

Inhaltsverzeichnis

I. Zusammenfassung	1
I. Summary	3
II. Einleitung	5
1. Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>	5
1.1 Krankheitsverlauf und Epidemiologie	5
1.2 Shiga-Toxine	7
1.2.1 Bau und zelluläre Wirkungsweise der Shiga-Toxine	7
1.2.2 Die Rolle von Shiga-Toxinen in der Pathogenese	9
1.2.3 Genetische Organisation und Regulation der Shiga-Toxine	11
1.3 Bildung von “attaching-and-effacing”-Läsionen	13
1.4 Weitere charakteristische EHEC-Virulenzfaktoren	15
2. Konstruktion von bakteriellen Lebendvakzinen	17
2.1 Prinzip von Attenuierung und Fremdantigenpräsentation	17
2.2 Möglichkeiten der Attenuierung durch das Ausschalten von Regulatorgenen	19
2.3 Entwicklung von Impfstoffen gegen EHEC	21
3. Zielsetzung der Arbeit	23
III. Material und Methoden	25
1. Material	25
1.1 Bakterienstämme	25
1.2 Plasmide	27
1.3 Oligonukleotide	28
1.4 Bakteriellcs Toxin	29
1.5 Antikörper	29
1.6 DNA- und Protein-Größenmarker	30
1.7 Medien und Nährböden	31
1.8 Chemikalien, Enzyme, Kits, Geräte und Sonstiges	32
1.9 Häufig verwendete Puffer und Lösungen	34
2. Methoden	36
2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	36
2.1.1 Kleiner Maßstab (DNA-Reinigung mit Diatomeenerde)	36
2.1.2 Mittlerer Maßstab (QIAGEN)	36

2.2 Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>E. coli</i>	37
2.3 Phenolisierung von DNA	37
2.4 Alkoholische Fällung von DNA	38
2.5 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	38
2.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	38
2.7 Agarose-Gelelektrophorese zur Trennung von DNA-Fragmenten	38
2.8 Elution von DNA aus Agarosegelen (GeneClean-Kit, Bio 101/Dianova)	39
2.9 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	39
2.10 DNA-Ligation	39
2.11 PCR	39
2.11.1 PCR mit dem Gibco BRL Supermix	40
2.11.2 PCR mit der DAp GOLDSTAR-Polymerase	40
2.12 Klonierung von PCR-Produkten (Sure-clone-Kit, Pharmacia Biotech)	41
2.13 Automatisierte Sequenzierung von Plasmid-DNA nach der Kettenabbruch-Methode	41
2.14 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen und Transformation	42
2.14.1 Kompetente Zellen durch CaCl ₂ -Behandlung und Hitzeschock-Transformation	42
2.14.2 Kompetente Zellen für die Elektroporation und Elektrottransformation	42
2.15 Plasmidtransfer durch Konjugation von <i>E. coli</i> Donor- und Rezipientenstämmen	42
2.16 Konstruktion von isogenen EHEC-Mutanten unter Benutzung von Suizidvektoren durch Genaustausch mittels Doppelcrossover	43
2.16.1 Integration eines Plasmids basierend auf einem Suizidvektor ins Chromosom (Einzelcrossover)	43
2.16.2 Induktion eines 2. Crossovers	43
2.17 Radioaktive Kolonie-Hybridisierung	44
2.17.1 Transfer von Kolonien auf Nylonmembran	44
2.17.2 Radioaktive Markierung einer DNA-Sonde mit dem Random Primers DNA Labelling System (Gibco BRL)	44
2.17.3 Kolonie-Hybridisierung	44
2.18 Nichtradioaktive Southern Hybridisierung	45
2.18.1 Southern Blot mit dem VakuGene Blotter (Pharmacia LKB)	45
2.18.2 Nichtradioaktive Markierung einer DNA-Sonde und Hybridisierung (ECL-Kit, Amersham)	46
2.19 Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>E. coli</i>	46
2.20 Radioaktive Northern-Hybridisierung	47
2.20.1 RNA-Gelelektrophorese	47

