

4. Konstruktion und Charakterisierung einer *leuX*-Mutante im *E. coli*-Stamm

O157:H7 86-24

Im UPEC-Stamm 536 war nachgewiesen worden, daß die Deletion des tRNA-Gens *leuX* zu einem Verlust der Virulenz des Stamms durch einen massiven Rückgang der Expression verschiedener Virulenzfaktoren führte (Blum *et al.*, 1994, Ritter *et al.*, 1995 und 1997, Dobrindt, 1999). Um zu testen, ob dieser Effekt auch für die Expression von EHEC-Virulenzfaktoren eine Rolle spielt, wurde eine isogene *leuX*-Mutante des Stx2-produzierenden EHEC-Stamms 86-24 konstruiert und phänotypisch charakterisiert.

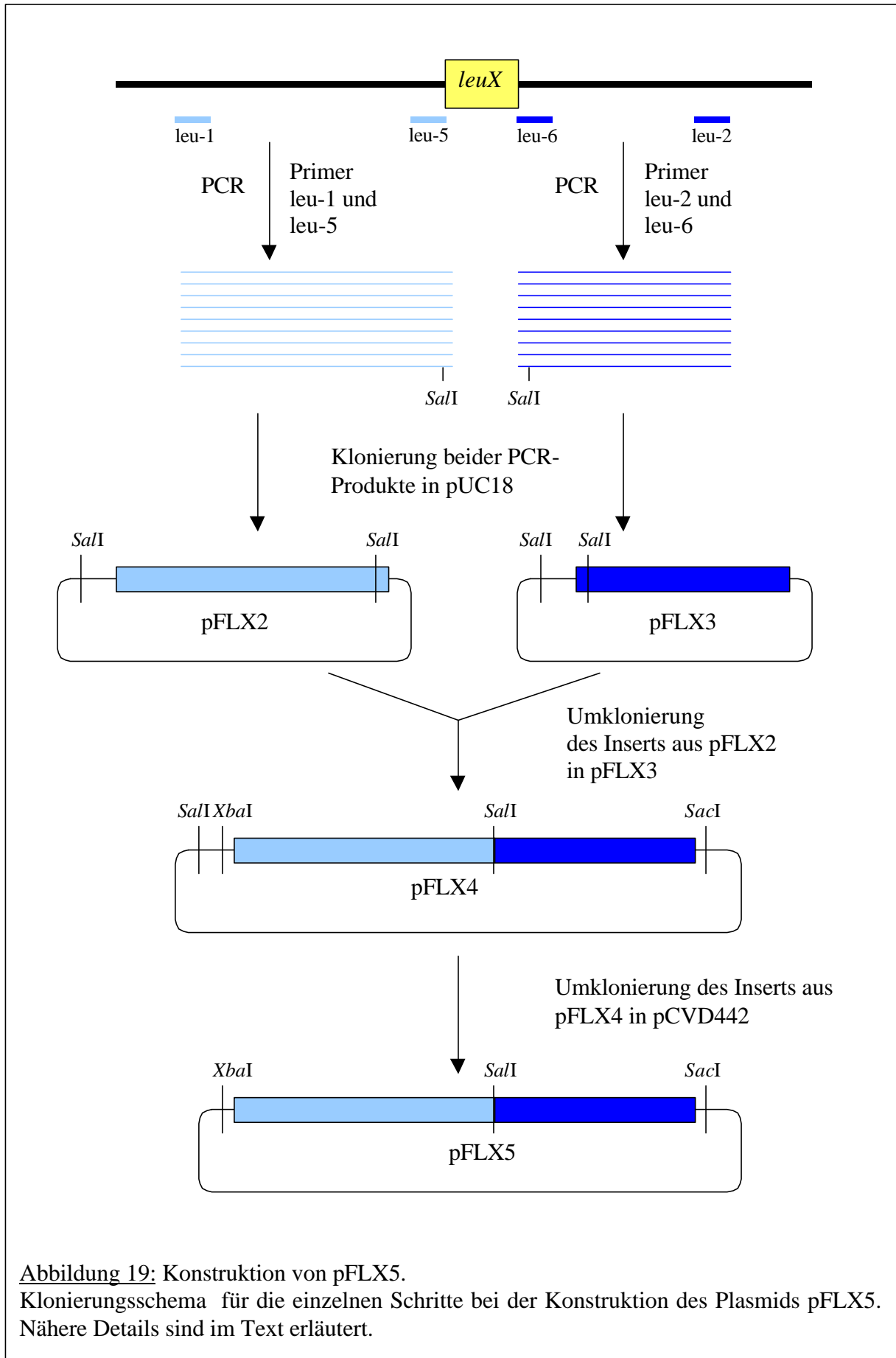
4.1 Konstruktion des Plasmids pFLX5

Im Vorfeld der Konstruktion einer EHEC *leuX*-Mutante wurde zunächst die *leuX*-Region des EHEC-Stamms O157:H7 86-24 charakterisiert. Zu diesem Zweck wurde das EHEC-*leuX*-Gen und die angrenzenden „upstream“- und „downstream“-Sequenzen mithilfe der Oligonukleotide *leu-1* und *leu-2* in einer PCR mit einer „proofreading“-aktiven DNA-Polymerase und dem genannten EHEC-Stamm als Template amplifiziert. Das 1.336 bp lange PCR-Produkt wurde in die *SmaI*-Schnittstelle des Vektors pUC18 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) kloniert. Das neu entstandene Plasmid wurde pFLX1 bezeichnet und das klonierte Fragment mit den Primern M13Universal, M13Reverse, *leu-9* und *leu-10* sequenziert. Die Sequenzen dreier unabhängig amplifizierter und klonierter PCR-Produkte wurden miteinander verglichen. Dabei ergab sich, daß das *leuX*-Gen im O157:H7-Stamm 86-24 identisch war mit dem *leuX*-Gen des UPEC-Stamms 536 und Unterschiede nur in den „upstream“- und „downstream“-Bereichen auftraten. Die Homologie in der gesamten klonierten *leuX*-Region (inclusive *leuX*-Gen und Sequenzen der Primer *leu-1* und *leu-2*) lag bei 96,2 % Identität (siehe Sequenz im Anhang).

Das *leuX*-Gen sollte nun im EHEC-Stamm O157:H7 86-24 mithilfe des λ -*pir*-abhängigen Suizidvektors pCVD442 (Donnenberg und Kaper, 1991), der die Gene *bla* (Ampicillinresistenz) und *sacB* (Saccharose-Sensitivität) enthält, unter Vermeidung einer möglichen Leserasterverschiebung („in frame“) deletiert werden. Zu diesem Zweck wurde der „upstream“-Bereich des Gens durch PCR mit Hilfe der Primer *leu-1* und *leu-5* mit dem Plasmid pFLX1 als Template amplifiziert. Dabei wurde durch *leu-5* in das PCR-Produkt am 5'-Ende von *leuX* eine zusätzliche *SalI*-Schnittstelle einbaut. Das 678 bp lange PCR-Fragment wurde in die *SmaI*-Schnittstelle des Vektors pUC18 kloniert und das neue Plasmid pFLX2 benannt. Dasselbe geschah mit der „downstream“-*leuX*-Region unter Verwendung der PCR-

Primer *leu-2* und *leu-6*, von denen letzterer am 3'-Ende von *leuX* eine zusätzliche *SalI*-Schnittstelle ins PCR-Produkt einführt, und dem EHEC-Stamm 86-24 als Template. Nach der entsprechenden Klonierung des 575 bp langen „downstream“-*leuX*-Fragments in pUC18 wurde ein Klon selektiert, dessen Insert in derselben Orientierung in den Polylinker inseriert war wie das „upstream“-Insert in pFLX2. Dieser Klon wurde pFLX3 benannt und beide klonierten Sequenzen durch Sequenzierung überprüft.

Das „upstream“-*leuX*-Fragment wurde über zwei *SalI*-Restriktionsschnittstellen in pFLX2 aus dem Plasmid ausgeschnitten. Eine der beiden Schnittstellen befindet sich vor dem 5'-Ende des Fragments im Polylinker von pUC18 und die andere am 3'-Ende des Inserts stammt aus dem PCR-Primer *leu-5*. Dieses *SalI*-Fragment wurde in die beiden entsprechend lokalisierten *SalI*-Schnittstellen des Plasmids pFLX3 umklont. Dabei entstand das Plasmid pFLX4, das eine Fusion aus der „upstream“- und der „downstream“-*leuX*-Region enthält, in der an der Stelle des deletierten *leuX*-Gens eine zusätzliche *SalI*-Schnittstelle lokalisiert ist. Die Gesamtlänge dieses $\Delta leuX$ -Inserts beträgt 1.234 bp, wobei die Länge der *leuX*-Deletion 102 bp umfaßt und fast die komplette Sequenz, die für die reife tRNA_{5^{Leu}} kodiert, beinhaltet. Dieses $\Delta leuX$ -Insert aus pFLX4 wurde über die flankierenden *XbaI*- und *SacI*-Schnittstellen im Polylinker von pUC18 in die entsprechenden Schnittstellen von pCVD442 umklont. Daraus resultierte schließlich das für die Durchführung der *leuX*-Deletion notwendige 7,4 kb große Plasmid pFLX5 (in *E. coli* K-12 SY327 *Ipir*). Die Fusionsstelle zwischen *leuX*-„upstream“- und „downstream“-Fragment wurde durch Sequenzierung von pFLX5 mit den Primern *leu-9* und *leu-10* überprüft. In Abbildung 19 ist das Konstruktionsschema von pFLX5 nochmals bildlich dargestellt (siehe auch Plasmidkarte im Anhang).



4.2 Konstruktion des *leuX*-negativen EHEC-Stamms 86-24D4.4

Die gezielte Deletion von *leuX* erfolgte nach demselben Prinzip wie es bereits für die analog erfolgte Konstruktion der EHEC Toxinmutante TUV86-1 in der vorliegenden Arbeit beschrieben wurde. Hierfür wurde das λ -*pir*-abhängige Plasmid pFLX5 in den *E. coli* K-12 Stamm SM10*Ipir* transformiert und anschließend durch Konjugation aus *E. coli* SM10*Ipir*(pFLX5) in den antibiotikasensitiven EHEC-Stamm O157:H7 86-24 übertragen. Der Suizidvektor pFLX5 integrierte durch ein Einzelcrossover über die in ihm enthaltenen *leuX*-flankierenden Sequenzen in die *leuX*-Region im Genom des EHEC-Stamms. Dieser wurde durch die Übertragung des plasmidkodierten *bla*-Gens (β -Lactamase) Ampicillin-resistent.

