

IV. Ergebnisse

1. Einfluß eines phagenkodierten Faktors auf die Expression von *stx₂* im *E. coli* K-12 Stamm C600(933W/pADR-28)

Die Expression von *stx₂* wurde mit Hilfe des Plasmids pADR-28 (siehe Plasmidkarte im Anhang) untersucht. Dieses Plasmid enthält eine Translationsfusion des Gens für alkalische Phosphatase (*phoA*) und 82,3 % der N-terminalen Sequenz des *stxA₂*-Gens, das für die StxA₂-Untereinheit kodiert, sowie deren Promotor und 2,4 kb an "upstream" liegenden Sequenzen des Bakteriophagen 933W. Nach Induktion eines lysogenen Shiga-Toxin-konvertierenden Phagen wird die Expression des Reportergens stark erhöht. Aus diesem Grunde wurde die Existenz eines transaktiven, diffusiblen, phagenkodierten Faktors postuliert, der eine regulatorische Wirkung entweder auf das *stx₂*-Operon direkt oder auf weitere regulationsvermittelnde Faktoren ausübt (Mühldorfer *et. al.*, 1996).

Ziel dieses Teilprojektes war es, diesen putativen phagenkodierten Faktor im Phagen genom zu lokalisieren, zu isolieren und näher zu charakterisieren. Im folgenden sind die Mutagenese des *stx₂*-konvertierenden Bakteriophagen 933W, die Klonierung und die Sequenzierung eines möglichen Regulatorgens sowie die Komplementation einer der konstruierten Mutanten dargestellt.

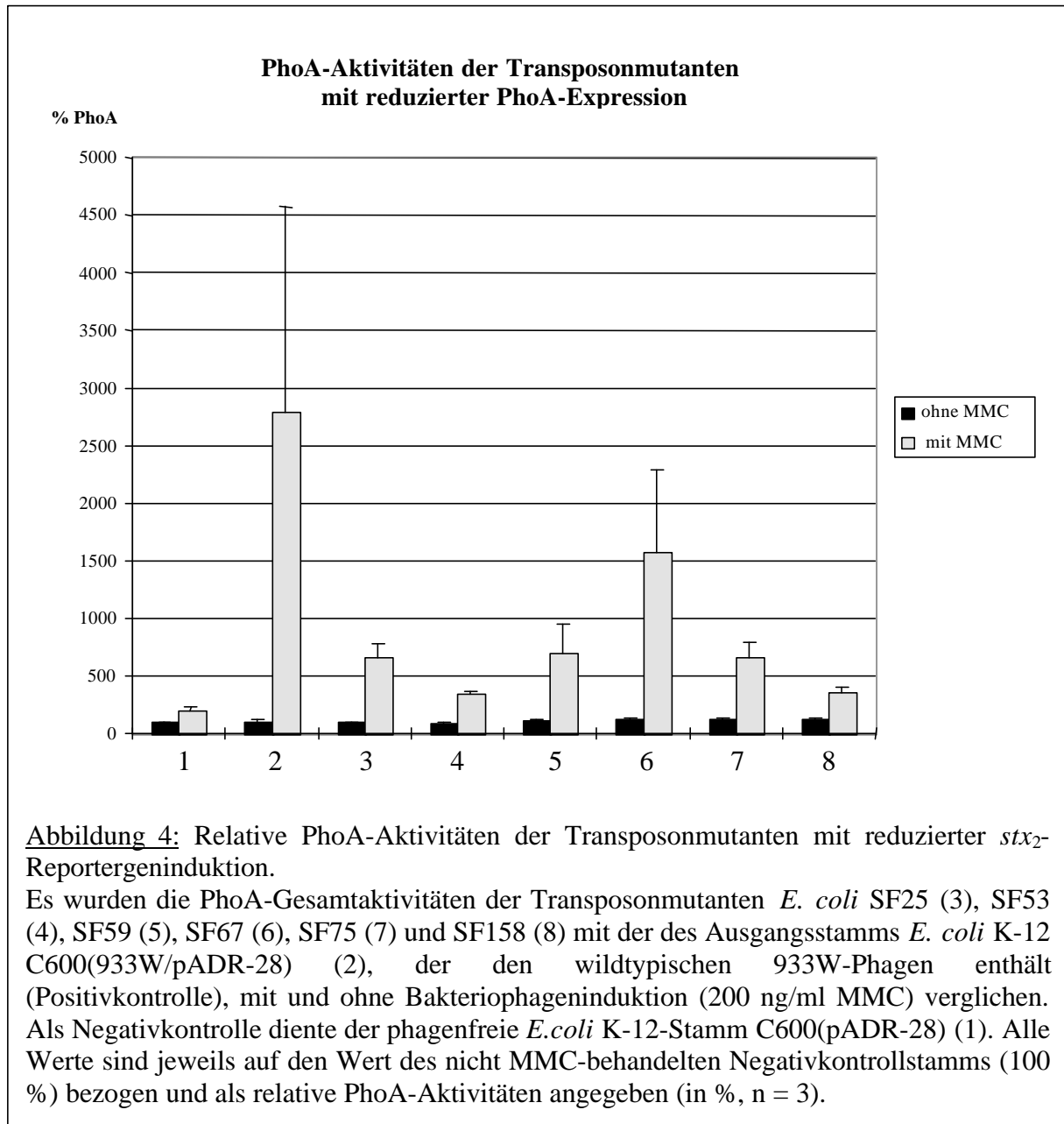
1.1. Konstruktion von Transposonmutanten des Bakteriophagen 933W aus dem *E. coli* K-12 Stamm C600(933W)

Es wurde eine Transposonmutagenese des Bakteriophagen 933W durchgeführt mit dem Ziel, den gesuchten phagenkodierten Faktor auszuschalten und zu lokalisieren. Der *E. coli* K-12 Stamm C600(933W), der den lysogenen wildtypischen Phagen 933W enthält, wurde mit dem Plasmid pZT344 transformiert. Dieses Plasmid enthält das Mini-Transposon Tn10d-Cam (Elliott und Roth, 1988), zwischen dessen flankierenden Elementen (je 70 bp vom rechten Ende des Tn10) ein Gen für Chloramphenicol-Acetyltransferase (*cat*), die Chloramphenicol-Resistenz (Cm^R) vermittelt, liegt. Ein Gen für Transposase befindet sich außerhalb des mobilen Elements auf dem Plasmid und steht unter der Kontrolle eines *tac*-Promotors. Durch Induktion dieses Promotors mit IPTG wurde die Produktion der Transposase und damit das Springen des Transposons ausgelöst. Unmittelbar danach erfolgte eine Induktion des lysogenen Bakteriophagen 933W mit Mitomycin C (MMC, 200 ng/ml). Mit der resultierenden Phagenpopulation, die sowohl mutierte als auch nichtmutierte Phagen

enthielt, wurde der *E. coli* K-12-Stamm C600(pADR-28) infiziert. Durch Selektion mit Chloramphenicol und Tetracyclin wurden aus diesem Gemisch Stämme isoliert, die sowohl den lysogenen durch das Transposon mutierten Phagen (Cm^R) als auch das Plasmid pADR-28 (Tetracyclin-Resistenz, Tc^R) enthielten. Die Stämme mit mutierten 933W-Phagen wurden nach einer Induktion mit MMC auf ihre PhoA-Expression getestet und mit dem *E. coli* K-12 Stamm C600(933W/pADR-28), der den wildtypischen 933W-Phagen enthält, verglichen.

Es konnten zwei verschiedene Gruppen von Stämmen mit veränderter PhoA-Expression isoliert werden. Die eine Gruppe umfaßt sechs verschiedene Stämme mit unterschiedlich starker Reduktion der Produktion von alkalischer Phosphatase (die *E. coli*-Stämme SF25, SF53, SF59, SF67, SF75 und SF158) (siehe Abbildung 4 und Tabelle 7). In den beiden Stämmen der anderen Gruppe (*E. coli* SF106 und SF156) war die Fähigkeit zur Induktion der Produktion von alkalischer Phosphatase um das bis zu fast vierfache gesteigert (siehe Abbildung 5 und Tabelle 8).

In Abbildung 4 sind die relativen PhoA-Aktivitäten der Transposonmutanten mit reduzierter Reporterinduktion ohne und mit Induktion der Bakteriophagen (200 ng/ml MMC) dargestellt.



In Tabelle 7 ist für die Stämme mit reduzierter PhoA-Aktivität die Stärke der PhoA-Induktion absolut und im Verhältnis zum Ausgangswert des Wildtyps *E. coli* K-12 C600(933W/pADR-28) aufgelistet.

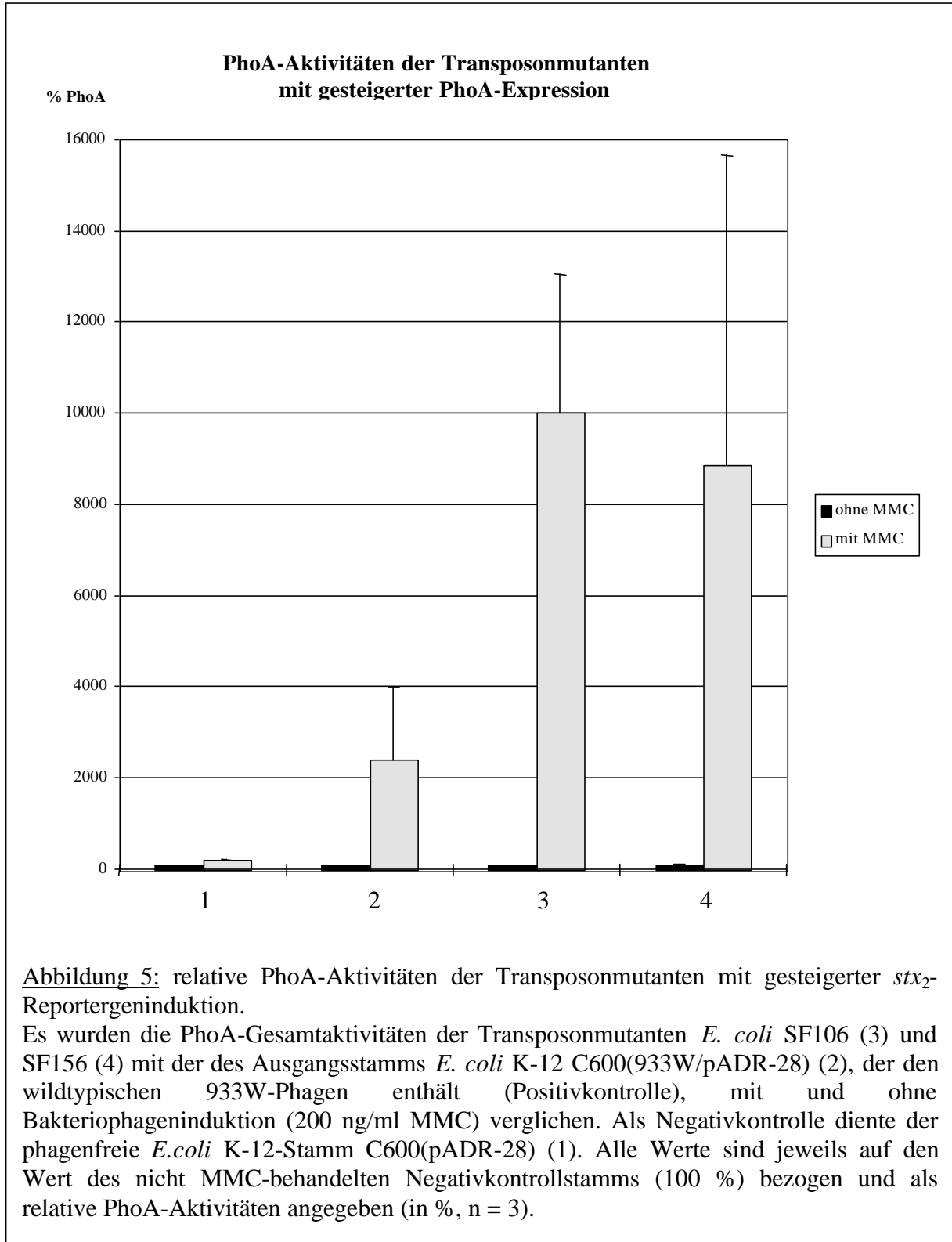
Tabelle 7: Absolute und relative Induktionsstärken der lysogenen 933W-Transposonmutanten mit reduzierter PhoA-Expression.

