. coli* K-12 wird Ag43 als ein aus 1039 Aminosäuren bestehendes Präproprotein gebildet, welches anschließend dem Sekretionsmechanismus und der einhergehenden Prozessierung klassischer Autotransporter unterliegt: Während des Sec-abhängigen Proteintransports über die innere Membran wird das N-terminale Signalpeptid (Met-1 -

Ala-52) abgespalten. Das „reife“ Ag43 wird nach Translokation der „passenger“-Domäne über die äußere Membran proteolytisch zwischen α - und β -Domäne getrennt (Henderson und Owen, 1999). Die α -Untereinheit von Ag43 bleibt jedoch über nichtkovalente Bindung mit der membranintegralen β -Domäne verbunden (Wells *et al.*, 2007). Das vollständig prozessierte Protein bildet somit einen heterooligomeren Komplex, bestehend aus Ag43^α und Ag43^β in der Stöchiometrie 1:1 (Owen *et al.*, 1996).

Ag43 wird von fast allen *E. coli* Stämmen exprimiert, was als Hinweis auf eine mögliche konservierte Funktion von Ag43 in *E. coli* gewertet werden kann (Wells *et al.*, 2010; Sonnenberg, 2013). Restieri *et al.* (2007) zeigten, dass etwa 93 % der von ihnen untersuchten klinischen Isolate (UPEC und IPEC) als auch 53 % der kommensalen *E. coli* Isolate mindestens eine Kopie des *agn43*-Gens besaßen. Häufig können jedoch auch mehrere *agn43*-Kopien in einem Genom existieren, wobei diese meist mit mobilen genetischen Elementen wie „Genomischen Inseln“, PAIs oder Plasmiden assoziiert sind (van der Woude und Henderson, 2008). Der uropathogene *E. coli* Stamm 536 besitzt beispielsweise zwei unterschiedliche *agn43*-Orthologe, *agn43a-536* auf PAI III und *agn43b-536* auf PAI V (Beloin *et al.*, 2006; Abbildung 5).

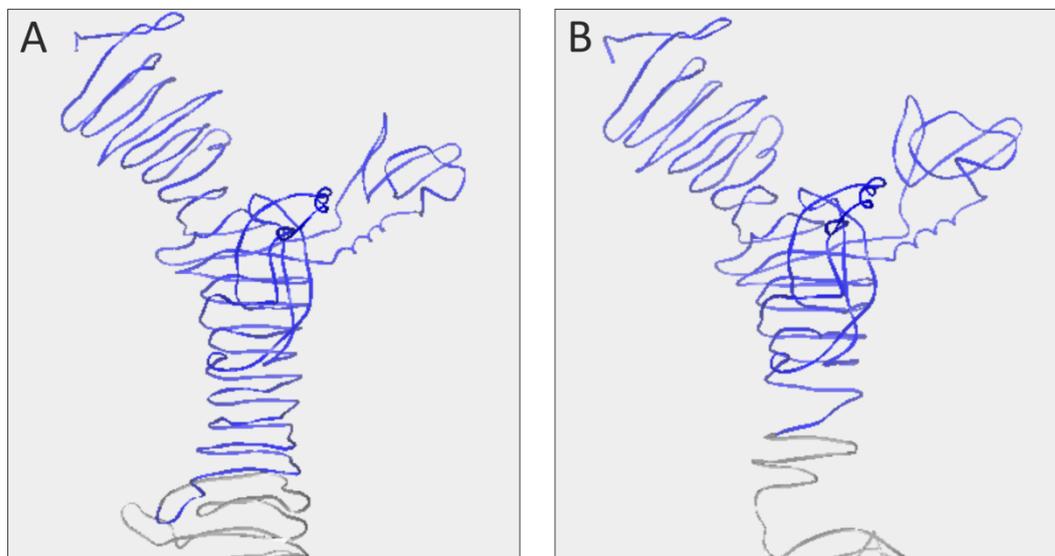


Abbildung 5: Schematische Darstellung der α -Domänen der Ag43-Varianten von *E. coli* Stamm 536.

Theoretische Strukturmodelle der α -Domäne von (A) Ag43a-536 und (B) Ag43b-536 (in blau: Struktur der α -Domäne, in grau: beginnende β -Domäne). Der Modellvergleich offenbart für die α -Domäne von Ag43b-536 (B) eine verkürzte C-terminale Struktur, was sich mit der bekannten geringeren Peptidlänge von Ag43b ^{α} im Vergleich zur α -Domäne von Ag43a-536 deckt (Reidl, 2009).

Modifiziert nach Dr. Akash Ranjan.

Beim Vergleich von Ag43-Proteinen isoliert aus verschiedenen *E. coli* Stämmen bzw. kodiert durch unterschiedliche *agn43*-Allele, wurden im Bereich der α -Domäne erhebliche Variationen in Bezug auf Struktur und Funktion festgestellt (Torres *et al.*, 2002; Klemm *et al.*, 2004). Ag43 lässt sich daher nicht als Protein mit einer festen Funktionsweise beschreiben. Vielmehr sollten die Ag43-Varianten als eine Familie homologer Proteine mit erweitertem Funktionsspektrum betrachtet werden und bei der Analyse von Ag43 immer das jeweilige Allel und der Stammhintergrund Berücksichtigung finden (Klemm *et al.*, 2006). Die biologische Funktion von Ag43 ist somit bis heute nicht eindeutig geklärt. Unstrittig sind die Beobachtungen, dass Ag43 an der bakteriellen Autoaggregation, Mikrokoloniebildung und Etablierung von Biofilmen beteiligt ist und so zur effektiveren Kolonisierung des Wirts beiträgt (Kjærsgaard *et al.*, 2000). Der bakteriellen Autoaggregation liegt zugrunde, dass Ag43 ein selbsterkennendes Adhäsion ist, welches die Interaktion über ein interzelluläres „handshake“-Motiv vermittelt, das sich aufgrund der L-förmigen Proteinstruktur von Ag43 ^{α} mit dem Mechanismus eines „Klettverschlusses“ vergleichen lässt (Hasman *et al.*, 1999; Kjaergaard *et al.*, 2000; Heras *et al.*, 2014). Da diese Art der Autoaggregation ebenso bei den Adhäsinen AIDA-I und TibA nachgewiesen werden konnte, bezeichnet man sie zusammen mit Ag43 auch als „self-associating autotransporters“ (SAATs) (Klemm *et al.*, 2006).

Fexby *et al.* (2007) demonstrierten die Aufnahme und das Überleben Ag43-exprimierender *E. coli* in humanen Granulozyten. Diese Beobachtung führte zur Vermutung, dass Ag43 eine mögliche Funktion bei der Umgehung der Wirtsabwehr zukommt. Zusätzlich wurde eine Ag43-Variante des UPEC Stammes CFT073, Ag43a-CFT073, als erforderlicher Faktor für das längerfristige Überleben der Bakterien im murinen Harnwegstrakt identifiziert (Ulett *et al.*, 2007). Übereinstimmend konnte auch in epidemiologischen Untersuchungen von aus Patienten isolierten UPEC Isolaten ein Zusammenhang zwischen dem Allel *agn43a-CFT073* und der Persistenz der UPEC in der Blase detektiert werden (Lüthje und Brauner, 2010). Des Weiteren war es Anderson *et al.* (2003) möglich, Ag43-exprimierende UPEC Bakterien in intrazellulären Biofilmen (IBCs) in der Mausblase nachzuweisen. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Expression von Ag43 bei pathogenen Bakterien während des späteren Infektionsstadiums von Bedeutung

ist und vielleicht auch eine entscheidende Rolle bei der Manifestation einer HWI bzw. beim Rezidiv derselben spielt.

1.4.3.1 Posttranslationale Glykosylierung von Ag43

Die Modifikation von Proteinen durch posttranslationale Glykosylierung wurde lange Zeit als ein ausschließlich in Eukaryonten vorkommender Mechanismus betrachtet (Moormann *et al.*, 2002). Durch die zunehmenden Fortschritte in analytischer Methodik und Genom-Sequenzierung konnten jedoch in den letzten Jahren immer mehr Beweise für N- und O-glykosylierte bakterielle Proteine gesammelt werden (Szymanski und Wren, 2005). Heute ist allgemein hin akzeptiert, dass zumindest einige Eubakterien Glykoproteine exprimieren, insbesondere als Zelloberflächen assoziierte und sezernierte Moleküle. Die Proteinglykosylierung in Bakterien scheint vor allem hinsichtlich der Wirt-Pathogen-Interaktion wie z.B. Adhäsion, Antigenvariation, Schutz vor proteolytischer Spaltung sowie schützende Immunität eine wichtige Rolle zu spielen. Einige der bisher identifizierten bakteriellen Glykoproteine konnten sogar als Virulenzfaktoren charakterisiert werden. Detaillierte Informationen über den jeweiligen Glykosylierungsprozess bzw. über den Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion sind jedoch nur für wenige bakterielle Glykoproteine bekannt.

Für *E. coli* wurden zunächst drei O-glykosylierte Oberflächenproteine, die Autotransporterproteine AIDA-I, TibA und Ag43 beschrieben (Benz und Schmidt, 2001; Lindenthal und Elsinghorst, 1999; Sherlock *et al.*, 2006). Bei AIDA-I und TibA ist die Modifikation der jeweiligen α -Domäne mittels O-Glykosylierung für die vollständige Funktionalität der Proteine notwendig. In beiden Fällen war es möglich, die verantwortliche Heptosyltransferase (Aah bzw. TibC) zu ermitteln. Der Genlocus dieser Glykosyltransferasen liegt jeweils stromaufwärts des zugehörigen Autotransportergens (*aidA* bzw. *tibA*). Obwohl Ag43 in *E. coli* Wildtypstämmen ebenfalls posttranslational heptosyliert wird, konnte für dieses Autotransporterprotein bislang keine Glykosyltransferase identifiziert werden (Sherlock *et al.*, 2006; Charbonneau *et al.*, 2007). Interessanterweise wird Ag43, dessen Primärstruktur nur zu 25 % mit den Aminosäuresequenzen von AIDA-I und TibA identisch ist (Klemm *et al.*, 2006), auch von den Heptosyltransferasen Aah und TibC glykosyliert (Sherlock *et al.*, 2006). Mit Hilfe dieses heterologen Glykosylierungsschritts konnten von

Knudsen et al. (2008) 15 mögliche Glykosylierungsstellen für die α -Domäne von Ag43 beschrieben werden (Tabelle 2).

Tabelle 2: Mögliche Glykosylierungsstellen der α -Domäne von Ag43 nach Knudsen *et al.*, 2008.

Die Identifizierung und Sequenzierung der heptosylierten Peptide erfolgte mittels MS. Die putativen Glykosylierungsstellen sind im Sequenzmotiv unterstrichen.

Sequenz- abschnitt	Molekulare Masse (Da)	Sequenz	Sequenzmotiv	Modifizierungen
1–29	3181.5163	ADIVVHPGETVNGGTLANHDNQIVFGTTN		1: (ohne Ergebnis)
32–60	3171.4115	TISTGLEYGPDNEANTGGQWVQDGGTANK	NGMTIS <u>T</u> GLEYGP	1: Thr ³⁵ , + ETD
61–70	1154.6400	TTVTSGGLQR	NKTTV <u>T</u> SGGLQRV	1: Ser ⁶⁵ , + DTT, + ETD
61–70	1402.6675	TTVTSGGLQR		2: Ser ⁶⁵ , Thr ⁶¹ , + ETD
71–93	2334.1298	VNPGGSVSDTVISAGGGQSLQGR	VSDTV <u>S</u> AGGGQS	1: Ser ⁸³ , + DTT, + ETD
71–93	2526.1932	VNPGGSVSDTVISAGGGQSLQGR		2: (ohne Ergebnis)
98–120	2825.2912	TLNGGEQWMHEGAIATGTVINDK		2: Thr ⁹⁷ and Thr ⁹⁸
174–194	2276.0192	AEGTANTTVVYAGGDQTVHGH	IVRAEGTANTTVV	1: (Thr ¹⁷⁷ ; ohne Ergebnis)
174–194	2468.0826	AEGTANTTVVYAGGDQTVHGH	IVRAEGTANTTVV AEGTANTTVVYAG	2: Thr ¹⁷⁷ and Thr ¹⁸⁰
228–240	1450.6899	NGGVAGNTTVNQK	GVAGNTTVNQKGR	1: Thr ²³⁵ or Thr ²³⁶
258–275	1907.9799	QGGALVTSTAATVTGINR	GGALVT <u>S</u> TAATVT	1: Ser ²⁶⁵ , + DTT, + ETD
258–275	2100.0433	QGGALVTSTAATVTGINR		2: (ohne Ergebnis)
265–275	1281.6412	STAATVTGINR	GGALVT <u>S</u> TAATVT	1: Ser ²⁶⁵
276–285	1141.6126	LGAFSVVEGK	NRLGAF <u>S</u> VVEGKA	1: Ser ²⁸⁰ , + DTT
320–347	2728.2820	NGGTATTVSMGNGGVLLADSGAAVSGTR	DSGAAV <u>S</u> GTRSDG	1: Ser ³⁴⁴
320–347	2920.3454	NGGTATTVSMGNGGVLLADSGAAVSGTR	-	2: (ohne Ergebnis)
320–347	3112.4088	NGGTATTVSMGNGGVLLADSGAAVSGTR	-	3: (ohne Ergebnis)
352–367	1742.8990	AFSIGGGQADALMLEK	SDGKAF <u>S</u> IGGGQA	1: Ser ³⁵⁴ , + DTT
368–392	2665.2354	GSSFLLNAGDTATDTTVNGGLFTAR	MLEKGS <u>S</u> FTLNAG	1: Ser ³⁷⁰ , + ETD
424–439	1858.8167	EGDALLQGGSLTGNGS	LQGGSL <u>T</u> GNGSVE	2: Thr ⁴³⁵ and Ser ⁴³⁹ ; semitrypt.
			SLTGNG <u>S</u> VEKSGS	
443–458	1785.8843	SGSGLTVSNNTLTQK	SGTLTV <u>S</u> NNTLTQ	1: Ser ⁴⁵¹ , + DTT, + ETD

(+DTT: Glykosylierungsstelle wurde durch Derivatisierung mit DTT identifiziert; +ETD: Ergebnis wurde mittels ETD-basierter Peptidsequenzierung bestätigt.)

1.5 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Die Erkenntnisse aus der vergleichenden Genomanalyse von uropathogenen *E. coli* Stämmen geben immer mehr Hinweise darauf, dass kein genereller Virulenz- oder Pathomechanismus bei UPEC existiert (Brzuszkiewicz *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2006; Abraham *et al.*, 2012). Vielmehr scheint es, als dass die Expression und Regulation unterschiedlicher, manchmal stammspezifischer Kombinationen von Virulenz- und Fitness-assoziierten Genen in einem ähnlichen Phänotyp, nämlich der Auslösung von Harnwegsinfektionen, resultieren.

Reidl beschrieb 2009, dass das Autotransporterprotein Ag43 in seiner Funktion als Adhäsion und Autoaggregation-vermittelnder Faktor einen Beitrag zur Virulenz des uropathogenen *E. coli* Stammes 536 leistet. Die Untersuchungen wurden dabei mit künstlich glykosyliertem Ag43 durchgeführt. Da es Hinweise dafür gibt, dass Ag43 in *E. coli* Wildtypstämmen posttranslational glykosyliert werden kann und da die Ag43-Homologen AIDA-I und TibA die Glykosylierung für ihre vollständige Funktionalität benötigen, war ein Ziel dieser Arbeit, die natürliche Glykosylierung von Ag43 (bzw. korrekter ausgedrückt, die natürliche Glykosylierung der Ag43-„passenger“-Domäne) in *E. coli* Stamm 536 zu charakterisieren. Hierbei war zu beachten, dass *E. coli* Stamm 536 zwei unterschiedliche Ag43-Varianten exprimiert. Die Untersuchungen umfassten daher die Analyse der natürlichen Glykanstruktur beider Ag43-Varianten.

Da für Ag43 bislang keine zugehörige Glykosyltransferase identifiziert werden konnte, war ein weiteres Ziel der Arbeit, mittels vergleichender Genomanalyse nach möglichen Glykosyltransferase-kodierenden „open reading frames“ in *E. coli* Stamm 536 zu suchen. Für geeignete Kandidaten-Gene sollten anschließend die entsprechenden „knock-out“-Mutanten generiert werden, um diese phänotypisch und funktional zu charakterisieren.

Beim Versuch der Aufklärung der UPEC-Pathogenese hat sich in den letzten Jahren das Mausmodell der experimentellen Harnwegsinfektion als sehr hilfreiches Werkzeug herausgestellt. Wie eingangs erwähnt, ist das Auslösen einer HWI durch UPEC das Ergebnis des regulierten Zusammenwirkens unterschiedlicher bakterieller, teilweise stammspezifischer Faktoren. Aus diesem Grund war die Untersuchung verschiedener *E. coli* Stämme bzw. ausgewählter bakterieller Faktoren hinsichtlich ihres uropathogenen

Virulenzpotentials im HWI-Mausmodell ein weiterer Gegenstand dieser Arbeit. Sie umfasste unter anderem die Charakterisierung der *in vivo*-Virulenz und -Fitness von *agn43*-Deletionsmutanten des *E. coli* Stammes 536, mit dem Ziel weitere Erkenntnisse über die Rolle von Ag43 im Infektionsprozess zu erlangen. Des Weiteren sollte am Beispiel atypischer UPEC Isolate untersucht werden, inwieweit pathogene *E. coli* Varianten, denen die charakteristischen Virulenzfaktoren von ExPEC fehlen, in der Lage sind, eine aufsteigende HWI zu verursachen.

2 Materialien

2.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten *Escherichia coli* Stämme sowie ihre Eigenschaften sind – soweit bekannt – in Tabelle 3 einschließlich Herkunftsangaben aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete *E. coli* Stämme.

Stamm	Beschreibung	Quelle/Referenz
536	Wildtyp, Pyelonephritis-Isolat; O6:K15:H31, <i>agn43a-536</i> ⁺ (ECP0332, ORF52 _{PAI III}), <i>agn43b-536</i> ⁺ (ECP3009, ORF48 _{PAI V}), <i>hly</i> ⁺ , <i>fim</i> ⁺ , <i>sfa</i> ⁺ , <i>prf</i> ⁺ , <i>ent</i> ⁺ , <i>fla</i> ⁺ , serumresistent, Sm ^R	Berger (1982)
536 Δ <i>agn43a</i>	536-Derivat, Deletion des <i>agn43a</i> -Allels	Lindner (2005)
536 Δ <i>agn43b</i>	536-Derivat, Deletion des <i>agn43b</i> -Allels	Lindner (2005)
536 DM (536 Δ <i>agn43a</i> Δ <i>agn43b</i>)	536-Derivat, Deletion beider <i>agn43</i> -Allele	Lindner (2005)
536 Δ <i>rfaH</i>	536-Derivat, Deletion von <i>rfaH</i>	Lindner (2005)
536 Δ <i>rfaH</i> Δ <i>agn43a</i>	536 Δ <i>rfaH</i> -Derivat, Deletion des <i>agn43a</i> -Allels	Lindner (2005)
536 Δ <i>rfaH</i> Δ <i>agn43b</i>	536 Δ <i>rfaH</i> -Derivat, Deletion des <i>agn43b</i> -Allels	Lindner (2005)
536 rDM (536 Δ <i>rfaH</i> Δ <i>agn43a</i> Δ <i>agn43b</i>)	536 Δ <i>rfaH</i> -Derivat, Deletion beider <i>agn43</i> -Allele	Lindner (2005)
MG1655	Wildtyp, K-12 Isolat; OR:H48:K-, F, λ ⁻ , <i>ilvG</i> ⁻ , <i>rfb-50</i> , <i>rph-1</i>	Blattner (1997)
MG1655 Δ <i>fim</i> Δ <i>flu</i>	MG1655-Derivat, Deletion der Gene <i>fimB-H</i> und <i>flu</i>	Lehmann (2005)
536 Δ <i>waaG::cat</i>	536-Derivat, Deletion von <i>waaG</i> durch homologe Rekombination mit entsprechend flankierter <i>cat</i> -Kassette	IMIB-Stamm-sammlung (2004)

Tabelle 3: Verwendete *E. coli* Stämme. (Fortsetzung)

Stamm	Beschreibung	Quelle/Referenz
536 $\Delta rfaH$ $\Delta ecp0425::cat$ (RS1)	536 $\Delta rfaH$ -Derivat, Deletion von <i>ecp0425</i> durch homologe Rekombination mit entsprechend flankierter <i>cat</i> -Kassette	diese Arbeit
536 $\Delta ecp1042::cat$ (RS2)	536-Derivat, Deletion von <i>ecp1042</i> durch homologe Rekombination mit entsprechend flankierter <i>cat</i> -Kassette	diese Arbeit
536 $\Delta ecp1999::cat$ (RS3A)	536-Derivat, Deletion von <i>ecp1999</i> durch homologe Rekombination mit entsprechend flankierter <i>cat</i> -Kassette	diese Arbeit
536 $\Delta rfaH$ $\Delta ecp1999::cat$ (RS3B)	536 $\Delta rfaH$ -Derivat, Deletion von <i>ecp1999</i> durch homologe Rekombination mit entsprechend flankierter <i>cat</i> -Kassette	diese Arbeit
536 $\Delta rfaH$ $\Delta ecp3716::cat$ (RS6)	536 $\Delta rfaH$ -Derivat, Deletion von <i>ecp3716</i> durch homologe Rekombination mit entsprechend flankierter <i>cat</i> -Kassette	diese Arbeit
536 $\Delta rfaH$ $\Delta ecp3720::cat$ (RS7)	536 $\Delta rfaH$ -Derivat, Deletion von <i>ecp3720</i> durch homologe Rekombination mit entsprechend flankierter <i>cat</i> -Kassette	diese Arbeit
536 $\Delta ecp3729::cat$ (RS8A)	536-Derivat, Deletion von <i>ecp3729</i> durch homologe Rekombination mit entsprechend flankierter <i>cat</i> -Kassette	diese Arbeit
536 $\Delta rfaH$ $\Delta ecp3729::cat$ (RS8B)	536 $\Delta rfaH$ -Derivat, Deletion von <i>ecp3729</i> durch homologe Rekombination mit entsprechend flankierter <i>cat</i> -Kassette	diese Arbeit
536 $\Delta ecp3730::cat$ (RS9A)	536-Derivat, Deletion von <i>ecp3730</i> durch homologe Rekombination mit entsprechend flankierter <i>cat</i> -Kassette	diese Arbeit
536 $\Delta rfaH$ $\Delta ecp3730::cat$ (RS9B)	536 $\Delta rfaH$ -Derivat, Deletion von <i>ecp3730</i> durch homologe Rekombination mit entsprechend flankierter <i>cat</i> -Kassette	diese Arbeit
DH5 α	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , $\Delta(argF-lac)$ U169, λ^{-} , $\phi 80lacZ\Delta M15$	Bethesda Research Laboratories (1969)
Nova-blue	<i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1 lac</i> [F ['] <i>proAB lacI^qZ\Delta M15 Tn10</i> (Tet ^r)]	Novagen (2000)
CFT073	Wildtyp, Pyelonephritis-Isolat; O6:K2:H1	Mobley (1990)

Tabelle 3: Verwendete *E. coli* Stämme. (Fortsetzung)

Stamm	Beschreibung	Quelle/Referenz
Nissle 1917	Wildtyp, Fäkalisolat; O6:K5:H1	Nissle (1918)
UTI89	Wildtyp, Zystitis-Isolat; O18:K1:H7	Mulvey (2001)
UTI89 $\Delta fimA-H$ (LH026)	UTI89-Derivat, Deletion des Genclusters <i>fimA-H</i>	Hosch (2012)
UTI89 $\Delta pgaA-D$ (LH024)	UTI89-Derivat, Deletion des Genclusters <i>pgaA-D</i>	Hosch (2012)
03-08304	Diarrhoe-Isolat, STEC; O2:H6; <i>stx2</i> , α -Hly ⁺	Bielaszewska (2014)
04-00955	Diarrhoe-Isolat, STEC; O2:H6; <i>stx2</i> , α -Hly ⁺	Bielaszewska (2014)
05-00787	Diarrhoe-Isolat, STEC; O2:H6; <i>stx2</i> , α -Hly ⁻	Bielaszewska (2014)
UR131	Isolat aus Katheter-assoziiertes hämorrhagischer Zystitis (Katheter <48 h), STEC; O76:H19; LEE ⁻ , <i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>saa</i> , EHEC- <i>hly</i>	Wagenlehner (St. Elisabeth-KH, AG Naber, Straubing, 2004)
UR5703/202	Zystitis-Isolat, STEC; O145:H-; LEE ⁺ , <i>cif</i> , <i>stx2</i> , EHEC- <i>hly</i>	Wagenlehner (St. Elisabeth-KH, AG Naber, Straubing, 2004)
UR5779/201	Zystitis-Isolat, STEC; Ont:H-; LEE ⁺ , <i>stx2</i> , EHEC- <i>hly</i>	Wagenlehner (St. Elisabeth-KH, AG Naber, Straubing, 2004)
UR1352	Zystitis-Isolat, EAEC; O15:H-; <i>pic</i> , <i>aggR</i> , <i>aap</i> , pCVD432, <i>aaf5</i>	Wagenlehner (St. Elisabeth-KH, AG Naber, Straubing, 2004)
536 $\Delta clbA::uvrY$	536-Derivat, Deletion von <i>clbA</i> , Insertion von <i>uvrY</i> aus <i>E. coli</i> CFT073	IMIB-Stamm-sammlung (2007)
536:: <i>uvrY</i>	536-Derivat, Insertion von <i>uvrY</i> aus <i>E. coli</i> CFT073	IMIB-Stamm-sammlung (2007)

2.2 Mäuse

Für das experimentelle Mausmodell der aufsteigenden Harnwegsinfektion wurden weibliche C57BL/6-Mäuse über die Tierzucht der „Charles River Laboratories“ (Sulzfeld, Deutschland) bezogen und unter spezifisch pathogenfreien (SPF-) Bedingungen gehalten. Zu Versuchsbeginn hatten die Tiere jeweils ein Alter von sieben bis acht Wochen. Die Tierversuche erfolgten in Übereinstimmung mit der Tierschutzgenehmigung des Landes Bayern vom 25.08.2009, Aktenzeichen 55.2-2531.01-53/09.

2.3 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und Vektoren sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Verwendete Plasmide.

Vektor / Plasmid	Beschreibung	Quelle/Referenz
pGEM-T	T/A-Klonierungsvektor; <i>bla</i> , <i>lacZα</i>	Promega
pGEM-T Easy	T/A-Klonierungsvektor; <i>bla</i> , <i>lacZα</i> (wie pGEM-T, nur andere multiple Klonierungsstelle)	Promega
pASK75	Expressionsvektor; <i>bla</i> , <i>tetR</i> , <i>tet^{pr/o}</i> (Promotor durch Anhydrotetracyclin induzierbar)	Skerra (1994)
pASK75-His- <i>agn43a</i>	pASK75-Derivat zur induzierbaren Expression von His-getagtem Ag43a-536	diese Arbeit
pASK75-His- <i>agn43b</i>	pASK75-Derivat zur induzierbaren Expression von His-getagtem Ag43b-536	diese Arbeit
pKD46	Hilfsplasmid mit λ -Red Rekombinationssystem; <i>bla</i> , <i>araC-P_{araB}⁻γ-β-exo</i> , <i>ori_{R101}</i> , <i>repA101ts</i> (Promotor durch Arabinose induzierbar, temperatursensitiver ori)	Datsenko und Wanner (2000)
pKD3	Template-Plasmid zum Amplifizieren der <i>FRT</i> -flankierten <i>cat</i> -Kassette; <i>bla</i> , <i>FRT</i> , <i>cat</i> , <i>ori_{Rγ}</i> (<i>pir</i> -abhängig)	Datsenko und Wanner (2000)
pGEN206 Δ <i>SpeI</i>	Expressionsvektor (stabil ohne Antibiotika-Selektionsdruck), Low-Copy; <i>ori_{R101}</i> , <i>gfpuv</i> , <i>repA101</i> , <i>par</i> , <i>bla</i> , <i>hok-sok</i> , <i>parA</i>	Galen (2010)
pGEN206- <i>agn43a</i>	pGEN206 Δ <i>SpeI</i> -Derivat; <i>\Delta gfpuv::P_{agn43a-536}-agn43a-536</i>	diese Arbeit

Tabelle 4: Verwendete Plasmide. (Fortsetzung)

Vektor / Plasmid	Beschreibung	Quelle/Referenz
pGEN206- <i>agn43b</i>	pGEN206 Δ <i>SpeI</i> -Derivat; Δ <i>gfpuv</i> :: <i>P</i> _{<i>agn43b-536</i>} - <i>agn43b-536</i>	diese Arbeit
pIB264	pBR322-Derivat kloniert mit <i>SphI/Clal</i> -Fragment (6 kb) aus pIB6 (kodiert <i>aidA</i> und <i>aah</i>); <i>bla</i>	Benz und Schmidt (1989)
pIB9	pBR322-Derivat kloniert mit <i>HpaI/Clal</i> -Fragment (5,2 kb) aus pIB264 (kodiert <i>aidA</i>); <i>bla</i>	Benz und Schmidt (2001)
pAAH	pACYC184-Derivat kloniert mit <i>SphI/StuI</i> -Fragment (2 kb) aus pIB264 (kodiert <i>aah</i>); <i>cat</i>	Lehmann (2005)

2.4 Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide wurden von den Firmen Biomers.net (Ulm), Sigma-Genosys (Steinheim) und Eurofins MWG (Ebersberg) bezogen und sind im Anhang in Tabelle 18 mit Angaben zu ihrer Verwendung zusammengefasst.

2.5 Chemikalien, Enzyme und Antibiotika

Die verwendeten Chemikalien, Enzyme und Antibiotika wurden von den Firmen Applied Biosystems (Darmstadt), CP-Pharma (Burgdorf), Dianova (Hamburg), Difco (Augsburg), Eurogentec (Köln), GE Healthcare/Amersham Biosciences (Freiburg), Invitrogen (Karlsruhe), MBI Fermentas (St. Leon-Roth), Merck (Darmstadt), New England Biolabs (Frankfurt am Main), Oxoid (Wesel), Qiagen (Hilden), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) erworben.

Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika und ihre jeweilig eingesetzten Konzentrationen sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Verwendete Antibiotika.

Antibiotikum	Lösungsmittel	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin (Amp)	H ₂ O _{dest}	100 mg/ml	100 µg/ml
Chloramphenicol (Cm)	100 % Ethanol	30 mg/ml	30 µg/ml
Kanamycin (Kan)	H ₂ O _{dest}	30 mg/ml	30 µg/ml
Streptomycin (Sm)	H ₂ O _{dest}	100 mg/ml	100 µg/ml
Tetracyclin (Tet)	70 % Ethanol	10 mg/ml	10 µg/ml

2.6 Puffer und Lösungen

Für die Enzymreaktionen wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer und Lösungen verwendet. Alle selbst angesetzten Puffer und Lösungen sind unter den jeweiligen Methoden beschrieben. Für alle Lösungen wurde steriles destilliertes Wasser eingesetzt.

2.7 Nährmedien

Bei allen folgenden Nährmedien diente destilliertes Wasser als Lösungsmittel. Feste Nährböden enthielten zusätzlich 1,5 % (w/v) Agar. Sterilisation erfolgte durch Autoklavieren (15 min, 121 °C). Hitzelabile Zusätze wurden durch Filtration sterilisiert und den Medien nach Abkühlen auf ca. 50 °C zugesetzt.

Lysogeny Broth (LB)-Medium:	Trypton/Pepton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
		ad 1 l H ₂ O _{dest}

Lysogeny Broth (LB)-Agar:	Trypton/Pepton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	Agar	15 g
		ad 1 l H ₂ O _{dest}

Sammelurin:

- sterilfiltrierter menschlicher Urin, der zuvor von der gleichen Anzahl gesunder männlicher und weiblicher Individuen gesammelt wurde
- kann bis zu 1 Woche bei 4 °C aufbewahrt bzw. für spätere Verwendung bei -80 °C weggefroren werden

SOC-Medium:	Trypton/Pepton	20 g
	Hefeextrakt	10 g
	NaCl	0,6 g
	KCl	0,18 g
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	2,04 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2,46 g
		ad 1 l H ₂ O _{dest}

→ nach dem Autoklavieren werden dem Medium 20 mM Glucose zugesetzt

M63-Minimalmedium:	20 % (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10 ml
	KH_2PO_4	13,6 g
	10 % (w/v) MgSO_4	1 ml
	0,1 % (w/v) FeSO_4	1 ml
		ad 0,8 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$
	→ mit KOH auf pH 7,0 einstellen	
	→ danach hinzufügen:	
	10 % (w/v) Casaminsäuren	100 ml
	20 % (w/v) Glucose	20 ml
	0,2 % (w/v) Thiamin	2,5 ml
	ad 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$	
M9-Minimalmedium:	5× M9-Salze	200 ml
	10 % (w/v) Casaminsäuren	30 ml
	1 M MgCl_2	2 ml
	1 M CaCl_2	0,1 ml
	20 % (w/v) Glucose	10 ml
	0,2 % (w/v) Thiamin	1 ml
		ad 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$
	→ <u>5× M9-Salze:</u>	
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	64 g
	KH_2PO_4	15 g
NaCl	2,5 g	
NH_4Cl	5 g	
	ad 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$	
Calcofluor-Medium:	Trypton/Pepton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	Calcofluor	200 mg
		ad 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$
Kongorot-Medium:	Trypton/Pepton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	Kongorot	40 mg
	Coomassie Brilliant Blue R 250	20 mg
		ad 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

Aerobaktinagar:

(I) Basalagar:

Trypton/Pepton	2,5 g
Hefeextrakt	1,5 g
NaCl	2,5 g
Agar	6 g
	ad 0,5 l H ₂ O _{dest}

→ autoklavieren und auf 45 °C abkühlen lassen
 → danach hinzufügen:

20 mM 2',2'-Dipyridyl-Lösung	5 ml
5 mM Titriplex I-Lösung	10 ml

→ Platten gießen

(II) Softagar:

Trypton/Pepton	0,5 g
Hefeextrakt	0,3 g
NaCl	0,5 g
Agar	0,75 g
	ad 0,1 l H ₂ O _{dest}

→ autoklavieren und auf 45 °C abkühlen lassen
 → danach hinzufügen:

20 mM 2',2'-Dipyridyl-Lösung	1 ml
5 mM Titriplex I-Lösung	2 ml

+ 4 ml üN-Kultur des Indikatorstammes *E. coli* EN99
 → eine dünne Schicht des Softagars auf den erstarrten Basalagar geben

Colicinagar:

(I) Basalagar:

Agar	15 g
M9-Minimalmedium	ad 1 l

→ autoklavieren und Platten gießen

(II) Softagar:

Agar	0,75 g
M9-Minimalmedium	ad 100 ml

→ autoklavieren und auf 45 °C abkühlen lassen
 → danach hinzufügen:

+ 1 ml üN-Kultur des *E. coli* Stammes DH5α
 → eine dünne Schicht des Softagars auf den erstarrten Basalagar geben

Blutagar:	LB-Agar mit Schafsblut (sauber gewaschen)	2,5 %
IPTG-X-Gal-Agar:	LB-Agar mit IPTG X-Gal	0,5 mM 80 µg/ml
LB-Schwärmagar:	Trypton/Pepton Hefeextrakt NaCl Agar	10 g 5 g 5 g 3 g ad 1 l H ₂ O _{dest}
Urin-Schwärmagar:	0,9 % (w/v) NaCl Agar → autoklavieren und auf 50 °C abkühlen lassen → 800 ml sterilen gepoolten Urin auf 45 °C erwärmen, zur warmen Agar-Lösung geben und Platten gießen	200 ml 3 g

2.8 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Verwendete Antikörper.

Antikörper	Ursprung	Beschreibung	Referenz
α-Ag43 IgG	Kaninchen	polyklonal, Reaktion mit jeder Ag43 ^α -Variante	P. Klemm (Lyngby, Dänemark)
α-Ag43a-536 ^α IgG	Kaninchen	polyklonal, Kreuzreaktion mit Ag43a-EcN ^α und Flu ^α	Reidl <i>et al.</i> , 2009
α-Ag43b-536 ^α IgG	Kaninchen	polyklonal, Kreuzreaktion mit Ag43b-EcN ^α	Reidl <i>et al.</i> , 2009
α-Kaninchen IgG-HRP	Ziege	polyklonal, Sekundärantikörper, mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert	Dianova (Hamburg)
α-Penta-His IgG	Maus	monoklonal, ermöglicht sensiblen Nachweis His-getaggtter Proteine	Qiagen (Hilden)

Tabelle 6: Verwendete Antikörper. (Fortsetzung)

Antikörper	Ursprung	Beschreibung	Referenz
α -Maus IgG-HRP	Ziege	polyklonal, Sekundärantikörper, mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert	Dianova (Hamburg)
α -AIDA-I IgG	Kaninchen	polyklonal, Reaktion mit glykosyliertem AIDA-I (glykosylierte α -Domäne)	I. Benz und M. A. Schmidt (Münster)
α -c600/p4 IgG	Kaninchen	polyklonal, Reaktion mit glykosyliertem und unglykosyliertem AIDA-Gesamtprotein (α - und β -Domäne)	I. Benz und M. A. Schmidt (Münster)
α -fp12 IgG	Kaninchen	polyklonal, Reaktion mit AIDA ^C (β - bzw. Translokator-Domäne)	I. Benz und M. A. Schmidt (Münster)

2.9 Molekularbiologische Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten molekularbiologischen Kits sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Verwendete molekularbiologische Kits.

Kit	Hersteller
ABI Prism BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
pGEM-T und pGEM-T Easy Vector System	Promega (Mannheim)
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick PCR Purification/Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
Protino Ni-TED 2000 Packed Columns	Macherey-Nagel (Düren)
DIG Glycan Detection Kit	Roche Diagnostics (Mannheim)
GlycoProfile III (Fluorescent Glycoprotein Detection Kit)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Glycopro (Glycoprotein Detection Kit)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

2.10 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller (Modell)
Analysenwaage	Chyo Balance Corp. (JL-180)
Autoklaven	Fedegari (FOM/B50), Biomedis (Tecnoclav), H+P Labortechnik (Varioclav)
Brutschrank (37 °C)	Heraeus (Function Line)
Chemilumineszenzkamera	Intas (Chemi Lux)
Eismaschine	Scotsman (AF30)
Elektrophoresekammern	Bio-Rad (Sub-Cell GT, Mini-PROTEAN 3)
Elektroporator	Bio-Rad (Gene Pulser Xcell, MicroPulser)
Feinpipetten	Eppendorf (Reference, Research)
Gefrierschränke	Liebherr (Öko super, -20 °C), Hereaus (-80 °C)
Gel-Dokumentation	Intas (GDS, Gel-Pro Analyzer 4.5)
Grobwaage	Kern (470)
Heizblöcke	Peqlab (HX-2), Eppendorf (Thermostat 5320)
Homogenisatoren	MP Biomedicals (FastPrep 24), Medic Tools (Dispo- mix), Miltenyi Biotec (gentleMACS Dissociator)
Koloniezähler	Synbiosis (ProtoCOL)
Kühl-Mikrozentrifuge	Heraeus (Biofuge 13 R)
Kühlschrank	Privileg (Öko)
Kühlzentrifuge	Heraeus (Multifuge 1 L-R)
Magnetrührer	GLW (M21)
Mikroliterspritze	Hamilton (705 LT SYR)
Mikrowelle	Privileg (8020)
Narkoseeinheit	Dräger (tragbares Narkosegerät)
Narkosegas-Verdampfer	Dräger (Vapor 19.1)
Netzgerät	Bio-Rad (PowerPac 300)
pH-Meter	WTW (Inolab pH 720)
Photometer	Amersham Biosciences (Ultrospec 3100 pro)
Pipettierhilfe	Brand (Accu Jet Pro)
Proteintransfersystem	Bio-Rad (Trans-Blot SD), Roth (Semi Dry Blotter)

Tabelle 8: Verwendete Geräte. (Fortsetzung)

Gerät	Hersteller (Modell)
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific (Innova 4300)
Sequenzierer	Applied Biosystems (ABI Prism 310 Genetic Analyzer)
Spektrophotometer	Thermo Scientific (NanoDrop 1000)
Sterilbank	Nunc (Microflow biological safety cabinet)
Thermocycler	Biometra (T3)
Tischmischer	Scientific Industries (Vortex Genie 2)
Tischzentrifuge	Eppendorf (5418)
Ultraschallgerät	Bandelin (Sonopuls HD 70, UW 70)
UV-Crosslinker	Bio-Rad (GS Gene Linker)
Wasserbad	Memmert (GFL 1083)
Zentrifuge	Beckman (J2-HC)

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden sämtlich von den Firmen ABgene (Hamburg), Becton Dickinson (Heidelberg), Bio-Rad (München), Eppendorf (Hamburg), Greiner Bio-One (Frickenhausen), Peqlab (Erlangen), Millipore (Schwalbach), Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach), MP Biomedicals (Eschwege), Sarstedt (Nümbrecht), VWR (Darmstadt) sowie Whatman (Dassel) bezogen.

3 Methoden

3.1 Kultur von Bakterien

3.1.1 Anzucht und Stammhaltung

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

Für Dauerkonserven von Bakterienstämmen wurden Aliquots von Flüssigkulturen mit sterilem Glycerin versetzt (Endkonzentration 30 %) und bei -80 °C eingefroren und gelagert.

3.1.2 Bestimmung des Wachstums in Flüssigkulturen

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

3.2 Molekularbiologische und genetische Methoden

3.2.1 Isolierung von genomischer DNA aus *E. coli*

Die Isolierung genomischer DNA aus *E. coli* erfolgte modifiziert nach Grimberg *et al.* (1989). Von einer Bakterien-ÜNK wurden 2 ml in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß abzentrifugiert (5 min, 6000 x g). Das Bakterienpräzipitat wurde einmal mit 1 ml TNE gewaschen und anschließend in 570 μl TNEX resuspendiert. Es wurden 30 μl

Lysozymbilösung (20 mg/ml in H₂O_{dest}) zugegeben und die Bakteriensuspension für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 30 µl Proteinase K (20 mg/ml in H₂O_{dest}) folgte eine Inkubation für 2 h bei 65 °C, bis die Bakteriensuspension aufklarte. Die Lösung wurde mit 200 µl Phenol-Chloroform-Lösung (1:1) versetzt, kurz gevortext und für 10 min bei 16000 x g und RT zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 30 µl 5 M NaCl und 2,5 Vol. eiskaltem EtOH (100 %) versetzt. Nach vorsichtigem Invertieren wurde der Ansatz erneut für 10 min bei 16000 x g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Präzipitat nach einmaligen Waschen mit 70 %igem EtOH getrocknet und in 100 µl H₂O_{dest} aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank.

3.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

3.2.2.1 Isopropanol-Extraktion von Plasmid-DNA

2 ml Bakterien-ÜNK wurden in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 2 min bei 16000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Bakterien-sediment in 150 µl Puffer P1 (Qiagen) resuspendiert und 7,5 µl Lysozymbilösung (20 mg/ml in H₂O_{dest}) zugegeben. Nach 10 min Inkubationszeit bei RT wurden 300 µl Puffer P2 (Qiagen) zugefügt. Der Ansatz wurde durch fünfmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes gut durchmischt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 225 µl Puffer P3 (Qiagen) versetzt, wieder fünfmal invertiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Zellfragmente und denaturierte Proteine wurden mittels Zentrifugation (15 min, 16000 x g, RT) gefällt, der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und nochmals für 5 min bei 16000 x g zentrifugiert. Nach erneuter Überführung des Überstandes in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde der Ansatz zur Fällung der Plasmid-DNA mit 472 µl Isopropanol versetzt und für 15 min bei 16000 x g zentrifugiert. Die pelletierte Plasmid-DNA wurde durch erneute Zentrifugation (10 min, 16000 x g, RT) mit 250 µl 70 %igem EtOH gewaschen und nach Dekantieren des Überstandes an der Luft getrocknet. Abschließend wurde die getrocknete Plasmid-DNA in 50 µl H₂O_{dest} aufgenommen, die DNA-Konzentration bestimmt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.2.2 Phenol-Chloroform-Extraktion von Plasmid-DNA

Zunächst erfolgte die Phenol-Chloroform-Extraktion analog der Isopropanolfällung mit den Puffern P1, P2 und P3 (Qiagen). Nach dem 15-minütigen Inkubationsschritt auf Eis wurden nun 100 µl Phenol-Chloroform-Lösung (1:1) zugefügt, der Ansatz durch kurzes Vortexen gut durchmischt und für 10 min bei 16000 x g zentrifugiert. Hierbei kam es zu einer Phasentrennung der zuvor hergestellten Emulsion: Die untere organische Phase enthielt die Zelltrümmer und Proteine, die obere wässrige Phase die DNA. RNA wurde bereits durch die RNase A in Puffer P1 abgebaut. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Reaktionsgefäß wurde dann mit 100 %igem eiskaltem EtOH bis zur 2 ml Füllgrenze aufgefüllt. Nach 30 min Zentrifugation bei 16000 x g wurde der Überstand verworfen und das Präzipitat mit 1 ml 70 %igem EtOH gewaschen (10 min, 16000 x g). Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet für 30 min bei RT getrocknet. Im Anschluss wurde das Pellet in 20 µl H₂O_{dest} gelöst, die DNA-Konzentration bestimmt und die Probe bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA mittels kommerziellem Kit

Um Plasmid-DNA zu gewinnen, die frei von störenden Exonukleasen war, wurde die Isolierung unter Zuhilfenahme des QIAprep Spin Miniprep Kits (Quiagen, siehe 2.9) durchgeführt. Die Isolierung der DNA erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde mit 30 µl H₂O_{dest} eluiert, ihre Konzentration bestimmt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA im größeren Maßstab erfolgte mittels QIAGEN Plasmid Midi Kit (Quiagen, siehe 2.9) gemäß Protokoll des Herstellers.

3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion („*polymerase chain reaction*“, PCR) dient der Amplifikation von DNA-Fragmenten. In dieser Arbeit wurde die PCR für folgende Zwecke angewandt:

- Nachweis von DNA-Abschnitten in *E. coli* Stämmen
- Amplifikation von DNA-Abschnitten für Klonierungen und Sequenzierungen
- Amplifikation von Resistenzkassetten für die direkte Integration ins Chromosom

- Überprüfung der Insertion und Orientierung von Resistenzkassetten und anderen Konstrukten (z.B. des His-Tags)

Standardansätze enthielten 1× Reaktionspuffer, 0,5 µM jedes Oligonukleotids, 25 µM jedes dNTPs, 1,5-3 mM MgCl₂ sowie 0,025-0,04 U/µl Polymerase und variierten im Volumen je nach Anwendung zwischen 20-400 µl. Als Ausgangsmaterial („*template*“) für die Amplifikation diente entweder isolierte Plasmid-DNA (0,5 ng/µl Ansatz) oder Bakterienzellysat (0,05 µl/µl Ansatz).

Als Polymerase für Standard-PCRs diente die *Taq*-DNA-Polymerase (Quiagen, Sigma-Aldrich). Längere Amplifikate, für die zudem eine Polymerase mit Korrekturlese („*proof-reading*“-) Aktivität benötigt wurde, entstanden unter Zuhilfenahme der Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase (NEB) bzw. der DAp GoldStar DNA-Polymerase (Eurogentec).

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

Der Erfolg der PCR-Reaktion wurde durch Elektrophorese eines 5-10 µl Aliquots in einem Agarosegel überprüft. Bei Bedarf wurden die PCR-Produkte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, siehe 2.9) gemäß Herstellerangaben für weitere Anwendungen wie Transformationen oder Klonierungen gereinigt.

3.2.4 Agarosegelelektrophorese

DNA-Moleküle können anhand ihrer Größe im elektrischen Feld mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt werden. Die Nukleinsäuren wandern dabei aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen im Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat in der Agarosematrix zur Anode und werden in Abhängigkeit ihrer Molekularmasse und Konformation aufgetrennt.

Für Routineanalysen wurde DNA in 1-2 %igen Agarosegelen in 1× TAE-Puffer bei 6 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Vor dem Lauf wurden die Proben mit DNA-Probenpuffer

versetzt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard zur Bestimmung der Fragmentgröße diente die 1 kb Plus DNA-Leiter von Invitrogen. Die Gele wurden anschließend mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) gefärbt, mit H₂O_{dest} gewaschen und unter UV-Licht ausgewertet.

Elektrophoresepuffer (50x TAE):	Tris	242 g
	Essigsäure	57,1 ml
	0,5 M EDTA	100 ml
		ad 1 l H ₂ O _{dest} →pH 8,3
Agarosegel:	Agarose	1-2 % in 1x TAE
DNA-Probenpuffer (6x):	TE-Puffer	50 % (v/v)
	Glycerin	49,2 % (v/v)
	Xylencyanol	0,04 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,04 % (w/v)
Ethidiumbromid-Färbebad:	Ethidiumbromid	0,5 µg/ml H ₂ O _{dest}

3.2.5 Gelextraktion

Die DNA-Extraktion aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, siehe 2.9) gemäß Herstellerangaben. Die extrahierte DNA wurde abschließend in 30 µl H₂O_{dest} aufgenommen, die Konzentration bestimmt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.6 DNA-Sequenzierung

PCR-Produkte wurden mittels ABI Prism BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, siehe 2.9) gemäß Herstellerangaben in einer modifizierten PCR-Reaktion sequenziert. Die Aufreinigung erfolgte durch EtOH-Fällung. Die Auftrennung der PCR-Produkte und somit die Bestimmung der DNA-Sequenz erfolgte an einem ABI Prism 3100 Genetic Analyzer im Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg.

3.2.7 Enzymatische Hydrolyse von DNA

Die enzymatische Hydrolyse von Plasmid-DNA durch Restriktions-Endonukleasen erfolgte in Reaktionsansätzen von 20-50 µl bei 37 °C für 2 h im vom Hersteller empfohlenen Puffersystem. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung des Enzyms (20 min, 65 °C) gestoppt und der Ansatz gegebenenfalls mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, siehe 2.9) gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Eine Überprüfung der erfolgreichen Hydrolyse erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese.

3.2.8 Klonierung von DNA

Vor dem eigentlichen Klonierungsschritt wurden die 5'-Enden der DNA dephosphoryliert. Zur Entfernung der 5'-Phosphatgruppen wurde der jeweilige Restriktionsansatz nach Hitzeinaktivierung mit 1/10 Vol. Phosphatasepuffer gemischt und pro µg DNA 5 U Antarctic Phosphatase (NEB) zugesetzt. Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert, hitzeinaktiviert (10 min, 65 °C) und über Agarosegelelektrophorese aufgereinigt.

Durch PCR generierte DNA-Abschnitte wurden mit Hilfe des pGEM-T bzw. pGEM-T Easy Vector Systems (Promega, siehe 2.9) gemäß Herstellerangaben kloniert. Für die PCR wurden hierbei in der Regel Polymerasen verwendet, die einen terminalen Adeninrest an das 3'-Ende ihrer Produkte anhängen, so dass eine direkte T/A-Klonierung möglich war. Bei der Verwendung von Polymerasen, die „blunt-end“-Produkte lieferten, wurden die 3'-Enden zunächst in einer weiteren Reaktion mittels *Taq*-DNA-Polymerase einfach adenyliert.

Für Klonierungen von Restriktionsfragmenten mit kompatiblen Enden zum gespaltenen Klonierungsvektor wurden dephosphorylierter Vektor und Insert in einem Verhältnis 1:3 gemischt und in einem Volumen von 10 µl zusammen mit 1/10 Vol. Ligationspuffer und 50 U T4-DNA-Ligase (NEB) über Nacht bei 4 °C inkubiert.

3.2.9 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

3.2.9.1 Herstellung elektrokompenter Bakterienzellen

Aus einer *E. coli* ÜNK wurden 50 ml LB-Medium im Verhältnis 1:100 beimpft und bei 37 °C unter Schütteln bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} \approx 0,6$) inkubiert. Die Bakterienkultur wurde dann 15 min auf Eis gekühlt, abzentrifugiert (5 min,

3000 x g, 4 °C) und zweimal mit 40 ml eiskaltem H₂O_{dest} sowie einmal mit 1 ml eiskaltem 10 %igem Glycerin gewaschen. Das Zellpellet wurde in 150 µl 10 %igem Glycerin resuspendiert, direkt verwendet oder in Aliquots zu 40 µl bei -80 °C gelagert.

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen für die Transformation mit PCR-Produkten nach Datsenko und Wanner (2000) wurden die entsprechenden *E. coli* Stämme unter geeignetem Selektionsdruck bei 30 °C angezogen und Arabinose (100 mM Endkonzentration) zur Induktion der λ-Red-Rekombinase vom Helferplasmid pKD46 zugesetzt.

3.2.9.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen

Aus einer *E. coli* ÜNK wurden 50 ml LB-Medium im Verhältnis 1:100 beimpft und bei 37 °C unter Schütteln bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ ≈ 0,6) inkubiert. Die Bakterienkultur wurde dann 15 min auf Eis gekühlt, abzentrifugiert (5 min, 3000 x g, 4 °C) und mit 25 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1,25 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und 30-60 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 520 µl eiskaltem Glycerin (87 %) wurden die Zellen direkt verwendet oder in Aliquots zu 80 µl bei -80 °C gelagert.

