



**Untersuchungen zur Struktur, Regulation und  
Funktion des nichtribosomalen Peptid-Polyketids  
Colibactin aus *E. coli***

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

vorgelegt von  
Grit Krumbholz  
aus  
Thale/ Harz

Würzburg 2010



Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

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

2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Dobrindt

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

## **Erklärung**

Gemäß § 4 Abs. 3 Ziff. 3, 5 und 8 der Fakultät für Biologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Dissertation hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Ich erkläre weiterhin, dass ich bisher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg,



## Danksagung

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

Besonders bedanken möchte ich mich bei

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

Herrn Prof. Dr. Ulrich Dobrindt für die kompetente Anleitung und Betreuung, seine Anregungen und konstruktive Kritik.

Prof. Michael Hecker und Dr. Birgit Voigt vom Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie, Greifswald für die Kooperation und fachkundige Anleitung, die mir die Möglichkeit zur Durchführung der Proteomanalyse gab.

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

der ganzen *E. coli*-Arbeitsgruppe für das freundliche Miteinander und die gute Stimmung, besonders Roswitha, Anja, Stefan, Johannes und Barbara für die gute Zeit und gegenseitige Hilfe.

Steffi für ihre Freundschaft und die schöne Zeit im Labor.

meinen Rostockern Axel, Katja, Dirk, Katrin und Antje für ihre Unterstützung, gutes Essen, Cocktailabende und so vieles mehr.....

meiner Familie für ihre Unterstützung und Aufmunterung in schwierigen Phasen

<b>Inhaltsverzeichnis</b>		<b>I-IV</b>
<b>1</b>	<b>Zusammenfassung, Summary</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
2.1	Die bakterielle Darmflora	5
2.2	Die Spezies <i>E. coli</i>	6
2.2.1	<i>E. coli</i> Nissle 19177	7
2.3	Polyketide und Nichtribosomale Peptide	8
2.3.1	Biosynthese von Polyketiden und nichtribosomalen Peptiden	9
2.3.2	Medizinischer Einsatz von Polyketiden und nichtribosomalen Peptiden	13
2.3.3	Funktion von Polyketiden und nichtribosomalen Peptiden und ihr Anteil bei der Vermittlung von Virulenz und Fitness	14
2.3.4	Polyketide und nichtribosomale Peptide in <i>E. coli</i>	15
2.4	Regulationsmechanismen der PK- und NRP-Synthese	18
2.5	Heterologe Expression von Polyketiden	20
2.6	Aufgabenstellung und Zielsetzung	22
<b>3</b>	<b>Material</b>	<b>23</b>
3.1	Bakterienstämme	23
3.2	Plasmide und Vektoren	24
3.3	Oligonukleotide	25
3.4	Chemikalien, Enzyme und Kits	26
3.5	Medien und Zusätze	26
3.6	Puffer und Lösungen	28
3.7	Geräte und Verbrauchsmaterialien	30
<b>4</b>	<b>Methoden</b>	<b>32</b>
4.1	Kultur von Bakterien	32
4.1.1	Anzucht und Stammhaltung	32
4.1.2	Bestimmung von Wachstumskinetiken	32
4.2	Zellkultur	32
4.2.1	Propagation von Zelllinien	32
4.2.2	Kokultur von HeLa-Zellen mit <i>E. coli</i> -Stämmen	32
4.3	Allgemeine molekularbiologische Methoden	33
4.3.1	Isolierung genomischer DNA aus <i>E. coli</i>	33
4.3.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	33
4.3.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>E. coli</i>	34
4.3.4	Bestimmung von Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen	35
4.3.5	Kontrolle der RNA-Integrität	36
4.3.6	PCR (Polymerase-Kettenreaktion)	36

## INHALTSVERZEICHNIS

4.3.7 Enzymatische Hydrolyse von DNA	37
4.3.8 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren im Agarosegel	37
4.3.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	38
4.3.10 Klonierung von DNA	38
4.3.11 Transformation von <i>E. coli</i> -Stämmen	39
4.3.12 Transformation von <i>Pseudomonas putida</i> KT2440	39
4.3.13 DNA-Sequenzierung	40
4.3.14 cDNA-Synthese und RT-PCR	40
4.3.15 quantitative Real-Time-PCR	40
4.4 Amplifizierung und Sequenzierung von 5'cDNA-Enden	41
4.4.1 Primer-Extension-Analyse	41
4.4.2 Amplifizierung von 5'cDNA-Enden mittels 5'/3'RACE-Kit (Roche)	44
4.5 Globale Transkriptomanalyse mittels DNA-Mikroarray	44
4.6 Konstruktion von Plasmiden	48
4.6.1 pME_Km_FRT1 bzw. pME_Km_FRT2	48
4.6.2 pBELOBACpkspME6030	48
4.7 Genetische Manipulation von <i>E. coli</i> -Stämmen	49
4.7.1 $\lambda$ -Red-Rekombinase vermittelte Allelaustauschmethode nach DATSENKO & WANNER (2000)	49
4.8 Proteinanalytik	49
4.8.1 Präparation zytoplasmatischer Proteine aus <i>E. coli</i>	49
4.8.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung mittels Roti <sup>®</sup> Nanoquant	49
4.8.3 Zweidimensionale SDS Polyacrylamidgelelektrophorese	50
4.8.4 Färbung der Proteingele mittels LavaPurple <sup>™</sup> - Fluoreszenzfärbung und Bilderfassung der 2-D Gele	50
4.8.5 Analyse von 2-D Gelen mittels Delta-2D Software	51
4.8.6 Identifizierung von Proteinen aus dem 2-D Gel mittels Massenspektroskopie	52
4.9 Phänotypische Charakterisierung	53
4.9.1 Nachweis der Siderophorenbildung in Kulturüberständen	53
4.9.2 Nachweis der Autoaggregation	53
4.9.3 Nachweis der Biofilmbildung	53
4.9.4 Ermittlung der Minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK-Test)	54
4.9.5 Nachweis des rdar-Morphotyps (Curli- und Zelluloseexpression)	54
4.9.6 Nachweis der Zellulosesynthese	54

<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>55</b>
5.1	Transkriptionsanalyse	55
5.1.1	Transkriptionsstartbestimmung relevanter Gene des Colibactin-Genclusters	55
5.1.2	Untersuchung der intergenischen Region zwischen <i>clbR</i> und <i>clbB</i>	57
5.1.3	Analyse von Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren	59
5.2	Analyse der Stabilität der <i>clb</i> -Transkripte	60
5.2.1	Vorhersage der Sekundärstruktur und Stabilität der <i>clbR</i> -mRNA	60
5.2.2	<i>clbR</i> -mRNA-Stabilität in Abhängigkeit vom 5'UTR	62
5.2.3	<i>clbB</i> -mRNA-Stabilität in Abhängigkeit vom 5'UTR	62
5.2.4	Stabilität einzelner <i>clb</i> -Transkripte	63
5.2.5	Bestimmung der Transkriptmengen einzelner <i>clb</i> -Gene in diskontinuierlicher Kultur	64
5.3	Regulationsmechanismen der Colibactin-Biosynthese	65
5.3.1	Rolle von <i>clbR</i> bei der Expression der strukturellen Gene des Colibactin-Clusters	65
5.3.2	Rolle von H-NS bei der Expression der strukturellen Gene des Colibactin-Genclusters	67
5.3.3	Untersuchungen der Transkription des Colibactin-Genclusters unter verschiedenen Bedingungen	67
5.4	Untersuchungen zum Einfluss des Colibactin-Genclusters auf den Gesamt-Metabolismus von <i>E. coli</i> Nissle 1917 mittels Proteom- und Transkriptom-Analyse	72
5.4.1	Vergleich des zytoplasmatischen Proteoms der <i>E. coli</i> Stämme Nissle 1917 und d Nissle 1917 $\Delta$ PKS	72
5.4.2	Mikroarray-basierte vergleichende Transkriptom-Analyse von <i>E. coli</i> Nissle 1917 im Vergleich mit der Deletionsmutante <i>E. coli</i> Nissle 1917 $\Delta$ PKS	77
5.5	Phänotypische Charakterisierung	83
5.5.1	Bestimmung der Minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK) von Polymyxin B	83
5.5.2	Biofilmbildung und Autoaggregation	84
5.5.3	Nachweis der Motilität	85
5.5.4	Nachweis von Curli-Fimbrien und Zelluloseproduktion	86
5.5.5	Eisenaufnahme	87
5.6	Heterologe Expression der <i>clb</i> -Gene in <i>Pseudomonas putida</i> KT2440	88

<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>90</b>
6.1	Strukturelle Charakterisierung des <i>clb</i> -Clusters in <i>E. coli</i> Nissle 1917	90
6.1.1	Analyse und Expression der <i>clb</i> -Gene	90
6.2	Mögliche regulatorische Mechanismen in der PK/NRP-Synthese	94
6.2.1	Posttranskriptionelle Regulation-Transkriptstabilität	96
6.2.2	Induktion der Transkription der <i>clb</i> -Gene-Regulation durch Umwelteinflüsse	98
6.2.3	Regulation der <i>clb</i> -Gene durch <i>clbR</i>	100
6.2.4	Regulation der <i>clb</i> -Gene durch H-NS	100
6.3	Über-Expression von Polyketiden und nichtribosomalen Peptiden	101
6.4	Einfluss des <i>clb</i> -Operons/ Colibactins auf den Gesamt-Metabolismus von <i>E. coli</i> Nissle 1917	102
6.5	Biologische Funktion von Colibactin-Beitrag der Colibactin-Synthese zur Fitness von <i>E. coli</i> Nissle 1917	105
6.5.1	Eisenaufnahme	106
6.5.2	Biofilmbildung	108
6.6	Fazit und Ausblick	109
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>110</b>
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>123</b>
A.1	Abkürzungsverzeichnis	123
A.2	Oligonukleotide	124
A.3	Primer-Extension Analyse	126
A.4	Analyse von Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren	129
A.5	Proteomanalyse	138
A.6	Vergleichende Transkriptomanalyse	143
A.7	Publikationen und Tagungsbeiträge	164
A.8	Lebenslauf	165

## 1. Zusammenfassung

Polyketide (PK) und nichtribosomale Peptide (NRP) sind zwei grosse Klassen von Naturstoffen, die eine grosse Vielfalt hinsichtlich ihrer Struktur und Funktion aufweisen. Sie werden von einer Reihe von Bakterien, Pilzen und Pflanzen als Sekundärmetabolite produziert und besitzen eine Vielzahl pharmakologisch wichtiger Aktivitäten, wie z.B. antimikrobielle, antimykotische, antitumorale oder antiparasitische Wirkungen. Ein Grossteil der bakteriellen Produzenten findet sich im Phylum *Firmicutes*, innerhalb der Gattungen *Bacillus*, *Streptomyces* und *Mycobacterium*. In *E. coli* sind Polyketide und nichtribosomale Proteine von eher geringer Bedeutung, mit Ausnahme der Siderophore Enterobactin und Yersiniabactin. Unerwartet war daher die Identifizierung eines neuen PKS/ NRPS-Gencluster in verschiedenen *E. coli*-Stämmen. Das 2006 durch NOUGAYRÈDE *et al.* zuerst beschriebene Colibactin-Gencluster kodiert für ein hybrides System aus modularen Polyketidsynthasen und nichtribosomalen Peptidsynthetasen sowie für zusätzliche editierende Enzyme und einen möglichen transkriptionellen Regulator (CibR). Das Produkt der PKS/NRPS-Synthasen, Colibactin, übt *in vitro* einen zytopathischen Effekt (CPE) auf Säugerzelllinien aus. Die zytopathische Aktivität Colibactins zeichnet sich u.a. durch die Induktion von Doppelstrangbrüchen in der DNA der eukaryotischen Zellen aus. Darüber hinaus kommt es zu einer Unterbrechung des Zellzyklus in der G<sub>2</sub>-Phase nach einer transienten *in vitro* Infektion mit Colibactin-positiven Bakterienstämmen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war besonders die weitere Aufklärung der Struktur des Colibactinclusters sowie die regulatorischen Mechanismen, die die Expression des hybriden nichtribosomalen Peptid-Polyketids von Interesse. Eine Transkriptionsanalyse führte zur Identifizierung der Transkriptionsstartpunkte der meisten relevanten Gene des Colibactinclusters. Basierend auf diesen neugewonnenen Informationen war eine Sequenzanalyse der *upstream*-Bereiche der Gene möglich, in deren Ergebnis neben den Elementen eines Sigma70-abhängigen Promotors, putative Bindestellen für mehrere Transkriptionsfaktoren identifiziert wurden. Untersuchungen zur Regulation der Colibactinsynthese zeigten, dass die Expression der Colibactin-Gene sowohl unter Kontrolle des Transkriptionsfaktors H-NS als auch des Colibactin-spezifischen Regulators CibR stehen.

Neben der Aufklärung der Struktur und Regulation der Colibactin-Gene bestand das Ziel dieser Arbeit in der Optimierung der Synthese des nichtribosomalen Peptid-

Polyketids. Hierfür durchgeführte Expressionstudien zeigten einen Einfluss von Fettsäuren und Indol sowie von der Sauerstoffverfügbarkeit auf die Promotoraktivität einzelner Gene des Colibactin-Genclusters. Darüberhinaus konnte das *pks*-Gencluster erfolgreich in *Pseudomonas putida* KT2440 transferiert werden sowie der Nachweis der Funktionsfähigkeit Colibactins in diesem Wirtsorganismus nachgewiesen werden. Wenngleich die Stabilität des für diesen Zweck konstruierten Shuttle-Vektors nicht von Dauer ist, konnte gezeigt werden dass *Pseudomonas putida* prinzipiell als Wirtssystem für die Realisierbarkeit der heterologen Expression von Colibactin, geeignet ist.

Zusätzlich zur Strukturanalyse des *pks*-Clusters und den Studien zur Expression der Colibactin-Gene befasste sich die hier vorliegende Arbeit mit der Fragestellung nach der biologischen Funktion Colibactins. Phänotypische Untersuchungen zeigen sowohl eine Beeinflussung der Eisenaufnahme als auch der Biofilmbildung durch das nichtribosomale Peptid-Polyketid. Dies sind die ersten Hinweise die zur Aufklärung der Funktion Colibactins beitragen könnten.

## Summary

Polyketides (PK) and nonribosomal peptides (NRP) are two large classes of natural products showing a great variety in structure and function. They are produced as secondary metabolites by a range of bacteria, fungi and plants and exhibit a wealth of pharmacologically important activities, including antimicrobial, antifungal, antitumor or antiparasitic properties. The vast majority of bacterial producers belong to the phylum *Firmicutes*, especially to the genera *Bacillus*, *Streptomyces* and *Mycobacterium*. With the exception of the siderophores enterobactin and yersiniabactin polyketides and nonribosomal peptides are of minor relevance within *E. coli*. Therefore unexpected was the identification of a new PKS/ NRPS gene cluster in several *E. coli* strains. The colibactin gene cluster being described for the first time in 2006 by NOUGAYRÈDE *et al.* is coding for a hybrid system of modular polyketide synthases and nonribosomal peptid synthetases as well as editing enzymes and a putative transcriptional regulator (CibR). The product of these PKS/ NRPS synthases, termed colibactin, induces *in vitro* a cytopathic effect (CPE) on mammalian cell lines. The cytopathic activity of colibactin is characterized by the induction of double strand breaks in the DNA of eukaryotic cells as well as the arrest of the cell cycle in G2 phase after transient infection with *E. coli* strains expressing colibactin.

In context of this thesis especially the elucidation of the regulation of *clb* operon transcription and the organisation of transcriptional units within the colibactin-encoding genomic island were of main interest. A transcriptional analysis led to the identification of the transcriptional starting points of most of the relevant genes within the colibactin cluster. Based on these newly obtained information it was possible to perform a sequence analysis of the upstream regions of the genes resulting in the detection of sigma70 depending promoter elements and several putative transcription factor binding sites. Studies on the regulation of the colibactin synthesis could also demonstrate that the expression of colibactin genes are under control of the transcription factor H-NS as well as the colibactin specific regulator CibR.

Beside the studies concerning the structure and regulation of colibactin genes optimization of the nonribosomal peptid-polyketid was object of this work. Therefore performed expression analysis showed an influence of fatty acids and indole, as well as the oxygen availability on the promoter activities of single genes within the

## SUMMARY

colibactin gene cluster. Further investigations belonging to the transcriptome and the proteome of the Colibactin expressing strain *E. coli* Nissle 1917 showed an overall influence of Colibactin synthesis on the amino acid and carbohydrate metabolism of this strain. Furthermore, a successful transfer of the *pks* gene cluster into *Pseudomonas putida* KT2440 was carried out as well as the demonstration of functionality of colibactin in this host organism. Even though long-term stability of the constructed shuttle vector was not given, it was shown that *Pseudomonas putida* is a suitable host for realizing the heterologous expression of colibactin.

Additionally to the structural analysis of the *pks* cluster and the studies on expression of the colibactin genes, this thesis questioned the biological function of Colibactin. Phenotypical examination showed an influence of iron uptake as well as on biofilm formation due to the nonribosomal peptide – polyketide. These are the first evidences that could contribute to the elucidation of Colibactin function.

## 2. Einleitung

### 2.1 Die bakterielle Darmflora des Menschen

Der menschliche Körper wird von einer Vielzahl von Mikroorganismen besiedelt. Die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften variiert zwischen einzelnen Menschen. Begründet ist dies durch Faktoren wie: der begrenzten Migration von Mikroorganismen zwischen einzelnen Wirten, der Ernährungsweise, genetischen Anlagen oder der Kolonisierungsgeschichte des einzelnen Individuums (DETHLEFSEN *et al.*, 2007).

Neben der Haut, dem Respirationstrakt und dem Urogenitaltrakt findet sich die mit Abstand höchste mikrobielle Besiedlung des menschlichen Körpers im Intestinaltrakt ( $10^{13}$  -  $10^{14}$  Bakterien). Mindestens 500 verschiedenen Arten können der menschlichen Darmflora, darunter: *Lactobacillus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Proteus mirabilis* und *E. coli* (STECHER *et al.*, 2010; MARIAT *et al.*, 2009). Ungefähr 90 % aller im Intestinaltrakt vorkommenden Bakterien können den Phyla *Firmicutes* (64%) und *Bacteroidetes* (23%) zugeordnet werden (HATORI & TAYLOR, 2009). Im Gegensatz dazu macht der Anteil der *Proteobacteria* und *Actinobacteria* gerade einmal 8 % bzw. 3 % der Darmflora des Menschen aus. Andere taxonomische Phyla sind unterdessen eher gering vertreten. Die genaue Zusammensetzung der bakteriellen Darmflora, auf Spezies- und Stamm-Ebene, variiert allerdings zwischen Individuen. Beeinflusst wird die Zusammensetzung der bakteriellen Darmflora u.a. durch Faktoren wie Alter, Ernährungsweise, kulturelle Bedingungen und die Verwendung von Antibiotika (TODAR, 2006).

In der Regel bestehen mutualistische Beziehungen zwischen dem menschlichen Wirt und den Darm besiedelnden Bakterien. Während der Intestinaltrakt den Bakterien ein grosses Nährstoffangebot bereitstellt, übernimmt die Darmmikroflora wichtige beschützende, metabolische und trophische Funktionen. Durch die im Darm bestehende mikrobielle Gemeinschaft wird u. a. dem Eindringen potenziell pathogener Mikroorganismen vorgebeugt. Diese „Kolonisierungsresistenz“ beruht auf der Tatsache, dass mögliche Anheftungsorte im Epithel bereits durch die dort angesiedelten Bakterien besetzt und somit für „fremde“ Bakterien unzugänglich sind. Ein zusätzlich schützender Effekt der Darmflora wird durch die Interaktion der Mikroorganismen mit den Zellen des Intestinaltrakts vermittelt. Da auch die normale Flora im Darm als Antigen wirkt, induziert sie eine schwache Antikörper-vermittelte Immunantwort. Die so generierten Antikörper sind auch gegen bestimmte verwandte Pathogene wirksam und können eine Infektion verhindern.

Metabolisch erhält der Wirtsorganismus Unterstützung u.a. durch die Fähigkeit bestimmter Bakterien, Vitamine zu synthetisieren. Zu den Vitaminen mit mikrobiellem Ursprung gehören z.B. Vitamin-K und einige B-Vitamine (Folat, B12 und Biotin). Synthetisiert werden sie z.B.

von Vertretern der Gattungen *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Propionibacterium* und *Fusobacterium*. Nutzbringend ist für den menschlichen Wirt auch die metabolische Fähigkeit der Darmmikroflora unverdauliche Kohlenhydrate wie langkettige Polysaccharide (Stärke, Pektine und Zellulose) und Oligosaccharide aufzuschliessen. Die Stoffwechselprodukte, kurzkettige Fettsäuren wie Azetat, Propionat und Butyrat dienen dem Wirt als zusätzliche Energie- und Nährstoffquelle. Zudem spielen die Fettsäuren eine fundamentale Rolle für die Darmphysiologie, indem sie die Epithelzellproliferation und Differenzierung stimulieren (CANNY & MCCORMICK, 2008 und Referenzen darin).

### 2.2 Die Spezies *E. coli*

*Escherichia coli* gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae* und zeigt Verwandtschaftsbeziehungen zu den Gattungen *Shigella*, *Citrobacter*, *Salmonella* und *Klebsiella*. *E. coli* Bakterien sind Gram-negative, fakultativ anaerobe Stäbchen mit einer Grösse von 1,1-1,5 µm x 2,0-6,0 µm.

Anhand verschiedener Antigenstrukturen (O-, K- und H-Antigene) lassen sich *E. coli* Bakterien detailliert differenzieren und serotypisieren. O-Antigene stellen dabei hitzestabile Bestandteile des Lipopolysaccharid-Komplexes (LPS) der äusseren Zellmembran, K-Antigene Polysaccharide der Kapsel und H-Antigene Flagellenantigene dar.

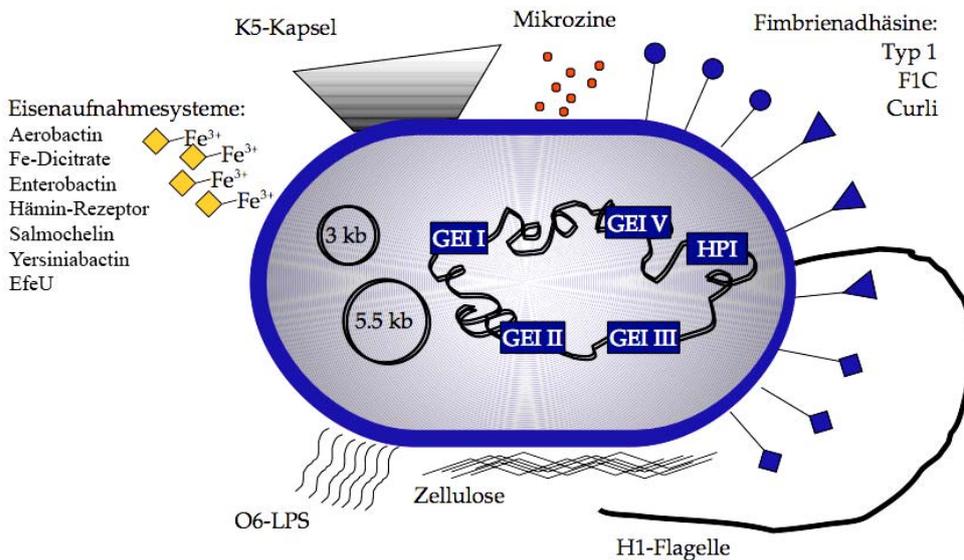
Es existieren zahllose Ökotypen von *E. coli*. Normalerweise besiedelt *E. coli* als harmloser, kommensaler Bewohner den Intestinaltrakt von Mensch und Tieren. Allerdings gibt es verschiedene hoch angepasste *E. coli* Bakterien, die durch den Erwerb spezifischer Fitnessfaktoren eine höhere Anpassungsfähigkeit an neue Nischen besitzen. Der Erwerb von Virulenzfaktoren kann das Bakterium dazu befähigen, sich Abwehrmechanismen des Wirts zu widersetzen und ein breites Spektrum an schwerwiegenden Erkrankungen hervorzurufen.

Die krankheitsverursachenden *E. coli* Stämme lassen sich in zwei grossen Gruppen zusammenfassen: die extraintestinal pathogenen *E. coli* (ExPEC) und die intestinal pathogenen *E. coli* (IPEC). Hauptsächlich führen Infektionen mit IPEC oder ExPEC zur Ausbildung der folgenden drei klinischen Syndrome: Darm- oder Durchfallerkrankungen, Harnwegsinfektionen, sowie Sepsis oder Meningitis. Anhand der Erkrankungen, die sie auslösen, lassen sich IPEC und ExPEC in gut beschriebene Kategorien einteilen: enteropathogene *E. coli* (EPEC), enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC), enterotoxische *E. coli* (ETEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), diffus adhärente *E. coli* (DAEC), uropathogene *E. coli* (UPEC), Meningitis-assoziierte *E. coli* (MNEC) und Sepsis auslösende *E. coli* (SEPEC) (KAPER *et al.*, 2004).

Heutzutage gehört *E. coli* zu einem der am besten untersuchten Mikroorganismen und findet darüber hinaus weite Anwendung in molekularbiologischen Laboratorien und spielt eine wichtige Rolle in vielen biotechnologischen Prozessen.

### 2.2.1 *E. coli* Nissle1917

*E. coli* Nissle 1917 (O6:K5:H1) ist ein typisches Beispiel für ein nicht-pathogenes, kommensales *E. coli* Bakterium. Isoliert wurde der Stamm im Jahr 1917 von Prof. Alfred Nissle aus der Stuhlprobe eines Soldaten, der im Gegensatz zu seinen Kameraden keine Enterocolitis entwickelte, die zu dieser Zeit in seinem Stationierungsgebiet grassierte (NISSLE, 1918). In Form des Präparates Mutaflor® ist der Stamm heutzutage im Einsatz gegen verschiedene Darmerkrankungen, wie z.B. Colitis ulcerosa, Morbus Crohn oder chronische Obstipation (KRUIS, 2004; MALCHOW, 1997, MÖLLENBRINK & BRUCKSCHEN, 1994). In diversen Studien konnte eine erfolgreiche Kolonisierung des Darms mit *E. coli* Nissle 1917 zur Prävention von Durchfallerkrankungen bei Säuglingen und Kleinkindern, als auch zur Behandlung verschiedener gastrointestinaler Beschwerden nachgewiesen werden (LODINOVA-ZADNIKOVA *et al.*, 1992; CUKROWSKA *et al.*, 2001, KRAMMER *et al.* 2006). Faktoren und Mechanismen, die aber letztendlich die Besiedelung des menschlichen Darms durch *E. coli* Nissle 1917 begünstigen, sind weitestgehend unbekannt.



**Abb. 1:** Eigenschaften von *E. coli* Nissle 1917. Schematische Darstellung der wichtigsten Oberflächenstrukturen und anderer Faktoren, die zur Fitness des Stammes beitragen. Modifiziert nach J. Hacker.

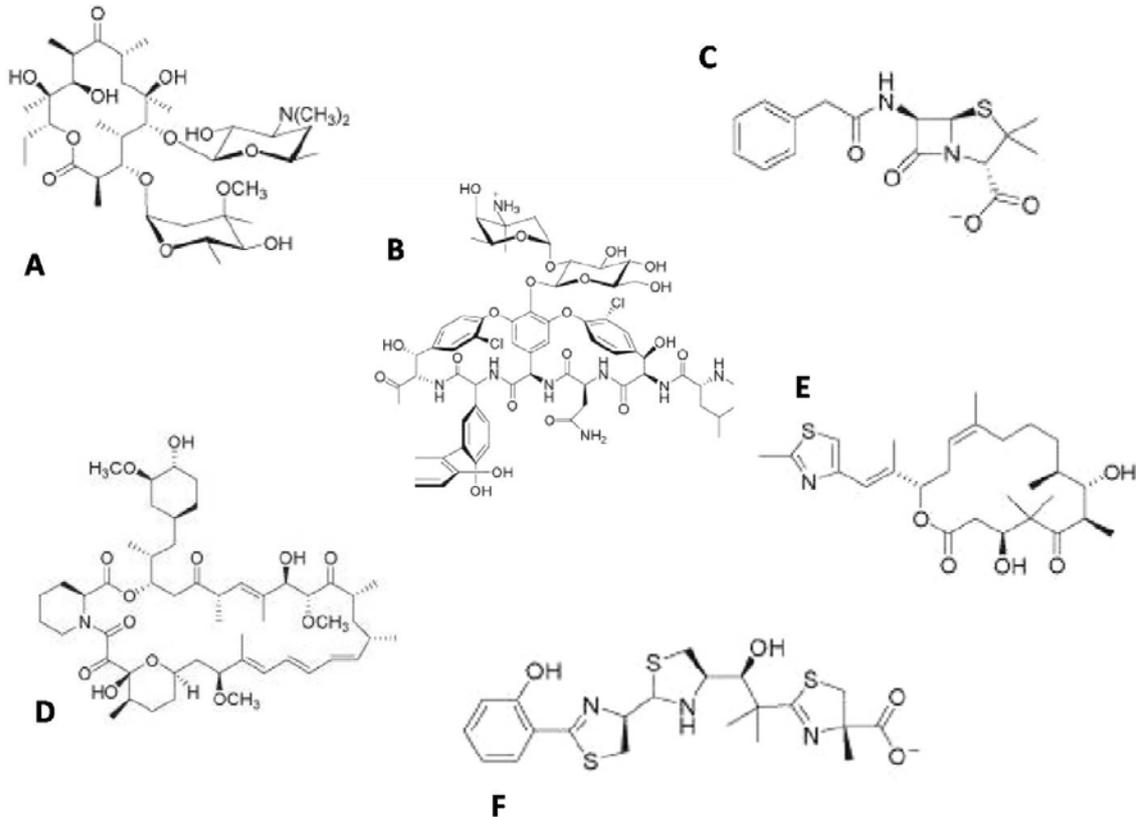
Möglicherweise wird die Fähigkeit des Stammes zur Kolonisierung des menschlichen Darm durch das Fehlen definierter Virulenzfaktoren ( $\alpha$ -Hämolysin, P-Fimbrien, semi-raues LPS) beim gleichzeitigen Auftreten diverser Fitnessfaktoren, wie z.B. Mikrozininen (PATZER *et al.*, 2003), Eisenaufnahmesystemen, Adhäsinen und Proteasen (GROZDANOV *et al.*, 2004; GROSSE *et al.*, 2006) gefördert.

Weiterführende Studien, die sich thematisch mit der Immunreaktion des Wirtsorganismus bei Besiedelung mit *E. coli* Nissle 1917 befassten, ergaben darüber hinaus eine Induktion zellulärer Abwehrmechanismen in Form der Expression des antimikrobiellen Peptids hBD-2 (humanes beta-Defensin-2) in Caco-2-Zellen (WEHKAMP *et al.*, 2004) sowie die erhöhte Expression von Genen, die für die proinflammatorischen Moleküle MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), MIP-2a (Macrophage Inflammatory Protein-2 alpha) und MIP-2b (Macrophage Inflammatory Protein-2 beta) kodieren (UKENA *et al.*, 2005). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit *E. coli* Nissle 1917 keinen Effekt auf die Migration, die klonale Ausbreitung und den Aktivierungsstatus spezifischer CD4<sup>+</sup>-T-Zellen ausübt (WESTENDORF *et al.*, 2005).

Ursprünglich aufgrund seiner therapeutischen Wirkung geschätzt, ist *E. coli* Nissle 1917 heutzutage angesichts seiner Eigenschaften, vor allem in Hinsicht auf Apathogenität, kombiniert mit Fitness und Kolonisationsfähigkeit ein beliebter Modellorganismus in Wissenschaft und Forschung.

### **2.3 Polyketide und nichtribosomale Peptide**

Polyketide (PK) und nichtribosomale Peptide (NRP) sind zwei grosse Klassen von Naturstoffen, die eine grosse Vielfalt hinsichtlich ihrer Struktur und Funktion aufweisen und von einer Reihe von Bakterien, Pilzen und Pflanzen als Sekundärmetabolite produziert werden (Abbildung 2). Sie besitzen eine Reihe von pharmakologisch wichtigen Aktivitäten, wie z.B. antimikrobielle, antimykotische, antitumorale oder antiparasitische Wirkungen. NRP werden durch die sequentielle Kondensation von Aminosäure-Monomeren synthetisiert. Hingegen erfolgt die Synthese von Polyketiden durch die wiederholte Addition einfacher Carbonsäuren (Acyl CoA-Derivate).

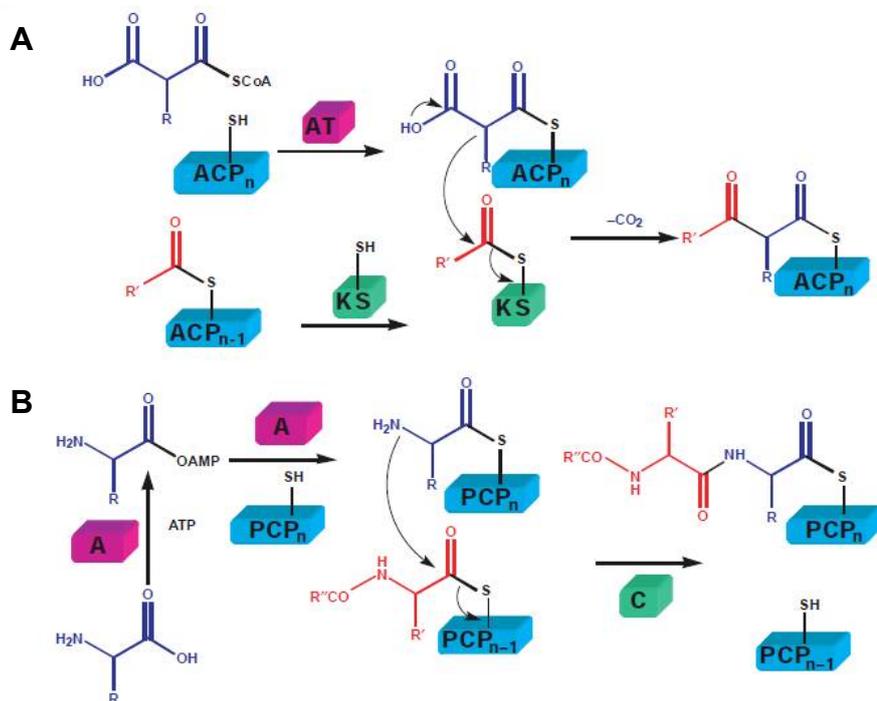


**Abb. 2:** Beispiele für bedeutsame Polyketide und nichtribosomale Peptide. A: Erythromycin A; B: Vancomycin; C: Penicillin G; D: Rapamycin; E: Epothilone D; F: Yersiniabactin (mod. nach FISCHBACH & WALSH, 2006)

### 2.3.1 Biosynthese von Polyketiden und nichtribosomalen Peptiden

Die Synthese von PKs und NRPs erfolgt durch Polyketidsynthasen (PKS) bzw. nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS). Diese Enzyme stellen einige der grössten bekannten Proteine dar. NRPS und PKS sind aus Modulen aufgebaut. Jedes dieser Module ist jeweils für die Katalyse eines Verlängerungs- oder Modifizierungsschrittes der Polyketid- bzw. Polypeptidkette verantwortlich. Daraus ergibt sich eine direkte Korrelation zwischen der Anzahl der Module einer PKS bzw. NRPS und der Anzahl der Ketid- bzw. Peptid-Untereinheiten des Enzym-Produktes. Innerhalb jedes Moduls einer NRPS bzw. PKS gibt es eine sogenannte Kerndomäne, die die Addition einer neuen Peptid- bzw. Polyketideinheit katalysiert. Im Fall einer NRPS besteht das minimale Kern-Modul aus einer Adenylierungsdomäne (A), einer Kondensationsdomäne (C), welche die Bildung der Peptid-Bindung katalysiert und einer Peptidyl-Träger Domäne (PCP) mit einer Phosphopantetheine-Gruppe, die die wachsende Peptid-Kette an verschiedene katalytische Zentren überträgt. Ein ähnlicher Aufbau findet sich auch im Kern-Modul einer PKS. Diese setzt sich zusammen aus einer Acyl-Transferase Domäne (AT) für die Auswahl und die Übertragung der wachsenden

Ketidkette, einem Acyl-Träger Protein (ACP) mit einer Phosphopantetheinyl-Gruppe und einer Ketoacyl-Synthase Domäne (KS), die die decarboxylierende Kondensation katalysiert (Abbildung 3). Während der Biosynthese bleibt das wachsende Polyketid bzw. Peptid kovalent an das Enzym gebunden und erst nach Erreichen der vollständigen Länge wird die Freisetzung des Produktes vom Enzym durch eine Thioesterase Domäne vermittelt (CANE & WALSH, 1999). Als Konsequenz ihres multifunktionalen Charakters kann ein einzelnes Protein dutzende unabhängiger enzymatischer Reaktionen katalysieren. So führen z.B. die Rapamycin PKS (SCHWECKE *et al.*, 1995) und die Cyclosporin NRPS (WEBER *et al.*, 1994) 51 bzw. 40 enzymatische Schritte bis zum Zusammenbau des jeweiligen Produktes aus.



**Abb.3:** Funktion und Mechanismus der katalytischen und Träger-Domänen in PKS (A) und NRPS (B). Die Acyltransferase-Domäne (AT) verbindet den flexiblen Phosphopantetheinyl-Rest der Acyl-Träger-Domäne (ACP) mit dem neuen Kettenglied (Malonyl- oder Methylmalonylgruppe). Die Ketosynthase-Domäne (KS) wird mit dem (Poly-) Ketid aus der vorangegangenen Kettenverlängerung acyliert und katalysiert den Transfer dieses Acyl-Restes auf das (Methyl-)Malonyl-S-ACP; B: Die Adenylierungsdomäne (A) aktiviert ein neues Aminosäure-Kettenglied (blau), das als Aminoacyl-Adenylat auf den Phosphopantetheinyl-Rest der Peptidyl-Träger-Domäne (PCP) übertragen wird. Die Kondensationsdomäne (C) katalysiert einen nukleophilen Angriff des Amino-Stickstoffs des Akzeptors Aminoacyl-S-PCP aus der vorangegangenen Kettenverlängerung auf den Peptidylacyl-Rest des Donors. (CANE & WALSH, 1999).

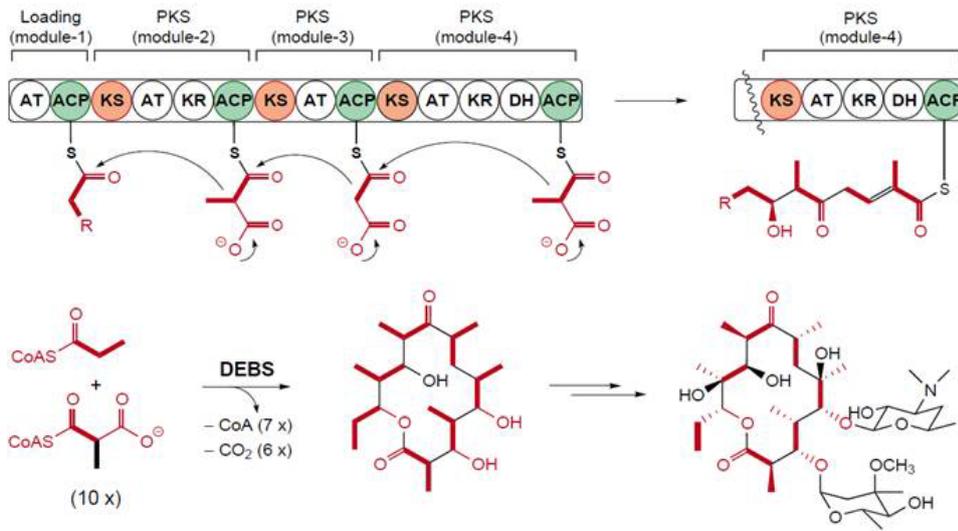
Derzeitig sind drei Typen bakterieller PKS bekannt: die modularen Typ I PKS, die iterativen Typ II PKS und die Chalcon-Synthase ähnlichen Typ III PKS (Abbildung 4).

Typ I PKS bestehen aus sehr grossen multifunktionalen Proteinen mit einem prozessiven Charakter wie z.B. im Fall der einzigartigen modularen Systeme, welche die Synthese der Makrolide Erythromycin, Rapamycin und Rifamycin katalysieren. Sie besitzen ein gesondertes aktives Zentrum für jeden einzelnen enzymatischen Reaktionsschritt. Die modularen Typ I PKS besitzen viele aktive Domänen, die in Modulen organisiert sind. Jedes Modul ist verantwortlich für die Bildung einer C-C-Bindung im wachsenden Polyketid. Zusätzlich gibt es in jedem Modul noch besondere Domänen, die das erste PKS-Modul mit einem Startermolekül beladen und so für die Initiation der Kettenbildung sorgen. Am Ende des letzten Moduls findet sich oft eine Thioesterase-Domäne (TE), die für den Abschluss der Kettenverlängerung sorgt, indem sie das Polyketid vom Enzymkomplex abspaltet.

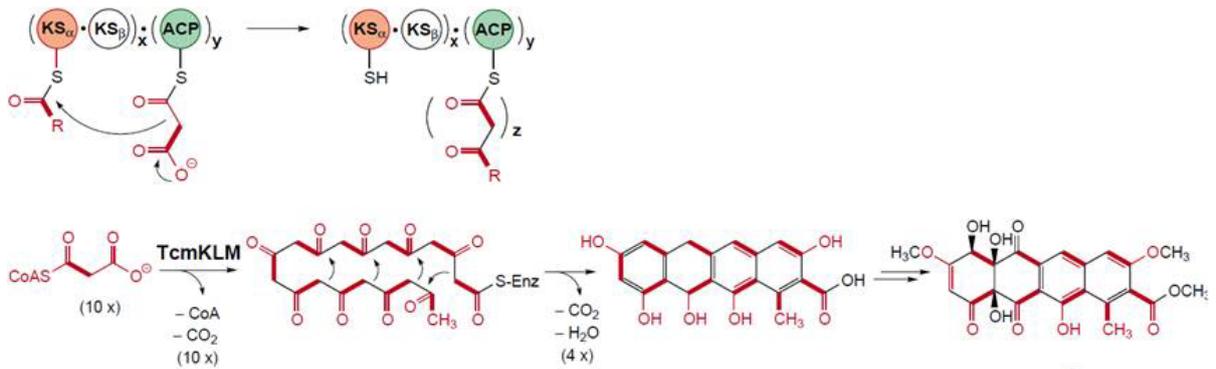
Aromatische Polyketide wie Actinorhodin, Tetracenomycin und Doxorubicin werden hauptsächlich von iterativen PKS gebildet, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu bakteriellen Typ-II-Fettsäuresynthasen auch Typ II-PKS genannt werden. In Analogie zu bakteriellen Typ II Fettsäuresynthasen setzen sich Typ II PKS aus verschiedenen individuellen Enzymen zusammen. Sequenzinformationen zahlreicher Typ II PKS Gencluster zeigen das Kennzeichen für die Biosynthese aromatischer Polyketide: in allen Fällen ist ein minimaler Satz iterativ genutzter Enzyme involviert. Gewöhnlich besteht die sogenannte „minimale PKS“ aus zwei Ketosynthaseuntereinheiten ( $KS\alpha$  und  $KS\beta$ ) und einem Acyl-Träger Protein (ACP), welches als Anker für die wachsende Polyketidkette dient. Mit wenigen Ausnahmen sind die Gene, die für diese drei Proteine kodieren, als Gruppe organisiert und zeigen einen typischen  $KS\alpha$ /  $KS\beta$ / ACP Aufbau. Zusätzliche PKS-Untereinheiten wie Ketoreduktasen und Zyklasen koordinieren die Faltung des poly- $\beta$ -Keto-Intermediat. Die abschliessende Modifizierung der Polyketide wird von Oxygenasen, Glykosyl- und Methyltransferasen vorgenommen. Typischerweise kommen die Gene, die die Polyketid-modifizierenden Enzyme kodieren, im Cluster gruppiert vor.

Die Typ III PKS, die auch unter dem Namen Chalcon-ähnliche PKS bekannt sind, wurden bis zur Entdeckung bakterieller Typ III PKS gewöhnlich mit Pflanzen in Verbindung gebracht. Während sie bei Pflanzen für die Synthese von Chalconen und Stilbenen dienen, sind sie in Prokaryoten für die Synthese von Polyhydroxyphenolen verantwortlich (BANGERA & THOMASHOW, 1999; MOORE & HOPKE, 2001). Die Chalconsynthase-ähnlichen Proteine sind verhältnismässig kleine Proteine, die aus einer einzelnen Polypeptidkette (80-90 kDa) bestehen. Wie im Fall der Typ II PKS erfolgt die Synthese des Polyketids bei Typ III PKS iterativ. Anders als alle übrigen PKS besitzen sie keinen Phosphopantheteinyl-Arm, an welchen normalerweise die wachsende Polyketidkette gebunden ist.

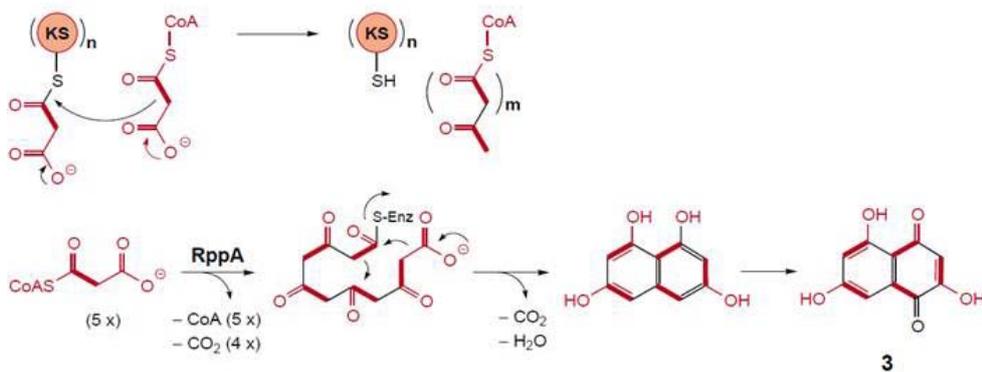
**A Type I PKS (noniterative)**



**B Type II PKS (iterative)**



**C Type III PKS (ACP-independent & iterative)**



**Abb.4:** Strukturen und Mechanismen bakterieller PKS. A: Typ I PKS bestehend aus nicht-iterativ arbeitenden Domänen, erklärt am Beispiel der 6-Deoxyerythromycin B Synthase (Erythromycin-Synthese). B: Typ II PKS bestehend aus iterativ arbeitenden Untereinheiten, erklärt am Beispiel der Tetramycin-Polyketid-Synthase TcmKLM (Tetracenomycin-Biosynthese). C: Typ III PKS bestehend aus iterativ arbeitenden einzelnen Untereinheiten, am Beispiel der RppA-Polyketidsynthase (Flaviolin-Synthese) (SHEN, 2003)

Neben der Kerndomäne gibt es einen variablen Satz zusätzlicher Domänen, die für die Modifikationen des Polyketids verantwortlich sind (z. B. Reduktion, Dehydrierung). Die präzise Kombination dieser additiven Domänen trägt mit zum unglaublich reichen Spektrum der strukturellen Komplexität der PK bei.

Die Biosynthese von NRP folgt im Prinzip dem generellen Schema von Typ I PKS. NRPS besitzen einen multimodularen Charakter, der Einbau einer Aminosäure erfolgt jeweils durch ein Modul. Wie bei PKS wird die Freisetzung des NRPS-Produktes vom Enzym normalerweise durch eine Thioesterase (TE) Domäne vermittelt. Alternativ kann die Abspaltung des NRP vom Enzymkomplex allerdings auch TE-unabhängig durch eine Reduktion des Produktes unter Bildung eines Aldehyds erfolgen. Wie schon im Fall der PKS existieren neben der Kerndomäne der NRPS, additive Domänen, die für die Modifizierung der wachsenden Peptidylkette verantwortlich sind und z.B. N-Methylierungen oder Zyklisierungsreaktionen durchführen (MARAHIEL *et al.*, 1997).

Aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen finden Polyketide und nichtribosomale Proteine eine weite Anwendung z.B. als Antibiotika, Cholesterol-senkende Mittel oder Immunsuppressiva im klinischen Bereich. Die grosse Nachfrage nach neuen PK/ NRP, vor allem im medizinischen Bereich, führte schnell zum Einsatz rekombinanter Techniken, welche durch Deletion, Umlagerung oder Insertion verschiedener Domänen oder ganzer PKS/ NRPS-Module die Synthese neuer „nicht-natürlich“ natürlicher PK/ NRP-Produkte ermöglichte (STAUNTON & WILKINSON, 2001; WEISSMAN & LEADLAY, 2005).

### 2.3.2 Medizinischer Einsatz von Polyketiden und nichtribosomalen Peptiden

Die Produkte vieler PKS und NRPS weisen u.a. pharmakologisch interessante Eigenschaften auf und finden dadurch heutzutage weite Anwendung im medizinischen Bereich. Zum Einsatz kommen sie z.B. aufgrund ihrer antimikrobiellen, immunsupprimierenden, antitumoralen oder cholesterinsenkenden Wirkung. Zu den antibiotisch wirksamen, pharmakologisch wichtigen Vertretern zählen u.a. die nichtribosomalen Peptide Cephalosporin und Penicillin ( $\beta$ -Lactam-Antibiotika aus *Aspergillus* und *Penicillium*), Daptomycin (*Streptomyces roseosporus*), Vancomycin und Teichoplanin (*Amycolatopsis orientalis*), Capreomycin (*Saccharothrix mutabilis* subsp. *capreolus*) sowie das Polyketid Rifampicin (*Amycolatopsis mediterranei*). Der Einsatz dieser antibiotisch wirksamen Substanzen erfolgt u.a. zur Therapie von Hautinfektionen, die durch Gram-positive Pathogene, einschliesslich Methicillin- und Vancomycinresistenter *S. aureus* hervorgerufen werden, als auch zur Behandlung von Bakteriämie und Endokarditis (Daptomycin) (KIRKPATRICK, 2003). Zum Einsatz des Glykopeptids Vancomycin kommt es z.B. bei der Bekämpfung ernsthafter Infektionen mit bestimmten *Staphylococcus*- oder

*Streptococcus*-Stämmen (NICAS & COOPER, 1997). Capreomycin und Rifampicin werden bei der Behandlung von Tuberkulose eingesetzt. Darüber hinaus wird Rifampicin aber auch bei der Therapie von Lepra oder AIDS-assoziierten mykobakteriellen Infektionen angewandt (VAN SCOY & WILKOWSKA, 1999). Neben der Vielzahl an therapeutisch genutzten antibiotisch wirksamen PK und NRP macht man sich in anderen medizinischen Bereichen vor allem die immunsupprimierende oder antikanzerogene Wirkung einiger Vertreter der beiden Naturstoffklassen zu nutze. So werden z.B. Cyclosporin A (Undecapeptid aus *Tolypocladium inflatum*) und Rapamycin (makrozyklisches PK aus *Streptomyces hygroscopicus*) aufgrund ihrer immunsupprimierenden Wirkung nach Organtransplantationen eingesetzt, um mögliche Abstossungsreaktionen zu verhindern (FELNAGLE *et al.*, 2007; ABRAHAM & WIEDERRECHT, 1996). Darüber hinaus konnte in zahlreichen Versuchen eine zytostatische Wirkung von Rapamycin auf verschiedene Krebszelllinien (z.B. Pankreas-, Brust- und Prostatakrebszelllinien, B-Zelllymphom, Neuroblastom) nachgewiesen werden (HUANG & HOUGHTON, 2001). Nach weiteren präklinischen Studien wurde Rapamycin im Jahr 2009 zur Behandlung von fortgeschrittenem Nierenkrebs zugelassen. Weitere Studien sollen nun über den Einsatz von Rapamycin auch bei anderen Krebserkrankungen entscheiden. Ein deutlich grösseres Anwendungsspektrum in der medikamentösen Therapie von Krebserkrankungen besitzt Bleomycin. Unter dem Namen Blenoxan wird es u.a. bei der Behandlung des Hodgkin-Lymphoms, diverser Karzinome der Haut, des Kopfes und des Halses sowie von Hodenkrebs eingesetzt (BOGER & CAI, 1999; KURUVILLA, 2009; GOOD *et al.* 2010; GARCIA-DEL-MURO *et al.*, 2008).

Aufgrund ihrer vielseitigen biologischen Aktivitäten und den daraus resultierenden Anwendungsmöglichkeiten im medizinischen Bereich besteht ein grosses Interesse an der Entwicklung neuer PK und NRP. Neben der Möglichkeit vorhandene Substanzen zu modifizieren, ist es durch den multimodularen Charakter der PKS und NRPS auch denkbar, durch die Kombination einzelner PKS- und NRPS-Module, die bereits bestehende strukturelle Diversität der Polyketide und nichtribosomalen Peptide zu erhöhen (STAUNTON & WILKINSON, 2001).

### **2.3.3 Funktionen von Polyketiden und nichtribosomalen Peptiden und ihr Anteil bei der Vermittlung von Virulenz und Fitness**

Mikroorganismen können bei Bedarf eine Reihe von ungewöhnlichen Sekundärmetaboliten produzieren, die eine zweitrangige Rolle in der Ontogenese des Organismus spielen. Sie dienen z.B. Abwehr-, Angriffs- oder Kommunikationszwecken und sind u.a. mit dafür verantwortlich, dass der produzierende Organismus konkurrenzfähig bleibt. Polyketide und nichtribosomale Peptide sind zwei dieser Gruppen, die eine grosse Vielfalt hinsichtlich ihrer biologischen Aktivitäten aufweisen. Für den produzierenden Organismus spielen PK und

NRP häufig eine relevante Rolle bei auftretendem Konkurrenzdruck, Wachstums- und Differenzierungsprozessen sowie bei der Vermittlung von Stressresistenzen. So sind sie z.B. mit Hilfe bestimmter PK und NRP in der Lage das Wachstum von Konkurrenten zu inhibieren (Erythromycin A) oder um Ressourcen wie Eisen zu wetteifern (Enterobactin, Yersiniabactin). Im Fall des Pflanzenpathogens *Cochliobolus heterostrophus* aus der Familie der Ascomyceten wird eine erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress durch die Expression des NRP NPS6 vermittelt (LEE *et al.*, 2005) und in *Bacillus brevis* beeinflusst die Expression des Decapeptids Gramicidin-S die Ausbildung hitzeresistenter Sporen (MARAHIEL *et al.*, 1979).

In anderen Fällen steht die Bildung von Polyketiden und nichtribosomalen Peptiden allerdings auch im Zusammenhang mit einem erhöhten Virulenzpotenzial des Organismus. So unterstützen, im Fall von *Mycobacterium tuberculosis*, an der Zelloberfläche exponierte Polyketide sowohl das bakterielle Wachstum als auch die Virulenz. Sie bilden eine direkte Barriere gegen Wirts-induzierte Schädigungen und modulieren die Immunantwort auf die Infektion durch Änderung des Cytokin-Profiles in Makrophagen (JAIN, 2005).