<i>E. coli</i> -Stamm	MMC	Relative PhoA-Aktivität (%)	Induktion (x-fach)	Induktion im Vergleich zum Wildtyp
C600(pADR-28)	–	100		
	+	189,9	1,9	6,7 %
C600(933W/pADR-28)	–	98,9		
	+	2.797,4	28,3	100 %
SF25	–	91,7		
	+	662,3	7,2	25,4 %
SF53	–	88,2		
	+	346,9	3,9	13,8 %
SF59	–	110,9		
	+	697,1	6,3	22,3 %
SF67	–	120,4		
	+	1.567,5	13,0	45,9 %
SF75	–	120		
	+	655,3	5,5	19,4 %
SF158	–	127		
	+	353,3	2,8	9,9 %

Für Tabelle 7 wurden die einzelnen PhoA-Induktionsstärken der Transposonmutanten *E. coli* SF25, SF53, SF59, SF67, SF75 und SF158 ermittelt. Dazu wurde der Quotient aus ihren PhoA-Aktivitäten jeweils mit und ohne Bakteriophageninduktion (200 ng/ml MMC, n = 3) gebildet [Induktion (x-fach)]. Die ermittelten Induktionsstärken wurden zu der des Ausgangsstamms *E. coli* K-12 C600(933W/pADR-28), der den wildtypischen 933W-Phagen enthält (Positivkontrolle), ins Verhältnis gesetzt (Werte in %, Positivkontrolle: 100%) (Induktion im Vergleich zum Wildtyp). Als Negativkontrolle diente der phagenfreie *E. coli* K-12-Stamm C600(pADR-28).

Aus diesen Daten wird ersichtlich, daß auch innerhalb dieser Gruppe von Mutanten unterschiedliche Phänotypen auftreten. Bei *E. coli* SF67 handelt es sich um einen Stamm, dessen Fähigkeit zur PhoA-Induktion nur um etwa die Hälfte reduziert ist. Die drei weiteren *E. coli*-Stämme SF25, SF59 und SF75 erreichen einen Induktionswert von ca. 20% des wildtypischen Ausgangswerts. In den beiden Stämmen *E. coli* SF53 und SF158 ist die PhoA-Induktionsfähigkeit am stärksten reduziert auf ungefähr 10% des Ausgangswerts.

In Abbildung 5 sind die relativen PhoA-Aktivitäten der Transposonmutanten mit gesteigerter *stx*₂-Reporterexpression ohne und mit Bakteriophageninduktion (200 ng/ml MMC) dargestellt.



In Tabelle 8 sind die Induktionsstärken dieser Stämme sowie ihre Induktionsfähigkeit im Vergleich zum *E. coli* K-12-Stamm mit dem wildtypischen Phagen C600(933W/pADR-28) aufgelistet. Die Induktionssteigerung dieser Mutanten liegt beim 3- bis 3,8-fachen des Werts für den nichtmutierten Ausgangsstamm.

Tabelle 8: Absolute und relative Induktionsstärken der lysogenen 933W-Transposonmutanten mit gesteigerter PhoA-Expression.

<i>E. coli</i> -Stamm	MMC	Relative PhoA-Aktivität (%)	Induktion (x-fach)	Induktion im Vergleich zum Wildtyp
C600(pADR-28)	–	100		
	+	178,8	1,8	5,9 %
C600(933W/pADR-28)	–	78,6		
	+	2.392,3	30,4	100 %
SF106	–	85,0		
	+	10.000,2	117,6	386,8 %
SF156	–	96,8		
	+	8.856,8	91,5	301,0 %

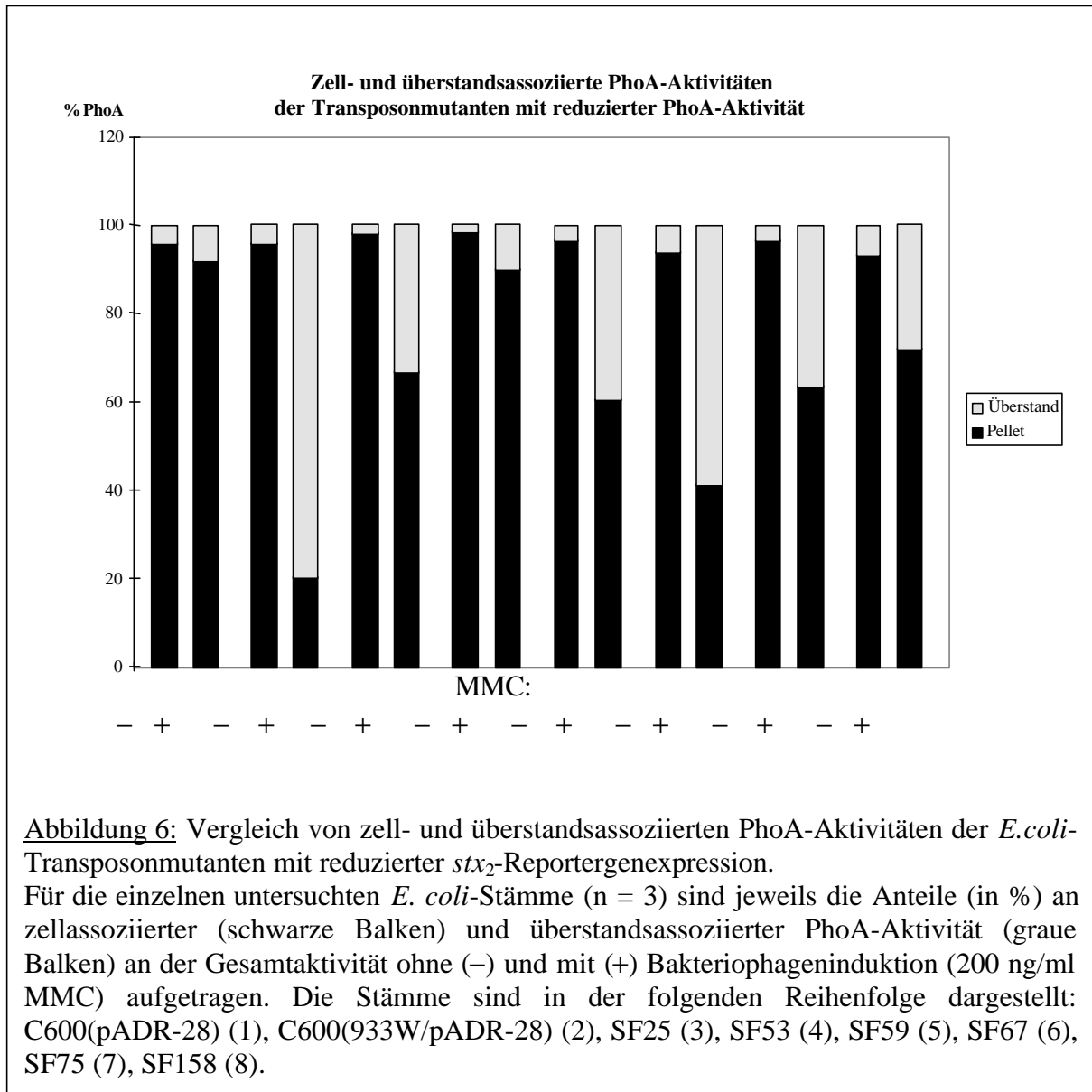
Für Tabelle 8 wurden die einzelnen PhoA-Induktionsstärken der Transposonmutanten *E. coli* SF106 und SF156 ermittelt. Dazu wurde der Quotient aus ihren PhoA-Aktivitäten jeweils mit und ohne Bakteriophageninduktion (200 ng/ml MMC, n = 3) gebildet [Induktion (x-fach)]. Die ermittelten Induktionsstärken wurden zu der des Ausgangsstamms *E. coli* K-12 C600(933W/pADR-28), der den wildtypischen 933W-Phagen enthält (Positivkontrolle), ins Verhältnis gesetzt (Werte in %, Positivkontrolle: 100%) (Induktion im Vergleich zum Wildtyp). Als Negativkontrolle diente der phagenfreie *E. coli* K-12-Stamm C600(pADR-28).