3.2.10 Transformation von Bakterien

3.2.10.1 Transformation elektrokompetenter Bakterien

Für die Transformation wurden die elektrokompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit Plasmid-DNA, PCR-Produkt oder einem Aliquot eines Ligationsansatzes vermischt und für 30 min auf Eis gestellt. Der Ansatz wurde in eine gekühlte 2-mm-Elektroporationsküvette überführt und die Transformation erfolgte bei 1,8-2,5 kV, 200 Ω und 25 µF. Die Zellen wurden in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und für 2 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden geeignete Volumina auf Selektionsmedium ausplattiert und die Platten bei entsprechender Temperatur über Nacht inkubiert.

3.2.10.2 Transformation chemisch kompetenter Bakterien (Hitzeschock)

Für die Hitzetransformation wurden die chemisch kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit 0,5-1 µg Plasmid-DNA bzw. 5-10 µl Ligationsansatz versetzt und für 30 min auf Eis gekühlt. Nach einem Hitzeschock (90 s, 42 °C) wurden die Zellen für 5 min auf Eis gestellt

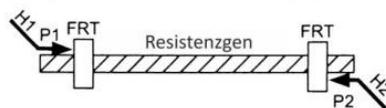
und danach in 1 ml LB-Medium aufgenommen. Der Ansatz wurde für 2 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden geeignete Volumina auf Selektionsmedium ausplattiert und die Platten bei entsprechender Temperatur über Nacht inkubiert.

3.2.11 Herstellung von *E. coli* Deletionsmutanten

Deletionsmutanten von *E. coli* Stämmen wurden mittels der λ -Red-Rekombinase vermittelten Allelaustauschmethode (Datsenko und Wanner, 2000) hergestellt, die gegebenenfalls für die jeweilige Anwendung modifiziert wurde.

Generell wurden die entsprechenden Stämme, in denen die auf dem Plasmid pKD46 kodierte λ -Red-Rekombinase durch Arabinose induziert worden war, mit PCR-Produkten transformiert. Diese bestanden aus einem Chloramphenicolresistenzgen, flankiert von zwei FRT-Sequenzen, und wurden durch Rekombination über kurze, durch die zur Amplifikation verwendeten Primer erzeugten homologe Bereiche (40-55 bp) in das Chromosom integriert (Abbildung 6).

Schritt 1: PCR-Amplifikation des FRT-flankierten Resistenzgens



Schritt 2: Transformation des λ -Red-Rekombinase exprimierenden Stammes



Schritt 3: Selektion der Antibiotikum-resistenten Transformanten

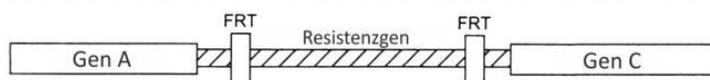


Abbildung 6: Schematische Darstellung des λ -Red-Rekombinase vermittelten Allelaustauschs.

H1 und H2 repräsentieren die homologen Bereiche, P1 und P2 stehen für die Primer-Bindestellen.

Modifiziert nach Datsenko und Wanner, 2000.

In der Regel wurden die zu integrierenden PCR-Produkte in einem 400 μ l-Ansatz amplifiziert, aufgereinigt, mit EtOH gefällt und in 10 μ l H₂O_{dest} aufgenommen. Zur Elektroporation wurden davon 2-3 μ l eingesetzt. Transformanten wurden bei 37 °C anhand ihres entsprechenden resistenten Phänotyps selektiert und mittels PCR überprüft.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Isolierung von Proteinen

3.3.1.1 Gesamtzellextrakt

Für die Isolierung von Gesamtzellproteinen wurde 1 ml einer Bakterien-ÜNK der $OD_{600} = 1$ abzentrifugiert (10 min, 16000 x g), das Pellet in 80 µl TE-Puffer aufgenommen und mit 20 µl 5x Lämmli-Puffer (Lämmli, 1970) versetzt. Der Ansatz wurde für 10 min bei 96 °C aufgeköcht, anschließend kurz anzentrifugiert und auf Eis abgekühlt. Um die Viskosität der Probe zu verringern und somit die Weiterverarbeitung zu erleichtern, wurden 4 µl 25 mM $MgCl_2$ und 0,5 µl Benzonase-Endonuklease (Merck Millipore) hinzugefügt und der Ansatz für 10 min bei 37 °C inkubiert. Von diesem Extrakt wurden 10-20 µl auf ein SDS-Polyacrylamidgel (siehe 3.3.4) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

TE-Puffer:	Tris (pH 7,5)	10 mM
	EDTA (pH 8,0)	1 mM
		ad 1 l H_2O_{dest}

Lämmli-Puffer (5x):

<u>Lösung I:</u>	SDS	1,1 g
	EDTA	0,41 g
	$NaH_2PO_4 \times 1 H_2O$	0,17 g
	β -Mercaptoethanol	1,1 ml
	→ mit NaOH auf pH 7,2 einstellen	
		ad 10 ml H_2O_{dest}

Lösung II: 0,2 % Bromphenolblau in 50 % Glycerin

→ Lösung I und II zu gleichen Teilen mischen, aliquotieren, Lagerung -20 °C

3.3.1.2 Hitzeextraktion

Autotransporter wie Antigen 43 werden nach der Translokation autokatalytisch gespalten und bilden einen heterooligomeren Komplex bestehend aus α - und β -Untereinheit (Kjærsgaard *et al.*, 2002), wobei die β -Untereinheit in der äußeren Zellmembran verbleibt. Die periphere α -Domäne bleibt nur über nichtkovalente Bindungen mit der integralen

β -Domäne verbunden. Bei der Hitzeextraktion können durch kurzes Erhitzen nichtkovalent an die Zelloberfläche gebundene Proteine abgeschert und diese dann mit Hilfe eines SDS-Polyacrylamidgels (siehe 3.3.4) sichtbar gemacht werden.

Für die Hitzeextraktion wurden Bakterien einer 50 ml-ÜNK durch Zentrifugation (10 min, 4000 x g) geerntet, zweimal mit 0,9 % NaCl gewaschen und anschließend in 5 ml Abscherpuffer aufgenommen. Die Zellsuspension wurde für 25 min bei 60 °C im Wasserbad schüttelnd inkubiert und danach sofort auf Eis abgekühlt. Durch intensives Schütteln (1 min) ließen sich angelagerte Proteine der äußeren Membran von der Zelloberfläche gewinnen. Die Suspension wurde mittels Zentrifugation (15 min, 18000 x g) geklärt. Die sich im Überstand befindlichen Proteine wurden entweder mit Trichloressigsäure gefällt (siehe 3.3.2.1) oder im Fall von His-getaggten Proteinen mit Hilfe einer Nickel-Säule aufgereinigt (siehe 3.3.2.2).

Abscherpuffer:

Tris (pH 7,5)	0,5 mM
NaCl	75 mM
	ad 1 l H ₂ O _{dest}

→ Zugabe von Proteaseinhibitor (Roche)

→ Lagerung bei 4 °C

3.3.1.3 Überexpression rekombinanter Proteine

Die Proteinüberexpression erfolgte in dieser Arbeit modifiziert nach Skerra (1994). Hierfür wurden 50 ml frisches Medium im Verhältnis 1:100 mit einer das Expressionssystem pASK75 tragender Bakterien-ÜNK beimpft und bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Nach 1 h wurde die Kultur mit 0,4 µg/l Anhydrotetracyclin induziert. In der Regel erreichten die Schüttelkulturen nach insgesamt siebenstündiger Inkubation bei 37 °C eine OD₆₀₀ von 0,8 und wurden dann je nach Versuchsansatz als Gesamtzellextrakt (siehe 3.3.1.1) oder Hitzeextrakt (siehe 3.3.1.2) weiterbehandelt.

3.3.2 Proteinaufreinigung

3.3.2.1 Fällung mit Trichloressigsäure

Die jeweilige Proteinlösung wurde mit Trichloressigsäure (Endkonzentration 10 % (w/v)) versetzt und über Nacht bei 4 °C stehen gelassen. Durch Zentrifugation (15 min, 18000 x g, 4 °C) wurden die ausgefallenen Proteine sedimentiert, dreimal mit 100 %igem EtOH gewaschen und danach luftgetrocknet. Das getrocknete Pellet wurde anschließend in geeignetem Volumen TE-Puffer aufgenommen und mit Proteaseinhibitor (Roche) versetzt.

3.3.2.2 Nickel-Affinitätschromatographie mit Protino Ni-TED 2000-Säule

Die Aufreinigung His-getaggtter Proteine erfolgte nach dem Prinzip der Nickel-Affinitätschromatographie. Hierbei dienen matrixgebundene Nickel (Ni^{2+})-Ionen als immobilisierte Liganden, die spezifisch basische Gruppen von Proteinen – in diesem Fall terminale poly-Histidin-Reste – reversibel binden. Diese Interaktion mit dem Liganden wird genutzt, um His-getaggte Proteine selektiv aus einer komplexen Proteinlösung herauszuadsorbieren. Durch kompetitive Verdrängung mit Imidazol kann das His-getaggte Protein anschließend wieder aus der Bindung gelöst und eluiert werden.

Für die Aufreinigung wurde das Protino Ni-TED 2000 Packed Columns-Kit (Macherey-Nagel, siehe 2.9) verwendet. Die Proteinlösung wurde auf eine mit 1x LEW-Puffer äquilibrierte Protino Ni-TED 2000-Fertigsäule gegeben. Der Durchfluß beruht hierbei auf der Gravitationskraft. Nach dem Waschen mit 8 ml 1x LEW-Puffer wurden die His-getaggtten Proteine mit 9 ml 1x EB-Puffer von der Säule eluiert.

Puffer aus dem Protino Ni-TED 2000 Packed Columns-Kit:

1x LEW-Puffer (pH 8,0):	NaH_2PO_4	50 mM
	NaCl	300 mM
1x EB-Puffer (pH 8,0):	NaH_2PO_4	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	250 mM

Sollte das so aufgereinigte Protein nachfolgend mittels massenspektrometrischer Analyse (MALDI-TOF) untersucht werden, musste für die Nickel-Affinitätschromatographie ein phosphatfreies Puffersystem verwendet werden. Der LEW-Puffer wurde dabei durch den Equi-Wasch-Puffer und der EB-Puffer durch den Elutions-Puffer ersetzt.

1x Equi-Wasch-Puffer (pH 8,0):	Tris	20 mM
	NaCl	500 mM

1x Elutions-Puffer (pH 8,0):	Tris	20 mM
	NaCl	500 mM
	Imidazol	250 mM

3.3.2.3 Dialyse von Proteinen

Die mittels Nickel-Affinitätschromatographie (siehe 3.3.2.2) gewonnene Proteinlösung wurde über Nacht bei 4 °C in einer Zellutrans-Schlauchmembran (MWCO 8000-10000; Roth) gegen 50 mM Tris-Puffer dialysiert.

3.3.2.4 Aufkonzentrieren von Proteinen

Wenn eine Fällung mit Trichloressigsäure (siehe 3.3.2.1) ungeeignet war, wurden die Proteinlösungen in Amicon Ultra-15-Zentrifugalfiltereinheiten (Millipore) mit einer Molekulargewichtsabgrenzung von 50 kDa überführt. Durch anschließende Zentrifugation für 15-20 min bei 4000 x g konnte das Volumen der Proteinlösung auf 170-200 µl eingengt werden.

3.3.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels Roti-Nanoquant

Von allen isolierten Proteinproben wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Zur Quantifizierung absoluter Proteinmengen wurde das Roti-Nanoquant-System der Firma Roth verwendet, das auf einer Modifikation der Proteinbestimmung nach Bradford (1976) beruht. Hierfür wurden für eine Eichgerade definierte BSA-Mengen (0-100 µg/ml) in Messküvetten vorgelegt (Roti-Nanoquant, Benutzerhandbuch). Zu den 200 µl der Standard- sowie Proteinproben wurden jeweils 800 µl 1x Roti-Nanoquant-Lösung gegeben, gemischt und deren Absorption gegen reines Wasser als Referenz bei 590 nm sowie 450 nm photometrisch gemessen. Anhand der Eichgeraden, die sich aus dem

Quotienten $A_{590\text{ nm}}/A_{450\text{ nm}}$ aufgetragen gegen die eingesetzten Proteinmengen der Standardproben ergab, konnte die Konzentrationen der jeweiligen Proteinproben ermittelt werden.

3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Bei der „*sodium dodecyl sulfate*“ Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt. Für die Elektrophorese wurden 1,0 mm dicke Flachgele der Größe 8 x 7 cm in einer vertikalen Laufkammer (Bio-Rad Mini-PROTEAN 3) verwendet. SDS-Gele bestehen in der Regel aus einem Trenngel (je nach Größe des aufzutrennenden Proteins 4-12 %ig) und einem Sammelgel (5 %ig). In dieser Arbeit wurden 12 %ige Trenngele verwendet. Tabelle 9 zeigt die Zusammensetzung der Polyacrylamidgele abgestimmt auf das Bio-Rad-System.

Als Größenstandards wurden die PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas) und der Precision Plus Protein All Blue Standard (Bio-Rad) verwendet.

Tabelle 9: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für SDS-PAGE.

Komponenten	Trenngel (12 %, 15 ml)	Sammelgel (5%, 5 ml)
H ₂ O _{dest}	4,9 ml	3,4 ml
Acrylamid/Bis-Lösung (30 %)	6 ml	830 µl
1,5 M Tris (pH 8,8)	3,8 ml	-
1,0 M Tris (pH 6,8)	-	630 µl
10 % SDS	150 µl	50 µl
10 % APS	150 µl	50 µl
TEMED	6 µl	5 µl

Die Proteinproben wurden vor dem Lauf mit Lämmli-Puffer versetzt und für 10 min bei 96 °C denaturiert. Die Gelkammer wurde mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt und die Proben in die Geltaschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 1 h bei konstanter Stromstärke (25 mA pro Gel). Nach der Elektrophorese wurden die SDS-Gele mit Coomassie-Lösung gefärbt oder für Immunoblot-Analysen bzw. Glykoprotein-Analysen eingesetzt.

10x SDS-Laufpuffer:	Tris	30,3 g
	Glycin	144,2 g
	SDS	10 g
		ad 1 l H ₂ O _{dest}

3.3.5 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Zur Visualisierung der mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurde das Trenngel nacheinander in Coomassie-Färbelösung (20 min), Entfärber I (zweimal 20 min) und Entfärber II (mind. zweimal 20 min) geschwenkt, bis das Bandenmuster gut sichtbar war. Zur Dokumentation wurde das Gel abschließend am Computer eingescannt.

Coomassie-Färbelösung:	Coomassie Brilliant Blau R250	2 g
	Coomassie Brilliant Blau G250	0,5 g
	EtOH (100 %)	476 ml
	Essigsäure	100 ml
		ad 1 l H ₂ O _{dest}

Entfärbelösung I:	EtOH (100 %)	500 ml
	Essigsäure	100 ml
		ad 1 l H ₂ O _{dest}

Entfärbelösung II:	EtOH (100 %)	50 ml
	Essigsäure	75 ml
		ad 1 l H ₂ O _{dest}

3.3.6 Western Blot (Immunoblot)

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

3.3.6.1 Proteintransfer („*semidry blot*“)

Der Elektrotransfer der Proteine auf die Nitrozellulose-Membranen erfolgte nach dem „*semidry blot*“-Verfahren (Kyhse-Andersen, 1984, modifiziert). Hierfür wurden zunächst

neun in Blotpuffer getränkte Whatman-Papiere auf die mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ befeuchtete Anodenplatte gelegt, gefolgt von der ebenfalls in Blotpuffer angefeuchteten Membran. Das SDS-Gel wurde luftblasenfrei auf die Membran gelegt und mit drei in Blotpuffer getränkten Whatman-Papieren abgedeckt. Zum Schluss wurde die mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ befeuchtete Kathodenplatte aufgesetzt und der Transfer für 55 min bei 17 V durchgeführt.

Oneway-Blotpuffer (pH 9,2):	Tris	5,82 g
	Glycin	2,93 g
	SDS	0,375 g
	Methanol	200 ml
		ad 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

3.3.6.2 Immundetektion

Nach dem Transfer wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für mindestens 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in Blockierlösung (5 % Magermilchpulver/TBS-T) geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T erfolgte die Inkubation mit einer geeigneten Verdünnung des primären Antikörpers in 2,5 % Magermilchpulver/TBS-T für 1 h bei RT. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran mit der Sekundärantikörper-Lösung inkubiert, ebenfalls für 1 h bei RT. Ungebundener Antikörper wurde abschließend durch mehrmaliges Waschen mit TBS-T entfernt. Die Entwicklung des Blots erfolgte durch Zugabe der Entwicklerlösung. Die hierbei von Meerrettich-Peroxidase katalysierte Reaktion beruht auf der Oxidation von Luminol durch Wasserstoffperoxid, bei der Licht emittiert wird. Diese Chemilumineszenz konnte mit Hilfe eines lichtsensitiven Kamerasystems (ChemiLux, Intas) detektiert werden.

TBS (10x):	Tris	0,2 M
	NaCl	1,5 M
	→ mit HCl auf pH 8,0 einstellen	
		ad 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

TBS-T (1x):	1x TBS + 0,1 % Tween 20
--------------------	-------------------------

Entwicklerlösung:

<u>Lösung A:</u>	0,1 M Tris-HCl (pH 8,6)	200 ml
	Luminol	50 mg
<u>Lösung B:</u>	DMSO	10 ml
	para-Hydroxycoumarinsäure	11 mg
<u>Lösung C:</u>	30% H ₂ O ₂	

→ erst direkt vor Entwicklung die drei Lösungen in folgendem Verhältnis zusammengeben:

4 ml Lösung A + 400 µl Lösung B + 1,2 µl Lösung C

3.3.7 Untersuchungen zum Glykosylierungsstatus von Proteinen

3.3.7.1 Detektion von Glykoproteinen mit Hilfe kommerzieller Kits

Um die posttranslationale Glykosylierung von Proteinen nachzuweisen, wurden in dieser Arbeit verschiedene Kits verwendet. Das Grundprinzip der Kits liegt in der Oxidierung von Zuckern zu Aldehyden durch Perjodat. Die Glykoproteine wurden entweder direkt im SDS-Gel oder nach dem Blotten auf Nitrozellulose-Membran angefärbt. Dazu wurden die Proteine wie beschrieben gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 3.3.4) und auf Nitrozellulose geblottet (siehe 3.3.6.1). Im Anschluss daran wurden mit den nachfolgend aufgeführten Kits gearbeitet.

DIG Glycan Detection Kit (Roche)

Mit Hilfe des DIG Glycan Detection Kits können auf Nitrozellulose transferierte Glykoproteine in einem Enzym-Immunoassay indirekt durch Farbreaktion nachgewiesen werden. Der Assay wurde gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde 1 µg Transferrin, als Negativkontrolle 1 µg Creatinase verwendet. Zur Dokumentation wurde die gefärbte Nitrozellulose-Membran abschließend am Computer eingescannt.

Glycopro (Sigma-Aldrich)

Das Prinzip des Glycopro Kits beruht auf der klassischen Anfärbung von Glykoproteinen mit PAS (Perjodsäure/Schiff-Reagenz). Die oxidierten Zucker reagieren hier mit dem Fuchsin des Schiff-Reagenz zu rot-violetten Komplexen, die im SDS-Gel sichtbar werden.

Die Nachweisgrenze liegt bei 25-100 ng Carbohydrat. Zur Dokumentation wurde das SDS-Gel abschließend am Computer eingescannt.

GlycoProfile III (Sigma-Aldrich)

Beim GlycoProfile III Kit werden die Glykoproteine spezifisch mit Hilfe eines fluoreszierenden Farbstoffes im SDS-Gel dargestellt. Diese Reaktion hat eine Nachweisgrenze von 5-25 ng Carbohydrat und besitzt somit eine hohe Sensitivität. Zur Dokumentation wurde das SDS-Gel unter UV-Licht-Anregung fotografiert.

3.3.7.2 Untersuchung möglicher Glykoproteine durch Massenspektrometrie

Um eine genauere Kenntnis über den Glykosylierungsstatus der Proteine zu erlangen, wurden die mittels Nickel-Affinitätschromatographie (siehe 3.3.2.2) gewonnenen Proteinproben nach ihrer Aufreinigung zur massenspektrometrischen Analyse eingeschickt. Die Bearbeitung und Auswertung am Quadrupol-Flugzeit-(Q-TOF)-Massenspektrometer (Micromass, Manchester, UK) wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Michael Mormann (Institut für Hygiene, Universitätsklinikum Münster) übernommen. Die für die MS-Untersuchung notwendige Ionisierung der Peptidproben erfolgte nach der Nanoelektrospray-Methode (nESI). Die Ionisierung durch einen Elektrospray ist eine milde Ionisierungstechnik, die es ermöglicht, große Moleküle aus einer Lösung in die Gasphase zu überführen, zu ionisieren und zu analysieren. Sie ist ideal dazu geeignet, Proteine und Peptide zu untersuchen. Alle Peptidproben wurden im positiven Ionenmodus analysiert. Die Temperatur der Z-Spray-Ionenquelle betrug 80 °C und die Fließgeschwindigkeit des Desolvationsgases (N₂) 75 l/h. Die Kapillarspannung lag bei allen Untersuchungen bei 1,1 kV, die Konusspannung bei 40 V. Um eine erweiterte Auflösung zu erreichen, wurde für alle Spektren Argon als Kollisionsgas bei einem Druck von $1,5 \times 10^{-5}$ mbar in der Kollisionszelle verwendet. Mit Hilfe zunächst durchgeführter Testversuche wurde ausgeschlossen, dass es unter diesen Bedingungen zu unbeabsichtigter Fragmentierung, d.h. zum Verlust möglicher (labiler) Glykosylierungen kommen könnte.

3.4 Phänotypische Charakterisierung von Bakterien

3.4.1 Wachstumskinetik in LB-Medium und Urin

Die Erfassung des Bakterienwachstums bei 37 °C erfolgte sowohl für die Kultivierung in LB-Medium (unter Schütteln) als auch für die statische Anzucht in humanem Sammelurin. Als Wachstumsparameter wurde die optische Dichte bei 600 nm in stündlichen Abständen gegen den entsprechenden Medienblindwert gemessen. Von den Urinkulturen wurden zudem in zweistündigen Abständen geeignete Aliquots ausplattiert, um zusätzlich die Lebendzellzahl („*colony forming units*“ (CFU)) der Bakterien bestimmen zu können.

3.4.2 Untersuchung auf Autoaggregation

Zur Untersuchung von Zell-Zell-Interaktionen wurde mit den zu testenden Bakterienstämmen ein Autoaggregations-Test durchgeführt. Hierzu wurden Kulturen in sowohl LB-Medium als auch Urin über Nacht bei 37 °C in Schüttelkultur angezogen. Am nächsten Morgen wurde die optische Dichte der Kulturen bei 600 nm gemessen und die Kulturen auf $OD_{600} = 3$ eingestellt. Jeweils 5 ml dieser Kulturen wurden bei RT im Reagenzglas stehengelassen. Alle 1,5 h wurde etwa 1 cm unterhalb des Flüssigkeit-Meniskus eine Probe entnommen und ihre OD_{600} bestimmt, um die Aggregation der Zellen zu quantifizieren.

3.4.3 Untersuchung auf Biofilmbildung

Zur Analyse der Biofilmbildung wurden ÜNK der zu testenden Stämme im Verhältnis 1:200 in frischem M63-Medium bzw. Urin verdünnt. Je 180 µl dieser Verdünnungen wurden in eine 96-well PVC-Mikrotiterplatte überführt und für 48 h statisch bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Kavitäten der Mikrotiterplatte dreimal vorsichtig mit 1x PBS gewaschen und für 30 min bei 95 °C getrocknet. Zur Färbung wurde der Biofilm für 20 min in 175 µl einer 1 %igen Kristallviolett-Lösung inkubiert. Um ungebundenes Kristallviolett zu entfernen, wurde die Mikrotiterplatte dreimal mit H_2O_{dest} gewaschen und danach getrocknet. Für die photometrische Auswertung wurden die Wells der Platte für 30 min mit jeweils 200 µl Entfärbelösung behandelt, davon je 100 µl in eine frische 96-Well-Platte überführen und die OD_{570} bestimmt.

PBS (10x):	NaCl	80 g
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	14,4 g
	KCl	2 g
	KH ₂ PO ₄	2 g
	→ mit HCl auf pH 7,4 einstellen	
	ad 1 l H ₂ O _{dest}	
Entfärbelösung:	EtOH	80 %
	Aceton	20 %

3.4.4 Motilitätstest auf Schwärmagar

Um die Motilität verschiedener Bakterienstämme zu testen, kamen Schwärmagarplatten (siehe 2.7) zum Einsatz. Dafür wurde eine sterile Pipettenspitze in eine Flüssigkultur der OD₆₀₀ = 0,1 getaucht und damit kurz und ganz vorsichtig die Oberfläche einer Schwärmagarplatte berührt. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und der Motilitätsfortschritt am nächsten Tag fotografisch festgehalten. Der Motilitätsnachweis war erbracht, wenn sich die Bakterien vom Schwärmagar-Mittelpunkt zum Rand hin ausbreiteten.

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

Zum Nachweis von Curli-Fimbrien und Zellulosesynthese (*rdar*-Morphotyp) wurden die zu testenden Stämme auf Kongorot-Agar (siehe 2.7) überimpft und bei RT, 30 °C und 37 °C für 48 h inkubiert. Als Kontrollen dienten der *rdar*-positive Stamm *E. coli* Nissle 1917 sowie der *rdar*-negative *E. coli* K-12 Stamm DH5α.

3.4.6 Nachweis der Zellulosesynthese

Die Synthese von Zellulose wurde durch Kultur der entsprechenden Stämme auf Calcofluor-Agar (siehe 2.7) und anschließende Betrachtung der Kolonien unter UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) nachgewiesen. Zellulose-positive Stämme konnten durch ihre Fluoreszenz identifiziert werden.

3.4.7 Nachweis der Hämolysinproduktion

Zum Nachweis der Hämolysinproduktion wurden die zu testenden Bakterienstämme auf Blutagarplatten (siehe 2.7) aufgebracht. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37 °C wurde das Ergebnis anhand des Vorhandenseins eines Hämolysehofes ermittelt.

3.4.8 Nachweis der Typ 1-Fimbrien-Expression (Mannose-abhängige Hefeagglutination)

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

3.4.9 Untersuchung auf Colicinproduktion (Colicininhibitions-Test)

Um die zu charakterisierenden Bakterienstämme auf Bildung von Colicinen zu untersuchen, wurden die Bakterien auf Colicinagar (siehe 2.7) ausgebracht und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Wurde auf diesen Agar ein Bakterienstamm aufgeimpft, der Colicin(e) exprimieren konnte, so kam es zu einer lokalen Wachstumshemmung des Indikatorstammes (*E. coli* DH5α) im Agar. Dies zeigte sich durch einen klaren Hof um die Kolonie des Colicin-Produzenten auf dem sonst trüben Agar.

3.4.10 Untersuchung auf Aerobaktinproduktion

Für die Untersuchung der Aerobaktinproduktion wurden die zu testenden Stämme auf Aerobaktinagar (siehe 2.7) überimpft und für 48 h bei 37 °C inkubiert. Waren die aufgeimpften Bakterien zur Aerobaktinproduktion befähigt, so wurde dies durch Wachstumszonen des Indikatorstammes *E. coli* EN99 um die jeweiligen Testkolonien herum angezeigt.

3.4.11 Nachweis der Siderophorenbildung in Kulturüberständen („CAS liquid assay“ nach Schwyn und Neilands (1987))

Die zu testenden Bakterienstämme wurden in zweifachem Ansatz über Nacht in M9-Medium bei 37 °C schüttelnd angezogen. Am nächsten Morgen wurde einem der beiden Ansätze der Eisen-Chelator 2,2'-Dipyridyl (Endkonzentration 0,1 mM) zugesetzt. 2,2'-Dipyridyl führte innerhalb der nächsten 3 h Inkubation bei 37 °C zu Eisenmangel im Medium. Nach 2 bzw. 3 h Inkubationszeit nach Chelatorzugabe wurden aus beiden Ansätzen Proben entnommen und abzentrifugiert (3000 x g, 20 min, 4 °C). Die jeweiligen Überstände wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Vol. CAS-Assay-Lösung gemischt. Bei Anwesenheit von Siderophoren erfolgte ein Farbumschlag dieser Lösung von Blau zu Rot, verursacht durch die Auflösung des Fe³⁺-CAS-Komplexes aufgrund der höheren Fe³⁺-Affinität der Siderophoren. Die Auflösung des Fe³⁺-CAS-Komplexes wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 630 nm dokumentiert.

CAS-Assay-Lösung:

<u>Lösung I:</u>	HDTMA (10 mM)	6 ml
	H ₂ O _{dest}	44 ml
	Fe ³⁺ -Lösung	1,5 ml
	(10 ml Fe ³⁺ -Lösung: 27 mg FeCl ₃ x 6 H ₂ O)	
	CAS-Lösung (2 mM)	7,5 ml
	→ Zugabe der CAS-Lösung langsam unter Rühren	

<u>Lösung II:</u>	Piperazin (H ₂ O-frei)	4,307 g
	H ₂ O _{dest}	40 ml
	HCl (37 %)	6,25 ml

→ nach Zusammenführen der Lösungen I und II wird ein Endvolumen von 100 ml mit H₂O_{dest} eingestellt und die fertige Lösung steril filtriert. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

3.5 Experimentelles Mausmodell der aufsteigenden Harnwegsinfektion

Für das experimentelle Mausmodell der aufsteigenden Harnwegsinfektion wurden ÜNK der zu testenden Bakterienstämme in LB-Medium angesetzt, diese am nächsten Tag abzentrifugiert und die Zellen in steriler Saline resuspendiert. Die Zellzahl der Suspensionen wurde auf 1×10^{10} bis 1×10^{11} Zellen/ml eingestellt. Die weiblichen C57BL/6-Mäuse wurden mittels Inhalationsnarkose mit Isofluran betäubt und die

transurethrale Infektion modifiziert nach Hagberg *et al.* (1983) durchgeführt. Jeder Maus wurden dabei 30 µl der bakteriellen Suspension in die Blase gespritzt. Je nach Versuchsanordnung wurden die Tiere 24, 48 bzw. 72 h nach der Infektion euthanasiert und ihnen die Blase sowie die Nieren entnommen. Nach sorgfältigem Waschen wurden die Organe in jeweils 1 ml Saline mit 0,025 % Triton-X homogenisiert. Geeignete Verdünnungsstufen dieser Homogenisate wurden auf LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Anzahl koloniebildender Einheiten bestimmt und die bakterielle Belastung der Organe pro Gramm (CFU/g) Gewebe für jeden Versuchsansatz berechnet.

Saline:	0,9 % NaCl in H ₂ O _{dest}
Instillagel® (Farco-Pharma):	→ steriles Gel zur Desinfektion und lokalen Betäubung
BD Vasculon™ Plus Venenverweilkatheter:	→ diente nach Entfernen der Injektionsnadel als Kunststoffkatheter zur transurethralen Infektion

3.6 Computergestützte Analysen

Standardmäßige Datenbankrecherche sowie Nukleotid- und Aminosäuresequenzvergleiche wurden in GenBank mit Hilfe von BLAST („*basic local alignment search tool*“; Altschul *et al.*, 1990) unter <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> durchgeführt. Als weitere Datenbanken wurden KEGG (Ogata *et al.*, 1999; <http://www.genome.jp/kegg/>), EcoCyc (Keseler *et al.*, 2005; <http://ecocyc.org/>), CAZy (Coutinho *et al.*, 2003; Cantarel *et al.*, 2009; <http://www.cazy.org>) und STRING (Franceschini *et al.*, 2013; <http://string-db.org/>) genutzt. Für die graphische Darstellung von DNA- und Protein-Sequenzen kam VectorNTI v10 (Invitrogen) zum Einsatz. Zum Primer-Design wurde Primer3 (Koressaar und Remm, 2007; <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) verwendet. Restriktionsschnittstellen für DNA-Sequenzen wurden mit VectorNTI v10 und NEBcutter V2.0 (Vincze *et al.*, 2003; <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) ermittelt. Für die Massenberechnung und Strukturvorhersage von Proteinen wurde mit dem Web-basierten Diensten ExpASY

(Artimo *et al.*, 2012; <http://www.expasy.org/>) und Phyre2 (Kelley und Sternberg, 2009; <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>) gearbeitet. Die digitale Fotoverarbeitung erfolgte mit Adobe Photoshop CS, IrfanView sowie CorelDraw Graphics Suite X5.

3.7 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 5. Zur Bestimmung der Signifikanz von Daten wurden je nach Beschaffenheit/Verteilung des zu testenden Datensatzes der Kruskal-Wallis-Test, der Mann-Whitney-U-Test oder der Student's t-Test verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur natürlichen Glykosylierung von Ag43 in *E. coli* Stamm 536

Bisher veröffentlichte Studien zum Glykosylierungsstatus des Autotransporterproteins Ag43 basieren ausnahmslos auf Untersuchungen mit künstlich modifiziertem Protein. Aus diesem Grund war ein Ziel der vorliegenden Arbeit die Isolierung und Charakterisierung von natürlich glykosyliertem Ag43. Für die experimentellen Untersuchungen wurde dazu der uropathogene *E. coli* Stamm 536 ausgewählt, da es Hinweise darauf gibt, dass Ag43 in diesem Wildtypstamm natürlicherweise glykosyliert vorliegt (Sherlock *et al.*, 2006). Der Stamm exprimiert zwei unterschiedliche Ag43-Varianten, Ag43a-536 und Ag43b-536, die beide hinsichtlich ihres Glykosylierungsstatus analysiert werden sollten. Da in dieser Arbeit ausschließlich mit Ag43 des *E. coli* Stammes 536 gearbeitet wurde, werden die Ag43-Varianten und zugehörigen Gene nachfolgend nur noch mit Ag43a (*agn43a*) bzw. Ag43b (*agn43b*) bezeichnet.

4.1.1 Klonierung, Expression und Isolation von rekombinantem Ag43a und Ag43b

4.1.1.1 Klonierung von rekombinantem Ag43a und Ag43b

Um für die Untersuchung der natürlichen Glykosylierung beider Ag43-Varianten aus *E. coli* Stamm 536 ausreichende Mengen an Protein zur Verfügung zu haben, sollten Ag43a und Ag43b vorab unter Verwendung eines bakteriellen Überexpressionssystems angereichert werden. Hierzu wurden zunächst sowohl *agn43a* als auch *agn43b* jeweils in den Klonierungsvektor pGEM-T (siehe 2.3) eingebracht. Dieser Schritt setzte die Amplifikation der kodierenden Gensequenzen voraus, welche mittels PCR unter Verwendung von chromosomaler DNA aus *E. coli* Stamm 536 Δ *agn43b* bzw. aus *E. coli* Stamm 536 Δ *agn43a* als „*template*“ und dem Primerpaar *agn43*-XbaI-fw/*agn43*-HindIII-rev (siehe Tabelle 18 im Anhang) erfolgte. Die PCR-Produkte wurden so konstruiert, dass sie die Shine-Dalgarno-

Sequenz, nicht aber die natürliche Promotorsequenz des jeweiligen Gens enthielten. Mit Hilfe des verwendeten Primerpaars wurden zudem terminale Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Xba*I bzw. *Hind*III eingefügt, die später die Ligation der PCR-Produkte in den Expressionsvektor pASK75 (Skerra, 1994) ermöglichten. Zur Überprüfung der Klonierung wurden die beiden pGEM-T-Konstrukte jeweils in *E. coli* NovaBlue eingebracht, positive Klone mittels Blau-Weiß-Screening selektiert und die Richtigkeit der Konstrukte via DNA-Sequenzanalyse bestätigt. Zusätzlich wurden die Restriktionsschnittstellen durch Verdau mit den entsprechenden Enzymen auf ihre Integrität hin getestet.

Um die spätere Aufreinigung der rekombinanten Proteine zu vereinfachen, wurde zwischen die DNA-Sequenz von Signalpeptid und „passenger“-Domäne die Sequenz für ein Hexa-Histidin-Peptid (His-Tag) eingebracht. Die Insertionsstelle wurde aufgrund der Überlegung gewählt, dass ein His-Tag an dieser Position vermutlich keinen störenden Einfluss auf den natürlichen Sekretionsmechanismus des Autotransporterproteins nehmen würde. Bei der Insertion war darauf zu achten, eine Leserasterverschiebung im Gen zu vermeiden. Die punktgenaue Einklonierung erfolgte über PCR-Amplifikation mit Hilfe modifizierter Primer, die um die Sequenz des His-Tags erweitert waren. Die so gewonnenen PCR-Produkte mit einer Größe von 6,2 bzw. 5,9 kb wurden nach Phosphorylierung der 5'-Enden mit sich selbst ligiert und die daraus resultierenden Plasmide anschließend zur Transformation von *E. coli* NovaBlue verwendet. Positive Klone wurden mittels PCR auf erfolgreiche Insertion der His-Tag-Sequenz getestet, die entsprechenden Plasmide isoliert und deren Richtigkeit via DNA-Sequenzierung bestätigt. Aus den korrekten Plasmiden wurde das *Xba*I/*Hind*III-Fragment (also das jeweilig klonierte *agn43*-Gen) isoliert und in den ebenfalls *Xba*I/*Hind*III-gespaltene und dephosphorylierten Expressionsvektor pASK75 ligiert. Beide Vektorkonstrukte wurden jeweils in *E. coli* Stamm 536 Δ *agn43a* Δ *agn43b* (536 DM), *E. coli* Stamm 536 Δ *rfaH* Δ *agn43a* Δ *agn43b* (536 rDM) und *E. coli* Stamm MG1655 Δ *fim* Δ *flu* eingebracht. Die Richtigkeit der Konstrukte wurde mittels DNA-Sequenzanalyse bestätigt. Um für die nachfolgenden Untersuchungen über entsprechende Negativkontrollen zu verfügen, wurden die drei Bakterienstämme auch mit dem leeren Vektor pASK75 transformiert. In Tabelle 10 sind die so generierten Bakterienstämme aufgelistet.

Tabelle 10: Generierte Bakterienstämme zur Ag43-Expression.

Stamm	Beschreibung
536 DM (pASK75-His- <i>agn43a</i>)	dient der Expression von His-getaggttem Ag43a
536 DM (pASK75-His- <i>agn43b</i>)	dient der Expression von His-getaggttem Ag43b
536 DM (pASK75)	Expressions-Negativkontrolle
536 rDM (pASK75-His- <i>agn43a</i>)	dient der Expression von His-getaggttem Ag43a
536 rDM (pASK75-His- <i>agn43b</i>)	dient der Expression von His-getaggttem Ag43b
536 rDM (pASK75)	Expressions-Negativkontrolle
MG1655 $\Delta fim \Delta flu$ (pASK75-His- <i>agn43a</i>)	dient der Expression von His-getaggttem Ag43a
MG1655 $\Delta fim \Delta flu$ (pASK75-His- <i>agn43b</i>)	dient der Expression von His-getaggttem Ag43b
MG1655 $\Delta fim \Delta flu$ (pASK75)	Expressions-Negativkontrolle

4.1.1.2 Expression und Aufreinigung von rekombinantem Ag43a und Ag43b

Die Überexpression von Ag43a bzw. Ag43b in den jeweiligen Bakterienstämmen erfolgte modifiziert nach Skerra (1994) (siehe 3.3.1.3). Um die erfolgreiche Überexpression beider Ag43-Varianten zu überprüfen, wurden Western Blot-Analysen mit Antikörpern gegen die α -Domäne von Ag43a bzw. Ag43b getrennt voneinander durchgeführt. Hierbei wurden zunächst die Gesamtzellextrakte von nicht-induzierten und induzierten Bakterienkulturen verglichen. Als Positivkontrolle diente durch Hitzeextraktion isoliertes α -Domänen-Protein der jeweiligen Ag43-Variante, also entweder Ag43a ^{α} oder Ag43b ^{α} . Da sich für die untersuchten Klone je nach exprimierter Ag43-Variante das gleiche Bandenmuster abzeichnete, steht Abbildung 7 exemplarisch für das Ergebnis der Western Blot-Analyse.

Für alle induzierten Proben konnten im Western Blot distinkte Banden nachgewiesen werden, deren Laufhöhe jedoch unerwarteter Weise bei ca. 110-120 kDa lag (siehe Abbildung 6, rote und blaue Umrandung). Das Molekulargewicht der überexprimierten Proteine war damit ungefähr doppelt so groß wie das der Kontrollproteine (58 bzw. 55 kDa). Da das theoretische Molekulargewicht der β -Domänen beider Ag43-Varianten ca. 51 kDa beträgt, ließ sich vermuten, dass es sich bei den detektierten Proteinen der induzierten Proben um unprozessiertes Ag43 handelte. Die Überexpression von Ag43 führte damit zwar zur verstärkten Bildung des Proteins, die Autotransporter-typische Translokation über die Zellmembranen und Prozessierung des Proteins waren jedoch nicht gewährleistet. Möglicherweise ist die durch die Überexpression bedingte, hohe

Proteinkonzentration in den Bakterienzellen ein hinderlicher Faktor. Ebenfalls denkbar ist, dass sich das zwischen Signalpeptid und α -Domäne eingebrachte His-Tag störend auf den SecA-abhängigen Transportmechanismus auswirkt.

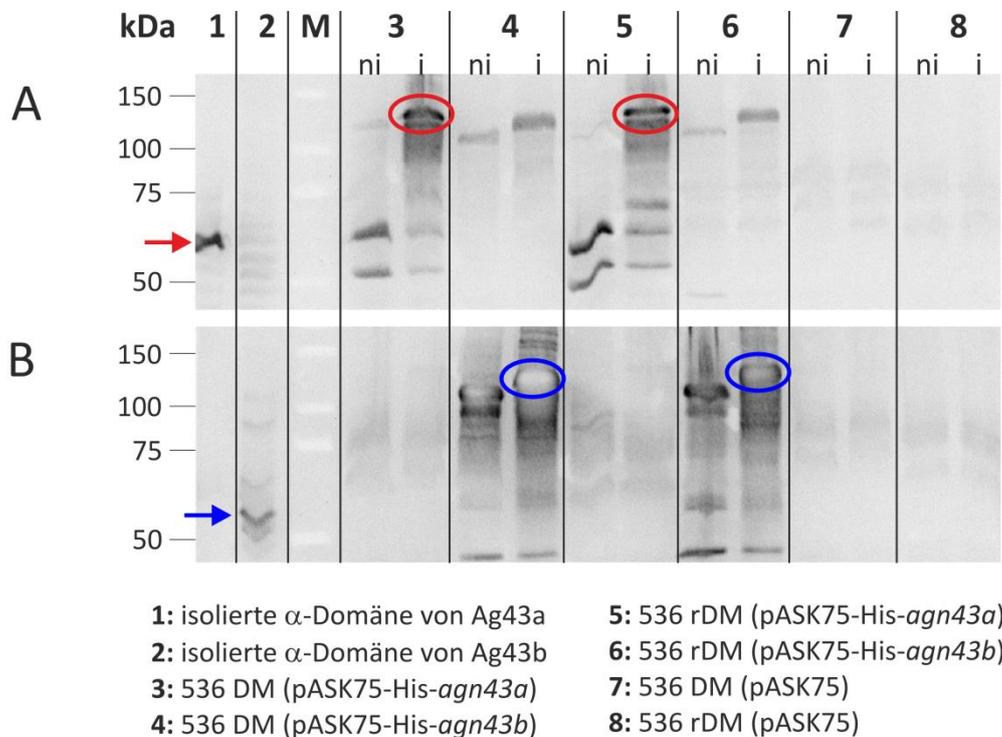


Abbildung 7: Western Blot-Analyse der Gesamtzellextrakte.

(A) Nachweis von rekombinantem Ag43a unter Verwendung von α -Ag43a-536^α IgG; roter Pfeil: Ag43a^α-Kontrollbande, rote Ovale: überexprimiertes Ag43a; (B) Nachweis von rekombinantem Ag43b unter Verwendung von α -Ag43b-536^α IgG; blauer Pfeil: Ag43b^α-Kontrollbande, blaue Ovale: überexprimiertes Ag43b.

M: Marker, ni: Probe aus nicht-induzierter Kultur, i: Probe aus induzierter Kultur.

Um diese Überlegungen zu bestätigen, wurde eine weitere Western Blot-Analyse durchgeführt, diesmal jedoch mit Hitzeextrakten der Bakterienkulturen. Der Hitzeextraktion liegt zu Grunde, dass nach Translokation und Prozessierung von Ag43 normalerweise die periphere α -Domäne nur über nichtkovalente Bindungen mit der integralen β -Domäne verbunden bleibt und sie durch kurzes Erhitzen abgeschert und isoliert werden kann. Bei negativer Auswirkung der Protein-Überexpression auf die Autotransportersekretion sollte sich somit in den Hitzeextrakten der induzierten Proben kein bzw. wenig Ag43a^α oder Ag43b^α nachweisen lassen. Abbildung 8 steht auch hier exemplarisch für das gesamte Ergebnis der Western Blot-Analyse; das nicht gezeigte Bandenmuster der *E. coli* MG1655 $\Delta fim \Delta flu$ -Klone entsprach dem Muster der *E. coli* 536 rDM-Klone.

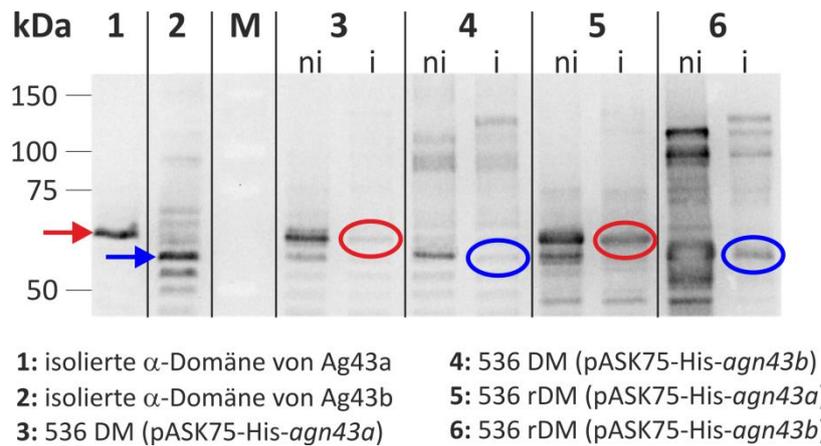


Abbildung 8: Western Blot-Analyse der Hitzeextrakte.

Nachweis von sekretiertem und prozessiertem Ag43a und Ag43b unter Verwendung von α -Ag43a/b-536^α IgG; roter Pfeil: Ag43a^α-Kontrollbande, blauer Pfeil: Ag43b^α-Kontrollbande, rote Ovale: überexprimiertes Ag43a^α, blaue Ovale: überexprimiertes Ag43b^α. M: Marker, ni: Probe aus nicht-induzierter Kultur, i: Probe aus induzierter Kultur.

Bei allen induzierten Proben konnte keine bzw. nur eine geringe Fraktionierung der Ag43- α -Domäne durch Hitzeextraktion festgestellt werden (siehe Abbildung 8, rote und blaue Umrandung). Diese Beobachtung wies somit ebenfalls darauf hin, dass die autokatalytische Spaltung der überexprimierten Autotransporterproteine, wenn überhaupt, nur unvollständig stattfand.

Die Ergebnisse machten deutlich, dass die Aufreinigung der überexprimierten Ag43-Varianten nicht mittels Hitzeextraktion erfolgen konnte. Aus diesem Grund sollten die Proteine via Affinitätschromatographie aus den Gesamtzelllysaten der induzierten Proben isoliert werden. Es stellte sich jedoch heraus, dass die überexprimierten Autotransporter in den Bakterienzellen in Form unlöslicher „inclusion bodies“ akkumulierten. „Inclusion bodies“ bestehen aus dichtgepackten Ansammlungen von zumeist fehlerhaft oder unvollständig gefalteten Proteinen, die nur durch vollständige chemische Denaturierung mit 8 M Harnstoff wieder in lösliche Form gebracht werden können. Erst in Lösung gebrachte Proteine können anschließend mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Da das eigentliche Ziel der Arbeit die Untersuchung der natürlichen Glykosylierung von Ag43 war, stellte sich an dieser Stelle die Frage, ob der natürliche Glykosylierungsprozess im Zytoplasma durch die fehlerhafte bzw. unvollständige Faltung der überexprimierten Proteine beeinträchtigt sein könnte. Selbst wenn der Vorgang der

Glykosylierung an sich nicht gestört sein sollte, war ebenfalls unklar, ob und in welchem Ausmaß die hochdenaturierenden Bedingungen der Solubilisierung eine verändernde Wirkung auf das glykosylierte Protein haben könnten. Aus diesen Gründen musste nach einer anderen Möglichkeit zur Expression und Aufreinigung von rekombinantem Ag43 gesucht werden.

Die Analyse der vorangegangenen Western Blot-Untersuchungen von Gesamtzell- und Hitzeextrakten hatte ergeben, dass in den induzierten Bakterienkulturen die Ag43-Varianten zwar verstärkt synthetisiert, jedoch nicht prozessiert wurden. Interessanterweise konnte für die nicht-induzierten Proben ebenfalls eine Expression der Ag43-Varianten festgestellt werden: die distinkten Banden, die sich in den Blots für die nicht-induzierten Proben detektieren ließen, zeigten dieselbe Laufhöhe wie die Banden der Kontrollproteine Ag43a^α bzw. Ag43b^α (siehe Abbildung 8). Vermutlich beruhte die Expression ohne Induktion auf einer leichten Undichtigkeit („leakiness“) des Promotors des Expressionsvektors pASK75. Aus der Größe der detektierten Proteine sowie ihrer Nachweisbarkeit im Hitzeextrakt-Blot ließ sich zudem ableiten, dass in den uninduzierten Proben nicht nur die Ag43-Expression, sondern auch die Autotransporter-typische Translokation und Prozessierung stattgefunden haben muss.

Aufgrund dieser Feststellung wurde das Verfahren zur Anreicherung von Ag43 dahingehend verändert, dass für die Isolation von rekombinantem Protein nur noch nicht-induzierte Bakterienkulturen verwendet wurden. Da die Menge an exprimiertem Protein in nicht-induzierten Proben natürlich geringer ist als in induzierten, wurde das Volumen der Ausgangskulturen entsprechend erhöht und variierte je nach Expressionsstärke der Ag43-Variante zwischen ein und drei Litern. Nach ihrer Hitzeextraktion aus nicht-induzierten Bakterienkulturen erfolgte die affinitätschromatographische Aufreinigung der His-getaggen Ag43- α -Domänen über Nickel-Säulchen. Die so isolierten Proteinproben wurden anschließend mit Hilfe von Konzentratoren eingeeengt und ihr Proteingehalt per Roti-Nanoquant bestimmt. Da in den nachfolgenden Untersuchungen ausschließlich die isolierten α -Domänen der Ag43-Varianten Verwendung fanden, wird der Übersichtlichkeit wegen von hier an in den Namen der Ag43-Proteinproben auf die Extranennung der α -Domäne verzichtet.

Zur weiteren Überprüfung der isolierten Proteine wurden sowohl SDS-PAGE als auch Western Blot-Untersuchungen wie unter 3.3.4 - 3.3.6 beschrieben durchgeführt. Um die Proben miteinander vergleichen zu können, wurde bei allen Untersuchungen eine einheitliche Menge von je 1 µg Protein eingesetzt. Abbildung 9A zeigt die durch Coomassie-Färbung des SDS-Gels visualisierten Proteinbanden der sechs aufgereinigten Ag43-Proben.