Durch Selektion auf die Einführung der Ampicillin-Resistenz in den ansonsten Antibiotika-sensitiven EHEC-Stamm konnten entsprechende EHEC-Kointegranenstämme leicht vom sensitiven Ausgangsstamm unterschieden werden. Schwieriger war die Trennung von dem ebenfalls Ampicillin-resistenten *E. coli*-Donorstamm SM10*Ipir*(pFLX5), die auf der Grundlage des unterschiedlichen Lactose-Metabolismus beider Stämme erfolgte. EHEC-Stämme sind Lactoseverwerter und bilden auf Lactose-haltigen MacConkey-Platten große rote Kolonien, während Derivate des *E. coli* K-12 Stamms SM10 keine Lactose abbauen können und auf denselben Platten als kleine weiße Kolonien in Erscheinung treten. Außerdem können die auxotrophen EHEC-Stämme in Minimalmedium wie M9 wachsen, was den heterotrophen *E. coli* K-12-Stämmen nicht möglich ist. Auf diese Weise konnten ampicillinresistente, Lactose verwertende Kointegranenstämme isoliert werden, die durch mehrfaches abwechselndes Ausstreichen auf ampicillinhaltigem Lac-MacConkey- und M9-Agar vom Plasmiddonorstamm *E. coli* SM10*Ipir*(pFLX5) getrennt wurden. Diese nun klonalen Kointegranen wurden genotypisch mittels Southern Hybridisierung wie im folgenden Kapitel beschrieben überprüft.

Für die Induktion des Plasmidverlusts durch ein zweites Einzelcrossover zwischen chromosomalen und Plasmid-*leuX*-Sequenzen wurde ein geeigneter Kointegranenstamm ohne Selektionsdruck hochgezüchtet. Die Kultur wurde anschließend auf 10 % Saccharoseplatten ausplattiert und die hochwachsenden Stämme auf den Verlust ihrer plasmidvermittelten Ampicillinresistenz und Saccharosesensitivität getestet. Stämme mit den passenden Eigenschaften, die sowohl wildtypische EHEC-Stämme als auch EHEC *leuX*-Mutanten hätten sein können, wurden im Folgenden genotypisch und phänotypisch charakterisiert.

4.3 Genotypische Charakterisierung des *leuX*-negativen EHEC-Stamms 86-24D4.4

Die genotypische Charakterisierung der möglichen *leuX*-Mutanten des EHEC-Stamms O157:H7 86-24 erfolgte durch PCR und Southern Hybridisierung. Die Unterscheidung durch PCR geschah mit Hilfe von Primern, die den gezielten Nachweis des intakten *leuX*-Gens sowie der *leuX*-Deletion ermöglichten. Der Primer leu-8 bindet im intakten *leuX*-Gen und ergibt in einer PCR zusammen mit dem Primer leu-2 mit einem wildtypischen Stamm als Template ein 593 bp langes PCR-Produkt, während in einer *leuX*-Mutante keine DNA amplifiziert wird. Umgekehrt gilt für eine PCR mit den Primern leu-2 und leuXdel, daß mit *leuX*-Mutanten ein 575 bp langes Fragment hergestellt wird, während in wildtypischen Stämmen die Reaktion negativ ausfällt. Der Primer leuXdel bindet genau auf der Fusionsstelle zwischen „upstream“- und „downstream“-*leuX*-Sequenz wie sie in pFLX5 vorliegt, weswegen er nur in *leuX*-Mutanten effizient binden und die Amplifikation eines PCR-Produkts ermöglichen kann. Auf diese Weise konnte eine Reihe von Klonen isoliert werden, die die erwünschten Amplifikationsmuster aufwiesen.

Diese potentiellen *leuX*-Mutanten wurden einer Southern Hybridisierung unterworfen. Hierfür wurde mit dem Restriktionsenzym *SalI* geschnittene chromosomale DNA der zu testenden Stämme mit einer DNA-Sonde aus dem *XbaI/SacI* Insert des Plasmids pFLX5 hybridisiert, die spezifisch die „upstream“- und „downstream“-*leuX*-Regionen detektiert. Die Hybridisierung ergab ein einziges Signal für den EHEC Wildtypstamm 86-24 auf einer Höhe von 15,6 kb. In den Mutanten ließ sich dieses Fragment durch *SalI* in zwei Teile spalten, die wildtypische 15,6 kb Bande verschwand und es traten zwei neue Banden bei 7,3 kb und 8,2 kb in Erscheinung. Im Vergleich zum Wildstamm war die Einführung der gewünschten zusätzlichen *SalI*-Schnittstelle an der Stelle des *leuX*-Gens sowie eine Deletion von 0,1 kb zu erkennen. Im Kointegrentenstamm war bereits das 7,3 kb Mutantenfragment vorhanden, die andere Bande von ca. 14,7 kb enthielt neben dem zweiten Mutantenfragment noch das 7,4 kb große Plasmid pFLX5. Der EHEC-*leuX*-Mutantenstamm 86-24Δ4.4 wurde ausgewählt für die weitere Charakterisierung (siehe Abbildung 20).

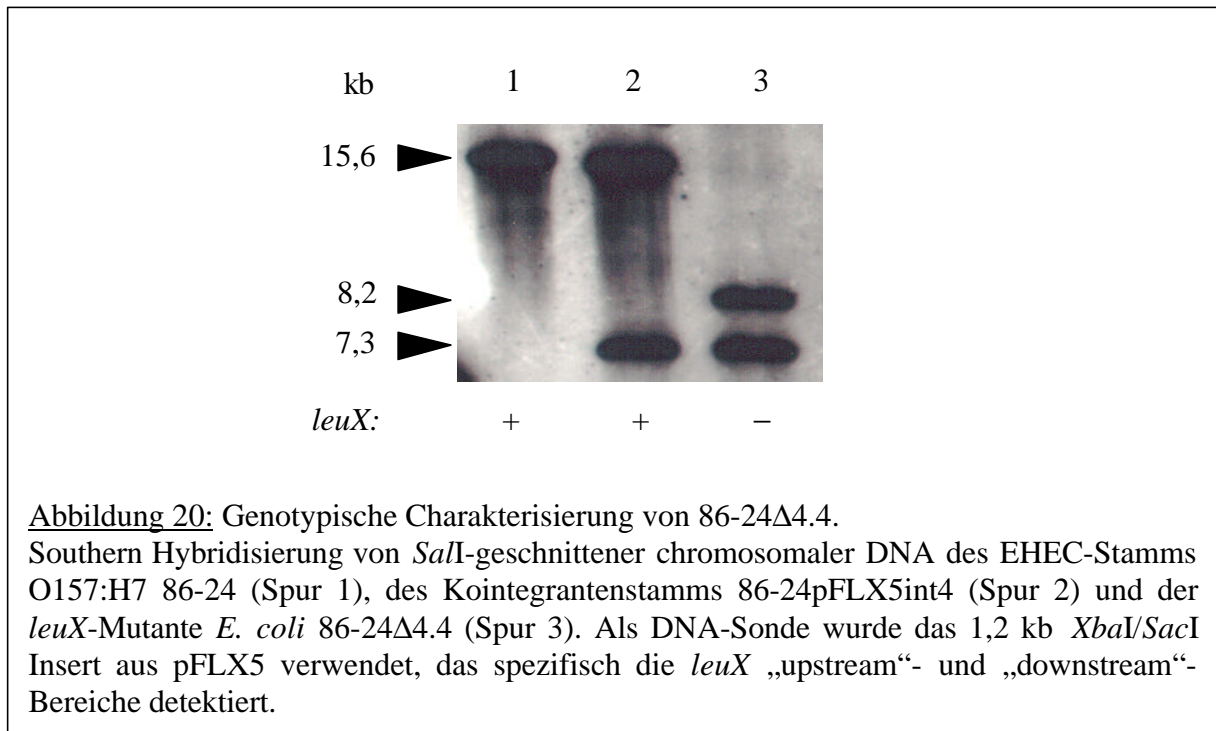
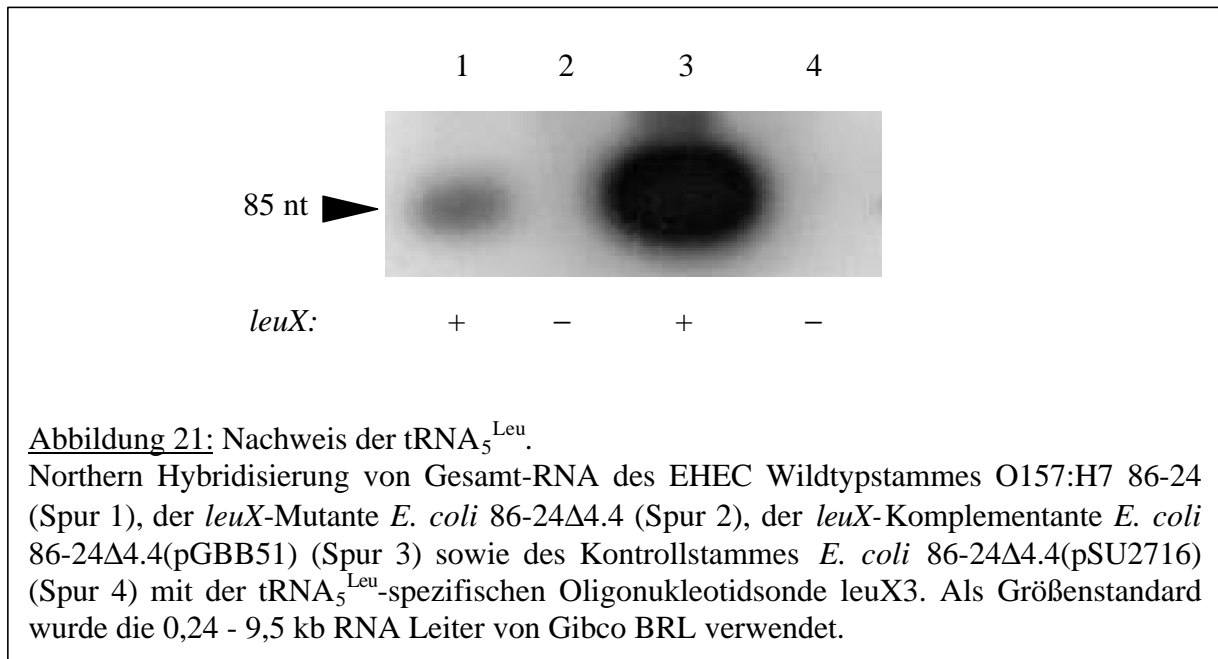


Abbildung 20: Genotypische Charakterisierung von 86-24 Δ 4.4.

