

**Strukturelle und funktionelle Charakterisierung
des Immunglobulin-bindenden Proteins EibG
aus Shiga Toxin-produzierenden
Escherichia coli – Stämmen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades des
Doktors der Naturwissenschaften
der Technischen Fakultät
der Universität Bielefeld

von
Viktor Merkel

Borchen
2013

Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier (ISO 9706)

Dekan: Prof. Dr. Jens Stoye

Gutachter: 1. Prof. Dr. Johannes Müthing

2. Prof. Dr. Thomas Noll

Datum der Einreichung: 23. April 2013

Datum der Disputation: 16. Dezember 2013

Quand tu veux construire un bateau, ne commence pas par rassembler du bois, couper des planches et distribuer du travail, mais reveille au sein des hommes le desir de la mer grande et large.

- Antoine de Saint-Exupéry -

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Pathogene <i>Escherichia coli</i>	1
1.2	Gruppierung der pathogenen <i>E. coli</i> – Stämme und deren Oberflächenantigene	2
1.2.1	Membran gramnegativer Bakterien	2
1.2.2	O-Antigen	2
1.2.3	H-Antigen	3
1.2.4	F-Antigen	4
1.2.5	K-Antigen	4
1.3	Pathogenitätsinseln von <i>E. coli</i>	5
1.3.1	Toxine und Proteasen	6
1.3.2	Synthese der O-Antigene	9
1.3.3	Synthese der K-Antigene	10
1.3.4	Serumresistenz	10
1.3.5	Eisenaufnahmesysteme	11
1.3.6	Adhäsine	12
1.3.7	Bakterielle Sekretionssysteme	13
1.4	Trimerische Autotransporter Adhäsine	21
1.4.1	YadA	21
1.4.2	EibD	22
1.5	Biofilmbildung durch Bakterien	24
1.5.1	Definition und Eigenschaften von Biofilmen	24
1.5.2	Stadien der Biofilmbildung	25
1.5.3	Oberflächeneigenschaften für die bakterielle Biofilmbildung	26
1.5.4	Erste Kontakte mit der Oberfläche	26
1.5.5	Reversible Adhäsion	27
1.5.6	Irreversible Oberflächenadhäsion	29
1.5.7	Biofilmmreifung	30
1.5.8	Auflösung des Biofilms	32
1.6	Immunglobulin-bindende Proteine von Bakterien	33
1.6.1	Immunglobuline	33
1.6.2	IBP grampositiver Bakterien	34
1.6.3	IBP gramnegativer Bakterien	36
1.7	Eib-Familie	38
1.7.1	Entdeckung der Eib-Familie	38
1.7.2	Erste genetische Identifizierung der <i>eib</i> -Gene	38
1.7.3	Homologien der Eib-Sequenzen	40
1.7.4	Kettenartige Aggregation der <i>E. coli</i> – Bakterien	41
1.8	Zielsetzung	43

2.	MATERIALIEN	45
2.1	Chemikalien	45
2.2	Antikörper	47
2.3	Technische Geräte	47
2.4	Weitere Verbrauchsmaterialien	48
2.5	Software	49
2.6	Biologisches Material	49
2.6.1	Intestinale Epithelzelllinien	49
2.6.2	Verwendete STEC Wildtyp-Stämme	50
2.6.3	In dieser Arbeit hergestellte gentechnisch veränderte Organismen (GVO)	50
2.6.4	STEC ohne <i>eibG</i> -Gene	51
2.6.5	Antigen43- und EhaA-positive <i>E. coli</i>	51
3.	METHODEN	52
3.1	Kultivierung der <i>E. coli</i> – Stämme	52
3.1.1	Medien	52
3.1.2	Herstellung von Kryokulturen	53
3.1.3	Bestimmung der optischen Dichte	53
3.2	Molekularbiologische Methoden mit DNA	53
3.2.1	Isolierung chromosomaler DNA von <i>E. coli</i>	53
3.2.2	<i>polymerase chain reaction</i> (PCR)	53
3.2.3	DNA-Sequenzierung	56
3.2.4	Transformation von <i>eibG</i> in den Expressionsstamm <i>E. coli</i> – BL21(DE3)	57
3.2.5	Blau-Weiß-Selektion	58
3.3	Kultivierung intestinaler Epithelzellen	60
3.4	Mikroskopie	61
3.4.1	Aggregation EibG-positiver STEC-Stämme	61
3.4.2	Blockierung von EibG mit humanem IgG Fc	62
3.4.3	Biofilmuntersuchung	63
3.4.4	Adhäsions-Assays von EibG-positiven STEC und intestinalen Epithelzellen	63
3.5	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	64
3.6	Molekularbiologische Methoden mit <i>E. coli</i> – Proteinen	64
3.6.1	Aufschluss der <i>E. coli</i> – Zellen	65
3.6.2	Konzentrierung von Proteingemischen	67
3.6.3	Proteinkonzentrationsbestimmung	69
3.6.4	Gelelektrophoretische Auftrennung EibG-positiver <i>E. coli</i> – Lysate	70
3.6.5	Proteinfärbemethoden	72
3.6.6	Auftrennung der inneren und der äußeren <i>E. coli</i> – Membran	75
3.7	Aufkonzentrierung von EibG mittels Hitzeextraktion	75
3.8	Affinität verschiedener EibG-Subtypen gegenüber Immunglobulinen verschiedener Säugerspezies	76
3.9	2D-Gelelektrophorese	77