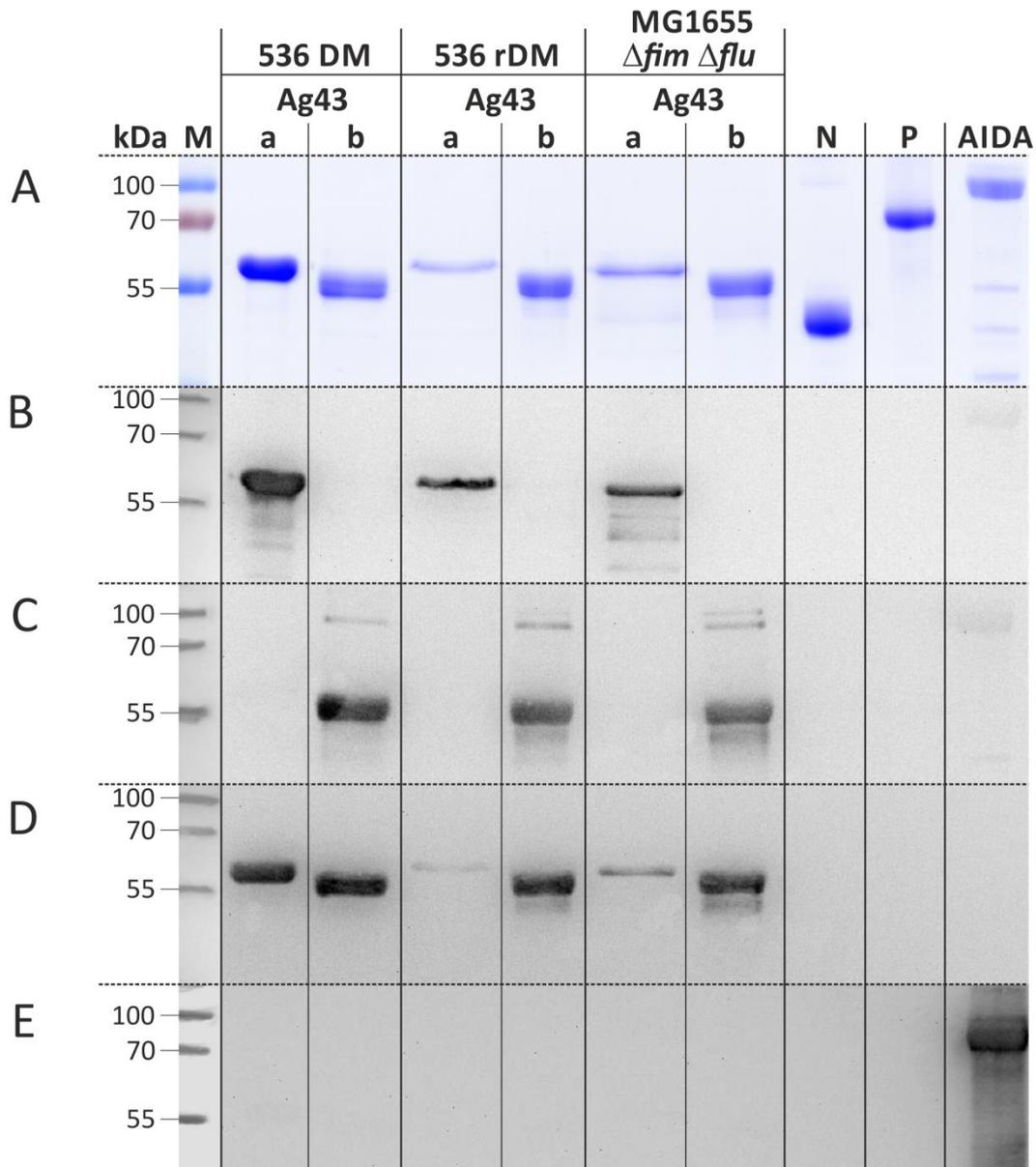


Abbildung 9: Nachweis der erfolgreichen Expression und Isolation der rekombinanten Ag43-Varianten. Überprüfung der aus den drei Stammhintergründen *E. coli* 536 DM, 536 rDM und MG1655 $\Delta fim \Delta flu$ isolierten Ag43-Varianten a und b durch (A) SDS-PAGE und Coomassie-Färbung sowie Western Blot-Analysen unter Verwendung von (B) α -Ag43a-536^a IgG, (C) α -Ag43b-536^a IgG, (D) α -Penta-His IgG und (E) α -AIDA-I IgG. M: Marker, N: Kreatinase, P: Transferrin, AIDA: glykosyliertes AIDA-I^a.

Die Laufhöhe der Banden von Ag43a bzw. Ag43b entsprach mit 58 kDa bzw. 55 kDa der jeweilig erwarteten Proteingröße. Dies deutete darauf hin, dass die Expression beider Ag43-Varianten in allen drei *E. coli* Stammhintergründen erfolgreich verlaufen war. Trotz der Verwendung gleicher Proteinmengen von jedem Ansatz wiesen die Proteinbanden der Ag43a-Proben isoliert aus *E. coli* 536 rDM bzw. MG1655 $\Delta fim \Delta flu$ eine abweichende Form auf (dünn und breit). Ursache für die Bandenverzerrung war vermutlich eine zu hohe Ionenkonzentration im Puffer der Proben, die jedoch, wie sich im weiteren Versuchsverlauf zeigte, keine Auswirkung auf die nachfolgenden Untersuchungen hatte.

Für die zusätzlich aufs Gel aufgetragenen Proteine Kreatinase, Transferrin und AIDA-I (glykosylierte α -Domäne) ließen sich ebenfalls Banden nachweisen, deren zugehöriges Molekulargewicht jeweils mit dem in der Literatur angegebenen Wert übereinstimmte (Kreatinase: 47 kDa, Transferrin: 75 kDa (Handbuch DIG Glycan Detection Kit, Roche), glykosyliertes AIDA-I $^{\alpha}$: 100 kDa (Charbonneau und Mourez, 2007)). Diese drei Proteine dienten in der sich anschließenden Untersuchung des Glykosylierungsstatus von Ag43 als Negativ- bzw. Positivkontrollen (siehe 4.1.2).

Durch die Western Blot-Analysen mit Antikörpern gegen Ag43a bzw. Ag43b konnte bestätigt werden, dass es sich bei den im SDS-Gel detektierten Proteinen um Ag43a bzw. Ag43b handelte (siehe Abbildung 9B und C). Zudem verifizierten die Blots, dass in allen generierten Klonen wirklich nur die gentechnisch eingebrachte *agn43*-Variante exprimiert wurde. Die Proteine Kreatinase und Transferrin führten wie erwartet zu keiner Antikörperreaktion. Für AIDA-I konnte hingegen auf der entsprechenden Laufhöhe von 100 kDa ein, wenn auch nur schwaches, Signal detektiert werden. Diese Beobachtung ist insofern nicht verwunderlich, da die primäre Aminosäuresequenz von Ag43 $^{\alpha}$ mit der α -Domäne von AIDA-I zu 31 % identisch und zu 62 % ähnlich ist (Henderson und Owen, 1999).

Da alle isolierten Ag43-Varianten aufgrund der angewandten Klonierungsstrategie ein C-terminales His-Tag aufweisen sollten, diente die Western Blot-Untersuchung mit anti-His-Tag-Antikörpern als weitere Kontrolle für einen erfolgreichen Versuchsverlauf (siehe Abbildung 9D).

Im letzten Western Blot-Versuch wurden Antikörper eingesetzt, die sich gegen glykosyliertes AIDA-I $^{\alpha}$ richten. Wie erwartet führte die aufgetragene AIDA-I-Probe zu einer starken Antikörperreaktion. Zudem konnte für Ag43a isoliert aus *E. coli* 536 DM ein sehr

schwaches Signal festgestellt werden, was in Abbildung 9E leider kaum zu erkennen ist, da das intensive Signal von AIDA-I bei der Aufnahme das Bild komplett überstrahlte. Für die restlichen Ag43-Proben sowie die Proteine Kreatinase und Transferrin wurden keine Signale detektiert. Da der verwendete Antikörper unter anderem gegen die Zuckerreste des glykosylierten AIDA-I^α gerichtet ist, kann das für Ag43a zu verzeichnende Signal als ein möglicher Hinweis darauf gewertet werden, dass das Protein ebenfalls glykosyliert vorliegt und eine ähnliche Zuckerzusammensetzung aufweist wie AIDA-I.

4.1.2 Untersuchungen zum Glykosylierungsstatus von isoliertem Ag43a und Ag43b

Die vorangegangenen Analysen hatten bestätigt, dass es sich bei den isolierten Proteinen um die gewünschten zwei Ag43-Varianten handelte und sich diese erfolgreich in den drei verschiedenen Stammhintergründen exprimieren ließen. Somit konnte mit der Untersuchung des Glykosylierungsstatus der sechs isolierten Ag43^α-Proteinproben begonnen werden. Die genauere Analyse der Glykosylierung sollte zum einen mit Hilfe kommerzielle Glykoprotein-Detektionskits, zum anderen mittels massenspektrometrischer Methoden erfolgen. Die Kits dienten allein dem Nachweis glykosylierter Proteine, die Ergebnisse der Massenspektrometrie sollten zudem Hinweise auf mögliche Glykosylierungsstellen in den Proteinen liefern.

4.1.2.1 Analyse mit Hilfe kommerzieller Glykoprotein-Detektionskits

Um in den isolierten Proteinproben mögliche Glykokonjugate nachweisen zu können, wurden verschiedene Kits verwendet, die Glykoproteine entweder direkt im SDS-Gel oder nach Blotten auf Nitrozellulose-Membran anfärben. Die Proteine wurden hierfür zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt (3.3.4) und, wenn nötig, auf eine Membran geblottet (3.3.6.1). Im Anschluss daran wurden die Proteine mit Hilfe drei verschiedener Kits (3.3.7.1) auf Glykosylierung hin untersucht.

Abbildung 10 zeigt den entwickelten Glykoblott, der mit Hilfe des DIG Glycan Detection Kits generiert wurde. Für die als Positivkontrollen verwendeten glykosylierten Proteine Transferrin und AIDA-I^α wurden auf der Membran starke Signale sichtbar. Für Ag43a isoliert aus *E. coli* 536 DM konnte ebenfalls ein Signal detektiert werden, es fiel jedoch weniger stark aus als das der Positivkontrollen. Für die Ag43b-Proben isoliert aus *E. coli* 536 rDM bzw. MG1655 $\Delta fim \Delta flu$ ließen sich nur schwach gefärbte Banden feststellen. Die

Signale, die von den Ag43a-Proben isoliert aus *E. coli* 536 rDM bzw. MG1655 $\Delta fim \Delta flu$ erzeugt wurden, waren kaum nachweisbar. Für die unglykosylierte Negativkontrolle Kreatinase sowie Ag43b isoliert aus *E. coli* 536 DM konnten keine Signale detektiert werden.

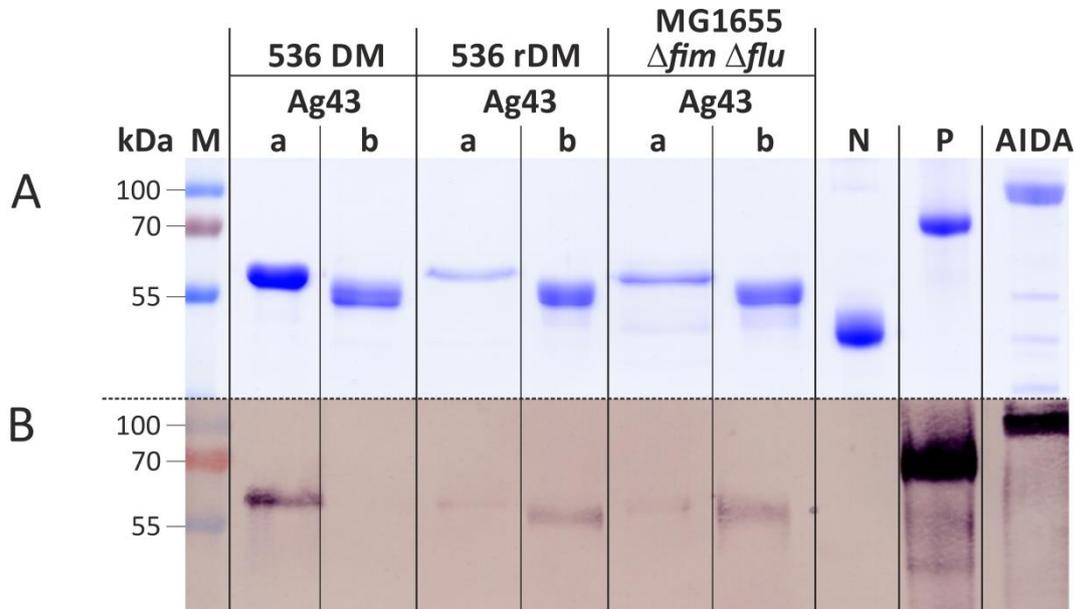


Abbildung 10: Glykoblott-Analyse der isolierten Ag43-Varianten mit Hilfe des DIG Glycan Detection Kits.

Untersuchung des Glykosylierungsstatus der aus den drei Stammhintergründen *E. coli* 536 DM, 536 rDM und MG1655 $\Delta fim \Delta flu$ isolierten Ag43-Varianten a und b mittels (A) SDS-PAGE und Coomassie-Färbung sowie (B) Glykoblott.

M: Marker, N: Kreatinase (unglykosylierte Negativkontrolle), P: Transferrin (glykosylierte Positivkontrolle), AIDA: glykosyliertes AIDA-I^α.

Da für den Glykoblott von allen Proben gleiche Proteinmengen eingesetzt wurden, lassen sich die verschiedenen Signalstärken nur mit Unterschieden in der Anzahl kovalent gebundener Zuckergruppen erklären. Demzufolge scheint keine der isolierten Ag43-Proben so stark glykosyliert vorzuliegen wie AIDA-I. Für Ag43a isoliert aus *E. coli* 536 DM lässt sich aufgrund des Ergebnisses vermuten, dass es sich hierbei um ein eindeutig glykosyliertes Protein handelt. Offenbar ist in *E. coli* 536 DM die natürliche Glykosylierung von Ag43a möglich. Da für die übrigen Ag43-Proben nur sehr schwache Signale detektiert wurden, kann bezüglich ihres Glykosylierungsstatus keine definitive Aussage getroffen werden, zumal schwache Signale laut Herstellerangaben auch das Ergebnis unspezifischer Artefaktfärbung sein können. Aufgrund der Artefaktfärbung sind die Ergebnisse, die mit dem DIG Glycan Detection Kit generiert wurden, leider generell unter Vorbehalt zu betrachten, da teilweise auch detektierbare Signale für die unglykosylierte Negativ-

kontrolle festgestellt werden konnten. Letztlich wurde das Kit von Roche infolge der unspezifischen Färbungen vom Markt genommen.

Als Alternative wurde zunächst das Glycopro Kit verwendet, dessen Prinzip auf rot-violetter Anfärbung der Glykoproteine im SDS-Gel beruht. Es zeigte sich aber, dass dieses Kit für die Untersuchung des Glykosylierungsstatus der Ag43-Varianten nicht sensitiv genug war: Im SDS-Gel konnten nur für die beiden Positivkontrollen Transferrin und AIDA-I violett gefärbte Banden nachgewiesen werden, nicht aber für die isolierten Ag43-Proben (ohne Abbildung). Die Nachweisgrenze des Glycopro Kits liegt bei 25-100 ng Kohlenhydrat. Somit muss der Zuckergehalt in den eingesetzten Ag43-Proben (jeweils 1 µg Protein) unter 25 ng liegen.

Aus diesem Grund wurde die Untersuchung mit dem sensitiveren GlycoProfile III Kit wiederholt. Bei dem Kit liegt der Nachweisbereich zwischen 5 und 25 ng Kohlenhydrat und die Glykoproteine werden spezifisch mit Hilfe eines fluoreszierenden Farbstoffes im SDS-Gel dargestellt. Der Kit-eigene Marker enthält sowohl glykosylierte (Ovalbumin, 45 kDa) als auch nicht-glykosylierte (Albumin, 66 kDa) Proteine und kann somit gleichzeitig als Positiv- und Negativkontrolle verwendet werden. Zusätzlich ist mit Hilfe des Markers eine ungefähre Quantifizierung der Glykosylierungsstärke eingesetzter Proben möglich, da - bei Verwendung des Markers nach Herstellerangaben - die Signalstärke der Ovalbuminbande ca. 25 ng Karbohydrat entspricht. Abbildung 11 zeigt das entsprechende Gelfoto, das unter UV-Anregung aufgenommen wurde. In der Gelspur des Kit-eigenen Markers konnten zwei unterschiedliche Banden detektiert werden: eine Bande mit sehr schwachem Signal, deren Laufhöhe mit dem Molekulargewicht von Albumin übereinstimmte und somit die Signalstärke von unglykosyliertem Protein repräsentierte, und ein Bande mit starkem Signal, die dem Molekulargewicht von Ovalbumin entsprach und damit exemplarisch die Signalstärke glykosylierter Proteine zeigte. Für AIDA-I wurde ein sehr starkes Signal sichtbar, das sich aufgrund seiner Intensität nicht als distinkte Bande, sondern eher als kontinuierliche Bande über einen Teil des Größenbereichs darstellte. Diese ausgeprägte Reaktion ist damit zu erklären, dass es sich bei AIDA-I um ein stark glykosyliertes Protein handelt und der Zuckergehalt der eingesetzten Probe wahrscheinlich außerhalb des optimalen Nachweisbereiches des verwendeten Kits lag.

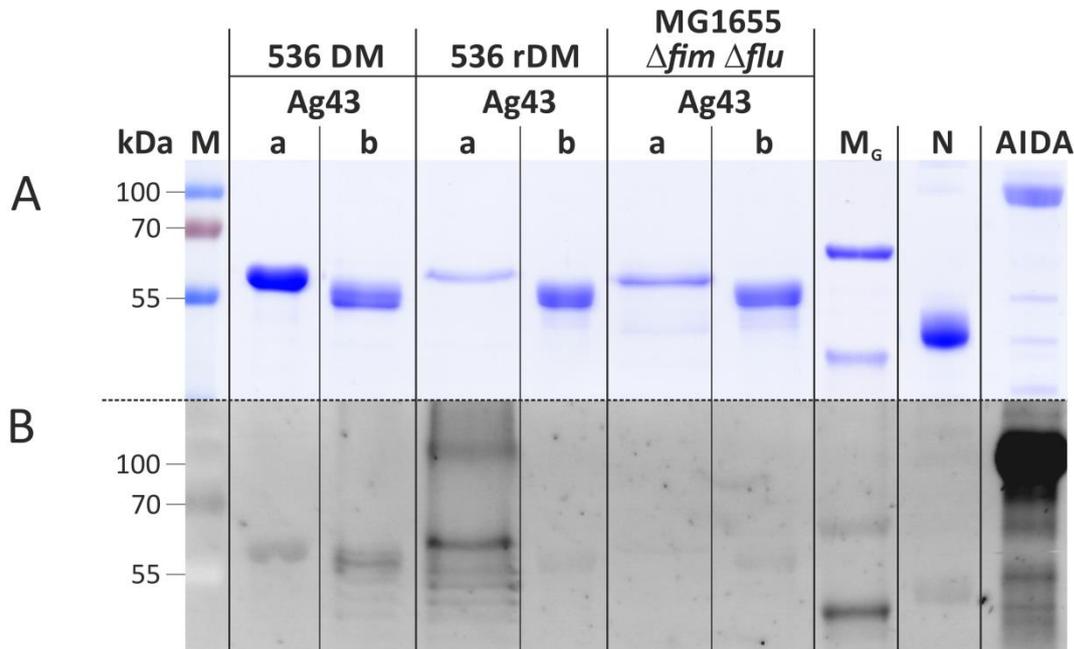


Abbildung 11: Glykostain-Analyse der isolierten Ag43-Varianten mit Hilfe des GlycoProfile III Kits.

Untersuchung des Glykosylierungsstatus der aus den drei Stammhintergründen *E. coli* 536 DM, 536 rDM und MG1655 $\Delta fim \Delta flu$ isolierten Ag43-Varianten a und b mittels (A) SDS-PAGE und Coomassie-Färbung sowie (B) Glykofärbung.

M: Marker, M_G: Glykomarker des GlycoProfile III Kits, N: Kreatinase (unglykosylierte Negativkontrolle), AIDA: glykosyliertes AIDA-I^α.

Für Ag43a isoliert aus *E. coli* 536 rDM konnte eine Bande detektiert werden, die in ihrer Signalstärke der Bande von Ovalbumin entsprach. Es ist daher anzunehmen, dass Ag43a isoliert aus *E. coli* 536 rDM in glykosylierter Form vorlag. Die Signale, die von den Ag43- Proben isoliert aus *E. coli* 536 DM erzeugt wurden, waren in ihrer Intensität schwächer als die Ovalbumin-Bande, jedoch stärker als das Signal der Negativkontrolle Albumin. Diese Beobachtung deutete darauf hin, dass sowohl Ag43a als auch Ag43b im Stammhintergrund *E. coli* 536 DM posttranslational glykosyliert wurden, die Anzahl der gebundenen Zuckergruppen aufgrund der schwächeren Bandensignale jedoch geringer als bei Ovalbumin sein musste. Für die restlichen Ag43-Proben sowie die Kreatinase konnten nur schwach gefärbte Banden nachgewiesen werden. Die Signalstärke dieser Banden war sogar niedriger als die der Albumin-Bande, was vermuten ließ, dass in den zugehörigen Proben keine Glykokonjugate vorhanden waren.

Auf Basis der Ergebnisse beider Untersuchungen konnten leider keine eindeutigen Rückschlüsse auf den Glykosylierungsstatus der isolierten Ag43-Proben gezogen werden. Die unspezifische Artefaktfärbung sowie die Marktrücknahme des DIG Glycan Detection

Kits ließen jedoch die Ergebnisse, die mit dem GlycoProfile III Kit generiert wurden, zuverlässiger erscheinen.

4.1.2.2 Massenspektrometrische Untersuchung des Glykosylierungsstatus der isolierten Ag43-Varianten (Nanoelektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (nESI-MS))

Um präzisere Informationen über das Ausmaß der Glykosylierung aller Ag43-Varianten zu erhalten, wurden die Proben nachfolgend massenspektrometrisch untersucht. Intakte glykosylierte Proteine resultieren bei der nESI-MS-Analyse in Massenspektren mit zusätzlichen Serien mehrfach geladener Ionen, d.h. sie zeigen eine signifikante Heterogenität. Aus diesem Grund sollten zunächst die nESI-MS-Spektren der intakten Ag43-Proteine ermittelt werden, was für fünf der isolierten Proben erfolgreich verlief. Für Ag43a isoliert aus MG1655 $\Delta fim \Delta flu$ war die nESI-MS-Analyse nicht möglich, da das Protein nicht in ausreichender Menge vorlag.

In Abbildung 12 ist exemplarisch das durch nESI-MS ermittelte Massenspektrum von intaktem Ag43a isoliert aus *E. coli* 536 DM dargestellt.

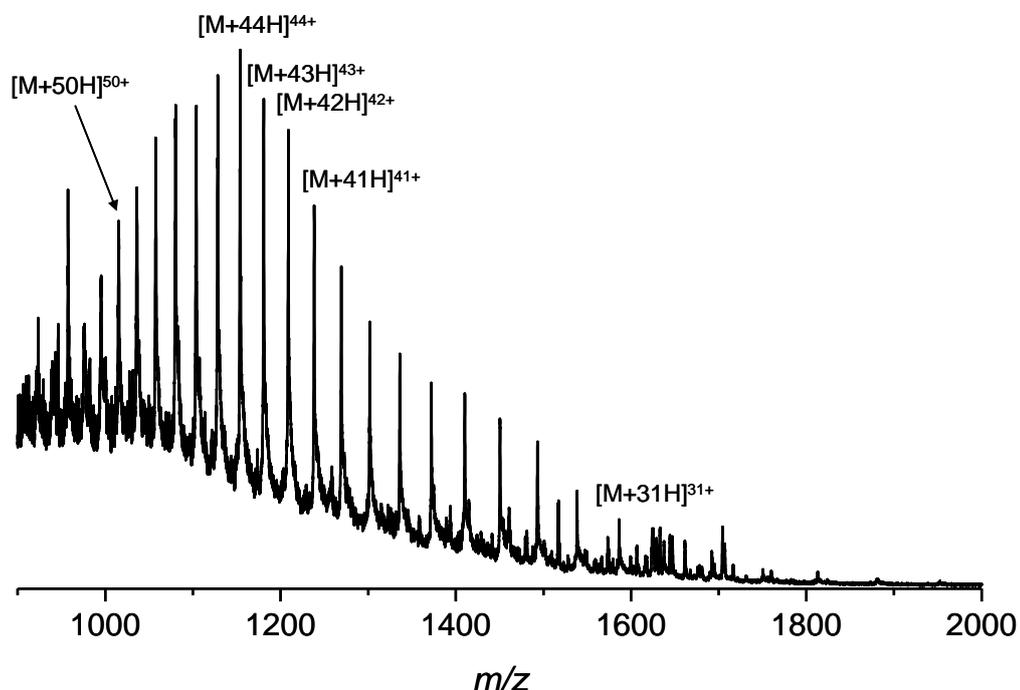


Abbildung 12: nESI-Massenspektrum von intaktem Ag43a isoliert aus *E. coli* 536 DM.

Auf der x-Achse ist das Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) angegeben, die Amplitude der Peaks entspricht der relativen Intensität. Das durchschnittliche Molekulargewicht von Ag43 aus *E. coli* 536 DM lag nach Daten-Entfaltung bei $M = 50732,3 \pm 1,5$ Da. Das Profil des Massenspektrums deutete aufgrund fehlender Heterogenität auf eine unglykosylierte Proteinprobe hin.

Das Spektrum wies eine Serie mehrfach geladener Ionen auf. Bei der Serie handelte es sich um die unterschiedlichen Ladungszustände der untersuchten Ag43-Variante, die sich nur in der Zahl der angelagerten H⁺-Ionen unterschieden. Nach der Daten-Entfaltung („*deconvolution*“) ergab sich für Ag43a isoliert aus *E. coli* 536 DM ein durchschnittliches Molekulargewicht von $M = 50732,3 \pm 1,5$ Da. Diese experimentell bestimmte Masse bestätigte das zuvor mit ExPASy berechnete theoretische Molekulargewicht von $M = 50729,07$ Da (siehe Tabelle 11). Das Profil des Massenspektrums deutete auf eine sehr homogen zusammengesetzte Proteinprobe hin. Somit konnte für diese Probe kein glykosyliertes Ag43 nachgewiesen werden.

Die Massenspektren der weiteren vier Ag43-Proben zeigten ein vergleichbares Profil: Es konnte jeweils nur eine Serie mehrfach geladener Ionen festgestellt werden (ohne Abbildung), was auch hier den Rückschluss auf sehr homogene Proteinproben zuließt und damit ebenfalls gegen das Vorhandensein von glykosyliertem Protein in den untersuchten Proben sprach. Die experimentell bestimmte Masse von Ag43a isoliert aus *E. coli* 536 rDM entsprach dem berechneten theoretischen Molekulargewicht (siehe Tabelle 11). Für alle Ag43b-Proben waren dagegen zwischen theoretischem und experimentellem Gewicht größere Abweichungen zu verzeichnen: Das experimentell bestimmte Molekulargewicht von Ag43b war in allen drei Stammhintergründen um ca. 1500 Da höher als die berechnete Masse. Diese einheitliche Massendifferenz lässt vermuten, dass die Trennung zwischen α - und β -Domäne bei Ag43b an anderer Stelle im Protein erfolgt als bisher gedacht.

Tabelle 11: Berechnetes und experimentell bestimmtes Molekulargewicht der isolierten Ag43-Varianten.

Protein	M _{theoretisch} in Da	M _{experimentell} in Da
Ag43a aus <i>E. coli</i> 536 DM	50729,07	50732,3 ± 1,5
Ag43b aus <i>E. coli</i> 536 DM	43236,83	44659 ± 2
Ag43a aus <i>E. coli</i> 536 rDM	50729,07	50737,1 ± 1,8
Ag43b aus <i>E. coli</i> 536 rDM	43236,83	44661,4 ± 1,2
Ag43a aus <i>E. coli</i> MG1655 $\Delta fim \Delta flu$	50729,07	-
Ag43b aus <i>E. coli</i> MG1655 $\Delta fim \Delta flu$	43236,83	44661,3 ± 0,8

Im Anschluss an die Untersuchung der intakten Proteine sollte mittels massenspektrometrischen Peptidmappings die Identität der Proteine bestätigt werden und ihre detaillierte Charakterisierung erfolgen. Beim Peptidmapping wird das zu untersuchende Protein zunächst unter Verwendung einer spezifischen Protease in kleinere Peptide gespalten und die Massen der erhaltenen Peptide mittels nESI-MS bestimmt. Gleichzeitig wird die angenommene Aminosäuresequenz des Proteins am Computer „theoretisch verdaut“, die Massen der resultierenden Peptide berechnet und daraus ein theoretisches Massenspektrum konstruiert. Es folgt der Vergleich des gemessenen Massenspektrums mit dem theoretischen, insbesondere die Analyse der Übereinstimmungen bzw. Abweichungen. Mit Hilfe dieses Verfahrens können posttranslationale Modifikationen wie z.B. Glykosylierungen spezifisch identifiziert werden. Aufgrund der nicht ausreichenden Menge an Probenmaterial konnte das Peptidmapping nur mit Ag43a isoliert aus *E. coli* 536 DM sowie beider Ag43-Varianten isoliert aus *E. coli* 536 rDM durchgeführt werden. Für den Verdau wurde jeweils Trypsin verwendet. In Abbildung 13 ist exemplarisch das durch nESI-MS ermittelte Massenspektrum der tryptisch verdauten Peptide von Ag43a isoliert aus *E. coli* 536 DM dargestellt.

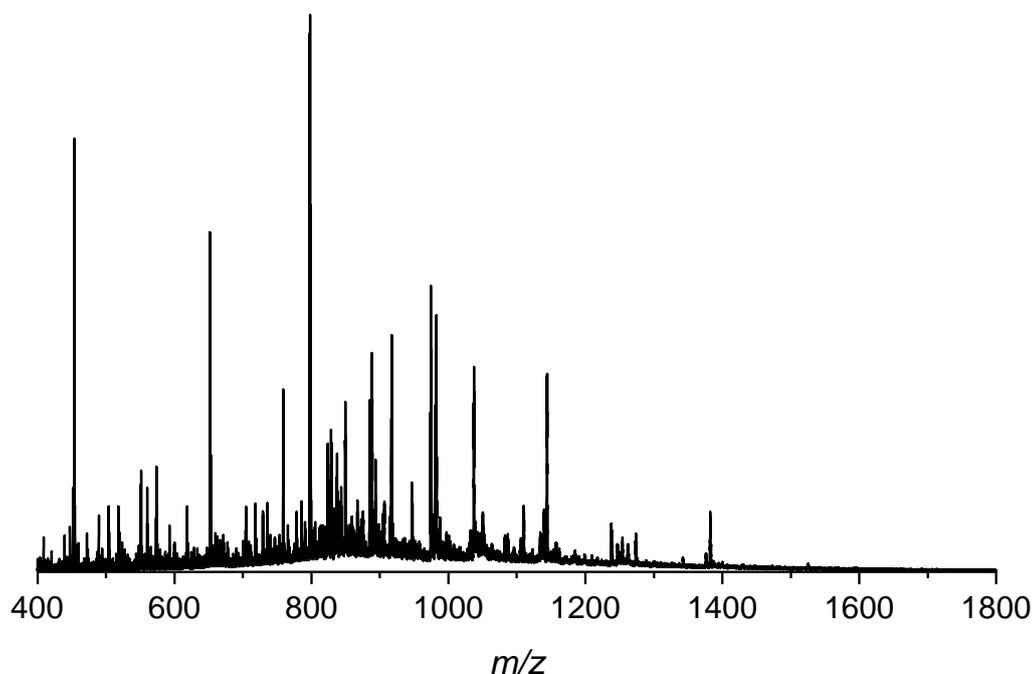


Abbildung 13: nESI-Massenspektrum der tryptisch verdauten Peptide von Ag43a isoliert aus *E. coli* 536 DM.

Auf der x-Achse ist das Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) angegeben, die Amplitude der Peaks entspricht der relativen Intensität.

Die Auswertung des Spektrums ergab, dass für die Ag43a-Proteinsequenz von Aminosäure (AS) 1 bis AS 494 ein lückenloser Peptidsatz vorhanden war (siehe Abbildung 14 und Tabelle 19 im Anhang).

ADHHHHHIV VHPGETVNGG TLVNHNDQFV SGTADGVTVS TGLELGPDS 50
ENTGGQWIK GGTGRNTT VT ANGRQIVQAG GTASDTVIRD GGGQSLNGLA 100
VNTTLDNRGE QVHGGGKAA GTIINQDGYQ TIKHGGLATG TIVNTGAEGG 150
PESENVSTGQ MVGGTAE STT INNNGRQVIW SSGVS RDTLI YTG GDQTVHG 200
EAHNTRLEGG NOYVHKYGLA LNTVINEGGW QVVKAGGTAG NTTINQNGEL 250
KVHAGGEASD VTQNTGGALV TSTAATVTGT NRLGAFSVVE GKADNVVLEN 300
GGRLDVL SGH TATNTR VDDG GTLDVRNGGT ATTVSMGNGG VLLADSGAAV 350
SGTRSDGTAF RIGGGQADAL MLEKGS SFTL NAGDTATDTT VNGGLFTARG 400
GSLAGTTTLN NGAILT LSGK TVNNDTLTIR EGDALLQGG LTGNGSVEKS 450
GSGLTIVSNT TLTQKAVNLN EGTTLTNDST VTTDVIAQRG TALK LTGSTV 500
LNGAID PTNV TLASGATWNI PDNATVQSVV DDL SHAGQIH FTSTR TGKFV 550
PATLKVKNLN GQNGTISLRV RPDMAQNNAD RLVIDGGRAT GKTILNLVNA 600
GNSASGLATS GKGIQVVEAI NGATTEEGAF VQGNRLQAGA FNYS LNDRSD 650
ESWYLRSENA YRAEVPLYAS MLTQAMDYDR ILAGS 685

Abbildung 14: Aminosäuresequenz der His-getaggten α -Domäne von Ag43a aus *E. coli* 536 DM.

Die unterstrichenen AS-Reste konnten mittels Peptidmapping detektiert werden, die rote Markierung entspricht hypothetisch fehlenden AS-Resten. Das in geringem Umfang glykosyliert nachgewiesene Peptid ist blau umrandet.

Für das C-terminale Peptid LTGSTVLNGAID (Abbildung 14, rote AS-Reste) konnte dagegen keine ionische Spezies nachgewiesen werden. Da dieses Peptid aus AS besteht, die eine sehr geringe Gasphasen-Basizität aufweisen, war es wahrscheinlich als Folge seiner niedrigen Ionisationseffizienz nicht detektierbar. Der Vergleich von gemessenem und theoretischem Massenspektrum lieferte so gut wie keine Hinweise auf glykosylierte Peptide, die sich - wenn man davon ausgeht, dass die Glykosylierung durch eine Heptose erfolgt - als Massenverschiebungen der jeweiligen Peptide um 192 Da dargestellt hätten. Für die untersuchte Probe ließ sich in geringem Umfang ein Peptid nachweisen, das doppelt geladen das m/z-Verhältnis 788,98 aufwies. Aus dem m/z-Verhältnis ergab sich ein durchschnittliches Molekulargewicht von ca. 1576 Da, welches dem Peptid von

AS-Abschnitt 304-316 (1384 Da) mit einer gebundenen Heptose (192 Da) entsprach. Da dieser AS-Abschnitt (LDVLSGHTATNTR, Abbildung 14, blaue Umrandung) vier potentielle O-Glykosylierungsstellen aufweist, konnte die Bindestelle der Heptose nicht eindeutig bestimmt werden. Insgesamt deutete das Ergebnis darauf hin, dass in der untersuchten Ag43-Probe fast keine Glykoproteine enthalten waren. Offenbar war es nur sehr selten zu Glykosylierungsereignissen gekommen, die sich aufgrund der geringen Häufigkeit der resultierenden Peptide kaum detektieren ließen.

Die beiden Ag43-Varianten isoliert aus *E. coli* 536 rDM wurden auf gleiche Weise untersucht. Das Ergebnis der Untersuchung von Ag43a aus *E. coli* 536 rDM entsprach den Erkenntnissen für Ag43a isoliert aus *E. coli* 536 DM: Für die Ag43a-Proteinsequenz von AS 1 bis AS 494 war ebenfalls ein vollständiger Peptidsatz vorhanden, eine ionische Spezies für das C-terminale Peptid fehlte (siehe Abbildung 14 und Tabelle 20 im Anhang). Ebenso ließ sich in geringem Umfang ein Peptid nachweisen, das doppelt geladen das m/z-Verhältnis 789.01 und damit ein durchschnittliche Masse von ca. 1576 Da aufwies, was auch hier dem Peptid von AS-Abschnitt 304-316 (1384 Da) mit einer gebundenen Heptose (192 Da) entsprach. Die vier potentiellen O-Glykosylierungsstellen verhinderten erneut die genaue Bestimmung der Bindestelle der Heptose. Auch für Ag43a aus *E. coli* 536 rDM konnte somit nur auf sehr geringe Glykosylierung geschlossen werden.

Für Ag43b isoliert aus *E. coli* 536 rDM ließ sich ein vollständiger Peptidsatz für die Ag43b-Proteinsequenz von AS 1 bis AS 449 detektieren (siehe Abbildung 15 und Tabelle 21 im Anhang). Damit wurde durch das Peptidmapping ein um 13 AS längerer Proteinsequenzbereich abgedeckt als ursprünglich vermutet. Somit deutete auch dies Ergebnis darauf hin, dass es bei Ag43b an einer weiter C-terminal liegenden Stelle des Proteins zur Trennung zwischen α - und β -Domäne kommt, was eine größere α -Domäne zur Folge hätte. Diese Vermutung wurde durch die theoretisch berechnete Gesamtmasse des detektierten Sequenzbereichs unterstützt: Der Wert lag bei 44654,3 Da, was gut mit der experimentell ermittelten Masse für das intakte Protein ($44661,4 \pm 1,2$ Da) übereinstimmte. Der Vergleich von gemessenem und theoretischem Massenspektrum lieferte dagegen keinen Hinweis auf glykosylierte Peptide. Somit konnte in der untersuchten Probe kein glykosyliertes Ag43 nachgewiesen werden.

<u>ADHHHHHTV VQAGETVNDG</u> <u>TLTNHDNQIV</u> <u>LGTANGMTIS</u> <u>TGLEYPDNE</u>	50
<u>ANTGGQWIQN</u> <u>GGIANNTTVT</u> <u>GGGLQRVNAG</u> <u>GSVSDTVISA</u> <u>GGGQSLQGOA</u>	100
<u>VNTTLNGGEQ</u> <u>WVHEGGIATG</u> <u>TVINEKGWQA</u> <u>VKSGAMATDT</u> <u>VVNTGAEGGP</u>	150
<u>DAENGD TGQF</u> <u>VRGNAVRTTI</u> <u>NENGRQIVAA</u> <u>EGTANTTVVY</u> <u>AGGDQTVHGY</u>	200
<u>ALDTTLNGGN</u> <u>QYVHNGGTAS</u> <u>GTVVNSDGWQ</u> <u>IVKEGGLADF</u> <u>TIVNQKGLQ</u>	250
<u>VNAGGTATNV</u> <u>TLKQGGALVT</u> <u>STAATVTGSN</u> <u>RLGNFTVENG</u> <u>NADGVVLESG</u>	300
<u>GRLDVLEGHS</u> <u>AWKTLVDDGG</u> <u>TLAVSAGGKA</u> <u>TDVTMTSGGA</u> <u>LIADSGATVE</u>	350
<u>GTNASGKFSI</u> <u>DGISGQASGL</u> <u>LLENGGSFTV</u> <u>NAGGQAGNTT</u> <u>VGHRGTLTLA</u>	400
<u>AGGSLSGRTQ</u> <u>LSKGASMLN</u> <u>GDVVSTGDIV</u> <u>NAGEIHF⁻⁻⁻⁻⁻DNQ</u> <u>TTPDAALS⁻⁻⁻⁻⁻RA</u>	450
<u>VAKGDSPVTF</u> <u>HKLTTSNLTG</u> <u>QGGTINMRVR</u> <u>LDGSNTSDQL</u> <u>VINGGQATGK</u>	500
<u>TWLAFTNVGN</u> <u>SNLGVATTGQ</u> <u>GIRVVDAQNG</u> <u>ATTEEGAFAL</u> <u>SRPLQAGAFN</u>	550
<u>YTLNRDSD</u> <u>EDWYLRS</u> <u>ENAYR</u> <u>AEVPLYASML</u> <u>TQAMDYDRIL</u> <u>AGS</u>	593

Abbildung 15: Aminosäuresequenz der His-getaggten α -Domäne von Ag43b aus *E. coli* 536 rDM.

Die unterstrichenen AS-Reste konnten mittels Peptidmapping detektiert werden. Der im Vergleich zur bisher angenommenen Proteinsequenz um 13 AS längere Bereich ist mittels gestrichelter Linie markiert.

4.1.3 Überprüfung der künstlichen Glykosylierung von Ag43a in *E. coli* Stamm 536 DM

Um für die massenspektrometrischen Untersuchungen eine adäquate Positivkontrolle zur Verfügung zu haben, sollte künstlich glykosyliertes, His-getaggtes Ag43 generiert werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass mit Hilfe der AIDA-I spezifischen Glykosyltransferase Aah die artifizielle Glykosylierung von Ag43a vermittelt werden kann (Sherlock *et al.*, 2006; Reidl *et al.*, 2009). Daher wurde das Plasmid pAAH, das das Gen für Aah trägt, zur Koexpression der Glykosyltransferase in *E. coli* Stamm 536 DM (pASK75-His-*agn43a*) eingebracht (Methode siehe 3.2.10). Isolation und Aufreinigung des so exprimierten Ag43a erfolgten wie unter 4.1.1 beschrieben. Zur Überprüfung der Glykosylierung wurde die isolierte Proteinprobe sowohl mit Hilfe des Glycopro Kits als auch mittels des sensitiveren GlycoProfile III Kits (3.3.7.1) untersucht.

Abbildung 16 zeigt vergleichend die Ergebnisse der SDS-Gel-Färbungen unter Verwendung der beiden Glykoprotein-Detektionskits sowie der im Anschluss erfolgten Coomassie-Nachfärbung des einen Glykokit-Gels.

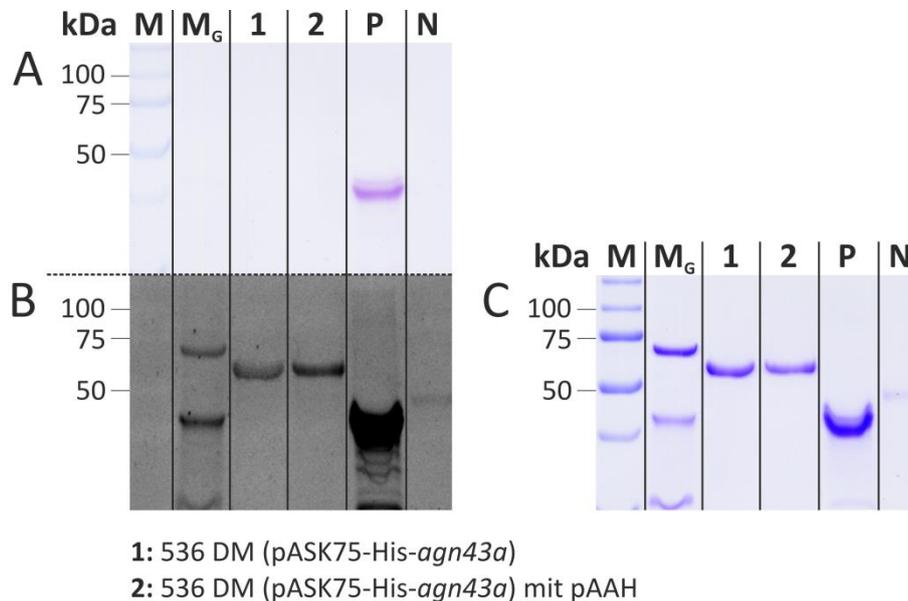


Abbildung 16: Nachweis der künstlichen Glykosylierung von Ag43a durch Aah.

Untersuchung des Glykosylierungsstatus der isolierten Ag43a-Proben mit Hilfe des (A) Glycopro Kits sowie des (B) GlycoProfile III Kits mit anschließender Kontrolle durch (C) Coomassie-Färbung des Glykogels.

M: Marker, M_G: Glykomarker des GlycoProfile III Kits, P: Meerrettichperoxidase (glykosylierte Positivkontrolle), N: Kreatinase (unglykosylierte Negativkontrolle)

In dem mit Hilfe des Glycopro Kits angefärbten Gel war eine violette Bande detektierbar, die der Kit-eigenen Positivkontrolle (Meerrettichperoxidase (44 kDa)) entsprach. Die Gelspur des mit Aah koexprimierten Ag43a wies auf Höhe von ca. 60 kDa einen leichten violetten Schatten auf. Für alle anderen aufgetragenen Proteinproben sowie den Marker aus dem GlycoProfile III Kit konnten keine Banden nachgewiesen werden. Die Beobachtung ließ vermuten, dass die künstliche Glykosylierung mittels Aah funktioniert hatte und bei Ag43a zu mehr gebundene Zuckerresten führte als die natürliche Glykosylierung. Bestätigt wurde diese These durch den Vergleich mit dem Ergebnis der GlycoProfile III Kit-Färbung: für das mit Aah koexprimierte Ag43a ließ sich eine Bande detektieren, die in ihrer Signalstärke der Bande der Positivkontrolle Ovalbumin entsprach. Die Signalstärke von Ag43a isoliert aus *E. coli* 536 DM ohne Aah-Koexpression deutete erneut darauf hin, dass das Protein in geringem Maße glykosyliert vorlag. Die Meerrettichperoxidase erzeugte ein sehr starkes Signal, das sich aufgrund seiner

Intensität nicht als distinkte Bande darstellte. Wahrscheinlich lag der Zuckergehalt dieser Probe außerhalb des optimalen Nachweisbereichs des Kits. Nach der Coomassie-Färbung des Gels war erkennbar, dass die Bandenposition des künstlich glykosylierten Ag43a einem leicht höheren Molekulargewicht entsprach als die Bandenhöhe der Ag43a-Kontrolle. Diese Beobachtung war ebenfalls Indiz für eine erfolgreiche künstliche Glykosylierung, da glykosylierte Proteine weniger effektiv mit SDS beladen werden und dadurch ein langsames Laufverhalten aufweisen als nicht glykosylierte Proteine mit dem selben Molekulargewicht (Lottspeich und Zorbas, 1998).

Um präzisere Informationen über das artifiziell glykosylierte Ag43a zu erhalten, sollte die Probe nachfolgend massenspektrometrisch untersucht werden. Leider lagen zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit noch keine Ergebnisse vor.

4.1.4 Untersuchungen zu Expression und Glykosylierung von AIDA-I in *E. coli* 536 DM, *E. coli* 536 rDM und *E. coli* MG1655 $\Delta fim \Delta flu$

Ag43 gehört zur AidA-Unterfamilie der Autotransporterproteine und weist zu einigen Mitgliedern dieser Proteinfamilie einen hohen Grad an Homologie auf, beispielsweise zu AIDA-I, dem „*adhesin involved in diffuse adherence*“ aus enteropathogenen *E. coli* (Ulett *et al.*, 2006). Aufgrund dieser Homologie sollte nachfolgend die Expression von AIDA-I in den zuvor verwendeten *E. coli* Stämmen 536 DM, 536 rDM und MG1655 $\Delta fim \Delta flu$ untersucht werden. Hierbei war insbesondere der Glykosylierungsstatus der exprimierten AIDA-I-Proteine von Interesse, da dieser mögliche Hinweise bezüglich der natürlichen Glykosyltransferase von Ag43 liefern könnte.

Für den Versuch wurde das Plasmid pIB9 verwendet, welches das *aidA*-Gen enthält, nicht aber das Gen für die AIDA-I spezifische Glykosyltransferase Aah (Benz und Schmidt, 2001). Nach erfolgreicher Transformation der oben genannten *E. coli* Stämme mit pIB9 wurden die Bakterien über Nacht kultiviert und die drei Ansätze am nächsten Tag zur Herstellung von Gesamtzell- und Hitzeextrakten (siehe 3.3.1) genutzt. Um für die Untersuchungen über eine entsprechende Positivkontrolle zu verfügen, wurde zusätzlich ein Hitzeextrakt des *E. coli* Stammes MG1655 $\Delta fim \Delta flu$ (pIB264) generiert. Da das Plasmid pIB264 sowohl *aah* als auch *aidA* umfasst (Benz und Schmidt, 1989), lag das so isolierte AIDA-I in natürlich glykosylierter Form vor. Als Negativkontrolle diente der Gesamtzellextrakt des *E. coli* Stammes 536 DM. Zur Überprüfung der AIDA-I-Expression wurden die

Proteinproben sowohl mittels SDS-PAGE als auch via Western Blot-Analyse untersucht (siehe 3.3.4 - 3.3.6). Die Bestimmung des Glykosylierungsstatus der Proteine erfolgte mit Hilfe des GlycoProfile III Kits (3.3.7.1). Bei allen Untersuchungen wurden Gesamtzell- und Hitzeextrakt des jeweiligen Ansatzes nebeneinander aufgetragen. Zur Vereinfachung werden Gesamtzell- und Hitzeextrakte nachfolgend mit GE und HE abgekürzt. In Abbildung 17 sind die Ergebnisse zusammengefasst dargestellt.

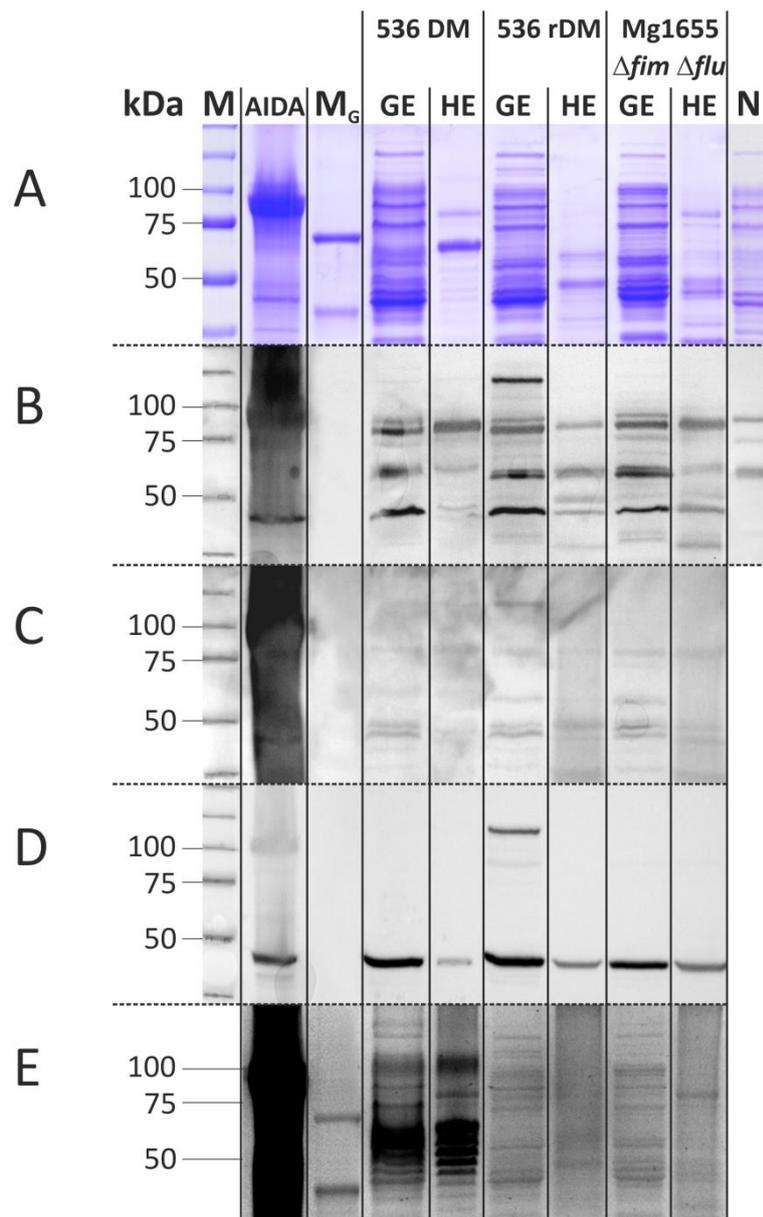


Abbildung 17: Untersuchung der Expression und Glykosylierung von pIB9-kodiertem AIDA-I in *E. coli* 536 DM, *E. coli* 536 rDM und *E. coli* MG1655 $\Delta fim \Delta flu$. Zur Analyse wurden sowohl Gesamtzell- (GE) als auch Hitzeextrakte (HE) der transformierten Bakterienstämme verwendet. Die Überprüfung erfolgte durch (A) SDS-PAGE und Coomassie-Färbung, Western Blot-Analysen unter Verwendung von (B) α -c600/p4 IgG, (C) α -AIDA-I IgG und (D) α -fp12 IgG sowie (E) Glykofärbung. Erläuterung siehe Text.
M: Marker, AIDA: glykosyliertes AIDA-I^α, M_G: Glykomarker des GlycoProfile III Kits, N: GE von *E. coli* 536 DM.

Die Analyse des Coomassie-Gels (Abbildung 17A) lieferte keinen eindeutigen Hinweis auf eine erfolgreiche Expression von AIDA-I in den drei verschiedenen Stammhintergründen: In den Gelspuren der drei GE war der Nachweis einer distinkten Proteinbande auf Laufhöhe der AIDA-I-Kontrollbande (ca. 100 kDa) nicht möglich, was aufgrund des dichten Bandenmusters des aufgetrennten Gesamtzellproteins nicht überraschte. Allerdings ließ sich auch für keinen der drei HE eine Proteinbande auf Bandenhöhe der AIDA-I-Kontrolle detektieren.