Ein weiteres Beispiel für virulenzvermittelnde PK stellt das von *Pseudomonas syringae* produzierte, Chlorose induzierende Phytotoxin Coronatin dar. Dieser Virulenzfaktor führt in höheren Pflanzen zu erhöhter Ethylenentwicklung sowie einer beschleunigten Seneszenz. Vermutlich beruhen die durch Coronatin ausgelösten Symptome auf starken strukturellen und funktionellen Homologien des Phytotoxins zum Phytohormon Jasmonsäure, welche u.a. für die Regulation von Wachstum und Alterungsprozessen bei Pflanzen verantwortlich ist. (BENDER *et al.*, 1999)

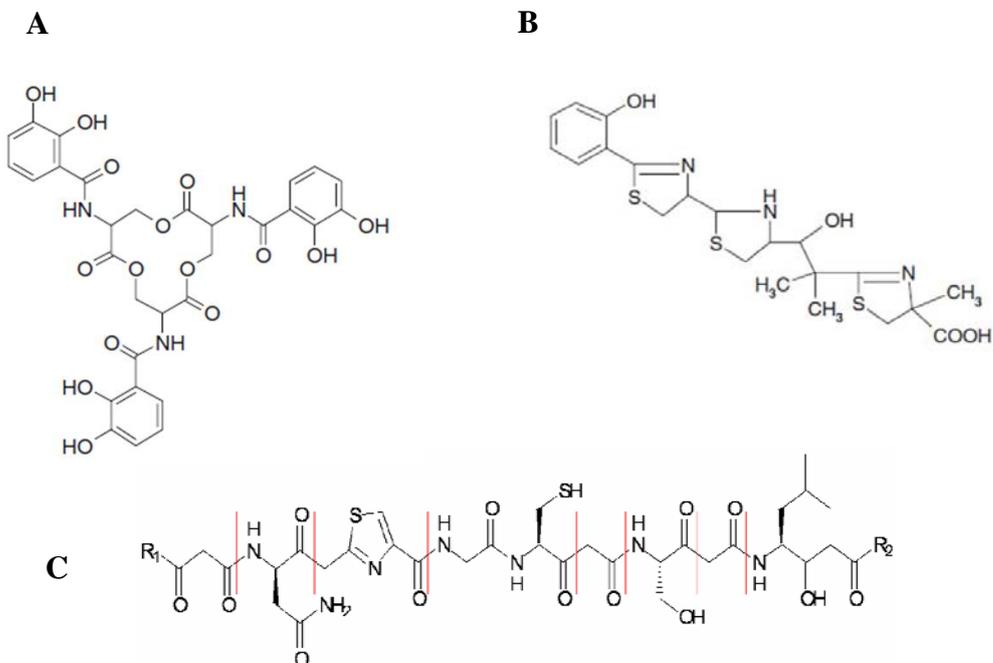
Bei der Unterscheidung zwischen einem Fitnessfaktor und einem Virulenzfaktor kann allerdings nicht immer eine klare Grenze gezogen werden. Es muss auch immer der ökologische Kontext in Betracht gezogen werden, da viele Faktoren, die die Virulenz von Pathogenen erhöhen, auch in nicht-pathogenen Mikroorganismen zu finden sind. Diese Faktoren erhöhen also die Fitness eines Mikroorganismus und sind nicht zwangsläufig für erhöhte Pathogenität verantwortlich (DOBRINDT *et al.*, 2003).

### **2.3.4 Polyketide und nichtribosomale Peptide in *E. coli***

Im Fall von *E. coli* sind Polyketide und nichtribosomale Proteine von eher geringer Bedeutung, mit Ausnahme der Siderophore Enterobactin und Yersiniabactin und dem 2006 erstmals beschriebenen Polyketid Colibactin.

**Enterobactin und Yersiniabactin**

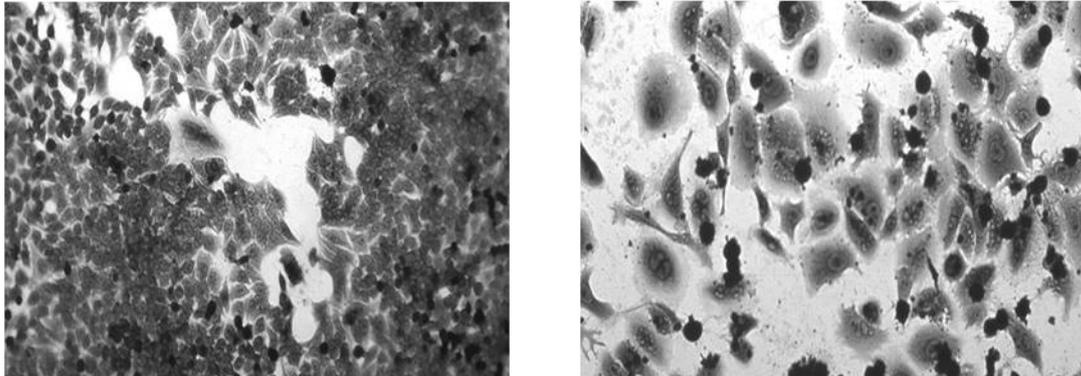
Für nahezu alle Lebewesen ist Eisen ein essentielles Element. So benötigt eine bakterielle Zelle ( $10^{-9} \text{ cm}^3$ ) pro Generationzeit  $10^5$  -  $10^6$  Eisen (III)-Ionen, um die interne Konzentration von  $10^{-6}$  Eisen (III)-Ionen aufrecht zu erhalten. Infolgedessen haben Bakterien leistungsfähige Eisenaufnahmesysteme entwickelt. In Antwort auf Eisenmangel werden selektive Eisen-Chelatoren (Siderophore) produziert und sezerniert. *E.coli* Nissle 1917 produziert insgesamt vier Siderophore, darunter das nichtribosomale Peptid Enterobactin und Yersiniabactin, ein Hybrid aus Polyketid und nichtribosomalem Peptid. Ihren Anfang nimmt die Synthese von Enterobactin in Chorismat, einem Vorläufer aromatischer Aminosäuren (Shikimat-Weg), das über zwei weitere enzymatische Schritte in 2,3-Dihydroxybenzoesäure (DHB) umgewandelt wird. An den weiteren Syntheseschritten, die zur Verknüpfung von DHB und L-Serin und der Hydrolyse von drei Molekülen DHB-Serin durch intermolekulare Zyklisierung führen, sind die Produkte von mindestens fünf Genen beteiligt (*entB*, *entC*, *entD*, *entE*, *entF*). Auch im Fall der Yersiniabactinsynthese stellt Chorismat den Ausgangspunkt dar. Über zwei Syntheseschritte wird Chorismat in Salicylsäure umgewandelt. Der Yersiniabactin-Biosynthese-Komplex beinhaltet fünf Proteine YbtE, HMWP1, HMWP2, YbtU und YbtT. Dieser Komplex setzt die Salicylsäure, drei Cystein und einen Malonylrest zum funktioniellen Eisenchelator zusammen (Abb.5; GROSA & WALSH, 2002).



**Abb.5:** Struktur der Siderophoren Enterobactin (A) und Yersiniabactin (B) sowie die putative Struktur des hybriden Peptid-Polyketids Colibactin (C).



eukaryotischen Zellen einher, der sich durch eine fortschreitende Vergrößerung des Zellkörpers und Nukleus auszeichnet, einer sogenannten Megalocytose (Abbildung 7). Es zeigte sich, dass der CPE strikt kontaktabhängig ist. So kam es zu keiner Induktion des CPE bei räumlicher Trennung von Bakterien und eukaryotischen Zellen. Ebenso wenig konnte nach Einsatz Hitze- oder Gentamycin-inaktivierter Bakterien oder bei Verwendung der bakteriellen Überstände oder Lysate eine Megalocytose der eukaryotischen Zellen beobachtet werden (NOUGAYRÈDE *et al.*, 2006).



**Abb. 7:** Zytopathischer Effekt von Colibactin. Morphologie von HeLa-Zellen. A: Kontrolle ohne Bakterien, Kultivierung in DMEM; B: 72 h nach Kokultur mit *E. coli* Nissle 1917

Durch die Eigenschaft Colibactin-produzierender Stämme, einen CPE in eukaryotischen Zellen zu induzieren, stellt sich die Frage der Bedeutung des Colibactins. Denkbar wäre eine Funktion des Polyketids als Fitnessfaktor, der die Kolonisierungsfähigkeit des Bakteriums in seinem Habitat erhöht.

## 2.4 Regulation

Die Polyketidsynthese, ebenso wie der Sekundärmetabolismus, zeichnet sich durch die Gruppierung der beteiligten Gene aus. Bei einem Grossteil dieser Gencluster wird die Genexpression der einzelnen Polyketidsynthese-Gene durch ein regulatorisches Protein kontrolliert, welches vorwiegend innerhalb des *pks*-Clusters kodiert wird. So wird z.B. die Produktion des Polyketids Actinorhodin aus *Streptomyces coelicolor* A3(2) durch das Gen *actII*-ORF4-Gen kontrolliert, welches einen positiven Regulator kodiert. Dieses regulatorische Protein ist unabdingbar für die Transkription der strukturellen *act* Gene. Darüber hinaus verfügt das *actII*-Gencluster über einen zweiten Regulator, kodiert durch das Gen *actII*-ORF1. Dessen Genprodukt, ein Repressor, die Expression der Gene *actII*-ORF2 und ORF3 (Resistenz-/ Transportgen) kontrolliert. In anderen Fällen, wie z.B. dem *ery*-Gencluster aus *Streptomyces coelicolor* A3(2) verantwortlich für die Erythromycin-Biosynthese, konnten innerhalb des Genclusters keine regulatorischen Gene identifiziert werden, die die

Expression der strukturellen Gene kontrollieren. Daraus lassen sich zwei generelle Mechanismen für die Regulation des Polyketidmetabolismus ableiten: Zum einen die Existenz eines spezifischen positiven Regulators, der im Gencluster lokalisiert ist und zum anderen die Nutzung von regulatorischen Genen, die ausserhalb des Polyketid-Genclusters kodiert sind (HUTCHINSON *et al.* 1993).

Neben der Regulation auf Transkriptionsebene kann eine Beeinflussung der Polyketidsynthese ebenfalls sowohl durch die Konzentration der biosynthetischen Enzyme als auch ihrer Substrate erfolgen. Die Kontrollmechanismen, die von der Enzymkonzentration bzw. der Substratverfügbarkeit ausgehen, sind weitestgehend unbekannt, mit Ausnahme der Tatsache, dass eine Überexpression der regulatorischen Proteine typischerweise zu einer erhöhten Produktion des Endproduktes führt, was auf die erhöhte Expression der strukturellen Gene zurückgeführt wird.

Im Fall von Typ I PKS kann die Polyketidsynthese auch durch die Verfügbarkeit ihrer Substrate beeinflusst werden. Die Fettsäuresubstrate für die Biosynthese dieser Makrolide haben unterschiedlichste metabolische Ursprünge. Acetyl-CoA, Malonyl-CoA und Butyryl-CoA kommen hauptsächlich aus der Glykolyse und der Fettsäurebiosynthese. Unsicher hingegen ist der metabolische Ursprung von Propionyl-CoA und 2-Methylmalonyl-CoA, da diese zwei Komponenten mindestens vier Ursprünge in Bakterien haben, so z.B. die Reduktion von Akrylsäureester oder den Katabolismus von Methionin, Threonin oder Valin. Hingegen scheint die Polyketidproduktion bei Typ II PKS durch die Anzahl ihrer ACP-Komponenten limitiert zu sein (HUTCHINSON *et al.* 1993).

Ebenso wie bei der Polyketidsynthese erfolgt die Regulation der NRP-Synthese häufig über einen vom Gencluster kodierten positiven transkriptionellen Regulator. Beispielsweise wurde in *Burkholderia contaminans* MS14 eine 45,2 kb grosse genomische Region identifiziert, welche in die Biosynthese eines antimykotischen Oligopeptids involviert ist (GU *et al.* 2009). Diese genomische Region kodiert u. a. auch die beiden *luxR*-ähnlichen regulatorischen Gene *ambR1* und *ambR2*. Eine Deletion von *ambR1* oder *ambR2* führte zu einer Verminderung der Transkriptmengen der übrigen Gene des Biosynthese-Clusters.

Neben individuellen transkriptionellen Aktivatoren wurde in einigen Fällen auch eine Kontrolle der NRP-Synthese durch übergeordnete Regulatoren oder alternative Sigmafaktoren beobachtet. Einer Kontrolle durch übergeordnete Regulatoren unterliegen z.B. die im *bmy*-Operon kodierten Biosynthese-Gene des Lipopeptids Bacillomycin D aus *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. Als Teil eines Zweikomponentensystems kontrolliert DegU normalerweise viele zelluläre Prozesse, einschliesslich der Produktion von Exoproteasen und der Kompetenzentwicklung (TSUKAHARA & Ogura, 2008). Im Fall von Bacillomycin ist DegU essentiell für die vollständige Aktivierung der Expression der Biosynthese Gene. Ähnlich verhält es sich mit LaeA, einem globalen Regulator des

sekundären Metabolismus in *Aspergillus* spp., dem u.a. eine positive Regulation der Gliotoxin- und Penicillin-Biosynthesegene nachgewiesen wurde (BOK & KELLER, 2004). Eine Regulation durch einen alternativen Sigmafaktor liegt z.B. im Fall der Ornibactin-Biosynthese vor. Eine Aktivierung der Expression des Siderophors aus *Burkholderia cenocepacia* erfordert die Anwesenheit von OrbS, einem Polypeptid mit Homologie zum ECF-(*extracytoplasmic factor*)-Sigma-Faktor aus *Pseudomonas aeruginosa* (AGNOLI *et al.*, 2006).

Anhand der zurzeit verfügbaren Daten lässt sich erkennen, dass ein Grossteil der Polyketide und nichtribosomalen Peptide einer Regulation durch spezifische oder globale Transkriptionsfaktoren unterliegt. Darüber hinaus gibt es aber auch Hinweise auf eine Beeinflussung der Synthese durch bestimmte Umweltfaktoren und Kulturbedingungen. Beispielsweise stimuliert eine kontaktabhängige Co-Kultivierung mit *Streptomyces hygroscopicus* bei *Aspergillus nidulans* die Produktion der aromatischen Polyketide F-9775A und F-9775B (SCHROECKH *et al.*, 2009). In anderen Fällen wird eine Steigerung der PK oder NRP-Synthese durch bestimmte Kohlenstoff- oder Stickstoffquellen erreicht (FENG & LEONARD, 1998; HAJJAJ *et al.*, 2001).

Das zunehmende Wissen über die Regulationsmechanismen in der PK- und NRP-Synthese eröffnet neue Möglichkeiten zur Verbesserung der Produktion von Polyketiden oder nichtribosomalen Peptiden in der mikrobiellen Fermentation, als auch der Expression in heterologen Wirtsorganismen (STROHL *et al.*, 1991).

### 2.5 Heterologe Expression von Polyketiden

Mikroorganismen produzieren eine grosse Vielfalt an natürlichen Produkten mit nutzbringenden biologischen Aktivitäten. Viele dieser Substanzen gehören den Stoffklassen der Polyketide und nichtribosomalen Proteinen an. Durch die komplexe Struktur und Stereochemie von PK und NRP ist eine effiziente, synthetische Produktion allerdings nur begrenzt möglich. Zur Gewinnung erstrebenswerter Mengen von PK und NRP wird daher häufig auf die mikrobielle Fermentation zurückgegriffen. Allerdings ist dieses Verfahren oft nur beschränkt einsetzbar aufgrund der schlechten Kultivierbarkeit der PK/NRP-Produzenten oder zu geringer Ausbeuten. In den meisten Fällen wird die Synthese des gewünschten Produktes in geeigneteren heterologen Wirtsorganismen vorgenommen (PFEIFER, 2001; WENZEL, 2005). Zumeist zeichnen sich die bei der heterologen Proteinexpression verwendeten Organismen durch ihre einfache Handhabung und exzellenten Wachstumscharakteristika aus. Zu den am häufigsten verwendeten Mikroorganismen zählen hierbei die Spezies *Streptomyces coelicolor*, *Bacillus subtilis*, und *Pseudomonas putida*. Diese Mikroorganismen erfüllen allesamt bestimmte Kriterien, die für eine erfolgreiche

Expression von Polyketiden und nichtribosomalen Peptiden erforderlich sind: (1) Expression des gesamten PK/ NRP-Enzymkomplexes in einem funktionalen Zustand, (2) posttranslationale Modifikation sowie (3) die Bereitstellung der für die PK/ NRP-Synthese erforderlichen Substrate (Aminosäuren, Acyl-CoA-Derivate). Um diese Voraussetzungen bestmöglich zu erfüllen, erfolgt die heterologe Expression oft in Organismen, die ursprünglich auch Polyketide oder nichtribosomale Peptide produzieren.

Wohl am häufigsten für die heterologe Produktion von PK verwendet wird der Actinomyzete *S. coelicolor*. Unter Standardbedingungen synthetisiert der Stamm das Polyketid Actinorhodin und bietet damit eine gute Basis für die Synthese „fremder“ Polyketide. Mit Hilfe eines Shuttle-Vektor-Systems wurden in diesem Stamm bereits zahlreiche aus Pilzen und Bakterien stammende Polyketide exprimiert, darunter Frenolicin, Tetracenomycin, Oxytetracyclin, Erythromycin, Epothilon und Oleandomycin. Die so produzierten Polyketidmengen betragen pro Liter der jeweiligen Kultur 1-100 mg (PFEIFER & KHOSLA, 2001). Neben *S. coelicolor* werden aber auch andere Vertreter der Gattung *Streptomyces*, wie z.B. *S. lividans* oder *S. glaucescens* zur Synthese von PK/NRP eingesetzt. Zusätzliche Verwendung in der heterologen Expression von PK und NRP finden andere genetisch gut charakterisierte Bakterien, wie z.B. *E. coli* oder *Pseudomonas putida*. Die Vorzüge von *E. coli* bei der Synthese von PK und NRP liegen u.a. in seinen hohen Wachstumsraten, guter Transformationseffizienz und der Verfügbarkeit gut etablierter molekularbiologischer Techniken und geeigneter Expressionsvektoren (LIU *et al.*, 2009; WATANBE & OIKAWA, 2007). Trotzdem bedarf die heterologe Expression von PK und NRP in *E. coli* häufig Optimierungen. Aufgrund seines genetischen Hintergrunds sowie des sehr geringen natürlichen Vorkommens von PK oder NRP in *E. coli* ist oft die exogene Zugabe von „Starter-Einheiten“, eine Anpassung der *codon usage* oder die Co-Expression einer Phosphopantheteinyltransferase notwendig (WATANBE & OIKAWA, 2007; PFEIFER *et al.*, 2001, MUTKA *et al.*, 2006)). Geeigneter, als Wirtsorganismus, erscheint *P. putida*. Zum Einen zeichnet sich der Stamm durch schnelles Wachstum und eine gute Konjugationseffizienz aus. Zum Anderen verfügt *P. putida* über eine Phosphopantheteinyltransferase, die ein weites Substratspektrum aufweist und mit Hilfe derer sowohl ACP- als auch PCP-Domänen aus Myxobakterien und Streptomyzeten posttranslational modifiziert werden können (GROSS *et al.*, 2005). Zusätzlich bieten die *Pseudomonaceae* als natürliche Produzenten von Polyketiden einen optimalen Hintergrund für die Synthese „fremder“ PK und NRP (MANTLE & MACGEORGE, 1990; RANGASWAMY, 1998).

Die heterologe Expression vollständiger PK- und NRP-Synthesewege ist von wachsendem Interesse auf der Suche nach neuen, nutzbringenden Produkten. Sie stellt eine gute Alternative zur Entwicklung von Fermentationsprozessen oder einer molekularbiologischen

Manipulation des natürlichen PK/ NRP-Produzenten dar. Neben der Möglichkeit die ursprüngliche PK/ NRP-Synthese zu optimieren, schaffen heterologe Wirtssysteme die Voraussetzungen für die kombinatorische Biosynthese neuer Polyketide und nichtribosomaler Peptide.

### **2.6 Aufgabenstellung und Zielsetzung**

Das Colibactin-Gencluster war bereits Bestandteil verschiedener Untersuchungen. Während die molekularen Mechanismen, die zu dem sogenannten zytopathischen Effekt (CPE) führen, weitestgehend aufgeklärt werden konnten und auf DNA Doppelstrangbrüche und der entsprechenden zellulären Antwort darauf zurückzuführen sind, steht die vollständige Aufklärung der Struktur des Genclusters, die regulatorischen Mechanismen denen die Colibactinsynthese unterliegt, ebenso wie die biologische Aktivität des nichtribosomalen Peptid-Polyketids, weiterhin aus.

Ziel der Arbeit war daher eine genauere Charakterisierung der genomischen Insel. Sowohl die Aufklärung der Struktur des PKS/ NRPS-Genclusters als auch die Regulation der Colibactin-Gene sollte anhand von Transkriptionsanalysen untersucht werden. Zusätzlich sollte durch eine Optimierung der Synthese des nichtribosomale Peptid-Polyketids sowie die heterologe Expression in einem geeigneten Wirtssystem ein Ausgangspunkt für die Überexpression und Isolation Colibactins geschaffen werden. Zusätzlich zu den molekularbiologischen Untersuchungen des Colibactin-Genclusters sollten phänotypische Untersuchungen am E. coli Stamm Nissle 1917 neue Einblicke in den möglichen biologischen Nutzen Colibactins liefern.

### 3. Material

#### 3.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sowie deren genotypischen Eigenschaften sind in Tabelle 1 einschließlich Herkunftsangaben aufgeführt.

**Tab. 1:** Bakterienstämme

Stamm	Beschreibung	Quelle/ Referenz
<i>E. coli</i> Nissle 1917 (DSM6601, EcN)	Wildtyp, Fäkalisolat (O6:K5:H1)	NISSLE (1918)
<i>E. coli</i> IHE3034	Wildtyp, Neugeborenen-Meningitis-Isolat (O18:K1:H7)	KORHONEN <i>et al.</i> (1985)
<i>E. coli</i> CFT073	Wildtyp, Pyelonephritis-Isolat (O6:K1:H?)	MOBLEY <i>et al.</i> (1990)
<i>E. coli</i> 536	Wildtyp, Pyelonephritis-Isolat (O6:K15:H31)	BERGER <i>et al.</i> (1982)
<i>E. coli</i> MG1655	K-12-Isolat	BLATTNER <i>et al.</i> (1997)
<i>E. coli</i> DH5a	F <sup>-</sup> <i>endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 Δ(argF-lacZYA) U169 (Φ60ΔlacZ M15λ<sup>-</sup>)</i>	Bethesda Research Laboratories
<i>E. coli</i> DH10B	F <sup>-</sup> <i>mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araΔ139 Δ (ara leu)7697galU galK λ<sup>-</sup> rpsL (Str<sup>R</sup>) nupG</i>	Invitrogen
EcN ΔPKS	Deletion der <i>asnW</i> -Insel in Nissle 1917	HOMBURG (2007)

**Tab. 1:** Bakterienstämme (Fortsetzung)

Stamm	Beschreibung	Quelle/ Referenz
<i>E. coli</i> IHE3034 $\Delta$ PKS	Deletion der <i>asnW</i> -Insel in IHE3034	HOMBURG (2007)
EcN 1960:: <i>lux</i>	Transkriptionsfusion von <i>clbA</i> mit <i>luxABCDE</i> -Reporter	HOMBURG (2007)
EcN 1943:: <i>lux</i>	Transkriptionsfusion von <i>clbQ</i> mit <i>luxABCDE</i> -Reporter	HOMBURG (2007)
EcN <i>lacZ</i> :: <i>lux</i>	Transkriptionsfusion von <i>lacZ</i> mit <i>luxABCDE</i> -Reporter	HOMBURG (2007)
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	<i>hsdR<sup>-</sup> hsdM<sup>+</sup></i> , Derivat von <i>P. putida</i> mt-2, "safety strain"	NELSON <i>et al.</i> (2002)

### 3.2 Plasmide und Vektoren

Verwendete Klonierungsvektoren sowie in dieser Arbeit konstruierte Plasmide sind unter Angabe ihrer Eigenschaften und Quellen in Tabelle 2 angegeben.

**Tab. 2:** Plasmide und Vektoren

Vektor/Plasmid	Beschreibung	Quelle/Referenz
pGEM <sup>R</sup> -T Easy	T/A-Klonierungsvektor; <i>bla lacZ<math>\alpha</math></i>	Promega
pKD4	<i>kan FRT cat ori<sub>RY</sub></i>	DATSENKO & WANNER (2000)
pKD46	<i>bla araC-P<sub>araB</sub>-<math>\gamma</math>-<math>\beta</math>-exo ori<sub>R101</sub> repA101 (ts)</i>	DATSENKO & WANNER (2000)
pCP20	<i>bla cat flp (ts)</i>	CHEREPANOV & WACKERNAGEL (1995)

**Tab. 2:** Plasmide und Vektoren (Fortsetzung)

Vektor/Plasmid	Beschreibung	Quelle/Referenz
pBACpks	pBeloBAC11 mit 67,9 kb Fragment des IHE3034 Chromosoms einschließlich der kompletten <i>asnW</i> -Insel	BUCHRIESER C., unveröffentlicht
pBAD <i>clbR</i>	pBAD24 – Derivat zur induzierbaren Expression von <i>clbR</i>	HOMBURG, Würzburg
pME6030	Shuttle-Vektor <i>tet<sup>R</sup></i> , <i>tet<sup>A</sup></i> , <i>repA</i> , <i>staA</i> , <i>oriV<sub>pVS1</sub></i> , <i>oriV<sub>p15A</sub></i> , <i>oriT</i>	HEEB <i>et al.</i> (2000)
pME_Km_FRT1	Shuttle-Vektor <i>tet<sup>R</sup></i> , <i>tet<sup>A</sup></i> , <i>repA</i> , <i>staA</i> , <i>oriV<sub>pVS1</sub></i> , <i>oriV<sub>p15A</sub></i> , <i>oriT</i> , <i>kan</i> FRT	diese Arbeit (4.6.1 )
pME_Km_FRT2	Shuttle-Vektor <i>tet<sup>R</sup></i> , <i>tet<sup>A</sup></i> , <i>repA</i> , <i>staA</i> , <i>oriV<sub>pVS1</sub></i> , <i>oriV<sub>p15A</sub></i> , <i>oriT</i> , <i>kan</i> FRT	diese Arbeit (4.6.1)
pBELOBACpks11: :FRTup	pBACpks mit integrierter FRT <i>upstream</i> der <i>asnW</i> -Insel	HOMBURG, Würzburg
pBELOBACpks11: :FRTdown	pBACpks mit integrierter FRT <i>downstream</i> der <i>asnW</i> -Insel	HOMBURG, Würzburg
pBACpks pME6030 up	Insertion von pME6030 in pBACpks11::FRTup <i>downstream</i> der <i>asnW</i> -Insel	diese Arbeit (4.6.2 )
pBACpks pME6030 down	Insertion von pME6030 in pBACpks11::FRTdown <i>upstream</i> der <i>asnW</i> -Insel	diese Arbeit (4.6.2)

### 3.3 Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim) und Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen und sind im Anhang in Tabelle 13 mit Angaben zu ihrer Verwendung zusammengestellt.

### 3.4 Chemikalien, Enzyme und Kits

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

Es kamen folgende Kits zum Einsatz:

- pGEM<sup>®</sup> T-Easy Vector System, Promega, Mannheim
- QIAGEN Plasmid Mini und Midi Kit, QIAGEN, Hilden
- QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification/Gel Extraction Kit, QIAGEN, Hilden
- QIAquick<sup>®</sup> RNeasy Kit, QIAGEN, Hilden
- Quick Ligation Kit, New England Biolabs, Frankfurt am Main
- SuperScript<sup>™</sup> III Reverse Transcriptase, Invitrogen, Karlsruhe
- Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit, GE Healthcare/Amersham Biosciences, Freiburg
- 5' / 3'RACE Kit, 2<sup>nd</sup> Generation, Roche Diagnostics, Mannheim

### 3.5 Medien und Zusätze

#### Medien

Als Lösungsmittel für Medien diente destilliertes Wasser. Feste Nährböden enthielten zusätzlich 0,3%, 0,5 % bzw. 1,5 % (w/v) Agar. Sterilisation erfolgte durch Autoklavieren (15 min, 121 °C). Hitze-labile Zusätze wurden durch Filtration sterilisiert und den Medien nach Abkühlen auf ca. 50 °C zugesetzt.

<b>Lysogen Broth (LB)</b>	Caseinhydrolysat (Pepton 140)	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	dH <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 1000 ml
<b>IPTG-X-Gal-Platten</b>	LB-Agar mit:	
	IPTG	0,5 mM
	X-Gal	80 µg/ml

MATERIAL

<b>Calcofluor-Medium</b>	Caseinhydrolysat (Pepton 140)	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	Calcofluor (200 mg/ml)	1 ml
	dH <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 1000 ml
<b>Kongorot-Medium</b>	Caseinhydrolysat (Pepton 140)	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	Kongorot (0,4 mg/ml)	1 ml
	Coomassie Brillant Blue (0,2 mg/ml)	1 ml
	dH <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 1000 ml
<b>M63-Minimalmedium</b>	20 % (w/v) (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 ml
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13,6 g
	MgSO <sub>4</sub> 10 % (w/v)	1 ml
	FeSO <sub>4</sub> 0,1 % (w/v)	1 ml
	dH <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 978 ml
	pH 7,0 (KOH)	
	Thiamin 0,05 % (w/v)	2 ml
	Glukose 20 % (w/v)	20 ml
<b>Zellkulturmedium</b>	MEM ( <i>Minimal Essential Medium</i> )	500 ml
	FCS ( <i>Fetal Calf Serum</i> ), hitzeinaktiviert	50 ml
	L-Glutamin	5,5 ml
	nicht-essentielle Aminosäuren	5,5 ml
	<b>Interaktionsmedium</b>	DMEM ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )
FCS ( <i>Fetal Calf Serum</i> ), hitzeinaktiviert		25 ml
L-Glutamin		5,5 ml
nicht-essentielle Aminosäuren		5,5 ml
HEPES		15 mM

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

**Antibiotika**

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

**Tab. 3:** Antibiotika

<b>Antibiotikum</b>	<b>Lösungsmittel</b>	<b>Stammkonzentration In mg /ml</b>
Ampicillin	dH <sub>2</sub> O	100
Chloramphenicol	Ethanol, 70 % (v/v)	20
Kanamycin	dH <sub>2</sub> O	50
Streptomycin	dH <sub>2</sub> O	500
Tetracyclin	Ethanol, 70 % (v/v)	10
Rifampicin	Ethanol, 70 % (v/v)	10

**3.6 Puffer und Lösungen**

<b>TAE (50x):</b>	Tris	2 M
	Essigsäure	1 M
	EDTA	0,1 M
	pH 8,3	
<b>TE:</b>	Tris-HCl pH 8,0	10 mM
	EDTA	1 mM
<b>TNE:</b>	Tris-HCl pH 8,0	10 mM
	NaCl	10 mM
	EDTA	10 mM
<b>TNEX:</b>	TNE	
	1 % Triton-X 100	

## MATERIAL

<b>DNA-Ladepuffer (6x):</b>	TE	50 % (v/v)
	Glycerin	49,2 % (v/v)
	Xylencyanol	0,04 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,04 % (w/v)

<b>PBS:</b>	NaCl	140 mM
	KCl	2,7 mM
	Na <sub>2</sub> HPO	48,1 mM
	KH <sub>2</sub> PO	41,5 mM

<b>EBSS:</b>	CaCl <sub>2</sub>	1,8 mM
	MgSO <sub>4</sub>	0,8 mM
	KCl <sub>5</sub> ,	4 mM
	NaCl	116,2 mM
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 mM
	Glukose	5,6 mM
	NaHCO <sub>3</sub>	26,2 mM

<b>Restriktionspuffer (10x):</b>	Tris-Acetat pH 7,9	220 mM
	K-Acetat	660 mM
	Mg-Acetat	100 mM
	DTT	5 mM
	BSA	1 mg/ml

### **Chrom Azurol S-Assay Lösung**

<b>Lösung I:</b>	HDTMA 10 mM	6 ml
	dH <sub>2</sub> O	44 ml
	Fe <sup>3+</sup> -Lösung	1,5 ml
	(10 ml Fe <sup>3+</sup> Lösung: 27 mg FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O)	
	CAS-Lösung 2mM	7,5 ml

Die Zugabe der CAS-Lösung erfolgt langsam unter Rühren.

<b>Lösung II:</b>	Piperazin (wasserfrei)	4,307 g
	dH <sub>2</sub> O	40 ml
	HCl (12 M bzw. 37 %)	6,25 ml

## MATERIAL

Nach dem Zusammenführen der Lösungen I und II wird ein Endvolumen von 100 ml mit dH<sub>2</sub>O eingestellt und die fertige Lösung steril filtriert. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

### 3.7 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Autoklaven	Fedegari (FOM/B50, 9191E), H+P Labortechnik Varioklav 500)
Elektrophoresekammern	Bio-Rad (Sub-Cell GT)
Elektroporator	Bio-Rad (Gene Pulser Xcell)
Feinpipetten	Gilson (pipetman), Eppendorf (Reference)
Feinwaage	Chyo Balance Corp. (JL-180)
Gefrierschränke	Liebherr (Öko super, -20 °C), Heraeus (-80 °C)
Geldokumentation	Intas (Gel iX Imager, Gel-Pro Analyzer 4.5)
Heizblock	Liebisch
Homogenisator	Q-BIOgene (Fast-Prep Maschine Savant BIO101)
Inkubatoren	Heraeus, Memmert
Kühlschrank	Privileg (Superöko)
Luminometer	Berhold (Lumat)
Magnetrührer	GLW(M21)
Mikroskope	Zeiss (Axiolab)
Mikrowelle	Privileg (8020)
Netzgeräte	Bio-Rad (PowerPac 300)
pH-Meter	WTW (pH 523)
Photometer	Pharmacia Biosystems (Ultraspec III), PEQLAB (Nanodrop ND-1000)
Schüttelinkubator	Braun-Melsungen (Clim-O-Shake), New Brunswick Scientific (Innova 4300)
Sequenzierer	Applied Biosystems (ABI Prism 310 Genetic Analyzer), MWG Biotech (LI-COR 4000)
Sterilbank	Nunc (Microflow biological safety cabinet)
Thermocycler	Biometra T3 Thermocycler, Bio-RAD (iCycler Single-Color Real Time PCR Detection System)
Tischmischer	Scientific Industries (Vortex Genie 2)
Tischzentrifuge	Eppendorf (5415C), Heraeus (Biofuge fresco)
Wasseraufbereitungsanlage	GFL (Bi-Dest 2304)
Wasserbad	Memmert (GFL 1083)
Zentrifuge	Beckman

## MATERIAL

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), Nalgene (Rochester, USA), Sarstedt (Nümbrecht), Q-BIOgene/ MP Biomedicals (Heidelberg) sowie Whatman (Dassel) bezogen.

## **4. Methoden**

### **4.1 Kultur von Bakterien**

#### **4.1.1 Anzucht und Stammhaltung**

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme sowie der Stamm *P. putida* KT2440 wurden, soweit nicht anders angegeben in LB Medium oder auf LB Agar kultiviert, welchem gegebenenfalls die entsprechenden Antibiotika zugesetzt wurden. Die Anzucht erfolgte im Fall der verwendeten *E. coli* Stämme bei 30°C bzw. 37°C. Während der Stamm *P. putida* KT2440 ausnahmslos bei 30°C kultiviert wurde. Zur Stammhaltung wurden Bakterienstämme auf LB Agar angezogen und anschließend bei 4 °C gelagert und regelmäßig auf neue Platten überimpft. Ferner erfolgte von jedem Isolat die Herstellung einer Stammkonserve, indem 1 ml der Flüssigkultur mit 0,3 ml sterilem Glycerin (87 %, [v/v]) versetzt und bei -80 °C gelagert wurde.

#### **4.1.2 Bestimmung von Wachstumskinetiken**

die Erfassung des Bakterienwachstums erfolgte mittels Kultivierung in Flüssigmedium. Als Wachstumsparameter wurde die optische Dichte bei 600 nm in stündlichen Abständen gegen den entsprechenden Medienblindwert gemessen.

### **4.2 Zellkultur**

#### **4.2.1 Propagation von Zelllinien**

Humane Cervixepithelzellen (HeLa) wurden in Zellkulturmedium (MEM, 10 % FCS, neAA) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in Zellkulturflaschen kultiviert. Kulturen, die 60-80 % konfluent waren, wurden 5 min mit 5 ml Trypsin-EDTA inkubiert und mit 5 ml frischem Medium in Suspension gebracht. Die Zellen wurden in einer 1:5 oder 1:10 Verdünnung ausgesät und weiter kultiviert.

#### **4.2.2 Kokultur von HeLa-Zellen mit *E. coli*-Stämmen**

Für die Kokultur wurde das Zellkulturmedium gegen Interaktionsmedium (DMEM, 5 % FCS, 15 mM HEPES) ausgetauscht und mit 1/100 V einer *E. coli*-ÜNK beimpft. Nach einer Inkubation von 4-5 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde das Medium entfernt, die Zellen viermal 1 min mit EBSS gewaschen und in Zellkulturmedium mit Gentamicin (200 µg/ml) für weitere

72 h kultiviert. Für die Mikroskopie wurden die Zellen gemäß Standardprotokoll mit Giemsa-Lösung gefärbt.

### 4.3 Allgemeine molekularbiologische Methoden

#### 4.3.1. Isolierung genomischer DNA aus *E. coli*

Die Isolierung genomischer DNA aus *E. coli* erfolgte nach GRIMBERG *et al.* (1989). Nachfolgend ist das Standardprotokoll für die Aufarbeitung von 2 ml Zellsuspension einer ÜNK aufgeführt:

1. Sedimentation der Zellen (14.000 rpm, 1 min)
2. Waschen des Zellpellets in 1 ml TNE
3. Sedimentation der Zellen (13.000 rpm, 5 min)
4. Resuspension des Zellpellets in 570 µl TNEX
5. Zugabe von 30 µl Lysozymlösung und Inkubation bei 37°C für 30 min
6. Zugabe von 30 µl Proteinase K und Inkubation bei 65°C für 2 h
7. Zugabe von 200 µl Phenol-Chloroform-Lösung
8. Zentrifugation (13.000 rpm, 10 min)
9. Überführen der oberen Phase in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß
10. Zugabe von 30 µl 5M NaCl-Lösung und 2,5 V Ethanol (100 % [v/v])
11. Zentrifugation (13.000, 1 min)
12. Waschen der sedimentierten Plasmid-DNA mit 0,5 ml eiskaltem Ethanol (70 % [v/v], reinst)
13. Trocknen des Pellets bei RT
14. Aufnahme des Pellets in 100 µl TE-Puffer oder dH<sub>2</sub>O

**Lysozym-Stammlösung:** 50 mg/ml Lysozym in dH<sub>2</sub>O

**Proteinase-Stammlösung:** 100 mg/ml Proteinase K in dH<sub>2</sub>O

#### 4.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur schnellen Isolierung von Plasmid-DNA diente eine Modifikation der Schritte des „Qiagen-Mini-Kits“ ohne Säulenaufreinigung (Qiagen, Hilden), nach BIRNBOIM & DOLY (1979). Die im Folgenden aufgeführten Schritte zeigen das Standardprotokoll für die Aufarbeitung von 2 ml Zellsuspension einer ÜNK.

## METHODEN

1. Sedimentation der Zellen (3000 x g, 10 min, 4 °C)
2. Suspension des Zellpellets in 0,3 ml Puffer P1
3. Zugabe von 0,3 ml Puffer P2, Mischen durch mehrmaliges vorsichtiges Umschwenken und Inkubation bei RT für 5 min
4. Zugabe von 0,3 ml Puffer P3, sofortiges Mischen durch mehrmaliges Umschwenken
5. Zentrifugation (16000 x g, 20 min, 4°C)
6. Überführen des klaren Überstandes in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß und erneute Zentrifugation (16000 x g, 20 min, 4°C)
7. Überführen des klaren Überstandes in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß und Zugabe von 0,8 Vol. Isopropanol
8. Zentrifugation (16000 x g, 30 min, 4°C)
9. Waschen der sedimentierten Plasmid-DNA mit 0,5 ml eiskaltem Ethanol (70 % [v/v], reinst)
10. Trocknen des Pellets bei RT
11. Aufnahme des Pellets in 10 µl TE-Puffer oder dH<sub>2</sub>O

<b>Puffer P1:</b>	Tris/ HCl	50 mM
	Na <sub>2</sub> EDTAx2H <sub>2</sub> O	10 mM
	RNAseA	10 mg/ml
	pH 8,0	

Lagerung bei 4°C

<b>Puffer 2:</b>	SDS (10 % [w/v])	1 % (w/v)
	NaOH (10 M)	200 mM

Lagerung bei RT

<b>Puffer 3:</b>	K-Acetat	3 M
	pH 5,5 mit Eisessig einstellen	

### 4.3.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus *E. coli*

Zur Präparation von mRNA aus *E. coli* wurde das „RNeasy Mini-Kit“ (Qiagen) verwendet. Die Bakterienkultur wurde bis zu einer optischen Dichte OD<sub>600</sub> von 3,6-3,8 angezogen. 2 bis 3 ml der Kultur wurden anschließend mit „RNAprotect Bacteria Reagent“ (Qiagen) im Verhältnis 1:2 vermischt und unter leichtem Schütteln für 5 min bei Raumtemperatur

inkubiert. Dieser Schritt diente zum Abstoppen des Wachstums und zum Schutz der mRNA. Im Anschluss wurde die Kultur bei 6328 x g, 4 °C für 10 min pelletiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet konnte dann bei -20°C für einige Tage gelagert werden.

Die Lyse der Zellen zur Präparation der RNA erfolgte durch die Resuspension des Bakterienpellets in 200 µl TE-Lysozym Puffer (Lysozym: 800 µg/ml) und eine anschließende 5 minütige Inkubation der Bakteriensuspension bei RT. Im Anschluss wurde die Suspension mit 350 µl RLT-Puffer (mit jeweils 10 µl/ml β-Mercaptoethanol) durch intensives Vortexen gemischt. Nachfolgend wurde dem Gemisch 250 µl 70 % Ethanol zugesetzt. Danach wurde das Gemisch auf eine RNeasy Säule gegeben. Diese enthält eine Matrix, die selektiv RNA bindet. Zur Bindung der RNA wurde die Säule dann für 15 s bei ca. 10.000 x g zentrifugiert und das Eluat verworfen. Im darauf folgenden Schritt wurde die RNeasy Säule mit 700 µl RW-1 Puffer gewaschen um Proteine zu entfernen. Darauf folgte ein weiterer Waschschrift mit 500 µl RPE Puffer. Um das restliche Ethanol (aus dem RPE Puffer) aus der Matrix zu entfernen, wurde die Säule für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die auf der Matrix gefällte RNA wurde dann in 85 µl (40 + 45 µl) Rnase freiem Wasser in zwei Schritten von der Membran gelöst. Dabei wurde das Wasser jeweils in die Mitte der Membran (Matrix) gegeben und nach 1 min Inkubation bei Raumtemperatur durch Zentrifugation (1 min, 13.000 x g, RT) die RNA eluiert.

Im Anschluss erfolgte die enzymatische Entfernung von DNA-Kontaminationen mittels DNase I Verdau. Die isolierten Gesamt-RNA wurde in einem 100 µl Reaktionsansatz (10 µl 10x DNaseI- Puffer, 5 µl DNase I, Roche Diagnostics) eine Stunde bei 37 °C inkubiert, anschließend mit Hilfe des QIAquick RNeasy Kits (QIAGEN, 3.4) gemäß Herstellerangaben aufgereinigt und mit 30 µl dH<sub>2</sub>O eluiert. Die komplette Hydrolyse der DNA wurde mittels PCR nachgewiesen.

#### **4.3.4 Bestimmung von Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen**

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen wurde photometrisch (Nanodrop ND-1000, PEQLAB, Erlangen) durch Messen der Absorption bei 260 nm ermittelt. Für eine OD<sub>260</sub> von 1 wurde für doppelsträngige DNA eine Konzentration von 50 µg/ml, für RNA von 40 µg/ml zugrunde gelegt. Die Reinheit der Nukleinsäure ließ sich aus dem Verhältnis der OD<sub>260</sub> zur OD<sub>280</sub> abschätzen. Bei reinen DNA-Lösungen liegt dieser Wert bei 1,8, bei reinen RNA-Lösungen bei 2,0. (SAMBROOK *et al.*, 1989). Werte zwischen 1,8 und 2,2 wurden toleriert.

#### 4.3.5 Kontrolle der RNA-Integrität

Für die Verwendung von RNA in Real-Time oder Mikroarray Analysen ist es extrem wichtig, dass die RNA Proben nicht degradiert sind. Daher wurden alle Proben mittels RNA 6000 Pico LabChip® Kit (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies) elektrophoretisch analysiert. Die Durchführung und Bedingung der entsprechenden Software kann dem Herstellerhandbuch entnommen werden.

#### 4.3.6 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Die PCR ist eine Methode zur Amplifikation von DNA-Fragmenten. Die Amplifikation erfolgte durch eine hitzestabile Polymerase. Je nach Anwendung kamen folgende Polymerasen zum Einsatz:

1. Taq DNA-Polymerase (Promega, Qiagen); ohne proofreading Aktivität
2. Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase (Finnzymes); mit proofreading Aktivität
3. DAP Goldstar (Eurogentec); mit proofreading Aktivität

Als Matrize diente chromosomale bzw. Plasmid-DNA. Die PCR-Protokolle variierten je nach verwendeter Polymerase, Schmelztemperaturen der eingesetzten Oligonukleotide sowie der zu erwartenden Produktlänge. Generell setzten sie sich zusammen aus einer initialen Denaturierung des Templates (60-120 s, 94-98 °C), 25-35 Zyklen von Denaturierung (10-30 s, 94-98 °C), Annealing der Oligonukleotid-Primer (15-30 s, 55-65 °C) und Elongation (15-420 s, 72 °C) sowie einer abschließenden Elongation (180-600 s, 72 °C). Die generelle Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes ist Tabelle 4 zu entnehmen. Je nach Anwendung variierte das PCR-Volumen von 20 bis 400 µl. Der Erfolg der PCR-Reaktion wurde durch Elektrophorese eines 5-10 µl Aliquots in einem Agarosegel überprüft.

Die PCR wurde angewendet um:

- DNA-Abschnitte für Klonierungen und Sequenzierungen zu amplifizieren
- Resistenzkassetten und andere Konstrukte für die direkte Integration in Vektoren zu amplifizieren
- Insertion und Orientierung von Resistenzkassetten und anderen Konstrukten zu überprüfen
- durch reverse Transkription erhaltene cDNA qualitativ und semi-quantitativ zu analysieren (RT-PCR, 4.3.14)

Bei Bedarf wurden PCR-Produkte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) gemäß Herstellerangaben für weitere Anwendungen wie Transformationen oder Klonierungen gereinigt.

**Tab.4: Zusammensetzung Standard-PCR-Ansatz**

<b>Zusammensetzung</b>	<b>Konzentration</b>
dNTP	25 $\mu$ M dATP, dCTP, dGTP, dTTP
Reaktionspuffer	1x
Polymerase	0,025-0,04 U/ $\mu$ l
Oligonukleotid-Primer	0,5 $\mu$ M
MgCl <sub>2</sub>	1,5-3 mM

#### 4.3.7 Enzymatische Hydrolyse von DNA

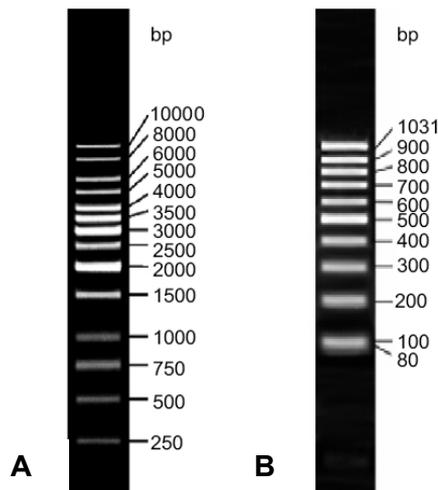
Für die enzymatische Hydrolyse von DNA wurden 0,5-2  $\mu$ g genomische oder Plasmid-DNA in 1 $\times$  Restriktionspuffer mit 1-2 U/ $\mu$ g der entsprechenden Restriktionsendonuklease für 1- 2 h bei der für das Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Für analytische Zwecke betrug das Reaktionsvolumen 10  $\mu$ l, präparative Ansätze wurden in entsprechend größeren Volumina durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung des Enzyms (20 min, 65 °C) gestoppt und gegebenenfalls mittels QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Vollständige Hydrolyse wurde durch Agarosegelelektrophorese (4.3.6) nachgewiesen.

#### 4.3.8 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren im Agarosegel

Die analytische Auftrennung von chromosomaler DNA erfolgte mittels horizontaler Agarosegelelektrophorese in 1-2 %igen (w/v) Agarosegelen unter Verwendung von 1 x TAE-Puffer als Laufpuffer. Zum Sichtbarmachen der Lauffront sowie zum Beschweren der Proben diente die Zugabe von 0,2 Volumen 6x Loading Dye vor dem Auftragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80-90 mV. Nach Beendigung der Elektrophorese konnten die Nukleinsäuren im Gel durch 30minütige Inkubation in einem Ethidiumbromid-Bad (0,5  $\mu$ g/ml) markiert und nach anschließender Wässerung mittels UV-Licht visualisiert und fotografiert werden.

Marker zur Größenbestimmung von DNA -Fragmenten bei der Agarosegelelektrophorese wurden von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Roth) bezogen (Abb. 8).

## METHODEN



**Abb. 8: Marker für die Elektrophorese.** A: GeneRulerTM1kb DNA Ladder, (Fermentas);  
B: GeneRulerTM100bp DNA Ladder (Fermentas)

### 4.3.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten oder Restriktionsfragmenten für nachfolgende Anwendungen wurden diese durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, ausgeschnitten und mittels QIAquick Gel Extraktion Kit (QIAGEN) gemäß Herstellerangaben extrahiert.

### 4.3.10 Klonierung von DNA

#### a) Dephosphorylierung von DNA-5'-Enden

Zur Entfernung von 5'-Phosphatgruppen von DNA-Fragmenten wurde der jeweilige Restriktionsansatz nach Hitzeinaktivierung mit 1/10 Vol. Phosphatasepuffer gemischt und pro  $\mu\text{g}$  DNA 5 U Antarctic Phosphatase (NEB) zugesetzt. Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert, hitzeinaktiviert (10 min, 65 °C) und über präparative Agarosegelelektrophorese (X) aufgereinigt.

#### b) Klonierung von PCR-Produkten

Durch PCR generierte DNA-Abschnitte wurden mit Hilfe des pGEM<sup>®</sup>T-Easy Vector Systems (Promega) 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.

### **c) Klonierung von Restriktionsfragmenten**

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  $\mu$ l zusammen mit 1/10 V Ligationspuffer und 50 U T4-DNA-Ligase (NEB) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Alternativ wurde in einigen Fällen das Quick Ligation Kit (NEB) eingesetzt und gemäß Herstellerangaben angewendet.

#### **4.3.11 Transformation von *E. coli*-Stämmen**

Aus einer *E. coli* ÜNK wurden 25 ml LB 1:100 beimpft und bei 37 °C bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase geschüttelt (OD600 = 0,6). Die Kultur wurde 15 min auf Eis gekühlt, abzentrifugiert (5 min, 5000 Upm, 4°C) und zweimal mit 1 V eiskaltem dH<sub>2</sub>O sowie einmal mit eiskaltem 10 % Glycerin gewaschen. Das Pellet wurde in 1/125 Vol. 10 % Glycerin resuspendiert, direkt verwendet oder in Aliquots zu 50  $\mu$ l bei -80 °C gelagert.

Zur Herstellung elektrokompenter Zellen für die Transformation mit PCR-Produkten nach DATSENKO & WANNER (2000) wurden die entsprechenden *E. coli*-Stämme unter geeignetem Selektionsdruck bei 30°C angezogen und gegebenenfalls Arabinose (100 mM Endkonzentration) zur Induktion der  $\lambda$ -Red-Rekombinase vom Helferplasmid pKD46 zugesetzt. Für die Transformation wurden die elektrokompenten Zellen auf Eis aufgetaut und mit Plasmid-DNA, PCR-Produkt oder einem Aliquot eines Ligationsansatzes vermischt. Die Transformation erfolgte durch Elektroporation in 2-mm-Küvetten bei 2,5 kV, 25  $\mu$ F und 200 W (Plasmide). Die Zellen wurden in 1 ml LB überführt und 1 h bei permissiver Temperatur geschüttelt. Anschließend wurden geeignete Volumina auf Selektionsmedium ausplattiert und die Platten bei entsprechender Temperatur über Nacht inkubiert.

#### **4.3.12 Transformation von *Pseudomonas putida* KT2440**

Aus einer ÜNK wurden 10 ml LB 1:20 beimpft und bei 30°C 3 – 4 h geschüttelt ( $1 \times 10^9$  Zellen/ml). Die Kultur wurde 15 min auf Eis gekühlt, abzentrifugiert (5 min, 5000 Upm, 4°C) und einmal mit 5 ml 10 mM NaCl gewaschen. Anschließend wurde das Bakterienpellet in 2,5 ml einer 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurde das Bakterienpellet in 250  $\mu$ l der 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert.

Für die Transformation wurden 200 µl der kompetenten Zellen mit der Plasmid-DNA vermischt und für 60 min bei 0°C inkubiert. Nach einem Hitzeschock (2 min, 42°C) wurden die Zellen mit 10 V LB-Medium versetzt und 1 h bei 30 °C geschüttelt, bevor geeignete Volumina auf Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht inkubiert wurden.

### 4.3.13 DNA-Sequenzierung

Plasmide wurden mittels ABI Prism Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) gemäß Herstellerangaben in einer modifizierten PCR-Reaktion sequenziert. Die Aufreinigung und 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.

### 4.3.14 cDNA-Synthese und RT-PCR

Die Umschreibung von RNA in cDNA erfolgt mittels SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) und 1 µg Random Primer (Invitrogen) gemäß Herstellerangaben. In der Regel wurden 2-4 µg RNA eingesetzt und die Reaktion für 60 min bei 50 °C im T3 Thermocycler (Biometra) inkubiert. Die so synthetisierte cDNA wurde anschließend entsprechend verdünnt (Verdünnungsfaktor 20 bzw. 40) und mittels PCR amplifiziert. Das Ergebnis der PCR wurde im Agarosegel überprüft.

### 4.3.15 quantitative Real Time-PCR

Eine weitere Methode zur Analyse der Transkriptmengen bestimmter Gene ist die quantitative Real Time-PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Bei dieser Methode dient die cDNA die mittels reverser Transkriptase aus der Gesamt-RNA synthetisiert wurde als Ausgangstemplate für eine PCR Reaktion. Der Nachweis der Transkriptmenge erfolgt indirekt über die photometrische Detektion des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR®-Green. Dieser Farbstoff besitzt die Eigenschaft an doppelsträngige (ds) DNA zu binden. Bedingt durch die Bindung an die dsDNA erhöht sich die Eigenfluoreszenz des Stoffes bis zu 1000fach. Das so erzeugte Fluoreszenz-Signal ist somit proportional zur Menge der dsDNA. Durch Amplifikation des Zieltranskripts kommt es zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals. Der gemessene Wert wird dann anhand eines zellulären Standards (*house keeping gene*) normalisiert und mit den Expressionsmengen unter anderen Bedingungen oder in einem anderen Stamm verglichen.

Für die Real Time-PCR wurden 2 µg RNA in cDNA umgeschrieben (4.3.2.3). Im Anschluss wurden 12,3 µl der verdünnten cDNA (Verdünnungsstufe:  $1 \times 10^{-2}$  bis  $1,25 \times 10^{-3}$ ) und je 500

ng der jeweiligen Primer zusammen mit 12,3 µl des iQ<sup>TM</sup> SYBR-Green Supermix (Bio-RAD) in einem 25 µl Ansatz eingesetzt. Der Nachweis der Transkriptmenge erfolgte mit Hilfe des MyiQ iCyclers (Bio-RAD).

Als zelluläre Standards wurden die Gene *rrnB* (16s rRNA), *gyrA* (DNA Gyrase, A-Untereinheit) und *recA* (Rekombinationsprotein) verwendet. Die Auswertung der erhaltenen Daten wurde mit der MyiQ<sup>TM</sup> Software (BioRAD) durchgeführt.

#### 4.4 Amplifizierung und Sequenzierung von 5´cDNA Enden

##### 4.4.1 Primer-Extension-Analyse

###### a) cDNA-Synthese

Das 5´-Ende von mRNA-Molekülen wurde durch die Primer-extension-Methode bestimmt. Hierbei synthetisiert eine reverse Transkriptase, ausgehend von einem IRD800<sup>®</sup>-markiertem Primer, an einer RNA-Matrize in 5´-3´Richtung einen cDNA-Strang. Trägt man diesen im Gel neben der Sequenzreaktion mit dem gleichen Primer (s.Anhang A.2) auf, dann kann über die Länge dieses cDNA-Stranges das 5´-Ende der mRNA abgeleitet werden. Die Synthese erfolgte unter Verwendung der SuperScript<sup>TM</sup> III Reversen Transcriptase (Invitrogen)

Die Reaktion umfasste folgende Schritte:

###### Denaturieren der mRNA und Primer-Anlagerung

Gesamt-RNA	500 ng
dNTP-Mix (10 mM)	2 µl
5´-IRD800 <sup>®</sup> -Primer (2 pmol/µl)	2-4 µl
dH <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 25 µl

Um das Annealing der Primer zu verbessern wurde der Reaktionsmix bei folgenden Temperaturen in der vorgegebenen Reihenfolge inkubiert:

90°C	2 min
80°C	7 min
65°C	7 min
45°C	7 min

### Reverse Transkription

Im Anschluss an die Annealingreaktion wurden die Proben sofort auf Eis überführt und folgende Komponenten zugefügt:

5x 1 <sup>st</sup> strand synthesis buffer	8 µl
DTT (0,1M)	2 µl
RnaseOut	2 µl
SuperscriptIII	2 µl

Die cDNA-Synthese erfolgte durch eine 30-90 minütige Inkubation der Proben bei 55°C. Nach der Inaktivierung der reversen Transkriptase (15 min, 70°C) wurden der cDNA 4 µl Natrium-Acetat (3M) und 110 µl Ethanol (96 % [v/v]) zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei -20°C wurde die cDNA (13.000 rpm, 20 min) durch Zentrifugation sedimentiert. Das Pellet wurde in 3 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen und mit 3 µl „Stop Mix“ aus dem Sequenzierungskit versetzt. Anschließend wurden 1-2,5 µl der cDNA auf ein Polyacrylamidgel (X) aufgetragen.