Southern Hybridisierung von *SalI*-geschnittener chromosomaler DNA des EHEC-Stamms O157:H7 86-24 (Spur 1), des Kointegranstamms 86-24pFLX5int4 (Spur 2) und der *leuX*-Mutante *E. coli* 86-24 Δ 4.4 (Spur 3). Als DNA-Sonde wurde das 1,2 kb *XbaI/SacI* Insert aus pFLX5 verwendet, das spezifisch die *leuX* „upstream“- und „downstream“-Bereiche detektiert.

Als nächstes sollte die *leuX*-Mutante *E. coli* 86-24 Δ 4.4 mit dem wildtypischen *leuX*-Gen komplementiert werden. Zu diesem Zweck wurde der Mutantenstamm mit dem Plasmid pGGB51, das das wildtypische *leuX*-Gen aus dem UPEC-Stamm 536 enthält (Ritter *et al.*, 1995), transformiert. Da die UPEC und EHEC *leuX*-Gene identisch sind, konnte davon ausgegangen werden, daß das Plasmid den Verlust des Gens in *E. coli* 86-24 Δ 4.4 komplementieren kann. Zur Kontrolle wurde noch der Vektor pSU2716 (Martinez *et al.*, 1988) ohne das *leuX*-Gen in die Mutante eingeführt.

Daraufhin sollte die Produktion der tRNA₅^{Leu} in der *leuX*-Mutante *E. coli* 86-24 Δ 4.4, dem *leuX*-Komplementantenstamm *E. coli* 86-24 Δ 4.4(pGGB51) und dessen Vektorkontrollstamm *E. coli* 86-24 Δ 4.4(pSU2716) mit der *leuX*-Expression im EHEC-Wildstamm 86-24 verglichen werden. Mit Gesamt-RNA dieser Stämme und der tRNA₅^{Leu}-spezifischen Oligonukleotidsonde leuX3 wurde eine Northern Hybridisierung durchgeführt (Dobrindt, 1999). Die 85 nt lange reife tRNA ließ sich im EHEC Wildtyp-Stamm O157:H7 86-24 sowie in der *leuX*-Komplementante 86-24 Δ 4.4(pGGB51) nachweisen, während in der Mutante *E. coli* 86-24 Δ 4.4 und dem Komplementantenkontrollstamm 86-24 Δ 4.4(pSU2716) keinerlei Transkript mehr zu detektieren war (siehe Abbildung 21). Auf diese Weise wurde bestätigt, daß die Deletion von *leuX* zu einem Ausfall der reifen tRNA₅^{Leu} führt.

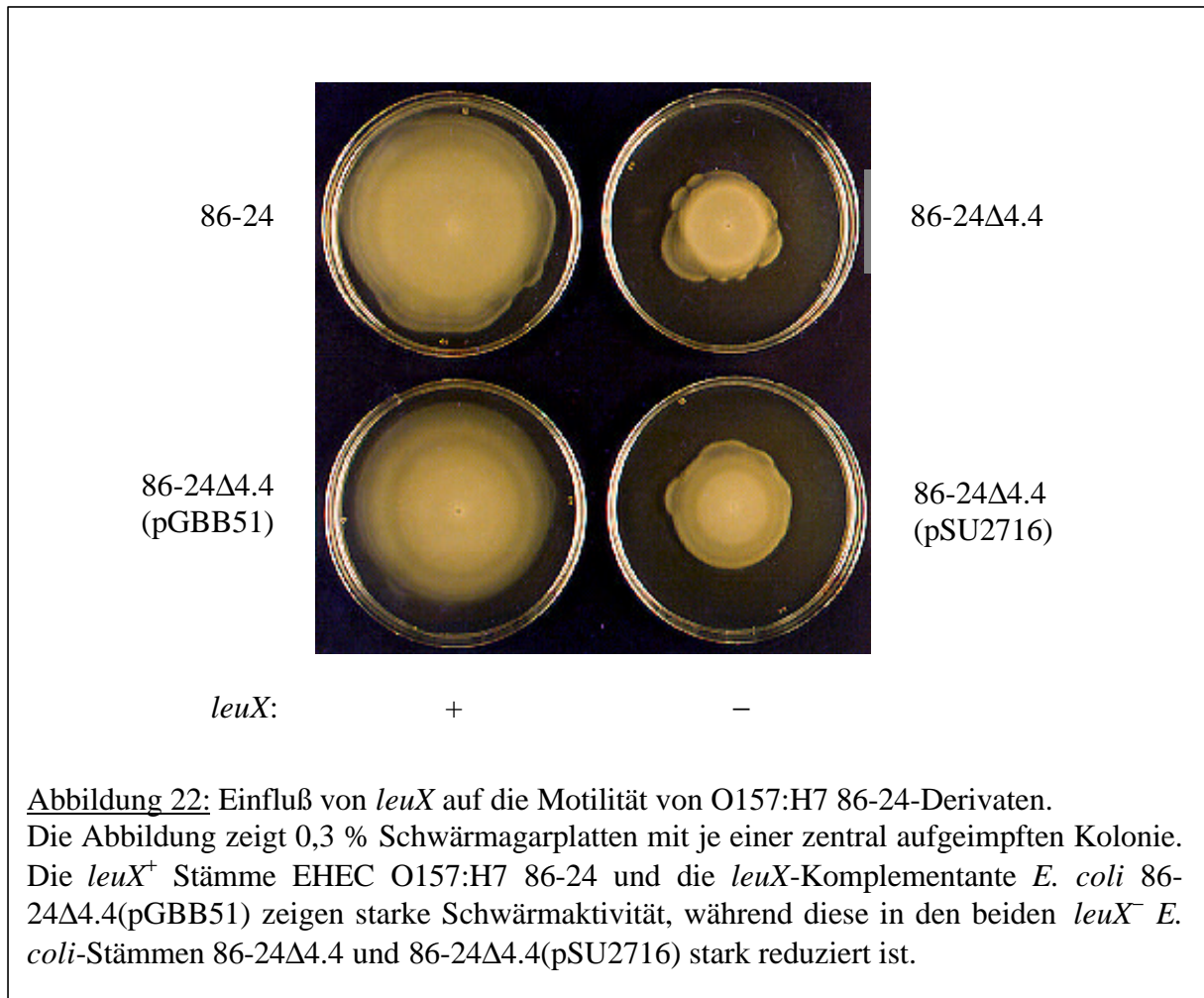


4.4 Phänotypische Charakterisierung des *leuX*-negativen EHEC-Stamms 86-24D4.4

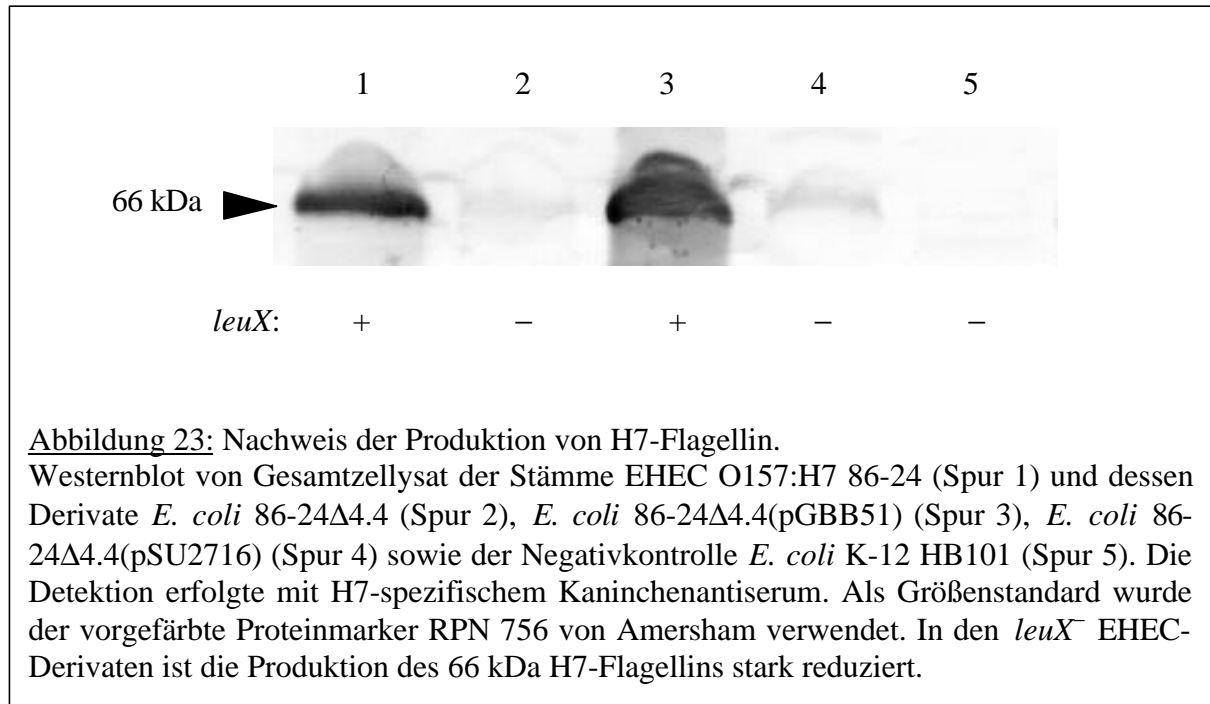
Im Folgenden wurde der Einfluß von *leuX* auf die Expression verschiedener EHEC-Pathogenitätsfaktoren getestet. Dabei wurden in den einzelnen Untersuchungen jeweils der Wildtypstamm EHEC O157:H7 86-24 mit der *leuX*-Mutante *E. coli* 86-24Δ4.4 und die mit episomalem *leuX* komplementierte *leuX*-Mutante *E. coli* 86-24Δ4.4(pGGB51) mit dem *leuX*⁻ Komplementantenkontrollstamm *E. coli* 86-24Δ4.4(pSU2716) verglichen.