Mit Hilfe der nachfolgenden Western Blot-Untersuchungen konnte jedoch die AIDA-I-Expression in den zu testenden drei Bakterienstämmen bestätigt werden: In der ersten Western Blot-Analyse wurde der Antikörper α -c600/p4 verwendet, der gegen das AIDA-Gesamtprotein (α - und β -Domäne) gerichtet ist (Abbildung 17B). Mit diesem Antikörper waren in der AIDA-I-Kontrollprobe zwei distinkte Banden nachweisbar, deren Laufhöhe bei ca. 100 bzw. 48 kDa lag. Der Literatur nach entsprach die Bande bei 100 kDa der glykosylierten AIDA-I- α -Domäne, die Bande bei 48 kDa der Translokator-Domäne AIDA^C (Benz und Schmidt, 2001). Auch für die drei GE konnten deutliche Signale auf Höhe der 48 kDa detektiert werden, was auf das Vorhandensein von AIDA^C in allen drei Proben hindeutete. Die GE-Banden auf Höhe der 60 kDa waren nach Abgleich mit dem Bandenmuster der Negativkontrolle auf eine unspezifische Bindung des Antikörpers zurückzuführen. Die Banden im 80 kDa-Bereich, die sich sowohl für die GE als auch für die HE nachweisen ließen, konnten dagegen in der Proben Spur der Negativkontrolle nicht festgestellt werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass sich die unglykosylierte AIDA-I- α -Domäne im SDS-Gel als Proteinbande bei ca. 80 kDa darstellt (Benz und Schmidt, 2001). Somit waren die im Western Blot detektierbaren 80 kDa-Banden vermutlich auf das Vorhandensein von unglykosyliertem AIDA-I in den zu untersuchenden Proben zurückzuführen. Auch im SDS-Gel ließen sich für die drei HE Proteinbanden auf Höhe der 80 kDa nachweisen. Hierbei fiel auf, dass für den HE isoliert aus 536 rDM (pIB9) nur eine sehr schwache 80 kDa-Bande zu erkennen war. Diese Beobachtung stimmte mit dem Western Blot-Ergebnis überein: Das für den HE isoliert aus 536 rDM (pIB9) detektierte Signal auf Höhe der 80 kDa war weniger stark als die entsprechenden Signale der anderen zwei HE. Interessanterweise konnte dafür in der GE-Probe aus 536 rDM (pIB9) eine zusätzliche Bande bei ca. 140 kDa beobachtet werden. Ein Protein dieses Molekulargewichts ließe sich als unprozessiertes AIDA-I interpretieren. Die unvollständige

Prozessierung wäre zudem eine Erklärung für die schwache 80 kDa-Bande, da es unter diesen Umständen nur zu geringfügiger Freisetzung der AIDA-I- α -Domäne käme.

Bei der nächsten Western Blot-Untersuchung wurde mit dem Antikörper α -fp12 gearbeitet, der nur gegen AIDA^C gerichtet ist (Abbildung 17D). Für die AIDA-I-Kontrollprobe ließ sich erwartungsgemäß ein starkes Signal auf Höhe der 48 kDa feststellen. Auch für alle zu überprüfenden GE und HE waren deutliche Signale auf Höhe der 48 kDa detektierbar. In der Probenspur des GE aus 536 rDM (pIB9) konnte zudem eine Bande auf Höhe der 140 kDa nachgewiesen werden, was die Vermutung, dass AIDA-I in *E. coli* 536 rDM (pIB9) nur unvollständig prozessiert wurde, bestätigte.

Im abschließenden Western Blot-Versuch wurden Antikörper eingesetzt, die sich gegen die glykosylierte AIDA-I- α -Domäne richten (Abbildung 17C). Wie erwartet führte die aufgetragene AIDA-I-Kontrollprobe zu einer starken Antikörperreaktion. Für alle anderen Proben konnten, wenn überhaupt, nur sehr schwache Signale detektiert werden, die sich jedoch durch den Vergleich mit der Negativkontrolle als unspezifisch herausstellten. Da der verwendete Antikörper in erster Linie gegen die Zuckerreste des glykosylierten AIDA-I ^{α} gerichtet ist, deutete das Ergebnis darauf hin, dass es in keinem der drei Stammhintergründe zur posttranslationalen Glykosylierung von AIDA-I gekommen war bzw. dass wenn doch, sich die Zuckerszusammensetzung und -struktur stark von der natürlichen Glykosylierung von AIDA-I durch Aah unterscheiden müssen.

Um den Glykosylierungsstatus der AIDA-I-Proben genauer zu bestimmen, wurden sie mit Hilfe des GlycoProfile III Kits untersucht, Abbildung 17E zeigt das zugehörige Gelfoto. Für die AIDA-I-Kontrolle war ein sehr starkes Signal detektierbar, das aufgrund seiner Intensität fast das gesamte Bild überstrahlte. Daher wurde das Gel ein weiteres Mal fotografiert, jedoch mit abgedeckter Kontrollprobe. In den Gelspuren der GE und HE aus *E. coli* 536 rDM (pIB9) sowie *E. coli* MG1655 Δ fim Δ flu (pIB9) waren nur schwach gefärbte Banden nachweisbar. Die Signalstärke der Banden war niedriger als die der Albumin-Bande (Negativkontrolle des Glykomarkers), was darauf schließen ließ, dass die zugehörigen Proben keine glykosylierten Proteine enthielten. In den Gelspuren von GE und HE aus *E. coli* 536 DM (pIB9) konnten dagegen starke Signale detektiert werden, deren Intensität auf das Vorhandensein von Glykokonjugaten hindeutete. Die Signale ließen sich zum einen aufgrund des typischen Strickleitermusters Resten der LPS-Schicht zuordnen, zum anderen einem Protein, dessen Laufhöhe bei ca. 60 kDa lag. Für den HE

von *E. coli* 536 DM (pIB9) konnte zudem auf Höhe der 80 kDa eine deutliche Bande detektiert werden, die wie oben gezeigt vermutlich dem exprimierten AIDA-I entsprach. Das Bandensignal war jedoch in seiner Intensität dem der Negativkontrolle Albumin sehr ähnlich, was darauf hin deutete, dass in *E. coli* 536 DM exprimiertes AIDA-I entweder gar nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß glykosyliert wurde. Somit konnte auf Basis dieses Ergebnisses keine eindeutige Aussage bezüglich des Glykosylierungsstatus von AIDA-I isoliert aus *E. coli* 536 DM (pIB9) getroffen werden.

Um ausschließen zu können, dass es sich bei dem glykosylierten Protein auf Höhe der 60 kDa um ein AIDA-I-Derivat handelte, wurde die entsprechende Proteinbande massenspektrometrisch untersucht. Die Proteinbande auf Höhe der 80 kDa wurde ebenfalls mittels MS überprüft. Das Ergebnis bestätigte, dass es sich bei dem Protein mit dem Molekulargewicht von 80 kDa eindeutig um AIDA-I handelte; das 60 kDa-Protein konnte dagegen als Flagellin identifiziert werden.

4.2 Identifizierung und Charakterisierung möglicher Glykosyltransferasen in *E. coli* Stamm 536

Für *E. coli* wurden bisher drei glykosylierte Oberflächenproteine, die Autotransporter AIDA-I, TibA und Ag43 beschrieben (Benz und Schmidt, 2001; Lindenthal und Elsinghorst, 1999; Sherlock *et al.*, 2006). Im Fall von AIDA-I und TibA sind die für die Glykosylierung verantwortlichen Heptosyltransferasen (Aah bzw. TibC) bekannt. Der Genlocus dieser Glykosyltransferasen (GTs) liegt jeweils stromaufwärts des zugehörigen Autotransportergens (*aidA* bzw. *tibA*). Für Ag43 konnte bislang keine zugehörige GT identifiziert werden. Aus diesem Grund war die Suche nach möglichen GT-kodierenden „*open reading frames*“ im Genom von *E. coli* Stamm 536 ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Für geeignete Kandidaten-Gene sollten anschließend die entsprechenden *E. coli* 536-„*knock-out*“-Mutanten generiert und diese phänotypisch und funktional charakterisiert werden.

4.2.1 Identifizierung putativer GT-kodierender „*open reading frames*“ in *E. coli* Stamm 536

Die Suche nach GT-kodierenden „*open reading frames*“ in *E. coli* Isolat 536 wurde mit Hilfe der CAZy- („*Carbohydrate-active enzymes*“) Datenbank durchgeführt. CAZy enthält eine detaillierte Übersicht über die Gesamtheit der kohlenhydrataktiven Enzyme, wobei diese in Abteilungen (z.B. Glykosidase, Esterase, GT) und Familien eingeteilt sind. Zudem kann für jedes Genom, das in GenBank veröffentlicht wurde, das Ergebnis einer auf kohlenhydrataktive Enzyme ausgerichteten Genom-Analyse abgerufen werden. Das Ergebnis umfasst dabei Gene sowohl bekannter als auch hypothetischer Proteine.

Für *E. coli* 536 ließen sich mit Hilfe von CAZy 40 verschiedene GTs ermitteln (siehe Tabellen 22 und 23 im Anhang). Der Großteil dieser GTs (insg. 29) war dem Funktionscluster „Bakterienhülle“ zuzuordnen, welches die GTs umfasst, die z.B. an der LPS- oder Colansäure-Synthese beteiligt sind. Sechs weitere GTs konnten aufgrund ihrer Funktion dem Cluster „Kohlenhydratmetabolismus“ zugewiesen werden. Bei den restlichen fünf GTs handelte es sich um hypothetische Proteine, über deren Funktion keine Informationen vorlagen. Eine Zuordnung zu funktionellen Clustern war somit für diese GTs nicht möglich, weswegen die entsprechenden Gene als Kandidaten für die Generierung von „*knock-out*“-Mutanten ausgewählt wurden (siehe Tabelle 12).

Interessanterweise konnten beim Vergleich der AS-Sequenzen der ausgewählten GTs mit dem Proteom von *E. coli* K-12 für Ecp2077 und Ecp2078 keine homologen Proteine gefunden werden.

Tabelle 12: Ausgewählte GT-Kandidaten aus *E. coli* Stamm 536 zur Generierung von Deletionsmutanten. In Klammern ist jeweils die „Accession number“ der AS-Sequenz der homologen Proteine angegeben.

GT-Name	Beschreibung	Gen	Homologievergleich mit <i>E. coli</i> K-12
Ecp0425	putative GT	<i>ecp0425</i>	zu 99 % identisch mit YaiP (AAC73466.1)
Ecp1999	hypothetisches Protein	<i>ecp1999</i>	zu 97 % identisch mit YaiP (AAC73466.1)
Ecp2077	putative GT	<i>ecp2077</i>	keine Homologe
Ecp2078	putative GT	<i>ecp2078</i>	keine Homologe
Ecp3716	putative GT	<i>ecp3716</i>	zu 99 % identisch mit WaaH (auch YibD) (AAC76639.1)

Zusätzlich zu den fünf identifizierten GTs sollte ebenfalls für das Gen der GT MdoH eine Deletionsmutante von *E. coli* 536 hergestellt werden. MdoH ist an der Biosynthese von osmoregulatorischen Oligosacchariden beteiligt, die im periplasmatischen Raum lokalisiert sind (Bohin und Kennedy, 1984), weswegen eine Interaktion mit dem Autotransporterprotein Ag43 nicht auszuschließen ist.

Da Ag43 sowohl von Aah als auch von TibC als Substrat akzeptiert wird (Sherlock *et al.*, 2006), wurden die Proteinsequenzen der 40 identifizierten GTs zusätzlich auf mögliche Homologien zu Aah bzw. TibC untersucht. Hierbei konnten für die Proteine WaaQ (GT der LPS-Kern-Biosynthese, Ecp3730) und WaaF (ADP-Heptose-LPS-Heptosyltransferase II, Ecp3720) signifikante Übereinstimmungen zu Aah bzw. TibC festgestellt werden. Für die zugehörigen Gene sollten ebenfalls „*knock-out*“-Mutanten konstruiert werden.

Aufgrund eines Vorversuchs wurde zudem das Gen *ecp3729*, das für die GT WaaG (UDP-Glucose:(Heptosyl)-LPS- α -1,3-Glucosyltransferase) kodiert, als weiterer Kandidat für die Herstellung einer Deletionsmutante ausgewählt.

4.2.2 Konstruktion der GT-Deletionsmutanten von *E. coli* 536

Die Konstruktion der Deletionsmutanten von *E. coli* Stamm 536 erfolgte mittels λ -Red-Rekombinase vermitteltem Allelaustausch (Datsenko und Wanner, 2000; siehe 3.2.11). Dabei wurden die ausgewählten Gene durch Chloramphenicol-Kassetten ersetzt, denen zuvor per PCR Nukleotidüberhänge homolog zu den die Zielsequenz flankierenden Bereichen angefügt wurden. Die Rekombinationsereignisse ließen sich mittels PCR anhand der Veränderung der Fragmentgrößen, die mit entsprechenden Primerpaaren detektiert wurden, dokumentieren (Primer siehe Tabelle 18 im Anhang). Da die Herstellung der Mutanten für den wildtypischen Stamm 536 nur teilweise erfolgreich war, wurde zusätzlich mit *E. coli* Stamm 536 $\Delta rfaH$ gearbeitet. In diesem Stamm erfolgt die Expression von Kapsel- und LPS-Komponenten reduziert, was das Generieren von Mutanten erleichtert.

Für die Gene *ecp2077* und *ecp2078* war die Konstruktion von Deletionsmutanten weder mit dem Wildtypstamm 536 noch mit der *rfaH*-Mutante möglich. Es ist denkbar, dass es sich hierbei um essentielle Gene handelt, was in zukünftigen Untersuchungen überprüft werden sollte. Die erfolgreiche Deletion der restlichen Gene ließ sich mittels Kontroll-PCR bestätigen; die generierten Deletionsmutanten sind in Tabelle 13 aufgelistet.

Tabelle 13: Übersicht über die generierten GT-Deletionsmutanten.

Name	deletiertes Gen	<i>E. coli</i> Stammhintergrund
<i>E. coli</i> RS1	<i>ecp0425</i>	536 $\Delta rfaH$
<i>E. coli</i> RS2	<i>ecp1042 (mdoH)</i>	536
<i>E. coli</i> RS3A	<i>ecp1999</i>	536
<i>E. coli</i> RS3B	<i>ecp1999</i>	536 $\Delta rfaH$
<i>E. coli</i> RS6	<i>ecp3716</i>	536 $\Delta rfaH$
<i>E. coli</i> RS7	<i>ecp3720 (waaF bzw. rfaF)</i>	536 $\Delta rfaH$
<i>E. coli</i> RS8A	<i>ecp3729 (waaG bzw. rfaG)</i>	536
<i>E. coli</i> RS8B	<i>ecp3729 (waaG bzw. rfaG)</i>	536 $\Delta rfaH$
<i>E. coli</i> RS9A	<i>ecp3730 (waaQ bzw. rfaQ)</i>	536
<i>E. coli</i> RS9B	<i>ecp3730 (waaQ bzw. rfaQ)</i>	536 $\Delta rfaH$

Alle Deletionsmutanten wurden nachfolgend mit Hilfe klassischer mikrobiologischer Tests hinsichtlich ihres Phänotyps untersucht.

4.2.3 Phänotypische Charakterisierung der GT-Deletionsmutanten

Wachstumskinetik in LB-Medium und Urin

Um die Wachstumseigenschaften der Deletionsmutanten zu untersuchen, wurden die Bakterien sowohl in LB-Medium bei 37 °C schüttelnd inkubiert (Abbildung 18A) als auch in humanem Sammelurin bei statischer Anzucht und 37 °C (Abbildung 18B).

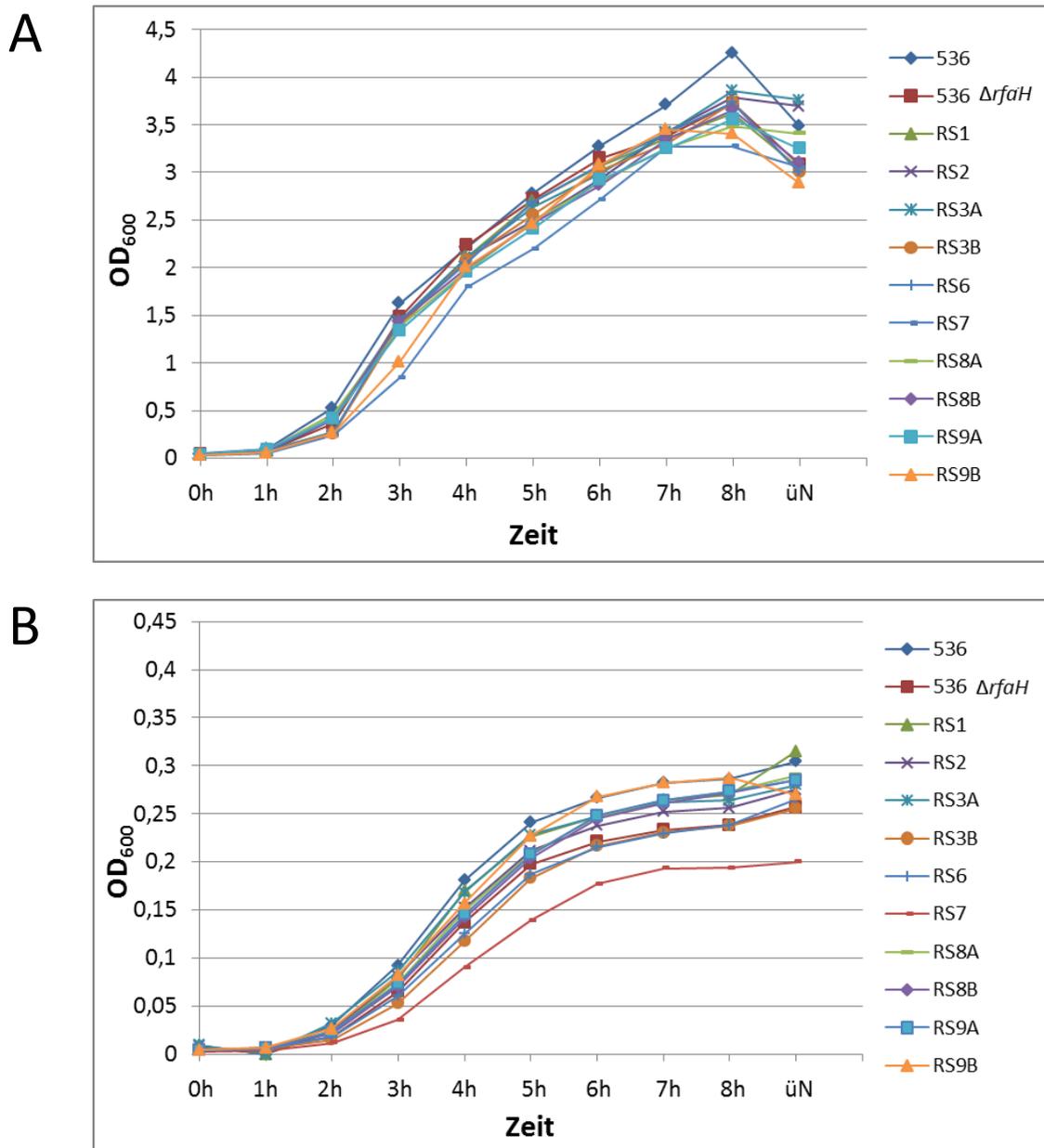


Abbildung 18: Vergleichende Wachstumskurven der GT-Deletionsmutanten.

Wachstum der GT-Deletionsmutanten in (A) LB-Medium bei 37 °C unter aeroben Bedingungen und (B) humanem Sammelurin bei 37 °C und statischer Anzucht. Das Bakterienwachstum wurde durch die photometrische Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm verfolgt.

In LB-Medium konnten keine relevanten Unterschiede bezüglich des Wachstumsverhaltens der Deletionsmutanten im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangsstämmen festgestellt werden. Bei der Anzucht in Urin zeigten alle Bakterienstämme ein signifikant geringeres Wachstum als in LB-Medium. Bis auf *E. coli* RS7 ließ sich für die Deletionsmutanten kein von der Charakteristik der Ausgangsstämme abweichendes Wachstum verzeichnen. Die *waaF*-Deletionsmutante RS7 zeigte dagegen ein im Vergleich zu *E. coli* 536 $\Delta rfaH$ vermindertes Wachstum, was sich auch in der geringen Anzahl detektierbarer CFU bestätigte (ohne Abbildung).

Untersuchung auf Autoaggregation und Biofilmbildung

Zur Untersuchung von Zell-Zell-Interaktionen wurde mit den Bakterienstämmen ein Autoaggregations-Test wie unter 3.4.2 beschrieben durchgeführt. Bei der Überprüfung der Deletionsmutanten hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Autoaggregation in LB-Medium waren im Vergleich zu den beiden Parentalstämmen keine Unterschiede feststellbar (siehe Abbildung 31 im Anhang).

Die Analyse der Biofilmbildung der Deletionsmutanten erfolgte mittels statischer Kultivierung in 96-well Mikrotiterplatten bei 37 °C für 48 h und anschließender Färbung mit Kristallviolett (siehe 3.4.3). Der Versuch wurde sowohl mit M63-Medium als auch mit menschlichem Sammelurin durchgeführt, die Ergebnisse sind in Abbildung 19 zusammengefasst.

Für alle Bakterienstämme konnte nach der Kultivierung in Urin nur eine sehr geringe Biofilmbildung festgestellt werden, weswegen eine quantitative Differenzierung nicht möglich war. Nach Anzucht in M63-Medium waren dagegen deutliche Unterschiede in der Fähigkeit zur Biofilmbildung erkennbar: Im Vergleich zum Ausgangsstamm *E. coli* 536 ließ sich für die *mdoH*-Deletionsmutante RS2 eine signifikant erhöhte Biofilmbildung feststellen. Der von Stamm RS3A gebildete Biofilm entsprach hingegen quantitativ dem des Ausgangsstammes. Für die *waaG*-Deletionsmutante RS8A konnte eine deutlich geringere Biofilmbildung nachgewiesen werden. Die Biofilmbildung von Stamm RS9A war nur leicht reduziert.

Die Deletionsmutante RS1 wies im Vergleich zum Ausgangsstamm *E. coli* 536 $\Delta rfaH$ eine erhöhte Biofilmbildung auf. Die Deletion von *ecp1999* in *E. coli* 536 $\Delta rfaH$ (RS3B)

resultierte in einer signifikant verstärkten Biofilmbildung. Die quantifizierte Biofilmbildung von Stamm RS6 und Stamm RS9B entsprach der des Parentalstammes. Bemerkenswert war die fast vollständig reduzierte Biofilmbildung bei der *waaF*-Deletionsmutante RS7. Für Stamm RS8B ließ sich im Vergleich zum Ausgangsstamm ebenfalls eine signifikant geringere Biofilmbildung verzeichnen.

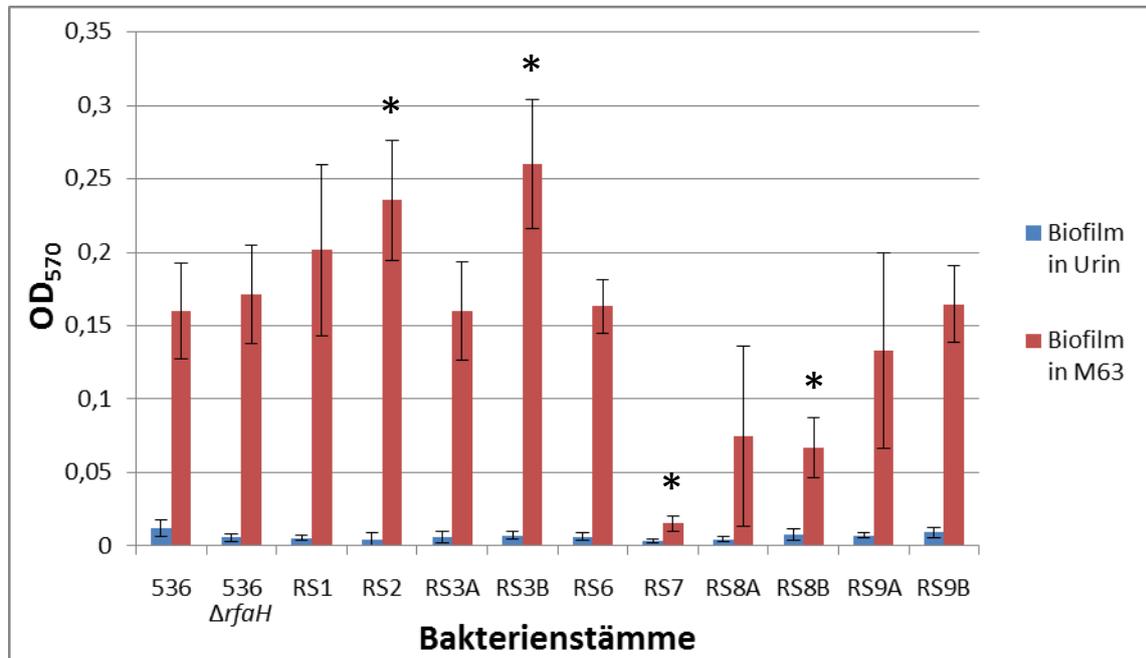


Abbildung 19: Graphische Darstellung der Biofilmbildung der GT-Deletionsmutanten.

Quantifizierte Biofilmbildung der GT-Deletionsmutanten nach statischer Kultivierung in 96-well Mikrotiterplatten bei 37 °C für 48 h, anschließender Färbung mit Kristallviolett und photometrischer Auswertung bei $\lambda = 570$. In blau: Biofilmbildung in Urin, in rot: Biofilmbildung in M63-Medium. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) in der Biofilmbildung im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangsstämmen wurden mittels Student's t-Test bestimmt und sind durch Sternchen (*) gekennzeichnet.

Somit schien die Deletion der Gene *ecp0425* und *mdoH* eine verstärkte Biofilmbildung zur Folge zu haben, die Deletion von *waaF* und *waaG* sich eher negativ auf die Biofilmbildung auszuwirken. Für die Deletion von *ecp1999* bzw. *waaQ* konnte keine eindeutige Aussage getroffen werden, da der Effekt des „knock-out“ je nach Stammhintergrund verschieden war.

Motilitätstest auf Schwärmagar

Um zu überprüfen, ob die Deletionsmutanten über eine funktionelle Flagelle verfügten, wurde die Motilität der Bakterien mit Hilfe von Schwärmagarplatten getestet (siehe 3.4.4). Die Tests wurden sowohl mit LB- als auch mit Urin-Schwärmagar durchgeführt.

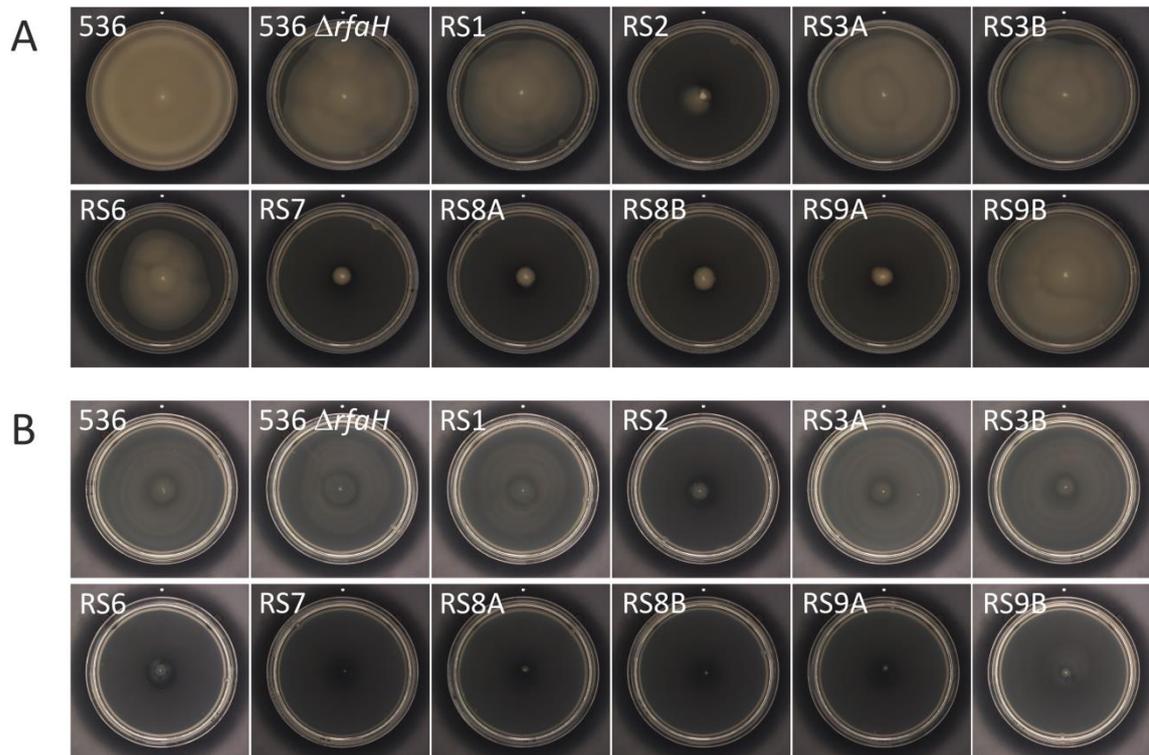


Abbildung 20: Motilitätstest der GT-Deletionsmutanten auf Schwärmagar.

Bestimmung der Motilität der GT-Deletionsmutanten im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangsstämmen auf (A) LB-Schwärmagar und (B) Urin-Schwärmagar nach Inkubation bei 37 °C für 24 h.

Das Schwärmverhalten der zu testenden Stämme war auf Urin-Schwärmagar weniger stark ausgeprägt als auf LB-Schwärmagar, was sich auf das generell geringere Wachstum der Bakterien in Urin zurückführen ließ. Jeder getestete Bakterienstamm zeigte für beide Wachstumsmedien ein in der Tendenz übereinstimmendes Schwärmverhalten (Abbildung 20).

Für den Ausgangsstamm *E. coli* 536 konnte das ausgeprägteste Schwärmverhalten festgestellt werden. Die *mdoH*-Deletionsmutante RS2 zeigte dagegen eine deutlich geringere Motilität. Im Vergleich zum Parentalstamm wies *E. coli* RS3A ein leicht schwächeres Schwärmverhalten auf. Für die Deletionsmutanten RS8A und RS9A konnte auf Urin-Schwärmagar keine Motilität beobachtet werden, ihr Schwärmverhalten auf LB-Agar war stark reduziert.

Die für die Deletionsmutanten RS1 und RS3B zu verzeichnende Motilität entsprach der des Ausgangsstammes *E. coli* 536 $\Delta rfaH$. Die Deletion von *ecp3716* in *E. coli* 536 $\Delta rfaH$ (RS6) resultierte in einem erkennbar schwächeren Schwärmverhalten. Die Deletionsmutanten RS7 und RS8B zeigten auf Urin-Schwärmagar keine Motilität, ihr

Schwärmverhalten auf LB-Agar war ebenfalls stark reduziert. Interessanterweise konnte dagegen für Stamm RS9B ein dem Ausgangsstamm entsprechendes Schwärmverhalten festgestellt werden.

Offenbar hatte die Deletion der Gene *mdoH*, *waaF* und *waaG* einen negativen Effekt auf die Motilität der Bakterienstämme. Für die Deletion von *waaQ* war das Treffen einer eindeutigen Aussage nicht möglich, da sich auch hier der „*knock-out*“ je nach Paternalstamm unterschiedlich auswirkte.

Untersuchung auf Curli-Fimbrien und Zellulosesynthese

Zur Überprüfung der Deletionsmutanten hinsichtlich ihrer Fähigkeit Curli-Fimbrien und Zellulose zu exprimieren, wurden die Bakterienstämme auf Kongorot (CR)-Agar bei RT, 30 °C und 37 °C für 48 h kultiviert (3.4.5). Bilden Bakterien Curli-Fimbrien aus und produzieren gleichzeitig Zellulose, können bei Wachstum auf CR-Agar Kolonien des sogenannten *rdar*-Morphotyps („*red, dry and rough*“) beobachtet werden. Bakterien, die Zellulose, jedoch keine Curli-Fimbrien synthetisieren, zeigen auf CR-Agar pinke Kolonien. Für Bakterienzellen, die Curli-Fimbrien, jedoch keine Zellulose bilden, lassen sich braune Kolonien auf CR-Agar feststellen. Bakterienstämme, die weder Curli-Fimbrien noch Zellulose exprimieren, wachsen auf CR-Agar weißlich und schleimig-glatt, sie zeigen den *saw*-Morphotyp („*smooth and white*“) (Bokranz *et al.*, 2005). Als Positivkontrolle diente der *E. coli* Stamm Nissle 1917, der unter jeder der drei Versuchsbedingungen Kolonien des *rdar*-Morphotyps ausbildet. Die Negativkontrolle *E. coli* Stamm DH5α zeigt keine Kolonien des *rdar*-Phänotyps.

Zusätzlich wurde die Zelluloseproduktion der Deletionsmutanten durch Anzucht auf Calcofluor (CF)-Agar überprüft (3.4.6): Der Fluoreszenzfarbstoff Calcofluor bindet an Zellulose, weswegen sich Zellulose-positive Stämme unter UV-Licht aufgrund ihrer Fluoreszenz identifizieren lassen.

Der besseren Vergleichbarkeit wegen wurden die Erscheinungsbilder der zu untersuchenden Stämme nach Wachstum auf CR- und CF-Agar bei unterschiedlichen Temperaturen in Tabelle 14 zusammengestellt.

Tabelle 14: Phänotypen der GT-Deletionsmutanten auf Kongorot- und Calcofluor-Agar.

Die fotografische Dokumentation erfolgte nach Inkubation der Agarplatten bei RT, 30 °C und 37 °C für 48 h. In jeder Spalte sind links die Kolonien auf CR-Agar und rechts die entsprechenden Kolonien auf CF-Agar abgebildet. Als Positivkontrolle diente *E. coli* Stamm Nissle 1917, als Negativkontrolle *E. coli* Stamm DH5 α .

<i>E. coli</i> -Stamm	RT		30°C		37°C	
536						
536 $\Delta rfaH$						
RS1						
RS2						
RS3A						
RS3B						
RS6						
RS7						
RS8A						
RS8B						
RS9A						
RS9B						
DH5 α						
Nissle 1917						

Für *E. coli* Stamm 536 konnte nach Inkubation bei RT auf CR-Agar ein schwach ausgebildeter *rdar*-Morphotyp beobachtet werden, der auf eine weniger starke Curli- und Zellulosesynthese schließen ließ. Die entsprechende Kolonie auf CF-Agar fluoreszierte nur geringfügig und bestätigte die reduzierte Zellulosesynthese. Bei 30 °C bildeten die Kolonien des Stammes 536 den typischen *rdar*-Phänotyp aus, was die Expression von Zellulose und Curli-Fimbrien anzeigte. Durch die deutliche Fluoreszenz der entsprechenden Kolonie auf CF-Agar wurde das Vorhandensein von Zellulose bestätigt. Bei 37 °C bildete der Stamm 536 auf CR-Agar eine bräunliche Kolonie. Sie ließ sich dem *bas*-Morphotyp („*brown and smooth*“) zuordnen, bei dem die Bakterien Curli-Fimbrien, jedoch keine Zellulose produzieren. Dieser Beobachtung entsprechend war für die zugehörige Kolonie auf CF-Agar keine Fluoreszenz detektierbar.

Für den *E. coli* Stamm 536 $\Delta rfaH$ waren nach Inkubation bei RT auf CR-Agar Kolonien zu beobachten, die dem *saw*-Phänotyp entsprachen, dabei aber einen deutlich rotgefärbten Innenbereich aufwiesen. Die Rotfärbung ließ sich vermutlich auf eine geringe Zelluloseproduktion der Bakterien zurückführen, was durch die schwache Fluoreszenz der entsprechenden Kolonie auf CF-Agar bestätigt wurde. Bei 30 °C zeigte sich für Stamm 536 $\Delta rfaH$ auf CR-Agar ein unvollständig ausgeprägter *rdar*-Phänotyp, der darauf schließen ließ, dass die Bakterien aufgrund der *rfaH*-Deletion nicht im selben Maße Zellulose und Curli-Fimbrien synthetisierten wie die des wildtypischen Stammes 536. Die Zelluloseexpression wurde durch die Fluoreszenz der entsprechenden Kolonie auf CF-Agar bestätigt. Bei 37 °C bildete der Stamm 536 $\Delta rfaH$ auf CR-Agar Kolonien des *saw*-Morphotyps aus, für die zugehörigen Kolonien auf CF-Agar war keine Fluoreszenz detektierbar.

Hinsichtlich der Curli- und Zellulosesynthese konnte für die Deletionsmutanten RS1, RS3B, RS6 und RS9B bei keiner der drei getesteten Temperaturen ein Unterschied zum Ausgangsstamm 536 $\Delta rfaH$ festgestellt werden.

Die *mdoH*-Deletionsmutante RS2 zeigte dagegen vom Ausgangsstamm 536 abweichende Morphotypen: Die bei RT gebildete Kolonie entsprach dem *saw*-Phänotyp mit rotem Innenbereich, die zugehörige Kolonie auf CF-Agar fluoreszierte nur sehr schwach. Inkubation bei 30 °C führte zu Kolonien mit unvollständig ausgeprägtem *rdar*-Morphotyp und unregelmäßig gelappter Randzone, die fluoreszierende Kolonie auf CF-Agar

bestätigte die Zelluloseexpression. Bei 37 °C bildete RS2 den *saw*-Phänotyp aus, die Kolonien zeigten zudem einen unregelmäßigen Rand.

Auch *E. coli* RS3A wies im Vergleich zum Parentalstamm 536 für alle drei Temperaturen phänotypische Unterschiede auf: Koloniemorphologie und Fluoreszenzmuster entsprachen interessanterweise eher dem Erscheinungsbild von *E. coli* 536 $\Delta rfaH$.

Die *waaF*-Deletionsmutante RS7 bildete bei allen drei Temperaturen nur Kolonien des *saw*-Phänotyps aus, für die zugehörigen Kolonien auf CF-Agar war keine Fluoreszenz detektierbar. Offenbar wirkte sich die Deletion von *waaF* im *E. coli* 536 $\Delta rfaH$ -Hintergrund negativ auf die Curli- und Zellulosesynthese aus.

Für *E. coli* Stamm RS8A konnten nach Inkubation bei RT auf CR-Agar pinke Kolonien beobachtet werden (*pas*-Morphotyp („*pink and smooth*“)), was auf Zellulosesynthese hinwies und durch die deutlich fluoreszierende Kolonie auf CF-Agar bestätigt wurde. Bei 30 °C zeigte die *waaG*-Deletionsmutante im Vergleich zum Ausgangsstamm 536 einen stark reduzierten *rdar*-Morphotyp. Inkubation bei 37 °C führte bei RS8A zur Bildung von Kolonien des *saw*-Phänotyps. Für RS8B, die *waaG*-Deletionsmutante von *E. coli* 536 $\Delta rfaH$, waren bei allen drei Temperaturen nur Kolonien des *saw*-Morphotyps zu beobachten, die zugehörigen Kolonien auf CF-Agar zeigten keine Fluoreszenz. Dies lässt vermuten, dass sich die Deletion von *waaG* in *E. coli* 536 $\Delta rfaH$ negativ auf die Curli- und Zellulosesynthese auswirkt.

Die *waaQ*-Deletionsmutante RS9A wies im Vergleich zum Ausgangsstamm 536 für alle drei Temperaturen phänotypische Unterschiede auf: Die bei RT gebildete Kolonie entsprach dem *saw*-Phänotyp, die zugehörige Kolonie auf CF-Agar zeigte keine Fluoreszenz. Inkubation bei 30 °C führte zu Kolonien mit reduziertem *rdar*-Morphotyp. Bei 37 °C bildete RS9A den *saw*-Phänotyp, die Kolonien zeichneten sich zudem durch eine stark gelappte Randzone aus.

Untersuchung auf Hämolyseproduktion

Um die Deletionsmutanten hinsichtlich hämolysierender Fähigkeiten beurteilen zu können, wurden die Bakterienstämme wie unter 3.4.7 beschrieben auf Blutagar inkubiert und anschließend auf das Vorhandensein eines klaren erythrozytenfreien Hämolysehofes untersucht. Als Negativkontrollen dienten die *E. coli* Stämme DH5 α sowie Nissle 1917.

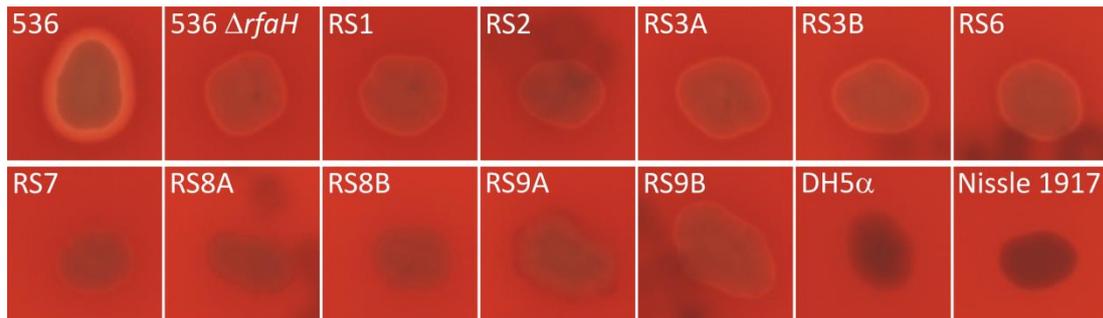


Abbildung 21: Untersuchung der Hämolysinsynthese der GT-Deletionsmutanten auf Blutagar.

Die fotografische Dokumentation erfolgte nach Inkubation der Agarplatten über Nacht bei 37 °C. Als Positivkontrolle diente *E. coli* Stamm 536, als Negativkontrollen *E. coli* Stamm DH5 α und Nissle 1917.

Für den wildtypischen Ausgangsstamm *E. coli* 536, der zwei Kopien des Hämolysin-Genclusters besitzt, war auf Blutagar ein deutlicher Hämolysehof nachweisbar. *E. coli* Stamm 536 $\Delta rfaH$ wies wie erwartet einen weniger starken Hämolysehof auf, da die Deletion von *rfaH* zur verminderten Expression von α -Hämolysin führt (Abbildung 21).

Für die Deletionsmutanten RS1, RS3B, RS6 und RS9B konnte im Vergleich zum Ausgangsstamm 536 $\Delta rfaH$ kein Unterschied in der α -Hämolysinproduktion festgestellt werden. Die Deletionsmutanten RS2 und RS3A zeigten im Vergleich zum Parentalstamm *E. coli* 536 einen reduzierten Hämolysehof, der in seiner Ausprägung dem Hämolysehof von 536 $\Delta rfaH$ entsprach. Für die Deletionsmutanten RS7, RS8A, RS8B und RS9A war keine hämolytische Aktivität feststellbar. Somit schien die Deletion der Gene *mdoH*, *waaF* und *waaG* eine reprimierende Wirkung auf die Hämolysinproduktion zu haben. Bezüglich der Deletion von *ecp1999* bzw. *waaQ* konnte keine eindeutige Aussage getroffen werden, da die Auswirkungen des „knock-out“ je nach Stammhintergrund verschieden waren.

Nachweis der Typ 1-Fimbrien-Expression (Mannose-abhängige Hefeagglutination)

Mittels der Mannose-abhängigen Hefeagglutination (3.4.8) wurden die Deletionsmutanten hinsichtlich der Typ 1-Pili-Expression untersucht. Für den wildtypischen Ausgangsstamm *E. coli* 536 ließ sich eine deutliche Agglutination mit Hefe beobachten, die jedoch in Anwesenheit von Mannose ausblieb. *E. coli* Stamm 536 $\Delta rfaH$ zeigte eine weniger starke Verklumpung mit Hefe, doch auch hier war die Agglutination durch Zugabe von Mannose inhibierbar.

Bis auf *E. coli* RS8A, RS8B und RS9A konnte für die Deletionsmutanten im Vergleich zu den Ausgangsstämmen kein Unterschied in der Typ 1-Fimbrien-Expression festgestellt werden. Für die Deletionsmutanten RS8A, RS8B und RS9A war interessanterweise keine Agglutination mit Hefe nachweisbar.

Nachweis der Expression von Siderophoren, Colicin und Aerobaktin

Um zu überprüfen, ob die generierten Deletionen einen Einfluss auf die Bildung der bakteriellen Eisenaufnahme-Systeme hatten, wurde für alle Bakterienstämme die Produktion von Siderophoren mittels des „*CAS liquid assays*“ nach Schwyn und Neilands ermittelt (3.4.11). Die für die Deletionsmutanten festgestellte Siderophor-Kinetik zeigte keinen Unterschied zu der der beiden Ausgangsstämme (siehe Abbildung 32 im Anhang). Für die Colicin- und Aerobaktinproduktion der Deletionsmutanten war ebenfalls keine Abweichung zum Syntheseverhalten der Parentalstämmen nachweisbar.

Der besseren Übersicht wegen wurden alle auffälligen Ergebnisse der phänotypischen Tests der GT-Deletionsmutanten nachfolgend in Tabelle 15 zusammengestellt.

Tabelle 15: Zusammenfassung der Ergebnisse der phänotypischen Charakterisierung der GT-Deletionsmutanten.

Bis auf die Beobachtungen für den Nachweis der Curli- und Zellulosesynthese erfolgte die Auswertung der Versuchsergebnisse jeweils im Vergleich zum entsprechenden Ausgangsstamm, d.h. „-“ bedeutet weniger/schwächer als der Ausgangsstamm, „+“ bedeutet mehr/stärker als der Ausgangsstamm.

Mutante	Parentalstamm	deletiertes Gen	Wachstum Urin	Biofilmbildung	Schwärmverhalten	Curli- und Zellulosesynthese		Hämolyse	Hefeagglutination			
						RT	30 °C			37 °C		
RS1	536 $\Delta rfaH$	<i>ecp0425</i>		+		saw (ri)	- (rdar)	+	saw	-		
RS2	536	<i>ecp1042 (mdoH)</i>		++	--	saw (ri)	- (rdar) I	+	saw I	-	-	
RS3A	536	<i>ecp1999</i>			(-)	saw (ri)	- (rdar)	+	saw	-	-	
RS3B	536 $\Delta rfaH$	<i>ecp1999</i>		++		saw (ri)	- (rdar)	+	saw	-		
RS6	536 $\Delta rfaH$	<i>ecp3716 (waaH)</i>			-	saw (ri)	- (rdar)	+	saw	-		
RS7	536 $\Delta rfaH$	<i>ecp3720 (waaF)</i>	-	---	---	saw	- saw	-	saw	-	---	
RS8A	536	<i>ecp3729 (waaG)</i>		--	---	pas	+	((rdar))	+/-	saw	-	---
RS8B	536 $\Delta rfaH$	<i>ecp3729 (waaG)</i>		--	---	saw	-	saw	-	saw	-	---
RS9A	536	<i>ecp3730 (waaQ)</i>		-	---	saw (ri)	- ((rdar))	+/-	saw I	-	---	
RS9B	536 $\Delta rfaH$	<i>ecp3730 (waaQ)</i>				saw (ri)	- (rdar)	+	saw	-		

(ri): Kolonie innen rötlich gefärbt, (rdar): unvollständig ausgeprägter *rdar*-Phänotyp, I: unregelmäßiger, lappiger Kolonierand

4.3 Vergleichsstudien zum uropathogenen Virulenzpotential ausgewählter *E. coli* Stämme mittels des experimentellen Mausmodells der aufsteigenden Harnwegsinfektion (HWI)

Die Entstehung einer HWI ist in der Regel das Ergebnis des regulierten Zusammenwirkens unterschiedlicher bakterieller, teilweise stammspezifischer Faktoren. Da sich das Mausmodell der experimentellen HWI in den letzten Jahren zur Aufklärung der UPEC-Pathogenese als hilfreiches Werkzeug erwiesen hat, sollten im Rahmen dieser Arbeit verschiedene *E. coli* Stämme hinsichtlich ihres uropathogenen Virulenzpotentials bzw. der Beitrag ausgewählter bakterieller Faktoren zur Uropathogenität im Tiermodell getestet werden. Die Durchführung der Tierversuche erfolgte jeweils wie unter 3.5 beschrieben.

4.3.1 Untersuchungen zur *in vivo*-Virulenz und -Fitness von *agn43*-Deletionsmutanten des *E. coli* Stammes 536

Um weitere Erkenntnisse über eine mögliche Beteiligung von Ag43 während des *in vivo*-Infektionsprozesses zu erlangen, sollten der UPEC Wildtypstamm 536 sowie seine *agn43*-Deletionmutanten und die entsprechenden Komplementanten im Mausmodell getestet werden. Hierfür wurden zunächst die *agn43*-Deletionmutanten komplementiert.

4.3.1.1 Konstruktion der *agn43*-Komplementanten

Für die Plasmid-vermittelte Komplementation von *agn43a* bzw. *agn43b* wurde das Vektorsystem pGEN206 Δ *SpeI* genutzt, das auch ohne Antibiotikadruck stabil in den Transformanten verbleibt (Galen *et al.*, 2010). Zur Konstruktion des jeweiligen Komplementations-Plasmids erfolgte zunächst die Amplifikation von *agn43a* bzw. *agn43b* mittels PCR unter Verwendung von chromosomaler DNA aus *E. coli* Stamm 536 und den Primerpaaren *agn43*+P_*EcoRI*fw/*agn43*_NheI_rev bzw. *agn43V*+P_*EcoRI*fw/*agn43*_NheI_rev (siehe Tabelle 18 im Anhang). Die PCR-Produkte waren so angelegt, dass sie sowohl die Shine-Dalgarno-Sequenz als auch die natürliche Promotorsequenz des jeweiligen Gens enthielten. Nach Zwischenklonierung der PCR-Produkte in pGEM-T Easy wurden die Amplifikate jeweils mit Hilfe der über die Primer angefügten terminalen Restriktionsschnittstellen in den Vektor pGEN206 Δ *SpeI* ligiert. Die Richtigkeit der Konstrukte wurde mittels DNA-Sequenzanalyse bestätigt. Beide Vektorkonstrukte wurden anschließend jeweils in *E. coli* Stamm 536 Δ *agn43a* Δ *agn43b* (*E. coli* 536 DM) eingebracht.

Zudem wurde Stamm 536 DM mit dem leeren Plasmid pGEN206 Δ SpeI transformiert, um für die nachfolgenden Versuche über eine Vektorkontrolle zu verfügen. Der Übersichtlichkeit wegen erfolgte die Benennung der drei generierten Stämme wie in Tabelle 16 aufgelistet.

Tabelle 16: Übersicht und Benennung der generierten *agn43*-Komplementanten und der Vektorkontrolle.

Stamm	Beschreibung	Benennung
<i>E. coli</i> 536 DM (pGEN206- <i>agn43a</i>)	<i>E. coli</i> 536 DM komplementiert mit <i>agn43a</i>	536 DM <i>agn43a</i> ⁺
<i>E. coli</i> 536 DM (pGEN206- <i>agn43b</i>)	<i>E. coli</i> 536 DM komplementiert mit <i>agn43b</i>	536 DM <i>agn43b</i> ⁺
<i>E. coli</i> 536 DM (pGEN206 Δ SpeI)	Vektorkontrolle	536 DM pGEN206

Um zu überprüfen, ob es in den komplementierten Stämme wirklich nur zur Expression der jeweils Plasmid-kodierten *agn43*-Variante kam, wurde die *in vitro*-Expression von Ag43 mittels SDS-PAGE und Immunoblot-Analyse von Gesamtzellextrakten untersucht (siehe Abbildung 22). Die Anzucht der Bakterien für die Herstellung der Gesamtzellextrakte erfolgte sowohl in LB-Medium als auch in menschlichem Sammelurin.

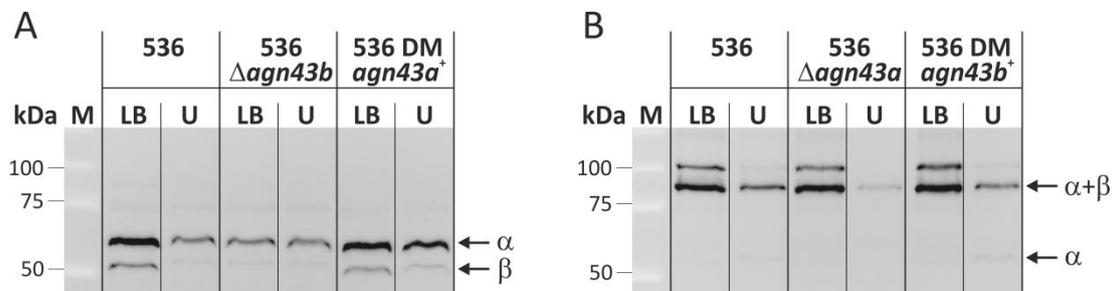


Abbildung 22: Überprüfung der *agn43*-Komplementanten mittels Western Blot-Analyse.

Immunoblot-Nachweis von (A) Ag43a in Gesamtzellextrakten von *E. coli* Stamm 536, seiner *agn43b*-Deletionsmutante und der *agn43a*-Komplementante von *E. coli* 536 DM unter Verwendung von α -Ag43a-536^α IgG und (B) Ag43b in Gesamtzellextrakten von *E. coli* Stamm 536, seiner *agn43a*-Deletionsmutante und der *agn43b*-Komplementante von *E. coli* 536 DM unter Verwendung von α -Ag43b-536^α IgG.

α : Signal der jeweiligen α -Domäne, β : Signal der β -Domäne, $\alpha+\beta$: Signal des unprozessierten Proproteins von Ag43, M: Marker, LB: Probe aus LB-Kultur, U: Probe aus Urin-Kultur.

Wie erwartet, konnte Ag43a mittels Immunodetektion nur im Gesamtzellextrakt des Wildtyps, der *agn43b*-Deletionsmutante (536 Δ *agn43b*) und der *agn43a*-Komplementante (536 DM *agn43a*⁺) nachgewiesen werden (siehe Abbildung 22A). Ag43b ließ sich für den Gesamtzellextrakt des Wildtyps, der *agn43a*-Deletionsmutante (536 Δ *agn43a*) sowie der *agn43b*-Komplementante (536 DM *agn43b*⁺) detektieren (siehe Abbildung 22B). Interessanterweise zeigte die *agn43a*-Komplementante bei Wachstum in Urin eine stärkere Ag43a-Expression als der wildtypische Stamm oder die *agn43b*-Deletionsmutante. Dieser Effekt konnte für Ag43b und die entsprechende komplementierte Mutante jedoch nicht beobachtet werden.