3.9.1	Lyse EibG-positiver STEC für 2D-GE	77
3.9.2	Rehydratisierung	77
3.9.3	Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)	78
3.9.4	Äquilibrierung	78
3.9.5	SDS-PAGE (2. Dimension)	79
3.10	Massenspektrometrische Analyse verschiedener EibG-Subtypen	79
3.10.1	UV-MALDI-o-TOF – MS	79
3.10.2	Probenvorbereitung für das <i>peptide mass fingerprinting</i>	81
3.10.3	nanoESI-Q-TOF – MS	83
3.11	Sequenzvergleiche und 3D-Modellierung	86
4.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	87
4.1	Allelvariation von <i>eibG</i>	87
4.1.1	Vorliegende Daten zu Beginn der Arbeit	87
4.1.2	DNA-Isolierung für die Sequenzierung von <i>eibG</i>	89
4.1.3	<i>Multilocus sequence typing</i> (MLST)	92
4.1.4	Gruppierung der sequenzierten <i>eibG</i> -Allele	93
4.1.5	Sequenzvergleich aller <i>eibG</i> -Allele	95
4.2	Phänotypische Charakterisierung <i>eibG</i>-positiver STEC	98
4.2.1	Adhäsion <i>eibG</i> -positiver STEC an humane intestinale Epithelzellen	99
4.2.2	Adhäsion EibG-positiver STEC an bovine intestinale Epithelzellen	100
4.2.3	Kettenausbildung von <i>eibG</i> -positiven STEC auf abiotischer Oberfläche	101
4.2.4	Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Bindung von IgG Fc-Fragmente an <i>eibG</i> -positive STEC	102
4.2.5	Blockierung der Kettenausbildung durch humanes IgG Fc	104
4.3	EibG-Expression in EibG-transformierten <i>E. coli</i>	105
4.3.1	Transformation von <i>E. coli</i> – BL21(DE3) mittels <i>pGEM-T Easy</i> – Vektor	105
4.3.2	Adhäsion der <i>eibG</i> -Klone an humane intestinale Epithelzellen	106
4.3.3	Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Bindung vom IgG Fc-Fragment an <i>eibG</i> -positive Klone	107
4.4	Veränderung der EibG-Expression von WT-Stämmen durch verschiedene Kultivierungs-Bedingungen	109
4.4.1	Kultivierung <i>eibG</i> -positiver Stämme in Minimalmedium M9	109
4.4.2	EibG-Expression bei geschüttelten und stationären Kulturen in LB-Medium	111
4.4.3	Adhäsion <i>eibG</i> -positiver Wildtypen und Klone an humane intestinale Epithelzellen nach geschüttelter und stationärer Bakterienkultivierung	113
4.5	Biofilmausbildung	114
4.5.1	Vergleich des Gefäßboden-assoziierten Biofilms mit dem Mediumoberflächen- assoziierten Flocken-Biofilm in stationärer Kultur	114
4.5.2	Biofilmausbildung <i>eibG</i> -positiver STEC in stationärer und geschüttelter Kultur	115
4.5.3	Biofilmausbildung <i>eibG</i> -positiver Klone in stationärer und geschüttelter Kultur	117
4.5.4	Auswirkung von Kollagen auf die Biofilmausbildung <i>eibG</i> -positiver Wildtypstämme	120
4.5.5	Kolorimetrische Quantifizierung der Biofilmausbildung <i>eibG</i> -positiver Wildtypstämme und Klone	121
4.6	Gelelektrophoretische Analyse EibG-positiver <i>E. coli</i> – Lysate	123