### b) Sequenzierungsreaktion

Für die Sequenzierungsreaktion wurde Plasmid-DNA als Matrize eingesetzt. Die Plasmide enthielten die Promotorbereiche der zu untersuchenden Gene. Als Primer dienten Oligonukleotide (17-22 Bp), die am 5`-Phosphat-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD<sub>800</sub> markiert waren (MWG Biotech, Ebersberg). Diese Sequenzreaktionen wurden für die Ermittlung des Transkriptionsstartpunktes eingesetzt.

Folgender Ansatz wurde auf Eis pipettiert:

Plasmid-DNA	1 - 3 µg
5`-IRD <sub>800</sub> -Primer (2 µM)	1 µl
dH <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 25 µl

Zu je 6 µl dieses Ansatzes wurden 3 µl der einzelnen Dideoxynukleotidgemische (A, G, T, C) aus dem Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare/Amersham Biosciences), pipettiert und in einem Thermocycler folgendem Zeitprogramm unterworfen:

## METHODEN

Denaturierung	95 °C	1,5 min	1 x
Denaturierung	95 °C	30 s	
Annealing	61 °C	30 s	
Synthese	70 °C	1,0 min	30 x
	8° C	∞	

Die Reaktion wurde mit 6 µl „Stop Mix“ aus dem Sequenzierungskit versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei –20 °C gelagert.

### c) Polyacrylamidgelelektrophorese

Primer-extension-Ansätze wurden auf 4 %ige, 40 cm lange Polyacrylamidgele aufgetragen. Die Elektrophorese und Fluoreszenz-Detektion erfolgte im Sequenziergerät LI-COR® 4000 DNA Sequenzer (MWG Biotech).

Bei der Herstellung des Gels wurden grundsätzlich Handschuhe getragen. Zunächst wurden zwei Glasplatten mit dH<sub>2</sub>O und Ethanol (70 %, [v/v], vergällt) gründlich gereinigt und dann, durch seitliche Spacer getrennt, mit Schraubklammern befestigt. Nach Vorbereitung der Gelapparatur wurde die Gellösung hergestellt und zwischen die Glasplatten gegossen und der Vorkamm luftblasenfrei eingesetzt. Nach ca. 1-2 Stunden war das Gel auspolymerisiert. Der Vorkamm wurde entfernt, die entstandene Tasche mit dH<sub>2</sub>O gespült und die Glasplatten nochmals von außen gereinigt. Das Gel wurde in die Elektrophoreseeinheit gehängt, die Pufferreservoirs mit 1x TBE-Laufpuffer (BioRAD) gefüllt und der Infrarotlaser auf das Gel eingestellt. Es folgte ein Vorlauf (2200 V, 37 mA) bei 45°C für ca. 30 min. Dann wurde der Haifischkamm (48 Zähne) eingesetzt und von den denaturierten Proben (2 min, 72 °C, Eis) jeweils 1-2,5 µl aufgetragen. Die Sequenzreaktionen wurden in der Reihenfolge A, T, C, G aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 2200 V, 37 mA, 45 °C und dauerte ca. 13 Stunden. Die Auswertung wurde mit Hilfe des Programmes Base ImagIR Image Analysis 4.0 (Eurofins MWG Operon, Ebersberg) durchgeführt.

### Gellösung

Sequagel XR	37 ml
Sequagel complete	9 ml
APS 10 % (v/v)	400 µl

#### 4.4.2 Amplifizierung von 5' cDNA Enden mittels 5'/3' RACE-Kit (Roche)

Die Isolierung und Charakterisierung von 5' Enden von mRNAs ausgehend von 2 µg RNA erfolgte mittels Roche 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation (3.4) gemäß Protokoll des Herstellers.

#### 4.5 Globale Transkriptomanalyse mittels DNA-Mikroarray

Zur Erfassung des globalen Transkriptionsmusters wurden *E. coli* spezifische DNA basierte Mikroarrays (Eurofins MWG Operon) verwendet. Bei diesem Mikroarray werden zwei zu vergleichende RNA Proben separat unter Verwendung unterschiedlicher DIGE-(Fluoreszenz-Farbstoff)-markierter dTTPs (Cy<sup>®</sup>3 und Cy<sup>®</sup>5, GE Healthcare/Amersham Biosciences) in markierte cDNA umgeschrieben und auf Oligonukleotid-Glasslides hybridisiert. Da die fluoreszenzmarkierten Farbstoffe lichtsensitiv sind erfolgten alle Arbeitsschritte, soweit wie möglich, unter Ausschluss von Licht.

##### Array Layout

Für die Expressions-Analyse wurden Oligonukleotid-Glasslides (Eurofins MWG Operon) eingesetzt. Dieser Mikroarray enthält 10816 70mer-Oligonukleotid-Sonden. Insgesamt wurden damit die kompletten Genome von 6 *E. coli* Stämmen abgedeckt (6 Genome und 4 Plasmide). Insgesamt umfasst der Array: 4269 ORFs des apathogenen *E. coli* Stammes K-12 MG1655, 5306 ORFs des enterohämorrhagischen *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933, 5251 ORFs von *E. coli* CFT073, 322 ORFs des uropathogenen *E. coli* Stammes 536, 448 ORFs des uropathogenen Stammes *E. coli* UTI89, 3 Gene des EHEC Plasmides OSAK1, 10 Gene des EHEC Plasmides pO0157\_Sakai, 97 Gene des EHEC Plasmides pO157 EDL933 und des UPEC Plasmides pUTI89. Zusätzlich enthält das Array-Layout eine Reihe von Positiv- und Negativkontrollen.

##### a) Markierungsreaktion

Zur cDNA-Synthese wurden je Probe 10 µg DNA-freier, gereinigter RNA zusammen mit 3 µg Random Primer auf 13 µl Volumen mit RNase freiem Wasser aufgefüllt und anschließend für 10 min bei 70°C denaturiert.

Die Probe wurde anschließend für 5 min auf Raumtemperatur abgekühlt und dann 19 µl Reaktionsstocklösung (Tabelle 4) hinzupipettiert. Nach Zugabe von 4 µl des jeweiligen DIGE Farbstoff (Cy<sup>®</sup>3 oder Cy<sup>®</sup>5)-markierten dTTP wurde der Ansatz für 25 min bei 50°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl Superscript III wurde der Ansatz weitere 35 min bei 50°C inkubiert.

Anschließend wurde die Reaktion für 15 min bei 70°C abgestoppt. Durch die Zugabe von 10 µl 1 M NaOH und einer Inkubation für 15 min bei 65°C wurde die RNA hydrolysiert und der Ansatz danach mit 25 µl Tris-HCl (1 M, pH 7,5) neutralisiert.

**Tab. 4: Reaktionsstocklösung:**

Zusammensetzung	Mengen	Bemerkung
dNTP	4 µl	5 mM dATP, dCTP, dGTP, 2 mM dTTP
Superscript III	2 µl	Reverse Transkriptase
5 x First-Strand Buffer	8 µl	
DTT (0,1M)	4 µl	
RNase OUT™	1 µl	

#### **b) Aufreinigung der cDNA**

Zur Aufreinigung der cDNA wurde das QIAquick PCR Purification Kit® (Qiagen) verwendet. Der Ansatz wurde dafür mit 400 µl PB Puffer vermischt und auf die mitgelieferte Säule gegeben. Durch zentrifugieren bei ca. 10.000 x g wurde die cDNA an die Matrix der Säule gebunden. Das Eluat wurde verworfen. Nach 3maligem Waschen der Matrix mit PE Puffer (je 500 µl) wurde die markierte cDNA durch Zugabe von 30 µl HPLC Wasser eluiert und in einem neuen Reaktionsröhrchen gesammelt.

#### **c) Bestimmung der Frequenz der Farbstoff-Inkorporation in die cDNA (FOI)**

Um eine gute Qualität für die Hybridisierungsreaktion der Mikroarrays garantieren zu können, wurde ausschließlich cDNA verwendet die folgende FOI aufwiesen:

**Cy<sup>®</sup>3** = 20-35

**Cy<sup>®</sup>5** = 12-25

Um die Frequenz des inkorporierten DIGE Farbstoffes (Cy<sup>®</sup>3 oder Cy<sup>®</sup>5) in die neusynthetisierte cDNA zu prüfen wurde 1 µl der cDNA mit Hilfe des NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer (PEQLAB) analysiert. Auf diese Weise konnte sowohl die cDNA-Konzentration als auch die Menge an inkorporierten DIGE Farbstoff bestimmt werden.

Anhand der so ermittelten Werte und der nachfolgenden Gleichung, ist es möglich die Frequenz der Farbstoff-Inkorporation in die cDNA zu ermitteln.

$$\text{FOI} = (\text{Cy}^{\text{®}}3 \text{ oder } \text{Cy}^{\text{®}}5 \text{ in pmol} \times 324,5) / \text{cDNA Konzentration in ng}$$

FOI.....Frequenz der Inkorporation (*F*requency *O*f *I*ncorporation)

324,5.....durchschnittliche molare Masse von dNTPs

#### **d) Vorbereitung der Hybridisierungskammer**

Die Hybridisierungskammern wurden vor jeder Verwendung gründlich gereinigt und dann mit Druckluft von etwaigen Staubresten befreit. In die entsprechenden Löcher (4 Stück) wurde jeweils 15 µl HPLC Wasser vorgegeben. Dieses dient dazu, die Luftfeuchtigkeit stabil zu halten und ein Austrocknen der Proben zu verhindern. Anschließend wurde der Mikroarray in die entsprechende Vertiefung gelegt.

#### **e) Hybridisierung der cDNA**

##### **Vorhybridisierung**

Im Vorfeld an die Hybridisierung wurde der Array einer Waschung (Vorhybridisierungsschritt) unterzogen. Hierzu wurde ein entsprechendes Volumen OpArray Pre-Hyb Lösung (Eurofins MWG Operon) für 30 min auf 42°C erwärmt. Anschließend wurde der Microarray 60 min in der Lösung bei 42°C inkubiert. Nach einem Waschschrift in Waschlösung 1 (5 min, 20-25°C) wurden die Arrays für 30s vorsichtig mit dH<sub>2</sub>O gespült, und in ein Falconröhrchen überführt. Abschließend wurden die Microarrays durch einen Zentrifugationsschritt (1000 rpm, 5 min, RT) getrocknet und der Hybridisierungsreaktion unterzogen.

##### **Hybridisierung**

Bei guter Qualität der cDNA wurde diese mittels einer „Speed Vac“ auf ein Volumen von 2 µl einrotiert. Die beiden zu vergleichenden cDNA Proben, markiert mit unterschiedlichen DIGE-Farbstoffen (Cy<sup>®</sup>3 oder Cy<sup>®</sup>5), wurden anschließend vereint und in 36 µl OpArray Hyb Puffer (Eurofins MWG Operon, Ebersberg) aufgenommen. Nach einer Inkubation von 5 min bei 65°C wurden die Proben auf die vorbereiteten Mikroarrays in den Hybridisierungskammern gegeben und mit einem Deckgläschen entsprechender Größe bedeckt. Abschließend wurde die Hybridisierungskammer verschlossen und für 16 h bei 42°C in einem Wasserbad inkubiert.

**f) Waschen des Mikroarrays**

Um ungebundene oder unspezifische cDNA zu entfernen wurde der Mikroarray mit drei Puffern (Tabelle 5) gewaschen. Dabei wurden die Mikroarrays nach Entfernen des Deckgläschens für jeweils 10 min in Puffer 1 und 2 in einem aluminiumummantelten Falconröhrchen gewaschen. Ein weiterer Inkubationsschritt von 5 min erfolgte in Puffer 3 bevor die Microarrays in ein neues, aluminiumummanteltes Falconröhrchen überführt und durch einen Zentrifugationsschritt (1000 rpm, 5 min, RT) getrocknet wurden.

**Tab.5:** Waschpuffer Microarray

Waschpuffer	Komponente	Menge	Bemerkung
Waschpuffer 1	OpArray Wash A	50 ml	Puffer auf 42°C erwärmen
	OpArray Wash B	25 ml	
	dH <sub>2</sub> O	ad 500 ml	
Waschpuffer 2	OpArray Wash A	50 ml	
	dH <sub>2</sub> O	ad 500 ml	
Waschpuffer 3	OpArray Wash A	5 ml	
	dH <sub>2</sub> O	ad 500 ml	

**g) Scannen und Auswertung der Mikroarrays**

Für die Analyse der Mikroarray Daten wurde die Software Version 6.0 von Genpix Pro verwendet. Die Mikroarrays wurden bei einer Ratio von ca. 1 (635nm /532 nm) eingescannt. Bei der Analyse wurde Axon Acuity 4.0 als Datenbank und Auswertungssoftware verwendet und wie folgt verfahren: Nach dem Scannen wurde das Gitter „55156017\_E coli“ (englisch: Grid) auf das gescannte Bild angewendet, welches mittels der Analysefunktion der Software den annotierten Genen Expressionswerte zuordnet. Diese Daten wurden dann in die Datenbanksoftware Axon Acuity 4.0 übertragen. Dort wurden mindestens 3 parallele Experimente zur Erstellung eines Datensatzes verwendet. Zunächst wurden alle Datensätze angeglichen, d.h. Mikroarrays wurden via „Dyeswap“ in die selbe Datenstruktur konvertiert (635nm/532nm → 532nm/635nm). Die sich daraus ergebenden analogen Repliken der Versuche wurden dann gemeinsam einer Normalisierung unterzogen, um Artefakte, die aus der Technik resultieren, zu minimieren. Die nun normalisierten Daten der Repliken wurden

per „Query Wizard“ in einen Datensatz transferiert. Dabei wurden mittels eines Logarithmus die Datenpunkte, bei denen der Wert nicht mindestens 2-mal über dem Hintergrund waren, bzw. die als *bad* oder *absent* markiert waren, entfernt. Die Datensätze der sich daraus ergebenden Datenbank wurden einer Bonferroni-Korrektur mit einem p-Wert von 0,01 unterzogen, um signifikante von unspezifischen Daten zu trennen. Anschließend wurde der Datensatz per Algorithmus nach Werten deren Ratio des Medians über 2,0 bzw. unterhalb 0,5 lag, sortiert, um die signifikant regulierten Gene zu erhalten. Der sich daraus ergebene Datensatz wurde dann in einer Excel-Datei abgespeichert und unter molekularbiologischen, regulatorischen Gesichtspunkten ausgewertet.

## 4.6 Konstruktion von Plasmiden

### 4.6.1 pME\_Km\_FRT1 bzw. pME\_Km\_FRT2

Dieses Plasmid sollte nach seiner Generierung mit dem Colibactin-tragenden Vektor pBACpks fusioniert werden und der Stabilisierung des BAC-Vektors in *Pseudomonas putida* KT2440 dienen. Zunächst wurde das Kanamycinresistenzgen von pkD4 (einschließlich der 3' bzw. 5' lokalisierten FRT Sequenz) mit den Primerpaaren pME-Km-FRT1 P1 und P2 bzw. pME-Km-FRT2 P1 und P2 amplifiziert. Durch die Wahl der Primer entstand ein Fragment mit Homologien zu den 3' und 5' Bereichen der *multiple cloning site* des Shuttle-Vektors pME6030. Anschließend wurden die entstandenen PCR-Produkte aufgereinigt. Durch Einsatz dieser PCR-Fragmente sowie des Shuttle-Vektors pME6030 wurden anschließend mittels der  $\lambda$ -Red-Rekombinase vermittelten Allelaustauschmethode (4.7.1) die Vektoren pME\_Km\_FRT1 bzw. pME\_Km\_FRT2 generiert. Die korrekte Integration der PCR-Fragmente wurde mit pMEKm P3 und pMEKm P4 überprüft.

### 4.6.2 pBELOBACpksME6030

Dieses Plasmid diente dem Transfer des *clb*-Genclusters in den Organismus *Pseudomonas putida* KT2440 für eine spätere heterologe Expression. Aufgrund seiner enormen Größe war keine direkte Klonierung des Colibactin-Genclusters in den Shuttle-Vektor pME6030 möglich. Um die Stabilität des Colibactin-Clusters und somit auch eine heterologe Expression in *Pseudomonas putida* KT2440 zu garantieren, wurde eine Integration des Shuttle-Vektor pME6030 in pBELOBACpks11 vermittelt. Die Fusion von pME\_Km\_FRT1 bzw. pME\_Km\_FRT2 (4.6.1) mit dem Colibactin-Gencluster erfolgte durch die Transformation des jeweiligen Plasmids in den pBELOBACpks11 und pCP20 tragenden Laborstamm *E. coli* DH10B. Die Integration der Plasmide pME\_Km\_FRT1 bzw. pME\_Km\_FRT2 in pBELOBACpks11::FRTup bzw. pBELOBACpks11::FRTdown erfolgte über die FRT-

Sequenzen der jeweiligen Plasmide und die Aktivität der auf pCP20 kodierten Flp-Rekombinase. Die korrekte Integration wurde durch Sequenzierung überprüft.

## **4.7 Genetische Manipulation von *E. coli*-Stämmen**

### **4.7.1 $\lambda$ -Red-Rekombinase vermittelte Allelaustauschmethode nach DATSENKO & WANNER (2000)**

Für die Generierung von Integrationsmutanten in *E. coli* wurden die entsprechenden Stämme, in denen die auf dem Plasmid pKD46 kodierte  $\lambda$ -Red-Rekombinase durch Arabinose induziert worden war, mit PCR-Produkten transformiert. Diese bestanden aus einem Kanamycinresistenzgen, flankiert von zwei FRT-Sequenzen und wurden durch Rekombination über kurze, durch die zur Amplifikation verwendeten Primer erzeugten, homologen Bereiche (40-55 bp) integriert.

## **4.8 Proteinanalytik**

### **4.8.1 Präparation zytoplasmatischer Proteine aus *E. coli***

Zur Präparation zytoplasmatischer Proteine wurden die jeweiligen *E. coli* Stämme 4-5 h in 25 ml M63 Minimalmedium bei 37 °C angezogen und mittels Zentrifugation (6000 rpm, 10 min, 4°C) geerntet. Die Bakterienpellets wurden 3-mal mit je 25 ml TE-Puffer gewaschen und abschließend in 700  $\mu$ l TE-Puffer resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde in „Lysing Matrix E“ Gefäße (Q-BIOgene) überführt und in der Fast-Prep Maschine Savant BIO101 (Q-BIOgene) 2-mal homogenisiert (30s, 5,5 g). Zwischen den einzelnen Homogenisierungsschritten wurden die Proben für mind. 1 min auf Eis gelagert. Danach wurde das Homogenat erneut zentrifugiert (13.000 rpm, 15 min, 4°C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Zentrifugationsschritt wurde 2-mal wiederholt um Zellreste und andere unlösliche Bestandteile zu sedimentieren. Die Lagerung der so gewonnenen zytoplasmatischen Proteine erfolgte bei -20°C.

### **4.8.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung mittels Roti® Nanoquant**

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen erfolgte gemäß Herstellerangaben. Im Vorfeld wurden die Proteinextrakte in der Regel 1:200 bis 1:400 in dH<sub>2</sub>O verdünnt.

#### **4.8.3 Zweidimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Die Auftrennung von Proteinen in der zweidimensionalen SDS-Polyacrylamid-elektrophorese wurde erstmals 1975 durchgeführt (KLOSE J., 1975; O'FARRELL P.H., 1975). Sie beruht auf der Auftrennung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt in der ersten Dimension und nach ihrer Masse in der zweiten Dimension. Die Rehydratisierung, Isoelektrische Fokussierung, Äquilibration und die Elektrophorese der zweiten Dimension wurden exakt nach dem von GE Healthcare/ Amersham Biosciences herausgegebene Handbuch „2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients - Principles and Methods“ durchgeführt. Die Zweidimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und die massenspektroskopische Analyse der Proteine wurden in Kooperation mit Frau Dr. Voigt in Greifswald durchgeführt.

#### **4.8.4 Färbung der Proteingele mittels LavaPurple™ Fluoreszenzfärbung und Bilderfassung der 2-D Gele**

Zur Analyse der Proteinexpression in *E. coli* Nissle 1917 wurde die LavaPurple™ Fluoreszenzfärbung (Fluorotechnics, Tübingen, Deutschland) verwendet. Diese äußerst sensitive Methode beruht auf der Fähigkeit des Stoffes Epicocconone (BELL P.J.L. & KARUSO P., 2003) reversibel an Arginin-, Histidin- und Lysinreste in Proteinen zu binden. Als Folge dieser Bindung entwickelt Epicocconone eine starke Fluoreszenz (COGHLAN, D. R., 2005), welche eine sensitive Quantifizierung von Proteinen in 2-D Gelen ermöglicht.

An die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine wurden die Gele folgendem Protokoll unterzogen:

1. Inkubation des Gels in Vorfixierer für 0,5-24 h
2. Fixierung des Gels für mind. 1 h
3. Inkubation in LavaPurple™ für 1-1,5 h
4. Schwenken des Gels in Waschlösung für 0,5 h

Zur Aufbewahrung wurden die Gele in Klarsichtfolien eingeschweißt, in Aluminiumfolie verpackt und bei 4°C gelagert.

**Tab.6:** Lösungen für die LavaPurple™ Färbung

Lösung	Komponente	Menge/ Konzentration
Vorfixierer	Ethanol 96 %	15 % (v/v)
	Essigsäure 40 %	10 % (v/v)
Fixierer und Ansäuerungslösung	Ethanol 96 %	15% (v/v)
	Zitronensäure	1% (w/v)
LavaPurple™	Borsäure	6,2 g/l
	(Einstellen des pH-Wertes auf 10,5 mit NaOH)	
	LavaPurple™	0,005 % (v/v)
Waschlösung	Ethanol 96%	15 % (v/v)

Die mit LavaPurple™ gefärbten Gele wurden mit Hilfe des Fluoreszenz Scanners Typhoon 8600 (GE-Healthcare/ Amersham Biosciences) dokumentiert. Die Grafikdateien wurden im unkomprimierten TIF Format gespeichert und zur besseren Verarbeitung mit der Decodon Delta 2D Software die Bilddatei auf 1000 x 800 Pixel reduziert.

#### 4.8.5 Analyse von 2-D Gelen mittels Delta-2D Software

Die vergleichende Analyse der Proteingele wurde mit der Software Delta 2D® (Decodon, Greifswald, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurden gleiche Proteinspots in 2 verschiedenen Gel-Bildern per „*warping*“ zur Deckung gebracht und anschließend die Färbungsintensität der Gel-Bilder aneinander angeglichen. Für die Datenanalyse wurden für jedes Experiment 3 unabhängige, parallele Gele verwendet, die zu einem Fusionsgel transformiert wurden, welches dann als Grundlage für die Datenanalyse diente. Alle Gele wurden den Angaben des Herstellers der Software entsprechend ausgewertet. Nach entsprechender Normalisierung wurden Proteinspots, die mit einem „*Ratio of Median*“ Wert  $\geq 2$  fach oder  $\leq 0,5$  fach divergent waren, als signifikant reguliert betrachtet. Diese Proteinspots wurden markiert und später massenspektrometrisch (4.8.6) analysiert.

#### 4.8.6 Identifizierung von Proteinen aus dem 2-D Gel mittels Massenspektroskopie

Um Größe und Form der Proteingele unter dem „Spot-picking“ Roboter zu erhalten, wurden die Proteingele zuvor für 24 Stunden gewässert. Das gewässerte Gel wurde in dem Roboter platziert und arretiert. Mit der im Roboter eingebauten Kamera wurde das Gel fotografiert. Auf diesem Bild wurden an der Computersteuerung des Roboters die auszuschneidenden Spots markiert. Der Roboter schnitt nun die markierten Spots aus und legte jeden einzelnen in eine dafür vorgesehene Vertiefung einer 96-Loch Mikrotiterplatte. Die Platte wurde bis zum Verdau im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Der Verdau erfolgte automatisch in der Ettan Spot Handling Workstation (GE healthcare, Freiburg, Deutschland). Dabei fand ein „In-Gel-Verdau“ statt. Als verdauendes Enzym wurde Trypsin verwendet, das spezifisch die Peptidbindungen am C- Terminus von Lysin (K) und Arginin (R) spaltet. Dabei entsteht ein für das jeweilige Protein spezifisches Fragmentmuster. Jedes einzelne Fragment hat eine spezifische Masse und kann später im MALDI-TOF-MS nachgewiesen werden. Die Gesamtheit aller Massen der Fragmente des Proteins ergibt letztlich den „Peptidmass-Fingerprint“. Durch den Vergleich des Massen-Datensatzes eines Proteins mit einer Datenbank kann das Protein identifiziert werden. Je mehr einzelne Fragmentmassen zwischen Protein und Datenbank übereinstimmen, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass das Ergebnis der Identifikation stimmt.

Nach dem Trypsinverdau wurden Gelrückstände durch Waschen mit Acetonitril entfernt. Das verdaute Protein wurde vom Roboter direkt auf die Messplatte getropft. Die beladene Platte wurde mit einem MALDI-TOF-MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Mass Spectrometer- Time Of Flight*) analysiert. Im MALDI-TOF-MS werden die in einer kristallinen Matrix befindlichen Fragmente mittels eines Laserbeschusses gasförmig ionisiert. Diese Ionen werden in einem im Vakuum befindlichen elektrischen Feld beschleunigt. Ihrer Masse wird dadurch bestimmt, dass alle Ionen nach der Beschleunigungsstrecke die gleiche kinetische Energie haben, aber aufgrund ihrer Masse eine unterschiedliche Flugzeit auf der nachfolgenden Driftstrecke benötigen. Die gemessenen Massenspektren wurden bereits vorgeeicht, so dass eine unmittelbare Auswertung der Daten mit GPMWATM (Lighthouse, San Diego, USA) möglich war. Als Standard wurde eine maximale Massenabweichung von 50 ppm und als Proteinmodifikation Carbamidomethylierungen bei Cystein, sowie Methionin-Sulfoxidierungen eingestellt. Als Datenbank wurde die UniProt Knowledgebase (<http://www.uniprot.org>) verwandt.

## 4.9 Phänotypische Charakterisierung

### 4.9.1 Nachweis der Siderophorenbildung in Kulturüberständen

Die Produktion von Siderophoren wurde mittels Chrom Azurol S (CAS) Assay ermittelt (Schwyn & Neilands, 1987). Übernachtkulturen der zu testenden Stämme wurden hierfür in 25 ml M63-Medium (+ 0,1 mM 2,2'-Dipyridyl) überimpft. Für die Messung der Siderophorenbildung wurden zu bestimmten Zeitpunkten Proben der Kulturen entnommen. Nach einem Zentrifugationsschritt (6000 rpm, 10 min, 4°C) wurden die Überstände in eine neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem 1 Volumen CAS-Assay Lösung gemischt und für 30 min bei RT inkubiert. Die Lösung enthält einen blauen Fe<sup>3+</sup>-CAS-Komplex. Bei Anwesenheit von Siderophoren erfolgt ein Farbumschlag zu rot, verursacht durch die Auflösung des Fe<sup>3+</sup>-CAS-Komplexes aufgrund der höheren Fe<sup>3+</sup>-Affinität der Siderophoren. Die Auflösung des Fe<sup>3+</sup>-CAS-Komplexes wurde photometrisch bei einer OD<sub>630nm</sub> dokumentiert.

### 4.9.2 Nachweis der Autoaggregation

Zur Untersuchung von Zell-Interaktionen wurden Bakterienstämme Autogreggations-Test unterzogen. Hierzu wurden Kulturen der zu testenden Stämme über Nacht bei 37°C in Schüttelkultur angezogen. Am folgenden Morgen wurde die optische Dichte der Kulturen bei 600 nm gemessen und auf OD<sub>600</sub> = 3,0 eingestellt. 5 ml der Kultur wurden stehend bei Raumtemperatur inkubiert. Stündlich wurden 50 µl Proben ca. 1 cm unterhalb der Oberfläche entnommen mit 950 µl M63-Medium gemischt und die optische Dichte bei 600 nm dokumentiert um die Aggregation der Zellen zu quantifizieren.

### 4.9.3 Nachweis der Biofilmbildung

Zur Analyse der Biofilmbildung wurden Übernachtkulturen der zu testenden Stämme im Verhältnis 1:200 in frischem M63-Medium inokuliert und bei 37°C und 200 rpm kultiviert. Nach 3 bis 4 stündigem Wachstum wurden 200 µl der Kulturen in 96-well-Mikrotiterplatten überführt und stehend bei 30°C für 24 bzw. 48h inkubiert. Anschließend wurden die Kavitäten der Mikrotiterplatte dreimal vorsichtig mit 1 x PBS gewaschen und für 30 min bei 95°C getrocknet. Zur Färbung wurde der Biofilm für 20 min in 200 µl einer 0,1 %igen Kristallviolett-Lösung inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit 1 x PBS (3-mal) zum Entfernen von ungebundenen Kristallviolett wurden die Mikrotiterplatten bei 60 °C getrocknet. Abschließend wurde die gefärbte Platte bei 495 nm im ELISA-Reader eingescannt.

#### **4.9.4 Ermittlung der Minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK-Test)**

Zur Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration wurden Übernachtskulturen der zu untersuchenden Bakterienstämme im Verhältnis 1:100 in frisches M63-Minimalmedium überimpft und 4 h schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl dieser Kulturen in 96-well-Mikrotiterplatten überführt. Die Kavitäten der Mikrotiterplatte wurden zuvor mit je 100 µl M63-Medium befüllt, das verschiedene Konzentrationen eines bestimmten Antibiotikums enthielt (Konzentrationsbereich: 160 - 0,6 µg/ ml). Die Mikrotiterplatten wurden anschließend stehend bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch die Messung der optischen Dichte der einzelnen Kavitäten bei 600 nm.

#### **4.9.5 Nachweis des rdar-Morphotyps (Curli- und Zelluloseexpression)**

Zum Nachweis von Curli-Fimbrien und Zellulosesynthese (rdar-Morphotyp) wurden die zu testenden Stämme auf Kongorot-Agar (3.5) überimpft und bei 30 °C und 37 °C für 48 h inkubiert.

#### **4.9.6 Nachweis der Zellulosesynthese**

Die Synthese von Zellulose wurde durch Kultur der entsprechenden Stämme auf Calcofluor-Agar (3.5) und anschließende Betrachtung der Kolonien unter UV-Licht ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) nachgewiesen. Zellulose-positive Stämme konnten durch deren Fluoreszenz identifiziert werden.

## Ergebnisse

### 5.1. Transkriptionsanalyse

#### 5.1.1 Transkriptionsstartbestimmung relevanter Gene des Colibactin-Genclusters

Frühere Erkenntnisse zu den Translationsstartpunkten der einzelnen Gene des Colibactin-Genclusters basierten ausschliesslich auf computergestützten Analysen (Artemis v9, Neural Network Promoter Prediction Software). Weitere Untersuchungen ergaben eine polycistronische Organisation mehrerer Gene des *clb*-Clusters. Zwei grosse Operons von ca. 6,2 bzw. 23,3 kb bilden demnach die Gene *clbC* bis *clbG* sowie *clbI* bis *clbN*. Auch die Gene *clbO* und *clbP* (3,9 kb) sowie *clbR* und *clbA* (0,9 kb) werden offenbar kotranskribiert. Einzig die Gene *clbB* und *clbH* werden gemäss dieser Analyse monocistronisch transkribiert (HOMBURG, 2007).

Um diese *in silico*-Analysen zu komplettieren, wurden die Transkriptionsstartpunkte der Gene *clbA*, *clbR*, *clbB*, *clbC*, *clbH*, *clbI* und *clbQ* ermittelt. Zu diesem Zweck wurden Primer Extension-Analysen durchgeführt (4.4.1). Alternativ zu diesem Verfahren kam in vereinzelt Fällen die Methode des 5'/3' RACE Kit (Roche) zum Einsatz.

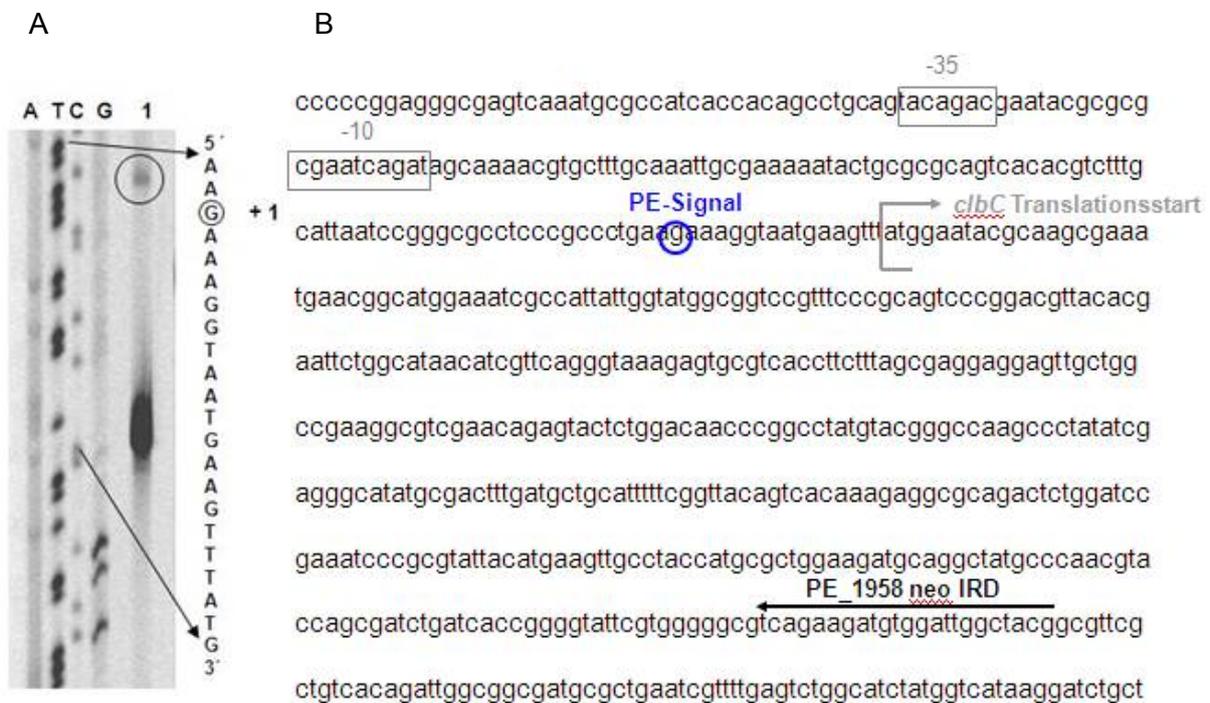
Pro Ansatz wurden 500 ng Gesamt-RNA aus *E. coli*-Zellen des Stammes Nissle 1917 eingesetzt, welcher zuvor in M63-Medium bei 37 °C angezogen und in der stationären Phase geerntet wurde. Als Beispiel ist in Abbildung 9 die Primer Extension-Analyse für das Gen *clbC* dargestellt. Die Analysen zur Transkriptionsstartbestimmung der übrigen Gene sind im Anhang A.3 aufgeführt.

Im Fall von *clbC* wurden mittels der Primer Extension-Analyse zwei Signale erhalten, wobei das erste und stärker ausgeprägte Signal dem ursprünglich mittels Computer-gestützter Analyse ermittelten Translationsstart von *clbC* entspricht. Dies würde eine Verkürzung des eigentlichen ClbC-Proteins von sechs Aminosäuren bedeuten. Ein zweites schwächeres Signal, es handelt sich um ein Guanin (Matrizenstrang), wurde im Abstand von 16 bp upstream vom *clbC*-Startcodon detektiert. Für das Gen *clbH* konnte ein Primer Extension-Signal im Abstand von 18 bp stromaufwärts vom Startcodon detektiert werden. Auch im Fall von *clbI* konnte das ursprünglich berechnete Startcodon bestätigt werden. Bei dem für dieses Gen ermittelten Transkriptionsstart handelt es sich um ein Adenin, das sich 126 bp vor dem Startcodon befindet. Das Primer Extension-Signal von *clbQ* wurde 81 bp vor dem berechneten Translationsstart detektiert und bestätigt ebenfalls die Richtigkeit der Computer-gestützten Analyse. Bei *clbA* liegt aufgrund früherer Untersuchungen die Vermutung nahe, dass das Gen zusammen mit *clbR* eine Transkriptionseinheit bildet. Um dieser Annahme nachzugehen, wurde der 5'-Bereich des *clbA*-Transkriptes ebenfalls untersucht. Die durchgeführte Amplifikation und anschliessende Sequenzierung (5'/3'RACE Kit, Roche) des

## ERGEBNISSE

Transkripts ergab, dass *clbA* einen eigenen Transkriptionsstart besitzt, welcher sich 101 bp vor dem Startcodon im *downstream*-Bereich des vorangehenden Gens *clbR* befindet.

Einzig für die Gene *clbB* und *clbR* war eine Bestimmung des Transkriptionsstarts mittels Primer Extension nicht möglich. Im Gegensatz zu den übrigen untersuchten Genen ergab die Primer Extension-Analyse für *clbR* stets ein diffuses Signal, so dass der Transkriptionsstart nicht exakt bestimmt werden konnte. Das diffuse Signal begründet sich möglicherweise in einer repeat-Region, die sich im Bereich vor dem Startcodon befindet. Diese kann sich störend auf die cDNA-Synthese auswirken. Im Fall von *clbB* wurde ein Transkriptionsstart ermittelt, der 637 bp downstream des berechneten Translationsstartpunktes liegt, woraus sich ein um 212 Aminosäuren verkürztes Protein ergeben würde. Es handelt sich hierbei vermutlich um ein falsches Signal verursacht durch einen vorzeitigen Abbruch der cDNA-Synthese aufgrund auftretender RNA-Sekundärstrukturen.



**Abb. 9:** Primer Extension-Analyse zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des Genes *clbC*. Die DNA-Sequenz (Abb. 9 B) zeigt den Translationsstartpunkt von *clbC*, die Region stromaufwärts mit dem Primer-Extension-Signal (blau markiert) und den Promotorstrukturen (hellgrauer Rahmen), sowie den verwendeten IRD<sub>800</sub>-markierten Primer (schwarzer Pfeil). In Abb. 9 A ist das PE-Signal (Spur 1) neben der Sequenzreaktion abgebildet.

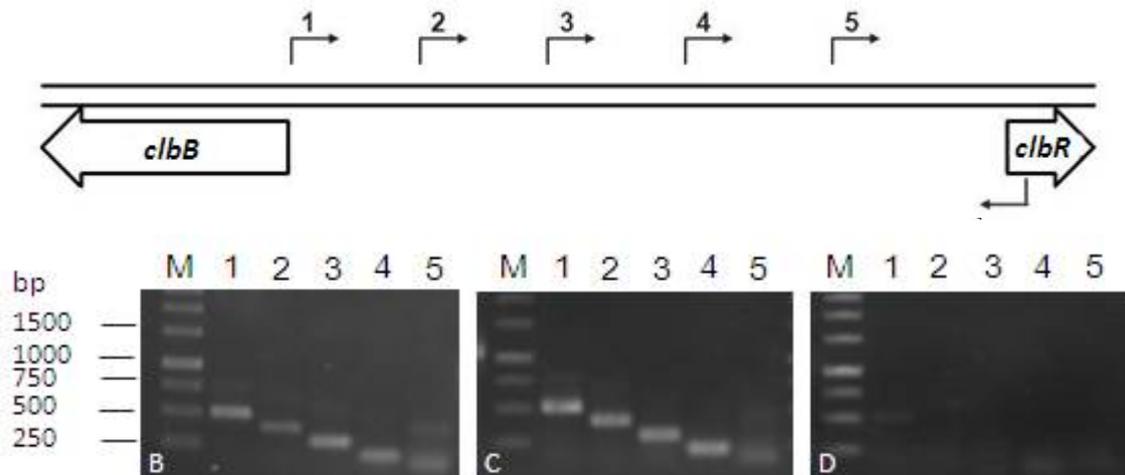
Somit konnten, mit Ausnahme der Gene *clbB* und *clbR*, die Transkriptionsstartpunkte der Gene *clbQ*, *clbH* sowie *clbI* mittels der Primer Extension-Analyse ermittelt werden, was die vorhergesagten Translationsstarts dieser Gene bestätigt. Zudem wurde für das Gen *clbA* ein eigenständiger Transkriptionsstart identifiziert. Unter Berücksichtigung der Transkriptionsstartpunkte erfolgte eine Berechnung möglicher Promotorstrukturen mit Hilfe der Software BPROM (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>). Mit dieser können prokaryotische DNA-Sequenzen anhand charakteristischer Konsensussequenzen, vorwiegend der -35- und -10-Boxen, auf mögliche Bindungsstellen der RNA-Polymerase hin untersucht werden. Mit Ausnahme von *clbI* konnten für alle Gene die Strukturelemente eines Sigma70-abhängigen Promotors identifiziert werden (Anhang A1). Zusätzlich wurden die stromauf- und abwärts vom Transkriptionsstart liegenden Sequenzen auf das Vorhandensein möglicher Transkriptionsfaktorbindestellen (TFB) untersucht. Auf die Ergebnisse dieser Analyse wird im folgenden Abschnitt (5.1.2) näher eingegangen.

### 5.1.2 Untersuchung der intergenischen Region zwischen *clbR* und *clbB*

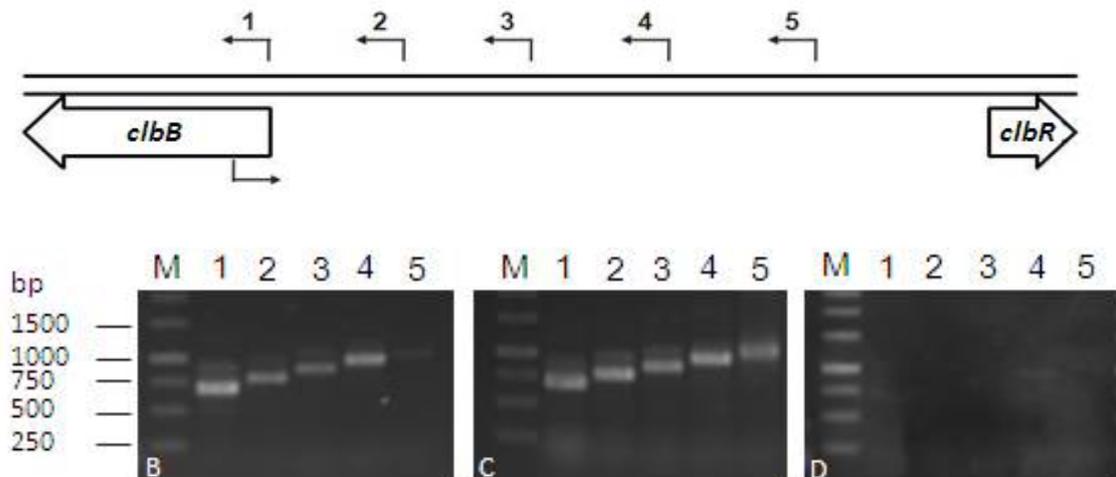
Aufgrund des ungewöhnlichen Primer Extension Signals, das sich im Fall des Genes *clbR* zeigte, sollte eine Überprüfung der intergenischen Region zwischen *clbB* und *clbR* mittels RT-PCR Aufschluss über die Begrenzung des *clbR*-Transkriptes geben. Da die Suche nach dem Transkriptionsstart von *clbB* mit herkömmlichen Methoden ebenfalls erfolglos blieb, sollte auch hier eine Untersuchung des intergenischen Bereichs über die Transkriptlänge erfolgen. Die zur Untersuchung der *clbR*-Transkriptlänge gewählten Primer umfassten den kompletten intergenischen Bereich vom *clbB*- bis zum *clbR*-Translationsstart (Abbildung 10 A). Auf diese Weise konnte festgestellt werden, dass im Fall von *clbR* scheinbar die komplette intergenische Region transkribiert wird (Abbildung 10 B). Für die RT-PCR-Analyse zur Abschätzung der Länge der *clbB*-mRNA wurden Primer verwendet, die den Bereich vom *clbB*-Translationsstart bis ca. 100 bp vor dem *clbR*-Translationsstart abdeckten (Abbildung 11 A). Im Ergebnis dieser Transkriptionsanalyse wurden für vier der Primerpaarungen Signale erhalten (Abbildung 11 B), was weiterführend eine Eingrenzung des *clbB*-Transkriptionsstarts auf den Bereich von 287-337 bp upstream vom *clbB*-Translationsstart ermöglicht. Zusätzlich wird dieses Ergebnis durch Sequenzanalyse identifizierte Promotorelemente im Bereich von 353-366 bp upstream des Translationstarts gestützt.

ERGEBNISSE

A



**Abb. 10: Analyse einer möglicherweise nicht-translatierten Region (UTR) des *clbR* Gens.** Die Transkription des intergenischen Bereiches zwischen *clbB* und *clbR* wurde durch RT-PCR ermittelt. A: Schema der Primerbindestellen; B: Signale der RT-PCR zur Untersuchung des 5'UTRs von *clbR*; C: Kontrolle mit DNA als Matrize; D: Kontrolle mit RNA als Matrize



**Abb. 11: Analyse einer möglicherweise nicht-translatierten Region (UTR) des *clbB* Gens.** Die Transkription des intergenischen Bereiches zwischen *clbR* und *clbB* wurde durch RT-PCR ermittelt. A: Schema der Primerbindestellen; B: Signale der RT-PCR zur Untersuchung des 5'UTRs von *clbB*; C: Kontrolle mit DNA als Matrize; D: Kontrolle mit RNA als Matrize

### 5.1.3 Analyse von Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren

Um Aufschluss über mögliche Kontrollmechanismen im Fall der Synthese des Polyketids Colibactin in *E. coli* zu erhalten, wurden die Promotor-Regionen der Gene bzw. im Fall von *clbB* und *clbR* die *upstream*-Bereiche der Gene auf das Vorhandensein möglicher Transkriptionsfaktorbindestellen (TFB) untersucht. Die Analyse erfolgte unter Zuhilfenahme der PRODORIC Datenbank (<http://www.prodoric.de>).

Tabelle 8 fasst die wichtigsten Ergebnisse der Analyse der Promotor-Regionen der einzelnen Gene zusammen. Berücksichtigt wurden bei der Auswertung der Ergebnisse sowohl die PWM (Position Weight Matrix), die Aufschluss über die Ähnlichkeit zur Konsensussequenz gibt (MÜNCH *et al.*, 2003), als auch die charakteristische Lage der TFB zum Transkriptionsstart. Die gesamte Liste möglicher Transkriptionsfaktorbindestellen ist im Anhang in Tabelle A.2 dargestellt.

Bei den in Tabelle X aufgeführten Transkriptionsfaktorbindestellen handelt es sich zum Grossteil um Erkennungssequenzen von Regulatoren, die sich vor allen Genen des Polyketid-Genclusters finden. Hierzu zählen u.a. Bindestellen von Regulatoren, deren Funktion in der Kontrolle von Stoffwechselprozessen liegt, wie z.B. CRP (**C**atabolism **R**epressor **P**rotein), Lrp (**L**eucline-responsive **R**egulatory **P**rotein) und Mlc. Während es sich bei CRP um den globalen Regulator Katabolit-sensitiver Operone handelt, der ausschliesslich den Abbau von nichtglukogenen Kohlenstoffquellen kontrolliert, fungiert Mlc als globaler Regulator des Kohlenhydratmetabolismus, einschliesslich des Phosphotransferasesystems. Im Gegensatz dazu sind Gene, die durch den Regulator LRP kontrolliert werden, z.B. in den Aminosäuremetabolismus, den Nährstofftransport oder die Pili-Synthese involviert. Weiterhin findet sich eine Gruppe von Transkriptionsfaktorbindestellen für Regulatoren, die unter bestimmten Stressbedingungen aktiviert werden. Darunter ArcA, OxyR und NarL, die als Regulatoren bei oxidativem Stress fungieren und u. a. die Expression von Genen beeinflussen, deren Produkte antioxidative Wirkung zeigen. Des Weiteren findet sich in dieser Gruppe der Transkriptionsfaktor GlnG, der unter Stickstoff-limitierten Bedingungen aktiviert wird und die Expression von Genen reguliert, deren Produkte in die Assimilation von Stickstoff involviert sind. Weiterhin finden sich in den Promotorbereichen der meisten Gene Bindungsstellen für die Proteine Fis (**F**actor for **I**nversion **S**timulation) und IHF (**I**ntegration **H**ost **F**actor) die eine Rolle in der Organisation bzw. Aufrechterhaltung der Nukleoidstruktur spielen. In einigen Fällen findet sich auch eine Erkennungssequenz für das H-NS Protein (**H**istone-like **N**ucleoid **S**tructuring **P**rotein), welches als pleiotroper Regulator fungiert. Vielfach reguliert es Gene die durch horizontalen Gentransfer erworben wurden. Eine Ausnahme bilden die Erkennungssequenzen für Fur (**F**erric **U**ptake **R**egulation) und GadX (**G**lutamic **A**cid **D**ecarboxylase), die sich ausnahmslos im Promotorbereich des Genes *clbR* finden. Während

das regulatorische Protein Fur die Transkription von Genen kontrolliert, die für die Eisenhomeostase in der Zelle verantwortlich sind, übernimmt GadX eine wichtige Funktion in der Regulation der Glutamat-abhängigen Säureresistenz.

**Tab.8:** Zusammenfassung möglicher Transkriptionsfaktorbindestellen (TFB) vor Genen des Colibactin-Genclusters

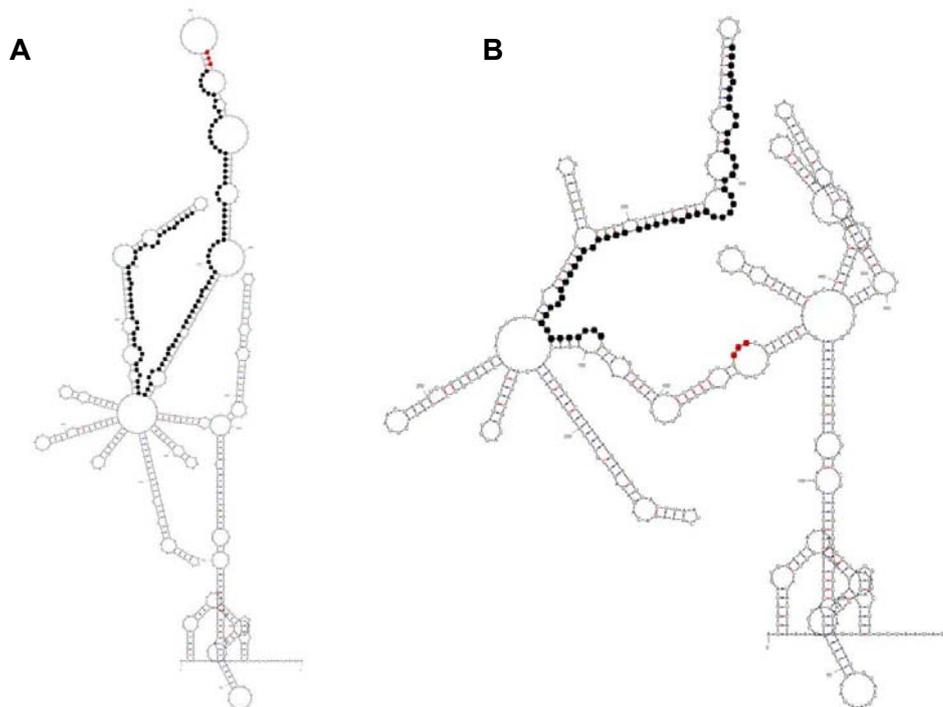
TFB für	Gen	<i>clbA</i>	<i>clbR</i>	<i>clbB</i>	<i>clbC</i>	<i>clbH</i>	<i>clbI</i>	<i>clbQ</i>
ArcA		-	+	+	-	+	+	+
Crp		+	+	+	+	-	+	+
Fis		-	-	+	+	+	+	+
Fur		+	+	-	-	-	-	-
GlnG		+	-	-	+	+	+	+
H-NS		+	-	-	+	-	+	-
IHF		+	+	+	-	-	+	+
Lrp		-	+	+	+	-	+	+
Mlc		+	+	-	+	+	+	+
NarL		+	+	+	+	-	+	+
OxyR		+	-	+	-	+	+	+
Sig70 (-10)		+	+	+	+	+	-	+
YhiX/ GadX		-	+	-	-	-	-	-

## 5.2 Analyse der Stabilität der *clb*-Transkripte

### 5.2.1 Vorhersage der Sekundärstruktur und Stabilität der *clbR*-mRNA

Die Stabilität einer mRNA kann von verschiedenen Faktoren beeinflusst werden, dazu zählt u.a. auch die Ausbildung von Sekundärstrukturen im untranslatierten 3'- und 5'-Bereich des Transkriptes. In der Regel ist der 5'-Bereich prokaryotischer mRNAs relativ kurz. Der vergleichsweise lange 5'UTR von *clbR* (5.1.2) legt die Vermutung nahe, dass dieser dem *clbR*-Transkript möglicherweise eine gewisse Stabilität vermittelt. Eine Analyse der mRNA-Sekundärstruktur von *clbR* (inklusive des 5'UTR) der *E. coli*-Stämme Nissle 1917 und CFT073 erfolgte unter Zuhilfenahme der *Mfold*-Software unter:

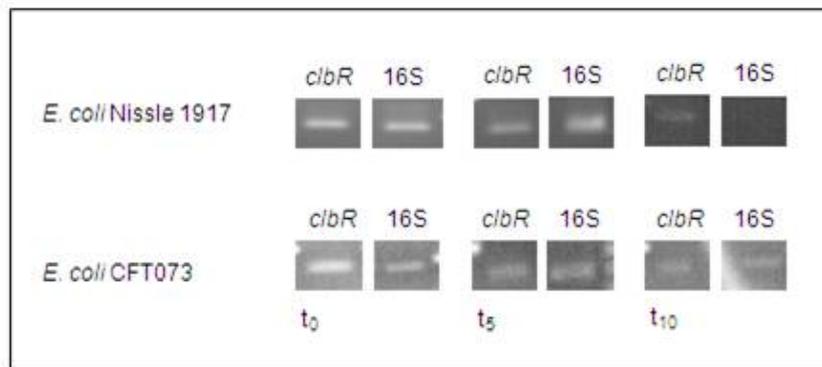
<http://dinamelt.bioinfo.rpi.edu/quikfold.php>, (ZUKER, 1989) und sollte einen ersten Eindruck von der Sekundärstruktur der *clbR*-mRNA und deren Stabilität vermitteln. Der Algorithmus zur Berechnung der Sekundärstruktur der RNA stützt sich hauptsächlich auf die „Minimierung der freien Energie“. Im Vergleich der so berechneten RNA-Sekundärstrukturen von *clbR* der *E. coli*-Stämme Nissle 1917 und CFT073 (Abbildung 12) zeigte sich eine theoretische Erhöhung der freien Energie  $dG$  mit Zunahme der Sequenzwiederholungen. G gibt Auskunft über die Stabilität der RNA-Sekundärstruktur, je niedriger der negative  $dG$ -Wert, desto stabiler ist der RNA-Komplex. So weist das *clbR*-Transkript (inklusive des 5'UTR) von *E. coli* Nissle 1917 (13 repeats) eine freie Energie  $dG = -124,2$  auf. Die freie Energie der *clbR*-mRNA in *E. coli* CFT073 (7 repeats) hingegen erreicht einen Wert von  $dG = -118,8$ .



**Abb. 12:** Schematische Darstellung der mittels *Mfold*-Software berechneten Sekundärstruktur der *clbR*-mRNA. Schwarze Bereiche kennzeichnen den Repeat, rote Bereiche den Translationsstart. A: *E. coli* Nissle 1917; B: *E. coli* CFT073.