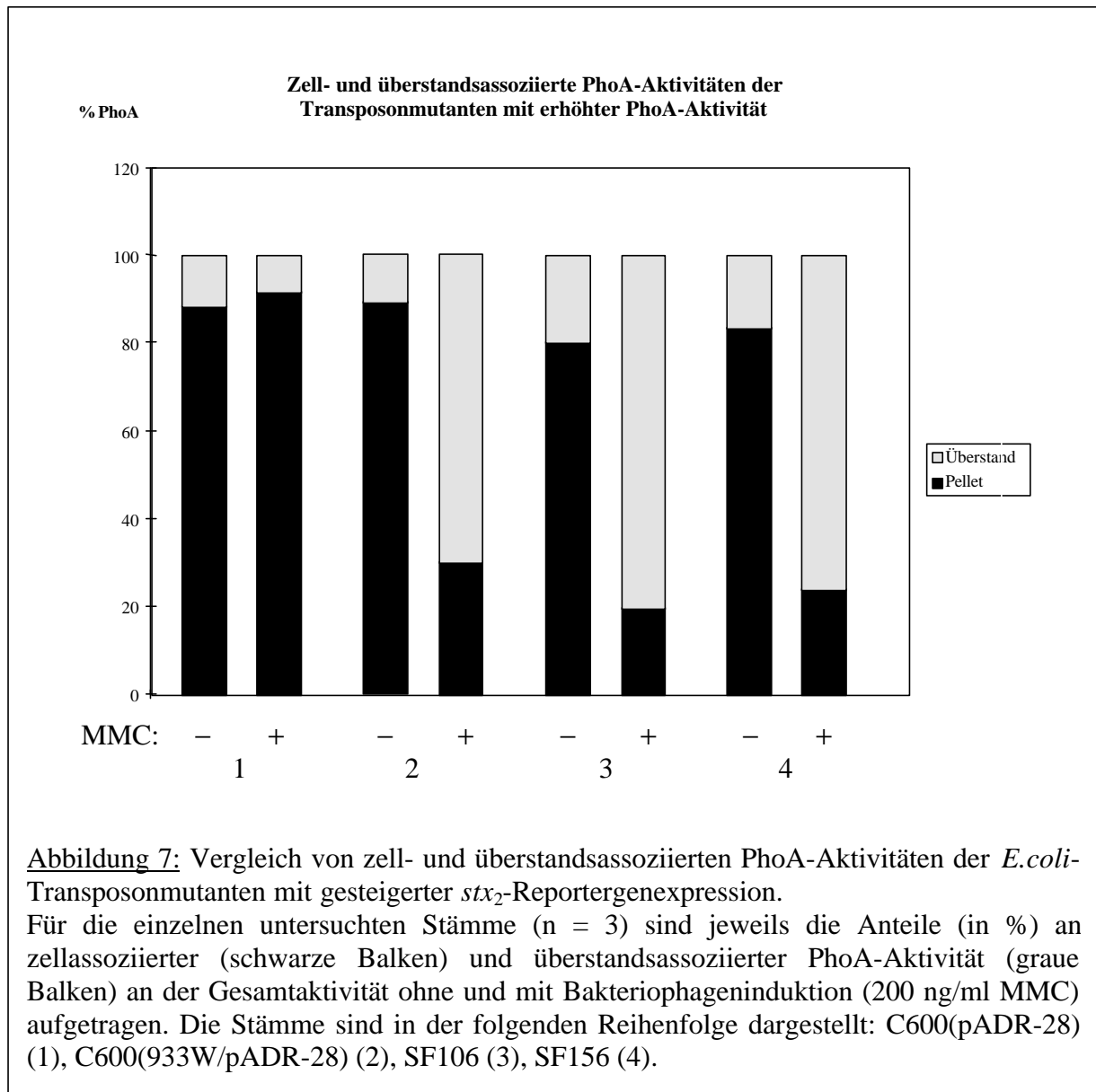
1.2 Phänotypische und genotypische Charakterisierung der 933W-Transposonmutanten

1.2.1 Vergleich von zell- und überstandsassozierten PhoA-Aktivitäten in den 933W-Transposonmutanten

Um herauszufinden, ob die mutierten Phagen noch zellytische Eigenschaften besitzen, wurde jede *E. coli*-Transposonmutante auf ihr Verhältnis von zell- zu überstandsassoziierter PhoA-Aktivität untersucht. Wie die Abbildung 6 zeigt, ist im Fall der PhoA-reduzierten Mutanten eine Korrelation zwischen PhoA-Induzierbarkeit und der Fähigkeit zur Phagenlyse

zu erkennen. Je schlechter das *stx*₂-Reportergen induziert wird, desto schlechter lysieren die Phagen bei gleicher MMC-Gabe die Zellen. Im Fall der expressionsgesteigerten Mutanten ist eine entsprechende Steigerung der Phagenlyse nur im Ansatz zu beobachten, was in Abbildung 7 dargestellt ist.





In den Tabellen 9 und 10 werden die Fähigkeiten der Mutanten zur Induktion des *stx*₂-Reportergens mit ihren Fähigkeiten zur Zellyse verglichen. In Tabelle 9 sind die Mutanten mit reduzierter, in Tabelle 10 die Mutanten mit gesteigerter PhoA-Expression dargestellt.

Tabelle 9: Vergleich der Fähigkeit zur *stx*₂-Reporter-geninduktion mit dem Anteil an überstandsassoziierter PhoA-Aktivität in den mit MMC induzierten *E. coli*-Transposonmutanten mit reduzierter PhoA-Produktion.

<i>E. coli</i>-Stamm	PhoA-Induktion (% Wildtyp)	Überstandsassozierte PhoA-Aktivität (% Wildtyp)
C600(pADR-28)	6,7 %	9,8 %
C600(933W/pADR-28)	100 %	100 %
SF25	25,4 %	41,9 %
SF53	13,8 %	12,5 %
SF59	22,3 %	49,3 %
SF67	45,9 %	73,5 %
SF75	19,4 %	45,7 %
SF158	9,9 %	34,9 %

Die Werte für die PhoA-Induktion und für die überstandsassozierte PhoA-Aktivität sind jeweils als relative Werte bezogen auf die Werte für den wildtypischen lysogenen Phagen in C600(933W/pADR-28) (100%) dargestellt.

Tabelle 10: Vergleich der Fähigkeit zur *stx*₂-Reporter-geninduktion mit dem Anteil an überstandsassoziierter PhoA-Aktivität in den mit MMC induzierten *E. coli*-Transposonmutanten mit erhöhter PhoA-Produktion.

<i>E. coli</i>-Stamm	PhoA-Induktion (% Wildtyp)	Überstandsassozierte PhoA-Aktivität (% Wildtyp)
C600(pADR-28)	5,9 %	11,7 %
C600(933W/pADR-28)	100 %	100 %
SF106	286,8 %	115,0 %
SF156	301,0 %	108,6 %

Die Werte für die PhoA-Induktion und für die überstandsassozierte PhoA-Aktivität sind jeweils als relative Werte bezogen auf die Werte für den wildtypischen lysogenen Phagen in C600(933W/pADR-28) (100%) dargestellt.

1.2.2 Vergleich der Produktion von Stx2 in den 933W-Transposonmutanten

Weiterhin sollte untersucht werden, ob die Insertion der Transposons ins Genom des lysogenen Phagen 933W neben den Auswirkungen auf die Expression des *stx*₂-Reportergens auch die Produktion von Toxin beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden Westernblots mit Periplasma-Extrakten (50fach konzentriert) und mit Überständen von nichtinduzierten und MMC-induzierten Kulturen (200 ng/ml MMC) der Phagentransposonmutanten hergestellt, wobei jeweils auf gleiche Zelldichten bezogene Mengen der Toxinextrakte eingesetzt wurden. Die Toxindetektion in den Westernblots erfolgte mit polyklonalem Kaninchenantiserum gegen Stx2. Die Toxinproduktion der Mutanten wurde mit der des *E. coli* K-12-Stammes C600(933W/pADR-28) verglichen. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 11 und 12 dargestellt. Für den Vergleich der relativen Toxinmengen wurden die detektierten Toxinmengen jeweils auf die Menge im MMC-induzierten *E. coli* K-12-Stamm C600(933W/pADR-28) (++) bezogen.

Tabelle 11: Vergleich der Produktion von Stx2 in *E. coli* K-12-Stämmen mit dem Phagen 933W und dessen Transposonmutanten mit reduzierter PhoA-Induktion.

<i>E. coli</i> -Stamm	MMC	Anwesenheit von Toxin im		PhoA-Induktion (% Wildtyp)
		Überstand	PP-Extrakt	
C600(pADR-28)	–	–	–	6,7 %
C600(pADR-28)	+	–	–	
C600(933W/pADR-28)	–	–	–	100 %
C600(933W/pADR-28)	+	++	++	
SF25	–	–	–	25,4 %
SF25	+	–	–	
SF53	–	–	–	13,8 %
SF53	+	–	–	
SF59	–	–	+	22,3 %
SF59	+	++	++	
SF67	–	–	+	45,9 %
SF67	+	++	+	
SF75	–	–	+	19,4 %
SF75	+	++	+++	
SF158	–	–	–	9,9 %
SF158	+	++	–	

Die Intensitäten der Toxinbanden in Westernblots mit äquivalenten Proteinnengen von Kulturüberständen und von Periplasma (PP)-Extrakten der Transposonmutanten wurden in jedem einzelnen Blot mit der Intensität der Toxinbande von *E. coli* C600(933W/pADR-28) verglichen. Die Toxinproduktion der Mutanten wurde im Vergleich dazu als gleichwertig (++) , reduziert (+) , gesteigert (+++) oder nicht detektierbar (–) eingestuft. Zum Vergleich sind die PhoA-Induktionsstärken derselben Stämme in der Tabelle mit angegeben.

Tabelle 12: Vergleich der Produktion von Stx2 in *E. coli* K-12-Stämmen mit dem Phagen 933W und dessen Transposonmutanten mit erhöhter PhoA-Induktion.

<i>E. coli</i> -Stamm	MMC	Anwesenheit von Toxin im		PhoA-Induktion (% Wildtyp)
		Überstand	PP-Extrakt	
C600(pADR-28)	–	–	–	5,9 %
C600(pADR-28)	+	–	–	
C600(933W/pADR-28)	–	–	–	100 %
C600(933W/pADR-28)	+	++	++	
SF106	–	–	–	368,8 %
SF106	+	+++	+++	
SF156	–	–	–	301,0 %
SF156	+	+	–	

Die Intensitäten der Toxinbanden in Westernblots mit äquivalenten Proteinmengen von Kulturüberständen und von Periplasma (PP)-Extrakten der Transposonmutanten wurden in jedem einzelnen Blot mit der Intensität der Toxinbande von *E. coli* C600(933W/pADR-28) verglichen. Die Toxinproduktion der Mutanten wurde im Vergleich dazu als gleichwertig (==), reduziert (+), gesteigert (+++) oder nicht detektierbar (–) eingestuft. Zum Vergleich sind die PhoA-Induktionsstärken derselben Stämme in der Tabelle mit angegeben.

Die Abschätzung der relativen Toxinmengen zeigte, daß in Bezug auf die Toxinproduktion ebenfalls unterschiedliche Phänotypen in den Phagentransposonmutanten auftraten. In den *E. coli* K-12-Stämmen SF25, SF53 und SF156 waren im Immunoblot kein bzw. nur noch sehr geringe Mengen an Toxin (SF156) zu detektieren. Die Stämme *E. coli* SF75 und SF106 zeigen im Vergleich zu C600(933W/pADR-28) eine verstärkte Toxinproduktion, während die Toxinmengen in *E. coli* SF59, SF67 und SF158 der im Ausgangsstamm in etwa gleichwertig waren. Schwankungen der Toxinmenge in den Periplasma-Extrakten blieben auf Grund des ohnehin geringen Anteils an zellassoziertem Stx2 bei gleichzeitig hohem Toxingehalt in den Kulturüberständen unberücksichtigt.