4.3.1.2 Untersuchung der *in vivo*-Virulenz und -Fitness der *agn43*-Deletionsmutanten und komplementierten Mutanten

Zur Untersuchung der *in vivo*-Virulenz und -Fitness der ausgewählten Stämme wurde der Tierversuch wie unter 3.5 beschrieben durchgeführt. Als apathogene Negativkontrolle diente der *E. coli* K-12 Stamm MG1655. Die Bestimmung der bakteriellen Belastung der Organe pro Gramm Gewebe erfolgte 48 h nach der Infektion (siehe Abbildung 23).

Für den wildtypischen UPEC Stamm 536 sowie seine Derivate konnte aus dem Blasengewebe der Mäuse jeweils nahezu die gleiche Anzahl an Bakterien (1×10^5 - 1×10^6 CFU/g) isoliert werden. Die bakterielle Belastung des Blasengewebes war in allen sieben Fällen signifikant höher ($p < 0,05$) als nach Infektion mit dem apathogenen Kontrollstamm MG1655. Die Untersuchung des Nierengewebes ergab, dass es nur dem komplementierten Stamm 536 DM *agn43a*⁺ möglich war, die Nieren so effizient zu kolonisieren wie der Wildtyp. Die bakterielle Belastung des Nierengewebes durch 536 DM *agn43a*⁺ war zudem signifikant höher als durch *E. coli* 536 DM. Für die Stämme 536 Δ *agn43a* und 536 DM ließ sich eine deutliche, aber nicht signifikante Tendenz zur Nierenkolonisation feststellen. Alle anderen 536-Derivate waren wie der apathogene Kontrollstamm MG1655 nicht in der Lage, über die Harnleiter in die Nieren aufzusteigen.

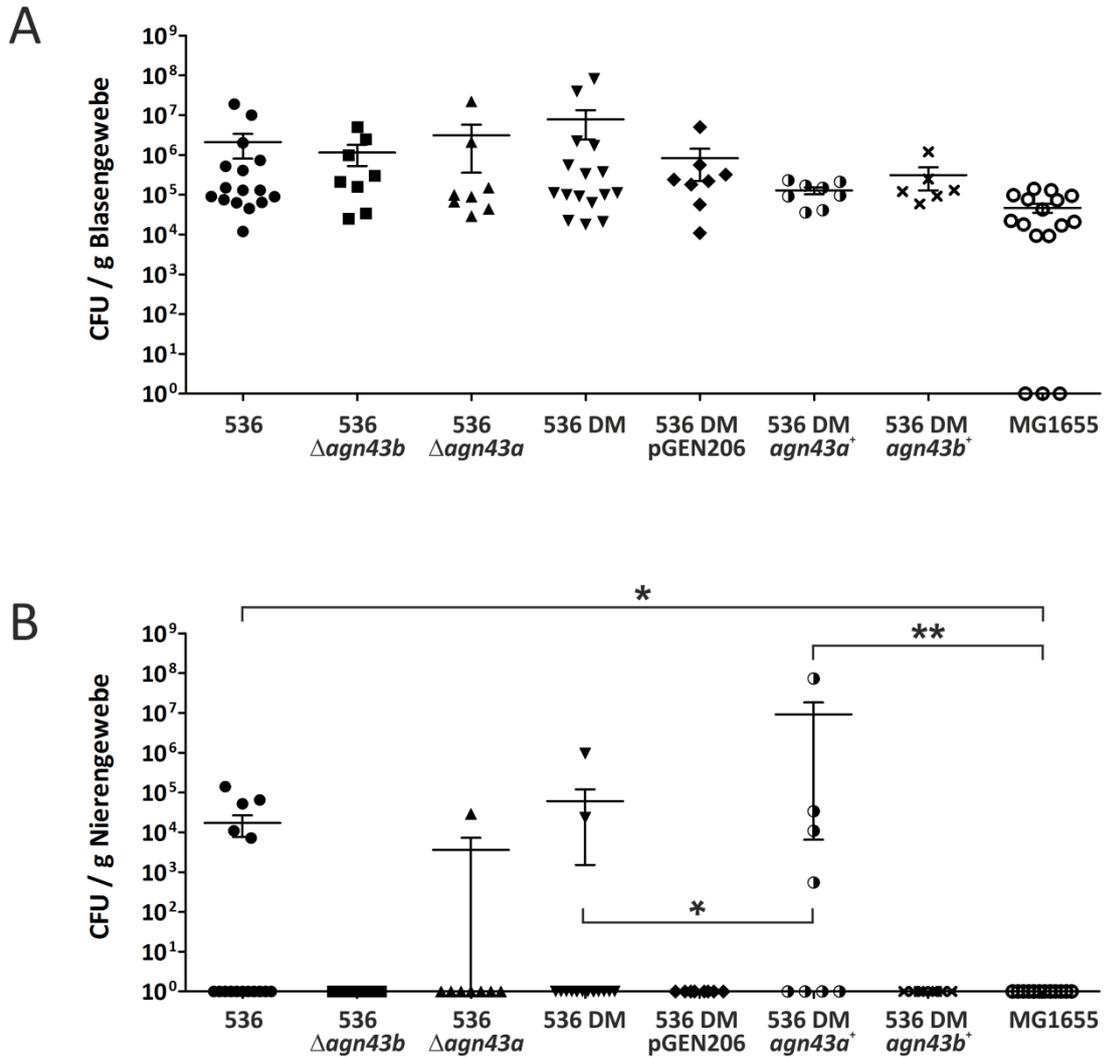


Abbildung 23: Virulenz des *E. coli* Stammes 536 und seiner *agn43*-Derivate im experimentellen Mausmodell der aufsteigenden HWI.

Die Bestimmung des Kolonisierungsgrads von Blasen- (A) und Nierengewebe (B) erfolgte 48 h nach der transurethralen Inokulation. Die horizontalen Linien repräsentieren die mittlere Anzahl der CFU eines jeden Stammes pro Gramm Gewebe, die Fehlerbalken zeigen die jeweiligen Abweichungen vom Mittelwert in \pm SEM. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) in der bakteriellen Belastung der Organe im Vergleich zur Negativkontrolle wurden mittels Mann-Whitney-U-Test bestimmt und sind durch Sternchen (*) gekennzeichnet. Da die bakterielle Belastung des Blasengewebes in allen sieben Fällen signifikant höher war als nach Infektion mit dem apathogenen Kontrollstamm MG1655, wurde der Übersichtlichkeit wegen auf das Einzeichnen der Signifikanzbalken in (A) verzichtet.

4.3.2 Untersuchung der *in vivo*-Virulenz und -Fitness von *uvrY*-Komplementanten des *E. coli* Stammes 536

Von Palaniyandi *et al.* (2012) wurde der Einfluss des Zwei-Komponenten-Systems BarA/UvrY auf die Virulenzeigenschaften des UPEC Stammes CFT073 untersucht. Es zeigte sich dabei, dass Mutationen in *barA* und/oder *uvrY* zu einer signifikanten Abnahme der Virulenz des Stammes CFT073 im murinen HWI-Modell führten.

Da es sich bei dem UPEC Stamm 536 um eine natürliche *uvrY*-Deletionsmutante handelt (Brzuszkiewicz *et al.*, 2006), sollte untersucht werden, ob die Komplementation von *uvrY* eine Veränderung der Virulenzeigenschaft des Bakterienstammes im murinen HWI-Modell zur Folge hat. Für die *uvrY*-Komplementante *E. coli* 536::*uvrY* ist bekannt, dass sie in HeLa-Zellen den zytopathische Effekt induziert, der für Colibactin-produzierende Bakterien charakteristisch ist (Homburg, 2007). Aus diesem Grund wurde zusätzlich eine Colibactin-negative *uvrY*-Komplementante (*E. coli* 536 Δ *clbA*::*uvrY*) in die Untersuchung miteinbezogen, um unterscheiden zu können, ob mögliche Veränderungen im Virulenzverhalten von *E. coli* 536::*uvrY* auf Colibactin rückführbar sind.

Zur Untersuchung der *in vivo*-Virulenz und -Fitness wurde der Tierversuch wie unter 3.5 beschrieben durchgeführt. Als apathogene Negativkontrolle diente der *E. coli* K-12 Stamm MG1655. Die Bestimmung der bakteriellen Belastung der Organe pro Gramm Gewebe erfolgte 48 h nach der Infektion (siehe Abbildung 24).

Für die Colibactin-positive *uvrY*-Komplementante konnte im Vergleich zum wildtypischen UPEC Stamm 536 eine signifikant geringere Bakterienlast des Blasengewebes festgestellt werden. Der Kolonisierungsgrad entsprach hier eher dem des apathogenen Kontrollstammes *E. coli* MG1655. Die Colibactin-negative *uvrY*-Komplementante zeigte dagegen bezüglich der bakteriellen Belastung der Blase keinen Unterschied zum Wildtyp. Nach Infektion mit der Colibactin-negativen *uvrY*-Komplementante ließ sich nur bei einem der acht Versuchstiere eine bakterielle Belastung des Nierengewebes nachweisen, was als leichte Tendenz zur Fähigkeit, die Nieren zu kolonisieren, gewertet werden kann. Aufgrund der geringen Gruppengröße ist jedoch das Treffen einer eindeutigen Aussage nicht möglich. Für die Colibactin-positive *uvrY*-Komplementante war eine Kolonisierung des Nierengewebes nicht nachweisbar.

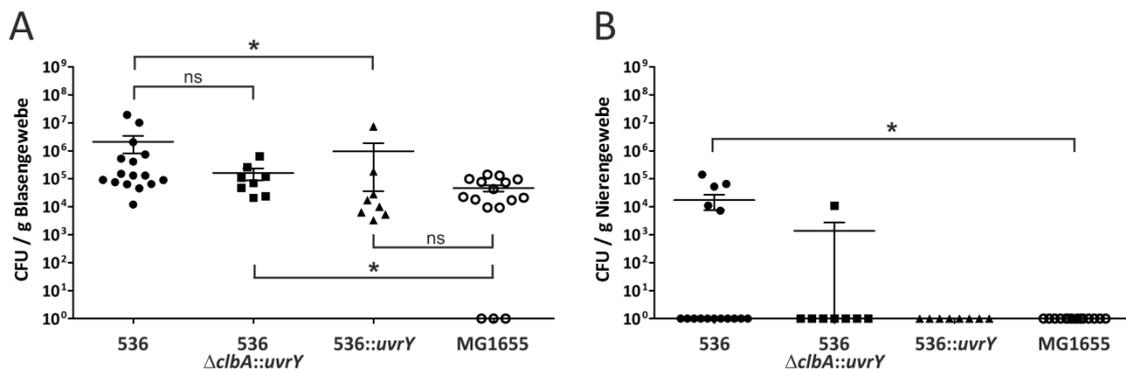


Abbildung 24: Virulenz des *E. coli* Stammes 536 und der beiden *uvrY*-Komplementanten im experimentellen Mausmodell der aufsteigenden HWI.

Die Bestimmung des Kolonisierungsgrads von Blasen- (A) und Nierengewebe (B) erfolgte 48 h nach der transurethralen Inokulation. Die horizontalen Linien repräsentieren die mittlere Anzahl der CFU eines jeden Stammes pro Gramm Gewebe, die Fehlerbalken zeigen die jeweiligen Abweichungen vom Mittelwert in \pm SEM. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) in der bakteriellen Belastung der Organe im Vergleich zu den Kontrollstämmen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test bestimmt und sind durch Sternchen (*) gekennzeichnet.

4.3.3 Untersuchungen zur *in vivo*-Virulenz und -Persistenz einer *pgaABCD*-Deletionsmutante des UPEC Stammes UTI89

Mikrobiologische Studien der letzten Jahre deuten auf einen Zusammenhang zwischen HWI und von UPEC gebildeten, intrazellulären biofilmartigen Strukturen in der Blase hin (z.B. Anderson *et al.*, 2003; Kau *et al.*, 2005). Es wird vermutet, dass UPEC-Bakterien über die Typ 1-Fimbrien-vermittelte Adhäsion in die Epithelzellen der Blase einzudringen, sich im Zytoplasma dieser Zellen rasant vermehren und in Folge dessen intrazelluläre Biofilmstrukturen („*intracellular bacterial communities*“ (ICBs); Mulvey *et al.*, 2001) bilden. Die ICBs schützen die Bakterien sowohl vor der Immunantwort des Wirts als auch vor einer möglichen Antibiotikaeinwirkung und tragen zur Etablierung einer akuten HWI bei (Anderson *et al.*, 2003, Rosen *et al.*, 2007; Hannan *et al.*, 2012). Untersuchungen der *in vitro*-Biofilmbildung von *E. coli* K-12 Stämmen identifizierten das Exopolysaccharid poly- β -1,6-N-Acetylglucosamin (poly-GlcNac oder PGA) als eine der Biofilm-Hauptstrukturkomponenten; das *pgaACBD*-Operon kodiert dabei für die entsprechende Synthese-Einheit (Romeo *et al.*, 1993). PGA (bzw. seine jeweiligen Homologe) konnte bereits bei einer Vielzahl pathogener Bakterien wie *Staphylococcus* spp. oder *Yersinia*

pestis als Virulenzfaktor beschrieben werden, da es bei diesen Bakterien z.B. zum Überleben im Wirtsorganismus beiträgt (O'Gara, 2007; Bobrov *et al.*, 2008).

Um zu untersuchen, ob PGA auch im Infektionsprozess uropathogener Bakterien eine mögliche Rolle zukommt, sollten nachfolgend Virulenz und Persistenz einer PGA-Deletionsmutante des UPEC Stammes UTI89 (*E. coli* UTI89 Δ *pgaA-D*) im Mausmodell der experimentellen HWI getestet werden. Die Untersuchung wurde wie unter 3.5 beschrieben durchgeführt. Als uropathogene Positivkontrolle diente der UPEC Stamm UTI89. Als Negativkontrolle wurde eine *fimA-H*-Deletionsmutante von UTI89 verwendet, die aufgrund des Fehlens der Typ 1-Fimbrien nicht zur effizienten Blasenkolonisierung befähigt ist (Kau *et al.*, 2005). Die Bestimmung der bakteriellen Belastung der Blase pro Gramm Gewebe erfolgte für die Zeitpunkte 24, 48 und 72 h sowie eine, zwei und drei Wochen nach Infektion (siehe Abbildung 25).

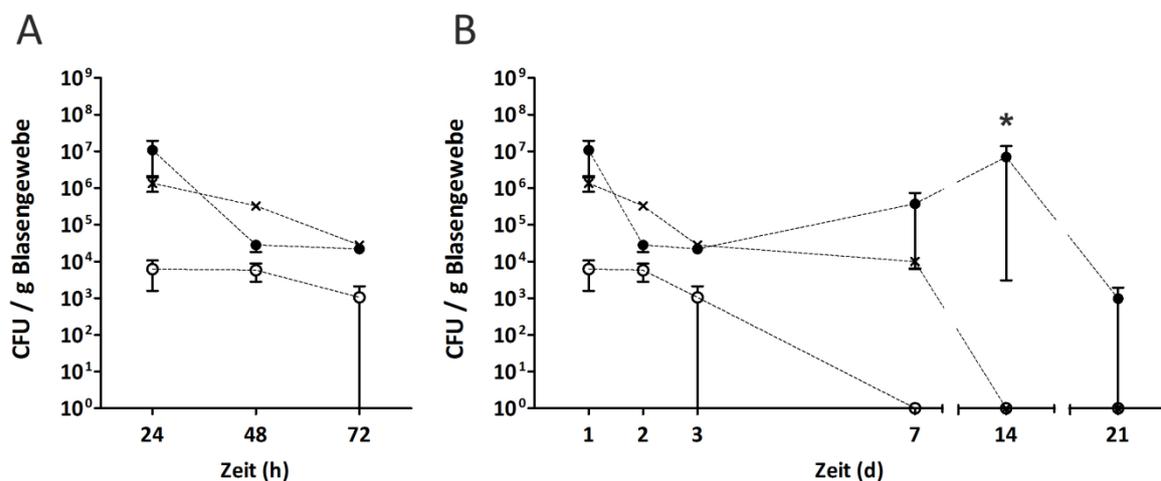


Abbildung 25: Virulenz und Persistenz der PGA-Deletionsmutante des UPEC Stammes UTI89 im experimentellen Mausmodell der aufsteigenden HWI.

(A) Drei-Tage-Kinetik der bakteriellen Belastung des Blasengewebes der Versuchstiere nach transurethraler Inokulation mit UTI89 (●), UTI89 Δ *pgaA-D* (×) und UTI89 Δ *fimA-H* (○). Die Bestimmung des Kolonisierungsgrads erfolgte 24, 48 und 72 h nach Infektion.

(B) Drei-Wochen-Kinetik der bakteriellen Belastung des Blasengewebes der Versuchstiere nach transurethraler Inokulation mit UTI89 (●), UTI89 Δ *pgaA-D* (×) und UTI89 Δ *fimA-H* (○). Die Bestimmung des Kolonisierungsgrads erfolgte eine, zwei und drei Wochen nach Infektion.

Die Daten repräsentieren die mittlere Anzahl der CFU eines jeden Stammes pro Gramm Blasengewebe. Die Fehlerbalken zeigen die jeweiligen Abweichungen vom Mittelwert in \pm SEM. Die verbindenden Linien sind nicht als kontinuierliche Funktion zu deuten. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) in der bakteriellen Belastung der Organe zwischen UTI89 und UTI89 Δ *pgaA-D* wurden mittels Mann-Whitney-U-Test bestimmt und sind durch Sternchen (*) gekennzeichnet.

Während des Kurzzeit-Infektionsversuchs über drei Tage war für die PGA-Deletionsmutante im Vergleich zum wildtypischen UPEC Stamm UTI89 kein signifikanter Unterschied in der bakteriellen Belastung des Blasengewebes feststellbar. Die Infektion mit der Typ 1-Fimbrien-negativen UTI89-Mutante führte dagegen im Vergleich zum Wildtyp zu einem eine bis zwei Log-Stufen niedrigeren Kolonisierungsgrad der Blase.

Um zu testen, ob die PGA-Expression von *E. coli* UTI89 eine Auswirkung auf die längerfristige Besiedlung der Blase hat, wurde die bakterielle Belastung des Blasengewebes nach transurethraler Inokulation mit den drei Stämmen über einen Zeitraum von drei Wochen beobachtet. Am ersten Tag nach der Infektion konnte für den wildtypischen UPEC Stamm UTI89 sowie seine PGA-Deletionmutante eine hohe Anzahl an Bakterien (1×10^6 - 1×10^7 CFU/g) aus dem Blasengewebe der Versuchstiere isoliert werden. Während der nächsten zwei Tage verringerte sich in beiden Fällen die bakterielle Organlast um durchschnittlich zwei Log-Einheiten. Diese Reduktion der bakteriellen Titer korreliert mit der aktivierten Wirtsabwehr als Reaktion auf die Infektion (Mulvey *et al.*, 2000). Von Tag 3 bis Tag 14 ließ sich für *E. coli* Stamm UTI89 ein Anstieg der bakteriellen Belastung verzeichnen. Die Bakterien des Wildtyps konnten über diesen Zeitraum konstant in der Blase der Versuchstiere mit durchschnittlich 5×10^4 - 5×10^5 CFU/g Gewebe nachgewiesen werden. Während der dritten Woche nach der Infektion war für *E. coli* UTI89 ein Rückgang der bakteriellen Organlast feststellbar, sie lag jedoch mit ca. 2×10^3 CFU/g Blasengewebe weiterhin im detektierbaren Bereich. Im Gegensatz dazu stagnierte die bakterielle Zellzahl im Blasengewebe der PGA-Deletionsmutante während der ersten Woche nach der Infektion bei 1×10^4 CFU/g Gewebe und verringerte sich in den nachfolgenden Tagen signifikant. Für die zweite und dritte Woche nach der Infektion konnte für *E. coli* UTI89 $\Delta pgaA-D$ keine Kolonisierung der Blase mehr nachgewiesen werden. Die bakterielle Belastung der Blase durch die Negativkontrolle *E. coli* UTI89 $\Delta fimA-H$ ging während der ersten Woche nach der Infektion auf 0 zurück. Bakterien dieses Stammes waren von diesem Zeitpunkt an bis zum Ende des Versuchs nicht mehr detektierbar.

Im Kurzzeit-Infektionsversuch konnte für die PGA-Deletion in *E. coli* UTI89 kein Einfluss auf die Fähigkeit der Bakterien zur Blasenkolonisation festgestellt werden. Die Ergebnisse der murinen experimentellen HWI über einen Zeitraum von drei Wochen deuten jedoch

darauf hin, dass PGA zum längerfristigen Überleben von *E. coli* UTI89 im Wirtsorganismus notwendig ist und somit zur Persistenz beiträgt.

4.3.4 Untersuchung der *in vivo*-Virulenz und -Fitness von atypischen UPEC-Isolaten

Nosokomiale Infektionen führen zu einem Großteil der in Krankenhäusern auftretenden Komplikationen und haben einen signifikanten Einfluss auf die Qualität und Kosten der medizinischen Versorgung von Patienten. Bei den häufigsten nosokomialen Infektionen handelt es sich um HWI (Gastmeier *et al.*, 1998). Erst kürzlich zeigten Toval *et al.* (2014), dass Krankenhaus-assoziierte HWI nicht nur durch klassische UPEC Stämme ausgelöst werden können, die die Hauptursache für in der Umwelt erworbene HWI darstellen, sondern häufig auch durch *E. coli* Stämme, deren genetischer Hintergrund sich von dem typischer UPEC-Varianten unterscheidet. In der Studie von Toval *et al.* wurden 265 *E. coli* Isolate von Krankenhauspatienten mit symptomatischer Harnwegsinfektion analysiert. Für 28 der Isolate ließen sich typische IPEC-Virulenzmarker nachweisen: es konnten Shiga Toxin-produzierende *E. coli* (STEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC) und atypische enteropathogene *E. coli* (aEPEC) gefunden werden. Diese 28 Isolate wurden daraufhin als atypische UPEC (aUPEC) bezeichnet.

Nachfolgend wurde die Virulenzeigenschaft vier ausgewählter aUPEC-Isolate im Mausmodell der experimentellen HWI untersucht. Die verwendeten Isolate sowie ausgewählte Charakteristika sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Tabelle 17: Beschreibung der in der Arbeit näher untersuchten aUPEC-Isolate. Nach Toval *et al.*, 2014.

Isolat	Serotyp	Phylo- gruppe	Diagnose	IPEC-Marker	IPEC- Pathotyp
UR131	O76:H19	B1	hämorrhagische Zystitis (Katheter <48 h)	LEE ⁻ , <i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>saa</i> , EHEC- <i>hly</i>	STEC
UR5703/202	O145:H-	E	Zystitis	LEE ⁺ , <i>cif</i> , <i>stx2</i> , EHEC- <i>hly</i>	STEC
UR5779/201	Ont:H-	A	Zystitis	LEE ⁺ , <i>stx2</i> , EHEC- <i>hly</i>	STEC
UR1352	O15:H-	A	Zystitis	<i>pic</i> , <i>aggR</i> , <i>aap</i> , pCVD432, <i>aaf5</i>	EAEC

(LEE: „locus of enterocyte effacement“-Pathogenitätsinsel, *stx*: Shiga Toxin, *saa*: „STEC autoagglutinating adhesion“, EHEC-*hly*: EHEC-Hämolyisin, *cif*: „cycle-inhibiting factor“, *pic*: „protein involved in intestinal colonization“, *aggR*: „transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I“, *aap*: „dispersin-encoding gene“, pCVD432: „aggregative adherence plasmid“, *aaf5*: „aggregative adherence fimbriae V“)

Zur Untersuchung der *in vivo*-Virulenz und -Fitness der ausgewählten Stämme wurde der Tierversuch wie unter 3.5 beschrieben durchgeführt. Als urovirulente Positivkontrolle diente der UPEC Stamm 536, als apathogene Negativkontrolle der *E. coli* K-12 Stamm MG1655. Die Bestimmung der bakteriellen Belastung der Organe pro Gramm Gewebe erfolgte 48 h nach der Infektion (siehe Abbildung 26).

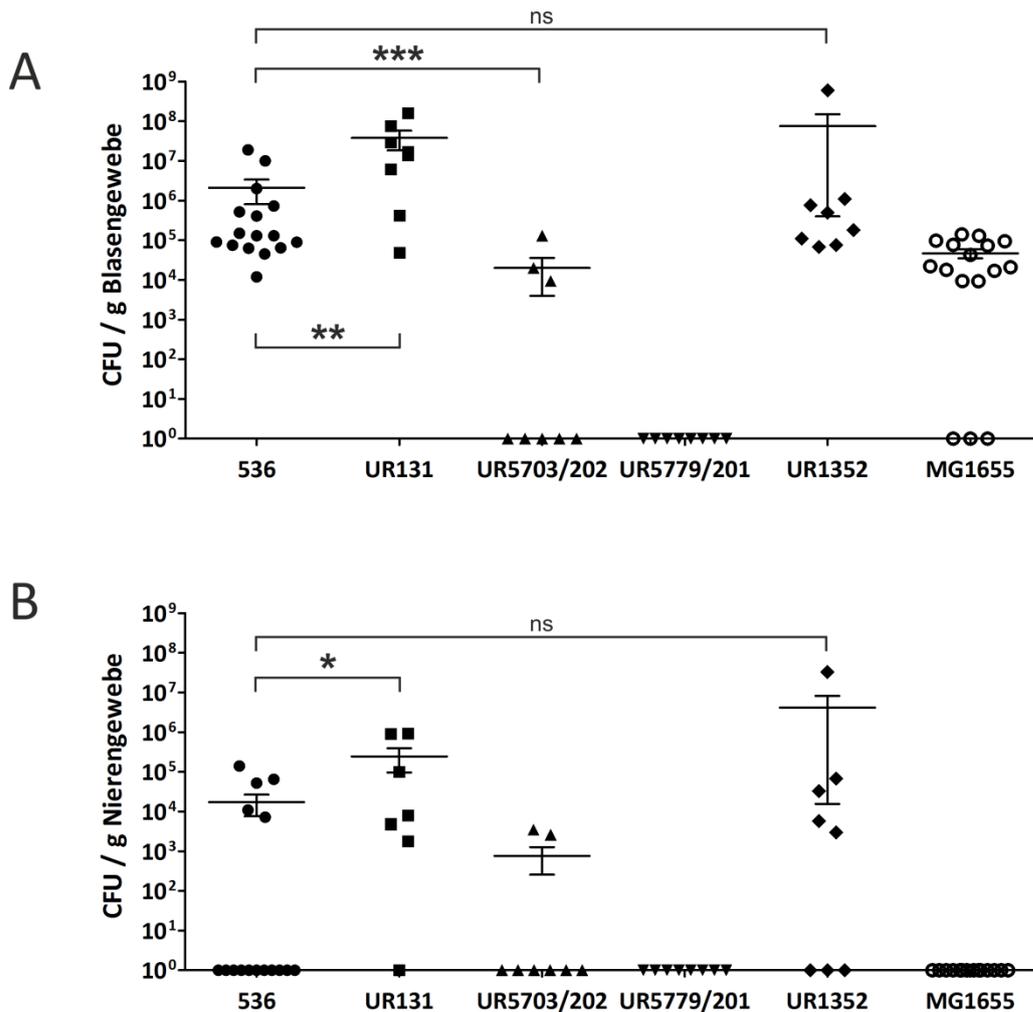


Abbildung 26: Virulenz der aUPEC-Isolate im experimentellen Mausmodell der aufsteigenden HWI.

Die Bestimmung des Kolonisierungsgrads von Blasen- (A) und Nierengewebe (B) erfolgte 48 h nach der transurethralen Inokulation. Die horizontalen Linien repräsentieren die mittlere Anzahl der CFU eines jeden Stammes pro Gramm Gewebe, die Fehlerbalken zeigen die jeweiligen Abweichungen vom Mittelwert in \pm SEM. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) in der bakteriellen Belastung der Organe im Vergleich zu den Kontrollstämmen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test bestimmt und sind durch Sternchen (*) gekennzeichnet.

Für das STEC-Isolat UR131 war im Vergleich zum UPEC Isolat 536 eine signifikant höhere bakterielle Belastung von sowohl Blasen- als auch Nierengewebe der Versuchstiere feststellbar. Die Anzahl an Bakterien, die für das STEC-Isolat UR5703/202 aus dem Blasengewebe isoliert werden konnte, war dagegen signifikant niedriger als die des Wildtyps. Eine Kolonisierung der Nieren durch UR5703/202 ließ sich bei zwei von acht Versuchstieren beobachten. Für das STEC-Isolat UR5779/201 konnte weder eine Kolonisierung der Blase noch der Nieren nachgewiesen werden. Das EAEC-Isolat UR1352 zeigte bezüglich der bakteriellen Belastung von Blase und Nieren keinen signifikanten Unterschied zum Wildtypstamm 536. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Fähigkeit, eine HWI auszulösen, in die Nieren aufzusteigen und diese zu kolonisieren, nicht auf klassische UPEC-Isolate beschränkt ist.

4.3.5 Untersuchung der *in vivo*-Virulenz und -Fitness von STEC O2:H6-Isolaten

Shiga Toxin-produzierende *E. coli* (STEC) stellen eine wichtige Gruppe der intestinal-pathogenen *E. coli* dar und können Durchfall, enterohämorrhagische Colitis und das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) hervorrufen (Kaper *et al.*, 2004; Croxen *et al.*, 2013). Bei *E. coli* O157:H7 handelt es sich um den weltweit am häufigsten identifizierten humanpathogenen STEC-Serotyp (Karch *et al.*, 2005). Inzwischen konnte jedoch auch eine Vielzahl von nicht-O157:H7 STEC-Serotypen aus Patienten isoliert werden (Karch *et al.*, 2005; Mellmann *et al.*, 2008; Bielaszewska *et al.*, 2013), die aufgrund paralleler Evolution einen ähnlichen Satz an Virulenzgenen aufweisen (Ogura *et al.*, 2009).

Für 13 STEC-Isolate des Serotyps O2:H6, die aus Patienten mit Durchfall isoliert wurden, zeigten Bielaszewska *et al.* (2014) mittels MLST- und rMLST-Untersuchung, dass STEC O2:H6 phylogenetisch zwischen HUSEC und ExPEC Stämmen (hier UPEC und MNEC Stämme) positioniert ist. In der Studie konnte STEC O2:H6 zudem ein heteropathogenes klinisches Potential nachgewiesen werden, da die Isolate sowohl STEC- als auch UPEC-assoziierte Virulenzfaktoren exprimieren.

Nachfolgend wurde die Virulenzeigenschaft von drei STEC O2:H6-Isolaten (Stämme 03-08304, 04-00955 und 05-00787) im Mausmodell der experimentellen HWI (wie unter 3.5 beschrieben) untersucht. Als uropathogene Positivkontrolle diente der UPEC Stamm 536, als apathogene Negativkontrolle der *E. coli* K-12 Stamm MG1655. Die Bestimmung

der bakteriellen Belastung der Organe pro Gramm Gewebe erfolgte 48 h nach der Infektion (siehe Abbildung 27).

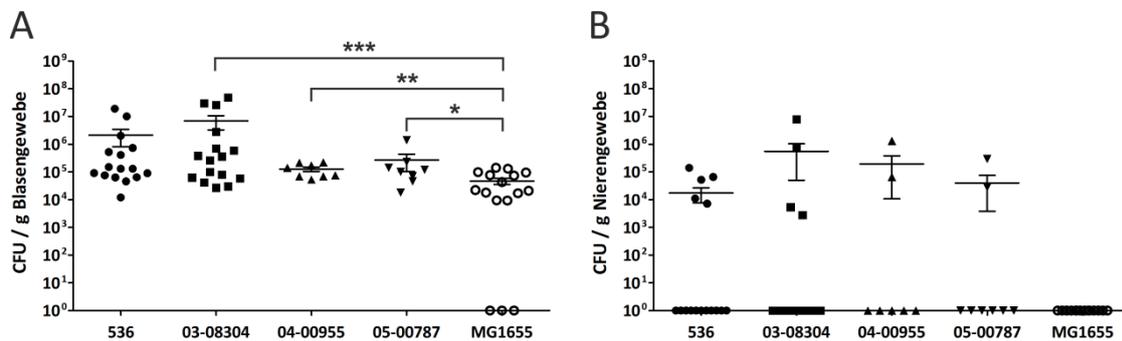


Abbildung 27: Virulenz von drei STEC O2:H6-Isolaten im experimentellen Mausmodell der aufsteigenden HWI.

Die Bestimmung des Kolonisierungsgrads von Blasen- (A) und Nierengewebe (B) erfolgte 48 h nach der transurethralen Inokulation. Die horizontalen Linien repräsentieren die mittlere Anzahl der CFU eines jeden Stammes pro Gramm Gewebe, die Fehlerbalken zeigen die jeweiligen Abweichungen vom Mittelwert in \pm SEM. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) in der bakteriellen Belastung der Organe im Vergleich zu den Kontrollstämmen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test bestimmt und sind durch Sternchen (*) gekennzeichnet.

Für das STEC O2:H6-Isolat 03-08304 konnte aus dem Blasen- und Nierengewebe der Versuchstiere nahezu die gleiche Anzahl an Bakterien (ca. 1×10^6 CFU/g) isoliert werden wie für den UPEC Stamm 536. Die Blasenkolonisierung durch die STEC O2:H6 Stämme 04-00955 und 05-00787 resultierte in einer ca. zehnfach geringeren bakteriellen Organlast. Nichtsdestotrotz war die Bakterienkonzentration im Blasen- und Nierengewebe bei allen drei STEC-Isolaten signifikant höher als nach Infektion mit dem apathogenen *E. coli* K-12 Stamm MG1655. Zusätzlich waren alle drei STEC O2:H6-Isolate in der Lage, die Nieren so effizient wie der UPEC Stamm 536 zu kolonisieren. Das Ergebnis zeigt, dass die STEC O2:H6-Isolate zumindest in diesem Modell ein mit dem des UPEC Modellstammes 536 vergleichbares uropathogenes Virulenzpotential besitzen und bestätigte somit den heteropathogenen Charakter von STEC O2:H6.

5 Diskussion

Genomvergleichende Studien der letzten Jahre offenbarten eine große genetische Variabilität uropathogener *E. coli* Stämme (Brzuszkiewicz *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2006; Abraham *et al.*, 2011). Sie bestätigten die Beobachtung, dass für UPEC kein einheitlicher Virulenzmechanismus beschrieben werden kann, sondern dass die Fähigkeit zum Auslösen einer HWI auf der Expression verschiedener, manchmal stammspezifischer Kombinationen von Virulenz- und Fitness-assoziierten Genen beruht. Aus diesem Grund war die Untersuchung ausgewählter bakterieller Faktoren bzw. verschiedener *E. coli* Stämme hinsichtlich ihres uropathogenen Virulenzpotentials das Ziel der vorliegenden Arbeit. Sie umfasste die Charakterisierung der natürlichen Glykosylierung des Autotransporterproteins Ag43, das in seiner Funktion als Adhäsion und Autoaggregation-vermittelnder Faktor einen Beitrag zur Virulenz des uropathogenen *E. coli* Stammes 536 leistet. Daran anknüpfend wurde das Genom von *E. coli* Stamm 536 auf mögliche Ag43-spezifische Glykosyltransferase-kodierende „*open reading frames*“ hin untersucht. Abschließend erfolgte die Analyse des uropathogenen Virulenzpotentials verschiedener *E. coli* Stämme bzw. ausgewählter bakterieller Faktoren im experimentellen Mausmodell der aufsteigenden HWI.

5.1 Untersuchung der natürlichen Glykosylierung von Ag43 in *E. coli* Stamm 536

5.1.1 Expression und Isolation von rekombinantem Ag43a und Ag43b

Voraussetzung für die Untersuchung der natürlichen Glykosylierung beider Ag43-Varianten aus *E. coli* Stamm 536 war es, über ausreichende Mengen an Protein zu verfügen. Hierfür sollten Ag43a und Ag43b vorab unter Verwendung eines bakteriellen Überexpressionsvektors in den drei verschiedenen Stämmen *E. coli* 536 DM, *E. coli* 536 rDM und *E. coli* MG1655 $\Delta fim \Delta flu$ exprimiert und angereichert werden. Mittels

Überexpression konnte in jedem Bakterienstamm eine verstärkte Ag43-Synthese erreicht werden; es zeigte sich jedoch, dass die Autotransporter-typische Translokation über die Zellmembranen sowie die autokatalytische Spaltung der überexprimierten Proteine, wenn überhaupt, nur unvollständig stattfand. Als Ursache für diese Beobachtung ließ sich die Akkumulation der angereicherten Autotransporter in den Bakterienzellen in Form unlöslicher „*inclusion bodies*“ identifizieren. Die Überexpression rekombinanter Proteine in *E. coli* führt häufig zur Bildung von „*inclusion bodies*“, in denen das überexprimierte Protein in unlöslicher, zumeist fehlerhaft oder unvollständig gefalteter Form vorliegt (Lilie *et al.*, 1998). Zwar ist es möglich, die Proteine nachfolgend mit Hilfe starker Denaturierungsmittel zu solubilisieren und aufzureinigen, es ist jedoch nicht auszuschließen, dass sich die hochdenaturierenden Bedingungen der Solubilisierung negativ auf z.B. den Glykosylierungsstatus eines Proteins auswirken. Da das Ziel der Untersuchung die Charakterisierung der natürlichen Glykosylierung von Ag43 war, stellte sich zudem die Frage, ob der natürliche Glykosylierungsprozess im Zytoplasma durch die fehlerhafte bzw. unvollständige Faltung der überexprimierten Proteine überhaupt stattfinden konnte. Eine alternative Methode zur Expression von rekombinantem Ag43 ergab sich durch die uninduzierte Basalaktivität des *tetA*-Promoters der Vektorkonstrukte (Terpe, 2006), die zwar sehr gering war, bei entsprechend erhöhtem Volumen der Ausgangskulturen jedoch die Gewinnung ausreichender Ag43-Proteinmenge in jedem Stammhintergrund ermöglichte (siehe Abbildung 9).

5.1.2 Untersuchungen zum Glykosylierungsstatus von Ag43a und Ag43b

Nachdem mittels Immunodetektion gezeigt worden war, dass es sich bei den isolierten Proteinen um die gewünschten zwei Ag43-Varianten Ag43a und Ag43b handelte und sich diese erfolgreich in den drei verschiedenen Stammhintergründen exprimieren ließen, wurde der Glykosylierungsstatus der sechs Proteinproben untersucht. Hierbei diente die Analyse mit Hilfe kommerzieller Glykoprotein-Detektionskits allein dem Nachweis der Proteinglykosylierung, die massenspektrometrische Untersuchung sollte zusätzlich die entsprechenden Glykosylierungsstellen in den Proteinen identifizieren.

5.1.2.1 Nachweis der Proteinglykosylierung mit Hilfe kommerzieller Glykoprotein-Detektionskits

In bisher veröffentlichten Studien, die die Glykosylierung von Ag43 zum Untersuchungsgegenstand hatten, war zur Bestimmung des Glykosylierungsstatus der Proteine das DIG Glycan Detection Kit von Roche verwendet worden (Sherlock *et al.*, 2006; Reidl *et al.*, 2009). Aus diesem Grund wurde auch in der vorliegenden Arbeit der Glykosylierungsstatus der zu testenden sechs Ag43-Proben zunächst mit dem DIG Glycan Detection Kit untersucht. Hierbei konnte für Ag43a isoliert aus *E. coli* 536 DM ein deutliches Signal detektiert werden, das zwar weniger stark ausfiel als das der Positivkontrollen, aber auf Glykosylierung hindeutete (Abbildung 10B). Im *rfaH*-negativen Hintergrund des Stammes 536 DM sowie in Proben isoliert aus *E. coli* MG1655 $\Delta fim \Delta flu$ waren dagegen nur sehr schwach gefärbte Proteinbanden für Ag43a nachweisbar (Abbildung 10B). Des Weiteren ließen sich deutlich, aber schwächer gefärbte Banden für die Ag43b-Proben isoliert aus *E. coli* 536 rDM und MG1655 $\Delta fim \Delta flu$ feststellen (Abbildung 10B). Da schwache Signale laut Herstellerangaben auch das Ergebnis unspezifischer Artefaktfärbung sein konnten, war eine eindeutige Interpretation der Ergebnisse nicht möglich. Dieser Umstand wurde durch die Tatsache verstärkt, dass das Kit von der Herstellerfirma vom Markt genommen wurde infolge zusätzlich auftretender unspezifischer Färbung der unglykosylierten Negativkontrolle. Somit konnte das Ergebnis dieser Analyse nur unter Vorbehalt betrachtet werden und wurde für die nachfolgende Diskussion nicht miteinbezogen.

Das als Alternative gewählte Glycopro Kit von Sigma, dessen Detektionssystem auf der „Periodic acid-Schiff reaction“ (PAS)-Methode basiert (Jay *et al.*, 1990), stellte sich für die Untersuchung des Glykosylierungsstatus der Ag43-Varianten als nicht sensitiv genug heraus. Da der Nachweisbereich des Kits 25-100 ng Kohlenhydrat betrug, ließ sich zumindest ableiten, dass der Zuckergehalt in der jeweils eingesetzten Menge der Ag43-Proben - wenn überhaupt vorhanden - unter 25 ng liegen musste. Das intensive Signal der Positivkontrolle AIDA-I deutete indes darauf hin, dass in der eingesetzten AIDA-I-Probe eine größere Menge gebundener Kohlenhydratgruppen vorhanden war. Da für die Untersuchung von allen Proben gleiche Proteinmengen eingesetzt worden waren, war dies ein erster Hinweis darauf, dass sich Ag43 hinsichtlich des natürlichen Glykosylierungsstatus deutlich von AIDA-I unterscheidet.

Die Untersuchung wurde mit dem sensitiveren GlycoProfile III Kit von Sigma wiederholt, dessen Nachweisbereich bei 5-25 ng Kohlenhydrat liegt. Hierbei war für Ag43a isoliert aus *E. coli* 536 rDM eine Bande detektierbar, die in ihrer Signalstärke fast der der Positivkontrolle entsprach (Abbildung 11B), wodurch der Zuckergehalt der eingesetzten Probe auf etwas weniger als 25 ng Kohlenhydrat geschätzt werden konnte. Für beide Ag43-Varianten isoliert aus *E. coli* 536 DM ließen sich Banden feststellen, die in ihrer Intensität schwächer als die Positivkontrolle, jedoch stärker als die unglykosylierte Negativkontrolle waren (Abbildung 11B). Somit musste die gebundene Kohlenhydratmenge in beiden Proben deutlich unter 25 ng liegen. Trotzdem schienen sowohl Ag43a als auch Ag43b im Stammhintergrund *E. coli* 536 DM, wenn auch nur geringfügig, posttranslational glykosyliert zu werden. Für die Ag43-Varianten isoliert aus MG1655 $\Delta fim \Delta flu$ war keine posttranslationale Glykosylierung feststellbar. Das für AIDA-I detektierbare, übermäßig starke Signal ließ darauf schließen, dass der Zuckergehalt der eingesetzten Probe außerhalb optimalen Nachweisbereiches des verwendeten Kits lag. Dies bekräftigte die Hypothese, dass es sich bei AIDA-I um ein stark glykosyliertes Protein handelt, dessen natürlicher Glykosylierungsstatus deutlich von dem des Autotransporters Ag43 abweicht.

Die Untersuchung bestätigte die Angaben aus der Literatur dahingehend, dass Ag43 im wildtypischen *E. coli* Stamm 536 natürlich glykosyliert werden kann, bei Expression im *E. coli* K-12 Hintergrund jedoch keine natürliche Glykosylierung aufweist (Sherlock *et al.*, 2006). Während Sherlock *et al.* in ihrer Studie nur über die natürliche Glykosylierung von Ag43a berichteten, lieferten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit Hinweise darauf, dass beide Ag43-Varianten im Stammhintergrund *E. coli* 536 DM posttranslational glykosyliert werden, wenn auch nur in geringem Maße. Interessanter Weise führte die Expression der beiden Ag43-Varianten in der *rfaH*-Deletionsmutante von *E. coli* 536 DM zu abweichenden Ergebnissen bezüglich des Glykosylierungsstatus: Für isoliertes Ag43b war keine posttranslationale Modifikation durch Glykosylierung feststellbar; Ag43a konnte dagegen als eindeutig glykosyliert beschrieben werden, wobei der Grad der Glykosylierung sogar höher zu sein schien als der des Ag43a isoliert aus *E. coli* 536 DM. Bei der Glykosylierung des zu Ag43 homologen Autotransporters AIDA-I werden die benötigten Zucker (ADP-Glyceromannoheptopyranosen) aus dem LPS-Biosyntheseweg

abgezweigt (Benz und Schmidt, 2001). Für die Glykosylierung von Ag43 wird ein vergleichbarer Mechanismus vermutet. Aus der Literatur ist bekannt, dass der Transkriptionselongationsfaktor RfaH in *E. coli* unter anderem an der Regulation der Biosynthese der LPS-Kernregion, des O-Antigens und weiterer Exopolysaccharide, des Hämolysins und des F-Faktors beteiligt ist (Marolda und Valvano, 1998; Beloin *et al.*, 2006). Die Deletion von *rfaH* führt in *E. coli* Stamm 536 zu einer Reduktion der LPS-Synthese und verkürzten LPS-Molekülen (Beloin *et al.*, 2006; Rendueles *et al.*, 2014). Möglicherweise handelt es sich daher bei der verstärkten Glykosylierung von Ag43a in *E. coli* 536 rDM um einen Nebeneffekt der *rfaH*-Deletion: Die höhere Verfügbarkeit freier, aktivierter Heptosemoleküle - bedingt durch die reduzierte LPS-Synthese - könnte eine Steigerung der Glykosylierungsrate von Ag43 zur Folge haben. Somit bliebe die Frage nach der nicht nachweisbaren Glykosylierung von Ag43b zu klären. Bis heute ist nicht bekannt, welche Enzyme für die Glykosylierung der Ag43-Varianten verantwortlich sind. Es wäre durchaus denkbar, dass Ag43b von einer anderen Glykosyltransferase modifiziert wird als Ag43a. Sollte sich die *rfaH*-Deletion auf die Expression dieses Enzyms negativ auswirken, könnte dies der Grund für die nicht feststellbare Glykosylierung von Ag43b sein.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die natürliche Glykosylierung der beiden Ag43-Varianten im Vergleich zu der in der Literatur dokumentierten künstlichen Glykosylierung durch die AIDA-I-spezifische Heptosyltransferase Aah (Reidl *et al.*, 2009) in wesentlich geringerem Ausmaß erfolgt. Möglicherweise ist die Beobachtung ein Hinweis darauf, dass die putative Ag43-spezifische Glykosyltransferase kein Homolog von Aah ist bzw. eine andere Funktionsweise als Aah aufweist. Der nachweisbar hohe natürliche Glykosylierungsgrad von AIDA-I, dem eigentlichen Substrat von Aah, kann ebenfalls als Argument für diese Überlegung herangezogen werden, da für die Untersuchung von allen Proben gleiche Proteinmengen eingesetzt wurden und sich verschieden starke Detektionssignale somit nur auf Unterschiede in der Anzahl kovalent gebundener Zuckergruppen zurückführen ließen.

5.1.2.2 Massenspektrometrische Untersuchung des Glykosylierungsstatus der isolierten Ag43-Varianten (Nanoelektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (nESI-MS))

Die massenspektrometrischen Untersuchungen der isolierten Ag43-Varianten lieferten keine klaren Hinweise auf posttranslational glykosylierte Proteine. Die Profile der ermittelten Massenspektren der intakten Proteine deuteten alle auf homogen zusammengesetzte Proben hin, was das Vorhandensein eindeutig glykosylierter Proteinspezies ausschließt. Mittels Peptidmapping konnte jedoch für trypsinisiertes Ag43a isoliert aus *E. coli* 536 DM sowie isoliert aus *E. coli* 536 rDM ein Peptid ermittelt werden, dessen Massenverschiebung auf eine kovalent gebundene Heptose hindeutete. Da dieses Peptid (Aminosäureabschnitt AS 304-316: LDVLSGHTATNTR) vier potentielle O-Glykosylierungsstellen aufweist, war eine eindeutige Bestimmung der Heptose-Bindestelle nicht möglich (siehe Abbildung 14).

Bisher veröffentlichte Studien zum Glykosylierungsstatus des Autoporterproteins Ag43 basieren ausschließlich auf der Untersuchung künstlich modifizierter Proteine (Sherlock *et al.*, 2006; Knudsen *et al.*, 2008). Die in ihnen beschriebenen massenspektrometrischen Analysen wurden jeweils mit der α -Domäne der Ag43-Variante Flu aus *E. coli* MG1655 durchgeführt, die zuvor durch heterologe Expression der AIDA-I-spezifischen Heptosyltransferase Aah künstlich glykosyliert worden war. Sherlock *et al.* (2006) identifizierten dabei O-glykosidisch gebundene Heptosen an insgesamt 44 Serin- bzw. Threoninresten. Knudsen *et al.* (2008) detektierten hingegen ein davon abweichendes Glykosylierungsmuster, das nur 15 Aminosäurereste umfasste. Obwohl bei beiden Arbeitsgruppen ähnliche Methoden zur Ermittlung der Glykosylierungsstellen zur Anwendung kamen, lassen sich beim Vergleich der Ergebnisse lediglich an sechs Positionen Übereinstimmungen feststellen (Ser-265, Ser-280, Ser-344, Thr-435, Ser-439, Ser-451) (Abbildung 28). Bis heute wurde jedoch kein Hinweis auf natürliche Glykosylierung von Flu in *E. coli* K-12 gefunden (Sherlock *et al.*, 2006).

A	ADIVVHPGETVNGGTLANHDNQIVFGTTNGMTIS [□] GLEYGPDNEANTGGQVWQDGGTANKTTVT [□] SGLQRVNPGGS [□] VS [□] SDT [□]	80
	VI [□] SAGGGQ [□] SLQGRAVNTTLNG-GEQWMHEGAIATGTVINDKGWQVVKPG [□] TVA [□] TD [□] TVVNTGAEGGPDAENGDT [□] GGQFVRGDA	159
	VRTTINKNGRQIVRAEG [□] AN [□] TFV [□] VYAGGDQTVHGHALD [□] TTLNGGYQYVHNGGTASD [□] TVVNSD [□] GWQIVKNGGVAGN [□] INQ	239
	KGRLQVDAGG [□] TAT [□] NV [□] TLKQGGALV [□] TS [□] AA [□] TV [□] TGINRLGAF [□] SV [□] VEGKADNVVLENGGRLDVL [□] TGH [□] TAT [□] NT [□] RVDDGG [□] TLDVR	319
	NGG [□] TAT [□] TV [□] SMGNGGVLLAD [□] SGAAV [□] SG [□] TR [□] SDGKAF [□] SI [□] GGQADALMLEKGS [□] FTLNAGDTATD [□] TTVNGGLFTARGGTLAGT	399
	TTLNNGAILT [□] LSGK [□] TVNND [□] TL [□] TIREGDALLQGG [□] SL [□] IGN [□] GS [□] VEK [□] SG [□] STL [□] TV [□] SN [□] TTL [□] TQKAVN [□] LN [□] EGT [□] TL [□] LN [□] DS [□] VT [□] TD [□] VI	479
	AQRGTALKLTGSTVLNGAID	499
B	ADIVVHPGETVNGGTLVNHNDQFVSGTADGVTVS [□] GLELGPDSIDENTGGQWIKAGGTGRNTT [□] VTANGRQIVQAGG [□] TAS [□] DT [□]	80
	VIRDGGGQ [□] SLNGLAVNTTL [□] DNRGEQVWHGGGKAAGT [□] IINQDGYQTIKHGGLAT [□] GT [□] IVNT [□] GAEGGPESENV [□] STGQMVGGTA	160
	ESTTINNNGRQVIWSSGVS [□] SRDTLIY [□] TGGDQTVHGEAHNTRLEGGN [□] QYVHKYGLALNTVINEGGWQVVKAGGTAGN [□] INQ	240
	NGELKVHAGGEAS [□] DV [□] TQNTGGALV [□] TS [□] AA [□] TV [□] TGNRLGAF [□] SV [□] VEGKADNVVLENGGRLDVL [□] SGH [□] TAT [□] NT [□] RVDDGG [□] TLDVR	320
	NGG [□] TAT [□] TV [□] SMGNGGVLLAD [□] SGAAV [□] SG [□] TR [□] SDGTAFRIGGGQADALMLEKGS [□] FTLNAGDTATD [□] TTVNGGLFTARGGSLAGT	400
	TTLNNGAILT [□] LSGK [□] TVNND [□] TL [□] TIREGDALLQGG [□] SL [□] IGN [□] GS [□] VEK [□] SG [□] STL [□] TV [□] SN [□] TTL [□] TQKAVN [□] LN [□] EGT [□] TL [□] LN [□] DS [□] VT [□] TD [□] VI	480
	AQRGTALKLTGSTVLNGAID	500

Abbildung 28: Vergleich der putativen Glykosylierungsstellen von Flu und Ag43a-536.