### 5.2.2 *clbR*-mRNA-Stabilität in Abhängigkeit vom 5'UTR

In einem weiteren Experiment wurde die Stabilität der *clbR*-Transkripte aus den *E. coli* Stämmen Nissle1917 und CFT073 untersucht. Dazu wurden die beiden Bakterienstämme bei 37 °C in M63 Minimalmedium kultiviert. Nach 4-stündigem Wachstum wurde den Kulturen Rifampicin (250 µg/ ml) zugefügt, was zum Transkriptionsstopp führt. Nach 5 min ( $t_5$ ) bzw. 10 min ( $t_{10}$ ) wurde RNA aus den Kulturen isoliert. Zum Vergleich diente RNA, die vor der Zugabe des Rifampicin aus den Kulturen gewonnen wurde ( $t_0$ ). Im Anschluss wurden die Transkriptmengen von *clbR* mittels semiquantitativer RT-PCR verglichen (Abbildung 13). Dabei zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied in den nachgewiesenen Mengen des *clbR*-Transkriptes im Vergleich von *E. coli* Nissle 1917 und *E. coli* CFT073, so dass augenscheinlich nicht von einer Beeinflussung der Stabilität der *clbR* mRNA durch die Anzahl der Wiederholungssequenz im 5'UTR von *clbR* ausgegangen werden kann.

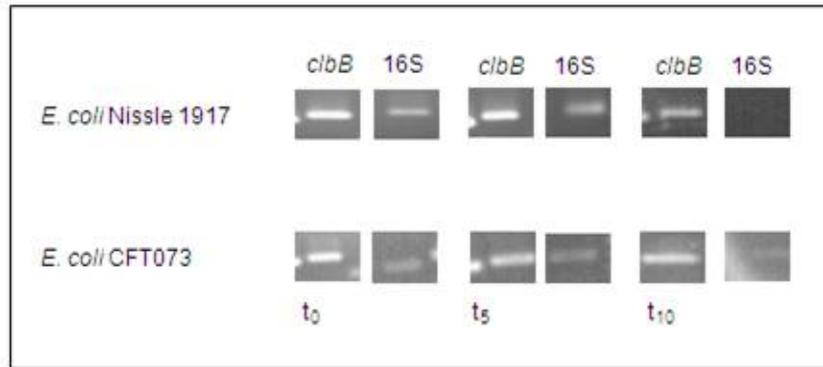


**Abb. 13: Vergleichende Transkriptmengenanalyse von *clbR* aus *E. coli* Nissle 1917 und *E. coli* CFT073.** Die *clbR*-Transkriptmenge wurde 5 Minuten ( $t_5$ ) bzw. 10 Minuten ( $t_{10}$ ) nach Inhibierung der Transkription bestimmt. Als zellulärer Standard wurde das Gen *rrnB* (16S rRNA) mitgeführt.

### 5.2.3 *clbB*-mRNA-Stabilität in Abhängigkeit vom 5'UTR

Der Vergleich der *clbB*-Transkriptstabilität in den *E. coli* Stämmen Nissle 1917 und *E. coli* CFT073 folgte dem gleichen Schema, das bereits im vorangehenden Abschnitt für *clbR* verwendet wurde. Mittels RT-PCR-Analyse liessen sich nach fünf bzw. zehn Minuten bei *E. coli* Nissle 1917 im Vergleich mit *E. coli* CFT073 leicht erhöhte Transkriptmengen von *clbB* nachweisen. Eine Beeinflussung der Stabilität der *clbB*-mRNA durch die Anzahl der Wiederholungssequenzen im 5'UTR von *clbB* kann daher nicht ausgeschlossen werden.

## ERGEBNISSE

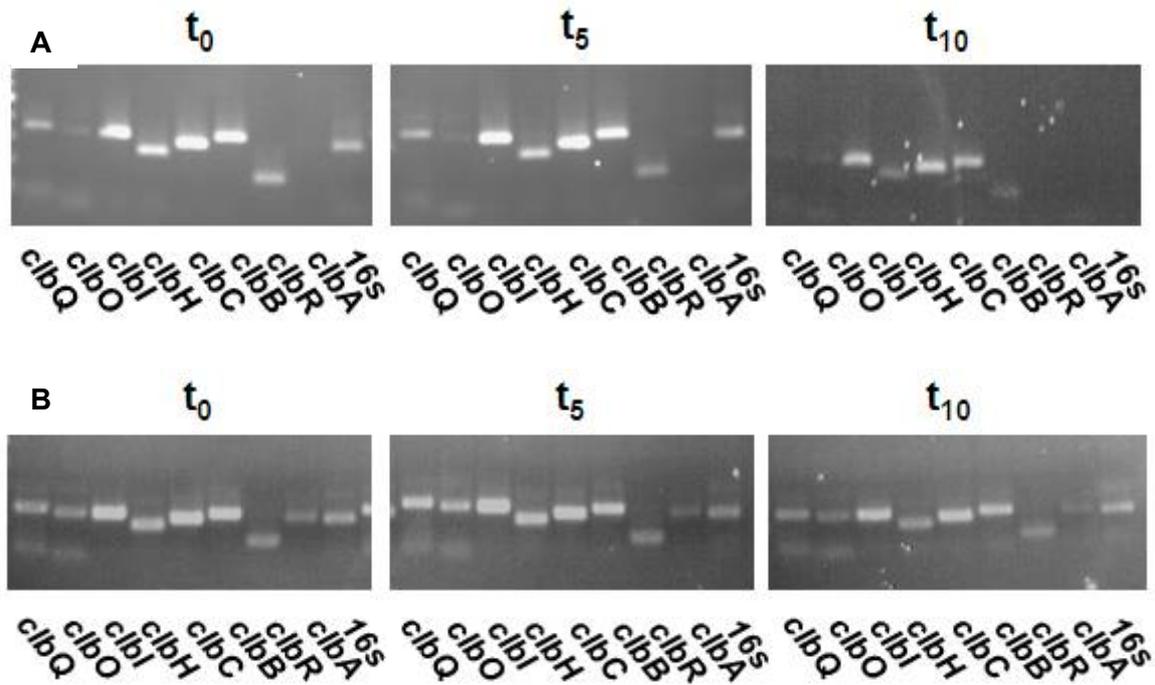


**Abb. 14: Vergleichende Transkriptmengenanalyse von *clbB* aus *E. coli* Nissle 1917 und *E. coli* CFT073.** Die *clbB*-Transkriptmenge wurde 5 Minuten ( $t_5$ ) bzw. 10 Minuten ( $t_{10}$ ) nach Inhibierung der Transkription bestimmt. Als zellulärer Standard wurde das Gen *rrnB* (16S rRNA) mitgeführt.

### 5.2.4 Stabilität einzelner *clb*-Transkripte

Auch die Stabilität der übrigen Transkripte des Colibactin-Clusters wurde überprüft. Hierzu erfolgte eine Kultivierung des Stammes *E. coli* Nissle 1917 in M63 Minimalmedium bei 37 °C über vier Stunden. Zusätzlich wurde auch der Einfluss der Ribosomenbindung auf die mRNA-Stabilität untersucht. Zur Inhibierung der RNA-Polymerase wurde der Kultur Rifampicin (250 µg/ ml) zugesetzt. Eine Blockierung der Ribosomen wurde durch Zugabe von Chloramphenicol (250 µg/ ml) erreicht. Die Entnahme der Proben für die spätere RNA-Isolierung erfolgte nach 5 bzw. 10 min ( $t_5$  bzw.  $t_{10}$ ). Zum Vergleich diente RNA, die vor der Zugabe des Rifampicin bzw. Chloramphenicol aus den Kulturen gewonnen wurde ( $t_0$ ). Mittels RT-PCR konnte festgestellt werden, dass die Transkriptmengen der überprüften Gene, sowohl nach Inhibierung der RNA-Polymerase (Abb. 15 A), als auch nach Blockierung der Ribosomen (Abb. 15 B), nach 10 min abnahmen. Nach der Zugabe von Rifampicin (Abb. 15 A) zeigte die RT-PCR-Analyse zum Zeitpunkt  $t_0$  hohe Transkriptmengen für die Gene *clbI*, *clbH*, *clbB* und *clbC*. Wesentlich geringere Transkriptmengen wurden die Gene *clbQ*, *clbO*, *clbR* und *clbA* nachgewiesen. Auch 5 bzw. 10 min nach Zugabe von Rifampicin zeigten die mRNAs von *clbI*, *clbH*, *clbB* und *clbC* eine relativ hohe Stabilität. Aber auch die eher schwach exprimierten mRNAs von *clbQ*, *clbO* und *clbR* liessen eine gewisse Stabilität erkennen und konnten nach 5 bzw 10 min mittels RT-PCR detektiert werden. Einzig im Fall von *clbA* liess sich nach 10 min kein Transkript mehr nachweisen. Nach Inhibierung der Transkription und Translation durch die Zugabe von Rifampicin und Chloramphenicol zur Bakterienkultur (Abb. 15 B) liessen sich im Ergebnis der RT-PCR-Analyse nach fünf Minuten ( $t_5$ ) im Vergleich mit Zeitpunkt  $t_0$  keine Veränderungen hinsichtlich der Transkriptmengen erkennen. Erst nach zehn Minuten zeigte sich eine Abnahme der Stabilität der einzelnen mRNAs.

## ERGEBNISSE

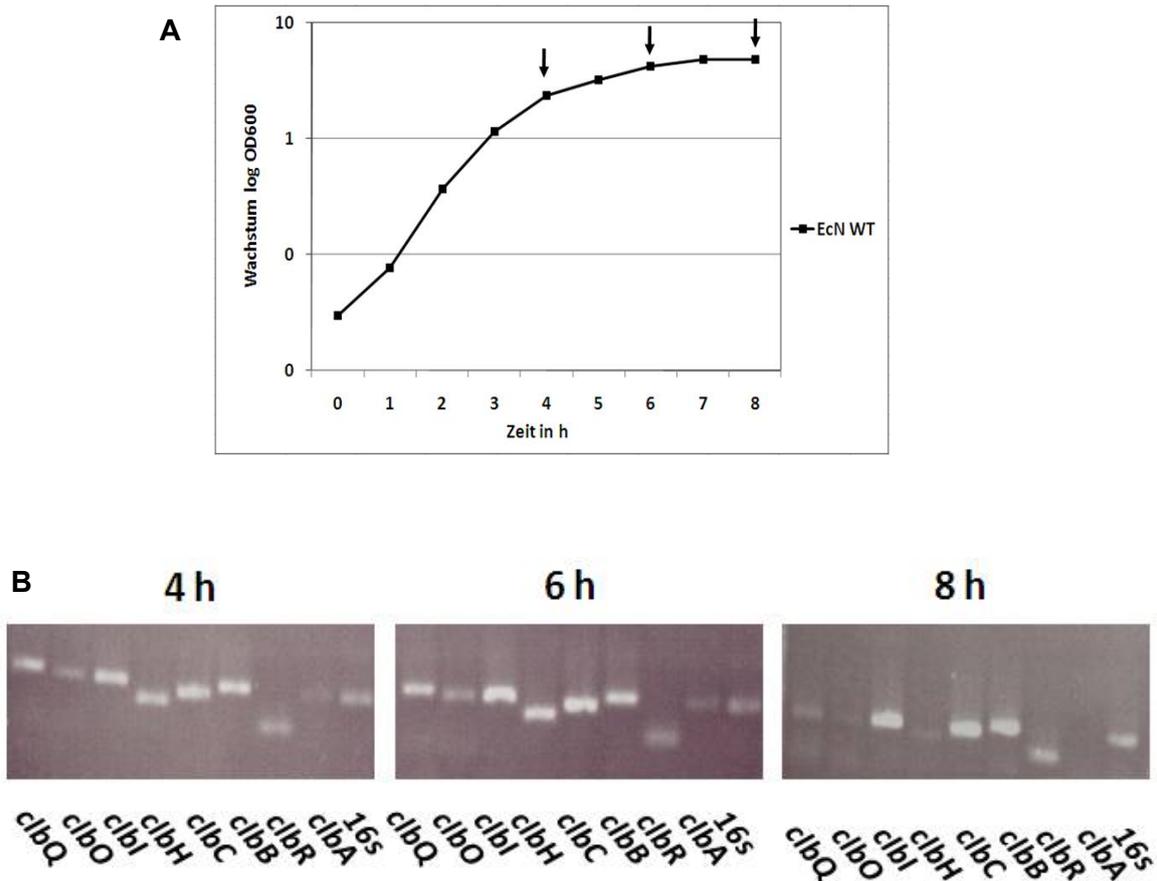


**Abb. 15:** Transkriptmengenvergleich durch RT-PCR-Analyse einzelner *clb*-Gene. Die verschiedenen *clb*-Transkriptmengen wurden 5 Minuten ( $t_5$ ) bzw. 10 Minuten ( $t_{10}$ ) nach Inhibierung der Transkription (A) bzw. der Ribosomen (B) bestimmt. Als zellulärer Standard wurde das Gen *rrnB* (16S rRNA) mitgeführt.

### 5.2.5 Bestimmung der Transkriptmengen einzelner *clb*-Gene in diskontinuierlicher Kultur

Zum Vergleich der Transkriptmengen der einzelnen *clb*-Gene im Wachstumsverlauf einer diskontinuierlichen Kultur wurde eine Übernachtskultur des Stammes *E. coli* Nissle 1917 in 25 ml M63 Minimalmedium überimpft und bei 37 °C unter Schütteln angezogen. Das Entnehmen der Proben für die spätere RNA-Isolierung erfolgte am Ende der exponentiellen, in der transienten und in der stationären Wachstumsphase, d.h. nach vier, sechs bzw. acht Stunden (Abbildung 16 A). Im Ergebnis der RT-PCR-Analyse zeigten sich die höchsten Transkriptmengen nach sechs Stunden, also in der transienten Phase des Wachstums. Eine deutliche Abnahme der Genexpression liess sich in der stationären Phase, nach acht Stunden, erkennen. Nach vier und sechs Stunden zeigten die Gene *clbQ*, *clbI*, *clbH*, *clbC* und *clbB* die stärkste Expression. Während dies auch nach acht Stunden für *clbI*, *clbC* und *clbB* zutraf, waren die Transkriptmengen von *clbQ* und *clbH* zu diesem Zeitpunkt stark vermindert. Sehr schwach wurden hingegen die Gene *clbO*, *clbR* und *clbA* in der exponentiellen und transienten Phase (vier bzw. sechs Stunden) transkribiert. Auch ihre Expressionsraten nahmen in der stationären Phase (acht Stunden) weiter ab bzw. waren im Fall von *clbA* nicht mehr nachweisbar.

## ERGEBNISSE



**Abb.16: Vergleichende Transkriptmengenanalyse verschiedener *clb* Gene im Verlauf des Wachstumskurve.** A: Wachstumsverlauf einer diskontinuierlichen Kultur von *E. coli* Nissle 1917 in M63-Minimalmedium bei 37 °C. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte der Probennahme; B: Signale der RT-PCR einzelner *clb*-Gene. Als zellulärer Standard wurde das Gen *rrnB* (16S rRNA) mitgeführt.

### 5.3 Regulationsmechanismen der Colibactin-Biosynthese

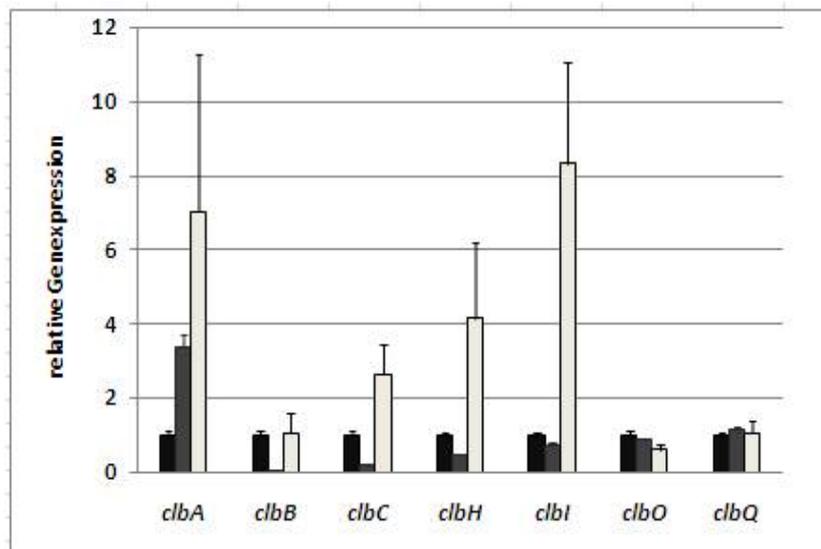
#### 5.3.1 Rolle von *clbR* bei der Expression der strukturellen Gene des Colibactin-Clusters

Es ist bekannt, dass die Expression vieler Sekundärmetabolit-Gencluster einer positiven Kontrolle unterliegt. In den meisten Fällen findet sich ein spezifischer positiver Regulator, der vom entsprechenden Sekundärmetabolit-Gencluster kodiert wird. Im Fall von Colibactin wurde innerhalb des Genclusters ein Gen für einen putativen Regulator identifiziert. Das Produkt des Genes *clbR* besitzt Ähnlichkeiten mit der DNA-bindenden HTH-Domäne (*helix-turn-helix*) des LuxR-Proteins aus *Vibrio sp.*. Obwohl dem Protein die übliche Domäne zur Bindung von *autoinducer*-Molekülen fehlt, ist eine regulatorische Funktion von ClbR nicht auszuschliessen.

Eine Beeinflussung der Expression einzelner *clb*-Gene durch das mögliche regulatorische Protein ClbR wurde anhand der Stämme *E. coli* Nissle 1917 und *E. coli* Nissle 1917  $\Delta clbR$

## ERGEBNISSE

überprüft, die sich nur hinsichtlich des Vorhandenseins des putativen Regulators unterschieden. Zu diesem Zweck wurden die Stämme fünf Stunden in M63-Minimalmedium bei 37 °C kultiviert und dann daraus die RNA extrahiert. Anschliessend wurden die Expressionsraten einzelner Gene des Colibactinclusters der beiden Bakterienstämme mittels qRT-PCR ermittelt und verglichen. Im Ergebnis dieses Experimentes zeigten sich bei einer Deletion von *clbR* im Stamm *E. coli* Nissle 1917 stark verminderte Transkriptionsraten für einen Grossteil der strukturellen Colibactin-Gene. Besonders die Expression von *clbB*, *clbC* und *clbH* war in Abwesenheit von ClbR stark beeinträchtigt. Die Transkriptmengen von *clbH* und *clbC* betragen nur noch 50 % bzw. 20 % verglichen mit dem Wildtyp und die Transkription von *clbB* kam fast vollständig zum Erliegen. Eine Ausnahme bildete das Gen *clbA*, das im *clbR*-negativen Stammhintergrund erhöhte Expressionsraten aufwies. Einzig unbeeinflusst von der Anwesenheit von ClbR zeigten sich die Expressionsraten der Gene *clbQ* und *clbO*, welche für eine Thioesterase bzw. eine putative Polyketidsynthase kodieren. Durch erneutes Einbringen des putativen Regulatorgens *clbR* in den Stamm *E. coli* Nissle 1917  $\Delta clbR$  wurde die geringe Expression der Gene wieder in der *clbR*-Deletionsmutante aufgehoben (Abbildung 17).



**Abb. 17:** Vergleich der Transkriptionslevel einzelner Gene des Colibactin-Genclusters von *E. coli* Nissle1917 in Abhängigkeit von *clbR*. Als zellulärer Standard wurden die Gene *gyrA* (DNA Gyrase) und *recA* mitgeführt. ( ■ *E. coli* Nissle 1917 WT ■ *E. coli* Nissle 1917  $\Delta clbR$  □ *E. coli* Nissle 1917  $\Delta clbR$  pBAD::*clbR*)

### 5.3.2 Rolle von H-NS bei der Expression der strukturellen Gene des Colibactin-Clusters

H-NS, ein globaler transkriptioneller Regulator in *Enterobacteriaceae*, spielt u. a. eine wichtige Rolle bei der Repression der Transkription „fremder“ DNA. Da das Colibactin-Gencluster mehrere Charakteristika einer horizontal erworbenen genomischen Insel aufweist (PUTZE, 2009), wurde der Einfluss von H-NS auf die Expression einzelner *clb*-Gene überprüft.

Die Expression der Gene wurde mit Hilfe der Stämme *E. coli* IHE3034 und *E. coli* IHE3034  $\Delta hns$  überprüft. Nach vierstündiger Kultivierung bei 37 °C in LB-Medium erfolgte die Probenahme mit anschliessender Extraktion der RNA. Die Expression der Gene des Colibactin-Genclusters wurde durch qRT-PCR ermittelt. Auf diese Weise konnte festgestellt werden, dass eine Deletion von *hns* zu 4-8 fach höheren Expressionsraten der *clb*-Gene führte. Einzige Ausnahme bildete *clbQ*, dessen Transkriptionsniveau im Vergleich von *E. coli* IHE3034 und seiner *hns*-negativen Mutante keine Unterschiede aufwies.

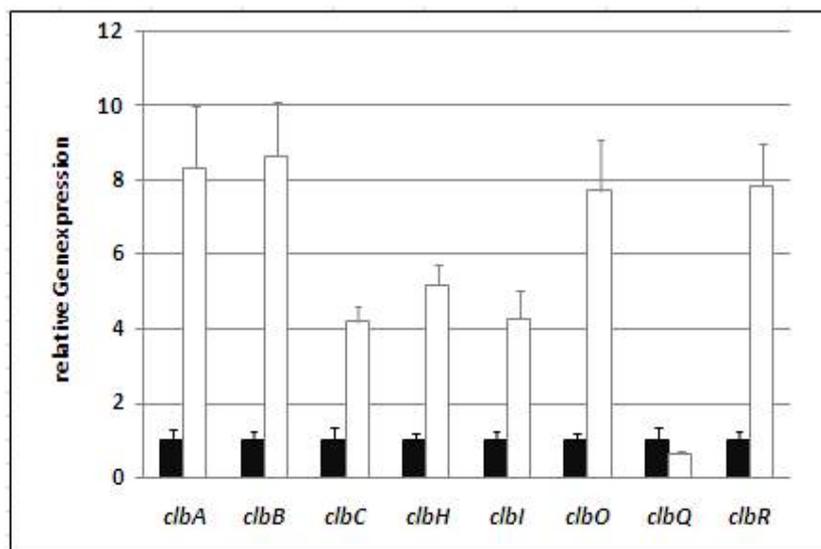
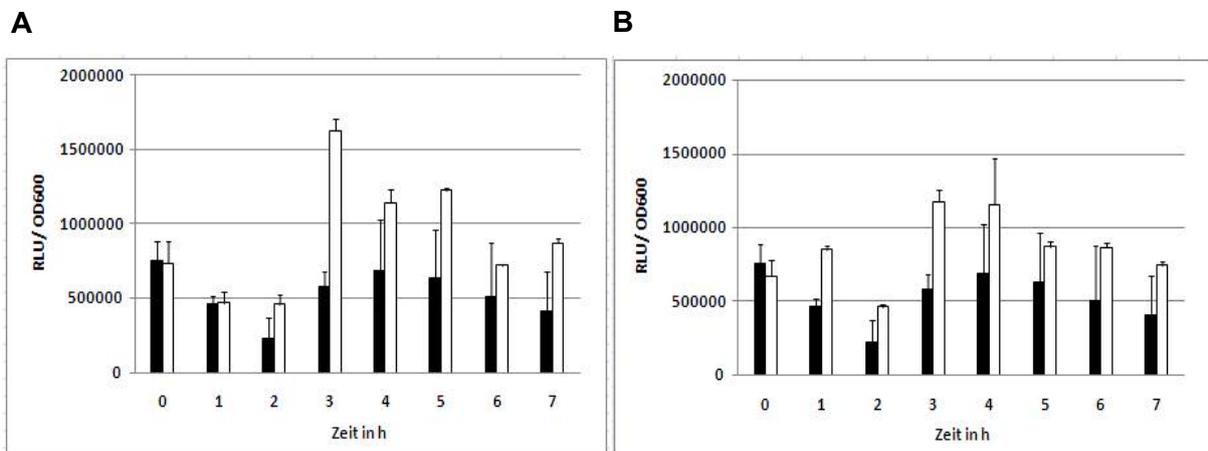


Abb. 18: Vergleich der Transkriptionslevel einzelner Gene des Colibactin-Genclusters von *E. coli* IHE3034 in Abhängigkeit von *hns*. Als zellulärer Standard wurden die Gene *gyrA* (DNA Gyrase) und *recA* mitgeführt. ( ■ *E. coli* IHE3034 WT □ *E. coli* IHE 3034  $\Delta hns$ )

### 5.3.3 Untersuchung der Transkription des Colibactin-Genclusters unter verschiedenen Bedingungen

Bei der weiteren Charakterisierung des PKS/NRPS-Genclusters war die Untersuchung der Beeinflussung der Genexpression unter verschiedenen Bedingungen von grossem Interesse, weil dadurch Rückschlüsse auf mögliche Regulationsmechanismen, denen die Synthese unterliegt, gezogen werden können.

**Einfluss von Sauerstoff auf die Transkription des *clb*-Genclusters:** Aufgrund des Vorkommens von putativen Bindestellen der Transkriptionsfaktoren ArcA und NarL (5.1.3), die als Regulatoren unter anoxischen Bedingungen fungieren, sollte eine Beeinflussung der Expression der *clb*-Gene durch die An- bzw. Abwesenheit von Sauerstoff untersucht werden. Hierzu wurde der Reporter-gen-Stamm *E. coli* Nissle 1960::*lux* in LB schüttelnd und statisch bei 37 °C angezogen. Zusätzlich erfolgte eine Kultivierung unter anaeroben Bedingungen in Müller- und Krempel-Flaschen (Bülach, Schweiz). Es wurden Wachstumskurven über einen Zeitraum von 7 Stunden aufgenommen und parallel dazu die Luziferaseaktivität in Form von relativen Lichteinheiten (RLU) mit einem Luminometer gemessen. Die Lichteinheiten wurden jeweils auf eine OD600 = 1 umgerechnet, um ein OD-unabhängiges Mass für die Expression zu erhalten. Die Messungen wurden dreimal wiederholt. Sie ergaben jeweils gleiche Relationen zwischen den Promotoraktivitäten von *clbA* unter den getesteten Bedingungen. Der Verlauf der RLU-Kurven unter den verschiedenen Sauerstoffbedingungen war ähnlich. Nach dem Erreichen eines Maximums nach drei Stunden erfolgte jeweils eine kontinuierliche Abnahme der RLU. Weiterhin zeigte sich, dass bei einer Kultivierung des Reporter-gen-Stammes ohne Schütteln erheblich höhere Luziferaseaktivitäten gemessen werden konnten, als bei den anderen getesteten Kultivierungsbedingungen. Im Vergleich mit der Kultivierung von *EcN* 1960::*lux* unter Schütteln bzw. anaeroben Bedingungen wurden in der statischen Kultur teilweise bis zu 2,8-fach bzw. 1,3-fach erhöhte Luziferaseaktivitäten gemessen.



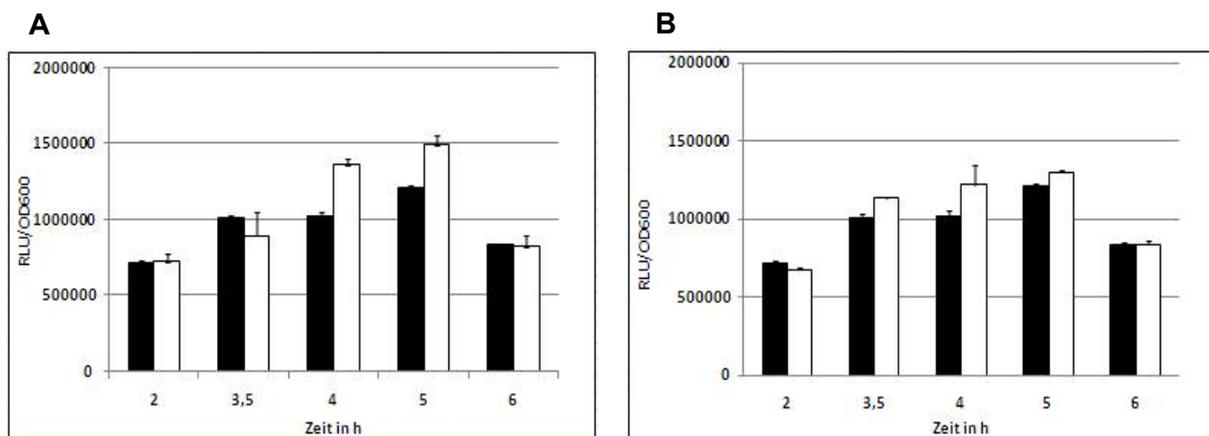
**Abb. 19: Transkriptionsniveaus von *clbA* bei Anzucht in LB unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen.** Die relativen Lichteinheiten (RLU/OD) repräsentieren die Transkriptionsaktivität der entsprechenden Gene über die Zeit. A: *E. coli* Nissle 1960::*lux* schüttelnd, statisch; B: *E. coli* Nissle 1960::*lux* schüttelnd, anaerob. ( ■ *E. coli* Nissle 1960::*lux* schüttelnd □ *E. coli* Nissle 1960::*lux* statisch)

**Einfluss der Verfügbarkeit von Aminosäuren auf die Transkription des *clb*-Genclusters:** Die Substrate für die Synthese von Nichtribosomalen Peptiden werden zum

## ERGEBNISSE

Teil aus dem Aminosäuremetabolismus bezogen. Darüber hinaus konnte in einigen Fällen eine Beeinflussung der Polyketidsynthese in Gegenwart bestimmter Aminosäuren beobachtet werden. Um zu prüfen, ob im Fall von Colibactin eine Beeinflussung der Biosynthese durch bestimmte Aminosäure-Substrate vorliegt, wurde der Reporter-gen-Stamm *E. coli* Nissle 1960::*lux* in M63 Minimalmedium schüttelnd, bei 37 °C, in Gegenwart verschiedener Aminosäuren angezogen. Getestet wurden Tryptophan (1mM), Indol (0,5 mM, 1 mM), Anthranilat (0,5 mM, 1 mM), Glutamin (10 mM), Cystein (0,1 mM), Serin (0,1 mM) und Methionin (2 mM). Um Unterschiede im Wachstum zu vermeiden, wurden die Aminosäuren erst drei Stunden nach Inokulation der Hauptkultur zugesetzt. Es wurden Wachstumskurven über einen Zeitraum von sechs bis sieben Stunden aufgenommen und parallel dazu die Luziferaseaktivität in Form von relativen Lichteinheiten (RLU) mit einem Luminometer gemessen. Die Lichteinheiten wurden jeweils auf eine OD600 = 1 umgerechnet, um ein OD-unabhängiges Mass für die Expression zu erhalten.

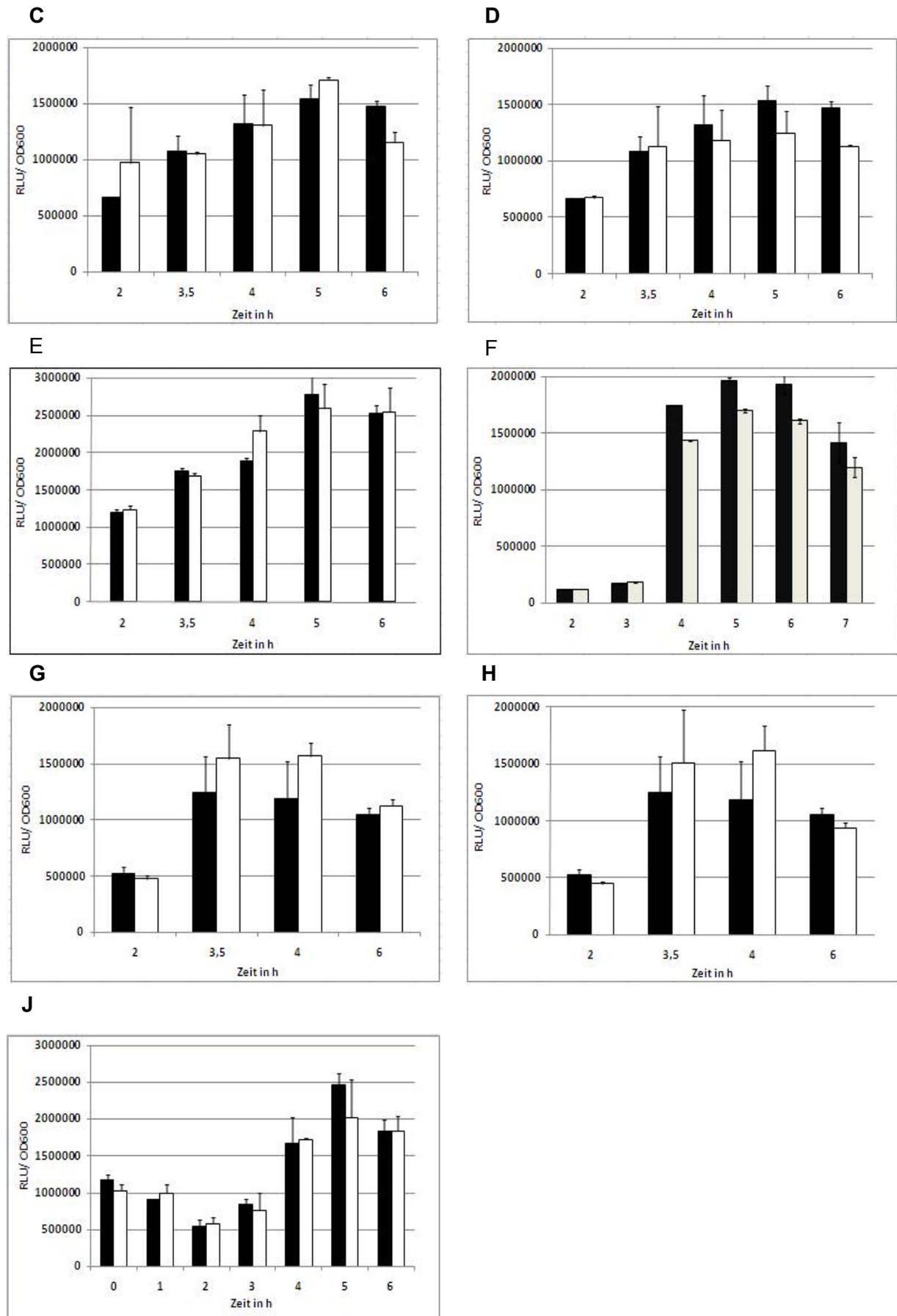
Der Verlauf der RLU-Kurven in Gegenwart der verschiedenen Aminosäuren war ähnlich. Nach dem Erreichen eines Maximums nach vier bis fünf Stunden erfolgte jeweils eine kontinuierliche Abnahme der RLU. Beim Grossteil der getesteten Aminosäuren konnten keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression beobachtet werden. Einzig eine Kultivierung des Stammes in Gegenwart von 0,5 mM Indol und 10 mM Glutamin schienen einen geringen Einfluss auf Expression auszuüben. Während in Anwesenheit von Indol 1,3-fach höhere Luziferaseaktivitäten gemessen wurden, schien sich die Zugabe von Glutamin sich auf die Genexpression auszuwirken. In Gegenwart von Glutamin lagen die Messwerte z.T. ca. 20 % unter denen der Kontrolle.



**Abb. 20: Transkriptionsniveau von *clbA* nach Anzucht in M63 Minimalmedium unter Zugabe verschiedener Aminosäuren.** Die relativen Lichteinheiten (RLU/OD) repräsentieren die Promotoraktivität von *clbA* über die Zeit. A: Indol (0,5 mM); B: Anthranilat (0,5 mM); C: Indol (1 mM); D: Anthranilat (1 mM); E: Tryptophan (1 mM); F: Glutamin (10 mM); G: Cystein (0,1 mM); H: Serin (0,1 mM); J: Methionin (2 mM). ( ■ *E. coli* Nissle 1960::*lux* □ *E. coli* Nissle 1960::*lux* + Aminosäure)

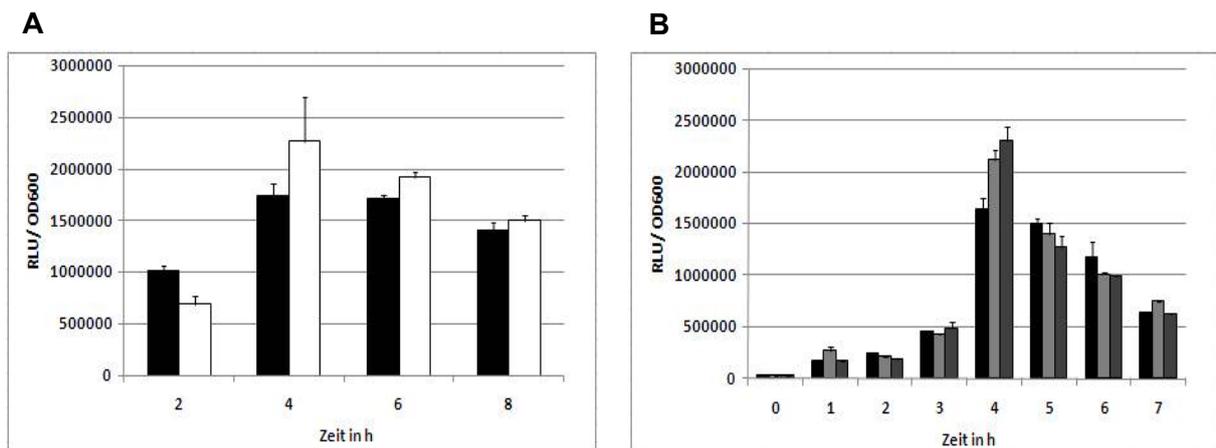
ERGEBNISSE

Abb. 20: Fortsetzung



**Einfluss der Verfügbarkeit von Fettsäuren auf die Transkription des *clb*-Genclusters:**

Die Mechanismen der Biosynthese von Polyketiden und Fettsäuren ähneln sich prinzipiell. In beiden Fällen sind die Makrolide aus einfachen Carbonsäuren (Acyl-CoA-Derivate) aufgebaut (SMITH & TSAI, 2007). Um zu prüfen, ob im Fall von Colibactin eine Beeinflussung der Biosynthese durch die Abbauprodukte von Fettsäuren vorliegt, wurde der Stamm *E. coli* Nissle 1960::*lux* unter Zugabe eines Fettsäuregemisches (Olivenöl) bzw. Oleat ( $C_{18}H_{34}O_2$ ) in M63-Minimalmedium schüttelnd, bei 37 °C kultiviert. Der Verlauf der RLU-Kurven in Gegenwart des Fettsäuregemisches und des Oleats war ähnlich. Nach dem Erreichen eines Maximums nach vier Stunden erfolgte eine kontinuierliche Abnahme der RLU. Bei Zugabe von 0,04 % (v/v) Olivenöl zur Bakterienkultur konnte eine leicht erhöhte Expression von *clbA* verzeichnet werden. Bei Kultivierung des Stammes in Gegenwart von 0,05 mM bzw. 0,4 mM Oleat war die Expression von *clbA* ebenfalls leicht erhöht. Die maximalen Luziferaseaktivitäten wurden nach vier Stunden gemessen und lagen ca. 22 % bzw. 28 % über denen des Kontrollstammes.



**Abb. 21: Promotoraktivität von *clbA* bei Anzucht in M63 Minimalmedium unter Zugabe von Fettsäuren.** Die relativen Lichteinheiten (RLU/OD) repräsentieren die Transkriptionsaktivität von *clbA* über die Zeit. A: Olivenöl (Firma); B: Oleat. ( ■ *E. coli* Nissle 1960::*lux* □ *E. coli* Nissle 1960::*lux* +0,04% Olivenöl ▒ *E. coli* Nissle 1960::*lux* 0,05 mM Oleat ▓ *E. coli* Nissle 1960::*lux* 0,4 mM Oleat)

## 5.4 Untersuchungen zum Einfluss des Colibactin-Genclusters auf den Gesamt-Metabolismus von *E.coli* Nissle 1917 mittels Proteom- und Transkriptom-Analyse

### 5.4.1 Vergleich des zytoplasmatischen Proteoms der *E. coli* Stämme Nissle 1917 und Nissle 1917 $\Delta$ PKS

Um den Einfluss der Deletion des kompletten Polyketid-Genclusters auf das zytoplasmatische Proteom von *E. coli* Nissle 1917 zu untersuchen, wurden Proben vom Wildtyp und der Deletionsmutante *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS in der stationären Phase präpariert. Die Proteinproben wurden mittels 2-D Gelelektrophorese über einen pH Bereich von pH 3 bis 10 aufgetrennt. Anschliessend wurden die resultierenden 2-D Gele einer LavaPurple<sup>TM</sup>-Färbung unterzogen, per Phosphoimager eingescannt und mittels der Delta 2-D Software (Decodon, Greifswald, Deutschland) ausgewertet. Im Anschluss an die Analyse wurden deregulierte Proteine mittels Massenspektrometrie identifiziert. Sowohl die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine als auch die massenspektrometrische Identifizierung der Proteinspots wurde in Kooperation mit dem Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie, unter Anleitung von Prof. M. Hecker und Dr. B. Voigt, in Greifswald durchgeführt.

Die Experimente zeigten einen deutlichen Unterschied auf zytoplasmatischer Proteomebene zwischen dem *E.coli* Stamm Nissle 1917 und der *clb*-Operon Deletionsmutante *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS. Insgesamt konnten etwa 201 Proteinspots im pH Bereich 3 bis 10 lokalisiert werden (Abbildung 22 und 23). Von diesen Proteinspots konnten bei massenspektrometrischen Analysen 77 verschiedene Proteine identifiziert werden. Von diesen tauchten 11 Proteine in mehr als einem Spot auf, vermutlich aufgrund von Variationen im *pI* oder in der Molekülmasse.

Die im Vergleich des *E. coli* Stammes Nissle 1917 und seiner Mutante *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS deregulierten Proteine liessen sich entsprechend ihres Verhaltens bezüglich der Deletion des Polyketid-Genclusters in Gruppen einteilen (Abbildung 22). Die gesamte Liste der identifizierten Proteine ist im Anhang A.5 dargestellt (Tabelle 15 und 16). 19 der identifizierten Proteine zeigten höhere Expressionsraten im Wildtyp, wohingegen 58 der Proteine stärker in der Colibactin-negativen Mutante exprimiert wurden.

Die grössten Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante im zytoplasmatischen Proteom konnten zum einen im Aminosäuremetabolismus festgestellt werden. Zum überwiegenden Teil handelte es sich bei entsprechend deregulierten Proteinen um Enzyme der Tryptophan-, Tyrosin- und Phenylalanin-Biosynthese (TrpA, TrpCF, TrpD, TrpE, MetE), die höhere Expressionsraten in der Mutante aufwiesen. Zudem wurden auch Enzyme des Glutamat-, Valin-, Leucin- und Isoleucin-Metabolismus in der Mutante stärker exprimiert. Zum anderen

## ERGEBNISSE

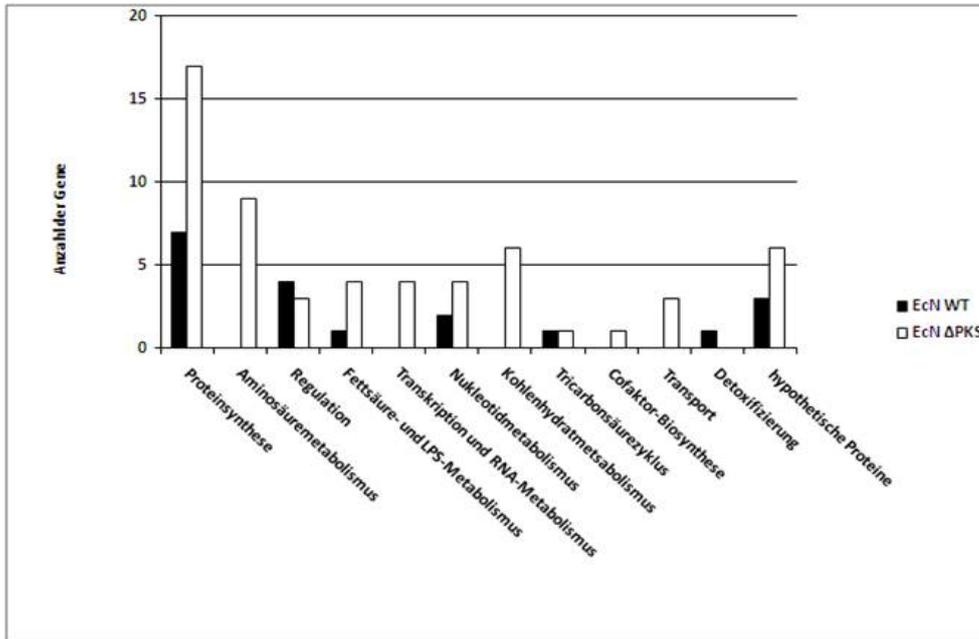
traten beträchtliche Unterschiede in der Proteinmenge von Bestandteilen des Translationsapparates auf. Hier konnte eine unterschiedlich starke Expression verschiedener ribosomaler Proteine und Elongationsfaktoren beobachtet werden.

Darüber hinaus wurde im Colibactin produzierenden Stamm *E. coli* Nissle 1917 das Protein DksA in zwei Proteinspots identifiziert. Die Expressionsraten dieses Proteins war 3,9- bzw. 2,04-fach erhöht im Vergleich zur Mutante. Bei DksA handelt es sich um einen RNA-Polymerase-bindenden Transkriptionsfaktor, der u.a. auch eine Funktion bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen erfüllt.

Weiterhin konnten in der Colibactin-negativen Mutante erhöhte Expressionslevel von Proteinen nachgewiesen werden, die in den Kohlenhydratmetabolismus involviert sind. Darunter Enzyme der Glykolyse und des Pyruvatmetabolismus, sowie PtsI, die Kinase des Phosphotransferasesystems. Diese Daten deuten auf mögliche Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante hinsichtlich des Energiestatus hin.

Darüber hinaus konnte eine erhöhte Menge der Inosin-5'-Monophosphat (IMP) Dehydrogenase GuaB im zytoplasmatischen Proteom des Wildtyp-Stammes nachgewiesen werden. GuaB katalysiert die Umwandlung von IMP zu Xanthosine-5'-Phosphat (XMP). Hingegen lag in der Mutante die GMP-Synthetase GuaA, welche die Synthese von GMP zu XMP katalysiert, in höheren Konzentrationen vor. Diese Beobachtungen weisen möglicherweise auf Veränderungen in der Nukleotid-Interkonversion hin. Ein weiterer interessanter Unterschied konnte in der Gruppe der regulatorischen Proteine beobachtet werden. So lagen die S-Ribosylhomocysteinylase LuxS und der Response Regulator PhoP in der Mutante in erhöhten Mengen vor. Während im Wildtyp-Stamm eine 2,5-fach höhere Expressionsrate beim Regulator YeiE beobachtet werden konnte. Zusammen mit LysP reguliert YeiE die Synthese von Piperinsäure, einer nicht-proteinogenen Aminosäure, die als Baustein für verschiedene mikrobielle und pflanzliche Sekundärmetabolite dient.

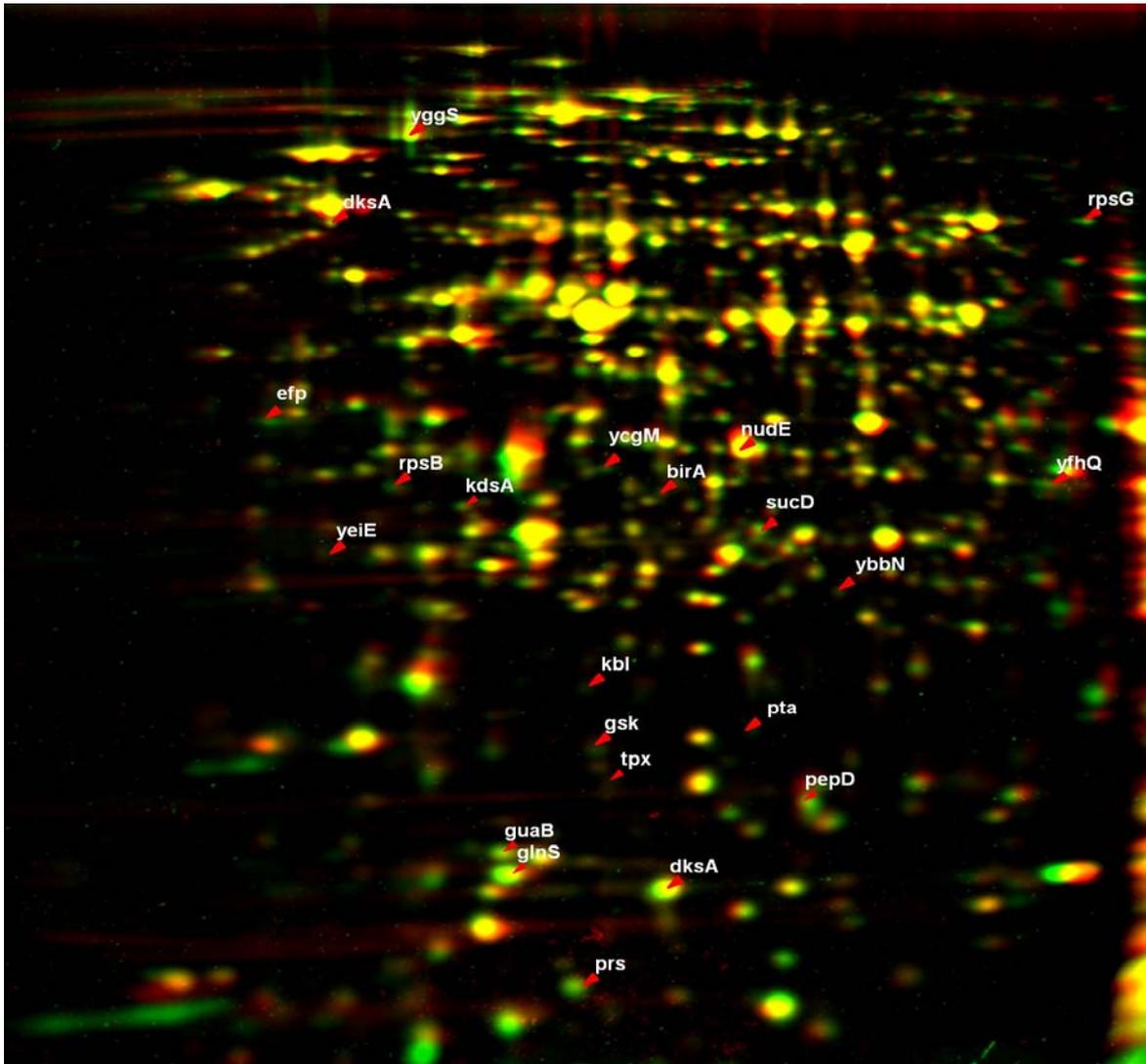
## ERGEBNISSE



**Abb. 22: Vergleich unterschiedlich exprimierter Proteine des cytoplasmatischen Proteoms von *E. coli* Stamm Nissle 1917 in An- und Abwesenheit des Colibactin-Genclusters.** Zusammenfassendes Säulendiagramm der Gengruppen, die durch die Deletion des Polyketid-Genclusters in *E. coli* Nissle 1917 in ihrer Expression verändert wurden. Aufgrund der grossen Anzahl von Einzeldaten wurden diese nach ihren regulatorischen bzw. funktionalen Gruppen (Stoffwechsel oder Synthese) zusammengefasst. Die Einteilung der Gene anhand ihrer Funktion erfolgte in Übereinstimmung mit der KEGG Datenbank (<http://www.genome.jp/kegg>) und der Encyclopedia of *Escherichia coli* K-12 (<http://ecocyc.org>). Die detaillierten Daten der einzelnen Gene sind im Anhang in Tabelle A.3 und A.4 aufgelistet.



## ERGEBNISSE



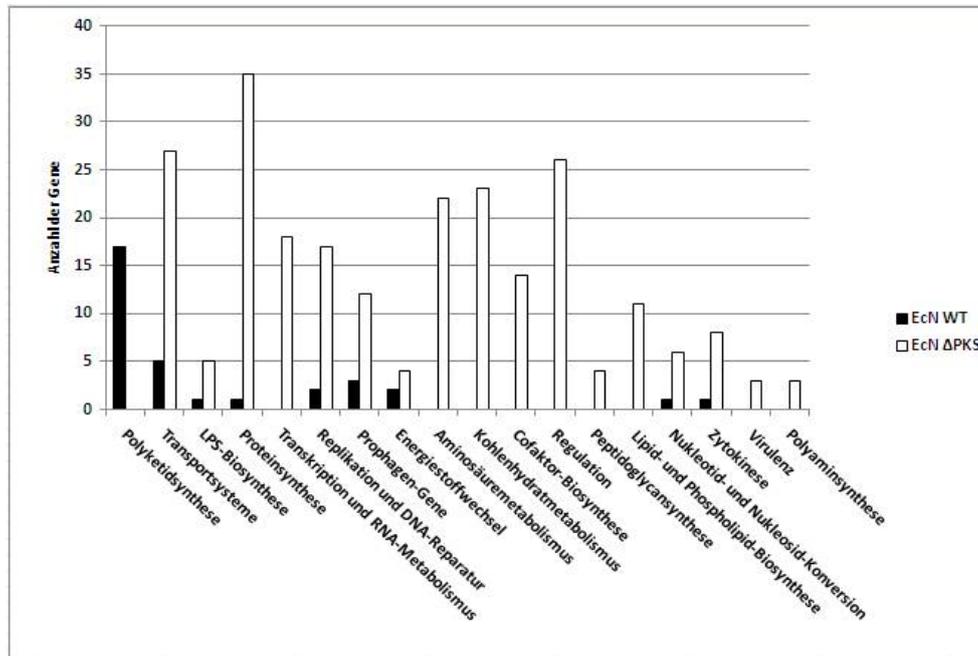
**Abb. 24:** Vergleich des zytosmatischen Proteoms von *E. coli* Nissle 1917 Wildtyp (grüner Kanal) und seiner *clb*-Operon Mutante (roter Kanal) als Falschfarbenbild. Die Proteine wurden mittels 2-D Gelelektrophorese im pH-Bereich 3 bis 10 aufgetrennt und mittels LavaPurple™ Färbung sichtbar gemacht. Proteine, die im *E. coli* Nissle 1917 Wildtyp in einer grösseren Menge vorkamen, erscheinen in grün, in der Mutante stärker exprimierte Proteine erscheinen in rot. Die per Massenspektrometrie identifizierten Proteine der Mutante sind durch Pfeile mit ihren gewöhnlichen Abkürzungen markiert und die korrespondierenden Daten im Anhang in Tabelle A.3 aufgeführt.

#### **5.4.2 Mikroarray-basierte vergleichende Transkriptom-Analyse von *E. coli* Nissle 1917 im Vergleich mit der Deletionsmutante *E. coli* Nissle 1917 $\Delta$ PKS**

Die vergleichende Transkriptom-Analyse per DNA-Mikroarray ermöglicht es, die Regulation zweier Stämme zu einem bestimmten Zeitpunkt in ihrer Gesamtheit und in ihren Unterschieden zu erfassen. Da die beobachteten Unterschiede im Bereich des zytoplasmatischen Proteoms den erwarteten Effekt einer Deletion des Polyketid-Genclusters in *E. coli* Nissle 1917 übertraf, erschien eine grundlegende Analyse auf Transkriptom-Ebene essentiell, um die Regulation besser interpretieren zu können. Dafür wurden RNA-Proben von *E. coli* Stamm Nissle 1917 und seiner Mutante *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS genommen. Der Probenzeitpunkt wurden dafür analog zu den zytoplasmatischen Proteom-Analysen in der stationären Phase gewählt und die RNA gemäss dem RNeasy-Protokoll (Qiagen) präpariert. Im Vergleich des *E. coli* Nissle 1917 Wildtyps und seiner Mutante *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS konnten insgesamt 374 Gene identifiziert werden, die differentiell reguliert wurden. Insgesamt 45 Gene wurden im Vergleich zur Mutante signifikant stärker im *E. coli* Nissle 1917 Wildtyp exprimiert. 329 Gene zeigten signifikant höhere Expressionslevel in der Deletions-Mutante *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS. Die deregulierten Gene lassen sich entsprechend ihres Verhaltens bezüglich der Deletion des Polyketid-Genclusters in Gruppen einteilen (Abbildung 25). Die vollständige Liste der differentiell regulierten Gene wird im Anhang A.6 in den Tabellen 17 und 18 wiedergegeben.

Die Transkriptom-Analyse per DNA-Mikroarray ermöglichte teilweise eine Verifizierung der zuvor mittels 2D-Gelelektrophorese erhaltenen Proteom-Daten. So konnte ebenfalls auf Transkriptomebene eine unterschiedliche Expression von Genen des Aminosäure- und des Kohlenhydratmetabolismus sowie der Proteinbiosynthese festgestellt werden, die bereits bei der Proteom-Analyse identifiziert wurden.