4.6.1	Visualisierung von EibG mit humanem IgG Fc-HRP	123
4.6.2	1D-GE <i>eibG</i> -positiver Wildtypstämme	125
4.6.3	Einfluss von geschüttelter und stationärer Kultivierung auf die EibG-Expression und Biofilmbildung von Wildtypen und Klonen	126
4.7	Auftrennung der inneren und äußeren <i>E. coli</i> – Membranen	131
4.8	Aufkonzentrierung von EibG	133
4.8.1	Chromatographische Aufkonzentrierung von EibG	133
4.8.2	Hitzeextraktion oberflächenassoziiertes <i>E. coli</i> – Proteine	133
4.9	Affinität von EibG zu Immunglobulinen verschiedener Spezies	134
4.10	1D – peptide mapping	136
4.11	Sequenzierung von Peptiden mittels nanoESI-Q-TOF – MS	141
4.12	Identifizierung der Signalsequenz von EibG	142
4.13	2D-Gelelektrophorese	143
4.13.1	2D-Gele <i>eibG</i> -positiver STEC-Stämme	144
4.13.2	2D – peptide mapping	145
4.14	Elektronenmikroskopie	152
4.15	3D-Modellierung der EibG-Struktur	156
4.15.1	<i>Swiss Model Workspace</i>	156
4.15.2	<i>RCSB-PDB</i> 3D-Modellierung	157
4.15.3	3D-Modell von EibG	159
4.15.4	Bindungsdomänen für Immunglobuline	161
4.16	Sequenzvergleich innerhalb der Eib-Familie	162
4.17	Weitere Adhäsionsfaktoren innerhalb des Genoms <i>eibG</i>-positiver <i>E. coli</i>	164
5.	ZUSAMMENFASSUNG	166
5.1	EibG-positive STEC	166
5.2	Allelvariation von <i>eibG</i> und die damit verbundenen Eigenschaften	166
5.2.1	Unterschiede zwischen den <i>eibG</i> -Allelen	166
5.2.2	Signalsequenz	167
5.2.3	Weitere AS-Bereiche von EibG	168
5.2.4	AS-Vergleich innerhalb der Eib-Familie	169
5.3	Bestätigung von EibG als ein IgG Fc – bindendes Protein	170
5.4	Weitere Trimerische Autotransporter Adhäsine <i>eibG</i>-positiver STEC-Stämme	170
5.5	Gleichzeitig mit EibG verstärkt exprimierte <i>E. coli</i> – Proteine	170
5.6	EibG-vermittelte Biofilmbildung von <i>E. coli</i>	171
5.6.1	Einfluss der Medienzusammensetzung auf die <i>eibG</i> -vermittelte Kettenausbildung	171
5.6.2	Variationen in der Expressionsstärke von EibG	171
5.6.3	Kettenausbildung <i>eibG</i> -positiver <i>E. coli</i>	172
5.6.4	Verteilung von EibG auf der <i>E. coli</i> – Oberfläche	172
5.6.5	Produktion der Biofilmmatrix durch <i>eibG</i> -positive <i>E. coli</i>	173
6.	ANHANG	175
6.1	Danksagung	175

6.2	Literaturverzeichnis	177
6.3	Abbildungsverzeichnis	189
6.4	Tabellenverzeichnis	192
6.5	Abkürzungsverzeichnis	193
6.6	Lebenslauf	197
7.	ERKLÄRUNG	198

1. EINLEITUNG

1.1 PATHOGENE *ESCHERICHIA COLI*

Das gramnegative stäbchenförmige Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae* und besiedelt den Verdauungstrakt von Warmblütern. Diese normalerweise apathogenen Bakterien sind ein wichtiger Teil der menschlichen und tierischen physiologischen Flora des Gastrointestinaltrakts und dienen als Wegbereiter für Ansiedlung weiterer Mikroorganismen (Fruth, 2005). Sowohl diese kommensalen Bakterien, als auch *E. coli* selbst, sind für den Abbau von Gallensäure, Bilirubin und kurzkettigen Carbonsäuren verantwortlich und dienen als Vitamin K – Produzenten (Sonnenborn und Greinwald, 1991).