(A) Aminosäuresequenz der α -Domäne von Flu aus *E. coli* MG1655. Eingezeichnet sind die putativen Glykosylierungsstellen nach Sherlock *et al.* (rot markiert) und nach Knudsen *et al.* (schwarz umrandet). Als übereinstimmende Glykosylierungspositionen zwischen den beiden Modellen lassen sich die AS-Reste Ser-265, Ser-280, Ser-344, Thr-435, Ser-439 und Ser-451 feststellen.

(B) Aminosäuresequenz der α -Domäne von Ag43a aus *E. coli* 536. Eingezeichnet sind die transponierten putativen Glykosylierungsstellen nach Sherlock *et al.* (rot markiert) und nach Knudsen *et al.* (schwarz umrandet). Der in der MS-Analyse der vorliegenden Arbeit als glykosyliert ermittelte Peptidbereich ist grau hinterlegt und zeigt eine Überschneidung mit den von Sherlock *et al.* beschriebenen Glykosylierungsstellen.

Modifiziert nach Sherlock *et al.* (2006) und Knudsen *et al.* (2008).

Die α -Domänen von Flu und Ag43a sind zu 84 % identisch (Reidl *et al.*, 2009). Aus diesem Grund wurden die beiden künstlichen Glykosylierungsmuster für eine vergleichende Analyse auf die Aminosäuresequenz von Ag43a transponiert (Abbildung 28). Es zeigte sich, dass der in der vorliegenden Arbeit als glykosyliert ermittelte Peptidbereich auch von Sherlock *et al.* (2006) beschrieben wurde, d.h. dass eine künstliche Glykosylierung dieses Peptids durch Aah möglich war. Da Aah O-glykosidische Bindungen vermittelt, deutet die Beobachtung darauf hin, dass die natürliche Glykosylierung von Ag43a das Ergebnis der Aktivität eines O-glykosylierenden Enzyms ist. Auch wenn aus der Literatur bekannt ist, dass eine N-verknüpfte Glykosylierung von Ag43 möglich ist (Naegeli *et al.*, 2014), kann sie hier ausgeschlossen werden, da der detektierte Peptidbereich keine Konsensussequenz für eine N-Glykosylierung (N-X-S/T) aufweist. Für die bakterielle

O-Glykosylierung konnte bisher keine allgemeingültige Konsensussequenz identifiziert werden, weswegen eine andere Art der Substraterkennung durch bakterielle O-Glykosyltransferasen angenommen wird. Charbonneau *et al.* (2012) zeigten, dass die Heptosyltransferase Aah ihr Substrat AIDA-I nicht über eine bestimmte Sequenz, sondern über ein Strukturmotiv erkennt. Aufgrund der Homologie von AIDA-I und Ag43 lässt sich vermuten, dass die Glykosylierung von Ag43 auch über die Erkennung eines Strukturmotivs erfolgt, was mittels zukünftiger Strukturstudien untersucht werden sollte. Leider konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, welches Enzym für die Glykosylierung von Ag43a verantwortlich ist und ob es sich dabei um ein Homolog von Aah handelt oder möglicherweise um eine Glykosyltransferase aus dem LPS-Biosyntheseweg. Die Suche nach dem entsprechenden Enzym bedarf daher weiterer Untersuchungen.

Die mittels Massenspektrometrie gewonnenen, wenigen Hinweise auf glykosylierte Proteine in den Ag43-Proben bestätigten die Beobachtung des Kit-basierten Glykoprotein-Nachweises (siehe 4.1.2.1), dass die natürliche Glykosylierung von Ag43 in sehr geringem Umfang erfolgt. Trotzdem war die minimale Nachweisbarkeit von Glykokonjugaten in den Proben überraschend, da sie wesentlich geringer ausfiel als erwartet. Es stellte sich daher die Frage, ob eine schonendere Untersuchungsmethode die Nachweisbarkeit von glykosyliertem Ag43 erhöhen könnte. Während der für diese Arbeit durchgeführten Versuche gab es Anzeichen dafür, dass das Einfrieren glykosylierter Ag43-Proben zu einem deutlichen Rückgang der Glykosylierungsstärke der Proteine führte. Da dies Phänomen auch schon für das stark glykosylierte AIDA-I zu beobachten war (I. Benz, persönliche Mitteilung), kann das Einfrieren als ein möglicher Grund für die geringe Nachweisbarkeit von glykosyliertem Ag43 vermutet werden. Zukünftige MS-Analysen sollten daher direkt im Anschluss an die Proteinisolation erfolgen, um den Zwischenschritt der Gefrierlagerung zu vermeiden.

Auch wenn die massenspektrometrische Analyse für Ag43b keinen Nachweis einer posttranslationalen Glykosylierung lieferte, konnte im Rahmen dieser Untersuchung eine andere interessante Beobachtung gemacht werden: Bei der MS-Analyse der intakten Proteinproben war zwischen dem theoretischen und experimentellen Molekulargewicht

von Ag43b ein Unterschied von ca. 1500 Da feststellbar (siehe Tabelle 11). Diese Massendifferenz, die übereinstimmend für die Ag43b-Isolate aus den drei Stammhintergründen zu detektieren war, deutet darauf hin, dass die Trennung zwischen α - und β -Domäne bei Ag43b an anderer Stelle im Protein erfolgt als bisher angenommen. Das Ergebnis des Peptidmappings bestätigte die Vermutung, da sich für Ag43b ein Peptidsatz nachweisen ließ, der um 13 AS länger war als erwartet. Die theoretisch berechnete Gesamtmasse dieses Peptidsatzes entsprach dem experimentell ermittelten Molekulargewicht von Ag43b. Die Untersuchung lieferte somit deutliche Hinweise darauf, dass sich die Prozessierungsstelle zwischen α - und β -Domäne bei Ag43b an einer weiter C-terminal liegenden Stelle (zwischen Arg-495 und Ala-496) im Protein befindet. Die α -Domäne von Ag43b würde damit nicht wie bisher angenommen 430 AS, sondern 443 AS umfassen (Abbildung 29).

```

MKRHLNTSYRLVWNHITGTLVVASELARSRGKRAVAVALSLAAVTSVPALAADTVVQAGETVNDGTLTNHDNQIVLGTA 80
NGMTISTGLEYPDNEANTGGQWIQNGGIANNNTVVTGGGLQQRVNAGGSVSDTVISAGGGQSLQGQAVNTTLNGGEQWVHE 160
GGIATGTVINEKQWQAVKSGAMATDTVVNTGAEGGPDAENGDTGQFVRGNAVVRTINENGRQIVAAEGTANTVVYAGGD 240
QTVHGYALDPTLNGGNQYVHNGGTASGTVVNSDGWQIVKEGGLADFTIVNQKGLQVNAGGTATNVTLKQGGALVTSTAA 320
TVTGSNRLGNFTVENGNADGVVLES GGRLDVLEGHSAWKTLDVDDGGTLAVSAGGKATDVTMTSGGALIADSGATVEGTNA 400
SGKFSIDGISGQASGLLLENGGSFTVNAGGQAGNTTVGHRGTLTLAAGGSLSGRTQLSKGASMLVNGD VVSTGDIVNAGE 480
IHFDNQTTPDALSRAVAKGDSPVTFHKLTTSNLTGQGGTINMRVRLDGSNTSDQLVINGGQATGKTWLAFTNVGNSNLG 560
VATTGQGIRVVDAQNGATTEEGAFALSRPLQAGAFNYTLNRDSEDEWYLRSENA YRAEVPLYASMLTQAMDYDRILAGSR 640
SHQTGVNGENNSFRLSIQGGHLGHVNNGGIARGATPESGSGYGLVLRLEGDLLRTEVAGMSLTTGVYGAAGHSSVDVKDDD 720
GSRAGTVRDDAGSLGGYLNLVHTSSGLWADIVAQGRHSMKASSDNNDFRARGWGLGSLETGLPFSITDNLMLPEQLQY 800
TWQGLSLDDGQDNAGYVVKFGHSAQHVRAGFRLGSHNDMNFVKGTSSRDTLRDSAKHSVREL PNVWVQPSVIRTFSSRG 880
DMSGMTAAAGSNMTFSPSQNGTTLDLQAGLEARVRENITLVGQAGYAHSVSGSSAEGYNGQATLNVTF 948

```

Abbildung 29: Übersicht über die ermittelte α -Domäne und neue Prozessierungsstelle von Ag43b-536.

Abgebildet ist die Aminosäuresequenz von Ag43b-536. Die auf Basis des Peptidmappings identifizierte α -Domäne ist grau hinterlegt. Sie ist 13 AS-Reste (rot markiert) länger als bisher angenommen, weswegen die Spaltstelle von α - und β -Domäne vermutlich zwischen Arg-495 und Ala-496 (unterstrichen) liegt. Die Asparaginsäurereste im Abstand von +33 AS und +39 AS von der Spaltstelle aus sind fett markiert, Erläuterung siehe Text.

In wie weit sich die längere Proteinsequenz der α -Domäne auf die bisher für Ag43b angenommene Molekülstruktur bzw. auf mögliche Wechselwirkungen mit der Umgebung auswirkt, muss mit Hilfe zukünftiger Strukturanalysen und Versuche geklärt werden. Möglicherweise kann die Kenntnis der genauen Prozessierungsstelle auch zur Aufklärung des Spaltungsmechanismus von α - und β -Domäne bei Ag43b beitragen.

Bis heute ist der Spaltungsmechanismus vieler Autotransporter nicht bekannt und wird kontrovers diskutiert. Hierbei geht es insbesondere um die Frage, ob die Spaltung von einer Membran-gebundenen Protease katalysiert wird oder ob es sich um ein autoproteolytisches Ereignis handelt. Beispielsweise wird die Trennung von α - und β -Domäne bei dem Autotransporterprotein IcsA (auch VirG) von *Shigella flexneri* durch die zugehörige Protease der äußeren Membran (IcsP) vermittelt (Steinhauer *et al.*, 1999). Dagegen prozessiert der Autotransporter IgA1-Protease von *Neisseria* und *Haemophilus* die N-terminale α -Domäne autoproteolytisch (Pohlner *et al.*, 1987; Poulsen *et al.*, 1989). Für das Autotransporterprotein AIDA-I konnte von Charbonneau *et al.* (2009) ein autokatalytischer Spaltungsmechanismus beschrieben werden. Dabei stellte sich heraus, dass die Aminosäurereste Asparaginsäure (Asp-878) und Glutaminsäure (Glu-897) der „*junction*“-Region des Proteins maßgeblich an der Autoprozessierung beteiligt sind. Sie liegen in einem Abstand von +32 AS (Asp-878) bzw. +51 AS (Glu-897) zu der zugehörigen Spaltstelle. Eine Mutation der beiden Reste führte zu einem kompletten Verlust der Spaltungsaktivität.

Bei genauerer Betrachtung der Umgebungssequenz der neu ermittelten Spaltstelle von Ag43b (Arg-495 - Ala-496) fällt auf, dass sich an Position +33 AS ebenfalls die Aminosäure Asparaginsäure befindet (Asp-528, siehe Abbildung 29). Es wäre somit denkbar, dass dieser Aspartatrest an der Autoprozessierung von Ag43b beteiligt ist. Da auch an Position +39 AS von der neuen Spaltstelle aus ein Aspartatrest (Asp-534) vorhanden ist, könnte man sogar die Existenz einer katalytischen Diade einer Aspartatprotease vermuten. Dem mittels Phyre2 vorhergesagten Strukturmodell nach wäre das Vorhandensein einer solchen katalytischen Tasche aufgrund der räumlichen Lage der Aspartatreste zueinander sogar möglich (Abbildung 30). Das Modell lässt jedoch auch erkennen, dass die neu ermittelte Ag43b-Spaltstelle räumlich nicht in unmittelbarer Nähe der Aspartatreste liegt, was eher gegen eine direkte Beteiligung der beiden AS-Reste an der Autoprozessierung spricht.

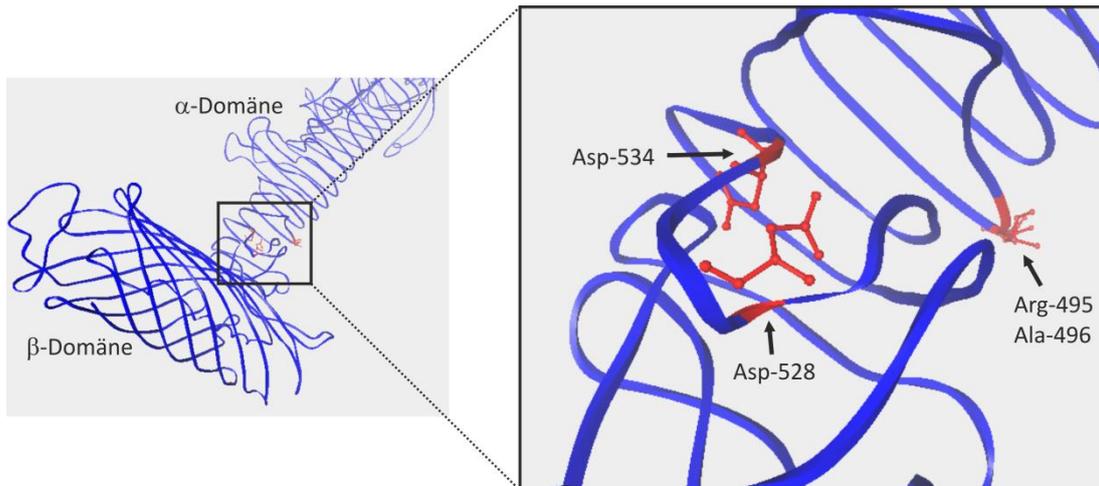


Abbildung 30: Strukturmodell der ermittelten Spaltstelle und der theoretisch möglichen Aspartatprotease von Ag43b-536.

Links: Übersicht über die mittels Phyre2 vorhergesagte Struktur von Ag43b-536 mit α - und β -Domäne. Rechts: vergrößerte Darstellung der Spaltstellenregion (Agr-495/Ala-496); die möglicherweise am Spaltungsprozess beteiligten Aspartatreste Asp-528 und Asp-534 sind gekennzeichnet.

Trotzdem sollten die beiden Aspartatreste bei zukünftigen Untersuchungen des Autoprocessing-Mechanismus miteinbezogen werden, da es sich bei dem Strukturmodell letztlich um eine Konformationsschätzung handelt. Zudem konnte bei weiteren bakteriellen Peptidasen (Typ-4-Prepilin-Peptidase, Omptine), die ebenfalls in der äußeren Membran lokalisiert sind, die Beteiligung von zwei Aspartatresten am katalytischen Spaltungsprozess als essentiell nachgewiesen werden (LaPointe und Taylor, 2000; Hritonenko und Stathopoulos, 2007).

5.1.3 Überprüfung der künstlichen Glykosylierung von Ag43a in *E. coli* Stamm 536 DM

Aus der Literatur ist bekannt, dass mit Hilfe der AIDA-I spezifischen Glykosyltransferase Aah die artifizielle Glykosylierung von Ag43a im Stammhintergrund *E. coli* MG1655 $\Delta fim \Delta flu$ vermittelt werden kann (Reidl *et al.*, 2009). Um für die massenspektrometrischen Untersuchungen über eine adäquate Positivkontrolle zu verfügen, sollte für diese Arbeit künstlich von Aah glykosyliertes Ag43a im Stammhintergrund *E. coli* 536 DM generiert werden. Den ersten Hinweis auf eine erfolgreich verlaufene künstliche Glykosylierung von Ag43a in *E. coli* 536 DM lieferte das Coomassie-gefärbte SDS-Gel der Proteinprobe: Die

Bande des künstlich glykosylierten Ag43a zeigte im Gel eine leicht höhere Position als die Ag43a-Kontrollbande (Abbildung 16B), was auf eine Glykosylierung hindeutet, da glykosylierte Proteine im SDS-Gel ein verlangsamtes Laufverhalten aufweisen (Lottspeich und Zorbas, 1998). Die Analyse der Probe mit Hilfe der zwei Glykoprotein-Detektionskits bestätigte, dass sich Ag43a mittels Aah auch im Stammhintergrund *E. coli* 536 DM künstlich glykosylieren ließ. Interessanterweise war sogar bei der Untersuchung mit dem weniger sensitiven Glycopro Kit ein leichter violetter Schatten für das künstlich glykosylierte Ag43a auf dem Gel zu erkennen (Abbildung 16A). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass durch Aah glykosyliertes Ag43a mehr gebundene Zuckerreste enthält als das natürlich glykosylierte Ag43a. Somit bekräftigt auch diese Untersuchung die Feststellung, dass die natürliche Glykosylierung von Ag43 weniger stark ausfällt als die künstliche Glykosylierung durch Aah.

Da zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit noch keine Ergebnisse der MS-Analyse von künstlich glykosyliertem Ag43a vorlagen, muss der Vergleich der künstlichen Glykosylierungsstellen von Ag43a mit zuvor generierten Ergebnissen nachträglich erfolgen.

5.1.4 Untersuchungen zu Expression und Glykosylierung von AIDA-I in *E. coli* 536 DM, *E. coli* 536 rDM und *E. coli* MG1655 $\Delta fim \Delta flu$

Aufgrund der Homologie zwischen Ag43 und AIDA-I (Ulett *et al.*, 2006) war die Untersuchung der Expression von AIDA-I in den zuvor verwendeten *E. coli* Stämmen 536 DM, 536 rDM und MG1655 $\Delta fim \Delta flu$ ein zusätzliches Ziel dieser Arbeit. In der Versuchsanordnung, bei der AIDA-I in den *E. coli* Stämmen ohne seine zugehörige Glykosyltransferase Aah exprimiert wurde, galt das Interesse insbesondere dem Glykosylierungsstatus der exprimierten AIDA-I-Proteine. Für Ag43 ist bekannt, dass es durch die AIDA-I spezifische Glykosyltransferase Aah modifiziert werden kann (Sherlock *et al.*, 2006; Reidl *et al.*, 2009). Es sollte daher überprüft werden, ob die Glykosyltransferase, die in *E. coli* Stamm 536 DM die Glykosylierung von Ag43 vermittelt, auch AIDA-I als Substrat akzeptieren würde.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Expression von AIDA-I in allen drei Stammhintergründen möglich war (Abbildung 17). Allerdings wiesen die Proteinbanden der drei isolierten

AIDA-I-Proben im SDS-Gel mit ca. 80 kDa eine geringere Laufhöhe auf als die Positivkontrolle (natürlich glykosyliertes AIDA-I, ca. 100 kDa) (Abbildung 17A und B). Benz und Schmidt (2001) hatten zeigen können, dass sich unglykosyliertes AIDA-I als 80 kDa-Proteinbande im SDS-Gel darstellt. Somit ließ die Beobachtung darauf schließen, dass das aus den drei Stammhintergründen isolierte AIDA-I nicht bzw. nur minimal glykosyliert vorliegen konnte. Diese Vermutung wurde durch die Resultate der Glykoprotein-Detektion bestätigt: Für AIDA-I isoliert aus *E. coli* 536 rDM bzw. *E. coli* MG1655 $\Delta fim \Delta flu$ war keine posttranslationale Glykosylierung nachweisbar. Das in *E. coli* 536 DM exprimierte AIDA-I schien dagegen schwach glykosyliert vorzuliegen (Abbildung 17E). Interessanterweise führte die AIDA-I-Probe isoliert aus *E. coli* 536 DM im Western Blot-Versuch mit dem Antikörper, der gegen die natürlich glykosylierte AIDA-I- α -Domäne gerichtet ist, zu keiner Reaktion (Abbildung 17C). Es ist daher anzunehmen, dass zwischen AIDA-I isoliert aus *E. coli* 536 DM und natürlich glykosyliertem AIDA-I in Bezug auf Glykosylierungsstellen bzw. Zuckerzusammensetzung und -struktur deutliche Unterschiede bestehen.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Erkenntnis aus der Untersuchung des Glykosylierungsstatus von Ag43, dass die natürliche Glykosylierung durch die putative Ag43-spezifische Glykosyltransferase schwächer ausfällt als die Glykosylierung durch Aah. Zudem liefert es einen weiteren Hinweis darauf, dass die Glykosyltransferase, die die natürliche Glykosylierung von Ag43 generiert, möglicherweise kein Homolog von Aah ist bzw. eine andere Funktionsweise als Aah besitzt. Es ist anzumerken, dass das Ergebnis der Beobachtung von Sherlock *et al.* (2006) widerspricht, die in ihrer Studie AIDA-I isoliert aus *E. coli* 536 DM als stark glykosyliert beschrieben, diese Aussage jedoch nicht mit gezeigten Daten belegten. Zur genaueren Analyse der Glykosylierung von AIDA-I im *E. coli* 536 DM Stammhintergrund sollte AIDA-I für zukünftige Versuche ebenfalls mit einem His-Tag versehen werden, um eine bessere Aufreinigung und die massenspektrometrische Untersuchung zu ermöglichen.

AIDA-I schien in *E. coli* Stamm 536 rDM weniger stark exprimiert zu werden als in den anderen zwei Stammhintergründen, da die Immunoblot-Untersuchung nur ein schwaches Detektionssignal erkennen ließ. Für den Gesamtzellextrakt aus 536 rDM (pIB9) konnte allerdings eine deutliche zusätzliche Bande bei ca. 140 kDa festgestellt werden

(Abbildung 17B). Da ein Protein dieses Molekulargewichts unprozessiertem AIDA-I-Preproprotein entspricht (Suhr *et al.*, 1996; Charbonneau und Mourez, 2007), war die geringe Nachweisbarkeit von freier AIDA-I- α -Domäne dem Anschein nach auf eine nicht stattfindende Proteinprozessierung zurückzuführen. Von Benz *et al.* (2010) konnte in einer *rfaH*-Deletionsmutante verstärkte Transkription von *aidA* festgestellt werden. Da eine verstärkte Transkription meist eine erhöhte Expression zur Folge hat, lässt sich die Bildung von „inclusion bodies“ aus aggregiertem AIDA-I-Preproprotein vermuten, was die nicht stattfindende Prozessierung begründen würde. Auch diese Beobachtung ließe sich in zukünftigen Untersuchungen mit His-getagtem AIDA-I genauer analysieren.

Eine generelle Reduktion des Expressionslevels von schwach bzw. nicht glykosyliertem AIDA-I, wie sie von Charbonneau *et al.* (2007) beschrieben wurde, konnte nicht festgestellt werden. Zwar ließ sich die unglykosylierte Form der AIDA-I- α -Domäne im Immunoblot in geringerem Ausmaß nachweisen als die entsprechende durch Aah glykosylierte Form, für die zugehörigen β -Domänen war jedoch kein mengenmäßiger Unterschied feststellbar (siehe Abbildung 17D). Diese Beobachtung spricht gegen eine generelle Expressionsreduktion von AIDA-I, sondern für eine geringere Stabilität der unglykosylierten α -Domäne, was durch das Vorhandensein von deutlichen Proteinabbauenden in den Gelspuren der unglykosylierten Hitzeextrakte untermauert wird. Zudem muss die Art der Nachweisführung von Charbonneau *et al.* (2007) eher kritisch betrachtet werden, da sich ihre These des reduzierten Expressionslevels nur auf der geringeren Detektierbarkeit von unglykosyliertem His-getagtem AIDA-I im Immunoblot (mit gegen das His-Tag gerichteten Antikörpern) begründet. Die zugehörigen Mengen an AIDA^C wurden in der Untersuchung jedoch außer Acht gelassen.

Das hier generierte Versuchsergebnis stützt die derzeit gültige Annahme, dass die Glykosylierung bei AIDA-I für die Stabilität des Proteins erforderlich ist (Charbonneau *et al.*, 2007; Knudsen *et al.*, 2008) und wie bei TibA sicherstellt, dass das Protein seine normale Konformation annimmt, was indirekt zur Funktionalität des Proteins beiträgt (Coté *et al.*, 2013).

5.2 Identifizierung und Charakterisierung möglicher Glykosyltransferasen in *E. coli* Stamm 536

Im Gegensatz zu den Autoporterproteinen AIDA-I und TibA konnte für Ag43 bisher keine zugehörige Glykosyltransferase (GT) identifiziert werden (Benz und Schmidt, 2011). Da Ag43 im uropathogenen *E. coli* Stamm 536 natürlich glykosyliert vorliegt, war die Suche nach „*open reading frames*“ im Genom von *E. coli* 536, die für eine möglichen Ag43-spezifische GT kodieren, ein weiteres Ziel dieser Arbeit.

5.2.1 Identifizierung putativer GT-kodierender „*open reading frames*“ in *E. coli* Stamm 536 und Generierung von Deletionsmutanten

Unter den insgesamt 40 ermittelten GTs für *E. coli* Stamm 536 ließen sich fünf hypothetische Proteine ausmachen, für die aufgrund noch nicht vorliegender Informationen keine eindeutige Zuordnung zu funktionellen Clustern wie „Bakterienhülle“ oder „Kohlenhydratmetabolismus“ möglich war. Hierbei handelte es sich um die putativen GTs Ecp0425, Ecp1999, Ecp2077, Ecp2078 und Ecp3716. Um Hinweise auf die mögliche Funktion dieser Proteine zu erlangen, sollte das jeweilig zugehörige Gen in *E. coli* 536 zur Herstellung von „*knock-out*“-Mutanten deletiert werden. Die resultierenden Mutanten sollten hinsichtlich eines erkennbaren Phänotyps untersucht werden. Die für die bekannten GTs MdoH, WaaF, WaaG und WaaQ kodierenden Gene waren ebenfalls zur Generierung von Deletionsmutanten von *E. coli* 536 vorgesehen, da eine mögliche Beteiligung dieser GTs an der Glykosylierung von Ag43 nicht auszuschließen war.

Die Konstruktion einer „*knock-out*“-Mutante konnte für fast alle Gene erfolgreich durchgeführt werden. Interessanterweise war es jedoch nicht möglich, *E. coli* 536 Mutanten mit deletiertem *ecp2077* bzw. *ecp2078* zu generieren. Die Analyse der genomischen Umgebung der beiden Gene ergab, dass sie im O6-Antigen-kodierende Gencluster von *E. coli* Stamm 536 lokalisiert sind (Grozdanov *et al.*, 2002). Da *E. coli* K-12 kein Vertreter des Serotyps O6 ist, erklärt sich somit, warum für die putativen GTs Ecp2077 und Ecp2078 im Proteom von *E. coli* K-12 keine homologen Proteine gefunden werden konnten. Durch den Aminosäuresequenzvergleich der beiden GTs mit dem Proteom weiterer *E. coli* Stämme des O6-Serotyps wie CFT073, Nissle 1917 oder B2C ließen sich dagegen jeweils homologe Proteine mit hoher Sequenzübereinstimmung

identifizieren. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich bei den beiden GTs um O6-Antigen-spezifische Enzyme handelt, was es jedoch mittels zukünftiger Untersuchungen zu verifizieren gilt. Aufgrund dieser Beobachtung ist die Tatsache, dass sich für die beiden GT-kodierenden Gene keine Deletionsmutante generieren ließ, umso erstaunlicher, da das O-Antigen gemeinhin als nicht essentiell für die Lebensfähigkeit von *E. coli* angesehen wird (Rock, 2008). Somit sollte zukünftig die Herstellung der Deletionsmutanten für *ecp2077* bzw. *ecp2078* mit alternativen Methoden erneut durchgeführt und geklärt werden, ob den GTs Ecp2077 und Ecp2078 nicht unerwarteter Weise eine bisher unbekannte essentielle Funktion (wie z.B. die Beteiligung an der Synthese eines Nukleotidzuckers) in *E. coli* Stämmen des O6-Serotyps zukommt. Hierfür sollte sowohl die Herstellung konditionaler Deletionsmutanten von *ecp2077* bzw. *ecp2078* als auch die komplette Deletion des O6-Antigen-kodierenden Genclusters in *E. coli* Stamm 536 in Betracht gezogen werden.

5.2.2 Phänotypische Charakterisierung der GT-Deletionsmutanten

Mit Ausnahme der Gene *ecp2077* und *ecp2078* war die Konstruktion einer Deletionsmutante für alle ausgewählten GT-kodierenden Gene möglich. Die phänotypische Analyse offenbarte deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Mutanten, wobei darauf zu achten war, die ausgeprägten Phänotypen unter Einbeziehung des Phänotyps des entsprechenden Ausgangsstammes zu beurteilen.

Im Vergleich zum Ausgangsstamm *E. coli* 536 $\Delta rfaH$ konnte für die *ecp0425*-Deletionsmutante (*E. coli* RS1) eine erhöhte Biofilmbildung in M63-Medium festgestellt werden (Abbildung 19). Ecp0425 wies beim Abgleich der Aminosäuresequenz mit dem Proteom von *E. coli* K-12 eine hohe Homologie zu YaiP auf. Da YaiP in *E. coli* K-12 als nicht-essentielles Protein mit unbekannter Funktion annotiert ist (Winterberg *et al.*, 2005), lieferte der Vergleich jedoch keine zusätzlichen Informationen bezüglich der Proteineigenschaften. Die Analyse der direkten genomischen Umgebung von *ecp0425* in *E. coli* 536 ließ ebenfalls keine Rückschlüsse auf mögliche Aufgaben des Genproduktes zu. In der STRING Datenbank, die einen umfassenden Überblick über direkte und indirekte Zusammenhänge und Interaktionen zwischen Proteinen gibt, wird Ecp0425 mit einer Wahrscheinlichkeit von 78 % als möglicher funktionaler Partner des äußeren Membran-

proteins PgaA gelistet. PgaA ist Teil der Synthese-Einheit des Exopolysaccharids poly- β -1,6-N-Acetylglucosamin (PGA), das als eine der Biofilm-Hauptstrukturkomponenten bei *E. coli* gilt (Romeo *et al.*, 1993). Da die *ecp0425*-Deletion in *E. coli* 536 Δ *rfaH* zu einer erhöhten Biofilmbildung führte, ist eine mögliche regulatorische Interaktion (z.B. negative Regulation) von Ecp0425 mit dem PGA-Syntheseapparat durchaus denkbar. Der genaue Zusammenhang muss jedoch in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden.

Das in *E. coli* RS2 deletierte Gen *mdoH* kodiert für die GT MdoH, die an der Biosynthese von osmoregulatorischen periplasmatischen Oligosacchariden beteiligt ist (Bohin und Kennedy, 1984). Es ist bekannt, dass die Inaktivierung von MdoH bei *E. coli* zu verringerter Motilität und erhöhter Exopolysaccharid-Synthese (Colansäure) führt (Bohin und Lacroix, 2006). Die Angaben aus der Literatur wurden in dieser Arbeit dahingehend bestätigt, dass für *E. coli* RS2 eine deutlich reduzierte Schwärmaktivität festzustellen war (Abbildung 20). Zudem zeigte *E. coli* RS2 im Vergleich zum Parentalstamm *E. coli* 536 eine signifikant erhöhte Biofilmbildung (Abbildung 19), die sich mit verstärkter Colansäure-Synthese erklären ließe (Danese *et al.*, 2000). Die für RS2 zu beobachtende Koloniemorphologie und -färbung nach Wachstum auf Kongorot (CR)- und Calcoflour (CF)-Agar deutet darauf hin, dass die Synthese von Zellulose und vor allem von Curli-Fimbrien in der *mdoH*-Deletionsmutante stark reduziert ist (Tabelle 14). Da die Deletion von *mdoH* in *E. coli* zur Aktivierung des Rcs-Systems führt (Ebel *et al.*, 1997) und das Rcs-System die Curli-Expression negativ reguliert (Vianney *et al.*, 2005), steht auch dieses Ergebnis in Übereinstimmung mit bisherigen Studien. Zusätzlich wies RS2 auf Blutagar im Vergleich zum Parentalstamm eine abgeschwächte hämolytische Aktivität auf (Abbildung 21). Möglicherweise ist die Ursache dafür der bei *E. coli* *mdoH*-Mutanten zu beobachtende größere periplasmatische Raum (Holtje *et al.*, 1988): Sollte aufgrund des vergrößerten Abstands zwischen den Membranen die Ausbildung der α -Hämolysin-Exporteinheit (HlyB/HlyD/TolC; Thanabalu *et al.*, 1998) nicht mehr optimal möglich sein, würde ein daraus resultierender verminderter α -Hämolysin-Export die abgeschwächte hämolytische Aktivität von *E. coli* RS2 erklären.

Für *ecp1999* konnte sowohl in *E. coli* 536 als auch in *E. coli* 536 Δ *rfaH* eine Deletionsmutante (RS3A und RS3B) generiert werden. Interessanterweise wiesen die Phänotypen der beiden Deletionsmutanten klare Unterschiede auf: Im Vergleich zum

wildtypischen Ausgangsstamm war für *E. coli* RS3A eine leicht reduzierte Motilität auf Schwärmagar (Abbildung 20) sowie geringere hämolytische Aktivität festzustellen (Abbildung 21). Zudem entsprachen die nach Wachstum auf CR- und CF-Agar sichtbaren Kolonien in ihrer Morphologie eher dem Phänotyp von *E. coli* 536 $\Delta rfaH$ (Tabelle 14). *E. coli* RS3B zeigte dagegen im Vergleich zum Parentalstamm *E. coli* 536 $\Delta rfaH$ eine stark erhöhte Biofilmbildung in M63-Medium (Abbildung 19).

Um die unterschiedlichen Ergebnisse besser interpretieren zu können, galt es zunächst, Ecp1999 genauer zu charakterisieren. Ecp1999 ist auf Aminosäuresequenzebene zu 97 % mit Ecp0425 identisch, weswegen der Vergleich mit dem K-12 Proteom ebenfalls eine hohe Homologie zu YaiP ergab und in STRING auch für Ecp1999 PgaA als möglicher funktionaler Partner gelistet wird. Die erhöhte Biofilmbildung der *ecp0425*-Deletionsmutante ließ einen negativ regulierenden Effekt der GT auf den PGA-Syntheseapparat vermuten, was aufgrund der hohen Homologie auch für Ecp1999 angenommen wurde. Eine erhöhte Biofilmbildung war jedoch nur für die *ecp1999*-Deletionsmutante mit $\Delta rfaH$ -Hintergrund feststellbar. Somit musste zur Interpretation der Ergebnisse zusätzlich der Einfluss der *rfaH*-Deletion auf den resultierenden Phänotyp beleuchtet werden. Beloin *et al.* (2006) zeigten, dass eine Inaktivierung von *rfaH* in *E. coli* Stamm 536 einen deutlich positiven Einfluss auf die Biofilmbildung hat. Da die für RS1 und RS3B festgestellte Biofilmbildung jedoch signifikant höher war als die des Ausgangstammes *E. coli* 536 $\Delta rfaH$ (Abbildung 19), kann der beobachtete Effekt nicht allein mit dem Fehlen von RfaH erklärt werden. Beloin *et al.* (2006) beschrieben ebenfalls, dass in *E. coli* 536 $\Delta rfaH$ das Autotransporteradhäsın Ag43 verstärkt exprimiert wird. Ag43 trägt zusammen mit Typ 1- und Curli-Fimbrien zur initialen Anhaftung und nachfolgenden irreversiblen Bindung der Bakterien an Oberflächen bei, was ausschlaggebend für die bakterielle Biofilmbildung ist. Bei dem sich anschließenden Reifungsprozess führt unter anderem PGA zu einer Stabilisierung des Biofilms (Beloin *et al.*, 2008; Mika und Hengge, 2013). Vielleicht muss der Phänotyp von RS1 und RS3B daher als Ergebnis des Zusammenwirkens der erhöhten Ag43-Expression und der vermutlich gesteigerten PGA-Synthese betrachtet werden. Eine verstärkte initiale Anhaftungsphase in Kombination mit der unmittelbaren Stabilisierung könnte die erhöhte Biofilmbildung begründen. Da die intensivierete Ag43-Expression im Wildtypstamm 536 fehlt, ließe sich auch erklären, warum für RS3A keine verstärkte Biofilmbildung zu beobachten war. Die leicht reduzierte

Schwärmaktivität von *E. coli* RS3A wäre dagegen ein weiterer Hinweis auf erhöhte PGA-Synthese, da PGA-Überexpression die Motilität von *E. coli* auf Schwärmagar verringert (Subashchandrabose *et al.*, 2013). Da bekannt ist, dass die PGA-Synthese einem sehr komplexen regulatorischen Netzwerk unterliegt (Tagliabue *et al.*, 2010; Carzaniga *et al.*, 2012), lassen sich hier jedoch keine eindeutigen Rückschlüsse bezüglich der Wirkungsweise von Ecp0425 und Ecp1999 auf die PGA-Synthese ziehen. Für ein besseres Verständnis bedarf es zukünftiger Analysen. Die Ursache für die veränderte Koloniemorphologie auf CR- und CF-Agar sowie die abgeschwächte Hämolyse von RS3A muss ebenfalls mit Hilfe nachfolgender Untersuchungen geklärt werden.

Für die putative GT Ecp3716 war mittels Aminosäuresequenzvergleich eine hohe Homologie zu WaaH (auch YibD) aus *E. coli* K-12 feststellbar. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass WaaH in *E. coli* K-12 für eine Modifikation der inneren Kernregion des LPS verantwortlich ist, bei der Glucuronsäure an die dritte Heptose (HepIII) der inneren Kernregion angelagert wird (Klein *et al.*, 2013). Somit ist zu vermuten, dass WaaH in *E. coli* 536 ebenfalls bei der Synthese/Modifizierung der Bakterienhülle eine Rolle spielt, auch wenn eine Glucuronsäure-Modifikation für *E. coli* Stämme mit dem Kerntyp R1 (wie z.B. *E. coli* 536) noch nicht nachgewiesen wurde. Unterstützt wird diese Annahme durch die im Genom von *E. coli* 536 bestehende räumliche Nähe des zugehörigen Gens *ecp3716* zum *wa**-Gencluster, welches für die LPS-Kernbiosynthese kodiert. Die Deletion von *ecp3716* in *E. coli* 536 $\Delta rfaH$ (RS6) resultierte in einem Phänotyp, der im Vergleich zum Ausgangsstamm ein erkennbar schwächeres Schwärmverhalten zeigte. Da eine fehlende LPS-Modifikation keine wirkliche Erklärung für die reduzierte Motilität zu sein schien, wurde mittels STRING nach weiteren Informationen bezüglich der Funktion von Ecp3716 gesucht. In der Datenbank wird Ecp3716 mit einer Wahrscheinlichkeit von 57 % als möglicher funktionaler Partner der Flagellenhaken-Untereinheit FlgE gelistet. Sollte die putative GT Ecp3716 die Funktionalität bzw. Expression von FlgE direkt oder indirekt beeinflussen, wäre ein vermindertes Schwärmverhalten der entsprechenden Deletionsmutante denkbar. Der genaue Zusammenhang muss auch hier in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden.

Für die *E. coli*-Mutante RS7, in der das LPS-Heptosyltransferase II-kodierende Gen *waaF* deletiert vorliegt, konnten die deutlichsten phänotypischen Unterschiede im Vergleich

zum Ausgangsstamm *E. coli* 536 $\Delta rfaH$ festgestellt werden: *E. coli* RS7 zeigte ein verlangsamtes Wachstum in Urin (Abbildung 18), den Verlust von Typ 1-Fimbrien, extreme Reduktion in Biofilmbildung (Abbildung 19) und Schwärmaktivität (Abbildung 20) sowie fehlende Hämolyse auf Blutagar (Abbildung 21). Zudem entsprachen alle auf CR-Agar gebildeten Kolonien dem *saw*-Morphotyp (Tabelle 14). Die LPS-Heptosyltransferase II (WaaF) ist an der Synthese des inneren Kernbereichs des LPS beteiligt, bei der sie die Übertragung des zweiten Heptosezuckers (HepII) auf die Heptosyl-KDO₂-Einheit vermittelt (Gronow *et al.*, 2000). Aus der Literatur ist bekannt, dass Mutationen, die Defekte in der Heptoseregion des inneren Kernbereichs des LPS bewirken bzw. die Modifizierung der Heptoseregion beeinflussen, bei *E. coli* zur Ausprägung des „*deep rough*“-Phänotyps führen (Schnaitman und Klena, 1993; Raetz und Whitfield, 2002). Der „*deep rough*“-Phänotyp zeichnet sich durch eine Reihe von Eigenschaften aus, die kollektiv die Veränderungen in der Struktur und Zusammensetzung der äußeren Membran reflektieren. So weisen Mutanten dieses Phänotyps z.B. eine erhöhte Permeabilität und Instabilität der äußeren Membran auf, die zur Sensitivität der Bakterien gegenüber einer Vielzahl hydrophober Verbindungen, einschließlich Antibiotika, Detergenzien und Gallensalze führen. Zusätzlich lässt sich für die äußere Membran von „*deep rough*“-Mutanten ein reduzierter Proteingehalt feststellen, der auf einer verminderten Expression von Porin-Proteinen basiert. Des Weiteren zeigen Bakterien des „*deep rough*“-Phänotyps eine verstärkte Expression von Colansäure sowie den Verlust von Pili und Flagelle und sekretieren, wenn überhaupt, eine weniger aktive Form des α -Hämolysins (Parker *et al.*, 1992; Stanley *et al.*, 1993; Bauer und Welch, 1997; O'Toole *et al.*, 2000; Raetz und Whitfield, 2002). Die oben beschriebenen Ergebnisse entsprachen klar den Angaben aus der Literatur und charakterisierten *E. coli* RS7 somit als Mutante des „*deep rough*“-Phänotyps.

Die Gene, die in den *E. coli*-Mutanten RS8A/B ($\Delta waaG$) und RS9A/B ($\Delta waaQ$) deletiert wurden, sind ebenfalls dem Gencluster zugeordnet, das für die LPS-Kernbiosynthese kodiert. Das Genprodukt von *waaG* vermittelt die Bindung des ersten Glucosemoleküls (Gluc) an HepII der inneren LPS-Kernregion und ermöglicht so die nachfolgende Synthese der äußeren Kernregion (Parker *et al.*, 1992). WaaQ (LPS-Heptosyltransferase III) ist für die Addition von HepIII an HepII der inneren LPS-Kernregion verantwortlich (Yethon *et al.*,

1998). Da beide GTs an der Modifizierung der Heptoseregion des inneren LPS-Kernbereichs beteiligt sind, war für die entsprechenden Deletionsmutanten zumindest mit einer partiellen Ausprägung des „*deep rough*“-Phänotyps zu rechnen.

Für *waaG* konnte sowohl in *E. coli* 536 als auch in *E. coli* 536 $\Delta rfaH$ eine Deletionsmutante (RS8A und RS8B) generiert werden. Übereinstimmend zeigten beide Deletionsmutanten im Vergleich zum jeweiligen Parentalstamm eine deutlich geringere Biofilmbildung (Abbildung 19), fehlende Schwärm- und Hämolyseaktivität (Abbildung 20 und 21) sowie den Verlust von Typ 1-Fimbrien. Sie waren somit auch als „*deep rough*“-phänotypisch zu identifizieren. Unterschiede zwischen den beiden *waaG*-Mutanten ließen sich dagegen nach Wachstum auf CR-Agar feststellen: Die Kolonien von RS8A zeigten eine erkennbare pinke Färbung, während die von RS8B gebildeten Kolonien eher dem *saw*-Morphotyp entsprachen (Tabelle 14). Bei *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium konnte nach der Deletion von *waaG* eine verringerte Curli-Synthese, dafür aber eine gesteigerte Zelluloseexpression beschrieben werden (Anriany *et al.*, 2006). Möglicherweise bedingt die *waaG*-Deletion auch in *E. coli* 536 eine verstärkte Zellulosesynthese, was durch die pinke Färbung der Kolonien auf CR-Agar angedeutet wird. Der für die Kolonien von *E. coli* RS8B beobachtete *saw*-Morphotyp ließe sich damit erklären, dass hier zusätzlich die Deletion von *rfaH* vorliegt, die sich reduzierend auf die Zelluloseexpression auswirkt.

Die Herstellung einer Deletionsmutante für *waaQ* war ebenfalls sowohl in *E. coli* 536 als auch in *E. coli* 536 $\Delta rfaH$ (RS9A und RS9B) möglich. Interessanterweise wiesen die Phänotypen der beiden Deletionsmutanten deutliche Unterschiede auf. Während *E. coli* RS9A aufgrund der reduzierten Biofilmbildung (Abbildung 19) und des Verlusts von Motilität (Abbildung 20), Hämolyse (Abbildung 21) und Typ 1-Fimbrien als „*deep rough*“-Phänotyp charakterisiert werden konnte, war für *E. coli* RS9B kein phänotypischer Unterschied zum Ausgangsstamm *E. coli* 536 $\Delta rfaH$ erkennbar. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass es sich bei *E. coli* RS9B leider um eine fehlerhafte *waaQ*-Deletionsmutante handelt. Es sollte jedoch nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass die *rfaH*-Deletion in *E. coli* RS9B möglicherweise die Auswirkung der *waaQ*-Deletion beeinflusst bzw. verändert. Ob ein Zusammenhang zwischen den beiden Deletionen besteht, muss in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden.

Die phänotypische Charakterisierung der GT-Deletionsmutanten von *E. coli* Stamm 536 vermittelte einen ersten Eindruck hinsichtlich der Funktionsweise der putativen Enzyme und bestätigte für die schon bekannten Proteine die Angaben aus der Literatur. Auf Basis dieser Ergebnisse ist es jedoch nicht möglich, eine definitive Aussage bezüglich der Ag43-Glykosylierungsfähigkeit der untersuchten GTs zu treffen. Hierzu bedarf es zukünftiger Untersuchungen, für die zunächst die GT-kodierenden Gene in *E. coli* 536 DM deletiert werden sollten. Durch Transformation dieser GT-Mutanten mit den Plasmiden pASK75-His-*agn43a* bzw. pASK75-His-*agn43b* wäre dann eine gezielte Expression und Isolation der Ag43-Varianten sowie eine anschließende Analyse des jeweiligen Glykosylierungsstatus möglich.

Es bleibt anzumerken, dass für das Autotransporterprotein Ag43 eine Modifizierung mit Heptosemolekülen angenommen wird (Sherlock *et al.*, 2006; Knudsen *et al.*, 2008). Somit scheint eine Beteiligung der GTs MdoH, WaaH und WaaG am Glykosylierungsvorgang eher unwahrscheinlich, da für diese GTs bekannt ist, dass sie Hexosen und entsprechende Derivate als Substrat verwenden. Trotzdem darf eine mögliche Substratflexibilität der GTs nicht von vornherein ausgeschlossen werden. Für das glykosylierte trimere Autotransporteradhäsinen EmaA aus *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* wurde von Tang *et al.* (2010) gezeigt, dass es zwischen den GTs, die an der Modifikation von EmaA beteiligt sind, Überlappungen mit den Enzymen der LPS-Biosynthese-Maschinerie gibt. Aufgrund dessen galt EmaA bisher als Einzelfall unter den bekannten glykosylierten Proteinen Gram-negativer Bakterien, deren Glykosylierung unabhängig von den LPS-Biosyntheseenzymen verläuft. Sollten nachfolgende Untersuchungen ergeben, dass an der Glykosylierung von Ag43 ebenfalls Enzyme des LPS-Biosynthesystems beteiligt sind, ist zu vermuten, dass zukünftig noch weitere Autotransporterproteine identifiziert werden können, die dieser Art der Modifizierung unterliegen.

5.3 Vergleichsstudien zum uropathogenen Virulenzpotential ausgewählter *E. coli* Stämme mittels des experimentellen Mausmodells der aufsteigenden Harnwegsinfektion (HWI)

In den letzten Jahren haben die Erkenntnisse aus Untersuchungen, in denen mit experimentellen Tiermodellen der aufsteigenden HWI gearbeitet wurde, deutlich zum besseren Verständnis der UPEC-Pathogenese beigetragen (Hopkins *et al.*, 2003). Hinsichtlich des Verlaufs einer HWI ließ sich für verschiedene UPEC Stämme übereinstimmend ein komplexer Pathogenese-Zyklus feststellen, der sowohl mit der Bildung intrazellulärer Bakteriengemeinschaften (IBCs) als auch mit der Besiedlung extrazellulärer Nischen einhergeht (Hannan *et al.*, 2012). Trotz dieses einheitlich anmutenden Pathogenese-Zyklus konnte bisher kein spezifisches genetisches „Urovirulenzprofil“ beschrieben werden (Wiles *et al.*, 2008). Neuere Studien identifizieren UPEC als eine vielfältige Klasse von *E. coli*, in der sich mehrere, teilweise unterschiedliche Faktoren entwickelt haben, die die Besiedlung der Harnwege ermöglichen. Somit wird das Auslösen einer HWI durch UPEC inzwischen als das Ergebnis eines regulierten Zusammenwirkens unterschiedlicher bakterieller, teilweise stammspezifischer Faktoren angesehen, das nachfolgend zur Ausprägung des generellen Pathogenese-Zyklus führt (Cusumano *et al.*, 2010). Aufgrund dessen war die Charakterisierung des uropathogenen Virulenzpotentials verschiedener *E. coli* Stämme bzw. ausgewählter bakterieller Faktoren im murinen Modell der aufsteigenden HWI ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit.

5.3.1 Untersuchung der *in vivo*-Virulenz und -Fitness von *agn43*-Deletionsmutanten und komplementierten Mutanten

Zur Untersuchung eines möglichen Effekts des Autotransporteradhäsins Ag43 auf den *in vivo*-Infektionsprozess der Harnwege wurde das Virulenzpotential des UPEC Wildtypstammes 536 sowie seiner *agn43*-Deletionmutanten und den entsprechenden Komplementanten im HWI-Mausmodell getestet. Nach der hier untersuchten Infektionszeit von 48 h war für die *agn43*-Deletionmutanten hinsichtlich des Kolonisierungsgrads der Blase kein Unterschied zum Wildtyp festzustellen (Abbildung 23A). Das Ergebnis deutet darauf hin, dass Ag43 bei der initialen Kolonisierung der Blase keine entscheidende Rolle zukommt. Die entsprechende Analyse des Nierengewebes

ergab, dass nur der komplementierte Stamm 536 DM *agn43a*⁺ die Nieren so effizient kolonisieren konnte wie der Wildtyp (Abbildung 23B). Da sich allerdings auch für die *agn43*-Doppelmutante eine erkennbare Tendenz zur Nierenkolonisation abzeichnete, ist es auf Basis dieses Versuchs nicht möglich, eine eindeutige Aussage bezüglich des Einflusses von Ag43 auf die Nierenkolonisierung zu treffen. Jedoch bleibt festzuhalten, dass die bakterielle Belastung des Nierengewebes durch 536 DM *agn43a*⁺ signifikant höher war als durch die *agn43*-Doppelmutante. Für einige in der Literatur beschriebene Mausmodelle der aufsteigenden HWI wurde nachträglich festgestellt, dass die jeweils detektierte Bakterienlast der Nieren auf einen methodisch bedingten vesikorenenalen Reflux zurückzuführen war (Hung *et al.*, 2009). Dieser methodische Fehler kann jedoch hier als Ursache für die beobachtete Nierenkolonisation ausgeschlossen werden, da die mittels gleicher Technik infizierten Versuchstiere der *E. coli* K-12 Kontrollgruppe keine bakterielle Belastung der Nieren aufwiesen. Zusätzlich bleibt anzumerken, dass die Expression von Ag43 phasenvariabel ist und sich *E. coli* Populationen daher heterogen aus Bakterien mit den möglichen Zuständen „Ag43 ON“ und „Ag43 OFF“ zusammensetzen. Chauhan *et al.* (2013) wiesen kürzlich darauf hin, dass die Verwendung von *E. coli* Populationen mit zufälligem „Ag43 ON“- bzw. „Ag43 OFF“-Status durchaus zu Fehlinterpretationen hinsichtlich der Funktion oder Regulation von Ag43 führen kann. Da allerdings vor Beginn der Tierversuche die verwendeten Ag43-exprimierenden *E. coli*-Kulturen mittels Western Blot-Untersuchung auf Anwesenheit des Proteins überprüft wurden, ist eine Verfälschung der hier generierten Ergebnisse durch einen unentdeckten „Ag43 OFF“-Status eher unwahrscheinlich.

Die aus dem Tierversuch abzuleitende Vermutung, dass Ag43 bei der initialen Kolonisierung der Blase keine entscheidende Funktion zukommt, steht nicht im Widerspruch zu vorangegangenen Erkenntnissen: Bisher veröffentlichte *in vivo*-Studien deuten darauf hin, dass Ag43 an der Ausbildung der Langzeitpersistenz des UPEC Stammes CFT073 in Mausblasen beteiligt ist (Ulett *et al.*, 2007). Des Weiteren wurde beschrieben, dass Ag43 zur Aufnahme und zum Überleben von UPEC in neutrophilen Granulozyten beiträgt, was möglicherweise der Umgehung eines der primären Abwehrmechanismen des menschlichen Körpers dient (Fexby *et al.*, 2007). In Übereinstimmung dazu konnte Ag43 in einer epidemiologischen Humanstudie ebenfalls

mit der Persistenz von UPEC in der Blase sowie dem Auftreten wiederkehrender HWI in Verbindung gebracht werden (Lüthje und Brauner, 2010). Aufgrund dieser Informationen sollte die Untersuchung der *agn43*-Deletionmutanten im Mausmodell mit einer längeren Infektionszeit wiederholt werden, um zu überprüfen, ob Ag43 auch bei *E. coli* Stamm 536 das Persistenzverhalten der Bakterien in der Blase beeinflusst.