## ERGEBNISSE

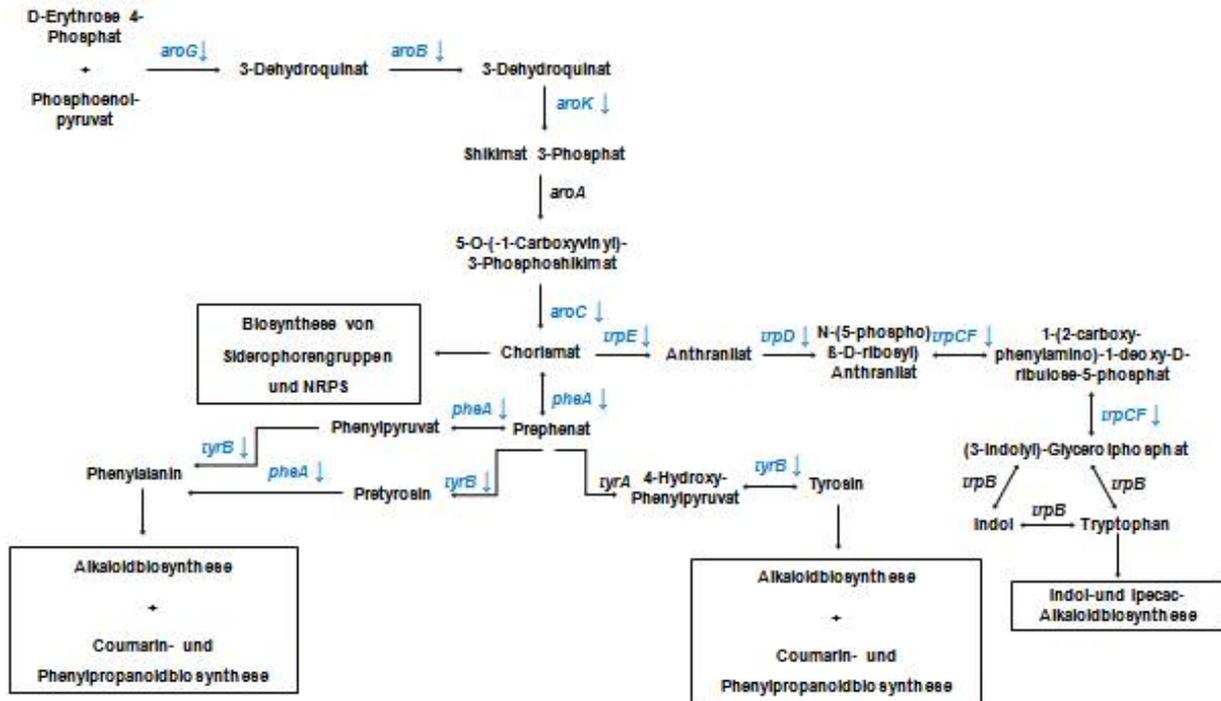


**Abb. 25:** Einfluss der Colibactinexpression auf das Transkriptom des *E. coli* Stammes Nissle 1917. Das zusammenfassende Säulendiagramm beinhaltet die Gengruppen, die durch die Deletion des Polyketid-Genclusters in *E. coli* Nissle 1917 in ihrer Expression verändert wurden. Aufgrund der grossen Anzahl von Einzeldaten wurden diese nach ihren regulatorischen bzw. funktionalen Gruppen (Stoffwechsel oder Synthese) zusammengefasst. Die Einteilung der Gene anhand ihrer Funktion erfolgte in Übereinstimmung mit der KEGG Datenbank (<http://www.genome.jp/kegg>) und der Encyclopedia of *Escherichia coli* K-12 (<http://ecocyc.org>). Die detaillierten Daten der einzelnen Gene sind im Anhang in Tabelle A.5 und A.6 aufgelistet.

### Veränderungen des Aminosäuremetabolismus

Im Vergleich der Stämme *E. coli* Nissle1917 und *E. coli* Nissle 1917 ΔPKS liess sich eine deutliche Beeinflussung der Expression von Genen erkennen, die in den Aminosäuremetabolismus involviert sind. So zeigte sich die Expression der betroffenen Gene im Colibactin exprimierenden Stamm um das 2- bis 3-fache reduziert. Zum überwiegenden Teil handelt es sich um Gene der Tryptophan-, Tyrosin- und Phenylalanin-Biosynthese, deren Genprodukte bereits teilweise in der Proteom-Analyse eine geringere Expression zeigten. Die verminderte Expression wurde sowohl sowohl für Gene der Chorismatsynthese (*aroG*, *aroB*, *aroK* und *aroC*), als auch für Gene beobachtet, die an der Synthese von Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin aus Chorismat beteiligt sind (*trpC*, *pheA*, *tyrB*, *trpE*). Aber auch die Gene der meisten anderen Aminosäurebiosynthesewege wurden in der Mutante stärker exprimiert: Histidin, Glutamat, Cystein, Arginin, Lysin, Glycin, Valin, Leucin und Isoleucin. Unter diesen Genen befand sich auch das für die putative

Arginin Dihydrolyase C5350 kodierende Gen, welches in der *pks*-Mutante eine 8-fach erhöhte Expression im Vergleich zum Wildtyp aufzeigte.

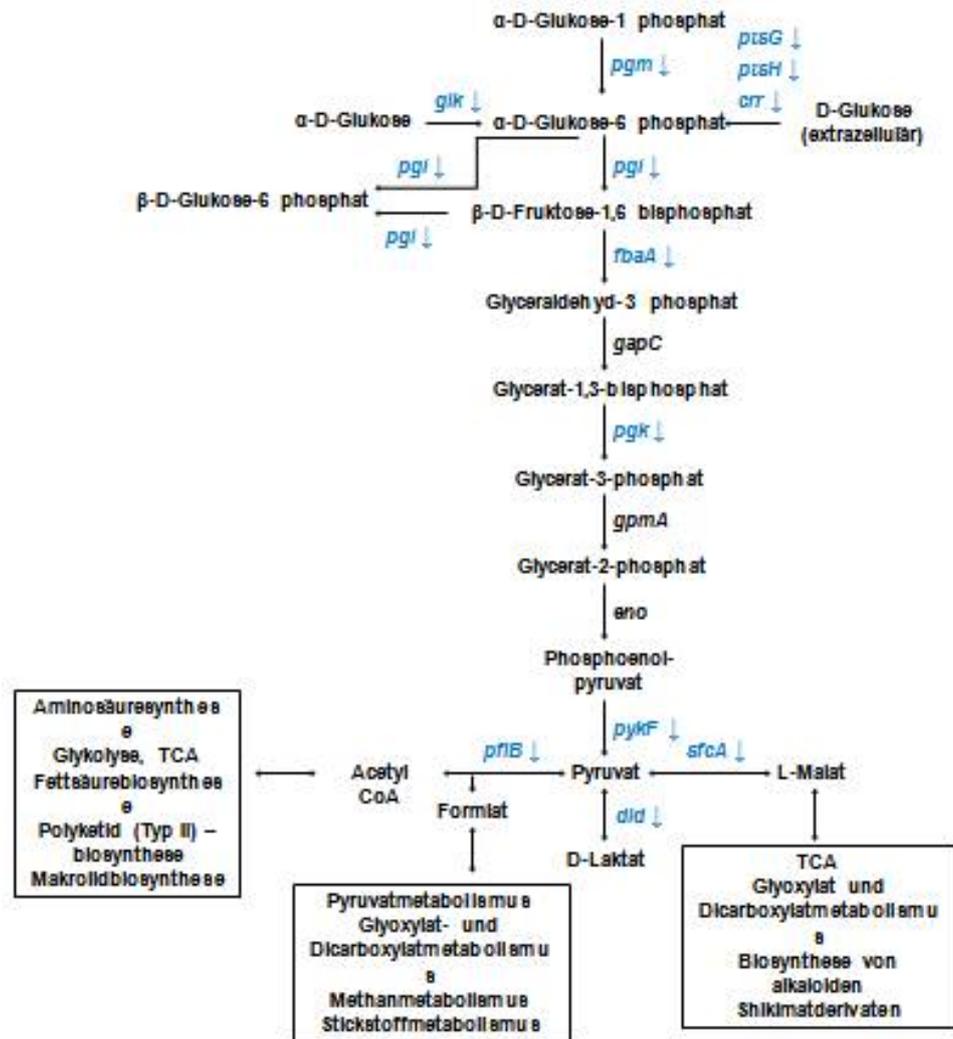


**Abb. 26:** Zusammenfassende Darstellung der deregulierten Gene der Tryptophan-, Tyrosin- und Phenylalanin-Biosynthese basierend auf der vergleichenden Transkriptom-Analyse von *E. coli* Nissle 1917 und *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS.

### Veränderungen im Kohlenhydratmetabolismus

Bereits die vergleichende Analyse des Proteoms von *E. coli* Nissle 1917 und *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS wies einige Unterschiede im Expressionsprofil bezüglich des Kohlenhydratmetabolismus auf. Weiterführend zeigte die Transkriptom-Analyse, dass die Anzahl der deregulierten Gene weit höher war als es die Analyse des Proteoms vermuten liess. So liess sich eine deutliche Beeinflussung der Expression von Genen erkennen, die in die Glykolyse und den Pyruvatmetabolismus involviert sind. Ein Grossteil der betroffenen Gene wies im Colibactin-produzierenden Stamm eine 2 bis 3-fach verringerte Expression auf (Abbildung 27). Zusätzlich wiesen Gene einiger zuckerspezifischer Transporter verminderte Transkriptionslevel auf, darunter die Komponenten des Glukose-spezifischen Phosphotransferasesystems.

## ERGEBNISSE



**Abb. 27:** Zusammenfassende Darstellung der deregulierten Gene der Glykolyse basierend auf der vergleichenden Transkriptom-Analyse von *E. coli* Nissle 1917 und *E. coli* Nissle 1917 ΔPKS.

### Veränderung der Zellwandbiosynthese

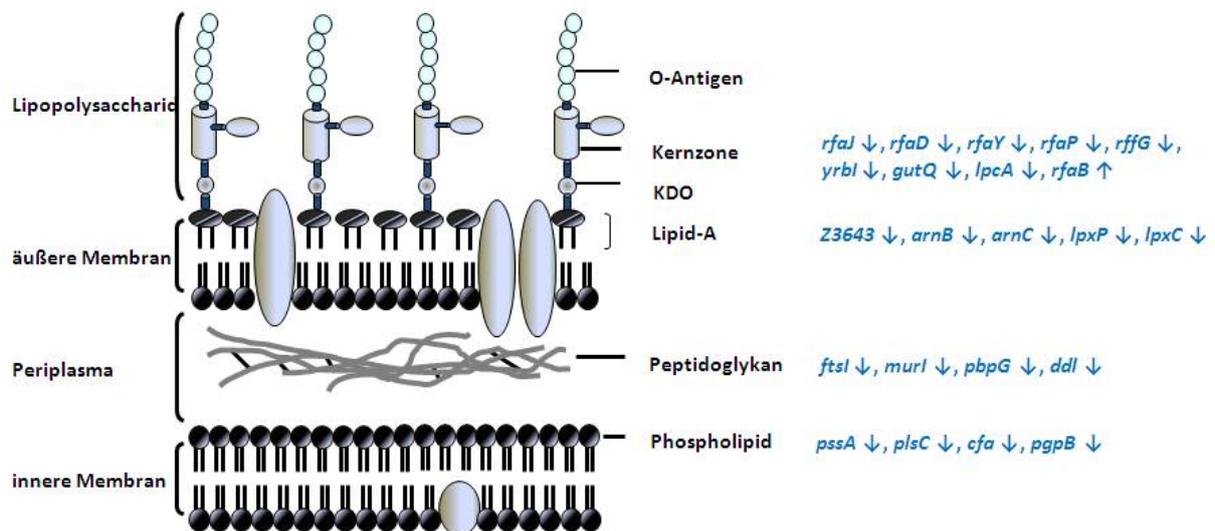
Auffällig bei der Betrachtung der Transkriptomdaten war auch die hohe Zahl an deregulierten Genen, die an der Zellwandbiosynthese beteiligt sind. Insgesamt wurden im Colibactin-negativen Stamm *E. coli* Nissle 1917 ΔPKS 21 entsprechende Gene identifiziert, die höhere Expressionsraten zeigten als im Wildtypstamm. Betroffen waren u.a. Gene der Peptidoglykan-, Phospholipid- und Lipid A-Biosynthese sowie der Lipopolysaccharid-Biosynthese (Abbildung 28).

Neben Veränderungen in der Expression von Genen grundlegender Bausteine der Zellmembran fanden sich grosse Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante auch hinsichtlich der Expression mehrerer Transporter/ Transportsysteme. Im Fall des Colibactin produzierenden Wildtyp-Stammes konnten fünf Gene identifiziert werden, deren Produkte eine Transportfunktion haben und die höhere Expressionsraten aufwiesen als in der

## ERGEBNISSE

Mutante. Unter diesen befand sich auch C5038. Den Informationen der KEGG SSDB (Sequence Similarity DataBase) entsprechend, weist C5038 Homologie zur Familie der Dct (C4-Dicarboxylat-Transport)-ähnlichen Transporter auf. Vertreter dieser Familie ermöglichen die Aufnahme von C4-Substraten wie z.B. Succinat, Fumarat oder Malat in die Bakterienzelle. Darüber hinaus konnte im Colibactin produzierenden Stamm *E. coli* Nissle 1917 eine 7-fach erniedrigte Expression eines Homologs von *c1273* festgestellt werden, welches für den Antigen 43-Vorläufer kodiert. Das Antigen 43-Protein wird einer Gruppe von Autotransportern zugeordnet, zu denen auch AIDA-I und TibA gehören. Die Expression von Antigen 43 vermittelt u.a. Autoaggregation von Bakterienzellen durch Zell-Zell-Wechselwirkung.

Darüber hinaus konnte eine 8-fach erhöhte Expression des Genes mit Homologie zu *ECs2214* im Colibactin-positiven *E. coli* Nissle 1917 festgestellt werden. Bei *ECs2214* handelt es sich um ein Protein, das Homologien zum Zellteilungs-Inhibitor DicB aufzeigt. Während der Zellteilung kontrolliert DicB durch Wechselwirkung mit dem Regulator MinC die Ausbildung der Septumbildung. Weiterhin fiel im Colibactin-negativen Stamm *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS die erhöhte Expression einer Gruppe von Genen auf die am Zellteilungsprozess beteiligt sind. Der Grossteil dieser Gene erfüllt dabei eine Funktion in der Septenbildung.

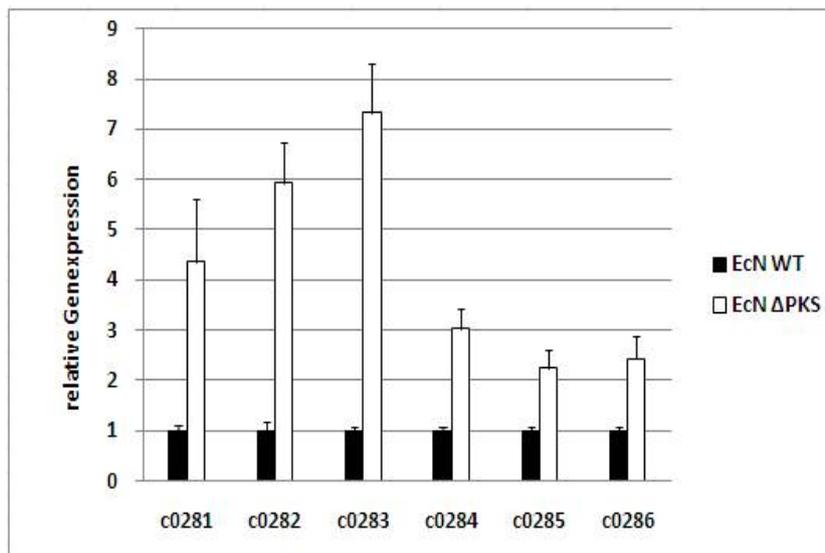


**Abb. 28:** Zusammenfassung der deregulierten Gene der Zellwandbiosynthese basierend auf der vergleichenden Transkriptom-Analyse von *E. coli* Nissle 1917 und *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS. Aufgeführt sind die deregulierten Gene in der schematischen Darstellung der Zellwand, neben den entsprechenden Komponenten, an deren Synthese sie beteiligt sind. Die Daten basieren ausschliesslich auf der vergleichenden Transkriptom-Analyse von *E. coli* Nissle 1917 und *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS.

### Veränderungen in der Expression hypothetischer Proteine

Neben den Unterschieden des Expressionsprofil bezüglich des Aminosäure- und Kohlenhydratmetabolismus sowie der Zellwandbiosynthese erbrachte die vergleichende Analyse des Transkriptom von *E. coli* Nissle 1917 und *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS weitere Unterschiede im Expressionsprofil einer Vielzahl von konservierten hypothetischen Genen. Darunter Gene, die aufgrund von Sequenzhomologien möglicherweise eine Funktion im Aminosäuremetabolismus, in der Lipopolysaccharid-Biosynthese oder bei der zellulären Stressantwort erfüllen.

Interessant erscheint vor allem eine Gruppe von Genen mit Homologie zu den Genen *c0283*, *c0284*, *c0285*, *c0286* und *c0287*, die im Vergleich mit dem Wildtyp-Stamm bis zu 8-fach erhöhte Transkriptmengen in der Colibactin-negativen Mutante aufwiesen. Die Gene kodieren ausnahmslos für Proteine mit unbekannter Funktion. Eine Untersuchung der Genexpression dieser Gene mittels quantitativer RT-PCR ermöglichte eine Verifizierung der Mikroarray-Daten (Abbildung 29). So zeigten sich auch hier deutlich erhöhte Transkriptionsmengen im Stamm *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS im Vergleich zum Wildtyp-Stamm.

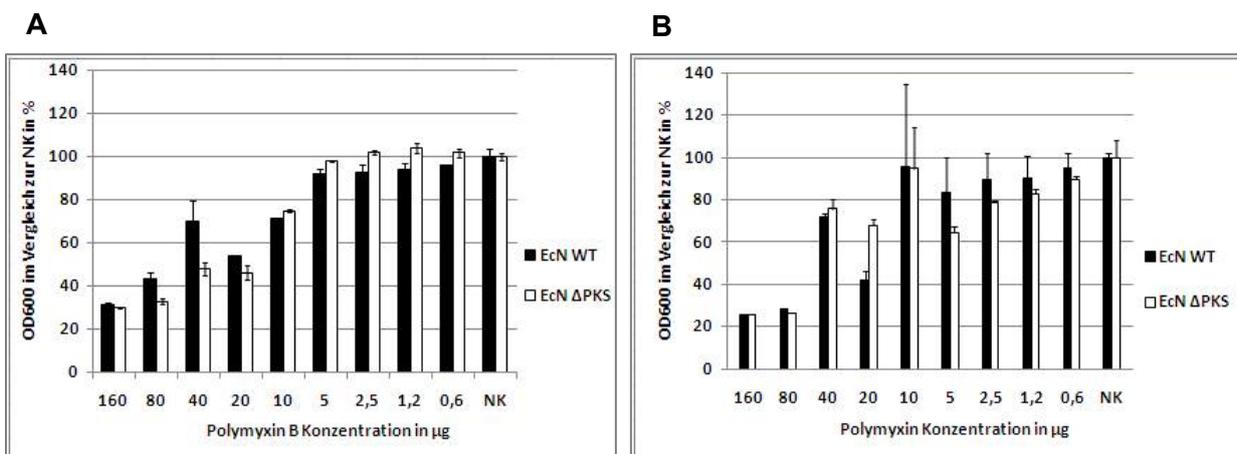


**Abb. 29:** Vergleich der Transkriptionslevel einzelner Gene von *E. coli* Nissle1917 und *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS mittels qRT-PCR. Als zellulärer Standard wurde das Gen *rrnB* (16S rRNA) mitgeführt.

## 5.5 Phänotypische Charakterisierung

### 5.5.1 Bestimmung der Minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK) von Polymyxin B

Bei der Analyse der Transkriptom-Daten fiel auch eine Gruppe von Genen auf, deren Expressionsraten im Colibactin produzierenden Wildtyp deutlich erniedrigt waren. Es handelt sich hierbei um Gene, deren Produkte eine Funktion in der Zellwand-Biosynthese erfüllen. Um einen ersten Eindruck über die Auswirkung dieser Deregulation zu gewinnen wurde eine Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration von Polymyxin B durchgeführt. Dieser Test sollte Aufschluss darüber geben, ob die veränderte Expression der Gene sich ebenfalls auf den Phänotyp auswirkt. Die bakterizide Wirkung von Polymyxin B richtet sich gegen Gram-negative Bakterien. Polymyxin B bindet Lipopolysaccharide (LPS) der äusseren Membran, wodurch die normale Anordnung der LPS gestört und die Durchlässigkeit der äusseren Membran erhöht wird. Dies führt schliesslich zu einer erleichterten Aufnahme von Polymyxin B in die Bakterienzelle. Veränderungen der Membran resultieren in einer erhöhten Sensitivität gegenüber Polymyxin B. Verglichen wurde das Wachstum der Stämme *E. coli* Nissle 1917 und *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS in einem Konzentrationsbereich von 160-06  $\mu$ g/ml Polymyxin B bei 30 °C bzw. 37 °C. Während der Kultivierung der beiden Bakterienstämme bei 30 °C bzw. 37 °C konnte eine Inhibierung des Wachstums bis zu einer Polymyxin B Konzentration von 10  $\mu$ g/ml bzw. 20  $\mu$ g/ml (Abbildung 30). Allerdings konnten bei der Anzucht der Stämme keine Unterschiede hinsichtlich der MHK von Polymyxin B beobachtet werden. Einzig die Tatsache, dass die Stämme eine höhere Sensitivität gegenüber Polymyxin B bei 30 °C aufwiesen, deutet auf eine höhere Effektivität des Antibiotikums bei niedrigeren Temperaturen hin.

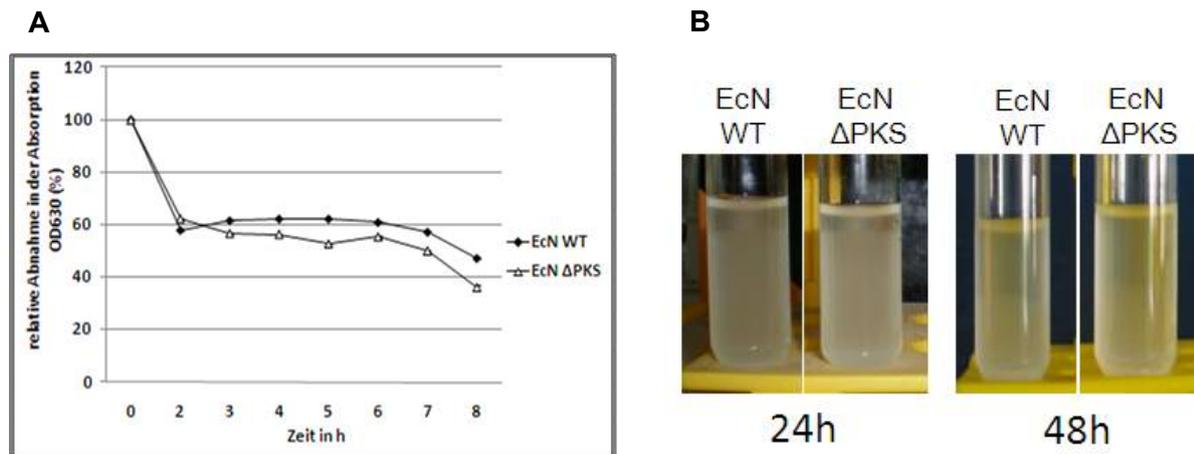


**Abb. 30: Bestimmung der Minimalen Hemmstoffkonzentration von Polymyxin B der *E. coli* Stämme Nissle 1917 und Nissle 1917  $\Delta$ PKS.** Quantifizierung des Wachstums durch Messung der optischen Dichte bei 550 nm. Die Kultivierung der Stämme erfolgte bei A: 30 °C; B: 37 °C

### 5.5.2 Biofilmbildung und Autoaggregation

Bei der vergleichenden Transkriptomanalyse des Colibactin produzierenden Stammes *E. coli* Nissle 1917 mit *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS zeigte sich eine 7-fach verringerte Expression eines Genes mit Homologie zu *c1273* bzw. *flu*, welches für das Antigen 43 kodiert. Antigen 43 wird einer Gruppe von Autotransportern zugeordnet, zu denen auch AIDA-I und TibA gehören. Da Antigen 43 nachweislich eine Rolle in der Autoaggregation und Biofilmbildung von *E. coli* spielt, erfolgte eine Überprüfung der Stämme *E. coli* Nissle1917 mit *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS hinsichtlich dieser Fähigkeiten.

Zu Beginn des Versuches liessen sich im Autoaggregations-Verhalten der beiden Stämme keine Unterschiede feststellen. Nach zwei Stunden zeigte sich aber ein schnelleres Absinken des Colibactin-negativen Stammes *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS (Abbildung 31 A). Im Vergleich mit dem Wildtyp-Stamm zeigte sich immer eine Differenz von 5-11% zum Stamm *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS. Ein vollständiges Absinken beider Stämme konnte aber auch nach 24 bzw. 48 Stunden nicht beobachtet werden (Abbildung 31 B).

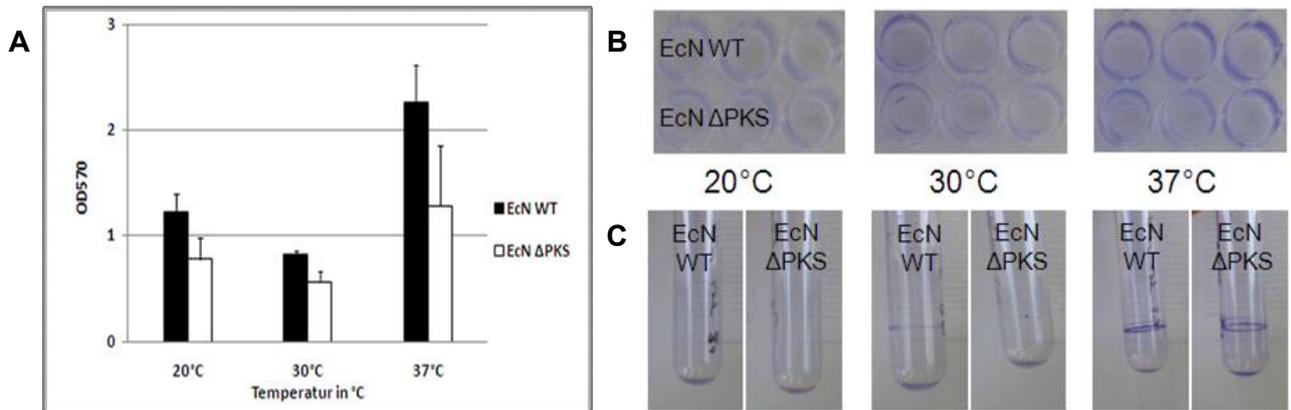


**Abb.31: Autoaggregationsverhalten von *E. coli* Nissle 1917 und *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS . A:** Quantifizierung der Autoaggregation durch Messung der optischen Dichte (OD600); B: Kulturen von *E. coli* Nissle 1917 und *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS nach 24 bzw. 48 h Inkubation bei RT

Eine konventionelle Analyse der Fähigkeit zur Biofilmbildung der Stämme *E. coli* Nissle 1917 und *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS erfolgte mittels Kultivierung in 96-well-Mikrotiterplatten bei 20 °C, 30 ° und 37 °C für 48 Stunden und anschliessender Färbung mit Kristallviolett (Abbildung 32 B). Signifikante Unterschiede in der Biofilmbildung der beiden Stämme konnten auf diese Weise nicht deutlich gezeigt werden (Abbildung 32 A). Hingegen zeigte eine 48-stündige Kultivierung der Bakterienstämme in Reagenzgläsern (stehend) bei 20 °C, 30 °C und 37 °C und anschliessender Färbung mit Kristallviolett (Abbildung 32 C) eine leicht erhöhte Biofilmbildung des Colibactin-positiven Stammes *E. coli* Nissle 1917 gegenüber

## ERGEBNISSE

*E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS bei 30 °C und 37 °C. Unter Berücksichtigung der in der Transkriptomanalyse erhaltenen stark verminderten Expressionsraten von *c1273* bzw. *flu*, welche für das Antigen 43 kodieren, ergibt sich allerdings ein Widerspruch zum phänotypischen Vergleich der beiden Stämme.

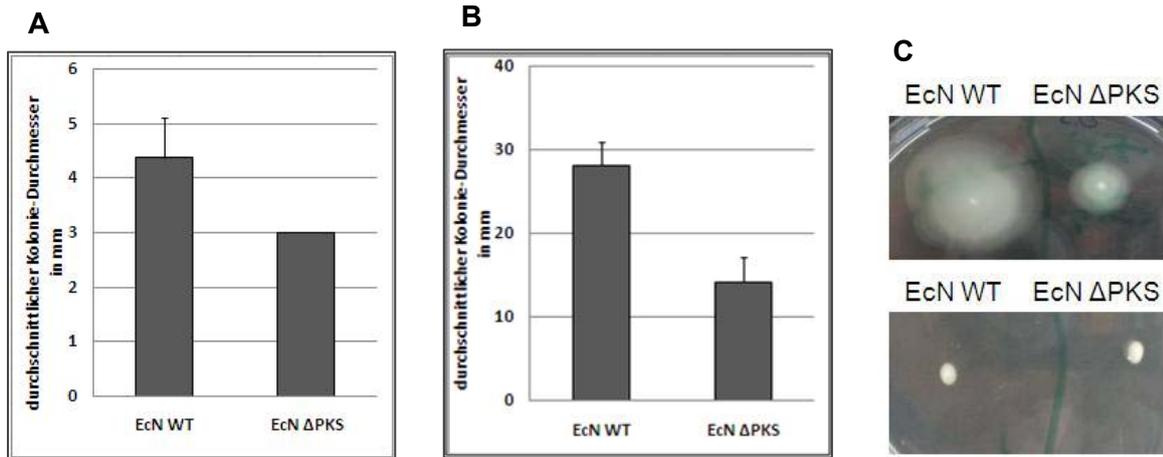


**Abb. 32:** Biofilmbildung von *E. coli* Nissle 1917 und *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS. A: graphische Darstellung der Biofilmbildung bei 20 °C, 30 °C und 37 °C (Kultivierung in 96-well-Mikrotiterplatten); B: Biofilmbildung in 96-well-Mikrotiterplatte; C: Biofilmbildung im Reagenzglas

### 5.5.3 Nachweis der Motilität

Bei der vergleichenden Transkriptomanalyse der Stämme *E. coli* Nissle 1917 und *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS zeigte sich im Wildtypstamm eine dreifach verminderte Expression der Gene *flhC* und *flhD*, welche für die Untereinheiten des Hauptregulators der bakteriellen Flagellum-Biogenese kodieren. In der Annahme, dass die verminderte Expression des Regulators FlhCD im Colibactin produzierenden *E. coli* Stamm Nissle 1917 sich auf die Flagellen-Biosynthese des Stammes auswirkt, wurde das Motilitätsverhalten der Stämme *E. coli* Nissle 1917 und *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS getestet. Zu diesem Zweck wurden Einzel-Kolonien der Bakterienstämme auf Schwimm- und Schwärm-Agar-Platten überimpft und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Im Vergleich mit dem Wildtypstamm zeigte der Colibactin-negative *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS auf Schwimm-Agar eine verringerte Motilität auf, was im Kontrast zu den erhaltenen Transkriptom-Daten steht. Hingegen wiesen die Stämme bei einer Kultivierung auf Schwärmagar ein ähnliches Motilitätsverhalten auf.

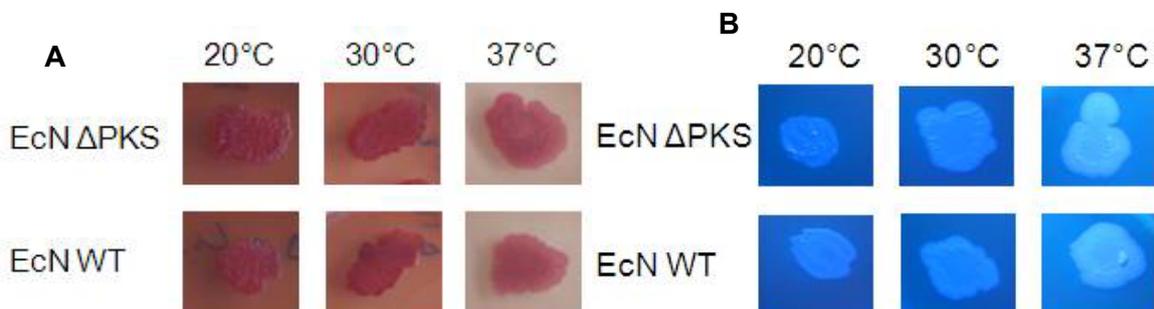
## ERGEBNISSE



**Abb.33: Schwimm- und Schwärm-Verhalten von *E. coli* Nissle 1917 und *E. coli* Nissle 1917 ΔPKS.** Graphische Darstellung der durchschnittlichen Kolonie-Durchmesser von *E. coli* Nissle1917 und *E. coli* Nissle 1917 ΔPKS; auf A: Schwimm-Agar (0,3 % [w/v]). und B: Schwärm-Agar (0,5 % [w/v]) C:Darstellung des Schwimm- (obere Abbildung) und Schwärmverhaltens (untere Abbildung).

### 5.5.4 Nachweis von Curli-Fimbrien und Zelluloseproduktion

Zur Überprüfung der Stämme *E. coli* Nissle 1917 und der Colibactin-negativen Mutante hinsichtlich der Fähigkeit Curli-Fimbrien auszubilden und Zellulose zu produzieren, wurden die beiden Stämme auf Kongorot-Agar bzw. auf Calcofluor-Agar bei 20 °C, 30 °C und 37 °C für 48 h kultiviert. Kommt es zur Ausprägung von Curli-Fimbrien bei den getesteten Stämmen, bilden sie entsprechend rote Kolonien auf Kongorot-Agar. Die Produktion von Zellulose kann mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Calcofluor nachgewiesen werden, da dieser Zellulose bindet und unter UV-Licht sichtbar gemacht werden kann. In Abbildung 34 ist zu erkennen, dass sowohl bei der Bildung der Curli-Fimbrien als auch in der Zellulose-Produktion keine Unterschiede zwischen *E. coli* Nissle 1917 und der Colibactin-negativen Mutante *E. coli* Nissle 1917 ΔPKS bestanden.

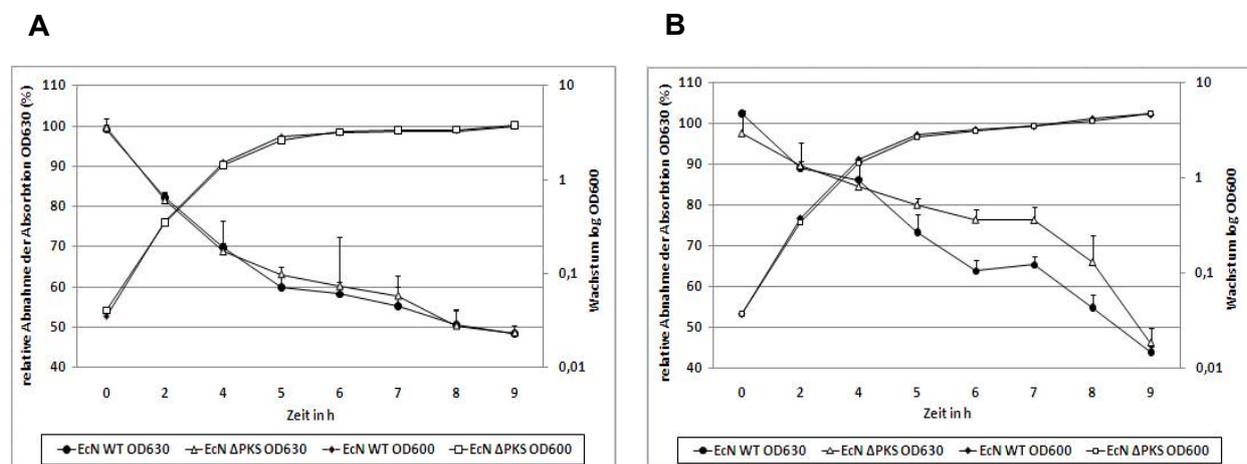


**Abb. 34:** Phänotyp von *E. coli* Nissle 1917 und *E. coli* Nissle 1917 ΔPKS auf Kongorot- und Calcofluor-Agar. A: Kongorot-Agar; B: Calcofluor-Agar 37 °C.

### 5.5.5 Eisenaufnahme

Eine Reihe von PK und NRP zählen wegen ihrer Fähigkeit Eisen (III)-Ionen zu binden zur Stoffgruppe der Siderophore. Aufgrund der niedrigen Bioverfügbarkeit von Eisen kann die Synthese solcher Komplexbildner die Fitness des produzierenden Organismus erhöhen. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist die Funktion des Polyketids Colibactin und damit seine Bedeutung für den produzierenden Bakterienstamm unbekannt. Aufgrund seiner putativen Struktur ist eine Funktion als Siderophor denkbar. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurde die Siderophor-Produktion im Wachstumsverlauf der Bakterienstämme *E. coli* Nissle 1917 und *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS verglichen. Die Produktion von Siderophoren wurde mittels des Chromazurol S (CAS) Assays ermittelt (SCHWYN & NEILANDS, 1987).

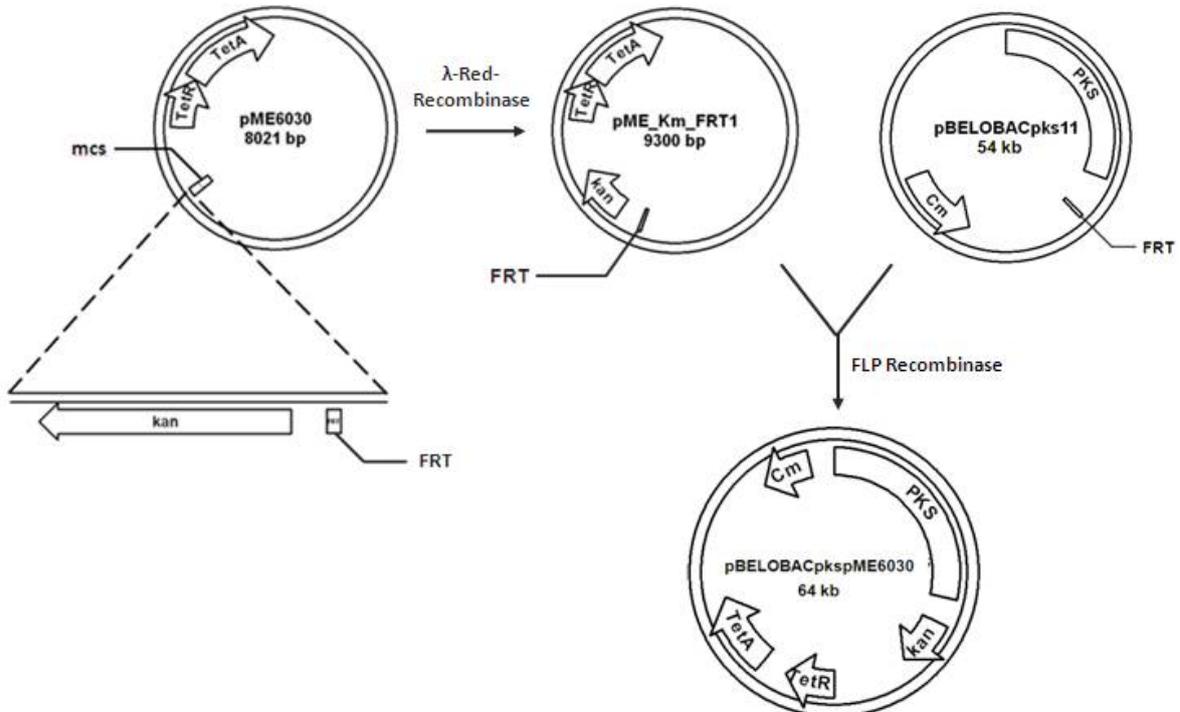
Im Verlauf des Versuches konnten bei der Kultivierung der Bakterienstämme unter Eisen-limitierenden Bedingungen (M63-Minimalmedium + 100  $\mu$ M Dipyritydyl) zu keinem Zeitpunkt Unterschiede zwischen dem Colibactin-produzierenden Wildtypstamm und der Deletionsmutante *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS (Abbildung 35 A) festgestellt werden. Hingegen liess sich während des Wachstums in M63-Minimalmedium am Ende der transienten Phase und mit Eintritt in die stationäre Phase für den Colibactin-positiven Stamm *E. coli* Nissle 1917 im CAS-Assay eine höhere Abnahme der Absorption (5-11%) verzeichnen, die bis in die spätstationäre Phase anhielt (Abbildung 35 B). Möglicherweise lässt dies auf eine erhöhte Produktion von Eisenaufnahme-Systemen im Colibactin-produzierenden Stamm deuten.



**Abb. 35:** Nachweis der Siderophor-Synthese in *E. coli* Nissle 1917 und *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS . Die Anzucht der Stämme erfolgte in M63-Minimalmedium + 100  $\mu$ M Dipyritydyl (A) bzw. in in M63-Minimalmedium (B) bei 37 °C.

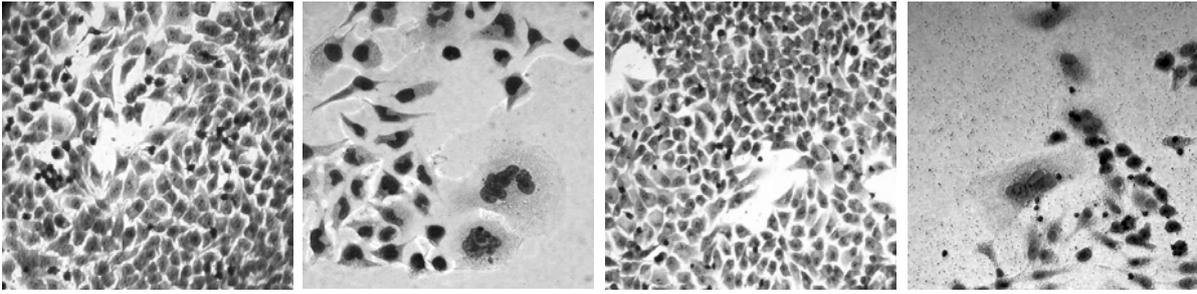
### 5.6 Heterologe Expression der *clb*-Gene in *Pseudomonas putida* KT2440

Um das Colibactin-Gencluster in *Pseudomonas putida* KT2440 exprimieren zu können, wurde der Colibactin tragende Vektor pBELOBAC11pks mit dem modifizierten pME6030-Shuttlevektor (Abbildung 36: pME\_Km\_FRT1; 4.6.1) fusioniert, der ursprünglich für den Transfer von Genen aus *E. coli* in *Pseudomonas* generiert wurde. Das so hergestellte Plasmid pBELOBACpkspME6030 (4.6.2) wurde anschliessend in *P. putida* KT2440 transformiert. Zum Nachweis der Funktionalität von pBELOBACpkspME6030 in *P. putida* KT2440 wurden HeLa-Zellen drei bis vier Stunden mit dem Stamm infiziert. Nach Entfernen der Bakterien erfolgte eine weitere Inkubation der Zellen von drei Tagen. Als Kontrolle dienten nicht infizierte HeLa-Zellen und mit einem Colibactin-negativen Stamm (*P. putida* KT2440) bzw. Colibactin-positiven Stamm (*E. coli* Nissle 1917) infizierte Zellen. Während bei einer anschliessenden mikroskopischen Untersuchung der HeLa-Zellen keine morphologischen Veränderungen bei den nicht infizierten bzw. mit *P. putida* KT2440 pME6030 ko-kultivierten Zellen festgestellt werden konnte, wurde sowohl im Fall der mit *E. coli* Nissle 1917 als auch den mit *P. putida* KT2440 pBELOBACpkspME6030 infizierten Zellen der typische, durch den zytopathischen Effekt ausgelöste Phänotyp beobachtet (Abbildung 37).



**Abb. 36:** Schematische Darstellung der Konstruktion von pBELOBACpkspME6030.

## ERGEBNISSE



**Abb. 37:** Nachweis des zytopathischen Effekts aufgrund von heterologer Colibactin-Expression in *Pseudomonas putida*: Morphologie von HeLa-Zellen 72 h nach Ko-Kultur mit *E. coli* Nissle 1917 und *Pseudomonas putida* KT2440 (Giemsafärbung). A: Kontrolle ohne Bakterien; B: *E. coli* Nissle 1917; C: *P. putida* KT2440 pME6030; D: *P. putida* KT2440 pBELOBACpkspME6030

## 6. Diskussion

### 6.1 Strukturelle Charakterisierung des *clb*-Clusters in *E. coli* Nissle 1917

#### 6.1.1 Analyse und Expression der *clb*-Gene

Mikroorganismen synthetisieren eine Vielzahl von ungewöhnlichen Metaboliten, die unter Umständen eine nebensächliche Rolle in der Ontogenese des Organismus spielen, aber z.T. wichtige Funktionen in der Verteidigung, der interzellulären Kommunikation oder einem anderen Aspekt des mikrobiellen Lebens erfüllen und dem Produzenten einen Wettbewerbsvorteil verschaffen (HUTCHINSON, 1999).

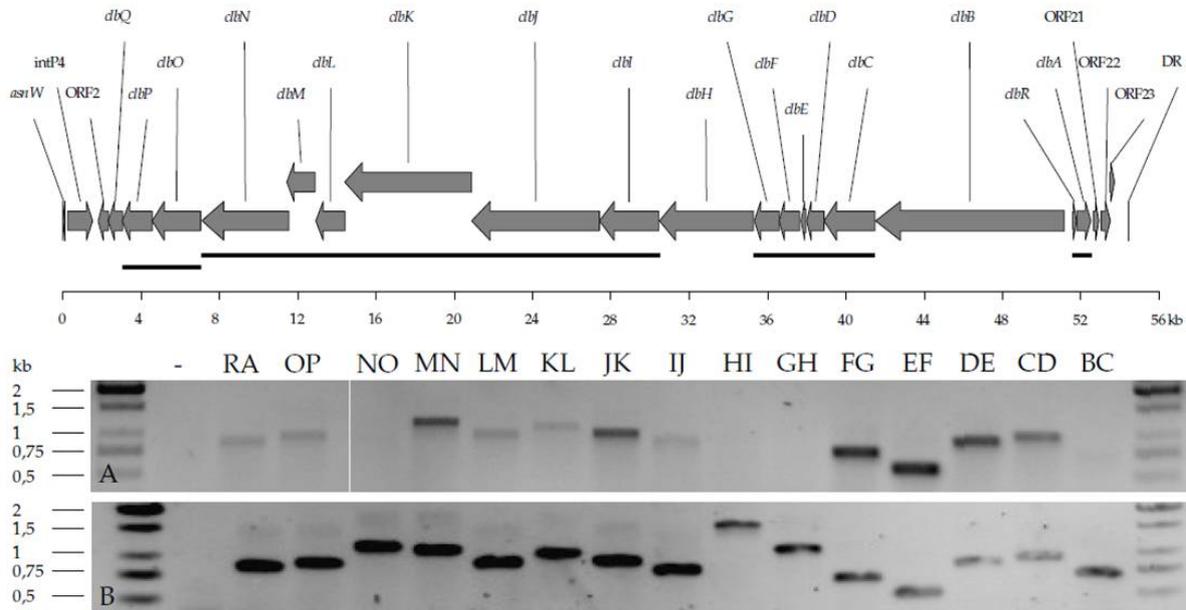
Innerhalb der Sekundärmetabolite bilden die Polyketide und Nichtribosomalen Peptide zwei herausragende Familien komplexer Naturstoffe, die eine Reihe bemerkenswerter biologischer Eigenschaften besitzen. Ihre antibiotische, antimykotische, antiparasitische oder immunsuppressive Wirkung machen sie oft wertvoll für klinische Anwendungen (FELNAGLE *et al.*, 2007; VETCHER *et al.*, 2007; KONTRIK & CLARDY, 2008 ;HUANG *et al.*, 2003). Diese Metabolite kommen ubiquitär vor und werden von einer Reihe von Bakterien, Pilzen, Pflanzen, Insekten und Schwämmen gebildet. Bei den Bakterien findet sich die Mehrheit der PK-NRPS-Produzenten im Phylum Firmicutes, darunter in Vertretern der Gattungen *Bacillus*, *Streptomyces* oder auch *Mycobacterium* (TAPI *et al.*, 2010; SANCHEZ *et al.*, 2008; COLE *et al.*, 1998).

Im Fall von *E. coli* sind beide Substanzklassen von eher geringer Bedeutung, mit Ausnahme der Enzyme der Fettsäurebiosynthese, die der Polyketidsynthese prinzipiell ähnlich ist, und den Siderophoren Enterobactin und Yersiniabactin (CROSA & WALSH, 2002; SCHUBERT *et al.*, 2004).

Unerwartet war daher die Identifizierung eines neuen PKS/ NRPS-Genclusters in verschiedenen *E. coli*-Stämmen. Das 2006 durch NOUGAYRÈDE *et al.* zuerst beschriebene Colibactin-Gencluster kodiert für ein hybrides System aus modularen Polyketidsynthasen und nichtribosomalen Peptidsynthetasen mit zum Teil außergewöhnlicher Struktur der PKS/NRPS-Module. So zeichnen sich einige der Module durch eine ungewöhnliche Abfolge der Domänen oder deren vollständiges Fehlen aus. Interessant erscheint auch das LuxR-ähnliche Protein ClbR. Dieses Protein besitzt das DNA-bindende HTH-(*Helix-Turn-Helix*)-Motif des bakteriellen *Response Regulators* LuxR, welcher in *Vibrio fischeri* am *Quorum Sensing* beteiligt ist und die Transkription des *lux*-Operons aktiviert (LAZDUNSKI *et al.* 2004; MIYAMOTO *et al.*, 2000). Eine weitere Besonderheit stellt die intergenische Region dar, welche zwischen *clbB* und *clbR* lokalisiert ist. Hier konnte eine sich wiederholende 8-bp-Sequenz (ACAGATAC) identifiziert werden, die in verschiedenen *E. coli*-Stämmen unterschiedlich oft aneinandergesetzt ist. Eine Analyse der *clb*-Gene mittels RT-PCR gab erste Einblicke in die transkriptionelle Organisation des Colibactin-Genclusters. Die

## DISKUSSION

durchgeführte Untersuchung ergab, dass das Colibactin-Gencluster in mindestens 7 Transkriptionseinheiten unterteilt werden kann (HOMBURG *et al.*, 2007b; Abbildung 38). Anscheinend bilden die Gene *clbC* bis *clbG* sowie *clbI* bis *clbN* zwei grosse Operons von ca. 6,2 bzw. 23,3 kb. Auch die Gene *clbO* und *clbP* (3,9 kb) sowie *clbR* und *clbA* (0,9 kb) werden



offenbar kotranskribiert. Einzig die Gene *clbB* und *clbH* werden gemäss dieser Analyse monocistronisch transkribiert (HOMBURG, 2007).

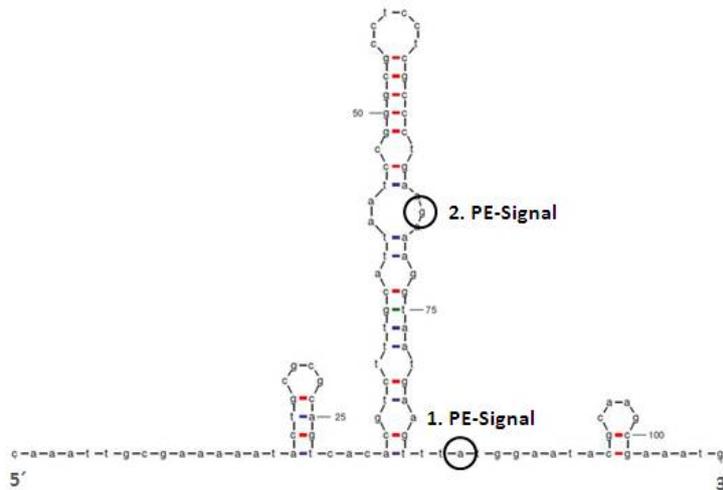
**Abb. 38: Identifizierung der Transkriptionseinheiten des Colibactin-Genclusters mittels RT-PCR.** Abbildung A veranschaulicht das Colibactin-Gencluster mit seinen ORFs. Die Transkripte sind als horizontale Balken unterhalb des Genclusters dargestellt. DR *direct repeat*; *asnW*, *asnW* tRNA Gen; *intP4*, P4-ähnliche Integrase; ORF2, hyp. konserviertes Protein; *clbQ*, put. Thioesterase; *clbP*, FmtA-ähnliches Protein; *clbO*, PKS; *clbN*, NRPS; *clbM*, MATE-ähnliches Protein; *clbL*, Amidase; *clbK*, PKS/NRPS; *clbJ* NRPS; *clbI*, PKS, *clbH*, NRPS; *clbG*, Malonyl-CoA Transacylase; *clbF*, Acyl-CoA Dehydrogenase; *clbE*, Acyl-Trägerprotein; *clbD*, 3-hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase; *clbC*, PKS; *clbB*, NRPS/PKS; *clbR*, LuxR-ähnliches Protein; *clbA*, Phosphopantheteinyltransferase; ORF21, IS1400 Transposase ORFA; ORF22, IS1400 Transposase ORFB; ORF23, Transposasefragment. In der mittleren und unteren Abbildung sind die Transkriptionseinheiten des Colibactin-Genclusters dargestellt. Gemeinsam transkribierte ORFs wurden durch RT-PCR ermittelt. Die gewählten Primer banden jeweils in zwei benachbarten ORFs, so dass ein Signal nur erhalten wurde, wenn ein gemeinsames Transkript vorlag. B: Signale der RT-PCR; C: Kontrolle mit chromosomaler DNA als Matrize. (HOMBURG, 2007)

Zur Vervollständigung der Strukturanalyse des *pks*-Clusters wurde in vorangegangenen Untersuchungen, im Rahmen einer Sequenzanalyse des Colibactin-Genclusters, auch eine Berechnung möglicher Promotoren vorgenommen. Diese Analyse führte zur Vorhersage

zahlreicher putativer Promotorstrukturen für das PKS/NRPS-Genclusters (HOMBURG, 2007a). Allerdings konnte mittels der verwendeten Software keine eindeutige Aussage über die tatsächlichen Startpunkte der Gene getroffen werden. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit vorgenommene experimentelle Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte mittels *Primer-Extension-Analyse* bestätigte die postulierten Startcodons der Gene *clbQ*, *clbI*, *clbH* und *clbC*. Im Fall von *clbB* und *clbR* blieb die Identifizierung des Transkriptionsstarts mit Hilfe der gängigen Primer-Extension-Methode erfolglos. Anhand von RT-PCR-Analysen konnte der Transkriptionsstart von *clbB* lediglich auf einen Bereich von 287-337 bp *upstream* vom *clbB*-Translationsstart eingegrenzt werden. Im Fall von *clbR* wird scheinbar der komplette intergenische Bereich zwischen *clbB* und *clbR* transkribiert. Darüber hinaus erfolgte zur Vervollständigung der Analyse eine Überprüfung des 5'-Bereiches des *clbA*-Transkriptes. Im Ergebnis dieser Arbeit zeigte sich, dass *clbA* einen eigenen Transkriptionsstart besitzt, welcher ca. 100 bp vor dem postulierten Translationsstart liegt. Dieses Resultat widerlegt die früher durchgeführten Untersuchungen (HOMBURG 2007, Abbildung 38), die vermuten liessen, dass *clbA* zusammen mit *clbR* kotranskribiert wird. Allerdings musste bei der dort angewandten Art der Analyse eingeschränkt werden, dass je nach Wahl der Oligonukleotid-Primer ein sehr weit vom postulierten Startcodon entfernter, in den *downstream*-Bereich des vorangehenden Gen hineinreichender Transkriptionsstart ebenfalls zu einem RT-PCR-Produkt führen und so fälschlicherweise als Polycistron identifiziert würde.

Im Fall von *clbC* wurden in der *Primer-Extension* Analyse zwei Signale detektiert, von denen das erste und stärkere Signal mit dem eigentlichen Translationsstart überlappt. Das Auftreten stabiler Sekundärstrukturen im 5'-Bereich der mRNA (Abbildung 39) legt die Vermutung nahe, dass dadurch die Synthese der cDNA durch die reverse Transkriptase behindert wurde (BELLAVIA *et al.*, 2008), wodurch das 2. Signal wesentlich schwächer ausgeprägt ist. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass sogenannte sekundäre Primeranlagerungen (*secondary annealing events*) an unspezifische Sequenzen zur Ausprägung multipler Primer-Extension-Signale führen (MALLIK, 2004). Ein Nachweis des *clbC* Transkriptionsstarts mittels Nuklease S1-Kartierung könnte Aufschluss über die Richtigkeit des mittels Primer-Extension erhaltenen Signals geben. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Verwendung einer DNA-Sonde, die aufgrund ihrer Fragment-Länge spezifischer an die Ziel-RNA bindet, als die bei der Primer-Extension-Analyse verwendeten Oligonukleotide.