Über den Gentransfer erlangen manche *E. coli* – Stämme neue genetische Elemente, welche der besseren Anpassung an neue biologische Nischen dienen (Bauwens, 2010). Einige der neu erlangten Fähigkeiten können beim Menschen Krankheiten hervorrufen und werden Virulenzfaktoren genannt. Die pathogen gewordenen *E. coli* werden nach den Bereichen des Körpers, in denen sie vorkommen, in intestinale oder extraintestinale Pathovaren unterschieden (Hacker, 2000). Die wichtigsten humanpathogenen intestinalen *E. coli* sind die EHEC/STEC (enterohämorrhagische *E. coli*/Shiga Toxin-bildende *E. coli*), EPEC (enteropathogene *E. coli*), ETEC (enterotoxische *E. coli*), EIEC (enteroinvasive *E. coli*) und EAEC (enteroaggregative *E. coli*) (Nataro und Kaper, 1998). Zu den extraintestinalen pathogenen *E. coli* zählen die UPEC (uropathogene *E. coli*), SEPEC (septikämische *E. coli*) und NMEC (Neonatale Meningitis *E. coli*) (Dobrindt *et al.*, 2001; Redford und Welch, 2002). Beim Menschen können die pathogenen Varianten von *E. coli* Kolitiden, Cholera-ähnliche Durchfälle, hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS), blutige Ruhr-ähnliche Durchfälle, Harnwegsinfektionen, Meningitis, Septikämien und Pyelonephritis hervorrufen.

Aufgrund des Ausbruchs im Jahr 1982 in den USA wurden die EHEC das erste Mal als gefährlich eingestuft, wobei die Erreger als der Grund für die auftretende hämorrhagische Kolitis (HC) bei den betroffenen Patienten identifiziert wurden (Riley *et al.*, 1983). Das Haupterregerreservoir bilden sowohl domestizierte als auch Wildwiederkäuer. Die Übertragung auf den Mensch findet überwiegend durch kontaminierte Lebensmittel, wie z. B. Gemüse (Sprossen), Rohmilch sowie unzureichend gekochtes (wie beim Ausbruch in den USA 1982) bzw. rohes Fleisch statt (WHO, 2011). In den Patientenisolaten konnte 1982 ein Toxin identifiziert werden, das zunächst aufgrund seiner hohen Toxizität gegenüber Verotoxinen (Nierenzellen der grünen Meerkatze) als Verotoxin bezeichnet wurde. Da das Verotoxin dem Toxin aus *Shigella dysenteriae* sehr ähnelt, wird dieses auch als Shiga Toxin (Stx) und die Stx-produzierenden *E. coli* als STEC bezeichnet (Shiga Toxin – produzierende *E. coli*). Als Vertreter der EHEC-Gruppe, der am weitesten verbreiteten und gefährlichsten humanpathogenen und Stx-produzierenden *E. coli*, werden nach heute verwendeter Definition diejenigen *E. coli* – Stämme bezeichnet, welche beim Menschen Durchfälle, HC oder HUS verursachen, die A/E-Läsionen (*attaching and effacing*) an Epithelzellen ausbilden und über ein oder mehrere 60 MDa große Virulenzplasmide verfügen (Bauwens, 2010; Paton und Paton, 1998; Nataro und Kaper, 1998).

1.2 GRUPPIERUNG DER PATHOGENEN *E. COLI* – STÄMME UND DEREN OBERFLÄCHENANTIGENE

Zu diagnostischen Zwecken werden *E. coli* – Stämme aufgrund der Unterschiede in den Oberflächenstrukturen in verschiedene Serogruppen unterteilt. Ähnlich dem Typisierungsschema für Salmonellen von Kauffmann und White wurden *E. coli* – Oberflächenantigene in die charakteristischen O-Antigene (ohne Hauch, basierend auf Lipopolysacchariden (LPS)), H-Antigene (Hauch, basierend auf Geißeln), K-Antigene (Kapseln, basierend auf Oberflächenkapseln) und F-Antigene (Fimbrien) unterteilt (Kauffmann und Vahlne, 1945; Knipschildt, 1945). Dabei sind nicht diese Antigene für die sichtbaren klinischen Symptome verantwortlich, sondern das Vorhandensein von Virulenz- bzw. Fitnessfaktoren (Zingler *et al.*, 1992). In **Abb. 1** sind die Oberflächenantigene schematisch dargestellt.