4.4.1 Einfluß der tRNA₅^{Leu} auf die Schwärmaktivität und die Flagellenproduktion

Zunächst wurde untersucht, ob die Deletion von *leuX* in EHEC die Flagellenproduktion und damit auch die Schwärmaktivität beeinflusst. Im Motilitätstest auf Schwärmagarplatten zeigte sich, daß die beiden *leuX*⁺ Stämme EHEC O157:H7 86-24 und *E. coli* 86-24Δ4.4(pGGB51) stark schwärmten und sich in der Größe ihrer Schwärmhöfe nicht voneinander unterschieden. Auch die beiden *leuX*⁻ *E. coli*-Stämme 86-24Δ4.4 und 86-24Δ4.4(pSU2716) unterschieden sich nicht signifikant in der Größe ihrer Schwärmhöfe. Verglichen mit den *leuX*⁺ Stämmen zeigten sie jedoch eine stark reduzierte, wenngleich immer noch deutlich vorhandene Schwärmaktivität (s. Abbildung 22).



Die Expression von H7-Flagellin (FliC) wurde im Westernblot überprüft. Dazu wurden Gesamtzelllysate der zu vergleichenden Stämme mit H7-Antigen-spezifischem polyklonalem Kaninchenantiserum als primärem Antikörper (B. Westerlund-Wikström, Helsinki) und mit einem anti-Kaninchen-Alkalische-Phosphatase-Konjugat als sekundärem Antikörper detektiert. Der Westernblot zeigte, daß die Produktion des 66 kDa H7-Flagellins (Sherman *et al.*, 1988) in den *leuX*⁻ EHEC-Derivaten im Vergleich zu den *leuX*⁺ Stämmen drastisch reduziert war. In der Negativkontrolle *E. coli* K-12 HB101 wurde keinerlei flagellenspezifisches Antigen nachgewiesen (siehe Abbildung 23).



4.4.2 Einfluß der tRNA₅^{Leu} auf die Siderophorproduktion

Der EHEC-Stamm O157:H7 86-24 und seine *leuX*⁺ und *leuX*⁻ Derivate wurden auf ihre Produktion von Siderophoren in spezifischen Siderophorbioassays getestet. Diese Untersuchungen wurden von Herrn Dr. Rabsch am Robert-Koch-Institut Wernigerode durchgeführt. Der Bioassay beruht auf einer Kreuzfütterung spezifischer Indikatorstämme durch die von den Teststämmen sezernierten Siderophore, die den Indikatorstämmen je nach Art und Menge des zur Verfügung stehenden Siderophors Wachstum erlauben (Rabsch *et al.*, 1991). Untersucht wurden der EHEC-Stamm O157:H7 86-24 und seine *leuX*⁺ und *leuX*⁻ Derivate sowie als Vergleichssystem der UPEC-Stamm 536 und dessen *leuX*-defizienter Abkömmling 536-21, dem zusätzlich beide Pathogenitätsinseln fehlen. Die Ergebnisse der Kreuzfütterungsversuche sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 23: Einfluß von *leuX* auf die Siderophorproduktion in Derivaten der Stämme EHEC O157:H7 86-24 und UPEC 536.

Stamm	<i>leuX</i>	Wachstumszonen (mm) auf den Siderophorindikatorstämmen		
		TA 2700	SR 1001	LG 1522
86-24 wt	+	20	0	0
86-24Δ4.4	-	12	14	0
86-24Δ4.4(pGBB51)	+	20	0	0
86-24Δ4.4(pSU2716)	-	12	14	0
536	+	23	0	0
536-21	-	10	16	0

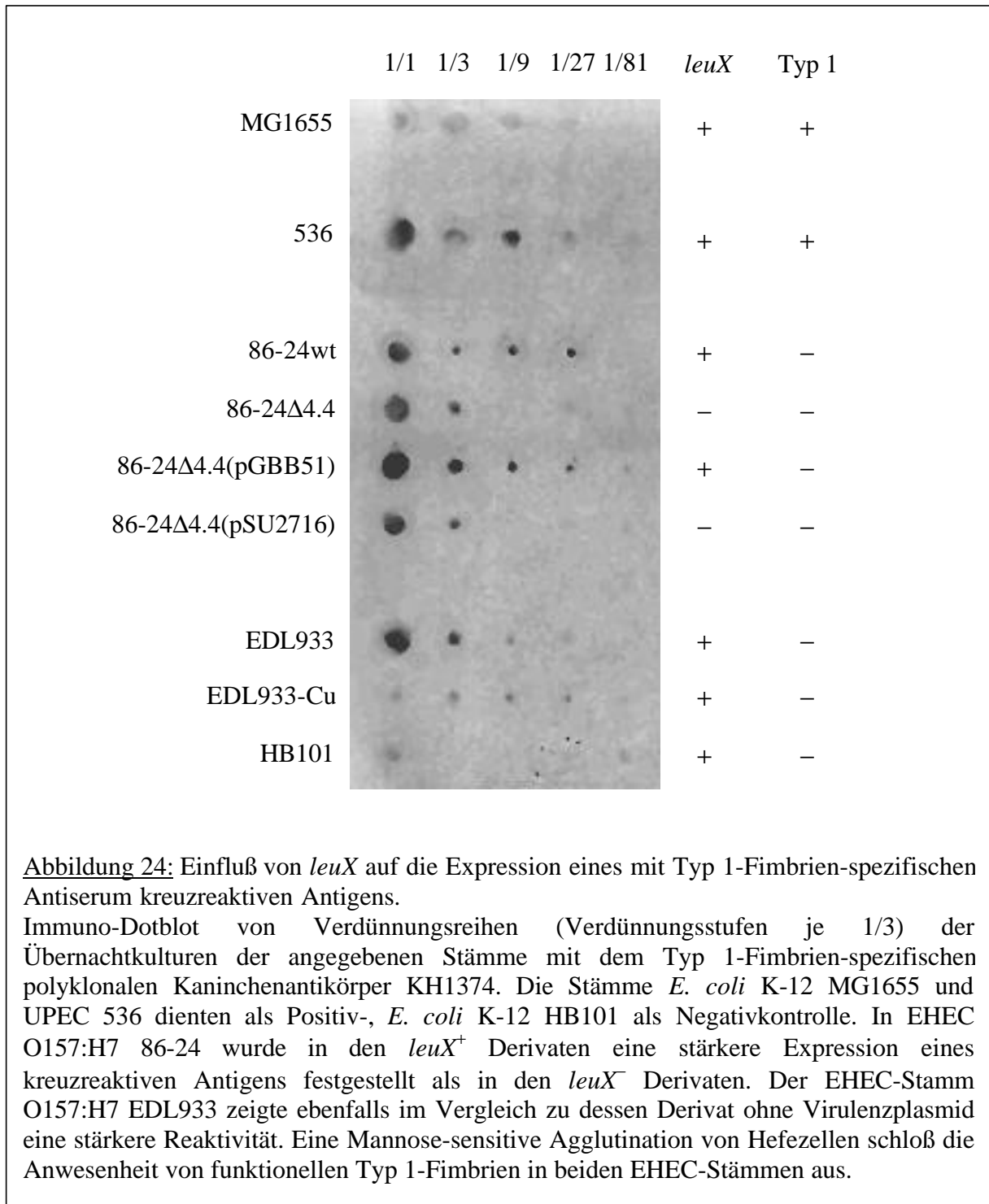
Der Durchmesser der Wachstumszonen auf den Siderophorindikatorplatten ist in mm angegeben. Indikatorstämme: *Salmonella typhimurium* TA2700 (spezifisch für Katecholate, ausgenommen DHBA), *Salmonella typhimurium* SR1001 (spezifisch für DHBA), *E. coli* LG1522 (spezifisch für Aerobaktin). Die Teststämme sind *leuX*⁺ und *leuX*⁻ Derivate der Stämme EHEC O157:H7 86-24 sowie UPEC 536. Die *leuX*⁻ Stämme zeigen im Vergleich zu den *leuX*⁺ Stämmen eine verringerte Enterobaktinsekretion und akkumulieren stattdessen DHBA.

Die Kreuzfütterung des *E. coli*-Stamms LG1522 (Carbonetti und Williams, 1984), der spezifisch ist für das Hydroxamatsiderophor Aerobaktin, führte weder in Anwesenheit der EHEC- noch der UPEC-Stämme zu Wachstum. Dies bedeutet, daß keiner der getesteten Stämme Aerobaktin produziert. Der Katecholatsiderophor-spezifische Indikatorstamm *Salmonella typhimurium* TA2700 (Luckey *et al.*, 1972, Rabsch, 1998) zeigte mit allen *leuX*⁺ Teststämmen starkes Wachstum, was auf eine starke Enterobaktinsynthese schließen läßt, wobei dessen Wachstum von UPEC am stärksten gefördert wurde. Mit allen *leuX*⁻ Stämmen war das Wachstum des Indikatorstamms signifikant eingeschränkt, wobei die Wachstumsreduktion in UPEC stärker ausgeprägt war als im EHEC-System. Der Indikatorstamm *Salmonella typhimurium* SR1001 (Rabsch *et al.*, 1991) wächst spezifisch auf dem Zwischenprodukt der Enterobaktinbiosynthese DHBA (2,3-Dihydroxybenzoesäure), das bei Inhibition der Enterobaktinbiosynthese von den Stämmen ausgeschieden wird. In allen Fällen mit reduzierter Enterobaktinbiosynthese konnte durch Kreuzfütterung des Indikatorstamms eine Ausscheidung dieses Stoffwechselzwischenprodukts nachgewiesen werden, und zwar um so mehr je weniger Enterobaktin produziert wurde. Damit war in allen *leuX*⁻ Stämmen eine DHBA-Ausscheidung nachweisbar, während alle *leuX*⁺ Stämme

keinerlei Exkretion von DHBA zeigten. Die *leuX⁻* Derivate von EHEC O157:H7 86-24 waren in ihrer Enterobaktinproduktion nicht so stark eingeschränkt wie der UPEC-Stamm 536-21 und schieden im Vergleich zu diesem auch nicht so viel DHBA aus. Im EHEC-System war wie im UPEC-System ein Einfluß der *tRNA₅^{Leu}* auf die Produktion von Enterobaktin festzustellen, wobei der Effekt in den EHEC-Stämmen im Vergleich zu UPEC schwächer ausgeprägt war.