2.20.2 RNA-Transfer durch Kapillarblot	47
2.20.3 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden und Hybridisierung	48
2.21 Gewinnung von Gesamtzellsaten durch Lyse mit Laemmli-Puffer aus <i>E. coli</i>	48
2.22 Gewinnung von Gesamtzellsaten für Typ 1-Fimbrien-Westernblot durch saure Fimbriendissoziation	49
2.23 Hitzeextraktion von Fimbrien	49
2.24 Fimbriendissoziation mit Hilfe von Guanidium-Hydrochlorid	49
2.25 Isolation von Membranproteinen aus <i>E. coli</i>	50
2.26 Quantifizierung von Proteinen	50
2.26.1 Bio-Rad Protein-Assay	50
2.26.2 Proteinquantifizierung nach Markwell	50
2.27 Auftrennung von Proteinen in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	51
2.28 Auftrennung von Proteinen in der Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	52
2.29 Westernblot (Promega ProtoBlot Immunoscreening System)	53
2.30 Immuno-Dotblot	53
2.31 Coomassie-Färbung von Proteingelen	54
2.32 Silberfärbung von Proteingelen	54
2.33 Induktion von Bakteriophagen durch Mitomycin C- oder UV-Licht-Behandlung von Bakterienkulturen	55
2.34 Isolation von Shiga-Toxin aus Bakterienkulturen	55
2.34.1 Herstellung von Periplasma-Extrakten	55
2.34.1.1 Minimal-Maßstab für ELISA-Toxinquantifizierung	55
2.34.1.2 50 ml-Maßstab für Westernblot	55
2.34.2 Stx2-Aufkonzentrierung durch-Ammoniumsulfatfällung	56
2.35 Quantifizierung von Shiga-Toxin 2 im Toxin-Sandwich-ELISA	56
2.36 Quantifizierung von Shiga-Toxin 2 im [³ H]Leucin-Inkorporations-Assay	57
2.36.1 Zellkultur	57
2.36.1.1 Anzichten von Gewebekulturzellen	57
2.36.1.2 Passagieren von Gewebekulturzellen	57
2.36.1.3 Bestimmung der Zelldichte	57
2.36.1.4 Einfrieren und Aufbewahrung von Gewebekulturzellen	58
2.36.2 Zytotoxizitätsmessung durch [³ H]Leucin-Inkorporation	58
2.37 Phagen-Plaque-Assay	58
2.38 Isolation von lysogenisierten <i>E. coli</i> -Stämmen	59
2.39 Indirekte Bakteriophagenquantifizierung durch relativ quantitative PCR	59

2.40 Transposonmutagenese lysogener Bakteriophagen in <i>E. coli</i> mit dem Transposon Tn10d-Cam	59
2.41 Bestimmung der Aktivität von alkalischer Phosphatase (PhoA) im PhoA-Assay	60
2.42 Schnelles PhoA-Screening der C600(933W)-Transposonmutanten	60
2.43 Motilitätstest auf Schwärmagarplatten	60
2.44 Mannose-sensitive Hefeagglutination	61
2.45 Nachweis der Häminverwertung	61
2.46 Nachweis von Enterohämolysin	61
IV. Ergebnisse	62
1. Einfluß eines phagenkodierten Faktors auf die Expression von <i>stx</i>₂ im <i>E. coli</i> K-12 Stamm C600(933W/pADR-28)	62
1.1. Konstruktion von Transposonmutanten des Bakteriophagen 933W aus dem <i>E. coli</i> K-12 Stamm C600(933W)	62
1.2 Phänotypische und genotypische Charakterisierung der 933W-Transposonmutanten	67
1.2.1 Vergleich von zell- und überstandsassozierten PhoA-Aktivitäten in den 933W-Transposonmutanten	67
1.2.2 Vergleich der Produktion von Stx ₂ in den 933W-Transposonmutanten	71
1.2.3 Vergleich der Produktion von Phagenpartikeln in den 933W-Transposonmutanten	74
1.2.4 Lokalisation der Transposons	78
1.3 Nähere Charakterisierung der Phagentransposonmutante SF158	81
1.3.1 Charakterisierung von Reinfektantenstämmen mit dem Phagen aus <i>E. coli</i> SF158	81
1.3.2 Klonierung und Sequenzierung der Transposonintegrationsstelle im Phagen des <i>E. coli</i> -Stammes SF158	82
1.3.3 Komplementation der Transposonmutante SF158	84
2. Konstruktion und Charakterisierung einer <i>stx</i>₂-Mutante im <i>E. coli</i>-Stamm O157:H7 86-24	90
2.1 Konstruktion des Plasmids pTUV2	90
2.2 Konstruktion der EHEC <i>stx</i> ₂ -Mutante TUV86-1	93
2.3 Genotypische Charakterisierung der EHEC <i>stx</i> ₂ -Mutante TUV86-1	93
2.4 Phänotypische Charakterisierung der EHEC <i>stx</i> ₂ -Mutante TUV86-1	95
2.5 Charakterisierung des Stx _{2A-B} Fusionsproteins	96
3. Vergleich der <i>in vivo</i>-Virulenz von enterohämorrhagischen <i>E. coli</i> und isogenen <i>stx</i>₂- und <i>recA</i>-Mutanten	99