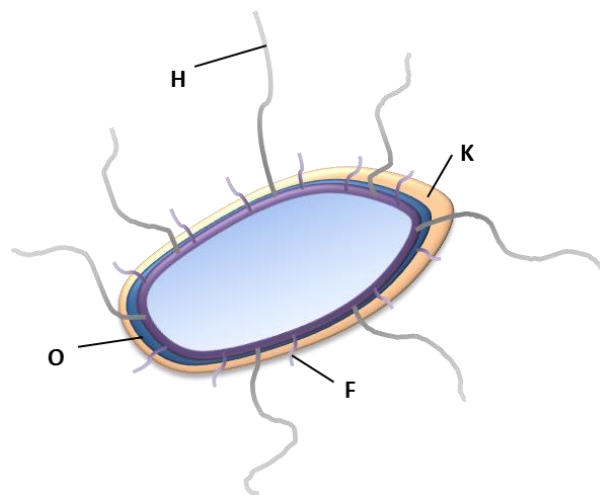


Abb. 1: Schematische Darstellung der Oberflächenantigene von *Escherichia coli*.

(H) Geißeln; (K) Kapsel; (F) Fimbrien; (O) Lipopolysaccharide; (hellblau) Cytosol; (violett) bakterielle Membran; (dunkelblau) LPS; (gelb) Kapselmantel.

1.2.1 Membran gramnegativer Bakterien

Die aus zwei Phospholipiddoppelschichten bestehende Membran gramnegativer Bakterien stellt eine wichtige Barriere zwischen dem Inneren der *E. coli* – Zelle und der äußeren Umgebung dar. Auf die innere Cytoplasmamembran folgt der periplasmatische Raum mit dem Zellgerüst aus Peptidoglykan (acetylierte Polysaccharide) und den Lipoproteinen. Die äußere Membran weist einen asymmetrischen Aufbau auf und enthält neben den Phospholipiden verschiedene Membranproteine sowie Lipopolysaccharide oder K-Polysaccharide und dient zudem als Verankerungsort für weitere membranassoziierte Proteine, die zum größten Teil in den extrazellulären Raum hineinragen. In **Abb. 2** sind diese Komponenten schematisch dargestellt.

1.2.2 O-Antigen

Auf der Oberfläche der *E. coli* – Bakterien befinden sich LPS-Moleküle, die aus dem lipophilen Lipid A, der Kernregion mit vielen konservierten Oligosacchariden sowie aus der variablen O-spezifischen Seitenkette, dem O-Antigen, bestehen. Die Variabilität des O-Antigens ist für die hohe Diversität der *E. coli* – Serotypen verantwortlich. Durch das Lipid A, welches aus zwei Glucosaminen mit mehreren veresterten Fettsäuren besteht und durch hydrophobe Wechselwirkungen in der äußeren

Phospholipidschicht eingebettet ist, wird das LPS-Molekül in der äußeren *E. coli* – Membran verankert. Die mit LPS bedeckte Oberfläche von *E. coli* bietet dem Bakterium einen guten Schutz vor einigen äußeren Einflüssen, wie Antibiotika, Detergenzien oder sogar Lysozym, welches die Peptidoglykane abbaut. Das Lipid A zeigt in den meisten gramnegativen Bakterien einen ähnlichen Aufbau. Die isolierte Form von Lipid A ist toxisch (Rietschel, 1999), weshalb es auch als Endotoxin bezeichnet wird.

Die 181 mittlerweile bekannten O-Antigene dienen der Klassifizierung sowohl von *E. coli* als auch von anderen Bakterien, wie z. B. Salmonellen. Die O-Antigene können in verschiedenen Spezies gleich oder ähnlich aufgebaut sein (Hacker, 2000).