Innerhalb der Gruppen ist keine direkte Korrelation zwischen der Toxinproduktion und der Induzierbarkeit des Reportergens festzustellen. Die Mutante *E. coli* SF156 mit gesteigerter PhoA-Expression produziert beispielsweise nur noch sehr wenig Toxin. Im Gegensatz dazu zeigt die Mutante *E. coli* SF75, die eine reduzierte Induktion des Reportergens aufweist, eine verstärkte Toxinproduktion im Vergleich zu C600(933W/pADR-28). Die Stämme der Gruppe mit annähernd wildtypischer Toxinproduktion (*E. coli* SF59, SF67 und SF158) exprimieren das Reportergen ebenfalls schlechter als der Ausgangsstamm.

Nur in den Stämmen *E. coli* SF25 und SF53 sowie in *E. coli* SF106 korrelieren die Expression des *stx*₂-Reportergens und die Produktion von Toxin.

1.2.3 Vergleich der Produktion von Phagenpartikeln in den 933W-Transposonmutanten

Als nächstes sollte überprüft werden, ob die Transposonmutanten des Phagen 933W noch in der Lage waren, infektiöse Phagenpartikel zu produzieren. Eine verlässliche Quantifizierung der *Stx*₂-konvertierenden Phagen ist im „Phagen-Plaque-Assay“ aufgrund der Instabilität dieser Phagen sehr schwierig. Aus diesem Grund wurde eine relative Quantifizierung der durch Zellyse freigesetzten Phagen Genome durch eine relativ quantitative PCR mit den phagenspezifischen Primern SLT-II-1 und SLT-II-2 vorgenommen. Auf diese Weise wurde die Freisetzung von Phagenpartikeln aus den Transposonmutanten ohne und mit Induktion der Bakteriophagen (200 ng/ml MMC) mit der Phagenfreisetzung aus dem *E. coli* K-12-Stamm C600(933W/pADR-28) verglichen. Die Ergebnisse dieser PCR sind in Abbildung 8 und in den Tabellen 13 und 14 dargestellt.

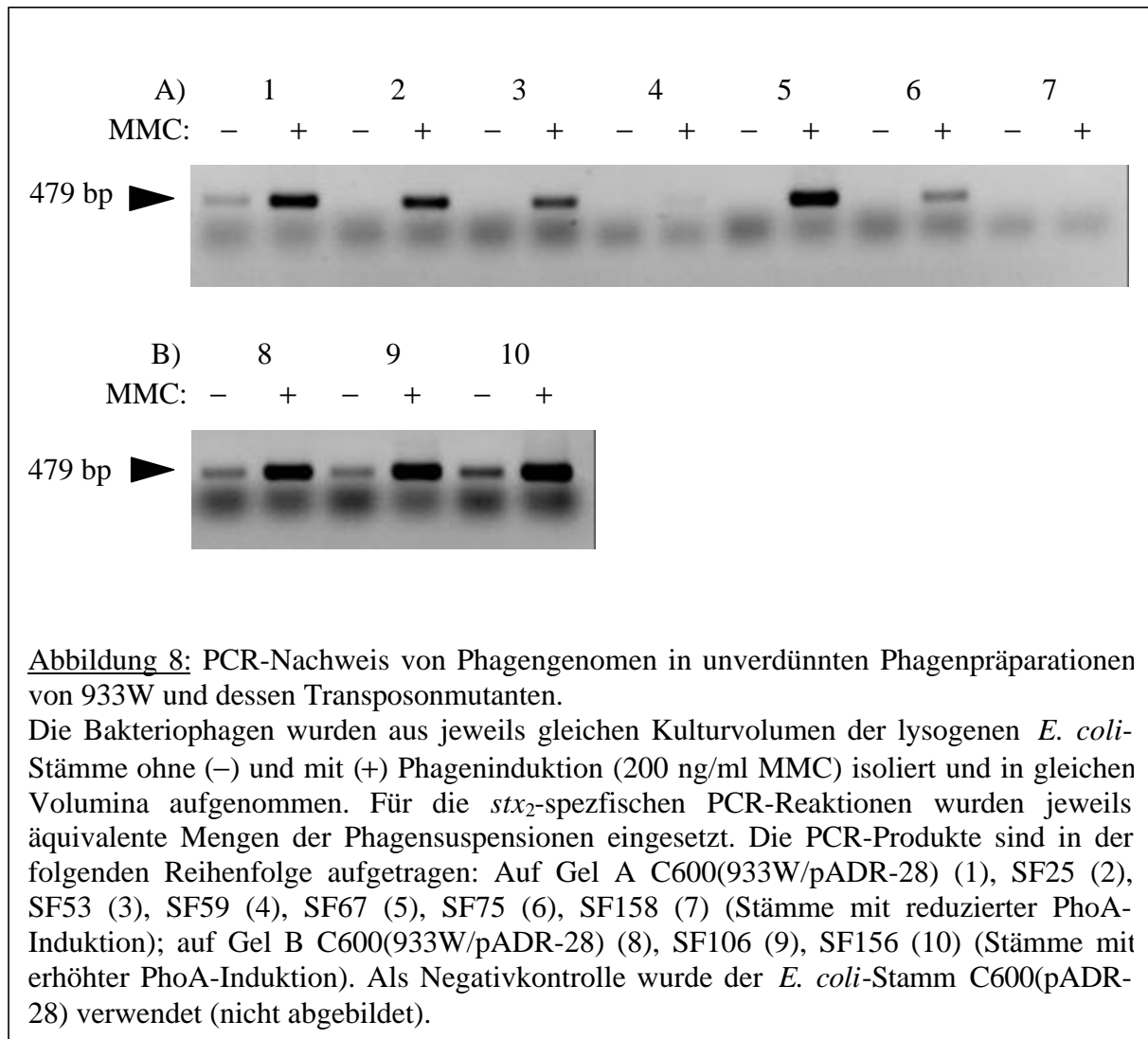


Tabelle 13: Relative Produktion von Phagenpartikeln bei den mutierten Bakteriophagen mit reduzierter PhoA-Induktion im Vergleich zum nichtmutierten Phagen 933W.

<i>E. coli</i>- Stamm	relative Phagenproduktion (% Wildtyp)	PhoA-Aktivität im Kulturüberstand (% Wildtyp)	PhoA- Induktion (% Wildtyp)	Toxin- produktion (tendentiell)
C600(933W/ pADR-28)	100 %	100 %	100 %	WT
SF25	100 %	41,9 %	25,4 %	n. d.
SF53	10 %	12,5 %	13,8 %	n. d.
SF59	10 %	49,3 %	22,3 %	WT
SF67	10.000 %	73,5 %	45,9 %	WT
SF75	10 %	45,7 %	19,4 %	verstärkt
SF158	n. d.	34,9 %	9,9 %	WT

Die Phagenrohpräparationen wurden in Zehnerschritten verdünnt und diese Verdünnungen in einer quantitativen PCR mit *stx₂*-spezifischen Primern eingesetzt. Die jeweils letzte Verdünnungsstufe, bei der noch Phagen-DNA amplifiziert wurde, wurde als Schwellenwert für den Vergleich mit den anderen Stämmen definiert. Die angegebenen Werte für alle Transposonmutanten sind als relative Werte bezogen auf den wildtypischen Phagen in *E. coli* C600(933W/pADR-28) zu verstehen. Es wurden nur die Werte für die relativen Phagentiter nach MMC-Induktion verglichen (n. d.: nicht detektierbar). Zum Vergleich sind auch die Anteile der PhoA-Aktivitäten in den Kulturüberständen an den Gesamtaktivitäten, die PhoA-Induktionsstärken und die relative Toxinproduktion der Stämme angegeben.

Tabelle 14: Relative Produktion von Phagenpartikeln bei den mutierten Bakteriophagen mit erhöhter PhoA-Induktion im Vergleich zum nichtmutierten Phagen 933W.

<i>E. coli</i>- Stamm	relative Phagenproduktion (% Wildtyp)	PhoA-Aktivität im Kulturüberstand (% Wildtyp)	PhoA- Induktion (% Wildtyp)	Toxin- produktion (tendentiell)
C600(933W/ pADR-28)	100 %	100 %	100 %	WT
SF106	10.000 %	115 %	386,8 %	verstärkt
SF156	10.000 %	108,6 %	301,0 %	reduziert

Die Phagenrohpräparationen wurden in Zehnerschritten verdünnt und diese Verdünnungen in einer quantitativen PCR mit *stx*₂-spezifischen Primern eingesetzt. Die jeweils letzte Verdünnungsstufe, bei der noch Phagen-DNA amplifiziert wurde, wurde als Schwellenwert für den Vergleich mit den anderen Stämmen definiert. Die angegebenen Werte für alle Transposonmutanten sind als relative Werte bezogen auf den wildtypischen Phagen in *E. coli* C600(933W/pADR-28) zu verstehen. Es wurden nur die Werte für die relativen Phagentiter nach MMC-Induktion verglichen (n. d.: nicht detektierbar). Zum Vergleich sind auch die Anteile der PhoA-Aktivitäten in den Kulturüberständen an den Gesamtaktivitäten, die PhoA-Induktionsstärken und die relative Toxinproduktion der Stämme angegeben.

In der relativen Phagenquantifizierung lassen sich die Mutantenstämme ebenfalls in drei Kategorien einteilen. Die Gruppe mit der um das ca. 100fache gesteigerten Phagenproduktion (10.000 %) umfaßt die *E. coli*-Stämme SF67, SF106 und SF156. Die Stämme *E. coli* SF53, SF59, SF75 und SF158 zeigen eine abgeschwächte Phageninduktion, wobei die ersten drei Stämme auf ca. 10 % des Ausgangsstamms reduziert waren und in SF158 die Nachweisgrenze für PCR bereits unterschritten war. In *E. coli* SF25 ist die Phageninduktion in etwa gleich stark wie die des nichtmutierten Stamms. Die meisten Phageninduktionsphänotypen korrelieren tendentiell mit der PhoA-Produktion der Stämme. So ist in den Stämmen mit gesteigerter Phagenproduktion auch die *stx*₂-Reporterexpression erhöht, und der einzige Stamm mit niedriger PhoA-Produktion, der keine Reduktion der Phagenfreisetzung zeigt, ist der Stamm *E. coli* SF25. *E. coli* SF67 ist der einzige Stamm mit niedriger *stx*₂-Reporterexpression, der eine stark erhöhte Phageninduktion aufweist. Verglichen mit den relativen Werten für die Toxinproduktion ergeben sich wiederum keine direkten Korrelationen.