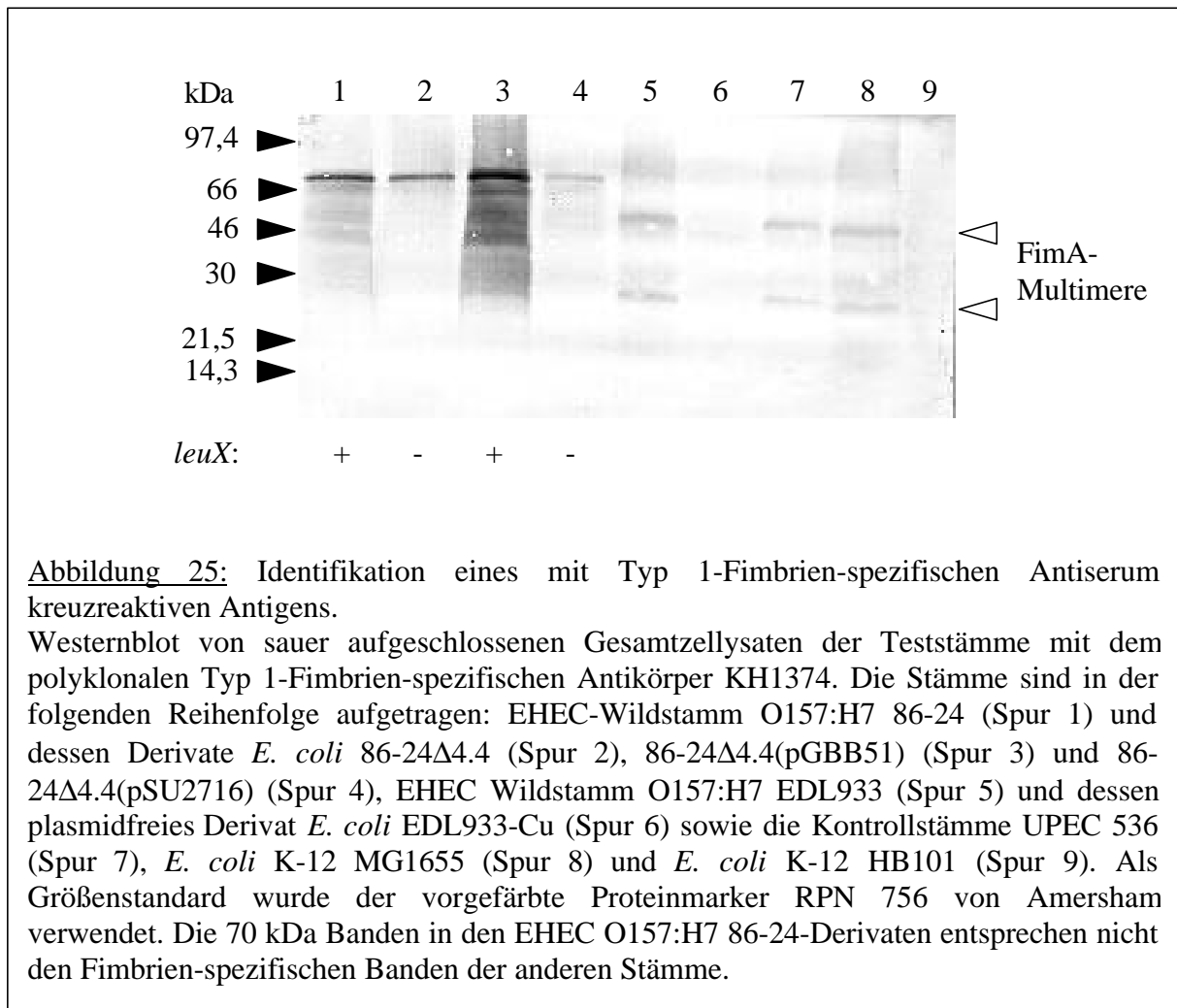
4.4.3 Einfluß der *tRNA₅^{Leu}* auf die Produktion eines mit Typ 1-Fimbrien-spezifischen Antiserum kreuzreaktiven Antigens

In dieser Arbeit vorangegangenen Untersuchungen war gezeigt worden, daß der EHEC-Stamm O157:H7 86-24 in einer Kolonie-Hybridisierung positiv mit einer Typ 1-Fimbrien-spezifischen Sonde reagiert (U. Wallner, pers. Mitteilung). Daher sollte untersucht werden, ob dieser Stamm Typ 1-Fimbrien exprimiert und ob die Expression abhängig ist von der *tRNA₅^{Leu}*. Zu diesem Zweck wurden in einem Immuno-Dotblot Verdünnungsreihen der zu testenden Stämme auf ihre Reaktivität mit dem polyklonalen Typ 1-Fimbrien (*E. coli* IHE3034) spezifischen Antikörper KH1374 getestet (B. Westerlund-Wikström, Helsinki, siehe Abbildung 24). Dabei dienten die Stämme UPEC 536 und *E. coli* K-12 MG1655 als Positiv- und *E. coli* K-12 HB101 als Negativkontrolle. Der Immuno-Dotblot zeigte in den *leuX⁺* Derivaten von EHEC O157:H7 86-24 eine stärkere Expression eines kreuzreaktiven Antigens im Vergleich zu dessen *leuX⁻* Derivaten. Der EHEC-Stamm O157:H7 EDL933 vermittelte eine dem anderen EHEC-Wildstamm äquivalente Expression eines kreuzreaktiven Antigens, die in dessen Derivat *E. coli* EDL933-Cu ohne Virulenzplasmid nur noch in abgeschwächter Form auftrat (s. Abbildung 24).



Zur genaueren Charakterisierung dieses kreuzreaktiven Antigens wurden Westernblots mit sauer aufgeschlossenen Gesamtzelllysaten der Teststämme durchgeführt. Hierbei zeigte sich bei den Kontrollstämmen sowie beim EHEC-Stamm O157:H7 EDL933 ein Bandenmuster wie es für Typ 1-Fimbrien typisch ist mit einer Monomerbande bei ca. 28 kDa und einer Dimerbande bei ungefähr 56 kDa. In EHEC O157:H7 fehlten diese Banden, dafür trat eine neue bei ca. 70 kDa in Erscheinung, deren Intensität in den *leuX*⁺ Derivaten stärker

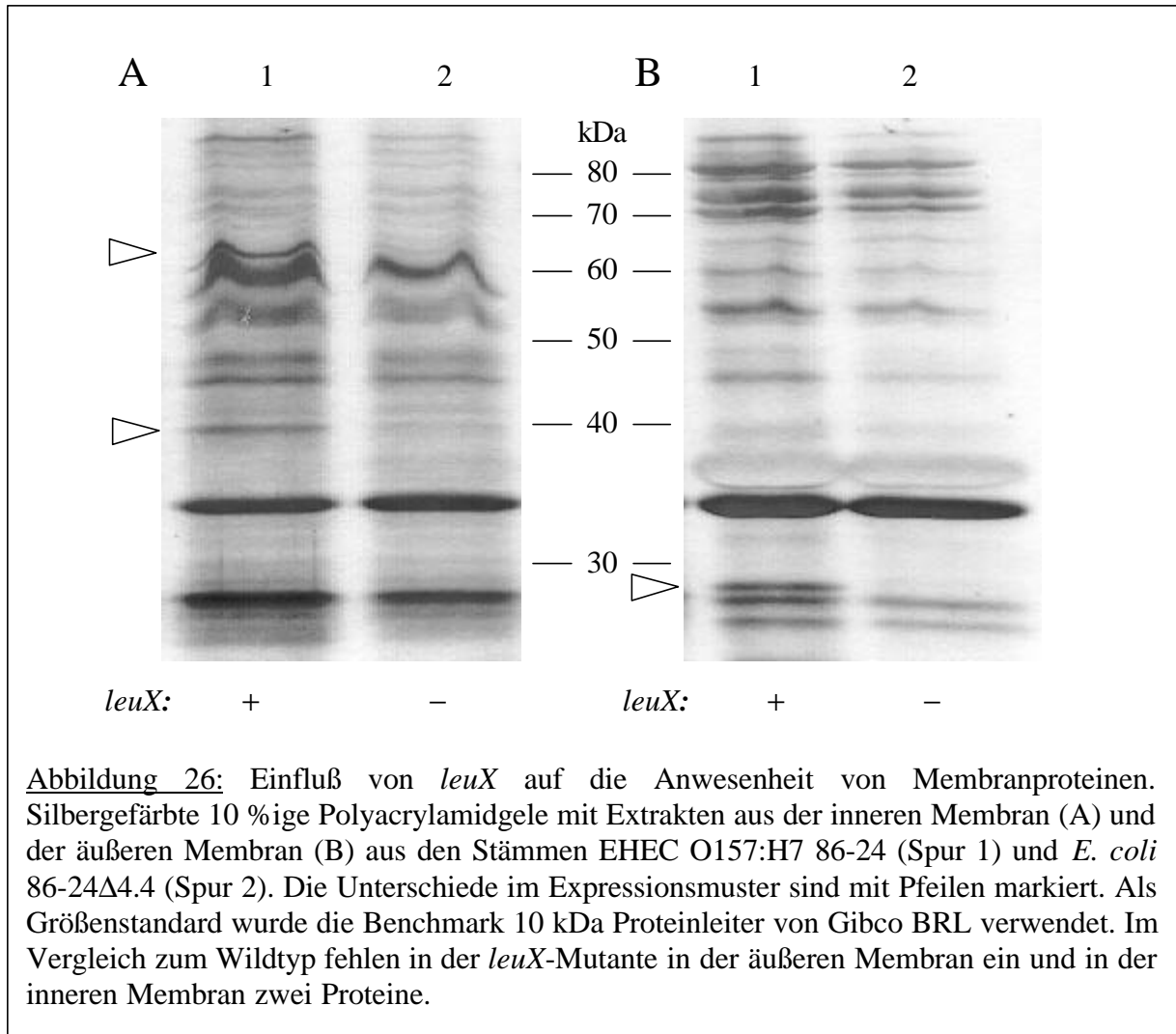
war als in den *leuX*⁻ (siehe Abbildung 25). Dieses Protein war stabil und ließ sich auch nicht mit Guanidium-Hydrochlorid in Untereinheiten dissoziieren (nicht abgebildet), was ausschließt, daß es sich hierbei um ein Typ 1-Fimbrien-Antigen handelt. Außerdem wurden durch eine Mannose-sensitive Agglutination von *Saccharomyces cerevisiae* für beide EHEC-Wildstämme und deren Derivate die Anwesenheit funktioneller Typ 1-Fimbrien ausgeschlossen (s. Abbildung 24).