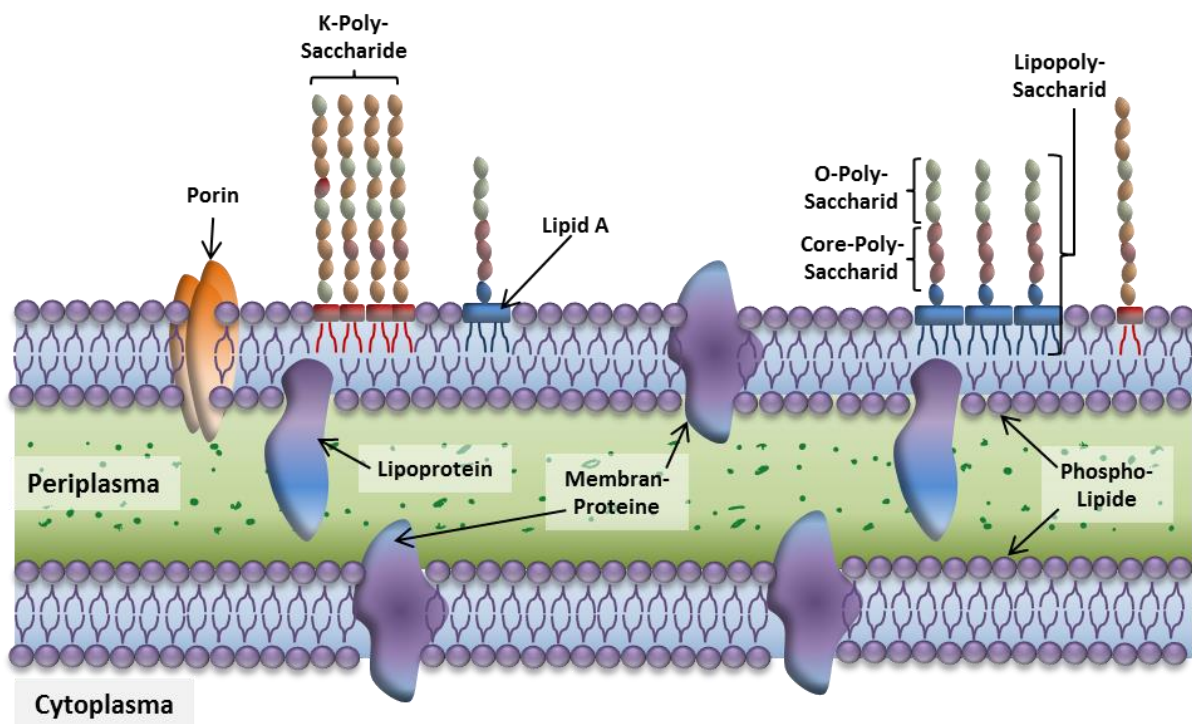


Abb. 2: Äußere und innere Membran von *E. coli*.

1.2.3 H-Antigen

Die Flagellen (H-Antigene) bilden einen weiteren wichtigen Bestandteil der bakteriellen Zellwand von *E. coli*. Sie sind für die Mobilität des Bakteriums verantwortlich und gewährleisten auf diese Weise eine bessere Erreichung verschiedener Lebensräume mit z. B. höherem Nahrungsangebot oder tragen zum Fluchtverhalten bei. Die in der Zellwand peritrich verteilten Flagellen bestehen aus einem Proteinanker in Zylinderform, einem Proteinhaken mit Adaptorproteinen und dem Filament, das aus etwa 20.000 Untereinheiten des Proteins Flagellin zusammengesetzt ist. Die Flagellinuntereinheiten sind tubulär angeordnet und verleihen der Flagelle die nötige Stabilität bei propellerähnlichen Bewegungen des gesamten Flagellapparates. Die Vielfalt der H-Antigene ist durch eine hohe Variabilität von *fliC*, dem kodierenden Gen für das Flagellin-Protein (FliC), gegeben. Genau diese genetischen Unterschiede des *fliC*-Gens ermöglichen eine weitere Typisierung der *E. coli* – Stämme. In Abwesenheit oder bei Mutationen des *fliC* werden keine Flagellen gebildet, wodurch die Fortbewegung eingeschränkt wird. Bei der Typisierung werden diese Serotypen dann mit *nm* (*non motile*) gekennzeichnet.

1.2.4 F-Antigen

Die Fimbrien von *E. coli* sind eine Art von Pili, die nicht dem horizontalen Gentransfer dienen, sondern als Adhäsionsstrukturen von Bakterien eingesetzt werden. Die aus einer Vielzahl an zylindrisch angeordneten Proteinen bestehenden langen Fortsätze dienen der Anhaftung des Bakteriums an Feststoffe, Flüssigkeiten, andere Bakterien sowie an die Oberflächen tierischer Zellen, wodurch sich die Virulenz der Fimbrien ergibt. Zu diesen fimbriellen Adhäsinen zählen die Typ-1 Fimbrien (Mannose-sensitiv), Typ-4 Pili (Bfp-Fimbrien), die Sfa-Fimbrien (*S fimbriae major subunit*), die P-Fimbrien (pap: *pyelonephritis-associated pili*), die langen polaren Fimbrien (Lpf: *long polar fimbriae*) und die Sfp-Fimbrien (Spears *et al.*, 2006; Dobrindt *et al.*, 2001; Müsken *et al.*, 2008). Fimbrien sind kürzer als Flagellen, kommen in höherer Anzahl auf der Oberfläche von Bakterien vor, können aber, wie die Flagellen, auf der ganzen Zelloberfläche verteilt vorgefunden werden. Die Expression der Fimbrienproteine ist sehr komplex und unterliegt verschiedenen Regulationsmechanismen, die sich z. B. durch das Nahrungsangebot, die Temperatur, die Osmolarität oder den pH-Wert der Umgebung verändern können (Romeo, 2008). Für eine Vielzahl von Fimbrien stellen Oligosaccharide auf den Oberflächen tierischer Zellen geeignete Rezeptoren dar. Einige Fimbrien besitzen die Eigenschaft, auf abiotischen Oberflächen anzuhaften und somit die Biofilmbildung der Bakterien zu begünstigen (Pratt und Kolter, 1998).