1.2.4 Lokalisation der Transposons

Um herauszufinden, ob die Transposons in den Phagenmutanten mit den Shiga-Toxin-Genen kolokalisiert sind, wurden Southern Hybridisierungen von chromosomaler DNA aus den lysogenen Stämmen, die mit den Restriktionsenzymen *Hind*III, *Sma*I und *Eco*RI geschnitten war, mit den Sonden gegen die Chloramphenicolcassette im Transposon (*cat*) und gegen *stx*₂ durchgeführt.

Die spezifischen Hybridisierungsmuster der mit *Hind*III und der mit *Sma*I-gespaltenen DNA sind in den Abbildungen 9 und 10 sowie zusammenfassend in Tabelle 15 dargestellt.

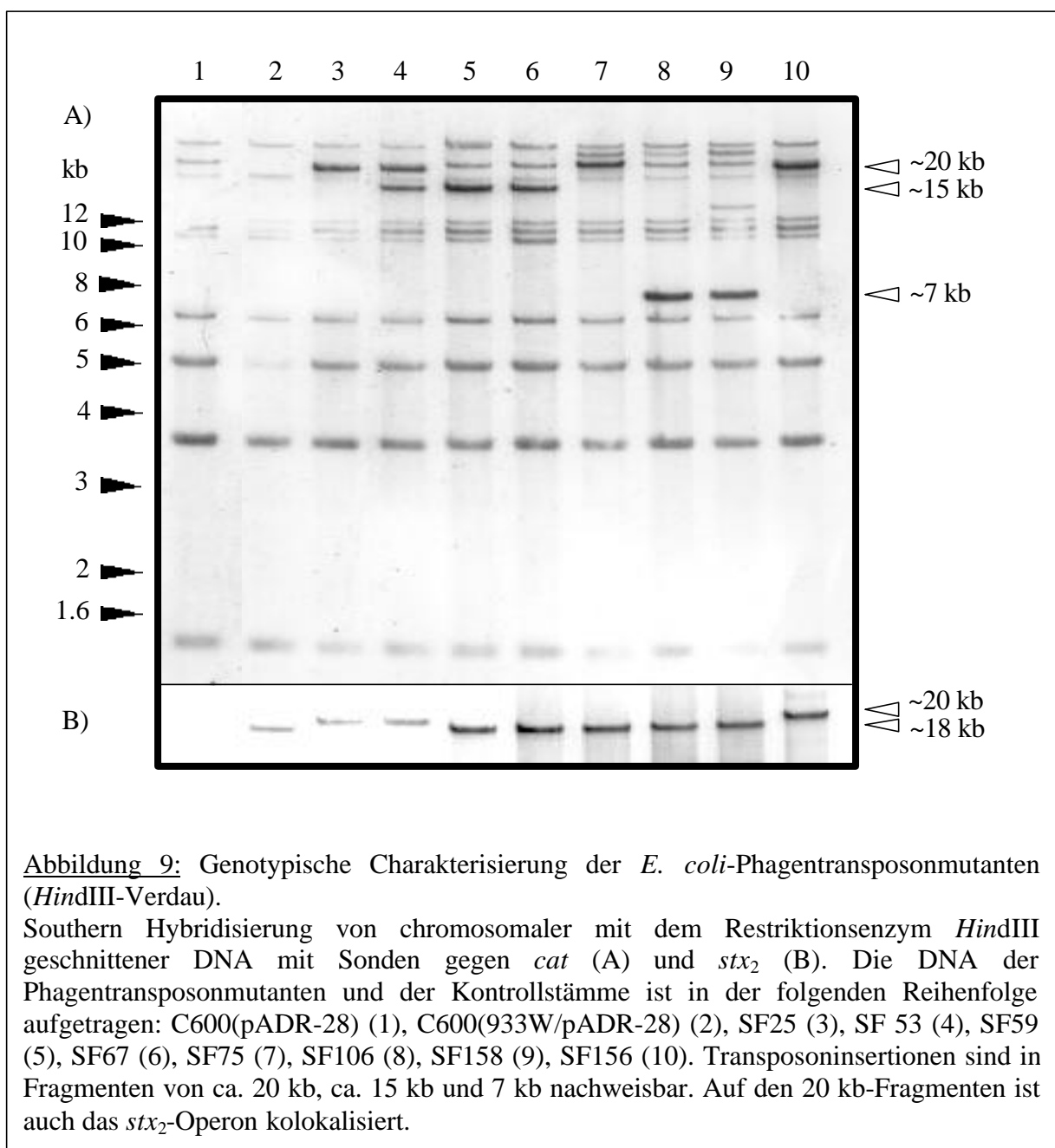


Abbildung 9: Genotypische Charakterisierung der *E. coli*-Phagentransposonmutanten (*Hind*III-Verdau).

Southern Hybridisierung von chromosomaler mit dem Restriktionsenzym *Hind*III geschnittener DNA mit Sonden gegen *cat* (A) und *stx*₂ (B). Die DNA der Phagentransposonmutanten und der Kontrollstämmen ist in der folgenden Reihenfolge aufgetragen: C600(pADR-28) (1), C600(933W/pADR-28) (2), SF25 (3), SF 53 (4), SF59 (5), SF67 (6), SF75 (7), SF106 (8), SF158 (9), SF156 (10). Transposoninsertionen sind in Fragmenten von ca. 20 kb, ca. 15 kb und 7 kb nachweisbar. Auf den 20 kb-Fragmenten ist auch das *stx*₂-Operon kolokalisiert.

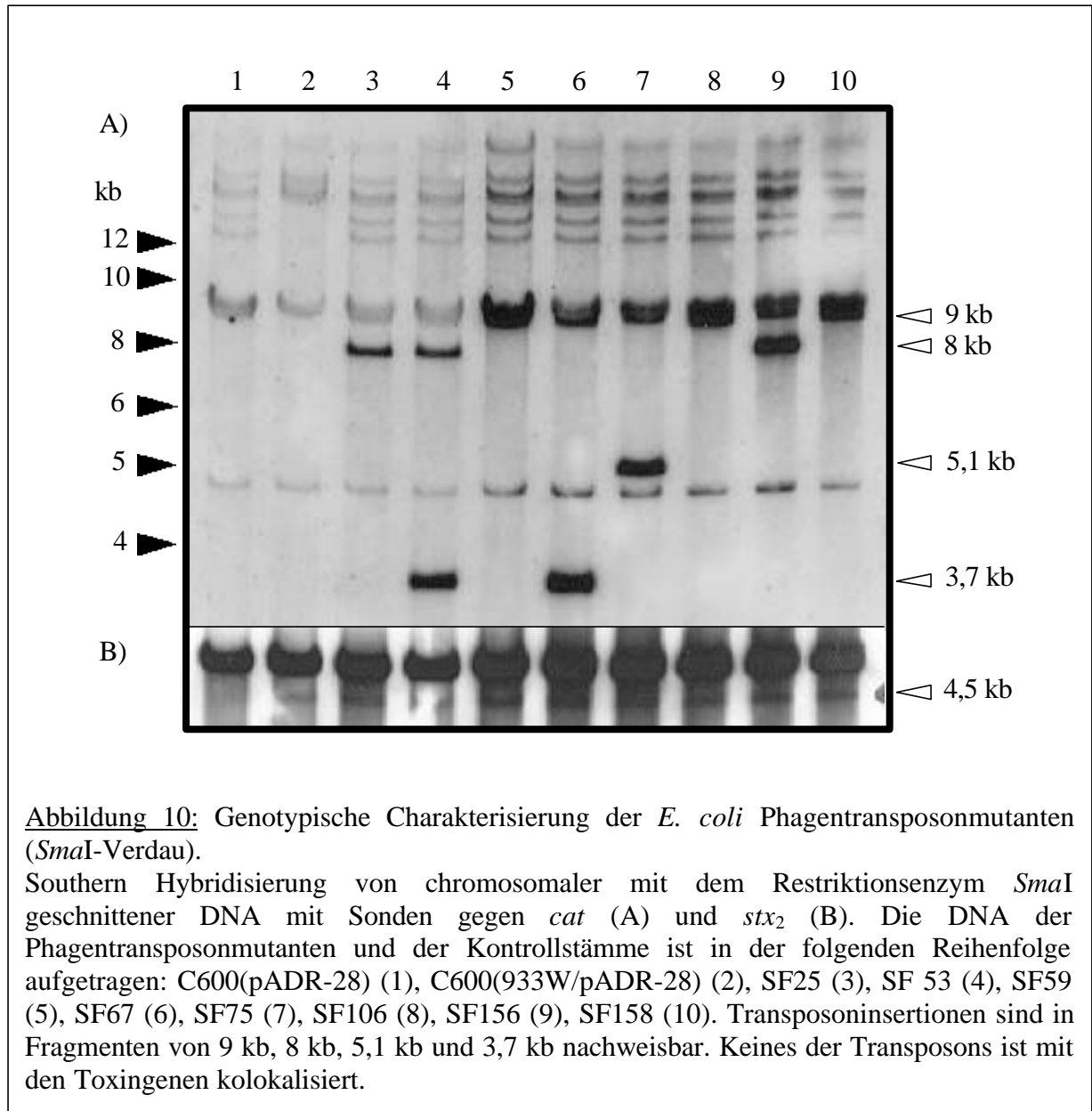


Abbildung 10: Genotypische Charakterisierung der *E. coli* Phagentransposonmutanten (*Sma*I-Verdau).

Southern Hybridisierung von chromosomaler mit dem Restriktionsenzym *Sma*I geschnittener DNA mit Sonden gegen *cat* (A) und *stx₂* (B). Die DNA der Phagentransposonmutanten und der Kontrollstämmen ist in der folgenden Reihenfolge aufgetragen: C600(pADR-28) (1), C600(933W/pADR-28) (2), SF25 (3), SF 53 (4), SF59 (5), SF67 (6), SF75 (7), SF106 (8), SF156 (9), SF158 (10). Transposoninsertionen sind in Fragmenten von 9 kb, 8 kb, 5,1 kb und 3,7 kb nachweisbar. Keines der Transposons ist mit den Toxigenen kolokalisiert.

Tabelle 15: Zusammenfassung der Southern-Hybridisierungsmuster der *E. coli*-Transposonmutanten mit Sonden gegen *stx*₂ und *cat*.