4.4.4 Einfluß der tRNA₅^{Leu} auf die Anwesenheit von Membranproteinen

Die Membranproteinmuster des EHEC-Wildstammes O157:H7 86-24 und der *leuX*-Mutante *E. coli* 86-24Δ4.4 wurden in der SDS-PAGE miteinander verglichen. Dabei stellte sich heraus, daß in der äußeren Membran im Wildtyp ein ca. 29 kDa großes Protein vorhanden ist, das in der Mutante fehlt. Ebenso fehlen in den inneren Membran der Mutante je ein ca. 40 kDa und ein ca. 63 kDa großes Protein, die in der wildtypischen

Zytoplasmamembran vorhanden sind (siehe Abbildung 26). Diese Unterschiede konnten im Stammpaar *E. coli* 86-24 Δ 4.4(pGBB51) und *E. coli* 86-24 Δ 4.4(pSU2716) reproduziert werden (nicht abgebildet). Die in EHEC von *leuX* beeinflussten Proteine stimmen nicht mit den von Ritter (1996) für UPEC beschriebenen überein.



4.4.5 Einfluß der tRNA₅^{Leu} auf die Häminverwertung

Um zu prüfen, ob die Fähigkeit von EHEC zur Häminverwertung von der Anwesenheit der tRNA₅^{Leu} beeinflusst wird, wurden die *leuX*⁺ und *leuX*⁻ Derivate von O157:H7 86-24 auf ihre Fähigkeit, in eisenlimitiertem Medium mit Hämin als einziger Eisenquelle zu wachsen, getestet. Zu diesem Zweck wurden die Stämme auf LB-Agarplatten mit 0,6 mM Dipyriddy, einem Eisenchelator, mit und ohne Zusatz von 30 µg/ml Hämin ausgestrichen und nach Inkubation deren Wachstum begutachtet. Keiner der Stämme wuchs auf LB-Dipyriddy-Agar ohne Hämin. Auf dem Häminagar hingegen waren der Wildtypstamm

und die *leuX*-Komplementante unter den gegebenen Bedingungen zur Bildung von Kolonien in der Lage, während auch hier die *leuX*⁻ Stämme kein Wachstum zeigten (siehe Tabelle 18).

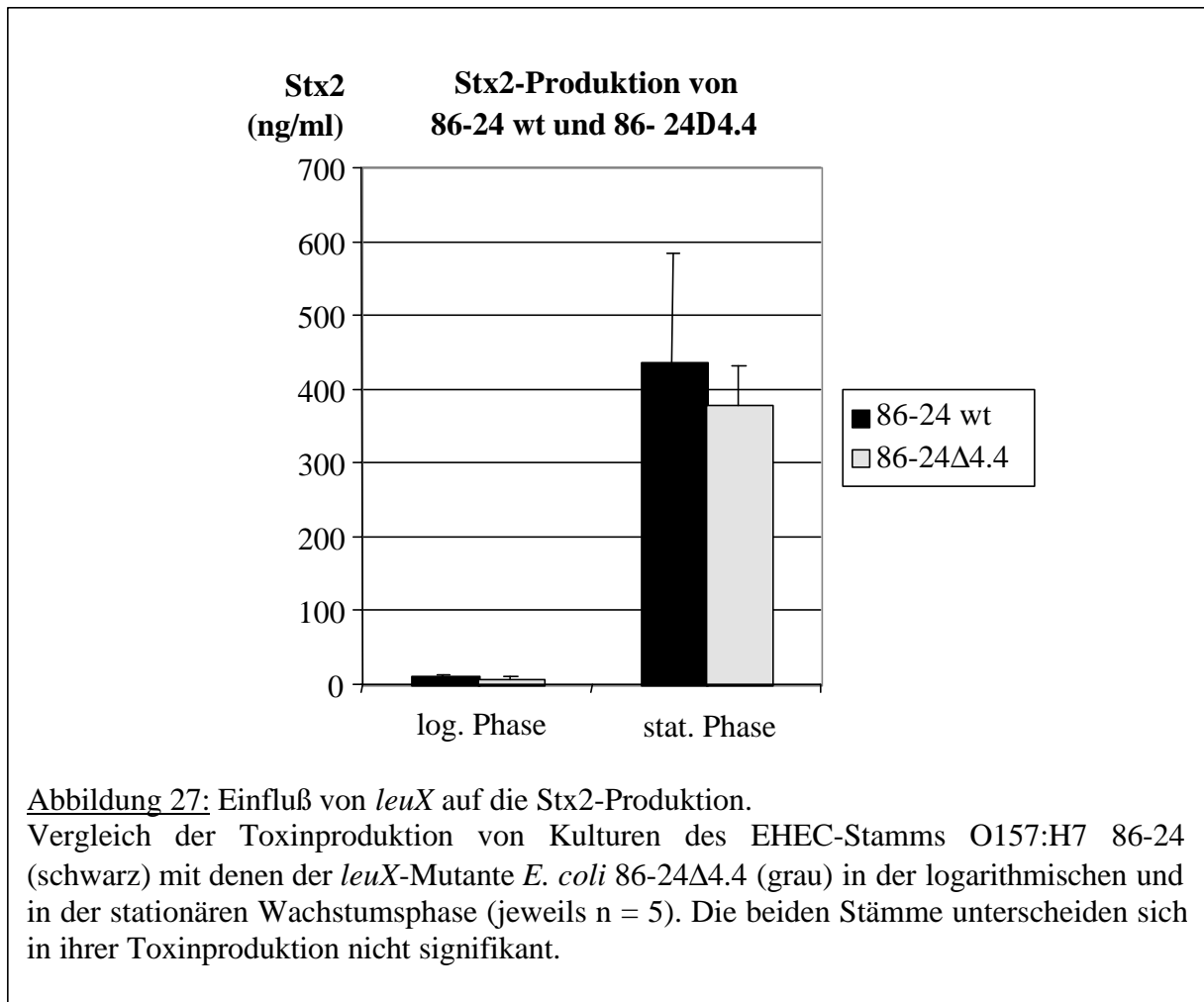
Tabelle 18: Einfluß von *leuX* auf die Verwertung von Hämin.

Stamm	<i>leuX</i>	Wachstum auf LB-Platten mit 0,6 mM Dipyridyl	
		ohne Hämin	mit 30mg/ml Hämin
86-24wt	+	-	+
86-24Δ4.4	-	-	-
86-24Δ4.4 (pGBB51)	+	-	+
86-24Δ4.4 (pSU2716)	-	-	-

Wie die Tabelle zeigt, sind die *leuX*⁻ Derivate des EHEC-Stamms O157:H7 86-24 im Gegensatz zu den *leuX*⁺ Vergleichsstämmen unter den gegebenen Bedingungen nicht mehr in der Lage, Hämin zu verwerten.