4. Konstruktion und Charakterisierung einer <i>leuX</i>-Mutante im <i>E. coli</i>-Stamm O157:H7 86-24	102
4.1 Konstruktion des Plasmids pFLX5	102
4.2 Konstruktion des <i>leuX</i> -negativen EHEC-Stamms 86-24Δ4.4	105
4.3 Genotypische Charakterisierung des <i>leuX</i> -negativen EHEC-Stamms 86-24Δ4.4	106
4.4 Phänotypische Charakterisierung des <i>leuX</i> -negativen EHEC-Stamms 86-24Δ4.4	108
4.4.1 Einfluß der tRNA _{5^{Leu}} auf die Schwärmaktivität und die Flagellenproduktion	108
4.4.2 Einfluß der tRNA _{5^{Leu}} auf die Siderophorproduktion	110
4.4.3 Einfluß der tRNA _{5^{Leu}} auf die Produktion eines mit Typ 1-Fimbrien-spezifischen Antiserum kreuzreaktiven Antigens	112
4.4.4 Einfluß der tRNA _{5^{Leu}} auf die Anwesenheit von Membranproteinen	114
4.4.5 Einfluß der tRNA _{5^{Leu}} auf die Häminverwertung	115
4.4.6 Einfluß der tRNA _{5^{Leu}} auf die Stx2-Produktion	116
4.4.7 Einfluß der tRNA _{5^{Leu}} auf die Enterohämolyse	117
4.4.8 Einfluß der tRNA _{5^{Leu}} auf die Intiminproduktion	119
4.4.9 Einfluß der tRNA _{5^{Leu}} auf die <i>in vivo</i> -Virulenz im Mäusemodell	120
4.5 Bestimmung des Gehalts an tRNA _{5^{Leu}} -spezifischen Codons in verschiedenen EHEC-Virulenzfaktoren	121
V. Diskussion	124
1. Charakterisierung eines putativen phagenkodierten <i>stx</i>₂-regulatorischen Faktors	124
2. Attenuierung von enterohämorrhagischen <i>Escherichia coli</i>	132
2.1 Attenuierung von EHEC durch die Deletion des Virulenzfaktors <i>stx</i> ₂	132
2.2 Attenuierung von EHEC durch die Deletion des Regulators <i>recA</i>	136
2.3 Attenuierung von EHEC durch das Ausschalten der tRNA _{5^{Leu}}	138
3. Ausblick	149
VI. Anhang	151
1. Plasmide	151
2. Sequenzen	155
2.1 Plasmid pFLX1, Insertsequenz: <i>leuX</i> aus EHEC O157:H7 86-24	155
2.2 Plasmid pPSR1, Insertsequenz: ORF L0065 aus EHEC O157:H7 EDL933 φ 933W	156
3. Literaturverzeichnis	157
4. Abkürzungen	185

5. Publikationen und Präsentationen	187
6. Lebenslauf	189