Stamm	PhoA (% WT)	<i>Hind</i> III-Verdau		<i>Sma</i> I-Verdau	
		<i>stx</i> ₂ -Sonde	<i>cat</i> -Sonde	<i>stx</i> ₂ -Sonde	<i>cat</i> -Sonde
SF25	25,4 %	ca. 20 kb	ca. 20 kb	4,5 kb (WT)	8 kb
SF53 (T1)	13,8 %	ca. 20 kb	ca. 20 kb	4,5 kb (WT)	8 kb
SF156	301,0 %	ca. 20 kb	ca. 20 kb	4,5 kb (WT)	8 kb
SF106	386,8 %	ca. 18 kb (WT)	7 kb	4,5 kb (WT)	9 kb
SF158	9,9 %	ca. 18 kb (WT)	7 kb	4,5 kb (WT)	9 kb
SF53 (T2)	13,8 %	(ca. 20 kb, s. o.)	ca. 15 kb	4,5 kb (WT)	3,7 kb
SF67	45,9 %	ca. 18 kb (WT)	ca. 15 kb	4,5 kb (WT)	3,7 kb
SF59	22,3 %	ca. 18 kb (WT)	ca. 15 kb	4,5 kb (WT)	9 kb
SF75	19,4 %	ca. 18 kb (WT)	größer als 20 kb	4,5 kb (WT)	5,1 kb

Die Hybridisierungsmuster der einzelnen Stämme wurden in Gruppen eingeteilt, die gleiche Muster zeigen. Der Stamm *E. coli* SF53 wurde wegen der zwei in ihm enthaltenen Transposons (T1 und T2) zwei unterschiedlichen Gruppen zugeordnet. Die Fragmente, die zwar die Toxingene, aber kein Transposon enthalten, sind als wildtypisch (WT) gekennzeichnet. In der Gruppe mit den Stämmen *E. coli* SF25, SF53 (T1) und SF156 sind die Toxingene mit dem Transposon auf einem 20 kb-DNA-Fragment kolokalisiert, ansonsten treten keine Kolokalisationen auf.

Diese Hybridisierungen zeigten, daß in fast allen Mutanten der Bakteriophage nur ein Transposon enthält. Die einzige Ausnahme bildet der Stamm *E. coli* SF53 mit zwei inserierten Transposons. Die Hybridisierung von mit *Eco*RI (nicht gezeigt) bzw. mit *Sma*I geschnittener chromosomaler DNA mit den beiden Sonden zeigte, daß das Transposon weder auf dem 4,9 kb *Eco*RI-Fragment (Newland *et al.*, 1987) noch auf dem 4,5 kb *Sma*I-Fragment mit den Toxingenen kolokalisiert ist. Die Transposons sind demnach nicht in der näheren Umgebung der Toxingene integriert.

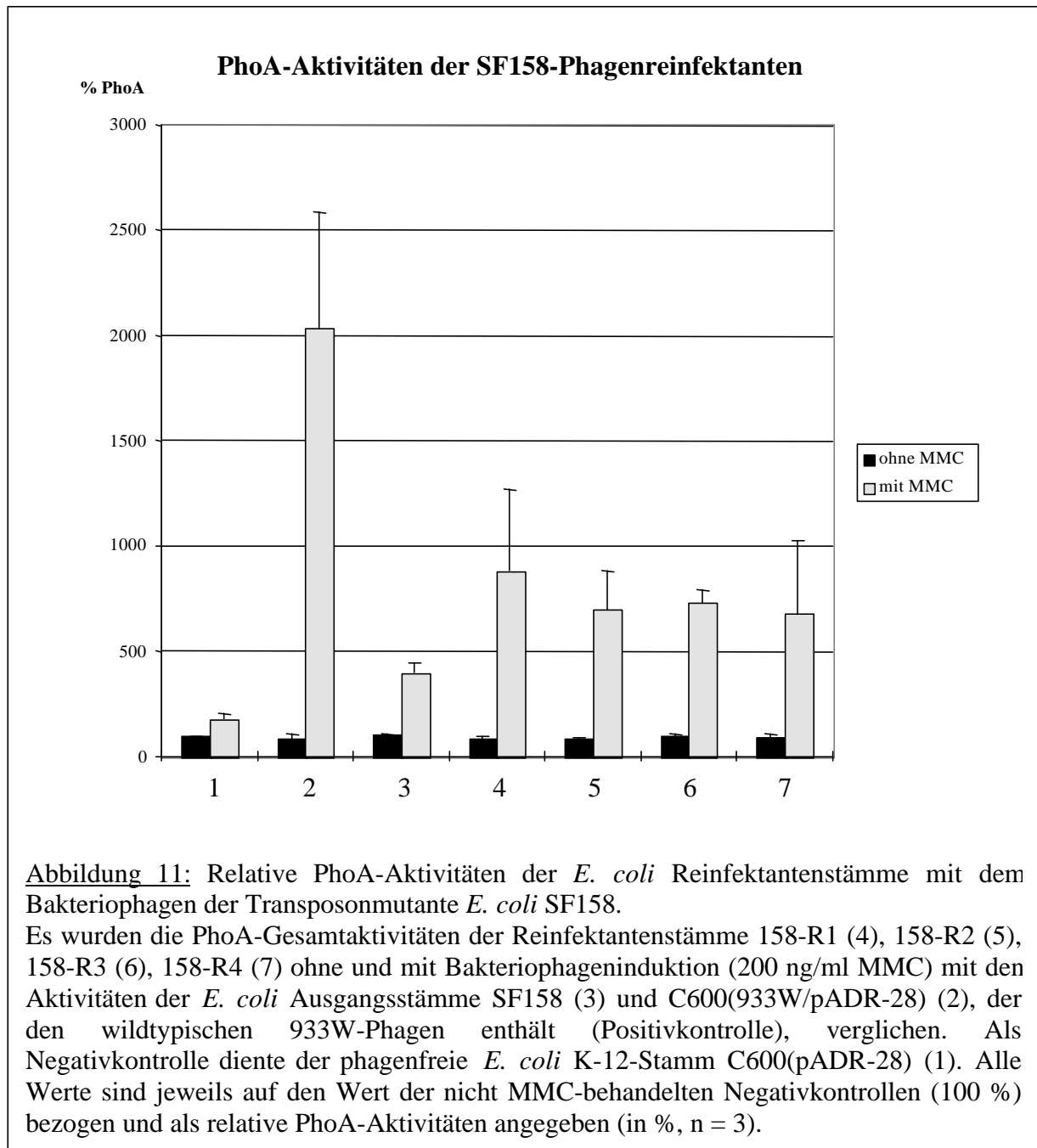
Beim Vergleich der Hybridisierungsmuster fällt auf, daß in den verschiedenen Mutanten zum Teil dieselben DNA-Fragmente von den Transposoninsertionen betroffen sind. So entsprechen sich etwa die ca. 20 kb großen hybridisierenden *Hind*III-Fragmente aus den Stämmen *E. coli* SF25, SF156 und SF53. Auf diesem Fragment konnte eine Kolokalisation von *stx*₂ und dem Transposon nachgewiesen werden. Weiterhin hybridisieren jeweils die DNA-Fragmente aus *E. coli* SF106 und SF158 sowie aus *E. coli* SF67 und das kleinere Fragment aus SF53 identisch. Die Stämme *E. coli* SF59 und SF75 können keiner dieser Gruppen zugeordnet werden. Vergleicht man die PhoA-Aktivitäten der Stämme innerhalb der

Gruppen mit identischen Transposon-Lokalisationsmustern, wird offensichtlich, daß die Stämme innerhalb der Gruppen nicht die gleichen Phänotypen bei der PhoA-Expression aufweisen. Dies zeigt sich am extremsten bei den Stämmen SF106 und SF158: während SF106 die stärkste Expressionssteigerung des *stx₂*-Reportergens aufweist, handelt es sich bei SF158 um den am schwächsten induzierenden PhoA-Produzenten. Wegen dieses Phänotyps wurde SF158 weiteren Untersuchungen unterzogen, die im folgenden Abschnitt dargestellt sind.

1.3 Nähere Charakterisierung der Phagentransposonmutante SF158

1.3.1 Charakterisierung von Reinfektantenstämmen mit dem Phagen aus *E. coli* SF158

Um festzustellen, ob der oben beschriebene Effekt der Transposoninsertion auf die *stx₂*-Expressionsregulation im Bakteriophagen des *E. coli*-Stamms SF158 von der Position des lysogenen Phagen im Bakteriengenom abhängig ist (Phagen-Positionseffekt), wurde der mutierte Phage aus diesem Stamm isoliert und zur Infektion von C600(pADR-28) verwendet. Die PhoA-Expression von vier der resultierenden Reinfektantenstämmen wurde getestet. Es zeigte sich, daß alle vier Stämme eine signifikant niedrigere PhoA-Expression als der wildtypische Stamm C600(933W/pADR-28) aufweisen. Diese ist in allen Reinfektanten etwas höher als in *E. coli* SF158 (siehe Abbildung 11), die Standardabweichungen liegen jedoch zumindest zum Teil im Schwankungsbereich der Ausgangsmutante.



1.3.2 Klonierung und Sequenzierung der Transposonintegrationsstelle im Phagen des *E. coli*-Stamms SF158

Wie bereits im vorherigen Kapitel gezeigt wurde, ist im *E. coli* K-12-Stamm SF158, der eine Transposonmutation im Phagen 933W trägt, das inserierte Transposon auf einem ca. 7 kb großen *Hind*III-DNA-Fragment lokalisiert. Um die exakte Insertionsstelle des Transposons in diesem Fragment bestimmen zu können, wurde das Fragment in die *Hind*III-Schnittstelle des Klonierungsvektors pUC18 kloniert und das resultierende 9,5 kb große

Plasmid pFUX158 benannt. Die Insertgröße wurde mit 6,8 kb bestimmt. Eine Southern-Hybridisierung des Plasmids pFUX158, das mit den Restriktionsenzymen *Hind*III bzw. *Bam*HI geschnitten war, mit einer *cat*-spezifischen Sonde erwies, daß die *cat*-Cassette des Transposons wie erwartet sowohl auf dem 6,8 kb *Hind*III-Insert als auch auf einem transposonspezifischen 1,3 kb *Bam*HI-Fragment nachgewiesen werden konnte (nicht abgebildet).

Ferner wurde pFUX158 einer Sequenzanalyse unterworfen. Die beiden Sequenzierprimer *cat*-2 und *cat*-4 binden innerhalb des Transposons jeweils wenige Basen „upstream“ von den beiden flankierenden *Tn*10-Elementen. Sie sind so gewählt, daß bei einer Sequenzierung über die flankierenden Elemente hinaus die dem Transposon benachbarten Phagensequenzen gelesen werden. Auf diese Weise konnten insgesamt 1.046 bp der Phagen-DNA sequenziert und die Lage des Transposons bestimmt werden. In den verschiedenen Leserastern waren insgesamt vier ORFs zu finden, die von der Transposoninsertion betroffen waren (s. Abbildung 12).