## DISKUSSION



**Abb.39: Schematische Darstellung der berechneten Sekundärstruktur des *clbC*-Transkriptes.** Die erhaltenen Primer-Extension Signale sind durch schwarze Kreise markiert.

Mit Ausnahme von *clbI* konnten für alle Gene die Elemente eines Sigma70-abhängigen Promotors identifiziert werden. Sigma70 ist der vorherrschende Sigmafaktor während des exponentiellen Wachstums (JISHAGE *et al.*, 1996). Denkbar wäre auch eine Beteiligung des alternativen Sigmafaktors  $\delta^S$  (RpoS), dessen Promotorerkennungssequenzen homolog zu denen des Sigmafaktors  $\delta^{70}$  sind. Die Erkennung eines Promotors durch Sigma 70- und Sigma S-RNA-Polymerasen wird möglicherweise durch unterschiedliche Toleranzschwellen hinsichtlich der Abweichungen von der Konsensussequenz und nicht optimaler Abstände zwischen der -35 und -10-Region erreicht. Der typische Abstand von 17 bp zwischen -10 und -35 Region fehlt bei diesen Genen. Das  $\delta^S$ -Regulon umfasst ungefähr 10 % der *E. coli*-Gene und spielt eine wichtige Rolle bei der Vermittlung verschiedener Stressresistenzen, wie z.B. oxidativem Stress oder Nährstoffmangel (DONG & SCHELLHORN, 2010). Aufgrund verminderter Transkription und erhöhter Proteolyse ist die RpoS-Konzentration in *E. coli* in der exponentiellen Phase des Wachstums sehr gering. Erst mit Eintritt in die stationäre Phase nimmt die RpoS-Konzentration zu. (HENGGE, 2009) Dies stimmt weitestgehend mit der Beobachtung überein, dass in diskontinuierlicher Kultur eine Zunahme der Expressionsraten der *clb*-Gene in der exponentiellen Phase zu verzeichnen ist, die ihr Maximum beim Übergang in die stationäre Phase erreichen, bevor sie wieder abnehmen (HOMBURG *et al.*, 2007b). Der Sigmafaktor S stellt die zentrale Komponente in einem grösseren regulatorischen Netzwerk dar. Meist sind in die Kontrolle von  $\delta^S$ -abhängigen Genen weitere Regulatoren involviert (LOEWEN & HENGGE-ARONIS, 1994). Dazu zählen u. a. CRP, Lrp, IHF oder H-NS. Interessanterweise sind die meisten dieser zusätzlichen Regulatoren keine spezifischen Aktivatoren oder Repressoren, deren Bindungsstellen mit

einer hohen Frequenz im Chromosomen vorkommen, was darauf schliessen lässt, dass einige von ihnen, wie z.B. H-NS, IHF und LRP, eine Funktion in der Chromosomenorganisation erfüllen (D'ARI *et al.*, 1993; DRLICA & ROUVIERE-YANIV, 1987). Putative Bindestellen für CRP, IHF und LRP wurden mit wenigen Ausnahmen vor allen *clb*-Genen gefunden. Auch Erkennungssequenzen für H-NS wurden vor drei der untersuchten Gene identifiziert. Da sich diese Beobachtungen fast ausschliesslich auf computergestützte Analysen stützen, ist eine eingehendere Untersuchung des Einflusses von RpoS, CRP, IHF und LRP auf die Regulation der *clb*-Gene von Interesse. Einzig eine Repression der Expression der *clb*-Gene durch H-NS scheint sicher. Auf diesen Kontrollmechanismus wird detailliert unter 6.2 eingegangen.

In der Regel ist der prokaryotische 5'UTR relativ kurz. Die durchschnittliche Länge beträgt 20 bis 40 nt (PASSALACQUA, 2009; SOREK, 2010). Mit Ausnahme von *clbC* und *clbH* besitzen die hier untersuchten *clb*-Gene einen überdurchschnittlich langen 5'UTR. Die Längen der 5'-untranslatierten Bereiche der Transkripte reichen von 81 bp bis 460 bp. Eine Korrelation der zellulären Funktion eines Gens und der Länge seines 5' UTRs wurde 2010 bei der globalen Transkriptom-Analyse von *Helicobacter pylori* festgestellt (SHARMA *et al.*, 2010). Mittels dieser wurden 1.907 Transkriptionsstartpunkte identifiziert. Auffällig war, dass häufig bei regulatorischen Genen zellulärer Prozesse, wie der Zellteilung oder Genen, die mit der Pathogenese des Organismus assoziiert sind, überdurchschnittlich lange 5'UTRs detektiert wurden. Eine Regulation erfolgt in solchen Fällen posttranskriptionell durch Kontrolle der Translation oder Vermittlung einer gewissen mRNA-Stabilität. So wird durch Ausbildung von Sekundärstrukturen unter bestimmten Bedingungen die Shine-Dalgarno-Sequenz maskiert oder zugänglich gemacht und somit die Translation reprimiert bzw. initiiert (JOHANSSON *et al.*, 2002). Der 5'-untranslatierte Bereich kann der mRNA aber auch eine gewisse Stabilität verleihen. Durch die Bildung von Sekundärstrukturen oder die Bindung von Ribosomen wird der Zugang von Ribonukleasen an die RNA erschwert und somit das Transkript stabilisiert (CONDON, 2003).

## 6.2 Mögliche regulatorische Mechanismen in der PK/NRP-Synthese

Viele der bisher untersuchten Polyketidsynthese-Gencluster unterliegen Regulationsmechanismen, die sich auf der Transkriptionsebene abspielen. Häufig handelt es sich um spezifische transkriptionelle Aktivatoren, wie z.B. *actI/ORF4* im Fall von Actinorhodin (FERNÁNDEZ-MORENO *et al.*, 1991) oder *dnrl* für Daunorubicin (STUTZMAN-ENGWALL *et al.*, 1992). In den meisten Fällen finden sich die regulatorischen Gene innerhalb des Polyketidsynthese-Genclusters. In einigen Fällen, wie z.B. dem *ery*-Gencluster aus *Streptomyces coelicolor* A3(2), verantwortlich für die Erythromycin Biosynthese, konnten innerhalb des Genclusters keine regulatorischen Gene identifiziert werden, die die

## DISKUSSION

Expression der strukturellen Gene kontrollieren. Hier liegt die Vermutung nahe, dass ein externer, übergeordneter Regulator die Expression der Polyketidsynthese-Gene kontrolliert (HUTCHINSON *et al.* 1993). So konnte z.B. in *S. coelicolor* und *S. lividans* eine negative Beeinflussung der Actinorhodin- bzw. Undecylprodigiosinsynthese durch hohe Phosphatkonzentrationen beobachtet werden, welche direkt auf das PhoP-PhoR-Zweikomponentensystem zurückgeführt werden konnte. Ein möglicher Mechanismus geht von einer negativen Beeinflussung der *afsS*-Expression durch phosphoryliertes PhoP aus. Da AfsS, als direkter transkriptioneller Aktivator von *actII-ORF4* und *redD* fungiert, führt dies gleichermassen zu einer verminderten Expression der beiden Gene. Infolge der niedrigen Konzentration von ActII-ORF4 und RedD wäre eine Induktion der Actinorhodin- und Undecylprodigiosin-Synthesegene unmöglich (MARTIN, 2004). In anderen Fällen scheinen äussere Stimuli an der Regulation der Polyketidsynthese beteiligt zu sein. So scheint eine Abhängigkeit der Aflatoxin-Biosynthese von *A. parasiticus* zur Kultivierungstemperatur zu bestehen. Während *Aspergillus* bei einer Kultivierung von 27 °C grosse Mengen von Aflatoxin produziert, ist das Polyketid bei einer Anzucht des Pilzes bei 37°C nicht detektierbar. Ferner zeigte sich eine Beeinflussung der Aflatoxinsynthese durch die jeweils verwendete Stickstoffquelle. Während z.B. durch Ammonium oder Pepton die Transkription der strukturellen Gene des Aflatoxin-Genclusters erhöht wird, kommt es zu einer Reprimierung der Expression unter Verwendung von Nitrat. (FENG & LEONARD, 1998)

Im Fall von Colibactin sind die regulatorischen Mechanismen der PK/NRP-Synthese weitestgehend unbekannt. Bisher scheinen einzig eine Abhängigkeit vom Zweikomponentensystem BarA/ UvrY sowie dem CsrA/ CsrB-System sicher. So zeigten bislang unveröffentlichte Experimente, dass eine Deletion von *uvrY* den zytopathischen Effekt aufhebt. Ferner konnte durch Einbringen des *uvrY*-Gens in die natürliche *uvrY*-Mutante UPEC 536, der zytopathische Effekt auf HeLa-Zellen hervorgerufen werden, welcher für Colibactin-produzierende Bakterien charakteristisch ist (HOMBURG, 2007a). Weiterhin führte eine Überexpression von CsrA in den Stämmen *E. coli* Nissle 1917 und *E. coli* IHE3034 zu einer Eliminierung des CPE. Zusätzlich konnte bei einer Überexpression von CsrA, eine negative Beeinflussung der Expressionsraten der Gene *clbA*, *clbB* und *clbQ* beobachtet werden (HOMBURG, Uni Würzburg, unveröffentlicht). Neben der Beteiligung von BarA/ UvrY und CsrA/ CsrB an der Kontrolle der Colibactin-Synthese wird ausserdem eine regulatorische Rolle von *clbR* sowie des intergenischen Bereiches zwischen *clbR* und *clbB* spekuliert.

### 6.2.1 Posttranskriptionelle Regulation-Transkriptstabilität

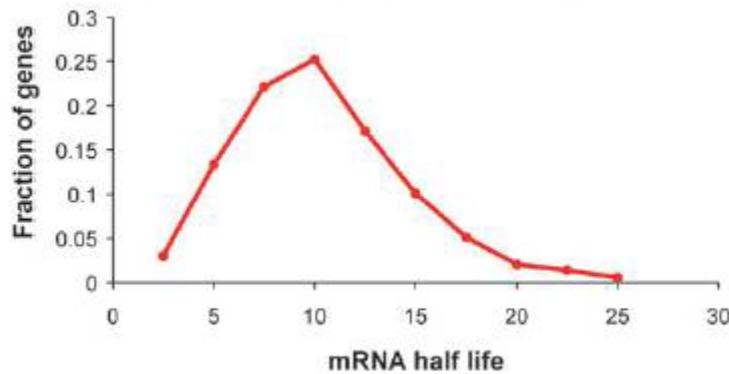
In ihrer natürlichen Umgebung sind Bakterien vielen verschiedenen und oft sehr schnell wechselnden Bedingungen ausgesetzt. Ihre hohe Anpassungsfähigkeit beruht auf einer strengen Kontrolle der Genexpression, welche zum Grossteil auf Ebene der Transkription stattfindet. Eine zusätzliche Feinregulation kann postranskriptionell durch Änderungen der Translationsraten oder der RNA-Stabilitäten erfolgen (RICHARDS *et al.*, 2008).

***clbR*-Halbwertszeit** Häufig spielen die untranslatierten Bereiche der Transkripte eine wichtige Rolle bei diesen Prozessen. Sekundärstrukturen in den nichtkodierenden Bereichen können Transkripten eine gewisse Stabilität verleihen oder die Translationseffizienz beeinflussen. Zum Beispiel kann die Affinität von Ribonukleasen oder Hilfsproteinen, die den Abbau von RNA fördern oder inhibieren, durch den 5' oder 3' UTR kontrolliert werden (CARRIER & KEASLING, 1997; Kushner, 2004). Besondere Aufmerksamkeit hinsichtlich einer möglichen postranskriptionellen Kontrolle durch den 5' UTR kommt *clbR* zu, dessen Genprodukt einen möglichen Regulator des Colibactin-Genclusters darstellt. Der ungewöhnlich lange 5' untranslatierte Bereich des *clbR*-Transkriptes beinhaltet eine 8-bp-Wiederholungssequenz, die sich in verschiedenen Stämmen unterschiedlich oft wiederholt. Aufgrund dieser variablen Region wird eine mögliche regulatorische Wirkung auf die Transkription oder auf die Translation von *clbR* vermutet. Berechnungen zur Stabilität der mRNA-Sekundärstruktur von *clbR* ergaben eine Erhöhung der Stabilität mit Zunahme der Sequenzwiederholungen. Eine Untersuchung zur Stabilität der *clbR*-mRNA in Abhängigkeit von der Anzahl der repeat-Sequenzen mittels RT-PCR ergab jedoch keinen Unterschied hinsichtlich der Abbaurates des *clbR*-Transkriptes in den Stämmen *E. coli* Nissle 1917 (13 repeats) und *E. coli* CFT073 (7 repeats), was auf die geringe Sensitivität der Methode zurückzuführen sein könnte. Allerdings bleibt auch zu berücksichtigen, dass die Stabilität der Sekundärstruktur der mRNA nicht zwangsläufig mit der Abbaurates des Transkriptes korreliert. Die mit der Zunahme der Sequenzwiederholungen auftretende Erhöhung der Stabilität der Sekundärstruktur eröffnet darüber hinaus eine weitere Möglichkeit der Regulation, auf Ebene der Translation. So besteht häufig eine Abhängigkeit zwischen der Translationseffizienz und der mRNA-Sekundärstruktur in der Initiations-Region/ RBS. Verursacht wird dies durch die Bildung bestimmter Sekundärstrukturen, die die Bindung ribosomaler Proteine erleichtert bzw. erschwert. CAMERON *et al.* (2008) zeigten dies z.B. im Fall von *Haemophilus influenzae*. Hier führt die Bildung einer Haarnadelstruktur im 5'-Bereich der *sxy*-mRNA, zu einer negativen Beeinflussung der Translation. Zurückgeführt wird dies auf eine schlechtere Zugänglichkeit der Shine-Dalgarno (SD)-Sequenz und damit auf eine schlechtere Bindung der Ribosomen. Ribosomen benötigen 35-50 nt (einschliesslich der SD-Sequenz) für eine effiziente Bindung an Transkripte. Auch doppelsträngige Bereiche

in der RNA in der Nähe der SD-Sequenz erschweren den Zugang der Ribosomen an die RNA. So kann bereits die Erhöhung der Stabilität der Sekundärstruktur im Bereich der SD-Sequenz um  $\Delta G -1,4 \text{ kcal/ mol}$  zu einer 10-fach reduzierten Translationseffizienz führen (DE SMIT & VAN DUIN, 1990). In Bezug auf *clbR* könnte die geringere Stabilität der Sekundärstruktur bei abnehmender Anzahl der Wiederholungssequenzen also eine höhere Translationseffizienz des *clbR*-Transkriptes bedeuten, da eine niedrigere Enthalpie  $\Delta G$  eine leichtere Entfaltung der RNA und damit eine höhere Zugänglichkeit für die Ribosomen an die RNA ermöglicht.

***clb*-mRNA-Halbwertszeiten** Gewöhnlich liegen die Halbwertszeiten von mRNAs in *E. coli* K-12 bei 2 bis 25 Minuten (Abbildung 40; JANGA & BABU, 2009). Im Gegensatz zu tRNAs und rRNAs besitzen sie eine relativ geringe Stabilität. Diese Eigenschaft ermöglicht eine schnelle Anpassung der Genexpression an Veränderungen der Wachstumbedingungen. In Untersuchungen zur Expression der *clb*-Gene wurden teilweise Unterschiede zwischen den Stärken der Luciferase-Expression und Signalen der RT-PCR beobachtet. Diese Diskrepanzen zeigten sich besonders deutlich im Fall von *clbA*. Während mittels RT-PCR nur sehr geringe Transkriptmengen detektiert wurden, zeigte das Gen sowohl in *E. coli* Nissle 1917 als auch in *E. coli* IHE3034 die höchsten Luciferaseaktivitäten. Zurückgeführt wurde dies auf mögliche Unterschiede hinsichtlich der Transkriptstabilitäten. Eine Untersuchung der Abbauraten einzelner *clb*-Transkripte ergab allerdings keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der mRNA-Stabilitäten. Mit Halbwertszeiten von ca. 10 Minuten weisen die *clb*-Transkripte eine für *E. coli* durchschnittliche mRNA-Stabilität auf. In der Regel besitzen Transkripte, deren Proteine in die gleichen zellulären Prozesse involviert sind, ähnliche Halbwertszeiten (Selinger et al., 2003).

Die Beobachtungen bezüglich der Abbauraten stehen allerdings in Widerspruch zu Untersuchungen, bei denen eine Überexpression des RNA-bindenden Protein CsrA zu einer negativen Beeinflussung der Expressionsraten der Gene *clbA*, *clbB* und *clbQ* bzw. zu einer positiven Beeinflussung der Expression von *clbR* führte (S. Homburg, Würzburg, persönlich). Dies könnte auf die unterschiedlichen Sensitivitäten der Methoden zurückzuführen sein. Eine Überexpression von CsrA mit anschließender Analyse der Transkript-Abbauraten könnte das Ausmass der posttranskriptionellen Kontrolle der *clb*-Transkripte durch den globalen Regulator klären.



**Abb.40:** Schematische Darstellung der Verteilung der mRNA-Halbwertszeiten in min für alle Protein kodierenden Gene in *E. coli* K12 (JANGA & BABU, 2009).

### 6.2.2 Induktion der Transkription der *clb*-Gene- Regulation durch Umwelteinflüsse

Neben der bereits erwähnten Regulation durch spezifische Transkriptionsfaktoren ist eine Beeinflussung der Polyketidbiosynthese auch über äußere Stimuli oder globale Regulatoren möglich. So wurde in einigen Fällen eine Steigerung der PK oder NRP-Synthese durch bestimmte Kohlenstoff- oder Stickstoffquellen beobachtet (FENG & LEONARD, 1998; HAJJAJ *et al.*, 2001).

Um eine Anreicherung Colibactins zu erreichen, wurden in der vorliegenden Arbeit neben der heterologen Expression des *pks*-Genclusters in *Pseudomonas putida* (6.3) auch unterschiedliche Wachstumsbedingungen zur Optimierung der Colibactin-Synthese getestet. Einzig das Wachstum unter sauerstofflimitierenden Bedingungen sowie eine Kultivierung in Anwesenheit von Indol oder Fettsäuren schienen eine leicht erhöhte Expression der Colibactin-Gene hervorzurufen.

**Einfluss von Sauerstoff auf die Transkription des *clb*-Genclusters:** Eine Erklärung für die positive Beeinflussung der *clb*-Expression unter sauerstofflimitierenden Bedingungen gestaltet sich schwierig, da die Umstellung des zellulären/ mikrobiellen Stoffwechsels auf die verminderte Sauerstoffverfügbarkeit äusserst komplex ist und mit weitreichenden Veränderungen auf Ebene der Genexpression einhergeht. Aufgrund limitierter Sauerstoffverfügbarkeit werden z.B. Glykolyse und der Metabolismus anderer Hexosen hochreguliert, um die Energieversorgung unter anaeroben Bedingungen zu sichern. Gleiches gilt für den Pyruvatmetabolismus oder die gemischte Säuregärung, die die Produkte der Glykolyse fermentieren. Hingegen werden Gene, deren Produkte in die oxidative Stressantwort oder in die Synthese des Siderophors Enterobactin involviert sind reprimiert (SCHRAMM *et al.*, 2007). Eine wichtige Rolle in der Anpassung der Genexpression an

verringerte Sauerstoffkonzentrationen spielen die Transkriptionsfaktoren ArcA und Fnr. Neben diesen Regulatoren ist auch der Sigmafaktor RpoS in die Induktion verschiedener Gene unter anaeroben Bedingungen involviert (LOEWEN, 1994). In Anbetracht der erhöhten Expressionsraten von *clbA* bei Wachstum von *E. coli* Nissle 1917 unter sauerstofflimitierenden Bedingungen könnte die Beteiligung des alternativen Sigmafaktors RpoS eine mögliche Erklärung liefern.

**Einfluss von Indol auf die Transkription des *clb*-Genclusters** In *E. coli* erfolgt die Synthese von Indol über Tryptophan mit Hilfe des Enzyms Tryptophanase TnaA. Da die Expression von *tnaA* einer Kontrolle durch Katabolit-Repression unterliegt, erfolgt seine Transkription erst bei Eintreten einer Limitierung der bevorzugten Kohlenstoffquellen. Als Resultat dieser Regulation werden grosse Mengen Indol erst während der stationären Phase des Wachstums gebildet (YANOFSKY *et al.*, 1991). In seiner Funktion als extrazelluläres Signalmolekül beeinflusst Indol in *E. coli* die Transkription verschiedener Multidrug-Resistenz-Transporter-Gene (HIRAKAWA *et al.*, 2005), Gene des Aminosäuremetabolismus (WANG *et al.*, 2001), aber auch die Expression von Virulenzgenen wie *espA*, *espB* (HIRAKAWA *et al.*, 2009) positiv. Vermittelt wird die Induktion der Genexpression durch Indol über Zweikomponentensysteme wie BaeSR und CpxAR (HIRAKAWA, 2005). Eine Inaktivierung der Tryptophanase und der damit verbundenen Inhibierung der Indol-Synthese könnte helfen, das Ausmass der Induktion der *clb*-Expression durch Indol weiter aufzuklären.

**Einfluss von Fettsäuren auf die Transkription des *clb*-Genclusters** Exogene Fettsäuren und ihre Derivate beeinflussen eine Vielzahl von zellulären Prozessen in Bakterien, einschliesslich der Fettsäure- und Phospholipidsynthese, des Exportes und der Modifikation von Proteinen, der Aktivierung/ Deaktivierung von Enzymen, der bakteriellen Pathogenese und der transkriptionellen Regulation (BLACK & DIRUSSO, 1994; DIRUSSO *et al.*, 1999). In *E. coli* fungieren langkettige CoA-Acyl-Thioester als Effektormoleküle, Durch die Bindung des Transkriptionsfaktors FadR modulieren sie die Expression zahlreicher Gene, darunter Gene des Fettsäureabbaus (DiRusso *et al.*, 1992), der Biosynthese ungesättigter Fettsäuren (DiRusso *et al.*, 1993), des Tricarbonsäure-Zyklus und des Aminosäuremetabolismus (HAN *et al.*, 2008). Im Fall der Colibactin-Gene wurden bei einer Analyse der Promotorregionen auch mögliche Bindungsstellen für FadR vor den Genen *clbA*, *clbH* und *clbI* gefunden. Untersuchungen zur Expression der *clb*-Gene in einem *fadR* negativen Hintergrund könnten Aufschluss über eine mögliche Beteiligung von FadR an der Regulation der Colibactin-Gene geben.

### 6.2.3 Regulation der *clb*-Gene durch *clbR*

Die Identifizierung des Proteins ClbR im Colibactin-Gencluster eröffnet darüber hinaus die Möglichkeit für einen weiteren Regulationsmechanismus der strukturellen *clb*-Gene. Das Produkt des Genes *clbR* besitzt Ähnlichkeiten zum LuxR-Protein aus *Vibrio sp.*. Häufig fungieren Vertreter der LuxR/ FixJ-Familie als transkriptionelle Aktivatoren, welche anhand ihres Aktivierungsmechanismus in zwei Hauptgruppen unterteilt werden können. Die erste Gruppe beinhaltet Regulatoren wie FixJ und UhpA, die Teil eines Zweikomponentensystems sind und durch Phosphorylierung aktiviert werden (BOBIK *et al.*, 2006; MERKEL *et al.*, 1992). Der zweiten Gruppe gehören Transkriptionsfaktoren an, die konstitutiv aktiv sind oder durch niedermolekulare Kofaktoren kontrolliert werden und zu denen u.a. der Aktivator des Maltose-Regulons in *E. coli*, MalT gehört (RICHET & RAIBAUD, 1989). Meist bestehen diese Regulatoren aus einer N-terminalen *receiver*-Domäne und einer C-terminalen DNA-bindenden Domäne, welche ein HTH (*helix-turn-helix*)-Motif beinhaltet. ClbR zeigt starke Homologien zum C-Terminus der LuxR-FixJ-Familie, während die N-terminale *receiver*-Domäne fehlt. Damit zählt ClbR zusammen mit GerE aus *Bacillus subtilis* zu den kleinsten Vertretern dieser Familie transkriptioneller Aktivatoren (CRATER & MORAN, 2001). Auf qRT-PCR basierende Expressionsstudien deuten auf eine positive Regulation der Expression der strukturellen Gene durch ClbR hin (5.3.1). So zeigten sich bei einer Deletion von *clbR* im Stamm *E. coli* Nissle 1917 stark verminderte Transkriptionsraten für die Gene *clbB*, *clbC*, *clbH* und *clbI*. Zusätzlich konnten bei einer Überexpression von ClbR in *E. coli* Nissle 1917, erhöhte Expressionsraten der strukturellen Gene *clbB* und *clbQ* sowie des putativen Regulators *clbR* beobachtet werden (SELLE, Universität Würzburg, Diplomarbeit, 2010). Die Aussage dieser Experimente geht konform mit Beobachtungen über die Regulationsmechanismen der Synthese anderer Polyketide und nichtribosomaler Peptide. Bei einem Grossteil erfolgt die Regulation der strukturellen Gene über einen spezifischen, transkriptionellen Aktivator wie z.B. dem in *Pseudomonas fluorescens* Pf5 identifizierten Pyoluteorin (NOWAK-THOMPSON *et al.*, 1999). Hier konnte nach Deletion des LysR-ähnlichen Transkriptionsfaktor PltR, der ebenfalls im Pyoluteorin-Gencluster kodiert ist, eine signifikante Reduktion der strukturellen Gene beobachtet werden. Dieses liess darauf schliessen, dass PltR als transkriptioneller Aktivator dient (NOWAK-THOMPSON *et al.*, 1999).

### 6.2.4 Regulation der *clb*-Gene durch H-NS

Untersuchungen zur genetischen Struktur des Colibactin-Clusters offenbarten verschiedene Charakteristika, die eine Verbreitung der genomischen Insel durch horizontalen Gentransfer (HGT) nahelegen (PUTZE *et al.*, 2009). Es hat sich gezeigt, dass unter Bakterien der Austausch von genetischem Material durch HGT einen wichtigen Mechanismus darstellt.

Dem Empfängerorganismus kann durch die schnelle Akquisition von Genclustern, die für Pathogenitäts- oder Fitnessfaktoren kodieren, ein selektiver Vorteil entstehen (BUCKLING & RAINEY, 2002). Allerdings kann sich die unzweckmässige Expression von neu erworbenen Genen auch nachteilig auf den Mikroorganismus auswirken (LEE & EDLIN, 1985). Vertreter der Familie der *Enterobacteriaceae* begegnen dieser Problematik u.a. mit Hilfe des DNA-bindenden Proteins H-NS (*Histone-like Nucleoid Structuring Protein*). Der globale Regulator wirkt reprimierend auf die Expression „fremder“ Gene durch einen Prozess, der auch als *xenogeneic silencing* bekannt ist (PEREZ *et al.*, 2008). H-NS bindet bevorzugt AT-reiche Sequenzen, was zu einer Begünstigung der Bindung von H-NS an horizontal erworbene DNA-Sequenzen führt (LUCHT *et al.*, 1994). Auch im Fall des Colibactin-Genclusters zeigte sich eine Reprimierung der strukturellen Gene durch H-NS. Die Deletion des *hns*-Gens im Colibactin-produzierenden *E. coli* Stamm IHE3034 führte zu einer erhöhten Expression der Colibactin-Gene. Vergleichende qRT-PCR-Analysen ergaben 4 bis 8-fach erhöhte Transkriptionsraten der Gene *clbA*, *clbB*, *clbC*, *clbH*, *clbI*, *clbO* und *clbR*.

Die Beobachtung, dass die Expression von H-NS in *E. coli* K-12 mit Eintritt in die stationäre Phase stimuliert wird (DERSCH *et al.*, 1993), liefert im Zusammenhang mit den hier erhaltenen Ergebnissen eine mögliche Erklärung für die rapide Abnahme der Expressionsraten der *clb*-Gene nach Eintritt in die stationäre Phase. Möglicherweise greift hier, neben der vermuteten Regulation durch CsrA, die Kontrolle durch H-NS auf die *clb*-Genexpression und führt zur Reprimierung der Colibactinexpression.

### 6. 3 Über-Expression von Polyketiden und nichtribosomalen Peptiden

Trotz aufwändiger biotechnologischer Methoden war eine Anreicherung bzw. Isolierung Colibactins bis zum heutigen Zeitpunkt nicht möglich. Dieser Umstand steht einer Aufklärung der chemischen Struktur der Komponente im Weg. Als ursächlich für die Schwierigkeiten bei der Isolierung wird u.a. die Kontaktabhängigkeit der Expression des Peptid-Polyketids angesehen. Um eine stärkere und kontaktunabhängige Colibactin-Synthese zu erreichen, war daher die heterologe Expression des PKS/NRPS-Genclusters von grossem Interesse. Zur Verwirklichung dieses Vorhabens wurde ein das Colibactin-Operon tragender Shuttle-Vektor in *Pseudomonas putida* KT2440 transformiert. Als Vertreter einer Familie mit einer Vielzahl von natürlichen Polyketid-Produzenten bietet der Bakterienstamm eine optimale Grundlage für die Synthese von Colibactin. *Pseudomonas putida* KT2440 wurde bereits erfolgreich zur Expression des aus *Sorangium cellulosum* stammenden Polyketids Myxochromid S eingesetzt (WENZEL *et al.*, 2005). Ein Vorteil bei der Verwendung von *P. putida* ergibt sich ausserdem aus dem Vorhandensein einer Phosphopantetheinyl-Transferase mit einem breiten Substratspektrum, die dazu in der Lage ist, Acyl- und Peptidyl-Träger Domänen diverser PKS, NRPS und Fettsäuresynthasen posttranslational zu

aktivieren (GROSS, 2005). Auch im hier vorliegenden Fall konnte das PKS/ NRPS-Gencluster erfolgreich in *P. putida* transformiert werden und darüber hinaus die Aktivität Colibactins anhand eines Zellkulturmodells nachgewiesen werden. Problematisch gestaltete sich lediglich die Stabilität des Vektorsystems. Plasmid-Instabilität kann zum Einen struktureller Natur sein. Verursacht wird sie in diesem Fall durch die Insertion, Deletion oder Neuordnung der Plasmid-DNA. Zum Anderen kann ein Verlust des Plasmides durch Segregation erfolgen, hierbei erwächst die Instabilität des Plasmides aus einer fehlerhaften Aufteilung des Plasmides bei der Zellteilung. Eine weitere Beeinflussung der Plasmidstabilität erfolgt durch Faktoren wie die Kopienanzahl oder Wachstumsbedingungen, aber auch die Art des Inserts kann sich auf die Stabilität des Plasmides auswirken (SUMMER, 1991). Im vorliegenden Fall muss ausserdem die hohe Resistenz von *Pseudomonas* gegenüber einer Vielzahl antimikrobieller Agenzien berücksichtigt werden, die aus der geringen Membranpermeabilität und der konstitutiven Expression zahlreicher Efflux-Pumpen resultieren (STRATEVA & YORDANOV, 2009). Im Fall des Colibactin tragenden Shuttle-Vektors wird die Instabilität des Plasmids vermutlich durch die Grösse des Genclusters verursacht.

#### **6.4 Einfluss des des *clb*-Operons/ Colibactins auf den Gesamt-Metabolismus von *E.coli* Nissle 1917**

Um eine Grundvorstellung von der Integration der Colibactin-Expression in den Gesamtmetabolismus zu erhalten, wurde eine vergleichende Proteom- und Transkriptom-Analyse der Stämme *E. coli* Nissle 1917 und *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS vorgenommen. Im Rahmen dieser Analyse zeigte sich eine weitaus stärkere Beeinflussung des Proteoms/ Transkriptoms als im Vorfeld erwartet. So ergab die Proteom-Analyse unterschiedliche Expressionsraten für insgesamt 77 Proteine, wobei der Grossteil dieser Proteine erhöhte Expressionsraten in der Colibactin-negativen Mutante aufwies. Auf Ebene der Transkription wurden insgesamt 374 Gene identifiziert, die differentiell exprimiert werden. Auffällig erscheint u. a. der veränderte Aminosäuremetabolismus, speziell die verminderte Expression der Gene/ Proteine der Tryptophan-, Tyrosin- und Phenylalanin-Biosynthese (Shikimat-Weg) in *E. coli* Nissle 1917. In *E. coli* liefert der Shikimat-Biosyntheseweg u.a. Vorstufen die für die Synthese der Siderophore Yersiniabactin und Enterobactin erforderlich sind (CROSA & WALSH, 2002). Der Shikimat-Weg spielt aber auch in anderen Organismen eine wichtige Rolle bei der Bereitstellung von Vorstufen zur Biosynthese von PK/NRP. So bezieht *Streptomyces* sp. u.a. p-Aminobenzoensäure und Tryptophan aus dem Shikimat-Weg für die Synthese von Candicinin und Actinomycin (MARTIN & LIRAS, 1976; HERLT *et al.*, 1985; JONES & KELLER, 1997). Inwiefern aber die Anwesenheit/Expression des Colibactin-Genclusters Einfluss auf die Expression der Gene der Tryptophanbiosynthese nimmt, ist unklar. Neben der Beeinflussung des Aminosäuremetabolismus zeigten verschiedene Gene

bzw. Proteine des Kohlenhydratmetabolismus im Wildtypstamm *E. coli* Nissle 1917 eine verringerte Expression. Betroffen von dieser Deregulation waren u.a. einige Gene, deren Produkte am Kohlenhydratmetabolismus beteiligt sind, darunter Gene der Glykolyse (*pykF*, *glk*, *pgk*, *pgi*, *fbaA*), des Pyruvatmetabolismus (*ackA*, *pflB*) sowie Gene einiger zuckerspezifischer Transporter (*crr*, *fruB*, *ptsG*, *ptsH*). Die Regulation der Transkription dieser Gene erfolgt vornehmlich durch FruR und Crp. FruR, ein transkriptioneller Regulator (***fructose repressor, catabolite repressor activator***) spielt eine pleiotrope Rolle in der Modulation der Ausrichtung des Kohlenstofffluss durch verschiedener Stoffwechselwege des Energiemetabolismus. Während FruR einen negativen Einfluss auf die Expression von Genen der Glykolyse und des Entner-Doudoroff-Weges ausübt (RAMSEIER, 1996), fungiert CRP bei einigen der Gene als Aktivator. Auch bei Crp (***catabolism repressor protein***) handelt es sich um einen dualen transkriptionellen Regulator, der die Expression einer Reihe von Genen kontrolliert, die in den Abbau von Kohlenstoffsubstraten (mit Ausnahme von Glukose) involviert sind (KOLB *et al.*, 1993). Zusätzlich erfolgt posttranskriptionell eine positive Kontrolle der Glykolyse durch Csr (***carbon storage regulator***) (ROMEO, 1998). Die posttranskriptionelle Regulation erfolgt durch Bindung von CsrA an das Zieltranskript und die damit verbundene Stabilisierung/ Destabilisierung der mRNA. Interessant an diesem Sachverhalt ist die Tatsache, dass auch die *clb*-Gene einer Kontrolle durch CsrA unterliegen (S. Homburg, Würzburg, persönlich). Aufgrund der zahlreichen an der globalen Kontrolle des Kohlenhydratmetabolismus beteiligten Regulatoren ist es allerdings schwierig anhand der vorliegenden Daten eine Verbindung zwischen den verminderten Expressionsraten der Gene der Glykolyse, des Pyruvatmetabolismus und der zuckerspezifischen Transporter in Anwesenheit des Colibactin-Genclusters zu finden.

Weiterhin konnte bei der vergleichenden Transkriptomanalyse der Stämme *E. coli* Nissle 1917 mit *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS eine 7-fach verringerte Expression eines Genes mit Homologie zu *c1273* bzw. *flu*, welches für das Antigen 43 kodiert, im Colibactin-produzierenden Stamm beobachtet werden. Der Autotransporter spielt nachweislich eine Rolle in der Autoaggregation und Biofilmbildung von *E. coli* (DIDERICHSEN, 1980; DA RE *et al.*, 2007; Beloin *et al.*, 2003). Die Expression von *flu* ist phasenvariabel kontrolliert durch die aufeinander abgestimmten Aktivitäten der Dam-Methylase (positive Regulation) und OxyR (negative Regulation) (HENDERSON & OWEN, 1999), wobei die Phasenvariation durch die Konkurrenz der Dam-Methylase und OxyR um unmethylierte GATC-Sequenzen in der regulatorischen Sequenz des *agn43* Gens hervorgerufen wird. In oxidierter Form (OxyR<sup>ox</sup>) aktiviert OxyR eine Reihe von Genen, deren Produkte reaktive Sauerstoffkomponenten eliminieren. In reduzierter Form (OxyR<sup>red</sup>) reprimiert der Transkriptionsfaktor neben seiner eigenen Transkription nur noch die Expression von *flu* (SCHEMBRI *et al.* 2003). Auch in den upstream-Bereichen der meisten *clb*-Gene konnten Erkennungssequenzen für OxyR

identifiziert werden. Untersuchungen ergaben allerdings eine leicht erhöhte Tendenz zur Autoaggregation sowie zur Biofilmbildung im Colibactin-produzierenden Stamm, was den in der Transkriptomanalyse erhaltenen Daten widerspricht. Die 7-fach verringerte Expression des *agn43* Gens im Colibactin-produzierenden Stamm *E. coli* Nissle 1917 sollte logischerweise auch in einer verminderten Biofilmbildung des Stammes resultieren, da das Membranprotein durch die Vermittlung von Zell-Zell-Wechselwirkungen die Biofilmentwicklung in *E. coli* positiv beeinflusst (DANESE *et al.*, 2000). Zu berücksichtigen bleibt aber, dass eine mögliche Assoziation Colibactins mit der Zelloberfläche dem Stamm unter Umständen eine bessere Anheftung an künstliche Oberflächen ermöglicht. Mit der erhöhten Expression des *agn43* im Colibactin-negativen *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS wirkt der Stamm möglicherweise auch dem Verlust des Colibactins entgegen. Auf das Phänomen oberflächenassoziierter Polyketide und deren Einfluss auf die Fähigkeit der Biofilmbildung von Mikroorganismen wird detailliert unter 6.5.2 eingegangen.

Zusätzlich konnte in der Transkriptom-Analyse eine Veränderung der Expression mehrerer Gene beobachtet werden, deren Produkte der Peptidoglycan-, Phospholipid-, Lipid A- und der Lipopolysaccharid-Biosynthese (u.a. *arnB*, *arnC*, *rfaD*, *rfaJ*, *rfaY*) zuzuordnen sind und deren Transkription scheinbar durch die Colibactin-Synthese inhibiert wird. Eine Beeinträchtigung der Zellwandbiosynthese auf Ebene der Transkription durch Polyketide ist bisher nicht beschrieben. Eine Beeinflussung der Oberflächenstruktur ist nur bekannt durch direkte Beteiligung von PKS an der Synthese oberflächenassoziierter Lipide. Beobachtet wurde dies z.B. in *Mycobacterium*. Hier führte die Deletion des Gens MSMEG\_4727 (Ortholog zur Polyketidsynthase Pks5 aus *M. tuberculosis*) zum Abbruch der Synthese oberflächenassoziierter Glykolipide (ETIENNE *et al.*, 2009). Eine weiterführende Überprüfung der Zellwandbeschaffenheit in Abhängigkeit von der Colibactin-Synthese zeigte allerdings keine auffälligen Veränderungen. So ergab eine Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration von Polymyxin B, einem Antibiotikum dessen Aktivität zu einer Störung der normalen LPS-Anordnung und einer erhöhten Durchlässigkeit der Membran führt, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stämmen *E. coli* Nissle 1917 und *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS. Auch eine Darstellung des LPS mittels Silberfärbung von *E. coli* Nissle 1917 sowie der Colibactin-negativen Mutante *E. coli* Nissle 1917 *rpsL* K42R *clbA::npt* ergab keine offensichtlichen Unterschiede (PUTZE, 2009). Daher kann im vorliegenden Fall davon ausgegangen werden, dass die Deregulation einiger an der Zellwandbiosynthese beteiligter Gene im Colibactin-produzierenden *E. coli* Stamm Nissle 1917 keine Veränderung der Zellwandstruktur nach sich zieht.

Des Weiteren wurde bei der Transkriptomanalyse eine Gruppe von Genen identifiziert, die im Wildtyp-Stamm bis zu 8-fach verringerte Transkriptionsraten aufwiesen (*c0283*, *c0284*, *c0285*, *c0286* und *c0287*). Eine Untersuchung der Genexpression dieser Gene mittels

quantitativer RT-PCR ermöglichte eine Verifizierung der Microarray-Daten und darüber hinaus eine Identifizierung weiterer Gene des Genclusters (*c0281* und *c0282*), deren Expression im Colibactin-produzierenden Stamm ebenfalls verminderte Expressionsraten aufwies. Die Gene kodieren ausnahmslos für Proteine mit unbekannter Funktion, von denen allerdings einige interessante Motife besitzen. So trägt das Protein C0286 ein Motif, das Homologien zum humanen Apolipoprotein ApoE aufzeigt. ApoE vermittelt im reversen Cholesterol-Transportweg die Aufnahme von Cholesterol und dessen Transport zur Leber durch seine hohe Affinität zu verschiedenen zellulären Rezeptoren wie z.B. dem LDL (*low-density lipoprotein*) Rezeptor (MAHLEY *et al.*, 2006). Bei C0284 handelt es sich um ein Patatin-ähnliches Protein. Diese Proteinfamilie besteht aus verschiedenen Patatin-Glykoproteinen. Den anfänglich in der Kartoffel als Speicherproteine beschriebenen Patatinen, konnte in weiteren Studien eine Rolle in der Hydrolyse von Phospho-, Glyko- und Sulfolipiden sowie Membranlipiden nachgewiesen werden (MIGNERY *et al.*, 1988). Ein weiteres Protein, C0287, weist Homologien zur Familie der Ras-ähnlichen GTPasen auf. Vertreter dieser Familie kontrollieren eine Vielzahl von zellulären Funktionen in Eukaryoten, wie z.B. die Regulation der Genexpression, die Reorganisation des Zytoskeletts oder die Mikrotubuli-Organisation. (WENNERBERG *et al.*, 2005) Das Genprodukt eines anderen Vertreters aus diesem Gencluster, *c0283*, zeigt Homologien zum Komplex der NADH-Ubiquinonoxidoreduktase (N-Terminus, Kette 5), welche für den Elektronentransport von NADH zum Ubiquinon verantwortlich ist (BRANDT, 2006).

### **6.5 Biologische Funktion von Colibactin -Beitrag der Colibactin-Synthese zur Fitness von *E. coli* Nissle 1917**

Das Colibactin-Gencluster konnte sowohl in pathogenen als auch in kommensalen *E. coli*-Stämmen, die zum grössten Teil der phylogenetischen Gruppe B2 zuzuordnen sind sowie weiteren Vertretern der Familie der *Enterobacteriaceae* (*Citrobacter koseri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*) nachgewiesen werden (PUTZE *et al.*, 2009). Das Gencluster weist mehrere typische Charakteristika einer horizontal erworbenen genomischen Insel auf. Desweiteren konnte mittels etablierter Methoden zur Überprüfung der Stabilität von genomischen Inseln eine geringe Deletionsrate ermittelt werden, was darauf hindeutet, dass diese Insel unter natürlichen Bedingungen nicht deletiert (HOCHHUT *et al.*, 2006). Da bakterielle Genome dazu tendieren nicht benötigte DNA-Abschnitte, die keinen selektiven Vorteil vermitteln, zu verlieren, kann horizontal erworbenen Elementen zumeist eine distinkte Funktion zugeordnet werden (DOBRINDT *et al.*, 2004). Daher stellt sich die Frage nach dem selektiven Vorteil, der dem Organismus aus dem Erhalt dieser genomischen Insel erwächst. Aufgrund der durch Colibactin induzierten Veränderungen des eukaryotischen Zellzyklus gehen Theorien bezüglich der biologischen Funktion von Colibactin hauptsächlich davon

aus, dass das möglich Einwirken des Zytotoxins auf intestinale Stammzellen zu einer Verlangsamung der Erneuerung des Darmepithels führen und damit eine längere Persistenz der Mikroorganismen im Darm ermöglichen könnte (NOUGAYRÈDE *et al.*, 2006). Allerdings zeigten kompetitive und nichtkompetitive Kolonisierungsstudien im murinen Intestinalmodell keine signifikanten Unterschiede zwischen Colibactin-positiven und –negativen Bakterienstämmen bezüglich der Kolonisierungsfähigkeit (PUTZE, Universität Würzburg, Dissertation, 2009). Dieses Resultat ist aber vermutlich darauf zurückzuführen, dass das Darmepithel in der Regel von einer dicken Mukusschicht bekleidet ist und daher kein direkter Kontakt zwischen Bakterien und Epithelzellen zustande kommt. Da aber zumindest in Zellkultur der direkte Kontakt zwischen Bakterien und Epithelzellen für die Ausprägung des zytopathischen Effekts unerlässlich ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch den fehlenden direkten Kontakt *in vivo* ein Colibactin-vermittelter Effekt ausbleibt. Nicht ausser Acht lassen sollte man allerdings, dass die zytotoxische Aktivität möglicherweise nur eine Nebenerscheinung des Colibactins ist und nicht der eigentlichen biologische Funktion für das produzierende Bakterium entsprechen. So finden sich DNA-schädigende Aktivitäten häufig bei antibiotisch wirksamen Polyketiden wie z.B. bei Vertretern der Enediyne (MARINELLI, 2009). Enediyne verursachen wie Colibactin, Doppelstrangbrüche in der DNA. Die Spaltung der DNA erfolgt durch eine Interkalierung des Enediynes mit der kleinen Furche der DNA-Doppelhelix, einen Entzug von Protonen ( $H^+$ ) und die nachfolgende Reaktion des DNA-Radikals mit Sauerstoff, was letztlich zu einer Unterbrechung des Zellzyklus führt (MINTO & BLACKLOCK, 2008). Neben den antibiotisch wirksamen Polyketiden können auch einige Siderophore DNA-Schädigungen an eukaryotischen Zellen hervorrufen, darunter auch das aus *Nocardia brasiliensis* isolierte Brasilibactin A (TSUDA *et al.*, 2005). Das zu den Mycobactinen zählende Polyketid führt zu einer Induktion der Caspase-3, welche eine wichtige Funktion im Transduktionsweg der Apoptose spielt (VISWANATH *et al.* 2001). Um der Frage nach dem selektiven Vorteil, den die Propagation des Colibactin-Genclusters mit sich bringt, weiter nachzugehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine phänotypische Charakterisierung/ Vergleich des Colibactin produzierenden Stammes *E. coli* Nissle 1917 und der Deletionsmutante *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS vorgenommen.

### 6.5.1 Eisenaufnahme

Für nahezu alle Lebewesen ist Eisen ein essentielles Element. Da es unter normalen Umständen unlöslich in Form von Fe(III)-Ionen vorliegt, ist es nur begrenzt zugänglich. Infolgedessen haben Bakterien leistungsfähige Eisenaufnahmesysteme entwickelt. In Antwort auf Eisenmangel werden selektive Eisen-Chelatoren (Siderophoren) produziert und sezerniert, die eine starke Affinität zu Eisen (III)-Ionen besitzen (FARALDO-GÓMEZ & SANSOM,

2003). *E. coli* Nissle1917 produziert als Antwort auf Eisenmangel insgesamt vier Siderophoresysteme, darunter das nichtribosomale Peptid Enterobactin und Yersiniabactin, ein Hybrid aus Polyketid und nichtribosomalem Peptid. Auch im Fall von Colibactin deuten erste Untersuchungen des Stammes *E. coli* Nissle 1917 und einer Colibactin-negativen Mutante bezüglich der Produktion von Eisenaufnahme-Systemen auf eine mögliche Funktion des PK/ NRP-Hybrids zur Eisenkomplexierung hin. Unter bestimmten Wachstumsbedingungen konnten im Überstand des Colibactin-produzierenden Stammes höhere Mengen an Eisen (III)-komplexierenden Substanzen detektiert werden. In der Regel wird die Synthese von Siderophoren in *E. coli* durch den globalen Regulator Fur (**F**erric **U**ptake **R**egulation) kontrolliert (HANTKE, 2001). Steht dem Bakterienstamm ausreichend Eisen zur Verfügung, liegt Fur in gebundener Form mit Fe(II) vor. In diesem Zustand lagert sich der Regulator an die DNA an. Normalerweise verhindert die Bindung des Fur-Fe(II)-Komplexes die Anlagerung der RNA-Polymerase, was zur Reprimierung der Expression stromabwärts liegender Gene führt. Unter Eisen-limitierenden Bedingungen zerfällt der Komplex und Fur ist nicht länger in der Lage die DNA zu binden und ermöglicht so die Expression der Gene (MILLS & MARLETTA, 2005). Neben dem globalen Regulator Fur existieren in einigen Fällen Regulatoren niedrigerer Rangordnung, die bei der Siderophorensynthese als Aktivatoren fungieren. Diese reagieren auf extra- oder intrazellulär anwesende Siderophor-Eisen-Komplexe. Unterteilt werden diese Regulatoren in (i) alternative Sigmafaktoren, (ii) Zweikomponentensysteme, (iii) Regulatoren vom AraC-Typ sowie (iv) weitere transkriptionelle Regulatoren (MIETHKE & MARAHIEL, 2007). Zu diesen transkriptionellen Aktivatoren gehören u.a. der Sigmafaktor FecI aus *E. coli*. FecI reguliert die Expression der Eisen-Dicitrat-Gene (*fecABCDE*). Hier erfolgt indirekt über den FecA-Rezeptor eine Messung des extrazellulär vorliegenden Eisen-Dicitrats. FecA signalisiert bei Bindung eines Eisen-Dicitrat-Komplexes dies an das integrale zytoplasmatische Membranprotein FecR, welches letztlich FecI aktiviert und zur Induktion der Expression von *fecABCDE* führt (ENZ *et al.*, 2000). Auch YbtA, scheint dieser Gruppe von Regulatoren zuzuordnen zu sein. YbtA, ein transkriptioneller Aktivator vom AraC-Typ, ist in *Yersinia pestis*, *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* für die Induktion der Yersiniabactinsynthese-Gene *irp21 ybtUTE* und *ybtPQXS* sowie der Salicylat-Synthese und des Yersiniabactinrezeptors FyuA verantwortlich. Es wird angenommen, dass die Wechselwirkung des YbtA-DNA-Komplexes mit Fe-Yersiniabactin notwendig für die Bindung des RNA-Polymerase-Komplexes ist (PERRY *et al.*, 1999).

Unter diesem Aspekt betrachtet, erscheinen die Ergebnisse zur Untersuchung der Siderophorproduktion in *E. coli* Nissle 1917 ungewöhnlich, da sie dem gängigen Regulations-Modell durch Fur widersprechen. Während unter Eisen-limitierenden Bedingungen zwischen *E. coli* Nissle 1917 und einer Colibactin-negativen Mutante,

bezüglich der Produktion von Eisenaufnahme-Systemen keine Unterschiede festzustellen waren, wurden beim Vergleich der beiden Stämme unter normalen Wachstumsbedingungen in M63-Minimalmedium höhere Mengen an Eisen (III)-komplexierenden Substanzen in den Überständen des Colibactin-produzierenden Stammes detektiert. Bereits in vorangegangenen Untersuchungen zeigte sich beim Wachstum von *E. coli* Nissle 1917 unter Eisen-limitierenden Bedingungen eine verminderte Expression der Colibactin-Gene *clbQ*, *clbB* und *clbR* (HOMBURG, 2007).

### 6.5.2 Biofilmbildung

Im Allgemeinen definiert sich ein Biofilm als eine strukturierte, von einer extrazellulären Matrix umschlossene Gemeinschaft von Bakterien, die an biotische oder abiotische Oberflächen gebunden ist (HOUDT & MICHIELS, 2005). Die Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix stellen Proteine und extrazelluläre Polysaccharide dar. Durch seine Struktur vermittelt der Biofilm Schutz und ermöglicht das Überleben in einer unwirtlichen Umgebung. Unterstützt wird die Biofilmbildung durch zahlreiche Faktoren, wie z.B. durch die Ausbildung oberflächenassoziierter Proteine, deren Expression einer strengen Kontrolle unterliegen, darunter u.a. Flagellen (PRATT & KOLTER, 1998), Typ I-Fimbrien (FERNANDEZ & BERENQUER, 2000), Curli-Fimbrien (OLSÉN *et al.*, 1989) und Autotransporterproteine (DANESE *et al.*, 2000; SHERLOCK *et al.*, 2004; LINDENTHAL & ELSINGHORST, 2001). Die Beteiligung dieser Proteine umfasst die Schritte von der ersten Anheftung, über die irreversible Adhäsion der Bakterien bis hin zur Ausbildung des vollständigen Biofilms (BELOIN *et al.*, 2008). Neben den oben erwähnten Faktoren kann die Fähigkeit zur Biofilmbildung aber auch durch die Synthese oberflächenaktiver PK/ NRP definiert werden. So belegen zahlreiche Studien in *Pseudomonas* und *Bacillus* die Bedeutsamkeit zyklischer Lipopeptide in der korrekten Ausbildung von Biofilmen. Beispielsweise zeigten *Pseudomonas fluorescens*-Stämme mit einer fehlerhaften Massetolid-Synthese eine Beeinträchtigung in ihrer Fähigkeit zur Biofilmbildung (DE BRUIJN, 2008). Auch das von *Bacillus subtilis* produzierte antibiotisch wirksame Lipopeptid Surfactin scheint aufgrund seiner spezifischen oberflächen- und membranaktiven Fähigkeiten eine wichtige Rolle in der Biofilmbildung zu spielen (HOFEMEISTER *et al.*, 2004). Allerdings führt in anderen Fällen die Synthese zyklischer Lipopeptide wie z.B. Arthofactin oder Putisolvin zu einer Beeinträchtigung der Biofilmbildung (ROONGSAWANG *et al.*, 2003; DUBERN *et al.*, 2008). Völlig unklar ist auf welchem Wege zyklische Lipopeptide die Biofilmbildung beeinflussen. Allerdings wird angenommen, dass ihr Effekt auf die hydrophoben Eigenschaften der Zelloberfläche eine Rolle in diesem Prozess spielt. Neben den oberflächenaktiven zyklischen Lipopeptiden ist eine zweite funktionelle Gruppe der NRP/PK in der Lage Einfluss auf die Biofilmbildung zu

nehmen. So zeigen Studien in *Pseudomonas* und *E. coli* eine positive Korrelation zwischen der Siderophoren-Biosynthese und der Fähigkeit des Stammes zur Biofilmbildung auf: Sowohl in *Pseudomonas* als auch in *E. coli* führten Defekte in der Pyoverdinin- bzw. Yersiniabactin-Synthese und Yersiniabactin zu einer verminderten Biofilmbildung (BANIN *et al.*, 2005; HANCOCK *et al.*, 2008). Zurückzuführen ist dies auf die Abhängigkeit der Biofilmbildung von der Eisenverfügbarkeit.

Untersuchungen zur Biofilmbildung in Abhängigkeit von der Fähigkeit Colibactin zu produzieren, ergaben eine leicht erhöhte Biofilmbildung des PK-NRP-produzierenden Stammes *E. coli* Nissle 1917. Auf welche Weise die Anwesenheit Colibactins Einfluss auf die Biofilmbildung des produzierenden Stammes nimmt ist jedoch unklar.

## 6.6 Fazit und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnene Erkenntnisse zur Struktur und Regulation der Colibactin-Gene sowie zur biologischen Funktion können als Grundlage für weitere Arbeiten dienen. Zwar kann über den selektiven Vorteil der dem Organismus aus dem Erhalt des Colibactinclusters erwächst weiterhin nur spekuliert werden, allerdings könnte durch weitere Arbeiten geklärt werden, in welcher Weise Colibactin tatsächlich in die Eisenaufnahme bzw. Biofilmbildung des Organismus eingreift. Auch die vollständige Aufklärung der regulatorischen Mechanismen, die die Expression des hybriden nichtribosomalen Peptid-Polyketids beeinflussen, ist weiterhin von grossem Interesse. Die neugewonnenen Erkenntnisse zur Regulation der Colibactinsynthese zeigen eine komplexe Kontrolle die neben dem Zweikomponentensystem BarA/ UvrY und den regulatorischen RNAs CsrA/CsrB, auch durch den globalen Transkriptionsfaktor H-NS und den Colibactin spezifischen transkriptionellen Regulator ClbR erfolgt. Eine Aufklärung des Zusammenspiels dieser einzelnen Faktoren könnten Aufschluss über Bedingungen erhöhter PK/ NRP Synthese geben.