4.4.6 Einfluß der tRNA₅^{Leu} auf die Stx2-Produktion

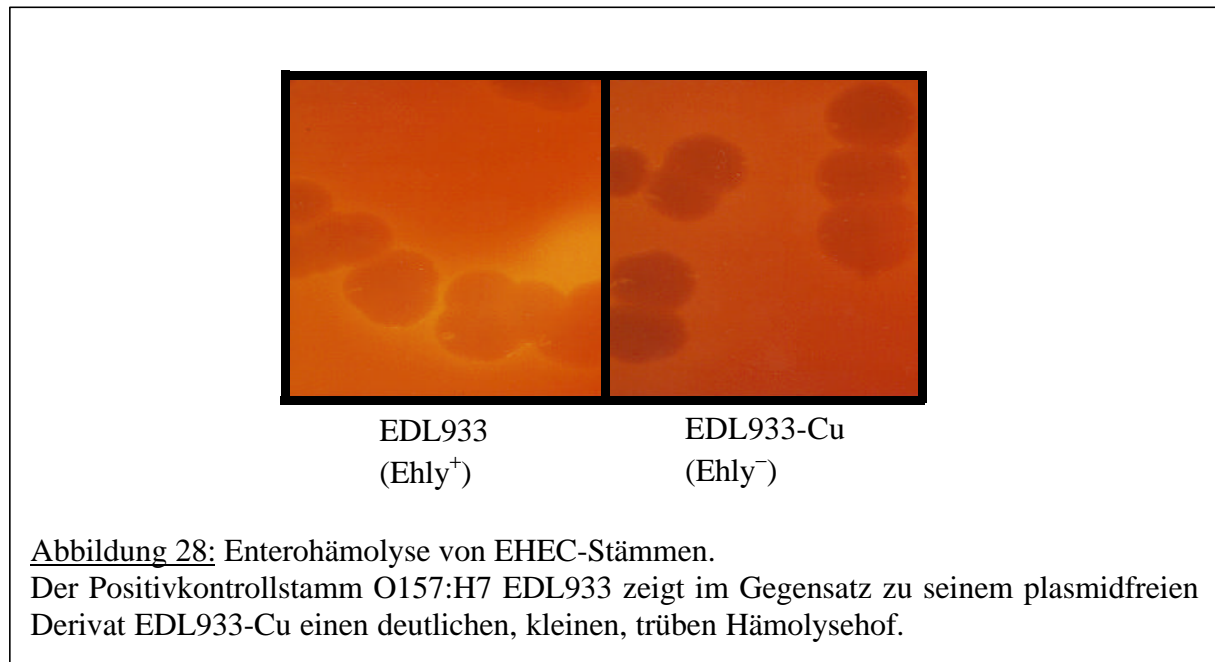
Von besonderem Interesse war der Einfluß der Verfügbarkeit der tRNA₅^{Leu} auf die Produktion von Stx2 als einem der Hauptvirulenzfaktoren im EHEC Stamm O157:H7 86-24. Aus diesem Grund wurden Toxinquantifizierungen von Kulturen des Wildtypstammes und der *leuX*-Mutante *E. coli* 86-24Δ4.4 durchgeführt. Von jeweils fünf unabhängigen Kulturen wurden für die logarithmische Wachstumsphase (OD600 = 0,7) und für die stationäre Phase (24 h Wachstum, OD600 = 2,9) die Kulturüberstände für die Quantifizierung von extrazellulärem Toxin isoliert und Periplasma-Extrakte für die Messung von zellassoziertem Toxin hergestellt. Das Stx2 in diesen Extrakten wurde in einem Toxin-Sandwich-ELISA (Acheson *et al.*, 1989) quantifiziert. Hierbei wurde Stx2 mithilfe des monoklonalen Antikörpers 3D1, der spezifisch an die A-Untereinheiten von Stx und Stx2 bindet (Donohue-Rolfe *et al.*, 1989), in Kombination mit polyklonalem Kaninchenantiserum (Donohue-Rolfe *et al.*, 1984) detektiert. Die Werte für Überstand und Periplasma-Extrakt jeder einzelnen Kultur wurden addiert und aus den Werten für alle fünf Kulturen die Durchschnittswerte und Standardabweichungen errechnet (s. Abbildung 27). Der Vergleich von Durchschnittswerten und Standardabweichungen läßt erkennen, daß sich der EHEC-Stamm O157:H7 86-24 und dessen *leuX*-Mutante *E. coli* 86-24Δ4.4 in ihrer Toxinproduktion weder in der logarithmischen noch in der stationären Wachstumsphase signifikant voneinander unterscheiden.

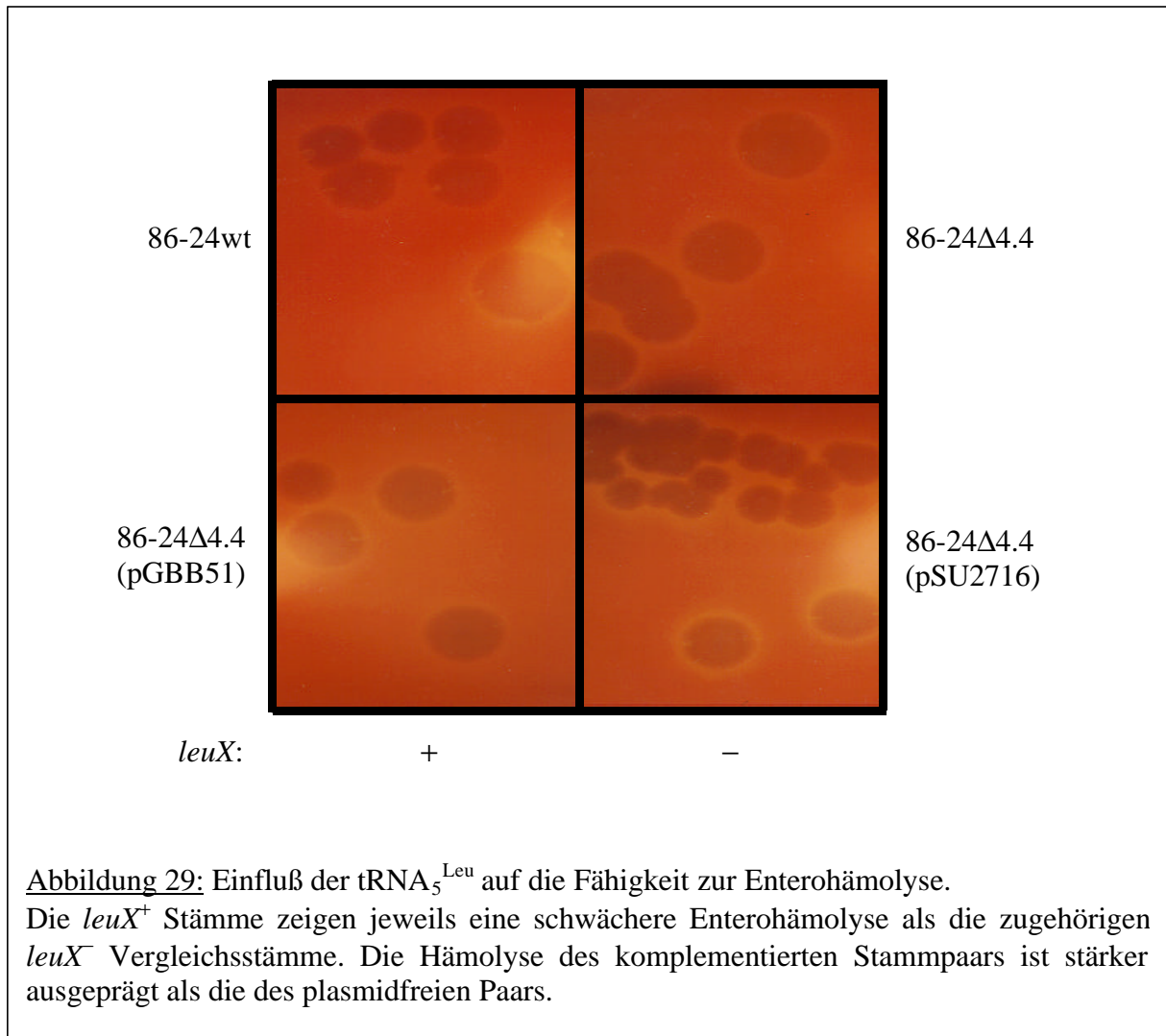


4.4.7 Einfluß der $tRNA_5^{Leu}$ auf die Enterohämolyse

Im EHEC-Stamm O157:H7 86-24 und in seiner *leuX*-Mutante *E. coli* 86-24Δ4.4 wurde untersucht, ob die Expression des Virulenzfaktors Enterohämolysin einer Beeinflussung durch die $tRNA_5^{Leu}$ unterliegt. Der α -hämolytische UPEC-Kontrollstamm (Positivkontrolle für α -Hämolyse) zeigte bereits nach 4 h deutliche Hämolyse auf Schafblutagarplatten und hatte nach 24 h große, klare Hämolysehöfe gebildet (nicht abgebildet). Bei den enterohämolytischen Stämmen waren erst nach 24 h Inkubation die für Enterohämolyse typischen kleinen, trüben Hämolysehöfe zu erkennen. Als Enterohämolyse-spezifische Kontrollstämme wurden die EHEC-Stämme O157:H7 EDL933 (Positivkontrolle) und dessen Derivat EDL933-Cu ohne Virulenzplasmid (Negativkontrolle) eingesetzt, die entsprechend einen kleinen, trüben, aber deutlich sichtbaren bzw. keinen Hämolysehof bildeten (siehe Abbildung 28). Der Hämolyse-Negativkontrollstamm *E. coli* K-12 HB101 war ebenfalls nicht zur Enterohämolyse in der Lage (nicht abgebildet). Die Hämolyse des Teststammes O157:H7 86-24 war etwas schwächer ausgeprägt als die des

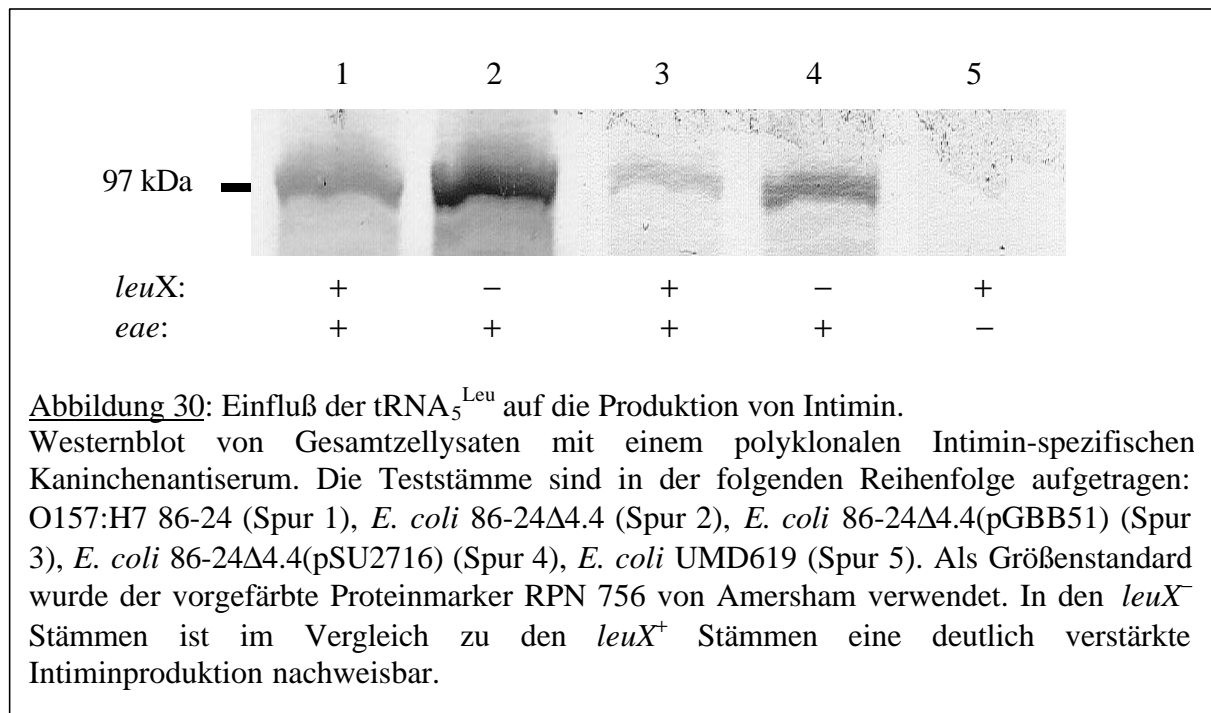
Positivkontrollstammes O157:H7 EDL933. Beim Vergleich der jeweiligen *leuX*⁺ und *leuX*⁻ Stammpaare EHEC O157:H7 86-24 und *E. coli* 86-24Δ4.4 sowie *E. coli* 86-24Δ4.4(pGBB51) und *E. coli* 86-24Δ4.4(pSU2716) stellte sich heraus, daß die Hämolyse des jeweiligen *leuX*⁻ Stamms stärker ausgeprägt war als die des *leuX*⁺ Stamms. Außerdem war im komplementierten Stammpaar eine generell stärkere Enterohämolyse zu beobachten als im Vergleichspaar (siehe Abbildung 29).