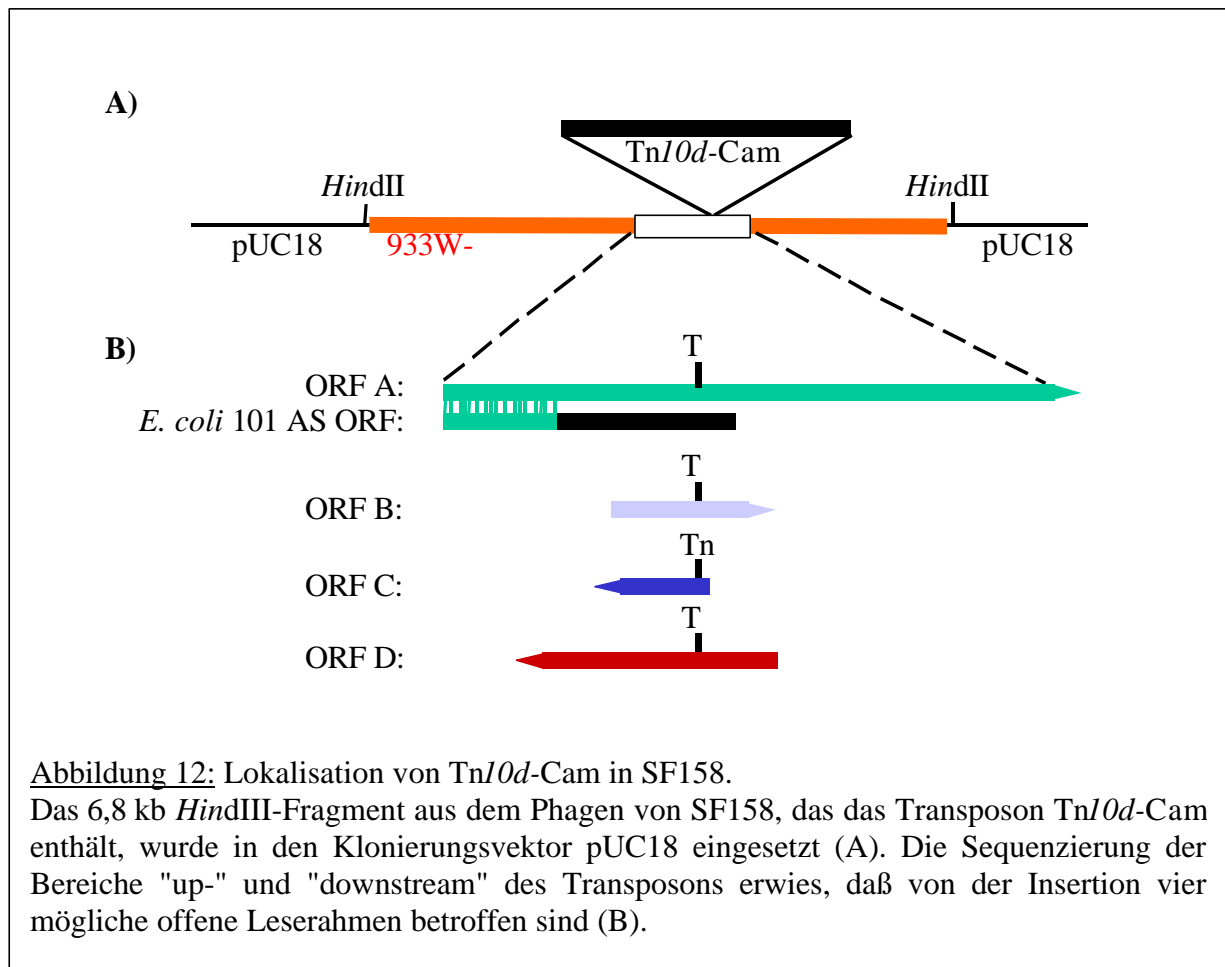


Abbildung 12: Lokalisation von Tn10d-Cam in SF158.

Das 6,8 kb *Hind*III-Fragment aus dem Phagen von SF158, das das Transposon Tn10d-Cam enthält, wurde in den Klonierungsvektor pUC18 eingesetzt (A). Die Sequenzierung der Bereiche "up-" und "downstream" des Transposons erwies, daß von der Insertion vier mögliche offene Leseraster betroffen sind (B).

Die offenen Leserahmen (ORFs) B und C haben eine Größe von 147 bzw. 96 bp und zeigen keinerlei Homologien zu bereits bekannten Sequenzen. Der ORF D ist 249 bp lang und das entsprechende 82 Aminosäuren (AS) lange Peptid besitzt in seinen N-terminalen 21 AS eine Identität von 38% zu einem 1.053 AS langen komplement-regulatorischen Plasmaprotein von *Paralabrex neblifer* (gestreifter Sandbarsch).

Der ORF A hat eine Länge von 624 bp, besitzt als einziger eine typische Ribosomenbindungsstelle und kodiert für ein 207 AS langes Protein. Dieses entspricht dem Genprodukt des kürzlich von Plunkett *et al.* (1999) veröffentlichten ORF L0065 aus der Sequenz des 933W-Phagen (GenBank acc. no. AF125520), dessen Funktion noch nicht bekannt ist. Im Stx2-konvertierenden Phagen VT2-Sa (DBJ acc. no. AP000363) wurde in orf4 an der entsprechenden Stelle im Genom eine Homologie von 99 % über 204 AS (von 299 AS) gefunden. Diese homologen ORFs tragen jeweils am N-terminalen Ende eine 42 AS lange Sequenz, die auf Proteinebene eine Identität von 78 % und eine Ähnlichkeit von 90 % zum ORF o101 aus dem *E. coli* K-12 Stamm MG1655 besitzt (Sequenz von Blattner *et al.*, 1997, GenBank acc. no. AE000324 und U00096, direct submission). Die Funktion des 101 AS langen Genprodukts von ORF o101 ist ebenfalls noch nicht aufgeklärt. Es hat jedoch auf Proteinebene über eine Länge von 42 AS 36 % Identität zu einer 1.824 AS langen hypothetischen Helicase aus *Caenorhabditis elegans* (PIR acc. no. S44849). Die N-terminalen 21 AS der homologen Helicasensequenz weisen 67 % Ähnlichkeit (29 % Identität) zu ORF A auf.

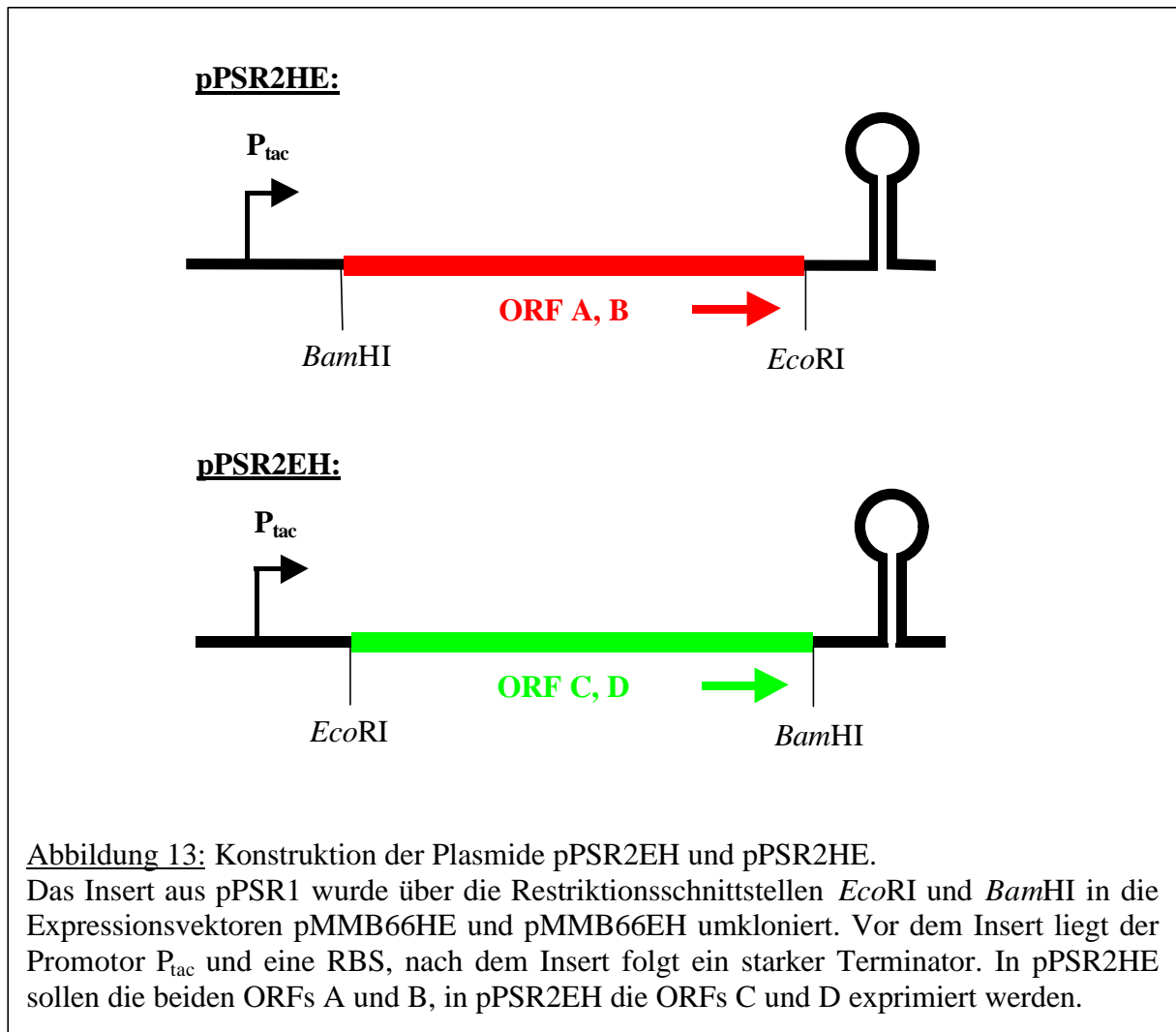
Im "downstream" von der Transposoninsertion liegenden Bereich besitzt ORF A eine Region mit Homologie zu den C-terminalen Bereichen weiterer Proteine aus Shiga-Toxin-konvertierenden Phagen, nämlich zu ORF L0140 aus 933W und zu orf76 aus VT2-Sa (jeweils 50 % Identität und 61 % Ähnlichkeit über 80 AS) sowie zu orf558 aus H19J (35 % Identität und 50 % Ähnlichkeit über 78 AS, EMBL acc. no. AJ236875). Denselben Grad an Homologie wie zu orf558 besitzt diese Region zum Gen *eaA* aus dem *Salmonella typhimurium* Bakteriophagen P22 (GenBank acc. no. L06296) über einen Bereich von 76 AS. Auch orf87 aus demselben Phagen (PIR acc. no. S15699) ist dieser Region aus ORF A homolog (37 % Identität und 47 % Ähnlichkeit über 75 AS). Für keines dieser homologen Proteine wurde eine Funktion beschrieben.