5.3.2 Untersuchung der *in vivo*-Virulenz und -Fitness von *uvrY*-Komplementanten des *E. coli* Stammes 536

Für den UPEC Stamm CFT073 zeigten Palaniyandi *et al.* (2012), dass Mutationen, die die Funktionalität des Zwei-Komponenten-Systems BarA/UvrY betreffen, zu einer signifikanten Abnahme der Virulenz im murinen HWI-Modell führen. Aufgrund des für *E. coli* CFT073 beschriebenen Effekts wurde in der vorliegenden Arbeit überprüft, ob im Umkehrschluss dazu die Komplementation von *uvrY* in der natürlichen *uvrY*-Deletionsmutante *E. coli* 536 auch eine Veränderung im Virulenzverhalten dieses Bakterienstammes bewirkt. Da die *E. coli* 536 *uvrY*-Komplementante zur Colibactin-Synthese befähigt ist (Homburg, 2007), wurde zusätzlich mit einer Colibactin-negativen *uvrY*-Komplementante von *E. coli* 536 gearbeitet, um mögliche auf das Genotoxin rückführbare Veränderungen in der Virulenzeigenschaft erkennbar zu machen. Interessanterweise erwies sich die Colibactin-positive *uvrY*-Komplementante als weniger virulent als der wildtypische UPEC Stamm 536. Der für sie detektierbare Kolonisierungsgrad von Blase und Nieren nach der untersuchten Infektionszeit von 48 h entsprach lediglich dem des apathogenen Kontrollstammes *E. coli* MG1655 (Abbildung 24). Die bakterielle Belastung der Blase durch die Colibactin-negative *uvrY*-Komplementante stimmte dagegen mit der des Wildtyps überein (Abbildung 24A). Hinsichtlich der Fähigkeit zur Nierenkolonisierung war für die Colibactin-negative *uvrY*-Komplementante allerdings auch nur eine leicht positive Tendenz festzustellen (Abbildung 24B).

Als mögliche Ursache für die reduzierte Virulenzeigenschaft der Colibactin-positiven *uvrY*-Komplementante kann die zusätzliche metabolische Belastung dieser Bakterien durch die Colibactin-Synthese vermutet werden. Für die Expression eines „Fremdproteins“ kommt es in den Wirtszellen bekanntlich zum Verbrauch zellulärer Ressourcen, die daraufhin im eigentlichen Wirtszellstoffwechsel fehlen (Corchero und Villaverde, 1998). Die so entstandene Stoffwechselbelastung kann zu Veränderungen in der Biochemie und

Physiologie der Wirtszellen, wie z.B. einer Reduktion des Zellwachstums oder der generellen Proteinsynthese führen und somit eine Abschwächung der bakteriellen Virulenz zur Folge haben. Da Bakterien des wildtypischen UPEC Stammes 536 normalerweise kein Colibactin bilden, ist die durch die *uvrY*-Komplementation hervorgerufene Genotoxin-Synthese als metabolische Last und infolgedessen als wahrscheinliche Erklärung für die reduzierte Virulenz der Komplementante zu werten. Zusätzlich ist anzumerken, dass die hier ermittelten Ergebnisse keinen Hinweis auf einen Effekt von Colibactin auf den *in vivo*-Infektionsprozess der Harnwege lieferten. Diese Beobachtung stimmt mit der Microarray-basierten Studie von Hagan *et al.* (2010) überein, in der bei der Untersuchung von HWI-Patientenisolaten ebenfalls keine Korrelation zwischen Colibactin-Expression und dem Auslösen einer HWI zu erkennen war. Die bakterielle Belastung der Blase durch die Colibactin-negative *uvrY*-Komplementante entsprach der des wildtypischen UPEC 536, was darauf hindeutet, dass sich die Colibactin-unabhängige Expression von UvrY in *E. coli* 536 - zumindest in der Mausblase - nicht verändernd auf das Virulenzverhalten des Bakterienstammes auswirkt. Da die Colibactin-negative *uvrY*-Komplementante jedoch eine im Vergleich zum Wildtyp reduzierte Fähigkeit zur Nierenkolonisierung zeigte, müssen zukünftige Untersuchungen klären, ob und wenn ja, wie die UvrY-Expression in *E. coli* 536 die Besiedlung der Nieren beeinträchtigt.

Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei dem uropathogenen *E. coli* Stamm 536 um eine natürliche *uvrY*-Deletionsmutante handelt, scheint das Zwei-Komponenten-System BarA/UvrY für das Hervorrufen einer HWI nicht essentiell zu sein. Es ist jedoch zu vermuten, dass sich in *E. coli* 536 vergleichbare Mechanismen entwickelt haben, die das Fehlen von UvrY kompensieren und ebenfalls an der Virulenzregulation beteiligt sind. Interessanterweise erfolgt die Regulation der bakteriellen Virulenz über das BarA/UvrY-System in *E. coli* CFT073 teilweise nur indirekt. Einige Virulenzeigenschaften werden von Komponenten des Csr („carbon storage regulator“-)Systems moduliert, die jedoch ihrerseits der Regulation durch BarA/UvrY unterliegen. Das Csr-System in *E. coli* besteht aus dem RNA-bindenden Protein CsrA und den zwei kleinen nicht-kodierenden regulatorischen RNAs CsrB und CsrC (Romeo, 1998). UvrY stimuliert die Transkription der zwei RNAs CsrB und CsrC, die daraufhin an CsrA binden und so der Aktivität von CsrA

entgegenwirken (Suzuki *et al.*, 2002; Weilbacher *et al.*, 2003). Romeo *et al.* (2012) konnten zeigen, dass CsrA für die Regulation mehrere Virulenzgene in *E. coli* verantwortlich ist. Mutationen in *csrA* bewirken beispielsweise im uropathogenen *E. coli* Stamm CFT073 eine Erhöhung der Virulenz (Palaniyandi *et al.*, 2012). Da das Csr-System in *E. coli* 536 ebenfalls exprimiert wird, lässt sich vermuten, dass CsrA auch in diesem UPEC Stamm eine Virulenz-regulierende Funktion zukommt. Ein Schwerpunkt zukünftiger Studien sollte somit auf der Charakterisierung des Csr-Systems und seiner Regulation in *E. coli* Stamm 536 liegen. Des Weiteren wäre die Untersuchung der *in vivo*-Virulenz einer *csrA*-Deletionsmutante von *E. coli* 536 im HWI-Tiermodell von Interesse, um zu überprüfen, ob die Mutation wie in *E. coli* CFT073 eine Erhöhung der Virulenz verursacht.

5.3.3 Untersuchungen zur *in vivo*-Virulenz und -Persistenz einer *pgaABCD*-Deletionsmutante des UPEC Stammes UT189

Die Ergebnisse mikrobiologischer Studien der letzten Jahre lieferten vermehrt Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Etablierung einer HWI und den von UPEC gebildeten, intrazellulären biofilmartigen Strukturen (IBCs) in der Blase (Anderson *et al.*, 2003; Kau *et al.*, 2005). In Untersuchungen der *in vitro*-Biofilmbildung von *E. coli* K-12 Stämmen konnte zudem das Exopolysaccharid PGA als eine der Biofilm-Hauptstrukturkomponenten identifiziert werden (Romeo *et al.*, 1993). Aufgrund dieser Erkenntnisse liegt die Vermutung nahe, dass die Bildung der IBCs in der Blase ebenfalls zu einem großen Teil von dem Vorhandensein von PGA abhängt, wodurch dem Exopolysaccharid bei der Ausprägung einer HWI eine essentielle Rolle zukommen würde. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit die Virulenz- und Persistenzeigenschaft einer PGA-Deletionsmutante des UPEC Stammes UT189 im Mausmodell der experimentellen HWI getestet. Als uropathogene Positivkontrolle diente der wildtypische UPEC Stamm UT189.

Im Verlauf der untersuchten Kurzzeit-Infektion von drei Tagen entsprach die bakterielle Belastung der Blase durch die PGA-Deletionsmutante der des Wildtypstammes (Abbildung 25A). Das Ergebnis deutet darauf hin, dass die PGA-Deletion in *E. coli* UT189 keine nachteilige Auswirkung auf die initiale Anhaftungsphase der Bakterien an das Blasengewebe der Versuchstiere hat. Dies steht in Übereinstimmung mit der derzeit gültigen Annahme, dass die initiale Anhaftung und nachfolgende irreversible Bindung

der Bakterien an Oberflächen - die ersten Schritte in der Biofilmbildung - überwiegend durch Typ 1- und Curli-Fimbrien sowie dem Autotransporteradhäsın Ag43 bedingt werden (Beloin *et al.*, 2008; Mika und Hengge, 2013).

Im Gegensatz dazu offenbarte die Analyse der bakteriellen Infektionskinetik über einen Untersuchungszeitraum von drei Wochen einen deutlichen Unterschied zwischen PGA-Deletionsmutante und Wildtyp. Während der durchschnittliche Kolonisierungsgrad der Blase durch den Wildtyp innerhalb der ersten zwei Wochen nach Infektion ca. 10^5 CFU/g Gewebe betrug und teilweise sogar ein Kolonisierungsanstieg zu verzeichnen war, stagnierte die bakterielle Belastung der Blase durch die PGA-Deletionsmutante in der ersten Woche bei 10^4 CFU/g Gewebe und verringerte sich in den nachfolgenden Tagen drastisch (Abbildung 25B). In der zweiten und dritten Woche nach Infektion war eine Kolonisierung der Blase durch die PGA-Deletionsmutante nicht mehr nachweisbar. Zwar ließ sich drei Wochen nach Infektion auch für den wildtypische UPEC UTI89 ein Rückgang in der bakteriellen Organlast beobachten, sie lag jedoch weiterhin im gut detektierbaren Bereich (Abbildung 25B). Da die IBCs für die Manifestierung des Akutstadiums einer HWI eine wichtige Rolle spielen und PGA zumindest *in vitro* deutlich zur Reifung/Stabilisierung von Biofilmen beiträgt (Mika und Hengge, 2013), stützen die Ergebnisse die Theorie, dass PGA für die Bildung der IBCs in der Blase benötigt wird. Um diesbezüglich detailliertere Informationen zu erlangen, wäre es sinnvoll, das Blasengewebe der Versuchsgruppen eine Woche nach der transurethralen Inokulation histologisch zu untersuchen. Unter der Voraussetzung, dass PGA wie vermutet die IBC-Bildung entscheidend beeinflusst, sollten sich dann im Blasengewebe der mit der PGA-Deletionsmutante infizierten Versuchstiere keine bzw. nur unvollständig ausgeprägte IBCs nachweisen lassen. Da für den wildtypischen UPEC Stamm UTI89 auch noch drei Wochen nach der Infektion Bakterien im Blasengewebe der Versuchstiere detektiert werden konnten (Abbildung 25B), identifizieren die Ergebnisse das Exopolysaccharid PGA als einen bestimmenden Faktor für das längerfristige Überleben von *E. coli* UTI89 in der Mausblase. Der genaue Zusammenhang von PGA und der Fähigkeit der Bakterien zu persistieren muss jedoch mittels zukünftiger Versuche noch weiter untersucht werden. Dabei gilt es unter anderem zu klären, ob PGA auch an der Ausbildung der für die Persistenz charakteristischen QIRs („*quiescent intracellular reservoirs*“) beteiligt ist. Für nachfolgende Persistenzuntersuchungen sollte zudem ein längerer Versuchszeitraum in Betracht gezogen werden.

Da der wildtypische UPEC Stamm 536 ebenfalls zur PGA-Synthese befähigt ist, würde sich zusätzlich die Untersuchung einer PGA-Deletionsmutante dieses Stammes anbieten, um den Einfluss von PGA auf die Virulenzeigenschaft beider UPEC Stämme vergleichen zu können.

5.3.4 Untersuchung der *in vivo*-Virulenz und -Fitness von atypischen UPEC-Isolaten

Toval *et al.* (2014) konnten zeigen, dass Krankenhaus-assoziierte HWI nicht nur durch klassische UPEC Stämme hervorgerufen werden, sondern häufig auch von *E. coli* Stämmen, deren genetischer Hintergrund sich von dem typischer UPEC-Varianten unterscheidet. Die in der Studie von Toval *et al.* positiv auf spezifische UPEC-Virulenzmarker getesteten HWI-Isolate wurden als atypische UPEC (aUPEC) bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Virulenzverhaltens im HWI-Mausmodell von vier ausgewählten aUPEC-Isolaten ein weiteres Ziel. Bei den Isolaten handelte es sich um drei als STEC charakterisierte Stämme (UR131, UR5703/202, UR5779/201) sowie einen als EAEC identifizierten Stamm (UR1352).

Interessanterweise zeigten die drei STEC-Stämme nach der hier untersuchten Infektionszeit von 48 h Unterschiede in der Virulenzeigenschaft: Im Vergleich zum UPEC Stamm 536 wies das STEC-Isolat UR131 eine signifikant höhere bakterielle Belastung von sowohl Blasen- als auch Nierengewebe auf (Abbildung 26). Das STEC-Isolat UR5703/202 war ebenfalls zur Kolonisierung von Blase und Nieren befähigt, allerdings weit weniger effizient als die UPEC-Kontrolle (Abbildung 26). Für STEC-Isolat UR5779/201 ließ sich weder Blasen- noch Nierenkolonisierung nachweisen (Abbildung 26). Aus vorangegangenen Untersuchungen ist bekannt, dass es sich bei dem STEC-Isolat UR5779/201 um einen *fimH*-negativen Stamm handelt. Die STEC-Isolate UR131 und UR5703/202 wurden dagegen positiv auf Typ 1-Fimbrien getestet (Toval, 2014). Typ 1-Fimbrien spielen im murinen HWI-Modell für die initiale Adhärenz der Bakterien an die Blasenepithelzellen und somit für das Auslösen einer HWI eine wichtige Rolle (Gunther IV *et al.*, 2002). Die nicht vorhandene Fähigkeit zur Organkolonisierung durch STEC-Isolat UR5779/201 ist daher mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das Fehlen der Typ 1-Fimbrien zurückzuführen. Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei dem stark kolonisierenden STEC-Isolat UR131 um einen LEE-negativen Stamm handelt, scheint die Fähigkeit der STEC-Isolate, eine HWI hervorzurufen, nicht vom Vorhandensein der LEE-Pathogenitätsinsel abzuhängen. Da

allerdings das STEC-Isolat UR131 als Einziges Shiga Toxin 1 exprimiert, sollten zukünftige Untersuchungen klären, ob zwischen der deutlich erhöhten Virulenz dieses STEC-Isolats und dem Vorhandensein von Shiga Toxin 1 ein möglicher Zusammenhang besteht (z.B. durch Wiederholung des Versuchs mit einer *stx1*-Deletionsmutante von STEC-Isolat UR131).

Für den EAEC Stamm UR1352 konnte im murinen HWI-Modell ebenfalls urovirentes Potential festgestellt werden (Abbildung 26). Der für das Isolat detektierbare Kolonisierungsgrad der Organe entsprach dem der UPEC-Kontrolle 536. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen für die STEC-Isolate handelt es sich bei dem zur Kolonisierung befähigten EAEC-Isolat auch um einen positiv auf Typ 1-Fimbrien getesteten Stamm (Toval, 2014). Das Ergebnis steht in Einklang mit vorangegangenen Studien, in denen EAEC-Bakterien in *in vitro*-Versuchen eine starke Adhärenz an humane Urothelzellen zeigten, die teilweise sogar höher ausfiel als die der uropathogenen Kontrollstämme (Yamamoto *et al.*, 1991; Boll *et al.*, 2013). Als wahrscheinlichste Ursache für die beobachtete bakterielle Adhärenz wurden auch hier die exprimierten Typ 1-Fimbrien identifiziert (Boll *et al.*, 2013). Es bleibt anzumerken, dass auf Basis der in der vorliegenden Arbeit generierten Ergebnisse eine Beteiligung der EAEC-spezifischen „aggregative Adhärenz-Fimbrien“ (AAF) an der Kolonisierung von Blase und Nieren der Versuchstiere nicht auszuschließen ist. Um dies genauer zu überprüfen, sollte der Versuch mit AAF-Deletionsmutanten von Stamm UR1352 wiederholt werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass für die zur Kolonisierung befähigten zwei STEC-Isolate sowie das EAEC-Isolat übereinstimmend nur die Typ 1-Fimbrien als charakteristischer ExPEC-Virulenzmarker zu ermitteln waren. Weitere ExPEC-Determinanten (wie z.B. P-, S- oder F1C-Fimbrien und Dr-Adhäsine) bzw. UPEC-spezifische Virulenzfaktoren (wie z.B. Toxine oder Siderophorsysteme) konnten nicht nachgewiesen werden (Toval, 2014). Für zukünftige Versuche sollten somit *fim*-Deletionsmutanten der Isolate generiert werden, um zu untersuchen, in welchem Ausmaß die Typ 1-Fimbrien zur Fähigkeit der IPEC-Isolate zum Auslösen einer aufsteigenden HWI beitragen. Des Weiteren könnte das Arbeiten mit den *fim*-Deletionsmutanten Hinweise darauf liefern, ob die Isolate weitere Virulenz-assoziierte Faktoren exprimieren, die die Ausprägung einer HWI fördern. Die Ergebnisse des Versuchs deuten klar darauf hin, dass die Fähigkeit, eine

HWI auszulösen, in die Nieren aufzusteigen und diese zu kolonisieren, nicht auf typische UPEC-Isolate beschränkt ist. Jedoch bedarf es weiterer Studien, unter anderem der systematischen Analyse der aUPEC-Isolate, um diese Beobachtung zu bestätigen.

5.3.5 Untersuchung der *in vivo*-Virulenz und -Fitness von STEC O2:H6-Isolaten

Nachdem für den Ausbruchstamm der HUS-Epidemie 2011, *E. coli* O104:H4, eine bisher einzigartige Kombination typischer STEC- und EAEC-Virulenzgene beschrieben wurde und der Stamm auch phänotypisch die Besonderheiten beider Pathogruppen zeigt (Bielaszewska *et al.*, 2011; Karch *et al.*, 2012), hat die Identifizierung hybrider Pathogene klar an klinischer Bedeutung gewonnen. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnten STEC-Isolate des Serotyps O2:H6 ebenfalls als hybride Pathogene charakterisiert werden (Bielaszewska *et al.*, 2014). Dafür wurde gezeigt, dass die aus Patienten mit Durchfall isolierten O2:H6-Stämme sowohl STEC- als auch UPEC-assoziierte Virulenzfaktoren exprimieren und phylogenetisch zwischen HUSEC und ExPEC Stämmen (hier UPEC und MNEC Stämme) einzuordnen sind.

Ziel der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchung war die Charakterisierung der Virulenzeigenschaft von drei STEC O2:H6-Isolaten (Stämme 03-08304, 04-00955 und 05-00787) im Mausmodell der experimentellen HWI. Dabei galt es zudem, das heteropathogene klinische Potential der STEC-Isolate zu bestätigen. Für alle drei Stämme war 48 h nach der Infektion eine Befähigung zur Blasenkolonisierung der Versuchstiere feststellbar (Abbildung 27A). Die detektierbare Bakterienlast der Blasen war jeweils signifikant höher als die des apathogenen *E. coli* K-12 Stammes MG1655. Allerdings zeigte nur STEC O2:H6-Isolat 03-08304 eine dem UPEC Stamm 536 entsprechend starke Kolonisation der Blase. Die Kolonisierung der Nieren erfolgte dagegen durch alle drei STEC O2:H6-Isolate so effizient wie durch den Wildtypstamm 536 (Abbildung 27B). Das Ergebnis zeigt, dass die STEC O2:H6-Isolate zumindest im hier angewandten Modell ein uropathogenes Virulenzpotential besitzen, das in etwa dem des UPEC Stammes 536 entspricht. Da die getesteten Isolate ursprünglich aus Durchfallpatienten isoliert wurden, bestätigt sich somit der heteropathogenen Charakter von STEC O2:H6.

Bei STEC O2:H6 scheint es sich um eine „Zwischenstation“ zwischen den Hauptgruppen pathogener *E. coli* zu handeln. Die heteropathogene Virulenzeigenschaft von STEC O2:H6 deutet zudem darauf hin, dass pathogene *E. coli* nicht nur über den einfachen linearen Erwerb von Virulenz-Loci durch nicht-pathogene *E. coli* Stämme entstehen können. Sie verweist auf ein Modell, in dem es *E. coli*-Pathogruppen möglich ist, sukzessive Sätze an Virulenzgenen gegen die anderer Pathogruppe zu tauschen. Hierdurch blieben pathogenen *E. coli*, die einer bestimmten phylogenetischen Position zugeordnet sind, alternative Virulenzoptionen gewahrt. Mit Hilfe breiter aufgestellter Untersuchungen muss in Zukunft geklärt werden, ob es sich bei dieser Form der Erregerentstehung um einen generalisierten Mechanismus handelt oder ob es sich um ein STEC O2:H6-spezifisches Phänomen handelt.

5.4 Abschließende Worte und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Aspekte der Virulenzeigenschaft uropathogener *E. coli*, insbesondere am Beispiel des wildtypischen UPEC Stammes 536 näher beleuchtet. Die gewonnenen Erkenntnisse bestätigen im Abgleich mit den Ergebnissen bisher veröffentlichter UPEC-Studien die derzeit gültige Theorie, dass sich für UPEC kein genereller Virulenzmechanismus beschreiben lässt, sondern dass eine HWI aufgrund des regulierten Zusammenwirkens mehrerer bakterieller, teilweise stammspezifischer Faktoren ausgelöst wird. Zudem wurde am Beispiel atypischer UPEC Isolate untersucht, inwieweit pathogene *E. coli* Varianten, denen die charakteristischen Virulenzfaktoren von ExPEC fehlen, in der Lage sind, eine aufsteigende HWI zu verursachen. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass diese Fähigkeit nicht auf Isolate typischer phylogenetischer UPEC Entwicklungslinien beschränkt und auf das Vorhandensein charakteristischer UPEC Virulenzfaktoren angewiesen ist.

Um die Interaktion der unterschiedlichen bakteriellen Faktoren bei einer HWI zukünftig besser untersuchen zu können, sollte über die Anwendung der „RNA-Seq“-Methode nachgedacht werden. Der Einsatz dieser „Next-Generation-Sequencing“-Technik ermöglicht einen detaillierteren Einblick in die transkriptionelle Regulation verschiedener Virulenzfaktoren sowie auf eventuelle Beziehungen der Faktoren zueinander. Die so gewonnenen Informationen könnten unter anderem einen großen Beitrag zur Entwicklung neuer Therapieformen bzw. Impfstoffe gegen HWI leisten, die aufgrund des Anstiegs von Antibiotikaresistenzen sowie nosokomialer Infektionen und der damit verbundenen ökonomischen Auswirkung zunehmend an Bedeutung gewinnen.

6 Literatur

- Abraham, S., Chapman, T. A., Zhang, R., Chin, J., Mabbett, A. N., Totsika, M. und Schembri, M. A. (2012). Molecular characterization of *Escherichia coli* strains that cause symptomatic and asymptomatic urinary tract infections. *J. Clin. Microbiol.* **50**(3): 1027–1030.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403–410.
- Anderson, G. G., Palermo, J. J., Schilling, J. D., Roth, R., Heuser, J. und Hultgren, S. J. (2003). Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science*. **301**(5629): 105–107.
- Anriany, Y., Sahu, S. N., Wessels, K. R., McCann, L. M. und Joseph, S. W. (2006). Alteration of the rugose phenotype in *waaG* and *ddhC* mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 is associated with inverse production of curli and cellulose. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**(7): 5002–5012.
- Arthur, M., Johnson, C. E., Rubin, R. H., Arbeit, R. D., Campanelli, C., Kim, C., Steinbach, S., Agarwal, M., Wilkinson, R. und Goldstein, R. (1989). Molecular epidemiology of adhesin and hemolysin virulence factors among uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **57**(2): 303–313.
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., Gasteiger, E., Grosdidier, A., Hernandez, C., Ioannidis, V., Kuznetsov, D., Liechti, R., Moretti, S., Mostaguir, K., Redaschi, N., Rossier, G., Xenarios, I. und Stockinger, H. (2012). ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res.* **40**(W1): W597–W603.
- Barnard, T. J., Dautin, N., Lukacik, P., Bernstein, H. D. und Buchanan, S. K. (2007). Autotransporter structure reveals intra-barrel cleavage followed by conformational changes. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**(12): 1214–1220.
- Barnett, B. J. und Stephens, D. S. (1997). Urinary tract infection: an overview. *Am. J. Med. Sci.* **314**(4): 245–249.
- Bauer, M. E. und Welch, R. A. (1997). Pleiotropic effects of a mutation in *rfaC* on *Escherichia coli* hemolysin. *Infect. Immun.* **65**(6): 2218–2224.

- Beloin, C., Michaelis, K., Lindner, K., Landini, P., Hacker, J., Ghigo, J. M. und Dobrindt, U. (2006). The transcriptional antiterminator RfaH represses biofilm formation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**(4): 1316–1331.
- Beloin, C., Roux, A. und Ghigo, J. M. (2008). *Escherichia coli* biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **322**: 249–289.
- Benz, I. und Schmidt, M. A. (1989). Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **57**(5): 1506–1511.
- Benz, I. und Schmidt, M. A. (1992). AIDA-I, the adhesin involved in diffuse adherence of the diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule. *Mol. Microbiol.* **6**(11): 1539–1546.
- Benz, I. und Schmidt, M. A. (2001). Glycosylation with heptose residues mediated by the *aah* gene product is essential for adherence of the AIDA-I adhesin. *Mol. Microbiol.* **40**(6): 1403–1413.
- Benz, I. und Schmidt, M. A. (2011). Structures and functions of autotransporter proteins in microbial pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* **301**(6): 461–468.
- Benz, I., van Alen, T., Bolte, J., Wörmann, M. E. und Schmidt, M. A. (2010). Modulation of transcription and characterization of the promoter organization of the autotransporter adhesin heptosyltransferase and the autotransporter adhesin AIDA-I. *Microbiology.* **156**(Pt 4): 1155–1166.
- Berger, H., Hacker, J., Juarez, A., Hughes, C. und Goebel, W. (1982). Cloning of the chromosomal determinants encoding hemolysin production and mannose-resistant hemagglutination in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **152**(3): 1241–1247.
- Bielaszewska, M., Mellmann, A., Bletz, S., Zhang, W., Kock, R., Kossow, A., Prager, R., Fruth, A., Orth-Holler, D., Marejkova, M., Morabito, S., Caprioli, A., Piérard, D., Smith, G., Jenkins, C., Curová, K. und Karch, H. (2013). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H⁻: a new virulent clone emerges in Europe. *Clin. Infect. Dis.* **56**(10): 1373–1381.
- Bielaszewska, M., Mellmann, A., Zhang, W., Köck, R., Fruth, A., Bauwens, A., Peters, G. und Karch, H. (2011). Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect. Dis.* **11**(9): 671–676.

- Bielaszewska, M., Schiller, R., Lammers, L., Bauwens, A., Fruth, A., Middendorf, B., Schmidt, M. A., Tarr, P. I., Dobrindt, U., Karch, H. und Mellmann, A. (2014). Heteropathogenic virulence and phylogeny reveal phased pathogenic metamorphosis in *Escherichia coli* O2:H6. *EMBO Mol. Med.* **6**(3): 347–357.
- Blattner, F. R., Plunkett, G. 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. und Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science.* **277**(5331): 1453–1462.
- Blomfield, I.C., McClain, M. S., Princ, J.A., Calie, P.J. und Eisenstein, B. I. (1991). Type 1 fimbriation and *fimE* mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **173**(17): 5298–5307.
- Blum, G., Falbo, V., Caprioli, A. und Hacker, J. (1995a). Gene clusters encoding the cytotoxic necrotizing factor type 1, Prs-fimbriae and alpha-hemolysin form the pathogenicity island II of the uropathogenic *Escherichia coli* strain J96. *FEMS Microbiol. Lett.* **126**(2): 189–195.
- Blum, G., Marre, R. und Hacker, J. (1995b). Properties of *Escherichia coli* strains of serotype O6. *Infection.* **23**(4): 234–236.
- Bobrov, A. G., Kirillina, O., Forman, S., Mack, D. und Perry, R. D. (2008). Insights into *Yersinia pestis* biofilm development: topology and co-interaction of Hms inner membrane proteins involved in exopolysaccharide production. *Environ. Microbiol.* **10**(6): 1419–1432.
- Bohin, J. P. und Kennedy, E. P. (1984). Mapping of a locus (*mdoA*) that affects the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **157**(3): 956–957.
- Bohin, J. P. und Lacroix, J. M. (2006). Osmoregulation in the periplasm in Ehrmann, M. (Hrsg.) *The Periplasm. American Society for Microbiology, Washington.* pp 325–341.
- Bokranz, W., Wang, X., Tschäpe, H. und Römling, U. (2005). Expression of cellulose and curli fimbriae by *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract. *J. Med. Microbiol.* **54**(Pt 12): 1171–1182.
- Boll, E. J., Struve, C., Boisen, N., Olesen, B., Stahlhut, S. G. und Krogfelt, K. A. (2013). Role of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in uropathogenesis. *Infect. Immun.* **81**(4): 1164–1171.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brüssow, H., Canchaya, C. und Hardt, W. D. (2004). Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**(3): 560–602.
- Brzuszkiewicz, E., Brüggemann, H., Liesegang, H., Emmerth, M., Olschlager, T., Nagy, G., Albermann, K., Wagner, C., Buchrieser, C., Emödy, L., Gottschalk, G., Hacker, J. und Dobrindt, U. (2006). How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**(34): 12879–12884.
- Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V. und Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* **37**(Database issue): D233–238.
- Carniel, E. (1999). The *Yersinia* high-pathogenicity island. *Int. Microbiol.* **2**(3): 161–167.
- Carniel, E., Guilvout, I. und Prentice, M. (1996). Characterization of a large chromosomal "high-pathogenicity island" in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* **178**(23): 6743–6751.
- Carzaniga, T., Antoniani, D., Dehò, G., Briani, F. und Landini, P. (2012). The RNA processing enzyme polynucleotide phosphorylase negatively controls biofilm formation by repressing poly-N-acetylglucosamine (PNAG) production in *Escherichia coli* C. *BMC Microbiol.* **12**: 270.
- Charbonneau, M. E. und Mourez, M. (2007). Functional organization of the autotransporter adhesin involved in diffuse adherence. *J. Bacteriol.* **189**(24): 9020–9029.
- Charbonneau, M. E. und Mourez, M. (2008). The *Escherichia coli* AIDA-I autotransporter undergoes cytoplasmic glycosylation independently of export. *Res. Microbiol.* **159**(7-8): 537–544.
- Charbonneau, M. E., Berthiaume, F. und Mourez, M. (2006). Proteolytic processing is not essential for multiple functions of the *Escherichia coli* autotransporter adhesin involved in diffuse adherence (AIDA-I). *J. Bacteriol.* **188**(24): 8504–8512.
- Charbonneau, M. E., Côté, J. P., Haurat, M. F., Reiz, B., Crépin, S., Berthiaume, F., Dozois, C. M., Feldman, M. F. und Mourez, M. (2012). A structural motif is the recognition site for a new family of bacterial protein O-glycosyltransferases. *Mol. Microbiol.* **83**(5): 894–907.

- Charbonneau, M. E., Girard, V., Nikolakakis, A., Campos, M., Berthiaume, F., Dumas, F., Lépine, F. und Mourez, M. (2007). O-linked glycosylation ensures the normal conformation of the autotransporter Adhesion Involved in Diffuse Adherence. *J. Bacteriol.* **189**(24): 8880–8889.
- Charbonneau, M. E., Janvore, J. und Mourez, M. (2009). Autoprocessing of the *Escherichia coli* AIDA-I autotransporter: a new mechanism involving acidic residues in the junction region. *J. Biol. Chem.* **284**(25): 17340–17351.
- Chauhan, A., Sakamoto, C., Ghigo, J. M. und Beloin, C. (2013). Did I pick the right colony? Pitfalls in the study of regulation of the phase variable antigen 43 adhesin. *PLoS One.* **8**(9): e73568.
- Chen, S. L., Hung, C. S., Xu, J., Reigstad, C. S., Magrini, V., Sabo, A., Blasiar, D., Bieri, T., Meyer, R. R., Ozersky, P., Armstrong, J. R., Fulton, R. S., Latreille, J. P., Spieth, J., Hooton, T. M., Mardis, E. R., Hultgren, S. J. und Gordon, J. I. (2006). Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of *Escherichia coli*: a comparative genomics approach. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**(15): 5977–5982.
- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E. und Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ. Microbiol. Rep.* **5**(1): 58–65.
- Corchero, J. L. und Villaverde, A. (1998). Plasmid maintenance in *Escherichia coli* recombinant cultures is dramatically, steadily, and specifically influenced by features of the encoded proteins. *Biotechnol. Bioeng.* **58**(6): 625–632.
- Côté, J. P., Charbonneau, M. E. und Mourez, M. (2013). Glycosylation of the *Escherichia coli* TibA self-associating autotransporter influences the conformation and the functionality of the protein. *PLoS One.* **8**(11): e80739.
- Coutinho, P. M., Deleury, E., Davies, G. J. und Henrissat, B. (2003). An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J. Mol. Biol.* **328**(2): 307–317.
- Croxen, M. A. und Finlay, B. B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**(1): 26–38.
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M. und Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **26**(4): 822–880.
- Cusumano, C. K., Hung, C. S., Chen, S. L. und Hultgren, S. J. (2010). Virulence plasmid harbored by uropathogenic *Escherichia coli* functions in acute stages of pathogenesis. *Infect. Immun.* **78**(4): 1457–1467.

- Danese, P. N., Pratt, L. A. und Kolter, R. (2000). Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J. Bacteriol.* **182**(12): 3593–3596.
- Datsenko, K. A. und Wanner, B. L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 6640–6645.
- Dautin, N. und Bernstein, H. D. (2007). Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**: 89–112.
- Desvaux, M., Parham, N. J. und Henderson, I. R. (2004). The autotransporter secretion system. *Res. Microbiol.* **155**(2): 53–60.
- Diderichsen, B. (1980). *flu*, a metastable gene controlling surface properties of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **141**(2): 858-867.
- Dobrindt, U. (2010). Virulenzfaktoren uropathogener Erreger. *Der Urologe.* **49**(5): 598–605.
- Dobrindt, U., Agerer, F., Michaelis, K., Janka, A., Buchrieser, C., Samuelson, M., Svanborg, C., Gottschalk, G., Karch, H. und Hacker, J. (2003). Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays. *J. Bacteriol.* **185**(6): 1831–1840.
- Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Hartsch, T., Gottschalk, G., Ron, E. Z., Fünfstück, R. und Hacker, J. (2001). S-Fimbria-encoding determinant *sfa(I)* is located on pathogenicity island III(536) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect. Immun.* **69**(7): 4248–4256.
- Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Nagy, G., Schneider, G., Johann, A., Gottschalk, G. und Hacker, J. (2002). Genetic structure and distribution of four pathogenicity islands (PAI I(536) to PAI IV(536)) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect. Immun.* **70**(11): 6365–6372.
- Donnenberg, M. S. (Hrsg.) (2002). *Escherichia coli*: Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen. *Academic Press*.
- Donnenberg, M. S. (Hrsg.) (2013). *Escherichia coli*: Pathotypes and Principles of Pathogenesis. *Academic Press*.
- Duriez, P., Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., Chaventré, A., Elion, J., Picard, B. und Denamur, E. (2001). Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology* **147**: 1671–1676.

- Ebel, W., Vaughn, G. J., Peters 3rd, H. K. und Trempy, J. E. (1997). Inactivation of *mdoH* leads to increased expression of colanic acid capsular polysaccharide in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**(21): 6858–6861.
- Emödy, L., Kerényi, M. und Nagy, G. (2003). Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **22** Suppl 2: 29–33.
- Escherich, T. (1886). Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehungen zur Physiologie der Verdauung. *Ferdinand Enke, Stuttgart*.
- Fexby, S., Bjarnsholt, T., Jensen, P. Ø., Roos, V., Høiby, N., Givskov, M. und Klemm, P. (2007). Biological Trojan horse: antigen 43 provides specific bacterial uptake and survival in human neutrophils. *Infect. Immun.* **75**(1): 30–34.
- Fives-Taylor, P. M., Meyer, D. H, Mintz, K. P. und Brissette, C. (1999). Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol 2000.* **20**: 136–167.
- Foxman, B. (2010). The epidemiology of urinary tract infection. *Nat. Rev. Urol.* **7**(12): 653–660.
- Franceschini, A., Szklarczyk, D., Frankild, S., Kuhn, M., Simonovic, M., Roth, A., Lin, J., Minguez, P., Bork, P., von Mering, C. und Jensen, L. J. (2013). STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res.* **41**(Database issue): D808–815.
- Galen, J. E., Wang, J. Y., Chinchilla, M., Vindurampulle, C., Vogel, J. E., Levy, H., Blackwelder, W. C., Pasetti, M. F. und Levine, M. M. (2010). A new generation of stable, nonantibiotic, low-copy-number plasmids improves immune responses to foreign antigens in *Salmonella enterica* serovar Typhi live vectors. *Infect. Immun.* **78**(1): 337–347.
- Gastmeier, P., Kampf, G., Wischnewski, N., Hauer, T., Schulgen, G., Schumacher, M., Daschner, F. und Rüden, H. (1998). Prevalence of nosocomial infections in representative German hospitals. *J. Hosp. Infect.* **38**(1): 37–49.
- Gerok, W., Huber, C., Meinertz, T. und Zeidler, H. (Hrsg.) (2007). Die Innere Medizin. 11. Auflage. *Schattauer Verlag, Stuttgart*.
- Grimberg, J., Maguire, S. und Belluscio, L. (1989). A simple method for the preparation of plasmid and chromosomal *E. coli* DNA. *Nucleic Acids Res.* **17**(21): 8893.
- Gronow, S., Brabetz, W. und Brade, H. (2000). Comparative functional characterization in vitro of heptosyltransferase I (WaaC) and II (WaaF) from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **267**(22): 6602–6611.

- Grozdanov, L., Zähringer, U., Blum-Oehler, G., Brade, L., Henne, A., Knirel, Y. A., Schombel, U., Schulze, J., Sonnenborn, U., Gottschalk, G., Hacker, J., Rietschel, E. T. und Dobrindt, U. (2002). A single nucleotide exchange in the *wzy* gene is responsible for the semirough O6 lipopolysaccharide phenotype and serum sensitivity of *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J. Bacteriol.* **184**(21): 5912–5925.
- Gruss, F., Zähringer, F., Jakob, R. P., Burmann, B. M., Hiller, S. und Maier, T. (2013). The structural basis of autotransporter translocation by TamA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**(11): 1318–1320.
- Gunther IV, N. W., Snyder, J. A., Lockatell, V., Blomfield, I., Johnson, D. E. und Mobley, H. L. (2002). Assessment of virulence of uropathogenic *Escherichia coli* type 1 fimbrial mutants in which the invertible element is phase-locked on or off. *Infect. Immun.* **70**(7): 3344–3354.
- Hacker, J. und Heesemann, J. (Hrsg.) (2000). Molekulare Infektionsbiologie – Interaktionen zwischen Mikroorganismen und Zellen. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin.*
- Hacker, J. und Kaper, J. B. (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 641–679.
- Hacker, J., Bender, L., Ott, M., Wingender, J., Lund, B., Marre, R. und Goebel, W. (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., Ott, M., Blum, G., Marre, R., Heesemann, J., Tschäpe, H. und Goebel, W. (1992). Genetics of *Escherichia coli* uropathogenicity: analysis of the O6:K15:H31 isolate 536. *Zentralbl. Bakteriol.* **276**(2): 165–175.
- Hagan, E. C., Lloyd, A. L., Rasko, D. A., Faerber, G. J. und Mobley, H. L. (2010). *Escherichia coli* global gene expression in urine from women with urinary tract infection. *PLoS Pathog.* **6**(11): e1001187.
- Hagberg, L., Engberg, I., Freter, R., Lam, J., Olling, S. und Svanborg Edén, C. (1983). Ascending, unobstructed urinary tract infection in mice caused by pyelonephritogenic *Escherichia coli* of human origin. *Infect. Immun.* **40**(1): 273–283.
- Hahn, H., Falke, D., Kaufmann, S. H. E. und Ulimann, U. (Hrsg.) (2005). Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 5. Auflage. *Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.*

- Hannan, T. J., Totsika, M., Mansfield, K. J., Moore, K. H., Schembri, M. A. und Hultgren, S. J. (2012). Host-pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and intracellular uropathogenic *Escherichia coli* bladder infection. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**(3): 616–648.
- Hasman, H., Chakraborty, T. und Klemm, P. (1999). Antigen-43-mediated autoaggregation of *Escherichia coli* is blocked by fimbriation. *J. Bacteriol.* **181**(16): 4834–4841.
- Hautmann, R. E. und Huland, H. (Hrsg.) (2006). Urologie. 3. komplett überarbeitete Auflage. *Springer Verlag, Heidelberg.*
- Hejnova, J., Dobrindt, U., Nemcova, R., Rusniok, C., Bomba, A., Frangeul, L., Hacker, J., Glaser, P., Sebo, P. und Buchrieser, C. (2005). Characterization of the flexible genome complement of the commensal *Escherichia coli* strain A0 34/86 (O83:K24:H31). *Microbiology.* **151**(Pt 2): 385–398.
- Henderson, I. R. und Nataro, J. P. (2001). Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect. Immun.* **69**(3): 1231–1243.
- Henderson, I. R. und Owen, P. (1999). The major phase-variable outer membrane protein of *Escherichia coli* structurally resembles the immunoglobulin A1 protease class of exported protein and is regulated by a novel mechanism involving Dam and OxyR. *J. Bacteriol.* **181**(7): 2132–2141.
- Henderson, I. R., Meehan, M. und Owen, P. (1997). Antigen 43, a phase-variable bipartite outer membrane protein, determines colony morphology and autoaggregation in *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol. Lett.* **149**(1): 115–120.
- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F. und Nataro, J. P. (1998). The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends. Microbiol.* **6**(9): 370–378.
- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C. und Ala'Aldeen, D. (2004). Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**(4): 692–744.
- Henderson, J. P., Crowley, J. R., Pinkner, J. S., Walker, J. N., Tsukayama, P., Stamm, W. E., Hooton, T. M. und Hultgren, S. J. (2009). Quantitative metabolomics reveals an epigenetic blueprint for iron acquisition in uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog.* **5**(2): e1000305.
- Heras, B., Totsika, M., Peters, K. M., Paxman, J. J., Gee, C. L., Jarrott, R. J., Perugini, M. A., Whitten, A. E. und Schembri, M. A. (2014). The antigen 43 structure reveals a molecular Velcro-like mechanism of autotransporter-mediated bacterial clumping. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**(1): 457-462.

- Herzer, P. J., Inouye, S., Inouye, M. und Whittam, T. S. (1990). Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**: 6175–6181.
- Hill, C. (2012). Virulence or niche factors: what's in a name? *J. Bacteriol.* **194**(21): 5725–5727.
- Hochhut, B., Dobrindt, U. und Hacker, J. (2005). Pathogenicity islands and their role in bacterial virulence and survival. *Contrib. Microbiol.* **12**: 234–254.
- Holtje, J. V., Fiedler, W., Rotering, H., Walderich, B. und van Duin, J. (1988). Lysis induction of *Escherichia coli* by the cloned lysis protein of the phage MS2 depends on the presence of osmoregulatory membrane-derived oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **263**(8): 3539–3541.
- Homburg, S. (2007). Untersuchungen zur Molekularbiologie von *Escherichia coli*-Wildstämmen. *Dissertation, Universität Würzburg*.
- Hopkins, W. J., Elkahwaji, J. E., Heisey, D. M. und Ott, C. J. (2003). Inheritance of susceptibility to induced *Escherichia coli* bladder and kidney infections in female C3H/HeJ mice. *J. Infect. Dis.* **187**(3): 418–423.
- Hosch, L. (2012). Regulation of poly-GlcNAc expression and fimbriation in uropathogenic *E. coli*. *Dissertation, Universität Basel*.
- Hritonenko, V. und Stathopoulos, C. (2007). Omptin proteins: an expanding family of outer membrane proteases in Gram-negative *Enterobacteriaceae*. *Mol. Membr. Biol.* **24**(5-6): 395–406.
- Hung, C. S., Dodson, K. W. und Hultgren, S. J. (2009). A murine model of urinary tract infection. *Nat. Protoc.* **4**(8): 1230–1243.
- Ieva, R. und Bernstein, H. D. (2009). Interaction of an autotransporter passenger domain with BamA during its translocation across the bacterial outer membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**(45): 19120–19125.
- Jauregui, F., Landraud, L., Passet, V., Diancourt, L., Frapy, E., Guigon, G., Carbonnelle, E., Lortholary, O., Clermont, O., Denamur, E., Picard, B., Nassif, X. und Brisse, S. (2008). Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics.* **9**: 560.
- Jay, G. D., Culp, D. J. und Jahnke, M. R. (1990). Silver staining of extensively glycosylated proteins on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels: enhancement by carbohydrate-binding dyes. *Anal. Biochem.* **185**(2): 324–330.

- Johnson, J. R. und Russo, T. A. (2005). Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *Int. J. Med. Microbiol.* **295**(6-7): 383–404.
- Johnson, J.R. (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**(1): 80–128.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P. und Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**(2): 123–140.
- Karch, H., Denamur, E., Dobrindt, U., Finlay, B. B., Hengge, R., Johannes, L., Ron, E. Z., Tonjum, T., Sansonetti, P. J. und Vicente, M. (2012). The enemy within us: lessons from the 2011 European *Escherichia coli* O104:H4 outbreak. *EMBO Mol. Med.* **4**(9): 841–848.
- Karch, H., Tarr, P. I. und Bielaszewska, M. (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int. J. Med. Microbiol.* **295**(6-7): 405–418.
- Kau, A. L., Hunstad, D. A. und Hultgren, S. J. (2005). Interaction of uropathogenic *Escherichia coli* with host uroepithelium. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**(1): 54–49.
- Kauffmann, F. (1965). [Supplement to the Kauffmann-White scheme. 8.]. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.* **64**(3): 362–366.
- Kelley, L. A. und Sternberg, M. J. (2009). Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protoc.* **4**(3): 363–371.
- Keseler, I. M., Collado-Vides, J., Gama-Castro, S., Ingraham, J., Paley, S., Paulsen, I. T., Peralta-Gil, M. und Karp, P. D. (2005). EcoCyc: a comprehensive database resource for *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **33**(Database issue): D334–337.
- Kjærgaard, K., Hasman, H., Schembri, M. A. und Klemm, P. (2002). Antigen 43-mediated autotransporter display, a versatile bacterial cell surface presentation system. *J. Bacteriol.* **184**(15): 4197–4201.
- Kjærgaard, K., Schembri, M. A., Ramos, C., Molin, S. und Klemm, P. (2000). Antigen 43 facilitates formation of multispecies biofilms. *Environ. Microbiol.* **2**(6): 695–702.
- Klein, G., Müller-Loennies, S., Lindner, B., Kobylak, N., Brade, H. und Raina, S. (2013). Molecular and structural basis of inner core lipopolysaccharide alterations in *Escherichia coli*: incorporation of glucuronic acid and phosphoethanolamine in the heptose region. *J. Biol. Chem.* **288**(12): 8111–8127.
- Klemm, P., Hjerrild, L., Gjermansen, M. und Schembri, M. A. (2004). Structure-function analysis of the self-recognizing antigen 43 autotransporter protein from *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **51**(1): 283–296.

- Klemm, P., Vejborg, R. M. und Sherlock, O. (2006). Self-associating autotransporters, SAATs: functional and structural similarities. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**(4-5): 187–195.
- Knowles, T. J., Scott-Tucker, A., Overduin, M. und Henderson, I. R. (2009). Membrane protein architects: the role of the BAM complex in outer membrane protein assembly. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**(3): 206–214.
- Knudsen, S. K., Stensballe, A., Franzmann, M., Westergaard, U. B. und Otzen, D. E. (2008). Effect of glycosylation on the extracellular domain of the Ag43 bacterial autotransporter: enhanced stability and reduced cellular aggregation. *Biochem. J.* **412**(3): 563–577.
- Köhler, W. (Hrsg.) (2001). Medizinische Mikrobiologie. 8. Auflage. *Urban & Fischer, München-Jena.*
- Koressaar, T. und Remm, M. (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics.* **23**(10): 1289–1291.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **10**(3-4): 203–209.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**(5259): 680–685.
- LaPointe, C. F. und Taylor, R. K. (2000). The type 4 prepilin peptidases comprise a novel family of aspartic acid proteases. *J. Biol. Chem.* **275**(2): 1502–1510.
- Lehmann, A. (2005). Untersuchungen zur Struktur und Funktion des Autotransporterproteins Antigen 43 von *Escherichia coli*. *Diplomarbeit, Universität Jena.*
- Lilie, H., Schwarz, E. und Rudolph, R. (1998). Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**(5): 497–501.
- Lindenthal, C. und Elsinghorst, E. A. (1999). Identification of a glycoprotein produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **67**(8): 4084–4091.
- Lindenthal, C. und Elsinghorst, E. A. (2001). Enterotoxigenic *Escherichia coli* TibA glycoprotein adheres to human intestine epithelial cells. *Infect. Immun.* **69**(1): 52–57.
- Lindner, K. (2005). Untersuchungen zum Einfluss der ATP-abhängigen Protease ClpXP auf die Regulation und Expression Virulenz-assoziiierter Gene des uropathogenen *E. coli* Stammes 536. *Dissertation, Universität Würzburg.*

- Long, S. S. und Swenson, R. M. (1977). Development of anaerobic fecal flora in healthy newborn infants. *J. Pediatr.* **91**(2): 298–301.
- Lottspeich, F. und Zorbas, H. (Hrsg.) (1998). Bioanalytik. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin.*
- Lüthje, P. und Brauner, A. (2010). Ag43 promotes persistence of uropathogenic *Escherichia coli* isolates in the urinary tract. *J. Clin. Microbiol.* **48**(6): 2316–2317.
- Marolda, C. L. und Valvano, M. A. (1998). Promoter region of the *Escherichia coli* O7-specific lipopolysaccharide gene cluster: structural and functional characterization of an upstream untranslated mRNA sequence. *J. Bacteriol.* **180**(12): 3070–3079.
- Maurer, J., Jose, J. und Meyer, T. F. (1999). Characterization of the essential transport function of the AIDA-I autotransporter and evidence supporting structural predictions. *J. Bacteriol.*, **181**(22): 7014–7020.
- Mellmann, A., Bielaszewska, M., Köck, R., Friedrich, A. W., Fruth, A., Middendorf, B., Harmsen, D., Schmidt, M. A. und Karch, H. (2008). Analysis of collection of hemolytic uremic syndrome-associated enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* **14**(8): 1287–1290.
- Mika, F. und Hengge, R. (2013). Small Regulatory RNAs in the Control of Motility and Biofilm Formation in *E. coli* and *Salmonella*. *Int. J. Mol. Sci.* **14**(3): 4560–4579.
- Mobley, H. L., Green, D. M., Trifillis, A. L., Johnson, D. E., Chippendale, G. R., Lockett, C. V., Jones, B. D. und Warren, J. W. (1990). Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. *Infect. Immun.* **58**(5): 1281–1289.
- Mobley, H. L., Jarvis, K. G., Elwood, J. P., Whittle, D. I, Lockett, C. V., Russell, R. G., Johnson, D. E., Sonnenberg, M. S. und Warren, J. W. (1993). Isogenic P-fimbrial deletion mutants of pyelonephritogenic *Escherichia coli*: the role of alpha Gal(1-4) beta Gal binding in virulence of a wild-type strain. *Mol. Microbiol.* **10**(1): 143–155.
- Moormann, C., Benz, I. und Schmidt, M. A. (2002). Functional substitution of the TibC protein of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains for the autotransporter adhesion heptosyltransferase of the AIDA system. *Infect. Immun.* **70**(5): 2264–2270.
- Mühdorfer, I. und Hacker, J. (1994). Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. *Microb. Pathog.* **16**(3): 171–181.
- Mühdorfer, I., Ziebuhr, W. und Hacker, J. (2001). *Escherichia coli* in Urinary Tract Infection. In: *Mol. Med. Microbiol.* pp. 1739–1748. Eds. Sussman, M. et al. *Acad. Press.*

- Mulvey, M. A., Schilling, J. D. und Hultgren, S. J. (2001). Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infect. Immun.* **69**(7): 4572–4579.
- Mulvey, M. A., Schilling, J. D., Martinez, J. J. und Hultgren, S. J. (2000). Bad bugs and beleaguered bladders: interplay between uropathogenic *Escherichia coli* and innate host defenses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**(16): 8829–8835.
- Mysorekar, I. U. und Hultgren, S. J. (2006). Mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli* persistence and eradication from the urinary tract. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**(38): 14170–14175.
- Naegeli, A., Neupert, C., Fan, Y. Y., Lin, C. W., Poljak, K., Papini, A. M., Schwarz, F. und Aebi, M. (2014). Molecular analysis of an alternative N-glycosylation machinery by functional transfer from *Actinobacillus pleuropneumoniae* to *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **289**(4): 2170–2179.
- Nataro, J. P. und Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**(1): 142–201.
- Neidhardt, F. C. (Hrsg.) (1996). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. 2nd ed. ASM Press, Washington, DC.
- Nielubowicz, G. R. und Mobley, H. L. (2010). Host-pathogen interactions in urinary tract infection. *Nat. Rev. Urol.* **7**(8): 430–441.
- Nissle, A. (1918). Die antagonistische Behandlung chronischer Darmstörungen mit Kolibakterien. *Med. Klin.* **2**: 29–30.
- O'Gara, J. P. (2007). *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **270**(2): 179–188.
- Ogata, H., Goto, S., Sato, K., Fujibuchi, W., Bono, H. und Kanehisa, M. (1999). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* **27**(1): 29–34.
- Ogura, Y., Ooka, T., Iguchi, A., Toh, H., Asadulghani, M., Oshima, K., Kodama, T., Abe, H., Nakayama, K., Kurokawa, K., Tobe, T., Hattori, M. und Hayashi, T. (2009). Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**(42): 17939–17944.
- Oomen, C. J., van Ulsen, P., van Gelder, P., Feijen, M., Tommassen, J. und Gros, P. (2004). Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter. *EMBO J.* **23**(6): 1257–1266.