Eine besondere Art von Fimbrien stellen die *Curli* dar. Diese amyloidartigen, aus Proteinen bestehenden, Teile der extrazellulären Matrix von Bakterien werden meist bei extremen Umweltbedingungen exprimiert. Diese können niedrige Temperatur, niedrige Konzentrationen an Stickstoff, Phosphat oder Eisen, niedrige Osmolarität, mikroaerophile Umgebung, langsames Wachstum oder Mangel an Nährstoffen sein. Dennoch konnte gezeigt werden, dass *Curli* innerhalb von Biofilmen auch bei normalen Bedingungen, wie sie in Säugetieren vorkommen, exprimiert werden. *Curli* dienen, neben der Adhäsion an verschiedene Oberflächen, auch der Zellaggregation während der Biofilmbildung und dadurch der Verbreitung und Kolonisation von *E. coli* im Wirt (Barnhart und Chapman, 2006; Romeo, 2008).

1.2.5 K-Antigen

Mit Hilfe der Kapseln können viele Bakterien, darunter auch *E. coli*, eine weitere Schutzschicht außerhalb der Zellmembran aufbauen. Diese ist zwar nicht lebensnotwendig, bietet jedoch einen gewissen Schutz vor der Phagozytose durch Makrophagen, dem Befall durch Phagen oder vor Austrocknung. Die membranassoziierten Polysaccharide ähneln den LPS, wobei jedoch keine Verankerung mit Lipid A vorliegt. Die Zusammensetzung der Kapselpolysaccharide kann stammabhängig sehr stark variieren. K-Antigene können ein Teil der Kapsel sein, kommen aber nicht in jeder Kapsel vor und variieren stark im Aufbau. Dadurch ergibt sich die Vielzahl von bisher 80 bekannten K-Antigenen. Da die K-Antigene in der äußeren Schicht der *E. coli* – Zellwand zu finden sind, werden sie als Virulenzfaktoren vom Immunsystem als erste erkannt und können heftige Immunreaktionen auslösen. K-Antigene, wie z. B. das K1-Antigen, werden meist mit extraintestinalen Infekten wie Sepsis, Meningitis oder Harnwegsinfektionen in Verbindung gebracht (Whitfield und Roberts, 1999). Da die Synthese der K-Antigene einer ähnlichen Regulation wie der von *Curli* und Flagellen unterliegt, wird die Ausbildung der Kapseln als begleitendes Ereignis zur Biofilmbildung angesehen (Romeo, 2008).

Des Weiteren besteht die bakterielle Zellmembran aus vielen eingelagerten Proteinen, die mit vielfältigen Funktionen, wie die der Porine, der Faltungshelfer, der Adhäsionsfaktoren oder der Proteasen zum Überleben von *E. coli* beitragen. Die Membranproteine weisen sowohl hydrophile als auch hydrophobe Bereiche auf, mit denen sie sich genau an der richtigen Stelle in den Phospholipidschichten, im Mureinsacculus oder an den Grenzen dieser Schichten verankern. Wie die einzelnen Membranproteine nach der Biosynthese ihren Zielort erreichen, wird im Kapitel 1.3.7 genauer erläutert.

1.3 PATHOGENITÄTSINSELN VON *E. COLI*

Die Anpassung der Bakterien an neue Lebensräume oder veränderte Lebensbedingungen erfolgt durch Veränderungen im Expressionsmuster von bereits vorhandenen Genen und Proteinen oder durch Aufnahme sogenannter Fitnessfaktoren von anderen Bakterien. Diese Fitnessfaktoren unterliegen einem ständigen Selektionsdruck und müssen demnach bei eintretenden Veränderungen der Umwelteinflüsse schnellstmöglich variiert werden können. Sobald diese Fitnessfaktoren für den betroffenen Wirt toxisch werden, spricht man von Virulenzfaktoren.