1.3.3 Komplementation der Transposonmutante SF158

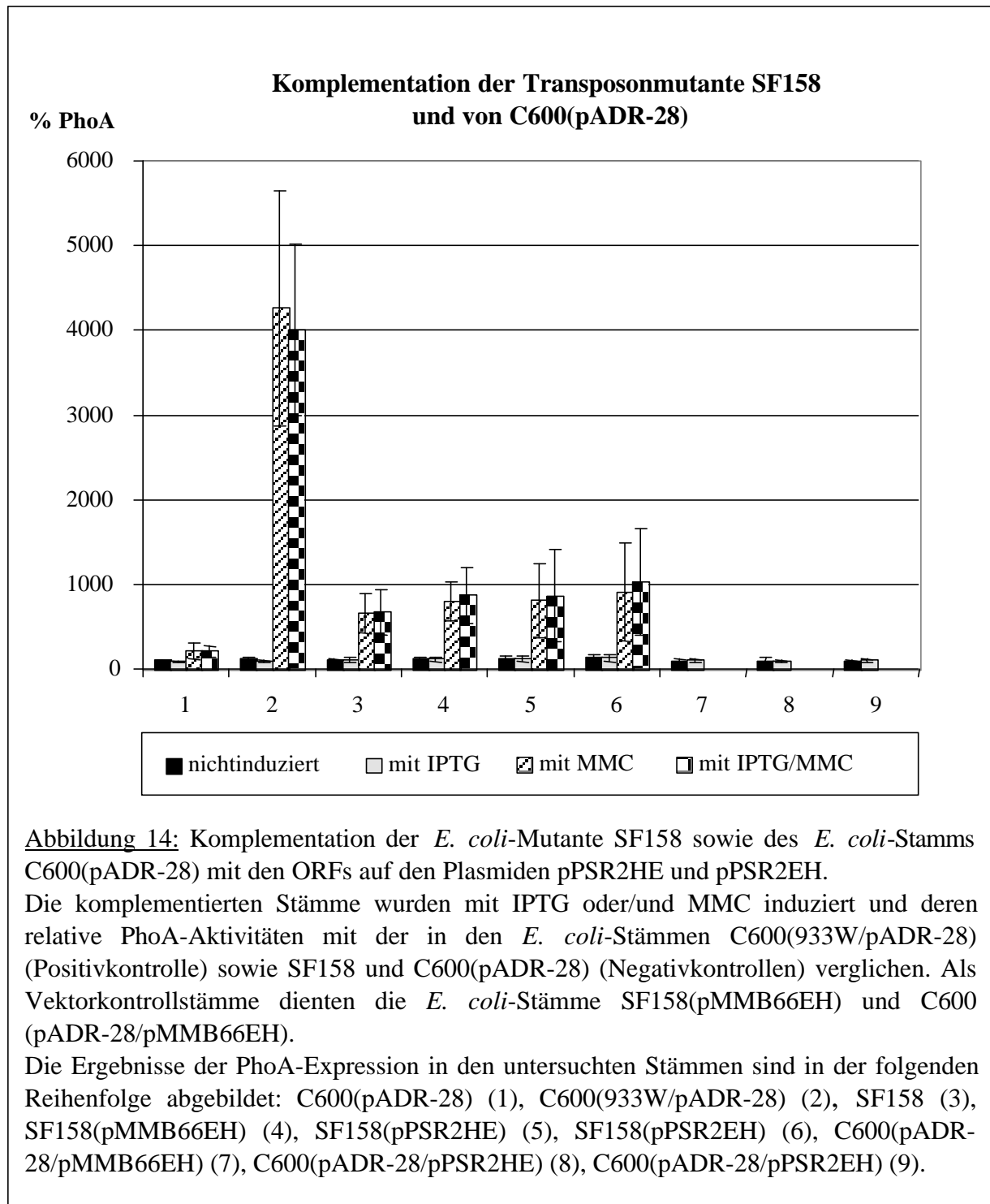
Um festzustellen, welcher der beschriebenen ORFs einen regulatorischen Einfluß auf die Expression von *stx₂* hat, sollten diese kloniert und zur Komplementation des *E. coli*-

Stammes SF158 verwendet werden. Der gesamte den ORF A umfassende Bereich, der auch die anderen Leseraster enthält, wurde mittels PCR mit den Primern cat-7 und cat-8 aus dem wildtypischen 933W-Phagen amplifiziert und das resultierende 686 bp große Fragment in die *SalI*-Schnittstelle des Vektors pUC18 kloniert. Die Inserts der Plasmide von fünf resultierenden Klonen wurden beidsträngig sequenziert und die Sequenzen miteinander und mit den Sequenzen aus der ursprünglichen pFUX158-Sequenzierung verglichen. Im Anhang ist die resultierende Sequenz von einem der Klone dargestellt. Dieses Plasmid erhielt den Namen pPSR1 (für phage-encoded Shiga-Toxin regulator).

Für die Komplementation der *E. coli* Phagenmutante SF158 wurden die vermuteten Gene auf der klonierten DNA-Sequenz in pPSR1 hyperexprimiert, weil der mit dem nichtmutierten 933W-Phagen beobachtete expressionssteigernde Effekt des postulierten Faktors auf das *stx*₂-Reportergen während der „Hyperexpression“ des Phagengenoms im Verlauf der Induktion des Phagen stattfindet. Um eine Hyperexpression des potentiellen Regulatorproteins zu gewährleisten, wurde das Insert mit der 933W-Sequenz aus dem Plasmid pPSR1 über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Eco*RI in die Expressionsvektoren pMMB66HE und pMMB66EH, die sich nur in der Orientierung ihrer Polylinker unterscheiden, umklont. Diese Expressionsvektoren stehen unter der Kontrolle des Promotors P_{tac}, der durch IPTG induzierbar ist und durch den auf demselben Plasmid kodierten *lac*-Repressor (*lacI*^Q) in nichtinduziertem Zustand reprimiert wird. Dieser Expressionsvektor enthält zusätzlich eine Ribosomenbindungsstelle (RBS) ohne ein Startcodon, so daß auch Gene ohne RBS ausgehend von ihren eigenen Startcodons exprimiert werden können, was in unserem Fall mit je zwei verschiedenen ORFs pro Leserichtung von Vorteil ist. Die resultierenden Plasmide erhielten je nach Insertorientierung die Namen pPSR2HE und pPSR2EH (s. Abbildung 13).



Um eine Komplementation der Transposonmutation im *E. coli*-Stamm SF158 zu erzielen, wurde dieser Stamm mit je einem der beiden Plasmide pPSR2HE und pPSR2EH transformiert. Die Expression der ORFs auf den Plasmiden wurde mit IPTG induziert. Um zu gewährleisten, daß nicht noch ein weiteres bei der Induktion der Bakteriophagen gebildetes Genprodukt für die Expression des *stx*₂-Reportergens benötigt wird, wurde der Phage zusätzlich noch mit MMC induziert (200 ng/ml). Weiterhin wurde untersucht, ob eines der auf dem Plasmid exprimierten Genprodukte auch in Abwesenheit des Phagen in der Lage ist, die Expression des Reportergens zu aktivieren. Zu diesem Zweck wurde der phagenfreie *E. coli*-Stamm C600(pADR-28) mit je einem der beiden Plasmide transformiert und diese wiederum mit IPTG induziert. Als Vektorkontrollstamm wurde der Klonierungsvektor pMMB66EH in beide Stämme transformiert. Dann wurde in all diesen Stämmen die Reportergenexpression durch Messung der PhoA-Aktivität bestimmt. In Abbildung 14 sind die Resultate dieser Messungen dargestellt.



Wie die Abbildung 14 zeigt, sind die klonierten ORFs weder in den komplementierten *E. coli* SF158-Derivaten noch in den *E. coli* C600(pADR-28)-Derivaten in der Lage, die Reporterexpression signifikant über die Werte von Negativkontrolle oder Vektorkontrollstämmen hinaus anzuheben. Die vier ORFs konnten die *stx₂*-Reporterexpression nicht direkt aktivieren, und es konnte auch keine Komplementation der Mutante *E. coli* SF158 durch sie erzielt werden.

Zusammenfassung

In diesem Teilprojekt sollte ein postulierter phagenkodierter Faktor, der einen regulatorischen Einfluß auf die Expression eines *stx*₂-Reportergens ausübt, charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurde eine Transposonmutagenese des Stx2-konvertierenden Bakteriophagen 933W durchgeführt und die resultierenden Mutanten auf die Auswirkung der Mutation auf die Reporterexpression sowie auf die Produktion von Toxin und von Phagenpartikeln hin untersucht. Zwei Gruppen von Mutanten konnten isoliert werden, von denen in der einen Gruppe die Fähigkeit zur Expression des Reportergens reduziert und in der anderen erhöht war. Auch die Produktion von Toxin und von Phagenpartikeln war in den Mutanten verändert, jedoch korrelierten diese Phänotypen nicht in allen Fällen mit der Veränderung in der Reporterexpression (s. Tabelle 16). Die Lokalisation der Transposons zeigte ebenfalls keine Korrelation mit den Reporterphänotypen.

Tabelle 16: Vergleich der *E. coli*-Transposonmutanten in ihren Tendenzen zur Phagenpartikelproduktion, Zellyse, Reporterexpression und Toxinproduktion.

<i>E. coli</i> -Stamm	relative Phagenproduktion	PhoA-Aktivität im Kulturüberstand	PhoA-Induktion	Toxinproduktion
SF53	-	-	-	-
SF106	+	+	+	+
SF59	-	-	-	=
SF75	-	-	-	+
SF158	-	-	-	=
SF25	=	-	-	-
SF67	+	-	-	=
SF156	+	+	+	-

Eine jeweilige Verstärkung des betreffenden Phänotyps im Vergleich zum Wildtypphagen 933W ist mit +, eine Reduktion mit - angedeutet. Unveränderte Werte werden mit = bezeichnet.

Eine der Transposonmutanten, der *E. coli* Stamm SF158 mit der am stärksten reduzierten Reporterexpression, wurde näher charakterisiert. Durch Sequenzanalyse konnte die Transposoninsertionsstelle im für den Phagen 933W beschriebenen ORF L0065 mit unbekannter Funktion bestimmt werden. Von der Insertion sind vier mögliche ORFs betroffen. Eine alle vier ORFs umfassende Region wurde in einen Expressionsvektor subkloniert und die *E. coli*-Transposonmutante SF158 sowie der *E. coli* K-12-Stamm

C600(pADR-28) damit komplementiert. Eine Analyse der Reporterexpression in den Komplementantenstämmen zeigte, daß keiner der vier ORFs in der Lage war, die Transposonmutation zu komplementieren oder das *stx₂*-Reporter gen direkt zu aktivieren. Mögliche Gründe für dieses Ergebnis sind in der Diskussion erläutert.