4.4.8 Einfluß der $tRNA_5^{Leu}$ auf die Intiminproduktion

Weiterhin wurde getestet, ob auch die Intiminproduktion einem Einfluß durch die $tRNA_5^{Leu}$ unterliegt. Zu diesem Zweck wurde eine Westernblot-Analyse von Gesamtzelllysaten mit einem Intimin-spezifischen (α RIHisEae) polyklonalen Kaninchenantikörper (McKee und O'Brien, 1996) durchgeführt. Als Teststämme wurden die $leuX^+$ und $leuX^-$ Derivate des EHEC-Stamms O157:H7 86-24 sowie als Negativkontrolle die *eae*-Deletionsmutante desselben EHEC-Stammes *E. coli* UMD619 verwendet. Auf dem Blot ist eindeutig eine Verstärkung der Intimin-spezifischen 97 kDa-Banden in den $leuX^-$ verglichen mit den $leuX^+$ Stämmen zu erkennen. Das komplementierte Stammpaar wies zudem eine generell schwächere Intiminproduktion auf als das Vergleichspaar (siehe Abbildung 30). In der *eae*-Deletionsmutante *E. coli* UMD619 war keine Intiminproduktion mehr festzustellen.



Um auszuschließen, daß es sich bei dem beobachteten Effekt lediglich um einen Artefakt auf Grund von möglicherweise ungleichen eingesetzten Zelldichten in den Gesamtzelllysaten handelt, wurden dieselben Lysate mit einem OmpA-spezifischen polyklonalen Kaninchenantikörper (Y. Stierhof, Tübingen) in einem Westernblot getestet, da OmpA *leuX*-unabhängig exprimiert wird (Ritter, 1996). In diesem Blot wurde für alle Teststämme eine gleichstarke Produktion von OmpA nachgewiesen (nicht abgebildet).

4.4.9 Einfluß der $tRNA_5^{\text{Leu}}$ auf die *in vivo*-Virulenz im Mäusemodell

Um Veränderungen der Gesamtpathogenität von EHEC durch die Deletion von *leuX* *in vivo* abschätzen zu können, wurden die *leuX*⁺ und *leuX*⁻ Derivate von EHEC O157:H7 86-24 im Mäusemodell mit sog. „Carworth Farm Lane Petter (CFLP) specific-pathogen-free (SPF)“-Mäusen getestet. Diese Untersuchungen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. L. Emödy, University Medical School of Pécs, Ungarn, durchgeführt. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in den folgenden Tabellen dargestellt.

Tabelle 19: Lungentoxizitätsassay mit „Carworth Farm Lane Petter (CFLP) specific-pathogen-free“-Mäusen.

Stamm	<i>leuX</i>	tot/infiziert (%)
86-24	+	7/10 (70)
86-24Δ4.4	–	7/10 (70)
86-24Δ4.4(pGGB51)	+	9/10 (90)
86-24Δ4.4(pSU2716)	–	7/10 (70)

Im Lungentoxizitätsassay unterscheiden sich die *leuX*⁺ und *leuX*[–] Derivate von O157:H7 86-24 in ihrer Virulenz nicht voneinander.

Tabelle 20: Intravenöse Infektion von „Carworth Farm Lane Petter (CFLP) specific-pathogen-free“-Mäusen.

Stamm	<i>leuX</i>	tot/infiziert (%)
86-24	+	40/40 (100)
86-24Δ4.4	–	40/40 (100)
86-24Δ4.4(pGGB51)	+	40/40 (100)
86-24Δ4.4(pSU2716)	–	32/40 (80)

Auch in der intravenösen Infektion unterscheiden sich die *leuX*⁺ und *leuX*[–] Derivate von O157:H7 86-24 nicht signifikant voneinander. Nur der plasmidhaltige, *leuX*[–] Stamm *E. coli* 86-24Δ4.4(pSU2716) ist in seiner Virulenz leicht reduziert.

Im Prinzip besteht kein signifikanter Unterschied in der *in vivo*-Virulenz zwischen den *leuX*⁺ und den *leuX*[–] Derivaten des EHEC-Stamms O157:H7, beide Varianten weisen in beiden Modellen die gleiche Letalität auf. Als einzige Ausnahme ist die *leuX*[–] Vektorkontrolle 86-24Δ4.4(pSU2716) des Komplementantenstammes in seiner intravenösen Letalität geringfügig reduziert.

4.5 Bestimmung des Gehalts an tRNA₅^{Leu}-spezifischen Codons in verschiedenen EHEC-Virulenzfaktoren

Schließlich wurde noch der Anteil an tRNA₅^{Leu}-spezifischen Codons an der Gesamtheit der Leucin-spezifischen Codons in den wichtigsten EHEC-Virulenzfaktoren ermittelt (s. Tabelle 21). Über diese Codon-Anteile sollte theoretisch auf das Ausmaß einer

möglichen Beeinflussung der Expression des entsprechenden Virulenzfaktors durch die Verfügbarkeit dieser tRNA geschlossen werden können. Ab etwa einem Anteil von 10 % tRNA_{5^{Leu}}-spezifischen Codons könnte von einem erhöhten Anteil dieser Codons gesprochen werden. Demnach weisen jeweils einzelne Gene in den verschiedensten Virulenzfaktorgruppen erhöhte Anteile dieses Codons auf.

Tabelle 21: Gehalt an tRNA_{5^{Leu}}-spezifischen Codons in Pathogenitätsfaktoren von EHEC.

Pathogenitätsfaktor	Gen	Leucin-Codons	tRNA _{5^{Leu}} -spezifische Codons		GenBank accession no.
			absolut	in %	
Stx1	<i>stxA</i> ₁	30	6	20 %	M16625
	<i>stxB</i> ₁	9	0	0 %	M16625
Stx2	<i>stxA</i> ₂	27	0	0 %	X07865
	<i>stxB</i> ₂	6	1	16,7 %	X07865
A/E-Läsionen-Bildung	<i>eae</i>	72	15	20,8 %	Z11541
	<i>espA</i>	17	0	0 %	AF071034
	<i>espB</i>	27	7	25,9 %	AF071034
	<i>espD</i>	37	4	10,8 %	AF071034
	<i>tir</i>	40	9	22,5 %	AF071034
Enterohämolysin	EHEC- <i>hlyA</i>	85	10	11,8 %	AF074613
	EHEC- <i>hlyB</i>	83	13	15,7 %	AF074613
	EHEC- <i>hlyC</i>	14	1	7,1 %	AF074613
	EHEC- <i>hlyD</i>	45	7	15,6 %	AF074613
Häminverwertung	<i>chuA</i>	51	8	15,7 %	U67920
Enterobaktin-Biosynthese	<i>entA</i>	21	2	9,5 %	AE000165
	<i>entB/G</i>	27	4	14,8 %	AE000165
	<i>entC</i>	41	7	17,1 %	AE000165
	<i>entD</i>	18	2	11,1 %	AE000163
	<i>entE</i>	60	9	15 %	AE000165
	<i>entF</i>	160	21	13,1 %	AE000164
Fe-Enterobaktin-Transport	<i>fepA</i>	54	10	18,5 %	AE000163
	<i>fepB</i>	45	1	2,2 %	AE000164
	<i>fepC</i>	33	6	18,2 %	AE000164
	<i>fepD</i>	63	6	9,5 %	AE000164
	<i>fepG</i>	59	8	13,6 %	AE000164

Zusammenfassung

Es wurde eine isogene *leuX*-Mutante des Stx2-produzierenden EHEC-Stammes O157:H7 86-24 konstruiert. Die Deletion umfaßt mit 102 bp einen Bereich, der praktisch die ganze Sequenz der reifen tRNA_{5^{Leu}} enthält, und wurde mittels PCR und Southern Hybridisierung bestätigt. Dabei kam es zu einem kompletten Ausfall der Produktion der tRNA_{5^{Leu}}. Die phänotypische Charakterisierung der Stämme ergab, daß in EHEC die Motilität und Flagellierung sowie die Siderophorproduktion durch den Ausfall dieser tRNA in ihrer Expression reduziert wurden. In gleicher Weise wurde ein mit Typ 1-Fimbrien-spezifischem Antiserum kreuzreagierendes Antigen, zwei Proteine der Cytoplasmamembran und ein Protein der äußeren Membran durch die tRNA_{5^{Leu}} beeinflusst. Auch die Verwertung von Hämin wurde durch den tRNA_{5^{Leu}}-Mangel beeinträchtigt. Kein Einfluß dieser tRNA war auf die Stx2-Produktion und auf die *in vivo*-Virulenz der Stämme in Mäusen festzustellen. Die enterohämolytischen Eigenschaften der *leuX*-Mutante sowie ihre Fähigkeit zur Produktion von Intimin hingegen wurden durch den tRNA_{5^{Leu}}-Mangel noch verstärkt. Erhöhte Anteile an tRNA_{5^{Leu}}-spezifischen Codons kamen vereinzelt in Genen für die verschiedensten Virulenzfaktoren vor. Der Einfluß der tRNA_{5^{Leu}} auf die Produktion von Pathogenitätsfaktoren in EHEC ist demnach sehr vielseitig.