- O'Toole, G., Kaplan, H. B. und Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 49–79.
- Owen, P., Caffrey, P. und Josefsson, L. G. (1987). Identification and partial characterization of a novel bipartite protein antigen associated with the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**(8): 3770–3777.
- Owen, P., Meehan, M., de Loughry-Doherty, H. und Henderson, I. (1996). Phase-variable outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **16**(2): 63–76.
- Palaniyandi, S., Mitra, A., Herren, C. D., Lockatell, C. V., Johnson, D. E., Zhu, X. und Mukhopadhyay, S. (2012). BarA-UvrY two-component system regulates virulence of uropathogenic *E. coli* CFT073. *PLoS One.* **7**(2): e31348.
- Parker, C. T., Kloser, A. W., Schnaitman, C. A., Stein, M. A., Gottesman, S. und Gibson, B. W. (1992). Role of the *rfaG* and *rfaP* genes in determining the lipopolysaccharide core structure and cell surface properties of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **174**(8): 2525–2538.
- Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K. und Meyer, T. F. (1987). Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature.* **325**(6103): 458–462.
- Poulsen, K., Brandt, J., Hjorth, J. P., Thøgersen, H. C. und Kilian, M. (1989). Cloning and sequencing of the immunoglobulin A1 protease gene (*iga*) of *Haemophilus influenzae* serotype b. *Infect. Immun.* **57**(10): 3097–3105.
- Preston, G. M., Haubold, B. und Rainey, P. B. (1998). Bacterial genomics and adaptation to life on plants: implications for the evolution of pathogenicity and symbiosis. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**(5): 589–597.
- Raetz, C. R. und Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **71**: 635–700.
- Reidl, S. (2009). Funktionale Charakterisierung an der Biofilmbildung beteiligter Faktoren pathogener und kommensaler *Escherichia coli*. *Dissertation, Universität Würzburg*.
- Reidl, S., Lehmann, A., Schiller, R., Salam Khan, A. und Dobrindt, U. (2009). Impact of O-glycosylation on the molecular and cellular adhesion properties of the *Escherichia coli* autotransporter protein Ag43. *Int. J. Med. Microbiol.* **299**(6): 389–401.
- Rendueles, O., Beloin, C., Latour-Lambert, P. und Ghigo, J. M. (2014). A new biofilm-associated colicin with increased efficiency against biofilm bacteria. *ISME J.* **8**(6): 1275–1288.

- Restieri, C., Garriss, G., Locas, M. C. und Dozois, C. M. (2007). Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**(5): 1553–1562.
- Rock, C. O. (2008). Fatty acid and phospholipid metabolism in prokaryotes in Vance, D. E. und Vance, J. E. (Hrsg.) *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. 5th Edition. *Elsevier Science, Amsterdam, Niederlande*.
- Romeo, T. (1998). Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol. Microbiol.* **29**(6): 1321–1330.
- Romeo, T., Gong, M., Liu, M. Y. und Brun-Zinkernagel, A. M. (1993). Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties. *J. Bacteriol.* **175**(15): 4744–4755.
- Romeo, T., Vakulskas, C. A. und Babitzke, P. (2013). Post-transcriptional regulation on a global scale: form and function of Csr/Rsm systems. *Environ. Microbiol.* **15**(2): 313–324.
- Rosen, D. A., Hooton, T. M., Stamm, W. E., Humphrey, P. A. und Hultgren, S. J. (2007). Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infection. *PLoS Med.* **4**(12): e329.
- Rossiter, A. E., Leyton, D. L., Tveen-Jensen, K., Browning, D. F., Sevastyanovich, Y., Knowles, T. J., Nichols, K. B., Cunningham, A. F., Overduin, M., Schembri, M. A. und Henderson, I. R. (2011). The essential β -barrel assembly machinery complex components BamD and BamA are required for autotransporter biogenesis. *J. Bacteriol.* **193**(16): 4250–4253.
- Russo, T. A. und Johnson, J. R. (2003). Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes. Infect.* **5**(5): 449–456.
- Schembri, M. A., Hjerrild, L., Gjermansen, M. und Klemm, P. (2003). Differential expression of the *Escherichia coli* autoaggregation factor antigen 43. *J. Bacteriol.* **185**(7): 2236–2242.
- Schnaitman, C. A. und Klena, J. D. (1993). Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**(3): 655–682.
- Schwyn, B. und Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**(1): 47–56.

- Selkrig, J., Mosbahi, K., Webb, C. T., Belousoff, M. J., Perry, A. J., Wells, T. J., Morris, F., Leyton, D. L., Totsika, M., Phan, M. D., Celik, N., Kelly, M., Oates, C., Hartland, E. L., Robins-Browne, R. M., Ramarathinam, S. H., Purcell, A. W., Schembri, M. A., Strugnell, R. A., Henderson, I. R., Walker, D. und Lithgow, T. (2012). Discovery of an archetypal protein transport system in bacterial outer membranes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**(5): 506–510, S1.
- Sherlock, O., Dobrindt, U., Jensen, J. B., Vejborg, R. M. und Klemm, P. (2006). Glycosylation of the self-recognizing *Escherichia coli* Ag43 autotransporter protein. *J. Bacteriol.* **188**(5): 1798–1807.
- Sherlock, O., Schembri, M. A., Reisner, A. und Klemm, P. (2004). Novel roles for the AIDA adhesin from diarrheagenic *Escherichia coli*: cell aggregation and biofilm formation. *J. Bacteriol.* **186**(23): 8058–8065.
- Sherlock, O., Vejborg, R. M. und Klemm, P. (2005). The TibA adhesin/invasin from enterotoxigenic *Escherichia coli* is self recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation. *Infect. Immun.* **73**(4): 1954–1963.
- Skerra, A. (1994). Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene.* **151**: 131–135.
- St. Geme, J. W. 3rd und Cutter, D. (2000). The *Haemophilus influenzae* Hia adhesin is an autotransporter protein that remains uncleaved at the C terminus and fully cell associated. *J. Bacteriol.* **182**(21): 6005–6013.
- Stanley, P. L., Diaz, P., Bailey, M. J., Gygi, D., Juarez, A. und Hughes, C. (1993). Loss of activity in the secreted form of *Escherichia coli* haemolysin caused by an *rfaP* lesion in core lipopolysaccharide assembly. *Mol. Microbiol.* **10**(4): 781–787.
- Steinhauer, J., Agha, R., Pham, T., Varga, A. W. und Goldberg, M. B. (1999). The unipolar *Shigella* surface protein IcsA is targeted directly to the bacterial old pole: IcsP cleavage of IcsA occurs over the entire bacterial surface. *Mol. Microbiol.* **32**(2): 367–377.
- Subashchandrabose, S., Smith, S. N., Spurbeck, R. R., Kole, M. M. und Mobley, H. L. (2013). Genome-wide detection of fitness genes in uropathogenic *Escherichia coli* during systemic infection. *PLoS Pathog.* **9**(12): e1003788.
- Suhr, M., Benz, I. und Schmidt, M. A. (1996). Processing of the AIDA-I precursor: removal of AIDA_c and evidence for the outer membrane anchoring as a beta-barrel structure. *Mol. Microbiol.* **22**(1): 31–42.

- Suzuki, K., Wang, X., Weillbacher, T., Pernestig, A. K., Melefors, O., Georgellis, D., Babitzke, P. und Romeo, T. (2002). Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**(18): 5130–5140.
- Szymanski, C. M. und Wren, B. W. (2005). Protein glycosylation in bacterial mucosal pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**(3): 225–237.
- Tagliabue, L., Antoniani, D., Maciag, A., Bocci, P., Raffaelli, N. und Landini, P. (2010). The diguanylate cyclase YddV controls production of the exopolysaccharide poly-N-acetylglucosamine (PNAG) through regulation of the PNAG biosynthetic *pgaABCD* operon. *Microbiology.* **156**(Pt 10): 2901–2911.
- Tang, G., Ruiz, T. und Mintz, K. P. (2012). O-polysaccharide glycosylation is required for stability and function of the collagen adhesin EmaA of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.* **80**(8): 2868–2877.
- Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**(2): 211–222.
- Thanabalu, T., Koronakis, E., Hughes, C. und Koronakis, V. (1998). Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from *E. coli*: Reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore. *EMBO J.* **17**(22): 6487–6496.
- Todar, K. (2006). Todar's Online Textbook of Bacteriology from www.textbookofbacteriology.net.
- Torres, A. G., Perna, N. T., Burland, V., Ruknudin, A., Blattner, F. R. und Kaper, J. B. (2002). Characterization of Cah, a calcium-binding and heat-extractable autotransporter protein of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **45**(4): 951–966.
- Totsika, M., Moriel, D. G., Idris, A., Rogers, B. A., Wurpel, D. J., Phan, M. D., Paterson, D. L. und Schembri, M. A. (2012). Uropathogenic *Escherichia coli* mediated urinary tract infection. *Curr. Drug Targets.* **13**(11): 1386–1399.
- Toval, F. (2014). Molecular characterization of virulence- and fitness-associated traits of atypical uropathogenic *Escherichia coli* isolates from hospital-acquired urinary tract infections. *Dissertation, Universität Münster.*
- Toval, F., Köhler, C. D., Vogel, U., Wagenlehner, F., Mellmann, A., Fruth, A., Schmidt, M. A., Karch, H., Bielaszewska, M. und Dobrindt, U. (2014). Characterization of *Escherichia coli* isolates from hospital inpatients or outpatients with urinary tract infection. *J. Clin. Microbiol.* **52**(2): 407–418.

- Ulett, G. C., Valle, J., Beloin, C., Sherlock, O., Ghigo, J. M. und Schembri, M. A. (2007). Functional analysis of antigen 43 in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in long-term persistence in the urinary tract. *Infect. Immun.* **75**(7): 3233–3244.
- Ulett, G. C., Webb, R. I. und Schembri, M. A. (2006). Antigen-43-mediated autoaggregation impairs motility in *Escherichia coli*. *Microbiology.* **152**(Pt 7): 2101–2110. Erratum in: *Microbiology.* **152**(Pt 9): 2865.
- van der Woude, M. W. und Henderson, I. R. (2008). Regulation and function of Ag43 (*flu*). *Annu. Rev. Microbiol.* **62**: 153–169.
- Vianney, A., Jubelin, G., Renault, S., Dorel, C., Lejeune, P. und Lazzaroni, J. C. (2005). *Escherichia coli tol* and *rcs* genes participate in the complex network affecting curli synthesis. *Microbiology.* **151**(Pt 7): 2487–2497.
- Vincze, T., Posfai, J. und Roberts, R. J. (2003). NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* **31**(13): 3688–3691.
- Waldron, D. E., Owen, P. und Dorman, C. J. (2002). Competitive interaction of the OxyR DNA-binding protein and the Dam methylase at the antigen 43 gene regulatory region in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **44**(2): 509–520.
- Wallecha, A., Munster, V., Correnti, J., Chan, T. und van der Woude, M. (2002). Dam- and OxyR-dependent phase variation of *agn43*: essential elements and evidence for a new role of DNA methylation. *J. Bacteriol.* **184**(12): 3338–3347.
- Warren, J.W. (1996). Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management. 1st ed. *ASM Press, Washington, DC*.
- Weilbacher, T., Suzuki, K., Dubey, A. K., Wang, X., Gudapaty, S., Morozov, I., Baker, C. S., Georgellis, D., Babitzke, P. und Romeo, T. (2003). A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **48**(3): 657–670.
- Wells, T. J., Totsika, M. und Schembri, M. A. (2010). Autotransporters of *Escherichia coli*: a sequence-based characterization. *Microbiology.* **156**(Pt 8): 2459–2469.
- Wells, T. J., Tree, J. J., Ulett, G. C. und Schembri, M. A. (2007). Autotransporter proteins: novel targets at the bacterial cell surface. *FEMS Microbiol. Lett.* **274**(2): 163–172.
- Wiles, T. J., Kulesus, R. R. und Mulvey, M. A. (2008). Origins and Virulence Mechanisms of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp. Mol. Pathol.* **85**(1): 11–19.
- Williams, D. H. und Schaeffer, A. J. (2004). Current concepts in urinary tract infections. *Minerva. Urol. Nefrol.* **56**(1): 15–31.

- Winterberg, K. M., Luecke, J., Bruegl, A. S. und Reznikoff, W. S. (2005). Phenotypic screening of *Escherichia coli* K-12 Tn5 insertion libraries, using whole-genome oligonucleotide microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(1): 451–459.
- Yamamoto, T., Endo, S., Yokota, T. und Echeverria, P. (1991). Characteristics of adherence of enteroaggregative *Escherichia coli* to human and animal mucosa. *Infect. Immun.* **59**(10): 3722–3739.
- Yethon, J. A., Heinrichs, D. E., Monteiro, M. A., Perry, M. B. und Whitfield, C. (1998). Involvement of *waaY*, *waaQ*, and *waaP* in the modification of *Escherichia coli* lipopolysaccharide and their role in the formation of a stable outer membrane. *J. Biol. Chem.* **273**(41): 26310–26316.
- Zingler, G., Ott, M., Blum, G., Falkenhagen, U., Naumann, G., Sokolowska-Kohler, W. und Hacker, J. (1992). Clonal analysis of *Escherichia coli* serotype O6 strains from urinary tract infections. *Microb. Pathog.* **12**(4): 299–310.
- Zude, I., Leimbach, A. und Dobrindt, U. (2013). Prevalence of autotransporters in *Escherichia coli*: what is the impact of phylogeny and pathotype? *Int. J. Med. Microbiol.* pii: S1438-4221(13)00156-2.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Masse pro Volumen
A	Adenin, Ampere
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	<u>b</u> ovines <u>S</u> erum <u>a</u> lbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAS	Chromazurol S
CFU	„colony forming unit“
Cm	Chloramphenicol
cm	Zentimeter
C-terminal	Carboxy-terminal
Δ	Delta
Da	Dalton
DAEC	diffus adhätierende <i>E. coli</i>
dest	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate

EAEC	enteroaggregative <i>E. coli</i>
EcN	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EIEC	enteroinvasive <i>E. coli</i>
EPEC	enteropathogene <i>E. coli</i>
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
ETEC	enterotoxische <i>E. coli</i>
EtOH	Ethanol
ExPEC	extraintestinal-pathogene <i>E. coli</i>
G	Guanin
g	Gramm, mittlere Erdbeschleunigung
GEI	genomische Insel
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GT	Glykosyltransferase
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _{dest}	destilliertes Wasser
H ₂ O _{bidest}	zweifach destilliertes Wasser
IPEC	intestinal-pathogene <i>E. coli</i>
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
λ	Lambda
l	Liter
LB	„Lysogeny Broth“
LPS	Lipopolysaccharid
m	milli, Meter
M	molar, Mega
μ	mikro
min	Minute
MW	Molekulargewicht
n	nano

NMEC	Neugeborenen-Meningitis-assoziierte <i>E. coli</i>
N-terminal	Amino-terminal
Ω	Ohm (Einheit des elektrischen Widerstands)
OD _x	Optische Dichte bei x nm Wellenlänge
ORF	„open reading frame“
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI	Pathogenitätsinsel
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	„polymerase chain reaction“
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration in einer wässrigen Lösung (pondus hydrogenii)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEPEC	Sepsis-assoziierte <i>E. coli</i>
Sm	Streptomycin
sp./spp.	Spezies
ssp.	Subspezies
STEC	Shiga Toxin-produzierende <i>E. coli</i>
T	Thymin
TE	<u>T</u> ris- <u>E</u> DTA
TAE	<u>T</u> ris- <u>A</u> acetat- <u>E</u> DTA
TBS	„tris buffered saline“
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
T _M	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Uracil, Enzymenheit
üN	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
UPEC	uropathogene <i>E. coli</i>
V	Volt
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

7.2 Oligonukleotide

Tabelle 18: Verwendete Oligonukleotide und deren Verwendungszwecke.

Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen, die His-Tag kodierende DNA-Sequenz ist grau hinterlegt und homologe Sequenzbereiche zu den *priming sites* des Plasmids pKD3 sind mittels Großbuchstaben markiert.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Anwendung	Referenz
agn43-Xbal-fw	gctctagagctaaggaaaagctgatgaaac	Amplifikation von <i>agn43a-536</i> und <i>agn43b-536</i> zur Klonierung	diese Arbeit
agn43-HindIII-rev	cccaagcttgggtcagaaaagtcacattcagcgt		
T7	taatacactcactataggg	Überprüfung und Sequenzierung von pGEM-T und pGEM-T Easy-Derivaten	Promega
SP6	tatttagtgacactatag		
Sagn31-fw	ccacgctggataacagaggt	Primer-Walking zur Sequenzierung von <i>agn43a-536</i>	diese Arbeit
Sagn31-rev	acctctgttatccagcgtgg		
Sagn32-fw	tctccgttggaggtaag		
Sagn32-rev	cttaccctccacaacggaga		
Sagn33-fw	tgacgctgaacgacagtacc		
Sagn33-rev	ggtactgtcgttcagcgtca		
Sagn51-fw	ggtgagcagtggtacatga	Primer-Walking zur Sequenzierung von <i>agn43b-536</i>	diese Arbeit
Sagn51-rev	tcatgtacccactgctcacc		
Sagn52-fw	tcacggtggaaaacggtaat		
Sagn52-rev	attaccgtttccaccgtga		
Sagn53-fw	cgcaggagagattcactttg		
Sagn53-rev	caaagtgaatctctctcgcg		
Sagn4-fw	gctgacacaggcaatggac	Primer-Walking zur Sequenzierung von <i>agn43-536</i>	diese Arbeit
Sagn4-rev	gtccattgcctgtgtcagc		
Sagn5-fw	aggataacccggttatgtg		
Sagn5-rev	cacataaccggcgttatcct		
tet ^{p/o}	ccatcgaatggccagatgat	Überprüfung und Sequenzierung von pASK75-Derivaten	Homburg (2007)
ASK3	tgacgcagtagcggtaaaccg		
His43-III fw	atcgttgtgcaaccgggtgaaacagtgaatgg	Insertion der His-Tag kodierenden DNA-Sequenz in <i>agn43a-536</i>	diese Arbeit
His43-III rev	atggtgatggtgatggtggtcagcagccagcac cgggag		
His43-V fw	acggttgtacagcgggagaaaccgtgaac	Insertion der His-Tag kodierenden DNA-Sequenz in <i>agn43b-536</i>	diese Arbeit
His43-V rev	atggtgatggtgatggtggtcagcagccagtgc cgggac		
HisK-fw	ctggctgctgaccaccatcaccatcaccat	Nachweis der erfolgreichen Insertion der His-Tag kodierenden DNA-Sequenz in <i>agn43a-536</i> und <i>agn43b-536</i>	diese Arbeit
HisK-III rev	ccggtgacggttgctgctgtgc		
HisK-V rev	cgtcgccccggcataaacca		

Tabelle 18: Verwendete Oligonukleotide und deren Verwendungszwecke. (Fortsetzung)

Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen, die His-Tag kodierende DNA-Sequenz ist grau hinterlegt und homologe Sequenzbereiche zu den *priming sites* des Plasmids pKD3 sind mittels Großbuchstaben markiert.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Anwendung	Referenz
ECP_0425_Cm_fw	atctgggtgaaggttttgttattcataaaatgatt ctttgagcaaattgcGTGTAGGCTGGAG TGCTT	Amplifikation der <i>cat</i> -Kassette für die Erzeugung der <i>ecp0425</i> -Deletionsmutante nach Datsenko und Wanner (2000)	diese Arbeit
ECP_0425_CM_rev	tttcatcaataattacctggctgcaatctgaata tttttctctttaacaCATATGAATATCCTCC TTAGTTCCTA		
ECP_1042_CM_fw	gaatgccgatcagacgttgagtgaacctggag ctaccagttacgtccaGTGTAGGCTGGA GCTGCTT	Amplifikation der <i>cat</i> -Kassette für die Erzeugung der <i>ecp1042</i> -Deletionsmutante nach Datsenko und Wanner (2000)	diese Arbeit
ECP_1042_CM_rev	gcaggaacgatgtagcctgataagcgtagcg catcaggcaactacgtttCATATGAATATC CTCCTTAGTTCCTA		
ECP_1999_CM_fw	gtgtgaaggttttgttccataagatggtgtgt aacggagtaataagaaGTGTAGGCTGGAG CTGCTT	Amplifikation der <i>cat</i> -Kassette für die Erzeugung der <i>ecp1999</i> -Deletionsmutante nach Datsenko und Wanner (2000)	diese Arbeit
ECP_1999_CM_rev	tttcatcaataatcacctggctgcaatctgaac attttctcttttagcaCATATGAATATCCTC CTTAGTTCCTA		
ECP_2077_CM_fw	tgagctttttctgaagagatatgcggaatt ttaacggcggcatttaGTGTAGGCTGGAG CTGCTT	Amplifikation der <i>cat</i> -Kassette für die Erzeugung der <i>ecp2077</i> -Deletionsmutante nach Datsenko und Wanner (2000)	diese Arbeit
ECP_2077_CM_rev	tatatccagcaccaccagttaactaatgttcat attatatctccactaaCATATGAATATCCT CCTTAGTTCCTA		
ECP_2078_CM_fw	tgtcaattcgttctgctaaaaatgaagtcgtttat cgggaagtttttaaGTGTAGGCTGGAGC TGCTT	Amplifikation der <i>cat</i> -Kassette für die Erzeugung der <i>ecp2078</i> -Deletionsmutante nach Datsenko und Wanner (2000)	diese Arbeit
ECP_2078_CM_rev	ctcctcggtaagttcattatatagtttaattgaa atgagacagagtttcCATATGAATATCCT CCTTAGTTCCTA		
ECP_3716_CM_fw	atacaaacctgtaaacgtcagataacttca gaggtcgtcggttaattGTGTAGGCTGGA GCTGCTT	Amplifikation der <i>cat</i> -Kassette für die Erzeugung der <i>ecp3716</i> -Deletionsmutante nach Datsenko und Wanner (2000)	diese Arbeit
ECP_3716_CM_rev	gcatcagtggaaggctgggcaaacagcccg aagcggcaaaacttaacgCATATGAATAT CCTCCTTAGTTCCTA		
ECP_3720_CM_fw	gcgtaacggaatacatggcctggctgaatcgtg acgcataagagctctgcGTGTAGGCTGGA GCTGCTT	Amplifikation der <i>cat</i> -Kassette für die Erzeugung der <i>ecp3720</i> -Deletionsmutante nach Datsenko und Wanner (2000)	diese Arbeit
ECP_3720_CM_rev	tggagaacatcgccatcgacgatgttttaacg atcagaaccgcatccgCATATGAATATCC TCCTTAGTTCCTA		

Tabelle 18: Verwendete Oligonukleotide und deren Verwendungszwecke. (Fortsetzung)

Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen, die His-Tag kodierende DNA-Sequenz ist grau hinterlegt und homologe Sequenzbereiche zu den *priming sites* des Plasmids pKD3 sind mittels Großbuchstaben markiert.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Anwendung	Referenz
ECP_3729_CM_fw	attgcagctgtcgataaattacttccctcctccac gacaggtacgtcgttGTGTAGGCTGGAGC TGCTT	Amplifikation der <i>cat</i> - Kassette für die Erzeugung der <i>ecp3729</i> -Deletions- mutante nach Datsenko und Wanner (2000)	diese Arbeit
ECP_3729_CM_rev	cctcaaaaggatctttaccgcccataacgtgg caaacgactctttaagtCATATGAATATCC TCCTTAGTTCCTA		
ECP_3730_CM_fw	aaaaagagttacttgggataagccatttcgaa gaatttggctcattaagGTGTAGGCTGGA GCTGCTT	Amplifikation der <i>cat</i> - Kassette für die Erzeugung der <i>ecp3730</i> -Deletions- mutante nach Datsenko und Wanner (2000)	diese Arbeit
ECP_3730_CM_rev	gcgctgcaaaccgcaaaaggaaaatattata taaacaaaaagcaacgaCATATGAATATC CTCCTTAGTTCCTA		
c1	ttatacgcaaggcgacaagg	Kontroll-Primer zur Über- prüfung der Integration der <i>cat</i> -Kassette	Datsenko und Wanner (2000)
c2	gatcttccgtcacaggtagg		
ECP_0425_500fw	atattgctaccgtggtgatgact	Test-Primer 500 bp upstream bzw. downstream von <i>ecp0425</i>	diese Arbeit
ECP_0425_500rev	ggagtgaataagttccggtagg		
ECP_1042_500fw	gatttctcccgtttgaagat	Test-Primer 500 bp upstream bzw. downstream von <i>ecp1042</i>	diese Arbeit
ECP_1042_500rev	acggcgactatgatgagatagag		
ECP_1999_500fw	tcatgacacctggttgctgt	Test-Primer 500 bp upstream bzw. downstream von <i>ecp1999</i>	diese Arbeit
ECP_1999_500rev	ttgtcggagtgagtaagtcca		
ECP_2077_500fw	tctgggctgtttcaataaggt	Test-Primer 500 bp upstream bzw. downstream von <i>ecp2077</i>	diese Arbeit
ECP_2077_500rev	ctagaatgagcaccgacaggtat		
ECP_2078_500fw	gatgtaatcggcgcaagaat	Test-Primer 500 bp upstream bzw. downstream von <i>ecp2078</i>	diese Arbeit
ECP_2078_500rev	ttggcagcatctatattggaa		
ECP_3716_500fw	ccttaatgatgtgatggcagaa	Test-Primer 500 bp upstream bzw. downstream von <i>ecp3716</i>	diese Arbeit
ECP_3716_500rev	tttggtatgcagaaagtgatgc		
ECP_3720_500fw	gaatcccgcgaatatgaaaa	Test-Primer 500 bp upstream bzw. downstream von <i>ecp3720</i>	diese Arbeit
ECP_3720_500rev	tcttccggccagtgtttatc		
ECP_3729_500fw	tgaagcagacaaccatgagttac	Test-Primer 500 bp upstream bzw. downstream von <i>ecp3729</i>	diese Arbeit
ECP_3729_500rev	atacactttcataaacgccaga		
ECP_3730_500fw	tacggtaatcggtaaatcaggataa	Test-Primer 500 bp upstream bzw. downstream von <i>ecp3730</i>	diese Arbeit
ECP_3730_500rev	gctggctatatttacgatcaggata		
RS1_K fw	aaaagtcagagccagcgaga	Kontroll-Primer zur Über- prüfung der homologen Rekombination von <i>ecp0425</i> und <i>cat</i> -Kassette	diese Arbeit
RS1_K rev	ccaatttttacgccattgct		

Tabelle 18: Verwendete Oligonukleotide und deren Verwendungszwecke. (Fortsetzung)

Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen, die His-Tag kodierende DNA-Sequenz ist grau hinterlegt und homologe Sequenzbereiche zu den *priming sites* des Plasmids pKD3 sind mittels Großbuchstaben markiert.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Anwendung	Referenz
RS2_K fw	ctggtgatgcgtgtgaaagt	Kontroll-Primer zur Überprüfung der homologen Rekombination von <i>ecp1042</i> und <i>cat</i> -Kassette	diese Arbeit
RS2_K rev	agcaaggtcaccattatgctc		
RS3_K fw	aaagccagatccatcgaaga	Kontroll-Primer zur Überprüfung der homologen Rekombination von <i>ecp1999</i> und <i>cat</i> -Kassette	diese Arbeit
RS3_K rev	gleiche Sequenz wie RS1_K rev		
RS4_K fw	ttgccaataataaagaagatttagca	Kontroll-Primer zur Überprüfung der homologen Rekombination von <i>ecp2077</i> und <i>cat</i> -Kassette	diese Arbeit
RS4_K rev	gaagcattactgaaattgtccaga		
RS5_K fw	tttgaatcttcttcaggacaaa	Kontroll-Primer zur Überprüfung der homologen Rekombination von <i>ecp2078</i> und <i>cat</i> -Kassette	diese Arbeit
RS5_K rev	tcctcaggtaaactattcgaagaca		
RS6_K fw	ttcgtaatgcgctgatctc	Kontroll-Primer zur Überprüfung der homologen Rekombination von <i>ecp3716</i> und <i>cat</i> -Kassette	diese Arbeit
RS6_K rev	cgctggaacctgtttatgct		
RS7_K fw	ctaccaggcgttcaactcagg	Kontroll-Primer zur Überprüfung der homologen Rekombination von <i>ecp3720</i> und <i>cat</i> -Kassette	diese Arbeit
RS7_K rev	gtgccaggaaggaatctgtg		
RS8_K fw	aattctgggcgggagattac	Kontroll-Primer zur Überprüfung der homologen Rekombination von <i>ecp3729</i> und <i>cat</i> -Kassette	diese Arbeit
RS8_K rev	gcatgcccatttgaaaaata		
RS9_K fw	tagcgcgtcaatatcagtgc	Kontroll-Primer zur Überprüfung der homologen Rekombination von <i>ecp3730</i> und <i>cat</i> -Kassette	diese Arbeit
RS9_K rev	accggcactttgatcagttc		
agn43+P_EcoRifw	<u>cggaattc</u> cgctctctcttgcgtgcaatagctt	Amplifikation von <i>agn43a-536</i> mit eigener Promotorregion zur Klonierung in pGEN206 Δ Spel	diese Arbeit
agn43_NheI_rev	ctag <u>ctag</u> ctagtcagaaagtcacattcagcgt		
agn43V+P_EcoRifw	<u>cggaattc</u> cggtttctcttgcgtgacctcctgct	Amplifikation von <i>agn43b-536</i> mit eigener Promotorregion zur Klonierung in pGEN206 Δ Spel	diese Arbeit
agn43_NheI_rev	ctag <u>ctag</u> ctagtcagaaagtcacattcagcgt		
agn43III_rbs_fw	catctgtggataccggcttt	Primer zur Sequenzierung der Promotorregion von <i>agn43a-536</i>	diese Arbeit
agn43III_rbs_rev	aaagccggtatccacagatg		
agn43V_rbs_fw	tacctgccggtatccacatt	Primer zur Sequenzierung der Promotorregion von <i>agn43b-536</i>	diese Arbeit
agn43V_rbs_rev	aatgtggataccggcaggtta		

7.3 Ergänzende Ergebnisse der MS-Untersuchung des Glykosylierungsstatus der isolierten Ag43-Varianten (nESI-MS)

Tabelle 19: Detektierte Peptidfragmente von trypsinisiertem Ag43a isoliert aus *E. coli* 536 DM.

$m/z_{\text{beobachtet}}/$ Ladungszustand	$M_{\text{experimentell}}$ in Da	$M_{\text{theoretisch}}$ in Da	AS-Bereich
1038.65 ⁶⁺	6225.86	6225.9301	1-59
1036.46 ⁴⁺	4141.81	4141.9206	134-176
708.13 ⁵⁺	3535.61	3535.7614	293-326
700.11 ⁵⁺	3495.51	3495.8069	283-316
981.85 ³⁺	2942.52	2942.4327	252-282
735.09 ⁴⁺	2936.33	2936.4124	90-118
849.08 ³⁺	2544.22	2544.3031	466-489
841.04 ³⁺	2520.10	2520.2238	327-354
825.38 ³⁺	2473.12	2473.1721	375-399
728.98 ³⁺	2183.92	2184.0195	187-206
981.02 ²⁺	1960.03	1960.0418	217-234
973.52 ²⁺	1945.02	1945.0480	400-420
916.45 ²⁺	1830.88	1830.8959	431-449
823.38 ²⁺	1644.74	1644.8067	235-251
797.87 ²⁺	1593.72	1593.8210	450-465
796.9 ²⁺	1591.79	1591.8206	119-133
758.30 ²⁺	1514.58	1514.8052	75-89
692.85 ²⁺	1383.68	1383.7106	304-316
651.8 ²⁺	1301.58	1301.6649	362-374
573.76 ²⁺	1145.50	1145.6040	421-430
572.74 ²⁺	1143.47	1143.5672	207-216
559.74 ²⁺	1117.46	1117.5880	177-186
523.71 ²⁺	1045.41	1045.5040	317-326
503.73 ²⁺	1005.44	1005.5495	283-292
933.40 ¹⁺	933.39	932.4675	66-74
753.31 ¹⁺	752.30	752.3453	355-361
518.25 ¹⁺	517.24	517.2608	60-65
489.24 ¹⁺	488.23	488.2900	490-494

Tabelle 20: Detektierte Peptidfragmente von trypsinisiertem Ag43a isoliert aus *E. coli* 536 rDM.

m/z_{beobachtet}/ Ladungszustand	M_{experimentell} in Da	M_{theoretisch} in Da	AS-Bereich
1038.75 ⁶⁺	6226.45	6225.9301	1-59
1036.55 ⁴⁺	4142.17	4141.9206	134-176
982.02 ³⁺	2943.04	2942.4327	252-282
849.21 ³⁺	2544.61	2544.3031	466-489
841.32 ³⁺	2520.94	2520.2238	327-354
825.56 ³⁺	2473.65	2473.1721	375-399
729.17 ³⁺	2184.48	2184.0195	187-206
981.27 ²⁺	1960.52	1960.0418	217-234
973.81 ²⁺	1945.62	1945.0480	400-420
951.67 ²⁺	1901.33	1900.9238	90-108
916.64 ²⁺	1831.27	1830.8959	431-449
823.69 ²⁺	1645.36	1644.8067	235-251
798.00 ²⁺	1593.98	1593.8210	450-465
797.07 ²⁺	1592.15	1591.8206	119-133
758.57 ²⁺	1515.12	1514.8052	75-89
693.01 ²⁺	1384.00	1383.7106	304-316
651.97 ²⁺	1301.92	1301.6649	362-374
573.91 ²⁺	1145.81	1145.6040	421-430
572.90 ²⁺	1143.78	1143.5672	207-216
572.40 ²⁺	1142.78	1142.5680	293-303
559.93 ²⁺	1117.85	1117.5880	177-186
1054.75 ¹⁺	1053.74	1053.4992	109-118
523.87 ²⁺	1045.72	1045.5040	317-326
503.88 ²⁺	1005.75	1005.5495	283-292
933.66 ¹⁺	933.39	932.4675	66-74
753.50 ¹⁺	752.30	752.3453	355-361
518.36 ¹⁺	517.24	517.2608	60-65
489.40 ¹⁺	488.23	488.2900	490-494

Tabelle 21: Detektierte Peptidfragmente von trypsinisiertem Ag43b isoliert aus *E. coli* 536 rDM.

$m/z_{\text{beobachtet}}/$ Ladungszustand	$M_{\text{experimentell}}$ in Da	$M_{\text{theoretisch}}$ in Da	AS-Bereich
1320.95 ⁶⁺	7919.65	7919.7103	1-76
1176.25 ⁵⁺	5876.21	5875.8313	176-233
1217.12 ⁴⁺	4864.45	4864.3863	77-126
1224.75 ³⁺	3671.23	3670.7532	414-449
1197.48 ³⁺	3589.42	3588.7556	358-394
975.5 ³⁺	2923.48	2923.2889	133-167
1291.76 ²⁺	2581.51	2581.2177	330-357
1053.26 ²⁺	2104.51	2104.0185	282-302
846.02 ²⁺	1690.02	1689.8645	264-281
743.96 ²⁺	1485.91	1485.8151	249-263
730.91 ²⁺	1459.81	1459.7518	314-329
696.41 ²⁺	1390.81	1390.7092	234-246
630.88 ²⁺	1259.75	1259.6833	395-408
627.86 ²⁺	1253.71	1253.6404	303-313
904.64 ¹⁺	903.63	903.4410	168-175
688.43	687.42	687.3704	127-132
576.44	575.43	575.3279	409-413
516.4	515.39	515.2816	163-167

7.4 Übersicht über die Glykosyltransferasen (GTs) von *E. coli* Stamm 536

Tabelle 22: Mittels CAZy identifizierte GT-Familien für *E. coli* Stamm 536: 40 GT (15 Familien).

(<http://www.cazy.org/b408.html>)

GT-Familie	1	2	4	5	8	9	19	20	26	28	30	35	51	56	83
Anzahl pro Familie	1	11	8	1	3	3	1	1	1	1	1	2	4	1	1

Tabelle 23: Übersicht und Beschreibung der für *E. coli* Stamm 536 identifizierten Glykosyltransferasen. Die zur Deletion ausgewählten GT-Gene sind gelb hinterlegt.

GT-Familie	Gen	Beschreibung/Funktion/Zuordnung
GT1	<i>ecp0306 (iroB)</i>	putative GT (Transfer von Hexosegruppen) → Eisenaufnahme-Cluster
GT2	<i>ecp0425</i>	putative GT

Tabelle 23: Übersicht und Beschreibung der für *E. coli* Stamm 536 identifizierten Glykosyltransferasen. (Fortsetzung). Die zur Deletion ausgewählten GT-Gene sind gelb hinterlegt.

GT-Familie	Gen	Beschreibung/Funktion/Zuordnung
GT2	<i>ecp1021 (ycdQ)</i>	N-GT, auch PgaC (vorhergesagte Polysaccharid-Polymerase, die an der Biofilmbildung beteiligt ist, für die Synthese von β -1,6-N-Acetylglucosamin-Polysaccharid (PGA) erforderlich, entspricht IcaA bei <i>Staphylococcus</i>) → „Bakterienhülle“-Cluster
GT2	<i>ecp1042 (mdoH)</i>	GT der Glucanbiosynthese, auch MdoH (erforderlich zur Biosynthese von osmoregulierten periplasmatischen Glucanen (OPGs), möglicherweise am Transfer ins Periplasma beteiligt) → „Bakterienhülle“-Cluster
GT2	<i>ecp1999</i>	hypothetisches Protein, putative GT YaiP
GT2	<i>ecp2079</i>	putative GT (zeigt homologe Bereiche zu WaaV, wahrscheinlich an der Zellwandbiogenese beteiligt) → „Bakterienhülle“-Cluster
GT2	<i>ecp2095</i>	putative GT der Colansäure-Biosynthese, auch WcaE → „Bakterienhülle“-Cluster
GT2	<i>ecp2099</i>	putative GT der Colansäure-Biosynthese, auch WcaE → „Bakterienhülle“-Cluster
GT2	<i>ecp2297 (arnC)</i>	Undecaprenyl-Phosphat 4-Desoxy-4-Formamido-L-Arabinose-Transferase (beteiligt an Aminozucker- und Nukleotidzucker-Synthese, Synthese sekundärer Metabolite und LPS-Synthese) → Kohlenhydratmetabolismus-Cluster
GT2	<i>ecp3633 (bcsA)</i>	katalytische Untereinheit der Zellulose-Synthase, auch BcsA → „Bakterienhülle“-Cluster
GT2	<i>ecp3716</i>	putative GT YibD
GT2	<i>ecp3723</i>	putative β -1,3-GT, auch WaaV → „Bakterienhülle“-Cluster
GT4	<i>ecp2075</i>	putative GT (zeigt homologe Bereiche zu WaaG, wahrscheinlich an der Zellwandbiogenese beteiligt) → „Bakterienhülle“-Cluster

Tabelle 23: Übersicht und Beschreibung der für *E. coli* Stamm 536 identifizierten Glykosyltransferasen. (Fortsetzung). Die zur Deletion ausgewählten GT-Gene sind gelb hinterlegt.

GT-Familie	Gen	Beschreibung/Funktion/Zuordnung
GT4	<i>ecp2077</i>	putative GT
GT4	<i>ecp2078</i>	putative GT
GT4	<i>ecp2084</i>	putative GT der Colansäure-Biosynthese, auch WcaI → „Bakterienhülle“-Cluster
GT4	<i>ecp2090</i>	putative GT der Colansäure-Biosynthese, auch WcaI → „Bakterienhülle“-Cluster
GT4	<i>ecp2097</i>	putative GT der Colansäure-Biosynthese, auch WcaC → „Bakterienhülle“-Cluster
GT4	<i>ecp3034</i>	putative GT (ORF72, wahrscheinlich an der Kapselbiogenese beteiligt) → „Bakterienhülle“-Cluster
GT4	<i>ecp3729 (waaG)</i>	UDP-Glucose:(Heptosyl)-LPS α -1,3-Glucosyltransferase, auch WaaG (an der LPS-Synthese beteiligt) → „Bakterienhülle“-Cluster
GT5	<i>ecp3523 (glgA)</i>	Glykogensynthase → Kohlenhydratmetabolismus-Cluster
GT8	<i>ecp3724</i>	UDP-Galactose:(Galactosyl)-LPS α -1,2-Galactosyltransferase, auch WaaW → „Bakterienhülle“-Cluster
GT8	<i>ecp3726</i>	UDP-Galactose:(Glucosyl)-LPS α -1,2-Galactosyltransferase, auch WaaT → „Bakterienhülle“-Cluster
GT8	<i>ecp3727</i>	UDP-Glucose: (Glucosyl)-LPS α -1,3-Glucosyltransferase, auch WaaO → „Bakterienhülle“-Cluster
GT9	<i>ecp3720 (waaF)</i>	ADP-Heptose-LPS-Heptosyltransferase II, auch WaaF → „Bakterienhülle“-Cluster
GT9	<i>ecp3721</i>	ADP-Heptose-LPS-Heptosyl transferase I, auch WaaC → „Bakterienhülle“-Cluster
GT9	<i>ecp3730 (waaQ)</i>	GT der LPS-Core-Biosynthese, auch WaaQ → „Bakterienhülle“-Cluster

Tabelle 23: Übersicht und Beschreibung der für *E. coli* Stamm 536 identifizierten Glykosyltransferasen. (Fortsetzung). Die zur Deletion ausgewählten GT-Gene sind gelb hinterlegt.

GT-Familie	Gen	Beschreibung/Funktion/Zuordnung
GT19	<i>ecp0190 (lpxB)</i>	Lipid-A-Disaccharid-Synthase → „Bakterienhülle“-Cluster
GT20	<i>ecp1838 (otsA)</i>	Trehalose-6-Phosphat-Synthase → Kohlenhydratmetabolismus-Cluster
GT26	<i>ecp3986 (wecG)</i>	putative UDP-N-Acetyl-D-Mannosaminuronsäure-Transferase → „Bakterienhülle“-Cluster
GT28	<i>ecp0092 (murG)</i>	Undecaprenyldiphospho-Muramoylpentapeptide-β-N-Acetylglucosaminyltransferase → „Bakterienhülle“-Cluster
GT30	<i>ecp3731</i>	3-Desoxy-D-Manno-2-Octulosonsäure (KDO)-Transferase, auch WaaA → „Bakterienhülle“-Cluster
GT35	<i>ecp3503</i>	Maltodextrinphosphorylase → Kohlenhydratmetabolismus-Cluster
GT35	<i>ecp3522</i>	Glykogenphosphorylase, auch GlgP → Kohlenhydratmetabolismus-Cluster
GT51	<i>ecp0159 (mrcB)</i>	Penicillin-bindendes Protein 1B → „Bakterienhülle“-Cluster
GT51	<i>ecp2524</i>	Penicillin-bindendes Protein 1C (Penicillin-unempfindliche Transglykosylase/Transpeptidase) → „Bakterienhülle“-Cluster
GT51	<i>ecp3296 (mtgA)</i>	monofunktionelle Transglykosylase der Peptidoglycan-Biosynthese → „Bakterienhülle“-Cluster
GT51	<i>ecp3482 (mrcA)</i>	Peptidoglycansynthetase (auch Penicillin-bindendes Protein 1A) → „Bakterienhülle“-Cluster
GT56	<i>ecp3984 (wecF)</i>	4-α-L-Fucosyltransferase → „Bakterienhülle“-Cluster
GT83	<i>ecp2300 (arnT)</i>	4-Amino-4-Desoxy-L-Arabinosetransferase → „Bakterienhülle“-Cluster

7.5 Ergänzende Ergebnisse zur phänotypischen Charakterisierung der GT-Deletionsmutanten

7.5.1 Ergebnis der Autoaggregationsstudie

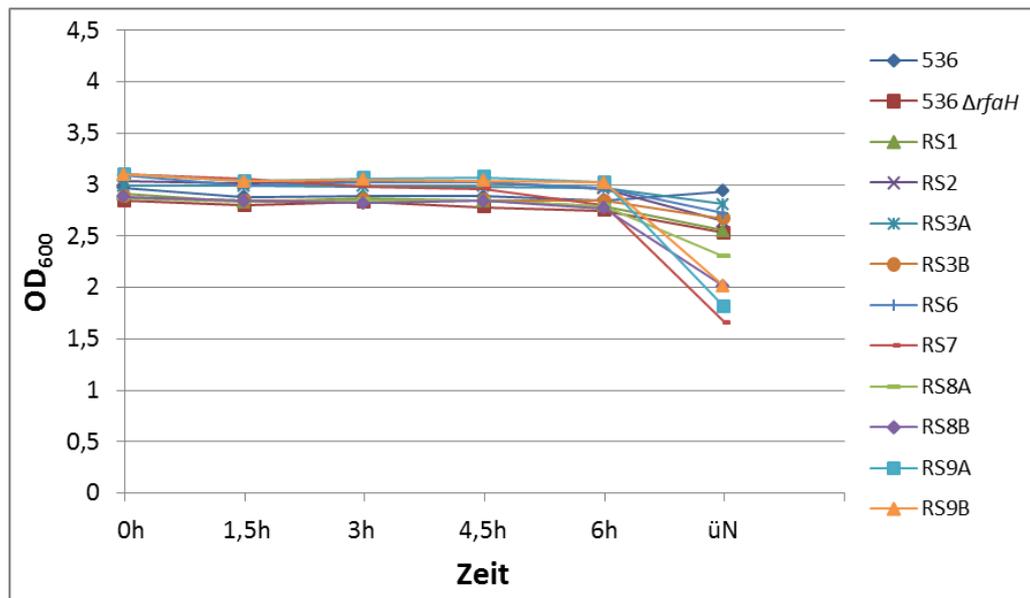


Abbildung 31: Autoaggregationsverhalten der GT-Deletionsmutanten in LB-Medium.

Quantifizierung der Autoaggregation durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm.

7.5.2 Ergebnis des „CAS liquid assays“ nach Schwyn und Neilands (1987))

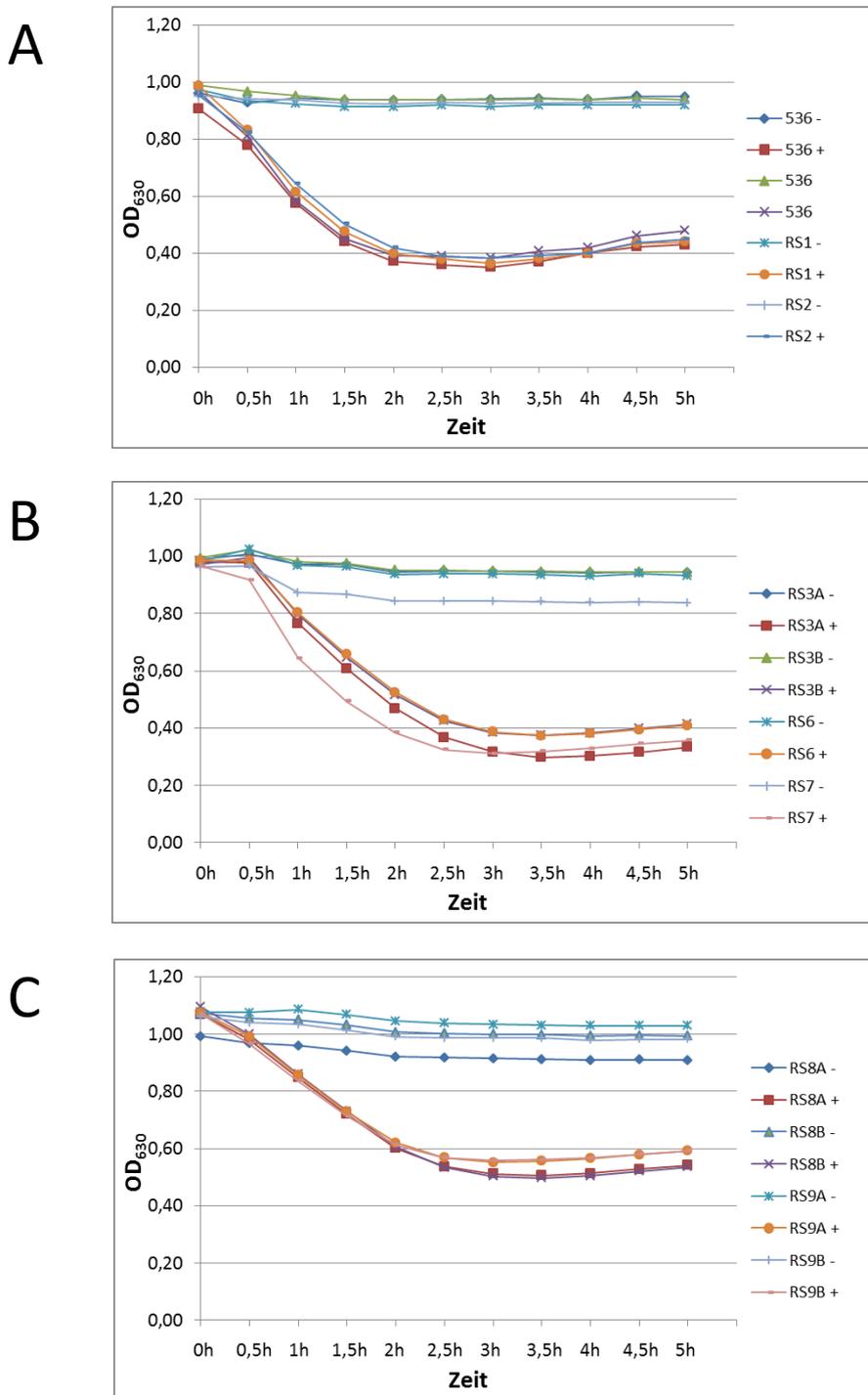


Abbildung 32: Vergleichende Siderophor-Kinetik der GT-Deletionsmutanten.

Graphische Darstellung des photometrischen Nachweises (OD₆₃₀) der Auflösung des Fe³⁺-CAS-Komplexes bei Anwesenheit von Siderophoren. Der Übersichtlichkeit wegen wurden die Ergebnisse auf drei Diagramme (A) – (C) verteilt. Die Siderophor-Kinetik der GT-Deletionsmutanten entsprach der der beiden Parentalstämme *E. coli* 536 und *E. coli* 536 $\Delta rfaH$.

-: Ansatz ohne Eisen-Chelator 2,2'-Dipyridyl, +: Ansatz mit Eisen-Chelator 2,2'-Dipyridyl.

7.6 Veröffentlichungen

7.6.1 Publikationen

Sebastian Reidl, Annika Lehmann, Roswitha Schiller, A. Salam Khan, Ulrich Dobrindt (2009).
Impact of O-glycosylation on the molecular and cellular adhesion properties of the *Escherichia coli* autotransporter protein Ag43. *International Journal of Medical Microbiology*. 299(6): 389–401.

Martina Bielaszewska¹, Roswitha Schiller¹, Lydia Lammers, Andreas Bauwens, Angelika Fruth, Barbara Middendorf, M. Alexander Schmidt, Phillip I. Tarr, Ulrich Dobrindt, Helge Karch, Alexander Mellmann (2014).

Heteropathogenic virulence and phylogeny reveal phased pathogenic metamorphosis in *Escherichia coli* O2:H6. *EMBO Mol. Med.* 6(3): 347–357.

(¹ geteilte Erstautorenschaft)

In Revision:

Francisco Toval, Roswitha Schiller, Iris Meisen, Johannes Putze, Ivan U. Kouzel, Wenlan Zhang, Helge Karch, Martina Bielaszewska, Michael Mormann, Johannes Müthing, Ulrich Dobrindt (2014).

Characterization of urinary tract infection-associated Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*

7.6.2 Vorträge

Roswitha Schiller, Ulrich Dobrindt

Characterization of protein glycosylation pathways in uropathogenic *Escherichia coli* strain 536

NoE-EPG-Konferenz „Pathogenomics - From basic research to practical application“, 22.-24. April 2010, Pécs, Ungarn

7.6.3 Posterpräsentationen

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

Impact of O-glycosylation on the molecular and cellular adhesion properties of the *Escherichia coli* autotransporter protein AG43

4. International Symposium organized by the students of the Graduate School of Life Sciences (GSLs), 13.-14. Oktober 2010, Würzburg, Deutschland

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

Investigation of protein glycosylation pathways in uropathogenic *Escherichia coli* strain 536

62. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) e.V., 28.-31. März 2010, Hannover, Deutschland

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

Characterization of protein glycosylation pathways in *Escherichia coli*

4th Student's meeting of the NoE-EPG-Graduate Academy, 27.-29. April 2009, Palma de Mallorca, Spanien

7.7 Lebenslauf