Allerdings ergeben sich bereits durch die erweiterten Kenntnisse über die Regulationsmechanismen sowie den Nachweis der Funktionsfähigkeit Colibactins im heterologen Wirtssystem *Pseudomonas putida* neue Möglichkeiten für die Überexpression und Isolation der Verbindung, was weiterhin vorrangiges Ziel ist, um Struktur und biologische Aktivität der Komponente vollständig aufklären zu können.

## 7. Literaturverzeichnis

**Abraham R. T., Wiederrecht G. J.** (1996) Immunopharmacology of rapamycin. *Annual Review of Immunology* **14**: 483-510

**Agnoli K., Lowe C. A., Farmer K. L., Husnain S. I., Thomas M. S.** (2006) The ornibactin biosynthesis and transport genes of *Burkholderia cenocepacia* are regulated by an extracytoplasmic function  $\delta$  factor which is part of the fur regulon. *Journal of Bacteriology*. **188**: 3631-3644

**Bangera M. G., Thomashow L. S.** (1999) Identification and Characterization of a Gene Cluster for Synthesis of the Polyketide Antibiotic 2,4-Diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *Journal of Bacteriology* **181** (10): 3155-3163

**Banin E. Vasil M.L., Greenberg E. P.** (2005) Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA* **102**:11076-11081

**Bell P.J.L., Karuso P.** (2003) Epicocconone, a novel fluorescent compound from the fungus *Epicoccum nigrum*. *Journal of the American Chemical Society*. **125**, 9304.

**Bellavia D., Forte G. I., Sisino G., Sisino G., Barbieri R** (2008) A new method for the mapping of 5' ends of RNAs. *Analytical Biochemistry* **378**:113-114

**Beloin C. Roux A., Ghigo J.-M.** (2008) *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*. **322**: 249–289

**Bender C. L., Alarcón-Chaidez F., Gross D. C.** (1999) *Pseudomonas syringae* Phytotoxins: Mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **63** (2): 266-292

**Berger, H., Hacker, J., Juarez, A., Hughes, C., & Goebel, W.** (1982) Cloning of the chromosomal determinants encoding hemolysin production and mannose-resistant hemagglutination in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **152**:1241–1247.

**Black P.N., DiRusso C.C.** (1994) Molecular and biochemical analyses of fatty acid transport, metabolism, and gene regulation in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1210** (2): 123-145

**Blattner, F. R., Plunkett, G., 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., & Shao, Y.** (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**:1453–1474.

**Bobik C., Meilhoc E., Batut J.** (2006) FixJ: a major regulator of the oxygen limitation response and late symbiotic functions of *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* **188** (13): 4890-4902

**Boger D. L., Cai H.** (1999) Bleomycin: Untersuchungen zu Synthese und Wirkungsmechanismus. *Angewandte Chemie. International Edition* **111** (4): 470-500

## LITERATURVERZEICHNIS

- Bok J. W., Keller N. P.** (2004) LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eucaryotic Cell* **3**: 527-535
- Brandt U.** (2006) Energy converting NADH:quinone oxidoreductase. *Annu.Rev. Biochem.* **75**: 69-92
- Bruijn de I., Kock de M. J. D., Waard de P., Beek de T. A., Raaijmakers J. M.** (2008) Massetolide A biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Bacteriology* **190** (8): 2777-2789
- Buckling A., Rainey P. B.** (2002) Antagonistic coevolution between a bacterium and a bacteriophage. *Proc Biol. Sci.* **269**: 931-936
- Cane D. E., Walsh C.T.** (1999) The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chemistry and Biology* **6**: R319–R325
- Canny G. O., McCormick B. A.** (2008) Bacteria in the intestine, helpful residents or enemies from within. *Infection and Immunity* **76** (8): 3360-3373
- Carrier T. A., Keasling J. D.** (1997) Controlling messenger RNA stability in bacteria: strategies for engineering gene expression. *Biotechnol Prog.* **13**: 699-708
- Cherepanov, P. P. & Wackernagel, W.** (1995) Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**:9–14.
- Chng C., um A. M., Vroom J. A., Kao C. M.** (2008). A key developmental regulator controls the synthesis of the antibiotic erythromycin in *Saccharopolyspora erythraea*. *PNAS* **105**: 11346–11351
- Coghlan, D. R., Mackintosh, J. & Karuso, P.** (2005). Mechanism of reversible fluorescent staining of protein with Epicocconone. *Organic Letters*. **7**, 2401-240.
- Cole S. T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S. V., Eiglmeier K., Gas S., Barry III C. E., Tekaia F., Badcock K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jagels K., Krogh A., McLean J., Moule S., Murphy L., Oliver K., Osborne J., Quail M. A., Rajandream M.-A., Rogers J., Rutter S., Seeger K., Skelton J., Squares R., Squares S., Sulston J. E., Taylor K., Whitehead S., Barrell B. G.** (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**: 537-544
- Condon C.** (2003). RNA processing and degradation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67** (2): 157-174
- Crater D. L., Moran C. P.** (2001) Identification of a DNA binding region in GerE from *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **183** (14): 4183-4189
- Crosa H. J & Walsh C. T.** (2002) Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**: 223-249
- Cukrowska B., Lodinova-Zadnikova R., Enders C., Sonnenborn U., Schulze J., Tlaskalova-Hogenova H.** (2002) Specific proliferative and antibody response of premature infants to intestinal colonization with non-pathogenic probiotic *E. coli* strain Nissle 1917. *Scand. J. Immunol.* **55**: 204-209

## LITERATURVERZEICHNIS

- Danese P. N., Pratt L. A., Dove S. L. Kolter R.** (2000) The outer membrane protein, Antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Molecular Microbiology* **37** (2): 424-432
- Da Re S., Quéré Le B., Ghigo J.-M., Beloin C.** (2007) Tight modulation of *Escherichia coli* bacterial biofilm formation through controlled expression of adhesion factors. *Applied and Environmental Microbiology* **73** (10): 3391-3403
- DÁri R, Lin R. T., Newman E. B.** (1993) The leucine-responsive regulatory protein: more than a regulator? *Trends Biochem. Sci.* **18**: 260-263
- Datsenko, K. A. &Wanner, B. L.** (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6640–6645.
- Dethlefsen L., Mc-Fall-Ngai M., Relman D. A.** (2007) an ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature Review* 449:811-818
- Diderichsen, B.** (1980). *Flu*, a metastable gene controlling surface properties of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **141**:858–867.
- DiRusso C. C., Heimert T. L., Metzger A. K.** (1992) Characterization of FadR, a global transcriptional regulator of fatty acid metabolism in *Escherichia coli*. Interaction with the fadB promoter is prevented by long chain fatty acyl coenzyme A. *J. Biol. Chem.* **267**: 8685-8691
- DiRusso C.C., Metzger A. K., Heimert T. L.** (1993) Regulation of transcription of genes required for fatty acid transport and unsaturated fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli* by FadR. *Mol. Microbiol.* **7**: 311-322
- DiRusso C.C., Black P.N., Weimar J.D.** (1999) Molecular inroads into the regulation and metabolism of fatty acids, lessons from bacteria. *Progress in Lipid Research* **38** (2): 129-197
- Dobrindt U., Hochhut B., Hentschel U., Hacker J.** (2004) Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol* **2** (5): 414-424
- Dong T., Schellhorn H. E.** Role of RpoS in virulence of pathogens. *Infection and Immunity* **78** (3): 887-897
- Drlica K., Rouviere-Yaniv J.** (1987) Histone-like proteins of bacteria. *Microbiol. Rev.* **51**: 301-319
- Enz S., Mahren S., Stroehler U. H., Braun V.** (2000) Surface signaling in ferric citrate transport gene induction: interaction of the FecA, FecR, and FecI regulatory proteins. *Journal of Bacteriology* **182** (3): 637-646
- Etienne G., Malaga W., Laval F., Lemassu A., Guilhot C., Daffé M.** (2009) Identification of the Polyketide synthase involved in the biosynthesis of the surface-exposed lipooligosaccharides in *Mycobacteria*. *Journal of Bacteriology* **191** (8): 2613-2621

## LITERATURVERZEICHNIS

**Felnagle E. A., Jackson E. E., Chan Y. A., Podevels A. M., Berti A. D., McMahon M. D., Thomas M. G.** (2007) Nonribosomal peptide synthetases involved in production of medically relevant natural products. *Molecular Pharmaceutics. Reviews* **5** (2): 191-211

**Feng G. H., Leonard T. J.** (1998) Culture conditions control expression of the genes for aflatoxin and sterigmatocystin in *Aspergillus parasiticus* and *A. nidulans*. *Applied and Environmental Microbiology* **64** (6): 2275-2277

**Fernández L. A., Berenguer J.** (2000) Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **24** : 21-44

**Fernández-Moreno, M. A., Martínez, E., Boto, L., Hopwood, D. A. & Malpartida, F.** (1992). Nucleotide sequence and deduced function of a set of co-transcribed genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2) including the polyketide synthase for the antibiotic actinorhodin. *J Biol Chem* **267**, 19278±19290.

**Fischbach M. A., Walsh C. T.** (2006) Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: Logic, machinery, and mechanisms. *Chem. Rev.* **106**: 3468-3496

**Garcia-del-Mundo X., Maroto P., Gumà J., Sastre J., López Brea M., Arranz J. A., Lainez N., de Prado D. S., Aparicio J., Piulats J. M., Pérez X., Germá-Lluch J.R.** (2008) Chemotherapy as an alternative to radiotherapy in the treatment of stage IIA and IIB testicular seminoma: a Spanish germ cell cancer group study. *Journal of Clinical Oncology* **26** (33): 5416-5421

**Goeffroy V. A., Fetherston J. D., Perry R. D.** *Yersinia pestis* YbtU and YbtT are involved in synthesis of the siderophore yersiniabactin but have different effects on regulation. *Infection and Immunity* **68**: 4452-4461

**Good L. M., Miller M. D., High W. A.** (2010) Intralesional agents in the management of cutaneous malignancy: a review. *Journal of American Academy of Dermatology*

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

**Gross F., Gottschalk D., Müller R.** (2005) Posttranslational modification of myxobacterial carrier protein domains in *Pseudomonas* sp. by an intrinsic phosphopantetheinyl transferase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**: 66-74

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

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

**Gu G., Wang N., Chaney N., Smith L., Lu S.** (2009) AmbR1 is a key transcriptional regulator for production of antifungal activity of *Burkholderia contaminans* strain MS14. *FEMS Microbiol Lett* **297**: 54-60

## LITERATURVERZEICHNIS

- Hajjaj H., Niederberger P., Duboc P.** (2001) Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemically defined medium. Applied and Environmental Microbiology **67**(6): 2596-2602
- Han M.-J., Lee J. W., Lee S. Y., Yoo J. S.** (2008) Proteome-level responses of *Escherichia coli* to long-chain fatty acids and use of fatty acid inducible promoter in protein production. Journal of Biomedicine and Biotechnology
- Hancock V., Ferrières L., Klemm P.** (2008) The ferric yersiniabactin uptake receptor FyuA is required for efficient biofilm formation by urinary tract infectious *Escherichia coli* in human urine. Microbiology **154**: 167-175
- Hantke K.** (2001) Iron and metal regulation in bacteria. Curr. Op. Microbiol. **4**(2): 172-177
- Hatori M, Taylor T. D.** (2009) The human intestinal microbiome: A new frontier of human biology. DNA Research **16**: 1-12
- Heeb S., Itoh Y., Nishijyo T., Schnider U., Keel C., Wade J., Walsh U. , O'Gara F., Haas D.** (2000) Small, stable shuttle vectors based on the minimal pVS1 replicon for use in gram-negative, plant-associated bacteria. Molecular Plant-Microbe Interaction **13**:232-237
- Henderson I. R., 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. Journal of Bacteriology **181** (7): 2132-2141
- Hengge R.** (2009) Proteolysis of  $\delta^S$  (RpoS) and the general stress response in *Escherichia coli*. Research in Microbiology **160**: 667-676
- Herlt A. J. Richards R. W., Wu J. P.** (1985) The structure of streptonigrin, and a comment on the biosynthesis of the streptonigrin antibiotics. J Antibiot **38**: 516-518
- Hirakawa H., Inazumi Y., Masaki T., Hirata T., Yamaguchi A.** (2005) Indole induces the expression of multidrug exporter genes in *Escherichia coli*. Molecular Microbiology **55** (4) 1113-1126
- Hirakawa H., Kodama T., Takumi-Kobayashi A., Honda T., Yamaguchi A.** (2009) Secreted indole serves as a signal for expression of type III secretion system translocators in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Microbiology **155**: 541-550
- Hochhut B., Wilde C., Balling G., Middendorf B., Dobrindt U., Brzuskiwicz, Gottschalk G., Carniel E., Hacker J.** (2006) Role of pathogenicity island-associated integrases in the genome plasticity of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. Molecular Microbiology **61**(3): 584-595
- Hofemeister J., Conrad B., Adler B., Hofemeister B., Feesche J., Kucheryava N., Steinborn G., Franke P., Grammel N., Zwintscher A., Leenders F., Hitzeroth G., Vater J.** (2004) Genetic analysis of the biosynthesis of non-ribosomal peptide and polyketide-like antibiotics, iron uptake and biofilm formation by *Bacillus subtilis* A1/3. Mol. Gen. Genomics **272**: 363-378
- Homburg S.** (2007a) Untersuchungen zur Molekularbiologie von *Escherichia coli*-Wildstämmen. Dissertation

## LITERATURVERZEICHNIS

- Homburg S., Oswald E., Hacker J., Dobrindt U.** (2007b) Expression analysis of the colibactin gene cluster coding for a novel polyketide in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett **275**: 255-262
- Houdt van R., Michiels C. W.** (2005) Role of bacterial surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. Research in Microbiology **156**: 626-633
- Huang S., Houghton P. J.** (2001) Mechanisms of resistance to rapamycins. Drug Resistance Updates **4**: 378-391
- Huang S., Bjornsti M.-A., Houghton P. J.** (2003) Rapamycins-Mechanisms of action and cellular resistance. Cancer Biology & Therapy **2** (3): 222-232
- Hutchinson C. R.** (1999) Microbial Polyketide synthases: more and more prolific. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **96**:3336-3338
- Hutchinson C. R., Decker H., Madduri K., Otten S. L., Tang L.** (1993) Genetic control of polyketide. Antonie van Leeuwenhoek **64**: 165-176
- Jain M., Cox J. S.** (2005) Interaction between polyketide synthase and transporter suggests coupled synthesis and export of virulence lipid in *M. Tuberculosis*. PLOS Pathogens: **1**: 12-19
- Janga S. C., Babu M. M.** (2009) Transcript stability in the protein interaction network of *Escherichia coli*. Mol. BioSyst. **5**: 154-162
- Jishage M., Ueda S., Ishihama A.** (1996) Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in *Escherichia coli*: intracellular levels of four species of sigma subunit under various growth conditions. J. Bacteriol. **178** (18): 5447-5451
- Johansson J., Mqandin P., Renzoni A., Spinger M., Cossart P.** (2002) An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. Cell **110**(5): 551-561
- Jones A. L., Keller U.** (1997) Biochemistry and genetics of actinomycin production. In: Biotechnology of Antibiotics (Strohl WR, ed), pp 335–361, Marcel Dekker, New York.
- Kaper J. B., Nataro J. P., Mobley H. L. T.** (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. Nature Reviews Microbiology **2**: 123-140
- Klose J.** (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutation in mammals. Hummangenetik **26**: 231-243.
- Kolb A., Busby S., Buc H., Garges S., Adhya S.** (1993) Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. Annu. Rev. Biochem. **62**: 749-795
- Kontnik R., Clardy J.** (2008) Codinaeopsin, an antimalarial Polyketide. Org. Lett. **10** (18): 4149-4154

## LITERATURVERZEICHNIS

- Korhonen, T. K., Valtonen, M. V., Parkkinen, J., Väisänen-Rhen, V., Finne, J., Orskov, F., Orskov, I., Svenson, S. B., Mäkelä, P. H.** (1985) Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis. *Infect Immun* **48**:486–491.
- Krammer H. J., Kämper, von Büнау R., Zieseniß E., Stange C., Schlieger F., Clever I., Schulze J.** Probiotische Arzneimitteltherapie mit *E. coli* Stamm Nissle 1917 (EcN): Ergebnisse einer prospektiven Datenerhebung mit 3807 Patienten. *Z Gastroenterol* **44**: 651-656
- Kruis, W., P. Fric, M. Stolte** (2001). "The mutaflor study group. Maintenance of remission in ulcerative colitis is equally effective with *Escherichia coli* Nissle 1917 and with standard mesalamine." *Gastroenterology*(120 (Supl)): A127.
- Kuruville J.** (2009) Standard therapy of advanced Hodgkin lymphoma. American Society of Hematology. Education Programm Book: 497-506
- Kushner S. R.** (2004) mRNA decay in prokaryotes and eukaryotes: different approaches to a similar problem. *IUBMB Life* **56** (10): 585-594
- Martin J. F., Liras P.** (1976) Rapid incorporation of precursors into candicidin by resting cells of *Streptomyces griseus*. *J. Antibiot* **29**: 1306-1309
- Lazdunski, A. M., Ventre, I., & Sturgis, J. N.** (2004) Regulatory circuits and communication in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* **2**:581–592.
- Lee B., Kroken S., Chou D. Y. T., Robbertse B., Yoder O. C., Turgeon B. G.** (2005) Functional analysis of all ribosomal peptide synthetases in *Cochliobolus heterostrophus* reveals a factor, NPS6, involved in virulence and resistance to oxidative stress. *Eukaryotic Cell* **4** (3): 545-555
- Lee S. W., Edlin G.** (1985) Expression of tetracycline resistance in pBR322 derivatives reduces the reproductive fitness of plasmid-containing *Escherichia coli*. *Gene* **39**: 173-180
- Lindenthal C., Elsinghorst E. A.** (2001) Enterotoxigenic *Escherichia coli* TibA glycoprotein adheres to human epithelial cells. *Infection and Immunity* **69** (1): 52-57
- Liu H., Jiang H., Haltli B., Kulowski K., Muszynska E., Feng X., Summers M., Young M., Graziani E., Koehn F., Carter G. T., He M.** (2009) Rapid cloning and heterologous expression of the Meridamycin biosynthetic gene cluster using a versatile *Escherichia coli* – *Streptomyces* artificial chromosome vector, pSBAC. *J. Nat. Prod.* **72**: 389-395
- Lodinova-Zanikova R., Tlaskalova-Hogenova H., Sonnenborn U.** (1992) Local and serum antibody response in full-term and premature infants after artificial colonization of the intestine with *E. coli* strain Nissle 1917 (Mutaflor®). *Pediatr Allergy Immunology* **3**: 43-48
- Loewen P. C., Hengge-Aronis R.** (1994) The role of the sigma factor  $\delta S$  (KatF) in bacterial global regulation. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**: 53-80

## LITERATURVERZEICHNIS

- Lucht J. M., Dersch P., Kempf B., Bremer E.** (1994) Interactions of the nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS with the regulatory region of osmotically controlled proU operon of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem **269**: 6578-6586
- Mahley R. W., Huang Y., Weisgraber K. H.** (2006) Putting cholesterol in its place: apoE and reverse cholesterol transport. The Journal of Clinical Investigation **116** (5):1226-1229
- Malchow, H. A.** (1997). Crohn's disease and *Escherichia coli*. A new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease? J Clin Gastroenterol **25**(4): 653-8.
- Mallik P., Pratt T. S., Beach M. B., Bradley M. D., Undamatla J., Osuna R.** (2004) Growth phase-dependent regulation and stringent control of *fis* are conserved processes in enteric bacteria and involve a single promoter (*fis P*) in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology **186**: 122-135
- Mantle P. G., Macgeorge K. M.** (1990) The role of monic acid A in pseudomonic acid A biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **33**: 709-711
- Marahiel M. A., Danders W., Krause M., Kleinkauf H.** (1979) Biological Role of Gramicidin-S in spore functions: Studies on Gramicidin-S-negative mutants of *Bacillus brevis* ATCC9999. Eur. J. Biochem **99**: 49-55
- Marahiel M. A., Stachelhaus T., Mootz H. D.** (1997) Modular Peptide Synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. Chem Rev. **97**: 2651-2673
- Mariat D., Firmesse O., Levenez F., Guimaraes V. D., Sokol H., Doré J., Corthier G., Furet J.-P.** (2009) The Firmicutes/ Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. BMC Microbiology **9**
- Marinelli F.** 2009 From microbial products to novel drugs that target a multitude of disease indications. Methods in Enzymology **458**: 29-58
- Martin J.F.** (2004) Phosphate Control of the Biosynthesis of Antibiotics and Other Secondary Metabolites Is Mediated by the PhoR-PhoP System: an Unfinished Story. Journal of Bacteriology **186**: 5197-5201
- Merkel T. J., Nelson D. M., Brauer C. L., Kadner R. J.** (1992) Promoter elements required for positive control of transcription of the *Escherichia coli* *uhpT* gene. Journal of Bacteriology **174** (9): 2763-2770
- Miethke M., Marahiel M. A.** (2007) Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. Microbiology and Molecular Biology Reviews **71**(3):413-451
- Mignery G. A., Pikaard C. S., Park W. D.** (1988) Molecular characterization of the patatin multigen family of potato. Gene **62** (1): 27-44
- Miller M. C., Fetherston J. D., Pickett C. L., Brobov A. G., Weaver R. H., DeMoll E., Perry R. D.** (2010) Reduced synthesis of ybt siderophore or production of aberrant ybt-like molecules activate transcription of yersiniabactin genes in *Yersinia pestis*. Microbiology **156**:2226-2238

## LITERATURVERZEICHNIS

- Mills S. A., Marletta M. A.** (2005) Metal binding characteristics and role of iron oxidation in the ferric uptake regulator from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **44** (41): 13553-13559
- Minto R. E., Blacklock B. J.** (2008) Biosynthesis and function of polyacetylenes and allied natural products. *Prog Lipid Res.* **47** (4): 233-306
- Miyamoto, C. M., Lin, Y. H., & Meighen, E. A.** (2000) Control of bioluminescence in *Vibrio fischeri* by the LuxO signal response regulator. *Mol Microbiol* **36**:594–607.
- Mobley, H. L., Green, D. M., Trifillis, A. L., Johnson, D. E., Chippendale, G. R., Lockett, C. V., Jones, B. D., & 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**:1281–1289.
- Möllenbrink, M. and E. Bruckschen** (1994). Treatment of chronic constipation with physiologic *Escherichia coli* bacteria. Results of a clinical study of the effectiveness and tolerance of microbiological therapy with the *E. coli* Nissle 1917 strain (Mutaflor). *Med Klin (Munich)* **89(11)**: 587-93.
- Moore B. S., Hopke J. N.** (2001) Discovery of a new bacterial polyketide biosynthetic pathway. *Chem. Biochem.* **2**:35-38
- Münch R., Hiller K., Barg H., Heldt D., Linz S., Wingender E., Jahn D.** (2003) PRODORIC: procaryotic database of gene regulation. *Nucleic acid research.* **31** (1): 266-269
- Mutka S. C., Carney J. R., Liu Y., Kennedy J.** (2006) Heterologous production of Epothilone C and D in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **45**: 1321-1330
- Nelson K. E., Weinel C., Paulsen I. T., Dodson R. J., Hilbert H., Martins dos Santos V. A. P., Fouts D. E., Gill S. R., Pop M., Holmes M., Brinkac L., Beanan M., DeBoy R. T., Daugherty S., Kolonay J., Madupu R., Nelson W., White O., Peterson J., Khouri H., Hance I., Chris Lee P., Holtzapple E., Scanlan D., Tran K., Moazzes A., Utterback T., Rizzo M., Lee K., Kosack D., Moestl D., Wedler H., Lauber J., Stjepandic D., Düsterhöft A., Tümmler B., Fraser C. M.** (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology* **4** (12): 799-808
- Nicas T. I., Cooper R. D. G.** (1997) Vancomycin and other glycopeptides. *Biotechnology of antibiotics*. Strohl W. R. Ed.; Marcel Dekker, Inc; New York **82**: 363-392
- Nissle, A.** (1918) Die antagonistische Behandlung chronischer Darmstörungen mit Kolibakterien. *Med Klein* **2**:29–30.
- Nowak-Thompson B., Chaney N., Wing J. S., Gould S. J., Loper J. E.** (1999) Characterization of the pyoluteorin biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas fluorescens* PF5. *Journal of Bacteriology* **181**: 2166-2174
- Nougayrède J.-P., Homburg S, Taieb F., Boury M., Brzuszkiewicz E., Gottschalk G., Buchrieser C., Hacker J., Dobrindt U., Oswald E.** (2006) *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* **313** (5788): 848-851

## LITERATURVERZEICHNIS

- Olsén A., Jonsson A., Normark S.** (1989) Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature* **338**: 652-655
- Passalacqua K. D., Varadarajan A., Ondov B. D., Okou D. T., Zwick M. E., Bergman N. H.** (2009) Structure and complexity of a bacterial transcriptome. *Journal of Bacteriology* **191**: 3203-3211
- Patzer, S. I., M. R. Baquero, D. Bravo, F. Moreno and K. Hantke (2003).** The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catecholate siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and IroN. *Microbiology* **149** (Pt 9): 2557-70
- Perez J. C., Latifi T., Groisman E. A.** (2008) Overcoming H-NS-mediated transcriptional silencing of horizontally acquired genes by the PhoP and SlyA proteins in *Salmonella enterica*. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 10773-10783
- Perry R. D., Balbo P. B., Jones H. A., Feherston J. D., DeMoll E.** (1999) Yersiniabactin from *Yersinia pestis*: biochemical characterization of the siderophore and its role in iron transport and regulation. *Microbiology* **145**:1181-1190
- Pfeifer B. A., Khosla C.** (2001) Biosynthesis of polyketides in heterologous hosts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **65**: 106-118
- Pfeifer B. A., Admiraal S. J., Gramajo H., Cane D. E., Khosla C.** (2001) Biosynthesis of complex polyketides in a metabolically engineered strain of *E. coli*. *Science* **291**: 1790-1792
- Pratt L. A., Kolter R.** (1998) Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology* **30** (2): 285-293
- Putze J.** (2009) Studien zur Verbreitung und genetischen Struktur des Colibactin-Genclusters in *Enterobacteriaceae*. Dissertation
- Putze J., Hennequin C., Nougayrède J.P., Zhang W., Homburg S., Karch H., Bringer M. A., Fayolle C., Carniel E., Rabsch W., Oelschläger T. A., Oswald E., Forestier C., Hacker J., Dobrindt U.** (2009) Genetic structure and distribution of the colibactin genomic island among members of the family Enterobacteriaceae. *Infect Immun* **77**: 4696-4703
- Raja A., LaBonte J., Lebbos J., Kirkpatrick P.** (2003) Daptomycin. *Nature Reviews. Drug Discovery* **2** (12): 943-944
- Ramseier M. T.** (1996) Cra and the control of carbon flux via metabolic pathways. *Research in Microbiology* **147**: 489-493
- Rangaswamy, V., S. Jiralerspong, R. Parry, and C. L. Bender.** 1998. Biosynthesis of the *Pseudomonas* polyketide coronafacic acid requires monofunctional and multifunctional polyketide synthase proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:15469–15474.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Richards J., Sundermeier T., Svetlanov A., Karzai W.** (2008) Quality control of bacterial mRNA decoding and decay. *Biochim Biophys Acta.* **1779** (9): 574-582
- Richet E., Raibaud O.** (1989) MalT, the regulatory protein of the *Escherichia coli* maltose system, is an ATP-dependent transcriptional activator. *EMBO Journal* **8** (3): 981-987
- Romeo T.** (1998) Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Molecular Microbiology* **29** (6): 1321-1330
- Sanchez J. F., Chiang Y.-M., Wang C. C.** (2008) Diversity of polyketide synthases found in the *Aspergillus* and *Streptomyces* genomes. *Molecular Pharmaceutics.* **5** (2):226-233
- Sharma C. M., Hoffmann S., Darfeuille F., Reignier J., Findeiß S., Sittka A., Chabas S., Reiche K., Hackermüller J., Reinhardt R., Stadler P. F., Vogel J.** (2010) The primary transcriptome of the major human pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **464**(11): 250-255
- Schembri M. A., Hjerrild L., Gjermansen, Klemm P.** (2003) Differential expression of the *Escherichia coli* autoaggregation factor antigen 43. *Journal of Bacteriology* **185** (7): 2236-2242
- Shen B.** (2003) Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Current Opinion in Chemical Biology* **7**:285–295
- Sherlock O. Schembri M. A., Reisner A., Klemm P.** (2004) Novel roles for the AIDA adhesin from diarrheagenic *Escherichia coli*: cell aggregation and biofilm formation. *Journal of Bacteriology* **186** (23): 8058-8065
- Schramm G., Zapatka M., Eils R., König R.** (2007) Using gene expression data and network topology to detect substantial pathways, clusters and switches during oxygen deprivation in *Escherichia coli*. *BMC Bioinformatics* **8**:149
- Schroeckh V., Scherlach K., Nützmann H.-V., Shelest E., Schmidt-Heck W., Schuemann J., Martin K., Hertweck C., Brakhage A. A.** (2009) Intimate bacterial-fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. *PNAS* **106** (34): 14558–14563
- Schubert S., Rakin A., Heesemann J.** (2004) The *Yersinia* high pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects. *Int. J. Med. Microbiol.* **294**: 83-94
- Schwarzer D., Mootz H. D., Linne U., Marahiel M. A.** (2002) Regeneration of misprimed nonribosomal peptide synthetases by type II thioesterases. *PNAS* **99**: 14083-14088
- Schwecke, T., Aparicio, J. F., Molnar, I., König, A., Khaw, L. E., Haydock, S. F., Oliynyk, M., Caffrey, P., Cortes, J., Lester, J. B.** (1995) The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. *Proc. Natl. Acad. USA* **92**: 7839–7843
- Selinger D. W., Mukherjee Saxena R., Cheung K. J., Church G. M., Rosenow C.** (2003) Global RNA half-life analysis in *Escherichia coli* reveals positional patterns of transcript degradation. *Genome Res.* **13** (2): 216-223

## LITERATURVERZEICHNIS

**Smith S., Tsai S.-C.** (2007) The type I fatty acid and polyketide synthases: a tale of two megasynthases. *Nat. Prod. Rep.* **24** (5): 1041-1072

**Summer D. K.** (1991) The kinetics of plasmid loss. *Trends Biotechnol.* **9** (8): 273-278

**Sorek R., Cossart P.** (2010) Prokaryotic transcriptomics: a new view on regulation, physiology and pathogenicity. *Nature Reviews Genetics* **11**: 9-16

**Staunton J., Wilkinson B.** (2001) Combinatorial biosynthesis of polyketides and nonribosomal peptides. *Current Opinion in Chemical Biology* **5**: 159-164

**Stecher B., Chafferon S., Käppeli R., Hapfelmeier S., Friedrich S., Weber T. C., Kirundi J., Suar M., McCoy K. D., von Mering C., Macpherson A. J., Hardt W.-D.** (2010) Like will to like: Abundances of closely related species can predict susceptibility to intestinal colonization by pathogenic and commensal bacteria. *PLOS Pathogens* **6** (1)

**Strateva T., Yordanov D.** (2009) *Pseudomonas aeruginosa*- a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology.* **58**: 1133-1148

**Strohl W. R., Bartel P. L., Li Y., Connors C, Woodman R. H.** (1991) Expression of polyketide biosynthesis and regulatory genes in heterologous streptomyces. *Journal of Industrial Microbiology* **7**: 163-174

**Stutzman-Engwall, K. J., Otten, S. L. & Hutchinson, C. R.** (1992). Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces* spp. And overproduction of daunorubicin in *Streptomyces peucetius*. *J Bacteriol* **174**, 144±154.

**Tapi A., Chollet-Imbert M., Scherens B.** (2010) New approach for the detection of non-ribosomal peptide synthetase genes in *Bacillus* strains by polymerase chain reaction. *Appl Microbiol Biotechnol* **85**: 1521-1531

**Tsuda M., Yamakawa M., Oka S., Tanaka Y., Hoshino Y, Yuzuru Mikami Y., Sato A., Fujiwara H., Ohizumi Y., Kobayashi J.** (2005) Brasilibactin A, a cytotoxic compound from actinomycete *Nocardia brasiliensis*. *J. Nat. Prod.* **68**: 462-464

**Tsukahara K., Ogura M.** (2008) Promoter selectivity of the *Bacillus subtilis* response regulator DegU, a positive regulator of the *fla/ che* operon and *sacB*. *BMC Microbiology* **8**

**Ukena, S. N., A. M. Westendorf, W. Hansen, M. Rohde, R. Geffers, S. Coldewey, S. Suerbaum, J. Buer and F. Gunzer** (2005). The host response to the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917: specific up-regulation of the proinflammatory chemokine MCP-1. *BMC Med Genet* **6**: 43

**Vetcher L., Menzella H. G., Kudo T., Motoyama T., Leonard Katz L.** (2007) The antifungal polyketide Ambruticin targets the HOG pathway. *Antimicrobial Pathways and Chemotherapy.* **51** (10): 3734-3736

**Viswanath V, Wu Y, Boonplueang R, Chen S, Stevenson FF, Yantiri F, Yang L, Beal MF, Andersen J.K.** (2001) Caspase-9 activation results in downstream caspase-8 activation and bid cleavage in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease. *J. Neurosci.* **21** (24): 9519-9528

## LITERATURVERZEICHNIS

- Wang D., Ding X., Rather P.** (2001) Indole can act as an extracellular signal in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **183** (14): 4210-4216
- Watanabe K., Oikawa H.** (2007) Robust platform for de novo production of heterologous polyketides and nonribosomal peptides in *Escherichia coli*. *Og. Biomol. Chem.* **5**: 593-602
- Weber, G., Schorgendorfer, K., Schneider-Scherzer, E. & Leitner, E.** (1994) The peptide synthetase catalyzing cyclosporine production in *Tolypocladium niveum* is encoded by a giant 45.8-kilobase open reading frame. *Curr. Genet.* **26**, 120–125
- Wehkamp, J., J. Harder, K. Wehkamp, B. Wehkamp-von Meissner, M. Schlee, C. Enders, U. Sonnenborn, S. Nuding, S. Bengmark, K. Fellermann, J. M. Schroder and E. F. Stange (2004).** NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infect Immun* **72**(10): 5750-8
- Weissman K. J., Leadlay P. F.** (2005) Combinatorial biosynthesis of reduced polyketides. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 925-936
- Wennerberg K., Rossman K. L., Der C. J.** (2005) The Ras superfamily at a glance. *J. Cell. Sci.* **118**: 843-846
- Wenzel S. C., Müller R.** (2005) recent developments towards the heterologous expression of complex bacterial natural product biosynthetic pathways. *Current Opinion in Biotechnology* **16**: 594-606
- Wenzel S. C., Gross F., Zhang Y., Fu J., Stewart A. F., Müller R.** (2005) Heterologous expression of myxobacterial natural products assembly line in *Pseudomonads* via Red/ET recombineering. *Chemistry & Biology*. **12**: 349-356
- Westendorf, A. M., F. Gunzer, S. Deppenmeier, D. Tapadar, J. K. Hunger, M. A. Schmidt, J. Buer and D. Bruder** (2005). "Intestinal immunity of *Escherichia coli* Nissle 1917: a safe carrier for therapeutic molecules." *FEMS Immunol Med Microbiol* **43**(3): 373-84.
- Yanofsky C., Horn V., Gollnick P.** (1991) Physiological studies of tryptophan transport and tryptophanase operon induction in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**: 6009-6017
- Zuker, M.** (1989). On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science*, **244**, 48-52

## Anhang

### A1 Abkürzungsverzeichnis:

(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Masse pro Volumen
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CAS	Chrom Azurol S
Cm	Chloramphenicol
CPE	<i>cytopathic effect</i>
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
EcN	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>
FRT	<i>Flp Recombinase Target</i>
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HDTMA	Hexadecyltrimethyl Ammonium Bromid
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IS	Insertionsequenz
Kb	Kilobasen
Km	Kanamycin
L	Liter
LB	Lysogen Broth
M	Molar
MEM	Minimal Essential Medium
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
mV	Millivolt
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
NRP	nichtribosomales Peptid
NRPS	nichtribosomale Peptidsynthetase
ODx	Optische Dichte bei x nm

ORF	<i>open reading frame</i>
PK	Polyketid
PKS	Polyketidsynthase
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
RLU	<i>Relative Light Units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SSC	<i>Standard Saline Citrate</i>
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Azetat-EDTA
TFB	Transkriptionsfaktorbindestelle
Tm	Tetrazyklin
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
u	Unit
U	Uracil
ÜNK	Übernachtkultur
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

## A2 Oligonukleotide

Tab. 13: Oligonukleotide und deren Verwendungszwecke.

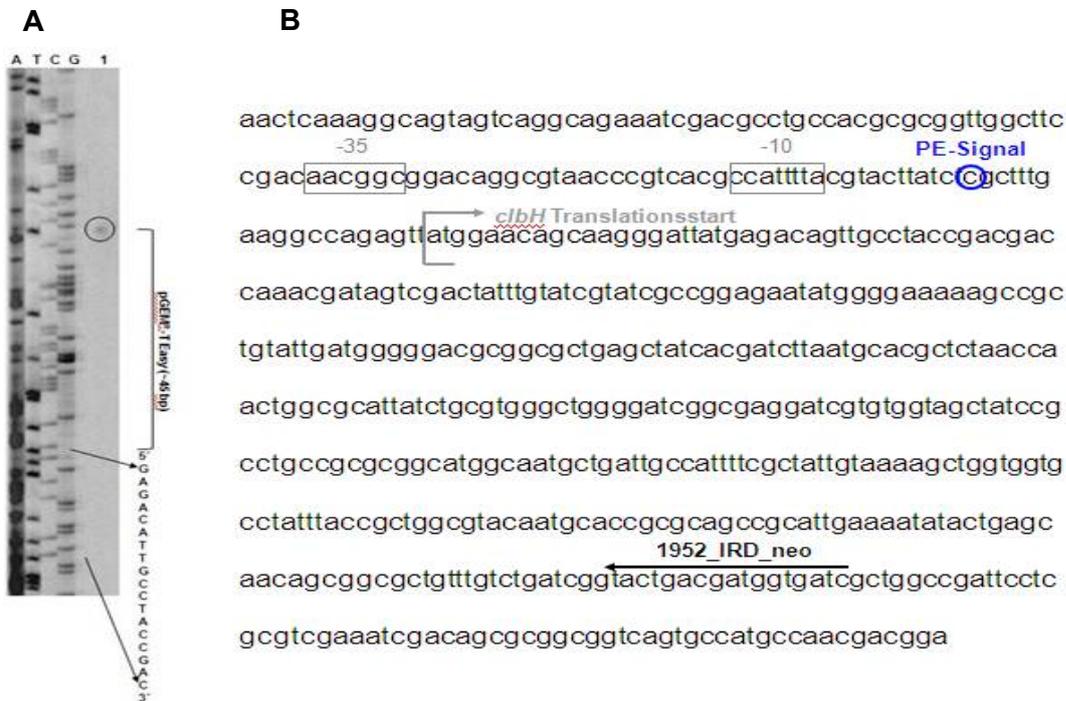
Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Anwendung
4711_IRD_neo	TTCCGAGCTTGTATTTTATG	cDNA Synthese und Sequenzierung zur Bestimmung des 5'-Endes von <i>clbR</i>
RIHE01959 IRD800	GAGCTATTAGTGTGGTGCAT	cDNA Synthese und Sequenzierung zur Bestimmung des 5'-Endes von <i>clbB</i>
PE_1958 neo IRD	TAGCCAATCCACATCTTCTG	cDNA Synthese und Sequenzierung zur Bestimmung des 5'-Endes von <i>clbC</i>
1952_IRD_neo	GATCACCATCGTCAGTACC	cDNA Synthese und Sequenzierung zur Bestimmung des 5'-Endes von <i>clbH</i>
1951_IRD_neo	ATAATCGGCAGCCACATA	cDNA Synthese und Sequenzierung zur Bestimmung des 5'-Endes von <i>clbI</i>
1945_IRD_neo	AGGCGGAATATTGAAAAA	cDNA Synthese und Sequenzierung zur Bestimmung des 5'-Endes von <i>clbO</i>
1943_IRD_neo	CATGTCCATGATCGAGAATA	cDNA Synthese und Sequenzierung zur Bestimmung des 5'-Endes von <i>clbQ</i>
PE_RIHE04711 fw	GGGGGAAACATGGATAAGTTCA	Amplifikation des 5' Bereiches von <i>clbR</i>
PE_RIHE04711 rev	GCGATTCAATTCTGCCATT	Amplifikation des 5' Bereiches von <i>clbR</i>
PE_RIHE01959 fw	GCGACGCGCATGACAATAATA	Amplifikation des 5' Bereiches von <i>clbB</i>
PE_RIHE01959 rev	TCTGTGTATCTGTTGTTTTGGCAGT	Amplifikation des 5' Bereiches von <i>clbB</i>
PE_RIHE01958 fw	GCAATAAGCGGGTGAATA	Amplifikation des 5' Bereiches von <i>clbC</i>
PE_RIHE01958 rev	TCGCCCTGAAGAAAGGTAAT	Amplifikation des 5' Bereiches von <i>clbC</i>
PE_RIHE01952 fw	CGCCACGTTGTTGAGATAGC	Amplifikation des 5' Bereiches von <i>clbH</i>
PE_RIHE01952 rev	GAGACAGTTGCCTACCGACGA	Amplifikation des 5' Bereiches von <i>clbH</i>
PE_RIHE01951 fw	AGTGTCACGCCAGATCC	Amplifikation des 5' Bereiches von <i>clbI</i>
PE_RIHE01951 rev	AGCCACAACCGACAGTCA	Amplifikation des 5' Bereiches von <i>clbI</i>
PE_RIHE01945 fw	CAGCCCAAACGAACTAACG	Amplifikation des 5' Bereiches von <i>clbO</i>
PE_RIHE01945 rev	AAACACGATGCCAACCCCTTA	Amplifikation des 5' Bereiches von <i>clbO</i>
PE1943 fw	TTTGATGATGGAACAGCCATA	Amplifikation des 5' Bereiches von <i>clbQ</i>
PE1943 rev	GCGATACCGTTCGGAATTAT	Amplifikation des 5' Bereiches von <i>clbQ</i>
clbRB P1	TAACCATCACCTTATTATCG	Amplifikation des intergenischen Bereichs zwischen <i>clbB</i> und <i>clbR</i> ; RT-PCR zur Überprüfung des Transkriptionsstart von <i>clbB</i>
clbRB P2	AATCATATTGCATTTTATCAC	
clbRB P3	AAAAACATGTAAGTCATGC	
clbRB P4	CATAAAAACCGTTGTATCG	
clbRB P5	GATACACAGATACACAGA	
clbRB P rev	CACGCAGAGATAACGGGTTT	

Fortsetzung Tab. 13

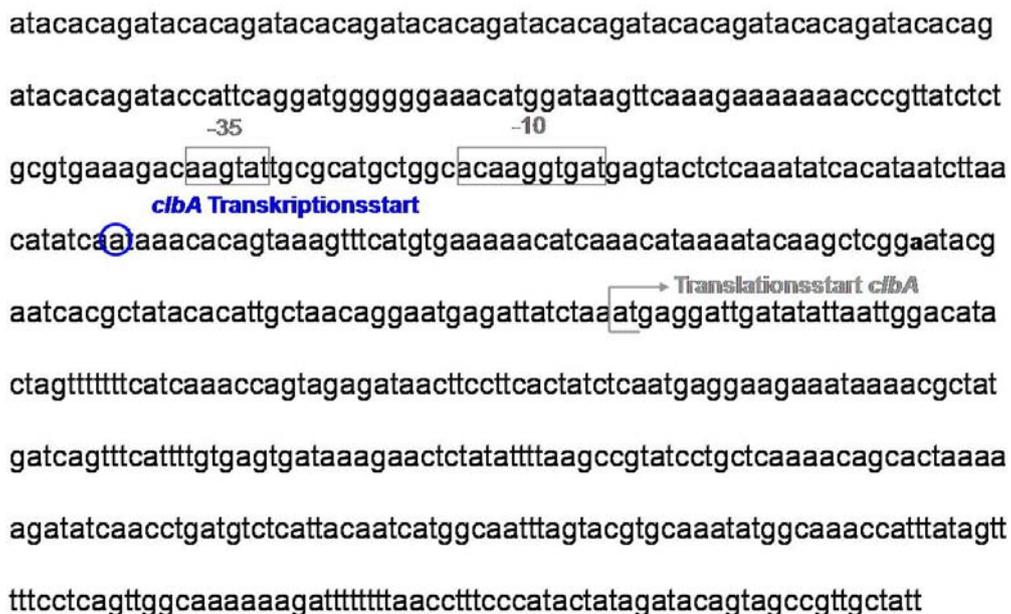
Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Anwendung
clbBR P1	CGATAATAAGGTGATGGTTA	Amplifikation des intergenischen Bereichs zwischen <i>clbB</i> und <i>clbR</i> ; RT-PCR zur Überprüfung des Transkriptionsstart von <i>clbR</i>
clbBR P2	GTGATAAATGCAATATGATT	
clbBR P3	GCATGACTTACATGTTTTT	
clbBR P4	CGATACAACGGTTTTTATG	
clbBR P5	TCTGTGTATCTGTGTATC	
clbBR P fw	TGCTGAAAGGTGTGACGTCGG	
pMEKm P3	CTTTTTTCTCCTGCCACATG	Überprüfung der Integration der Km-Kassette in pME6030
pMEKm P4	GACAACGTCGAGCACAGCTG	Überprüfung der Integration der Km-Kassette in pME6030
pME-Km-FRT1 P1	CGAGATCTATCGATGCATGCCATGGTA CCCGGGAGCTCGAGTGTAGGCTGGAG CTTC	Amplifikation der Km-Kassette zur Integration in pME6030
pME-Km-FRT1 P2	AAATCACCATGAGTGACGACTGAATCC GGTGAGAATGGCACAGAGTCCCCTA G	Amplifikation der Km-Kassette zur Integration in pME6030
pME-Km-FRT2 P1	CGAGATCTATCGATGCATGCCATGGTA CCCGGGAGCTCGAGGATGAGGATCGTT TCGC	Amplifikation der Km-Kassette zur Integration in pME6030
pME-Km-FRT2 P2	AAATCACCATGAGTGACGACTGAATCC GGTGAGAATGGCACATATGAATATCCTC CTTAGTTC	Amplifikation der Km-Kassette zur Integration in pME6030
pBELO FRT1 P1	GCTGACTCATACCAG	Überprüfung der Integration von pME6030 in pBELOBACpks
pBELO FRT1 P2	TCTATAGTCTCACCT	Überprüfung der Integration von pME6030 in pBELOBACpks
pBELO FRT2 P1	ACGTATTTATATATC	Überprüfung der Integration von pME6030 in pBELOBACpks
pBELO FRT2 P2	CGTCAAAAATAAGGTT	Überprüfung der Integration von pME6030 in pBELOBACpks



markierten Primer (schwarzer Pfeil). Die Promotorstrukturen sind hellgrau umrahmt. In Abb. A.1.2.A ist das PE-Signal (Spur 1) neben der Sequenzreaktion abgebildet.

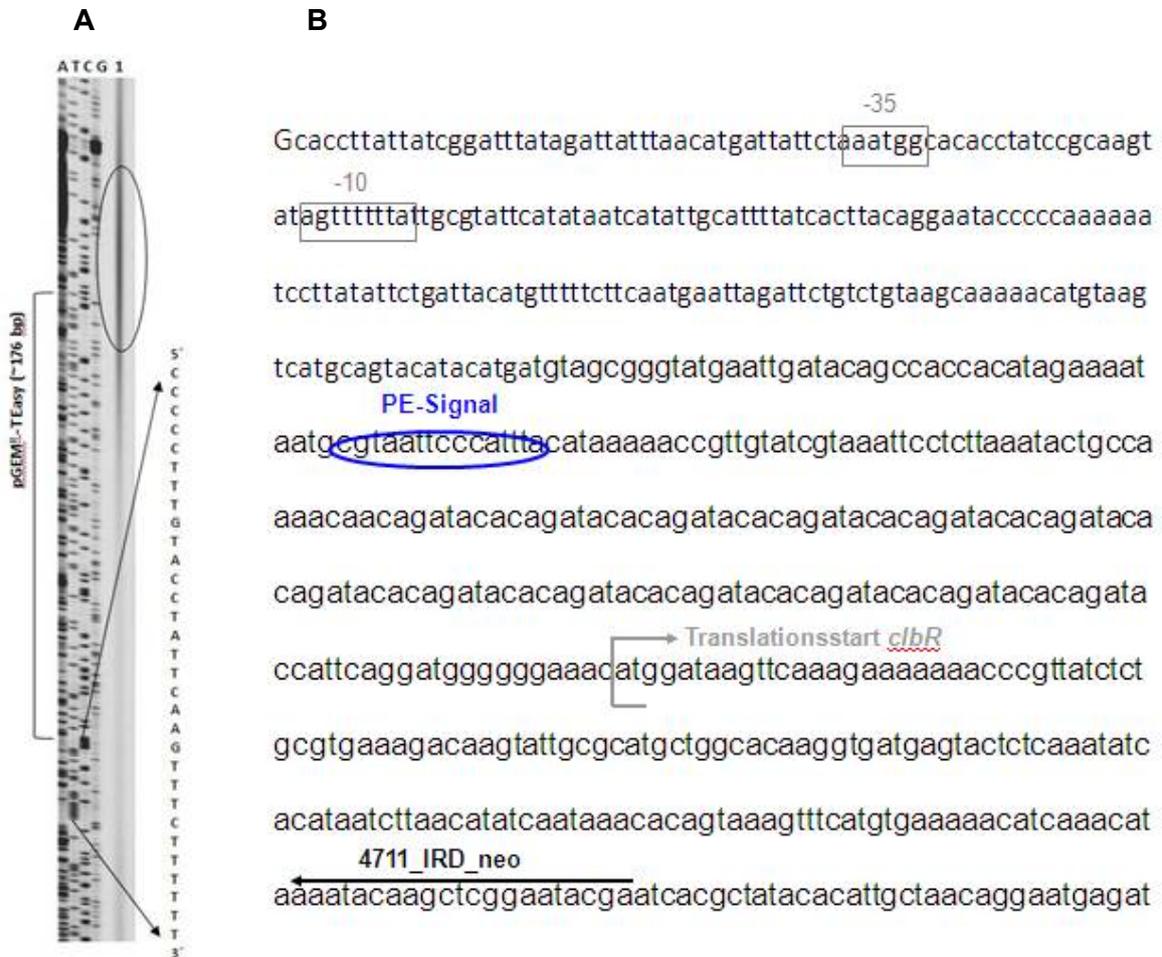


**Abb. A.3.3 Primer-Extension-Analyse zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des Genes *clbH*** Die DNA-Sequenz (Abb. A.1.3.B) zeigt den Translationsstartpunkt von *clbH*, die Region stromaufwärts mit dem Primer-Extension-Signal (blau markiert), sowie dem verwendeten IRD<sub>800</sub>-markierten Primer (schwarzer Pfeil). Die Promotorstrukturen sind hellgrau umrahmt. In Abb. A.1.3.A ist das PE-Signal (Spur 1) neben der Sequenzreaktion abgebildet



**Abb. A.3.4: 5'-Prime-RACE-Analyse zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des Genes *clbA*** Die DNA-Sequenz zeigt den Translationsstartpunkt von *clbA*, die Region stromaufwärts

mit dem Transkriptionsstart (blau markiert), sowie die verwendeten Primer (schwarzer Pfeile). Die Promotorstrukturen sind hellgrau umrahmt.



**Abb. A.3.5: Primer-Extension-Analyse zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des Genes *cIbR*** Die DNA-Sequenz (Abb. A.1.4.B) zeigt den Translationsstartpunkt von *cIbR*, die Region stromaufwärts mit dem Primer-Extension-Signal (blau markiert), sowie die verwendeten IRD<sub>800</sub>-markierten Primer (schwarzer Pfeil). Die Promotorstrukturen sind hellgrau umrahmt. In Abb. A.1.5.A ist das PE-Signal (Spur 1) neben der Sequenzreaktion abgebildet

#### A.4 Analyse von Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren

Tab. 14 Analyse der Promotorregionen wichtiger *clb*-Gene hinsichtlich der Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktor-bindestelle	Sequenz	<sup>1,2</sup> Start	Ende	Regulatorische Funktion
<b><i>clbA</i></b>				
Crp	TCATGTGAAAAACATC	+16	+37	globaler Regulator katabolitischer Operons
CytR	TCTAAATGAGGA	+96	+107	Regulation des Transports und der Verwertung von Nukleosiden
DnaA	CTATACACA	+66	+74	Regulatorisches Protein der Replikationsinitiation
FadR	TGCTGGC	-54	-48	Regulator des Fettsäuremetabolismus
Fur	TGGATAAG	-111	-104	Regulation von Eisentransport-Enzymen
GlnG	TGGCAC	-51	-46	regulatorisches Protein der Stickstoff-Assimilation
GlpR	ATTGCGCATGCTGGCACAAG	-62	-43	<b>sn-Glycerol-3-Phosphat Repressor</b>
H-NS	TTGATATATT	+108	+117	Histone-like nucleoid structuring protein
H-NS	AGGATTGATA	+104	+113	Histone-like nucleoid structuring protein
IHF	TCACATAATCTTAACA	-22	-7	Aufrechterhaltung der DNA-Struktur
IciA	TGATATATTAAT	+109	+120	Regulation des Arginintransports und der DNA-Replikation
IciA	GGATAAGTTCAA	-110	-99	Regulation des Arginintransports und der DNA-Replikation
MalT	GGGGGA	-121	-116	Regulator des Maltose Katabolismus
MetJ	CATCAAACC	+140	+148	Regulator der Methioninbiosynthese

**Tab. 14 Analyse der Promotorregionen wichtiger *clb*-Gene hinsichtlich der Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren (Fortsetzung)**

<b>Transkriptionsfaktor-bindungsstelle</b>	<b>Sequenz</b>	<b><sup>1,2</sup>Start</b>	<b>Ende</b>	<b>Regulatorische Funktion</b>
<b><i>clbA</i> (Fortsetzung)</b>				
MetJ	TATCTAAAT	+94	+102	Regulator der Methioninbiosynthese
MetR	TGAAAAA	+21	+27	Regulation der Methioninbiosynthese
MetR	TGAAAGA	-74	-68	Regulation der Methioninbiosynthese
Mlc	CGGAAT	+50	+55	globaler Regulator des Kohlenhydratmetabolismus
NarL	TACCATT	-135	-129	Regulator der anaeroben Atmung und Gärung
NarL	TACACAT	+69	+75	Regulator der anaeroben Atmung und Gärung
OmpR	GAAAAAC	+22	+28	Osmoregulatorisches Zweikomponentensystem
OmpR	GAAAAAA	-97	-91	Osmoregulatorisches Zweikomponentensystem
OxyR	TTTCATCAAAC	+137	+147	Regulation der Zellantwort auf oxidativen Stress
OxyR	ATTGCTAACAG	+74	+84	Regulation der Zellantwort auf oxidativen Stress
PdhR	TCAATA	-4	+1	Regulator des Pyruvatdehydrogenase Komplexes
PdhR	TCAATG	+174	+179	Regulator des Pyruvatdehydrogenase Komplexes
RcsAB	TCGGAATA	+49	+56	Regulator der Kapselbiosynthese
<b><i>clbR</i><sup>2</sup></b>				
ARCA	AGTTACTTAA	+65	+74	Regulator der aeroben Atmung
Crp	ATGTATGTACTACATCGCCCAT	+113	+134	globaler Regulator katabolitischer Operons

**Tab. 14 Analyse der Promotorregionen wichtiger *clb*-Gene hinsichtlich der Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren (Fortsetzung)**

<b>Transkriptionsfaktor-bindungsstelle</b>	<b>Sequenz</b>	<b><sup>1,2</sup>Start</b>	<b>Ende</b>	<b>Regulatorische Funktion</b>
<b><i>clbR</i> (Fortsetzung)</b>				
Fur	TGGCAACA	+332	+339	Regulation von Eisentransport-Enzymen
GcvA	CTAAT	+49	+53	Repressor des Glycinspaltungssystem
IHF	CAACATAGCATTTAAG	+193	+208	Aufrechterhaltung der DNA-Struktur
Lrp	AAGTTACTTAATCTA	+64	+78	Regulator des Aminosäuremetabolismus
MetJ	CGCCCATAC	+128	+136	Regulator der Methioninbiosynthese
Mlc	CGCATT	+167	+172	globaler Regulator des Kohlenhydratmetabolismus
NarL	TACCCCC	+342	+348	Regulator der anaeroben Atmung und Gärung
RcsAB	TAGGAATA	+36	+43	Regulator der Kapselbiosynthese
RcsAB	TAGTGAAT	+10	+17	Regulator der Kapselbiosynthese
RcsAB	AAGGAGAA	+206	+213	Regulator der Kapselbiosynthese
Sig70 (-10)	TACATT	+98	+103	Regulator der DNA abhängigen RNA-Synthese
GadX	TAAGGGTAAATGTATTTT	+172	+189	Regulator der Glutamat abhängigen Säureresistenz
GadX	AAGGGTAAATGTATTTT	+173	+190	Regulator der Glutamat abhängigen Säureresistenz
<b><i>ClbB</i><sup>2</sup></b>				
ArcA	AGTTAAGTAT	+212	+221	Regulator der aeroben Atmung
Crp	ATGGGCGATGTAGTACATACAT	+220	+241	globaler Regulator katabolitischer Operons
Crp	AAGGGGGGTAGGACTTACCATA	+3	+24	globaler Regulator katabolitischer Operons

**Tab. 14 Analyse der Promotorregionen wichtiger *clb*-Gene hinsichtlich der Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren (Fortsetzung)**

<b>Transkriptionsfaktor-bindungsstelle</b>	<b>Sequenz</b>	<b><sup>1,2</sup>Start</b>	<b>Ende</b>	<b>Regulatorische Funktion</b>
<b><i>clbB</i> (Fortsetzung)</b>				
DnaA	TTCTCCTTA	+141	+149	Regulatorisches Protein der Replikationinitiation
Fis	GGGGTAGGACTTACC	+7	+21	Organisation und Aufrechterhaltung der Nukleoidstruktur
GlnG	TGTTGC	+157	+162	regulatorisches Protein der Stickstoff-Assimilation
IciA	AGATTAAGTAAC	+277	+288	Regulation des Arginintransports und der DNA-Replikation
MetJ	CAACAAAAC	+123	+131	Regulator der Methioninbiosynthese
NarL	TACCCTT	+175	+181	Regulator der anaeroben Atmung und Gärung
NhaR	TCCTAAAAAAC	+314	+324	Regulation des Kationtransport
OxyR	ATTCCTAAAAA	+312	+322	Regulation der Zellantwort auf oxidativen Stress
OxyR	GTTGCCAAAAA	+158	+168	Regulation der Zellantwort auf oxidativen Stress
Sig70 (-10)	TATACT	+361	+366	Regulator der DNA abhängigen RNA-Synthese
Sig70 (-10)	TATACT	+353	+358	Regulator der DNA abhängigen RNA-Synthese
<b><i>clbC</i></b>				
Crp	TTTATGACGCGTCAGTGTG	-37	-58	globaler Regulator katabolitischer Operons
DnaA	TTATGCGCG	-96	-104	Regulatorisches Protein der Replikationinitiation
DnaA	TTTTGCACG	-73	-81	Regulatorisches Protein der Replikationinitiation
Fis	CACGAAACGTTTAAC	-62	-76	Organisation und Aufrechterhaltung der Nukleoidstruktur

**Tab. 14 Analyse der Promotorregionen wichtiger *clb*-Gene hinsichtlich der Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren (Fortsetzung)**

<b>Transkriptionsfaktor-bindungsstelle</b>	<b>Sequenz</b>	<b><sup>1,2</sup>Start</b>	<b>Ende</b>	<b>Regulatorische Funktion</b>
<i>clbC</i> (Fortsetzung)				
GlnG	TGGTGC	-188	-193	regulatorisches Protein der Stickstoff-Assimilation
GlnG	TGGCAC	-180	-185	regulatorisches Protein der Stickstoff-Assimilation
H-NS	CGGATTAATG	-20	-29	Histone-like nucleoid structuring protein
H-NS	TGCATTAATC	-22	-31	Histone-like nucleoid structuring protein
Lrp	ACGCTTTTTATGACG	-49	-63	Regulator des Aminosäuremetabolismus
Lrp	AAATACCTTATGCGT	+13	+28	Regulator des Aminosäuremetabolismus
Lrp	TGTCTGCTTATGCGC	-97	-111	Regulator des Aminosäuremetabolismus
MalT	GGAGGA	-10	-15	Regulator des Maltose Katabolismus
MetJ	CTGCAAAAC	-160	-168	Regulator der Methioninbiosynthese
Mlc	CGAAAC	-69	-74	globaler Regulator des Kohlenhydratmetabolismus
Mlc	CGTAAT	-25	-30	globaler Regulator des Kohlenhydratmetabolismus
NarL	TACTTCA	+8	+14	Regulator der anaeroben Atmung und Gärung
PdhR	TCAAAT	+12	+17	Regulator des Pyruvatdehydrogenase Komplexes
Sig70 (-10)	TATCGT	-81	-86	Regulator der DNA abhängigen RNA-Synthese

**Tab. 14 Analyse der Promotorregionen wichtiger *clb*-Gene hinsichtlich der Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren (Fortsetzung)**

<b>Transkriptionsfaktor-bindungsstelle</b>	<b>Sequenz</b>	<b><sup>1,2</sup>Start</b>	<b>Ende</b>	<b>Regulatorische Funktion</b>
<b><i>clbH</i></b>				
ArcA	CGTTAACTTT	-213	-222	Regulator der aeroben Atmung
FadR	AACTTGT	-115	-121	Regulator des Fettsäuremetabolismus
FadR	AACTCGT	-169	-175	Regulator des Fettsäuremetabolismus
Fis	GTAACTTTCTTAAC	-207	-221	Organisation und Aufrechterhaltung der Nukleoidstruktur
Fur	TGAATAGA	-1	-9	Regulation von Eisentransport-Enzymen
GlnG	TGCCGC	-41	-46	regulatorisches Protein der Stickstoff-Assimilation
GlnG	TGTTGC	-44	-49	regulatorisches Protein der Stickstoff-Assimilation
MetJ	CGTCTAACT	-172	-180	Regulator der Methioninbiosynthese
Mlc	CGAAAC	+1	+6	globaler Regulator des Kohlenhydratmetabolismus
OmpR	GAAAAAA	-133	-139	
OxyR	TAACGAAAAAA	-133	-143	Regulation der Zellantwort auf oxidativen Stress
OxyR	AACGAAAAAAC	-134	-144	Regulation der Zellantwort auf oxidativen Stress
OxyR	CAGCAAAAAAA	-192	-202	Regulation der Zellantwort auf oxidativen Stress
Sig70 (-10)	TAAAAT	-13	-18	Regulator der DNA abhängigen RNA-Synthese
<b><i>clbI</i></b>				
ArcA	CGTTATGTAG	-120	-129	Regulator der aeroben Atmung

**Tab. 14 Analyse der Promotorregionen wichtiger *clb*-Gene hinsichtlich der Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren (Fortsetzung)**

<b>Transkriptionsfaktor-bindungsstelle</b>	<b>Sequenz</b>	<b><sup>1,2</sup>Start</b>	<b>Ende</b>	<b>Regulatorische Funktion</b>
<i>clb</i> (Fortsetzung)				
Crp	GTGAGTGAAGACGATCATGTC T	-134	-155	globaler Regulator katabolitischer Operons
FadR	AACTGGA	-82	-88	Regulator des Fettsäuremetabolismus
FadR	CCCTGGT	-14	-20	Regulator des Fettsäuremetabolismus
Fis	GCCTTAAAGACGACC	-38	-52	Organisation und Aufrechterhaltung der Nukleoidstruktur
GlnG	TGGTGT	-12	-17	regulatorisches Protein der Stickstoff-Assimilation
H-NS	GCAATACATC	-116	-125	Histone-like nucleoid structuring protein
IHF	CCGCAACCAACTGGAC	-81	-96	Aufrechterhaltung der DNA-Struktur
IciA	CGATCATGTCTA	-133	-144	Regulation des Arginintransports und der DNA-Replikation
Lrp	TACGTCGTTATGTAG	-120	-134	Regulator des Aminosäuremetabolismus
Lrp	TTTGGACTTATATCC	+101	+115	Regulator des Aminosäuremetabolismus
Lrp	AGGTGACTTACTTTG	+79	+93	Regulator des Aminosäuremetabolismus
MalT	GGACGA	-77	-82	Regulator des Maltosekatabolismus
MetJ	CCTCTAGTC	-2	-10	Regulator der Methioninbiosynthese
Mlc	CGAAGT	-70	-75	globaler Regulator des Kohlenhydratmetabolismus
NarL	TACTTTG	+87	+93	Regulator der anaeroben Atmung und Gärung

**Tab. 14 Analyse der Promotorregionen wichtiger *clb*-Gene hinsichtlich der Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren (Fortsetzung)**

<b>Transkriptionsfaktor-bindungsstelle</b>	<b>Sequenz</b>	<b><sup>1,2</sup>Start</b>	<b>Ende</b>	<b>Regulatorische Funktion</b>
<b><i>clbI</i> (Fortsetzung)</b>				
OxyR	AAACCGGAAAC	+26	+36	Regulation der Zellantwort auf oxidativen Stress
RcsAB	TAGTGACT	+70	+77	Regulator der Kapselbiosynthese
Sig70 (-10)	TAGTCT	-1	-6	Regulator der DNA abhängigen RNA-Synthese
<b><i>clbQ</i></b>				
ARCA	TGTTGTTCT	+63	+72	Regulator der aeroben Atmung
ArcA	AGTTTAATTT	+40	+49	Regulator der aeroben Atmung
ArcA	TGTTCTCAC	+67	+76	Regulator der aeroben Atmung
Crp	TAATGTGTTGTTCTCACCCCTG	+59	+80	globaler Regulator katabolitischer Operons
CspA	CCAAT	-150	-154	Kälteschockprotein
CytR	TGCAAATGCGCA	-139	-154	Regulation des Transports und der Verwertung von Nucleosiden
Fis	GGTCCTGAACTGACC	-48	-62	Organisation und Aufrechterhaltung der Nucleoidstruktur
Fis	GTGTTGTTCTCAC	+63	+77	Organisation und Aufrechterhaltung der Nucleoidstruktur
Fnr	TTGCTTAAGATAAT	+49	+62	Regulator der anaeroben Atmung und Gärung
GlnG	TGGCCC	-73	-78	regulatorisches Protein der Stickstoff-Assimilation
GlnG	TGCCGC	-177	-182	regulatorisches Protein der Stickstoff-Assimilation
IHF	AAGCAAGACTGTAATT	+21	+36	Aufrechterhaltung der DNA-Struktur
IciA	AGATAATGTGTT	+56	+67	Regulation des Arginintransports und der DNA-Replikation

**Tab. 14 Analyse der Promotorregionen wichtiger *clb*-Gene hinsichtlich der Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren (Fortsetzung)**

<b>Transkriptionsfaktor-bindungsstelle</b>	<b>Sequenz</b>	<b><sup>1,2</sup>Start</b>	<b>Ende</b>	<b>Regulatorische Funktion</b>
<i>clbQ</i> (Fortsetzung)				
IciA	TGATATAGTAGC	-122	-133	Regulation des Arginintransports und der DNA-Replikation
Lrp	TAGTAGTTTAATTTG	+37	+51	Regulator des Aminosäuremetabolismus
MetJ	AATCGAAAA	+14	+22	Regulator der Methioninbiosynthese
Mlc	CGAAAA	+17	+22	globaler Regulator des Kohlenhydratmetabolismus
Mlc	CGCAAA	-43	-48	globaler Regulator des Kohlenhydratmetabolismus
NarL	TACCCCA	-27	-33	Regulator der anaeroben Atmung und Gärung
OxyR	TTGCTTAAGAT	+49	+59	Regulation der Zellantwort auf oxidativen Stress
OxyR	TTTGCTTAAGA	+48	+58	Regulation der Zellantwort auf oxidativen Stress
OxyR	AAAATAGAACCATACCCCAGGT AGCTCGCACAAACCGCTATGGC AAG	-45	+1	Regulation der Zellantwort auf oxidativen Stress
PdhR	TTAATT	+44	+49	Regulator des Pyruvatdehydrogenase Komplexes
PdhR	TTAATA	+4	+9	Regulator des Pyruvatdehydrogenase Komplexes
Sig70 (-10)	TATGAT	-66	-71	Regulator der DNA abhängigen RNA-Synthese

<sup>1</sup> Start und Ende beziehen sich auf die Nukleotidposition ausgehend vom Transkriptionsstartpunkt (+1)

<sup>2</sup> Start und Ende beziehen sich auf die Nukleotidposition ausgehend vom Translationsstart

## A.5 Proteomanalyse:

Tab. 15 Identifizierte Proteine mit einem x-fach erhöhtem Wert im Wildtypstamm *E. coli* Nissle 1917

Protein	Funktion	
<b>Proteinsynthese, Faltung, Modifikation</b>		
rpsG	30S ribosomales Protein S7	4,2
rpsB	30S ribosomales Protein S2	2,76
Efp	Elongationsfaktor P	2,98
yfhQ	uncharakterisierte tRNA/rRNA Methyltransferase	2,8
GlnS	Glutaminyl-tRNA Synthetase	2,25
pepD	Aminoacyl-Histidin-Dipeptidase	2,3
<b>Aminosäuremetabolismus</b>		
<b>Threoninkatabolismus</b>		
kbl	2-amino-3-ketobutyrat-Coenzym A Ligase	2,35
<b>Regulation</b>		
dksA	DnaK suppressor protein	3,9
dksA	DnaK suppressor protein	2,04
BirA	Biotin-Carboxyl-Träger-Protein der Acetyl-CoA Carboxylase	2,06
yeiE	Uncharakterisierter HTH-ähnlicher Regulator der Transkription	2,57
<b>Detoxifizierung</b>		
tpx	Thiolperoxidase	2,05
<b>Fettsäure, LPS- und Phospholipidmetabolismus</b>		
kdsA	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonat-Aldolase	2,63
<b>Nucleotidmetabolismus</b>		
NudE	ADP-Hydrolase	2,89
gsk	Inosin-Guanosin-Kinase	2,34
guaB	Inosin-5'-monophosphat Dehydrogenase	2,27

**Tab. 15** Identifizierte Proteine mit einem x-fach erhöhtem Wert im Wildtypstamm *E. coli* Nissle 1917

<b>Protein</b>	<b>Funktion</b>	
<b>Nucleotidmetabolismus (Fortsetzung)</b>		
prs	Ribosephosphat-Pyrophosphokinase	1,99
<b>TCA</b>		
sucD	Succinyl-CoA Ligase ; ADP bildende $\alpha$ -Untereinheit	2,58
<b>Hypothetische Proteine</b>		
yggS	putative Alaninracemase	1,85
ybbN	Chaperon und schwache Protein-oxidoreductase	2,51
ycgM	putative Isomerase	2,81

**Tab. 16** Identifizierte Proteine mit einem x-fach erhöhtem Wert im Colibactin-negativen Stamm *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS

<b>Protein</b>	<b>Funktion</b>	
<b>Proteinsynthese, Faltung, Modifikation</b>		
rplM	50S ribosomales Protein L13	1,542
rplM	50S ribosomales Protein L13	1,534
rplA	50S ribosomales Protein L1	1,648
rpsF	30S ribosomales Protein S6	1,5
rpsE	30S ribosomales Protein S5	1,521
rpsA	30S ribosomales Protein S1	5,58
rpsB	30S ribosomales Protein S2	1,733
rpsD	30S ribosomales Protein S4	1,5
tuf2	Translationselongationfaktor EF	2,354
tuf2	Translationselongationfaktor EF	2,105
tufA	Translationselongationfaktor Tu	2,179
tufA	Translationselongationfaktor Tu	2,178
tufA	Translationselongationfaktor Tu	2,079

**Tab. 16** Identifizierte Proteine mit einem x-fach erhöhtem Wert im Colibactin-negativen Stamm *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS

<b>Protein</b>	<b>Funktion</b>	
<b>Proteinsynthese, Faltung, Modifikation (Fortsetzung)</b>		
tufA	Translationselongationfaktor Tu	2,064
tsf	Elongationsfaktor Ts	1,82
serS	Seryl-tRNA Synthetase	2,416
asnS	Asparaginyl-tRNA Synthetase	2,348
hscA	Chaperonprotein	3,564
Tig	Triggerfaktor	2,857
Tig	Triggerfaktor	2,56
hslU	ATP-abhängige hsl Protease; ATP-bindende Untereinheit	1,624
SlyD	Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase	1,537
fkpA	FKBP-ähnliche Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase	1,733
def	Peptiddeformylase	1,596
<b>Aminosäuremetabolismus</b>		
<b>Phenylalanine, Tyrosin und Tryptophan Biosynthese</b>		
trpA	Tryptophansynthase; $\alpha$ -Kette	1,627
trpCF	bifunktionale Indol-3-glycerolphosphat-Synthase	1,522
trpD	Anthranilatsynthase Komponente II	3,521
trpD	Anthranilatsynthase Komponente II	3,275
trpD	Anthranilatsynthase Komponente II	2,964
trpD	Anthranilatsynthase Komponente II	2,916
trpD	Anthranilatsynthase Komponente II	2,878
trpD	Anthranilatsynthase Komponente II	2,582
trpE	Anthranilatsynthase Komponente I	3,514
trpE	Anthranilatsynthase Komponente I	3,077
trpE	Anthranilatsynthase Komponente I	3,041

**Tab. 16** Identifizierte Proteine mit einem x-fach erhöhtem Wert im Colibactin-negativen Stamm *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS

<b>Protein</b>	<b>Funktion</b>	
<b>Phenylalanine, Tyrosin und Tryptophan Biosynthese</b> (Fortsetzung)		
trpE	Anthranilatsynthase Komponente I	2,715
trpE	Anthranilatsynthase Komponente I	2,575
trpE	Anthranilatsynthase Komponente I	1,894
metE	5-methyltetrahydropteroyl-triglutamat-homocysteinmethyltransferase	13,04
<b>Glutamin-, Glutamatmetabolismus</b>		
murl	Glutamatracemase	1,697
glnA	Glutaminsynthetase	2,726
<b>Valin-, Leucin- und Isoleucin-Biosynthese</b>		
ilvC	Ketol-acid reductoisomerase	2,73
serC	Phosphoserinaminotransferase	1,964
		1,864
tdcB	Threonindehydratase	2,886
<b>Kohlenhydratmetabolismus</b>		
<b>Glykolyse</b>		
gapA	Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase	1,843
pgk	Phosphoglyceratkinase	1,979
eno	Enolase	2,257
aceF	Acyltransferase	10,58
<b>Colanic acid biosynthesis</b>		
Ugd	UDP-Glukose-6-dehydrogenase	2,048
<b>Pyruvatmetabolismus</b>		
ackA	Acetatkinase	2,237
aceF	Dihydrolipoyldehydrogenase	2,545

**Tab. 16** Identifizierte Proteine mit einem x-fach erhöhtem Wert im Colibactin-negativen Stamm *E. coli* Nissle 1917 ΔPKS

<b>Protein</b>	<b>Funktion</b>	
<b>Methylglyoxalmetabolismus</b>		
gldA	Glyceroldehydrogenase	1,86
gldA	Glyceroldehydrogenase	1,852
<b>Metabolismus von Cofactoren and Vitaminen</b>		
hemL	Glutamat-1-semialdehyd 2,1-Aminomutase	1,827
<b>Transport</b>		
atpA	ATP-Synthase ; α-Untereinheit	2,652
ynhD	möglicher ATP-abhängiger Transporter	1,647
ptsI	Zuckerspezifisches PTS; Kinase	5,577
<b>Regulation</b>		
luxS	S-Ribosylhomocysteinylase	1,56
phoP	Response Regulator in Zwei-Komponenten System mit PhoQ	1,652
yqgE	putativer Regulator der Transkription	
<b>Fettsäure, LPS- und Phospholipidmetabolismus</b>		
fabF	3-oxoacyl-[Acyl-Träger-Protein] Synthase 2	2,095
glpA	Glyceroldehydrogenase	
accA	Acetyl-Ccoenzym A carboxylase; Carboxyl- transferase α-Untereinheit	1,737
cpsG	Phosphomannomutase	2,33
<b>Transkription und RNA Metabolismus</b>		
RpoA	DNA-abhängige RNA-Polymerase; α-Kette	2,095
RpoA	DNA-abhängige RNA-Polymerase; α-Kette	1,871
RpoS	RNA Polymerase Sigmafaktor	2,001
rnb	Exoribonuklease II	1,5
pnp	Polyribonukleotid-Nukleotidyltransferase	10,94

**Tab. 16** Identifizierte Proteine mit einem x-fach erhöhtem Wert im Colibactin-negativen Stamm *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS

<b>Protein</b>	<b>Funktion</b>	
<b>Nucleotidmetabolismus</b>		
guaA	GMP-Synthase	3,539
guaA	GMP-Synthase	3,013
ThyA	Thymidylatsynthase	1,754
yggV	DITP/XTP Pyrophosphatase	1,583
<b>TCA</b>		
gltA	Zitratsynthase	2,24
<b>Hypothetische Proteine</b>		
ECP_3915	putatives uncharakterisiertes Protein	1,711
ECP_4008	hypothetisches Protein	1,646
ECP_2942	hypothetisches Protein	1,62
iroB	putative Glykosyltransferase	1,781
yceF	Maf-ähnliches Protein	1,604
engD	GTP-abhängiges Nukleinsäure-bindendes Protein	2,1

## A.6 Vergleichende Transkriptomanalyse

**Tab 17:** Gene mit einem x-fach erhöhtem Wert im Wildtypstamm *E. coli* Nissle 1917

<b>Gen</b>	<b>Funktion</b>	<b>Ratio <i>E. coli</i> Nissle 1917 <math>\Delta</math>pks/ WT</b>
<b>Polyketidsynthese</b>		
c2471	hypothetisches Protein, putative Phosphopantetheinyltransferase	1000
c2470	clbB; putative Peptid/Polyketid Synthase	250
c2468	ClbC; putative Polyketid Synthase	111,1
c2467	ClbD; putative 3-hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase	62,5
c2469	ClbB; putative hybride PKS/NRPS	40
c2452	ClbP; putatives Penicillin Bindeprotein	35,7

**Tab 17: Gene mit einem x-fach erhöhtem Wert im Wildtypstamm *E. coli* Nissle 1917**  
(Fortsetzung)

<b>Gen</b>	<b>Funktion</b>	<b>Ratio <i>E. coli</i> Nissle 1917 <math>\Delta</math>pks/ WT</b>
<b>Polyketidsynthese (Fortsetzung)</b>		
c2461	clbH; putative NRPS AMP-binding Condensation	34,4
c2466	clbE; putatives D-Alanyl carrier Protein	33,3
c2464	clbF; putative Acyl CoA Dehydrogenase	16,9
c2454	clbN; NRPS	15,1
c2457	clbL; putative Amidase	12,3
c2451	clbQ; putative Thioesterase	10,5
c2460	clbI ; putative PKS	4,23
c2458	clbK; putative NRPS	4,13
c2459	clbJ; putative NRPS	3,2
<b>Transportsysteme</b>		
<b>Proteintransport</b>		
gspH	putatives Transportprotein; predicted general secretory pathway component, cryptic	6,36
csgF	putatives Transportprotein	4,58
<b>Zuckertransport</b>		
idnT	L-Idonate and D-Gluconsäure Transporter	3,13
<b>Dicarboxylsäuretransport</b>		
c5038	putatives Transportprotein; Membran gebunden	2,94
<b>Aminosäuretransport</b>		
ycaM	putativer Transporter; Permease	2,91
<b>Lipopolysaccharid Biosynthese</b>		
rfaB	(Glucosyl) Lipopolysaccharid-1, 6-D-Galactosyltransferase; UDP-D-galactose	5,95
<b>Proteinsynthese</b>		
argS	Arginyl-tRNA Synthetase	2,46

**Tab 17: Gene mit einem x-fach erhöhtem Wert im Wildtypstamm *E. coli* Nissle 1917 (Fortsetzung)**

<b>Gen</b>	<b>Funktion</b>	<b>Ratio <i>E. coli</i> Nissle 1917 <math>\Delta</math>pks/ WT</b>
<b>Replikation und DNA Reparatur</b>		
ECs2189	putative Transposase	5,18
yhhl	putative Transposase	2,89
<b>Hypothetische Proteine</b>		
ybiA	hypothetisches Protein	4,32
ECs4300	hypothetisches Protein	4,13
ECs1386	hypothetisches Protein	3,89
ECs1975	hypothetisches Protein; Kohlenhydrat-Bindedomäne	4,69
ECs1976	hypothetisches Protein	3,78
yadK	putatives Fimbrien-ähnliches Adhäsın	4,38
ECs1162	hypothetisches Protein	3,02
ECs2753	hypothetisches Protein	2,68
Z5201	hypothetisches Protein	2,32
Z1386	unbekanntes Protein, kodiert vom kryptischen Prophagen CP-933M	2,32
c3340	hypothetisches Protein	2,17
Z4773	hypothetisches Protein	2,12
<b>Prophagen Gene und Phage ähnliche Funktionen</b>		
ECs2217	putative Integrase	2,09
ECs1637	kleines Kapsid Protein	2,01
ECs1983	putatives Schwanzfiber-Längenmaßprotein	2,29
<b>Energiestoffwechsel</b>		
ndh	respiratorische NADH Dehydrogenase 2 Kupfer(II) Reduktase	4,46
narZ	Nitratreduktase 2 (NRZ), alpha Untereinheit	3,54

**Tab 17: Gene mit einem x-fach erhöhtem Wert im Wildtypstamm *E. coli* Nissle 1917**

Gen	Funktion	Ratio <i>E. coli</i> Nissle 1917 $\Delta$ pks/ WT
<b>Zytokinese</b>		
ECs2214	putativer Zellteilungs-Inhibitor	8,2
<b>Nucleotid-und Nucleosid-Konversion</b>		
adk	Adenylatkinase	2,9
<b>Virulenz</b>		
ECs1126	EspF-ähnliches Protein	4,1

**Tab. 18: Gene mit einem x-fach erhöhtem Wert im Colibactin-negativen *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS**

Gen	Funktion	Ratio <i>E. coli</i> Nissle 1917 $\Delta$ pks/ WT
<b>Aminosäuremetabolismus</b>		
<b>Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan Biosynthese</b>		
trpC	bifunktionale Indol-3-glycerolphosphat-Synthase	-3,023
pheA/ tyrA	Chorismatmutase P	-2,749
tyrB	Tyrosinaminotransferase	-2,043
ECs1835/ TrpE	Anthranilatphosphoribosyltransferase	-2,468
aroB	3-Dehydrochinat-Synthase	-2,79
aroG	3-deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-Phosphat-Synthase	-2,414
aroK	Shikimatkinase I	-2,312
aroC	Chorismatsynthase	-2,304
<b>Histidinmetabolismus</b>		
hisG	ATP-Phosphoribosyltransferase	-2,766
hisI	bifunktionale Phosphoribosyl-AMP-Cyclohydrolase	-2,555

**F Tab. 18: Gene mit einem x-fach erhöhtem Wert im Colibactin-negativen *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS (Fortsetzung)**

<b>Gen</b>	<b>Funktion</b>	<b>Ratio <i>E. coli</i> Nissle 1917 <math>\Delta</math>pks/ WT</b>
<b>Histidinmetabolismus (Fortsetzung)</b>		
hisA	1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5- phosphoribosylamino)-methyliden-amino]-imidazol-4-Carboxamid Isomerase	-2,488
hisH	Imidazol-glycerolphosphat-Synthase; Untereinheit	-2,461
hisIE	Histidinbiosynthese bifunktionales Protein	-2,267
<b>Glutamatmetabolismus</b>		
gltB	Glutamatsynthase; große Untereinheit	-2,423
glnA	Glutaminesynthetase	-2,36
<b>Cysteinmetabolismus</b>		
cysH	Phosphoadenosin-phosphosulfatreductase	-2,442
cysI	Sulfitreductase, beta Untereinheit	-2,230
<b>Arginin- und Prolinmetabolismus</b>		
c5350	putative Arginine Dihydrolase	-8,086
<b>Lysin-Biosynthese</b>		
dapA	Dihydrodipicolinsäuresynthase	-2,237
<b>Glycin, Serin und Threoninmetabolismus</b>		
gcvT	Aminomethyltransferase T (Glycinspaltungs-System)	-2,188
<b>Valin-, Leucin- und Isoleucinbiosynthese</b>		
ilvM	Acetolactatsynthase II, kleine Untereinheit	-2,009
<b>Putative Enzyme</b>		
yafJ	putative Amidotransferase	-2,043

**Tab. 18: Gene mit einem x-fach erhöhtem Wert im Colibactin-negativen *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS (Fortsetzung)**

<b>Gen</b>	<b>Funktion</b>	<b>Ratio <i>E. coli</i> Nissle 1917 <math>\Delta</math>pks/ WT</b>
<b>Transportsysteme</b>		
<b>Aminosäuretransport</b>		
lysP	Lysintransporter	-2,522
metN	DL-Methionintransporter, Untereinheit	-2,03
<b>Ionentransport und Ionen gekoppelter Transport</b>		
fieF	Eisen Fe(II) Effluxprotein F	-2,461
feoA	Eisen Fe(II) Transportprotein A	-2,261
copA	Kupfertransporter	-2,206
YgiE/ zupT	Zinktransporter	-2,03
yebZ	putatives Membranprotein; innere Membran	-2,39
focA	Formiattransporter	-2,363
<b>Proteintransport</b>		
secB	Exportprotein ,TypII Sekretion	2,484
secY/ prlA	Translokase, Untereinheit, TypII Sekretion	2,466
<b>Polysaccharidtransport</b>		
yrbK	hypothetisches Protein	-2,818
kpsM	Permease; N-Acetylneuraminsäuretransporter	-2,604
yhbN	putativer Transporter, Untereinheit	-2,93
c1820	hypothetisches Protein, ABC-Transporter	-2,598
<b>Nukleosidtransport</b>		
nupC	Nukleosidtransporter (außer Guanosin)	-2,595
<b>Zuckertransport</b>		
dhaH	putatives Dihydroxyaceton-spezifisches PTS	-2,144
crr	Glukose-spezifisches PTS System Enzym IIA Komponente	-3,108

**Tab. 18: Gene mit einem x-fach erhöhtem Wert im Colibactin-negativen *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS (Fortsetzung)**

<b>Gen</b>	<b>Funktion</b>	<b>Ratio <i>E. coli</i> Nissle 1917 <math>\Delta</math>pks/ WT</b>
<b>Zuckertransport (Fortsetzung)</b>		
fruB	Fruktose-spezifisches PTS Enzym IIA Komponente	-2,674
ptsN	Zucker-spezifisches PTS Enzym IIA Komponente	-2,136
ptsG	Glukose-spezifisches PTS Enzym Enzym IIB Komponente	-2,8
ptsH	PhosphohistidinoProtein-Hexose phosphotransferase Komponente des PTS Systems (Hpr)	-2,744
ptsP	Zucker-spezifisches PTS PEP-Protein	-2,075
<b>Putative uncharakterisierte Transportsysteme</b>		
yccA	Membranprotein (innere Membran)	-3,41
ybhS	putativer Transporter, Untereinheit	-2,306
dcrB	periplasmatisches Protein	-2,271
c3557	shiA ähnliches Protein	-2,137
<b>Kohlenhydratmetabolismus</b>		
<b>Glykolyse</b>		
pykF	Pyruvatkinase I	-3,096
glk	Glukokinase	-2,967
pgk	Phosphoglyceratkinase	-2,872
fbaA	Fruktose-bisphosphataldolase	-2,696
pgi	Glukose-6-phosphatisomerase	-2,263
pgm	Phosphoglukomutase	-2,085
<b>Pyruvatmetabolismus</b>		
pflA	Pyruvat Formiatlyase aktivierendes Enzym 1	-2,86
pflB	Pyruvat Formiatlyase I	-2,741

**Tab. 18: Gene mit einem x-fach erhöhtem Wert im Colibactin-negativen *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS (Fortsetzung)**

<b>Gen</b>	<b>Funktion</b>	<b>Ratio <i>E. coli</i> Nissle 1917 <math>\Delta</math>pks/ WT</b>
<b>Pyruvatmetabolismus (Fortsetzung)</b>		
ackA	Acetat/Propionatkinase	-2,728
sfcA	Malatdehydrogenase, (decarboxylierend, NAD-abhängig)	-2,708
dld	D-Laktat-Dehydrogenase	-2,575
<b>Pentosephosphatweg</b>		
tkrA	Glyoxylatreduktase B	-2,491
rpe	Ribulose-phosphat 3-Epimerase	-2,408
<b>Stärke- und Saccharose-Metabolismus</b>		
glgB	Glykogen-Verzweigungsenzym	-2,261
ycjU	putative beta-Phosphoglukomutase	-2,009
<b>Galaktose-Metabolismus</b>		
c2560	UDP-Glukose 4-Epimerase	-2,792
<b>Fruktose- und Mannose-Metabolismus</b>		
c2558	Mannose-1-phosphat Guanylyltransferase	-2,49
fsaB	Fruktose-6-phosphat Aldolase 2	-2,013
<b>Putative Enzyme</b>		
ucpA	putative Oxidoreduktase	-2,17
yhhX	putative D-Galaktose-1-Dehydrogenase	-2,541
<b>Proteinsynthese, Modifikation, Faltung, Reparatur, Abbau</b>		
<b>Proteinsynthese</b>		
yfiA	Kälteschock Protein; assoziiert mit 30S ribosomaler Untereinheit	-4,006
rpsA	30S ribosomales Protein S1	-3,23
rpsP	30S ribosomales Protein S16	-2,977
rpmD	50S ribosomales Protein L30	-2,869

**Tab. 18: Gene mit einem x-fach erhöhtem Wert im Colibactin-negativen *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS (Fortsetzung)**

<b>Gen</b>	<b>Funktion</b>	<b>Ratio <i>E. coli</i> Nissle 1917 <math>\Delta</math>pks/ WT</b>
<b>Proteinsynthese (Fortsetzung)</b>		
rpsE	30S ribosomales Protein S5	-2,841
prfA	Peptidketten-Entlassungsfaktor 1	-2,596
rpmJ	50S ribosomales Protein L36	-2,564
rplS	50S ribosomales Protein L19	-2,533
ychF	Translations assoziierte GTPase	-2,312
rpsH	30S ribosomales Protein S8	-2,268
rplM	50S ribosomales Protein L13	-2,254
rpsM	30S ribosomales Protein S13	-2,236
rplQ	50S ribosomales Protein L17	-2,128
infA	Translation Initiation Factor IF-1	-2,105
prfB	Peptidketten-Entlassungsfaktor 2	-2,097
tufA	Proteinkettenverlängerungsfaktor EF-Tu	-2,085
rplO	50S ribosomales Protein L15	-2,167
rpsB	30S ribosomales Protein S2 (Untereinheit)	-2,023
<b>Faltung</b>		
iscU	Scaffold Protein	-3,151
hlpA	periplasmatisches Chaperon	-2,768
groES	Co-Chaperon GroES	-2,724
dnaK	Chaperon	-2,613
ppiD	Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase (Rotamase D)	-2,206
hscB	Co-Chaperon HscB	-2,13
<b>Aminoacyl-tRNA Biosynthese</b>		
lysU	Lysin tRNA Synthetase, induzierbar	-2,512
trpS	Tryptophanyl-tRNA Synthetase	-2,507

**Tab. 18: Gene mit einem x-fach erhöhtem Wert im Colibactin-negativen *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS (Fortsetzung)**

<b>Gen</b>	<b>Funktion</b>	<b>Ratio <i>E. coli</i> Nissle 1917 <math>\Delta</math>pks/ WT</b>
<b>Aminoacyl-tRNA Biosynthese (Fortsetzung)</b>		
lysS	Lysin tRNA Synthetase, konstitutiv	-2,389
ileS	Isoleucyl-tRNA Synthetase	-2,033
leuS	Leucyl-tRNA Synthetase	-2,013
<b>Proteinabbau</b>		
pepN	Aminopeptidase N	-2,350
yfgC	putative Peptidase	-2,394
prlC	Oligopeptidase A	-2,084
<b>Proteinmodifikation</b>		
hypC	akzessorisches Protein; Reifung von Hydrogenase 1 und 3	-2,293
prmB	N5-Glutamine Methyltransferase	-2,251
lgt	Phosphatidylglycerol-prolipoprotein-diacylglyceryl Transferase	-2,052
spy	periplasmatisches Protein	-2,449
<b>Transkription und RNA Metabolismus</b>		
<b>Transkription</b>		
rpoB	DNA-abhängige RNA Polymerase; beta-Untereinheit	-2,383
rpoA	DNA-abhängige RNA polymerase alpha-Untereinheit	-2,284
rpoE	RNA Polymerase, Sigma 24 (Sigma E) Faktor	-2,034
<b>Regulation der Transkription</b>		
rhoL	rho Operon leader Peptid	-3,623
Rho	Transkriptionsterminationsfactor Rho	-2,197
Gmr	Modulator der Rnase II Stabilität	-2,141
hfq	RNA-Bindeprotein Hfq	-2,111

**Tab. 18: Gene mit einem x-fach erhöhtem Wert im Colibactin-negativen *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS (Fortsetzung)**

<b>Gen</b>	<b>Funktion</b>	<b>Ratio <i>E. coli</i> Nissle 1917 <math>\Delta</math>pks/ WT</b>
<b>Regulation der Transkription (Fortsetzung)</b>		
sspA	stringentes Nährstoffmangel Protein A	-2,065
<b>RNA-Modifikation</b>		
ksgA	Dimethyladenosintransferase	-2,059
<b>RNA Destabilisierung und Abbau</b>		
mrn	Exoribonuklease R	-2,191
ygdP	Dinukleosidpolyphosphatase	-2,169
<b>DNA Metabolismus, Replikation und Reparatur</b>		
<b>Replikation</b>		
dnaG	DNA Primase	-2,559
gyrB	DNA Gyrase, Untereinheit B	-2,321
seqA	regulatorisches Protein der Replikationsinitiation	-2,289
Dam	DNA Adeninmethylase	-2,082
cspD	DNA Replikationsinhibitor	-2,051
<b>DNA-Reparatur</b>		
ydjQ	Endonuclease	-2,75
Gph	Phosphoglykolatphosphatase	-2,593
sbcB	Exonuklease I	-2,401
nfo	Endonuklease IV	-2,077
uvrA	Excinuklease ABC, Untereinheit A	-2,054
radC	DNA Reparatur Protein	-2,039
<b>Putative Enzyme</b>		
yrdD	putative DNA Topoisomerase	-2,772
pO157p15	Hypothetisches Protein, putative Transposase	-2,47
pO157p16	Hypothetisches Protein, putative Transposase	-2,147

**Tab. 18: Gene mit einem x-fach erhöhtem Wert im Colibactin-negativen *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS (Fortsetzung)**

<b>Gen</b>	<b>Funktion</b>	<b>Ratio <i>E. coli</i> Nissle 1917 <math>\Delta</math>pks/ WT</b>
<b>DNA Metabolismus</b>		
ECs0053	putatives Toxin des Gyrase inhibierenden Toxin-Antitoxin Systems (CcdB-ähnliches Protein)	-2,321
yhiR	putatives DNA prozessierendes Protein	-2,129
tas	putative Oxidoreductase, NADP(H)-abhängig	-2,049
<b>Cofaktor-Biosynthese</b>		
<b>Coenzym A Biosynthese und Modifikation</b>		
coaE	Dephospho-CoA Kinase	-2,953
dfp	bifunktionale Phosphopantothenoylecystein-Decarboxylase	-2,507
<b>Porphyrinbiosynthese</b>		
hemA	Glutamyl-tRNA Reduktase	-2,159
hemD	Uroporphyrinogen-III Synthetase	-2,156
lolB hemM	Chaperone für Lipoproteine	-2,345
btuR	Cobalamin-Adenosyltransferase	-2,154
<b>Ubiquinonbiosynthese</b>		
ubiA	4-Hydroxybenzoat-octaprenyltransferase	-2,29
ubiH	2-Octaprenyl-6-methoxyphenolhydroxylase	-2,028
<b>Andere Cofaktorbiosynthesewege</b>		
moaA	Molybdän Cofaktor Biosyntheseprotein A	-2,853
panD	Aspartat-1-Decarboxylase Vorstufe	-2,478
mioC	Flavodoxin	-2,235
nadE	NAD Synthetase	-2,102
folE	GTP Cyclohydrolase I	-2,043
iscS	Cysteindesulfurase	-2,98
ribF	Hypothetisches Protein; bifunctional riboflavin kinase/FAD synthetase	-2,240

**Tab. 18: Gene mit einem x-fach erhöhtem Wert im Colibactin-negativen *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS (Fortsetzung)**

<b>Gen</b>	<b>Funktion</b>	<b>Ratio <i>E. coli</i> Nissle 1917 <math>\Delta</math>pks/ WT</b>
<b>Elektronentransport</b>		
trxA	Thioredoxin	-2,54
mdaB	NADPH quinonreductase	-2,523
<b>Elektronentransportkette</b>		
fldA	Flavodoxin 1	-2,353
fdx	[2Fe-2S] Ferredoxin	-2,317
<b>Prophagen Gene und Phage ähnliche Funktionen</b>		
<b>Autotransporter</b>		
c1273	Antigen 43 Vorstufe	-7,545
flu	Antigen 43 (Ag43) autotransporter	-2,656
<b>Stressantwort</b>		
pspA	regulatorisches Protein des Phagen-Schock-Protein Operons	-2,759
pspD	periphäres phage-shock Protein; innere Membran	-2,418
pspB	phage-shock Protein B	-2,374
pspC	Aktivator; Transkription	-2,676
<b>DNA-Reparatur</b>		
yeeS	putatives DNA Reparaturprotein; CP4-44 prophage	-2,295
<b>Transport</b>		
nmpC	Pseudogen; truncated outer membrane porin ; DLP12 prophage	-2,239
<b>Transposon ähnliche Proteine</b>		
insA-3	IS1 Repressor Protein; CP4-6 prophage	-2,166
insC-4 yaiX	IS2 Insertionselementrepressor	-2,094
insA-7	IS1 Repressor Protein; KpLE2 Phagen-ähnliches Element	-2,079
insO-1	partielle Transposase des Insertionselementes IS911A ; CP4-6 Prophage	-2,005

**Tab. 18: Gene mit einem x-fach erhöhtem Wert im Colibactin-negativen *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS (Fortsetzung)**

<b>Gen</b>	<b>Funktion</b>	<b>Ratio <i>E. coli</i> Nissle 1917 <math>\Delta</math>pks/ WT</b>
<b>Regulation</b>		
<b>Fimbrien und Flagellen</b>		
c3582	papX; P-Fimbrie	-3,462
flhC	dualer Regulator; Transkription	-3,103
flhD	Aktivator; Transkription	-2,952
hdfR	Hns-abhängiger Regulator für flhDC	-2,083
<b>Stressantwort</b>		
cpxP	periplasmatisches Protein response to ox. stress	-2,75
cpxR	Response Regulator in Zwei-Komponenten System mit CpxA	-2,056
baeR	Regulator; Transkription	-2,525
yihE	putative Kinase	-2,443
iscR	Repressor; Transkription	-2,286
rseB	periplasmatischer negativer Regulator von SigmaE	-2,049
Hns	globaler dualer Regulator H-NS	-2,569
<b>Kohlenhydratmetabolismus</b>		
crp	dualer Regulator; Transkription	-2,448
gntR	Repressor; Transkription	-2,381
uvrY	Regulator; Carbon storage	-2,134
<b>Detoxifizierung</b>		
zntR	Regulator; Transkription; Zink-sensitiv	-2,333
yjeB	Putativer Regulator; Nitrit-sensitiver Repressor	-2,293
<b>Nährstoffmangel</b>		
phoQ	Sensorkinase in Zwei-Komponenten System mit PhoP	-2,258
phoP	Response Regulator in Zwei-Komponenten System mit PhoQ	-2,178

**Tab. 18: Gene mit einem x-fach erhöhtem Wert im Colibactin-negativen *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS (Fortsetzung)**

<b>Gen</b>	<b>Funktion</b>	<b>Ratio <i>E. coli</i> Nissle 1917 <math>\Delta</math>pks/ WT</b>
<b>Nährstoffmangel (Fortsetzung)</b>		
ECs0169	PII uridylyl-Transferase	-2,215
<b>Anaerobe Respiration</b>		
dcuR	Response Regulator in Zwei-Komponenten System mit DcuS	-2,271
narL	Response Regulator in Zwei-Komponenten System mit NarX (oder NarQ)	-2,162
fnr	Globaler dualer Regulator des anaeroben Wachstums	-2,246
<b>Cofaktor-Biosynthese</b>		
gcvR	Repressor; Transkription; Glycinspaltungs-System	-2,284
<b>Putative Regulatoren</b>		
ygaV	putativer Regulator; Transkription	-2,072
hflX	putative GTPase	-2,048
ybiH	hypothetischer Regulator; Transkription	-2,043
<b>Peptidoglycan-Biosynthese</b>		
ftsI	Transpeptidase involviert in septale Peptidoglycan Synthese	-2,413
murl	Glutamatracemase	-2,364
pbpG	D-Alanyl-D-Alanin Endopeptidase	-2,240
ddl	D-Alanylalanine Synthetase	-2,007
<b>Lipid- und Phospholipid-Biosynthese</b>		
<b>Lipid A Biosynthese</b>		
Z3643	Lauroylacyltransferase; Lipid A Biosynthese	-2,927
YfbE/ arnB	Uridin 5'-(beta-1-threo-pentapyranosyl-4-ulose diphosphat) Aminotransferase	-2,720
YfbF/ arnC	Undecaprenyl-Phosphat-L-Ara4FN Transferase	-2,626
ddg/ lpxP	Palmitoleoylacyltransferase; Lipid A Biosynthese	-2,568

**Tab. 18: Gene mit einem x-fach erhöhtem Wert im Colibactin-negativen *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS (Fortsetzung)**

Gen	Funktion	Ratio <i>E. coli</i> Nissle 1917 $\Delta$ pkS/ WT
<b>Lipid A Biosynthese (Fortsetzung)</b>		
lpxC	UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl] N-acetylglucosamin-Deacetylase	-2,495
<b>Phospholipidbiosynthese</b>		
pssA	Phosphatidylserin Synthase	-2,422
plsC	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphat Acyltransferase	-2,310
cfa	Methyltransferase für ungesättigte Phospholipide	-2,297
pgpB	Phosphatidylglycerophosphatase B	-2,063
<b>Lipidbiosynthese</b>		
accD	Acetyl-CoA Carboxyltransferase	-2,151
accB	Acetyl-CoA Carboxylase	-2,108
<b>Nukleotid-und Nukleosid-Konversion</b>		
<b>Nukleotidbiosynthese</b>		
purA	Adenylsuccinat Synthetase	-2,522
gmK	Guanylatkinase	-2,342
add	Adenosindeaminase	-2,303
thyA	Thymidylat Synthase	-2,036
<b>Nukleosidmetabolismus</b>		
amn	AMP Nucleosidase	-2,221
relA	(p)ppGpp Synthetase I	-2,113
<b>Lipopolysaccharid Biosynthese</b>		
rfaJ	(Galactosyl)lipopolysaccharid Glucosyltransferase (UDP-D-Glukose)	-2,586
rfaD	ADP-L-glycero-D-mannoheptose-6-Epimerase,	-2,348
rfaY	Lipopolysaccharid Biosynthese	-2,124
rfaP	Lipopolysaccharid Biosynthese	-2,093

**Tab. 18: Gene mit einem x-fach erhöhtem Wert im Colibactin-negativen *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS (Fortsetzung)**

<b>Gen</b>	<b>Funktion</b>	<b>Ratio <i>E. coli</i> Nissle 1917 <math>\Delta</math>pkS/ WT</b>
<b>Lipopolysaccharid Biosynthese (Fortsetzung)</b>		
rffG	dTDP-Glukose 4,6-Dehydratase	-2,339
yrbI	3-deoxy-D-manno-octulosonat 8-phosphat Phosphatase	-2,052
gutQ	D-Arabinose-5-phosphat-Isomerase	-2,013
lpcA	Phosphoheptoseisomerase	-2,007
<b>Zytokinese</b>		
<b>Zellteilung</b>		
nlpl	Hypothetisches Protein; Lipoprotein	-3,239
minE	topologischer Spezifitätsfaktor; Zellteilung	-2,877
ispZ	intrazelluläres Septenbildungsprotein A	-2,451
yghB	konserviertes Protein; innere Membran	-2,333
ftsL	Zellteilungsprotein; Septum; Membran gebunden	-2,242
minC	Inhibitor der Septumbildung	-2,186
maf	Septumbildung	-2,005
<b>Energiestoffwechsel</b>		
<b>Gärung</b>		
adhE	Acetaldehyd-Dehydrogenase	-3,048
<b>Aerobe und anaerobe Respiration</b>		
nuoH	NADH Dehydrogenase; Untereinheit H	-2,546
nuoL	NADH Dehydrogenase ; Untereinheit L	-2,203
<b>Polyaminsynthese</b>		
speE	Spermidin Synthase	-2,613
speG	Spermidin N1-Acetyltransferase	-2,587
ygiC	Glutathionylspermidine Synthase; putatives Enzym	-2,389

**Tab. 18: Gene mit einem x-fach erhöhtem Wert im Colibactin-negativen *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS (Fortsetzung)**

<b>Gen</b>	<b>Funktion</b>	<b>Ratio <i>E. coli</i> Nissle 1917 <math>\Delta</math>pks/ WT</b>
<b>Virulenzfaktoren</b>		
gipA	Peyer's Patch-spezifischer Virulenzfaktor; putative Transposase	-2,491
c3620   c3619	sekretiertes Autotransportertoxin	-2,490
ECs1396	AidA-I; Adhäsion-ähnliches Protein	-2,093
<b>Hypothetische Proteine</b>		
c0286	Hypothetisches Protein; LDL-Rezeptorbinde-Domäne des humanen Apolipoproteins E	-8,154
c0287	Hypothetisches Protein	-6,052
c0284	konserviertes hypothetisches Protein; Patatin-ähnliche Phospholipase	-3,662
c0283	Hypothetisches Protein	-3,177
c0285	Hypothetisches Protein	-2,966
yrdA	Hypothetisches Protein; Transferase-Aktivität	-3,702
c0299	Hypothetisches Protein	-5,344
c0300	Hypothetisches Protein	-3,361
ygdH	Hypothetisches Protein, putative Lysin-Decarboxylase	-3,427
c3818	Hypothetisches Protein	-3,187
c3682	Hypothetisches Protein	-3,13
c3686	Hypothetisches Protein; putative Arabinose-5-Phosphat Isomerase	-2,961
ECP_3005	Hypothetisches Protein	-2,936
c5346	Hypothetisches Protein; DNA-Bindedomäne	-2,786
damX	Hypothetisches Protein; Progesteronrezeptor-Motif	-2,767
ECs2547	Hypothetisches Protein	-2,749
ECs5432	Hypothetisches Protein	-2,727
c3681	Hypothetisches Protein	-2,696

**Tab. 18: Gene mit einem x-fach erhöhtem Wert im Colibactin-negativen *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS (Fortsetzung)**

<b>Gen</b>	<b>Funktion</b>	<b>Ratio <i>E. coli</i> Nissle 1917 <math>\Delta</math>pks/ WT</b>
<b>Hypothetische Proteine (Fortsetzung)</b>		
ydiH	Hypothetisches Protein	-2,625
yeaC	Hypothetisches Protein	-2,593
yebR	Hypothetisches Protein; putative Methionin-(R)-sulfoxidreduktase	-2,535
c2917	Hypothetisches Protein	-2,517
yeeX	Hypothetisches Protein	-2,508
yafD	Hypothetisches Protein; YadD ähnliches Protein	-2,491
ynfB	Hypothetisches Protein	-2,477
yjiX	Hypothetisches Protein	-2,464
ycbK	Hypothetisches Protein; putative Peptidase	-2,421
c2251	Hypothetisches Protein; yobA precursor	-2,430
c5451	Hypothetisches Protein	-2,416
c2837	Hypothetisches Protein	-2,394
Z1663	Hypothetisches Protein	-2,37
yebE	Hypothetisches Protein	-2,35
UT189_P066	Hypothetisches Protein	-2,341
c2523	konserviertes hypothetisches Protein Patatin-like phospholipase	-2,339
ygiA	Hypothetisches Protein	-2,338
yfiR	Hypothetisches Protein	-2,33
ymjA	Hypothetisches Protein	-2,329
yhdN	Hypothetisches Protein	-2,306
yqgE	Hypothetisches Protein; putative transcriptional regulator	-2,29
ECs3251	Hypothetisches Protein	-2,289
yaeJ	Hypothetisches Protein; <i>release factor 1 domain</i>	-2,278

**Tab. 18: Gene mit einem x-fach erhöhtem Wert im Colibactin-negativen *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS (Fortsetzung)**

<b>Gen</b>	<b>Funktion</b>	<b>Ratio <i>E. coli</i> Nissle 1917 <math>\Delta</math>pks/ WT</b>
<b>Hypothetische Proteine (Fortsetzung)</b>		
c2501	Hypothetisches Protein; Haemolysinexpression modulierendes Protein (homolog)	-2,264
yebC	Hypothetisches Protein	-2,211
yfgA	Hypothetisches Protein; Cytoskelet Protein RodZ	-2,192
ECs4632	Hypothetisches Protein; Zuckerphosphatase	-2,187
yhbJ	Hypothetisches Protein; Nucleosidtriphosphat-Hydrolase-Domäne	-2,182
yafK	Hypothetisches Protein	-2,181
smg	Hypothetisches Protein	-2,165
ydiZ	Hypothetisches Protein	-2,149
yhjX	Hypothetisches Protein; putativer Transporter	-2,148
ybgF	Hypothetisches Protein	-2,148
yggJ	Hypothetisches Protein; 16S rRNA m(3)U1498 methyltransferase	-2,145
ycbJ	Hypothetisches Protein, putative Phosphotransferase	-2,145
c3679	konserviertes hypothetisches Protein	-2,144
yfhM	$\alpha$ -Makroglobulin, involved in colonization , entericidin antidote/toxin peptides family	-2,136
yffB	Hypothetisches Protein related to glutaredoxins family	-2,125
c3113	Hypothetisches Protein	-2,109
ygfB	Hypothetisches Protein	-2,096
c3605	Hypothetisches Protein	-2,091
mazG	Hypothetisches Protein; nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase	-2,091
yiiS	Hypothetisches Protein	-2,090
yceB	putatives Lipoprotein	-2,086

**Tab. 18: Gene mit einem x-fach erhöhtem Wert im Colibactin-negativen *E. coli* Nissle 1917  $\Delta$ PKS (Fortsetzung)**

<b>Gen</b>	<b>Funktion</b>	<b>Ratio <i>E. coli</i> Nissle 1917 <math>\Delta</math>pks/ WT</b>
<b>Hypothetische Proteine (Fortsetzung)</b>		
ycfP	Hypothetisches Protein	-2,085
ybgT	Hypothetisches Protein; membran protein	-2,072
smf	Hypothetisches Protein; DNA processing protein	-2,072
yebY	Hypothetisches Protein	-2,071
yjjA	Hypothetisches Protein yjjA Vorläufer (Protein P-18)	-2,065
ybjX	Hypothetisches Protein	-2,063
c1195	Hypothetisches Protein	-2,057
c1269	Hypothetisches Protein	-2,050
apaG	Hypothetisches Protein; protein associated with Co <sub>2</sub> <sup>+</sup> and Mg <sub>2</sub> <sup>+</sup> efflux	-2,039
yjbQ	Hypothetisches Protein	-2,028
yobA	Hypothetisches Protein; response to copper ion	-2,012
<b>Metabolismus anderer Komponenten</b>		
ppk	Polyphosphatkinase	-2,545
sseA	3-mercaptopyruvat-Sulfurtransferase	-2,025
ygaW	Putatives Membranprotein; innere Membran	-2,019
yeiR	putatives Enzym	-2,018

## A.7 Publikationen und Tagungsbeiträge

### Publikationen

**Dobrindt U, Chowdary MG, Krumbholz G, Hacker J.** (2010) Genome dynamics and its impact on evolution of *Escherichia coli*. *Med Microbiol Immunol.* **199** (3):145-154

### Tagungsbeiträge

**Krumbholz G., Dobrindt U., Hacker J.** (2007): Functional Characterization of a new polyketide expressed in *Escherichia coli*. 59. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Göttingen, Posterpräsentation

**Krumbholz G., Dobrindt U., Hacker J.** (2007): Functional Characterization of a new polyketide expressed in *Escherichia coli*. EMBO-FEMS-LEOPOLDINA Symposium "Escherichia coli-Facets of a versatile pathogen.", Kloster Banz, Posterpräsentation

**Krumbholz G., Dobrindt U., Hacker J.** (2008): Studies on the organization and expression of colibactin genes in *Escherichia coli*. 60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Dresden, Posterpräsentation