Durch horizontalen Gentransfer werden zwischen verschiedenen bakteriellen Stämmen genetische Informationen ausgetauscht. Die neuen Segmente werden entweder in die chromosomale DNA eingebaut oder auf Plasmiden kodiert vermittelt. Dadurch sind die chromosomale- und die plasmid-DNA von *E. coli* und anderen Bakterien einem ständigen strukturellen Wandel ausgesetzt, was als Genomplastizität bezeichnet wird. Grundsätzlich werden durch horizontalen Gentransfer Fähigkeiten übertragen, die die Fitness von Bakterien erhöhen, die Metabolitexpression anpassen und das Überleben des Bakteriums in neuen ökologischen Nischen sichern.

Die Resistenz gegenüber Antibiotika wird an Bakterien z. B. meistens durch Plasmide, Integrons oder Transposons übertragen. Durch diese Transportmechanismen sowie durch lysogene Bakteriophagen, werden Virulenzfaktoren zwischen den Bakterien ausgetauscht. Diese sind auf großen genomischen Inseln (GEI: *genomic islands*), den sogenannten Pathogenitätsinseln (PAI: *pathogenicity islands*) kodiert und bilden eine Untergruppe des mobilen Genoms von *E. coli*. Die Expression der Gene auf den PAI führt bei günstigen Bedingungen nicht nur zum längeren Aufenthalt von Bakterien im Wirt, sondern auch zur Ausbildung verschiedener Krankheitssymptome (Hacker *et al.*, 2003; Hacker *et al.*, 2004). Die PAI wurden sowohl in gramnegativen als auch in grampositiven Bakterien nachgewiesen, wobei einige PAI sich bestimmten Pathotypen zuordnen lassen und andere auf Genomen vieler unterschiedlicher Bakterien zu finden sind (Dobrindt *et al.*, 2004). In **Abb. 3** ist eine genomische Insel schematisch dargestellt.

Die PAI beanspruchen relativ große Segmente in der cDNA und können 10-200 kb groß sein. Meistens sind diese Bereiche von repetitiven DNA-Fragmenten flankiert (DR: *direct repeats*), die auch nach der Insertion der PAI-DNA durch Rekombination eingebaut werden können. Loki für tRNA dienen oft als Integrationsstellen für fremde DNA und werden oft auf den GEI und PAI vorgefunden. Die tRNA-Loki sind damit ein Zeichen für den horizontalen Gentransfer der sich auf GEI befindenden Gene. Die Mobilität der Gene von GEI wird durch die Kodierung der Gene für Transposasen, Integrasen (*int*) sowie der Insertionssequenzen (IS) gewährleistet (Hacker und Kaper, 2000).

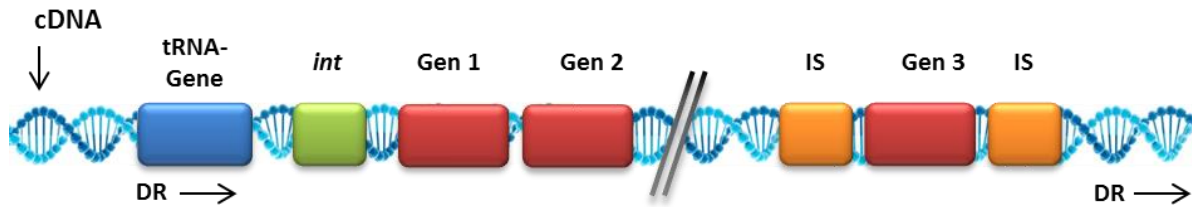


Abb. 3: Mobile genomische Insel (GEI) auf einem bakteriellen Chromosom.

(**cDNA**) chromosomale DNA; (**DR**) repetitive DNA (*direct repeats*); (**tRNA**) GEI flankierende tRNA-Loki; (**int**) Gen für Integrase; (**IS**) Insertionssequenzen, Genmobilität-assoziierte Gene. Modifiziert nach Hacker und Kaper, 2000 und Dobrindt *et al.*, 2004.

Als Virulenzfaktoren auf den PAI sind verschiedene Toxine, Proteasen, LPS, Eisenaufnahmesysteme, serumresistenzvermittelnde Elemente, Flagellen und Adhäsine zu nennen. Ob die exprimierten Faktoren ausschließlich zur Erhöhung momentaner Fitness der Bakterien beitragen oder darüber hinaus toxische Eigenschaften für den Wirt beinhalten, kann nicht immer vorausgesagt werden. Bis heute existiert kein geeignetes tierisches Modell für die Untersuchung des Zusammenspiels dieser Faktoren (Gyles, 2007). Die im Folgenden vorgestellten Virulenzfaktoren sind im Einzelnen mit verschiedenen, durch *E. coli* verursachten, Krankheiten assoziiert worden.

1.3.1 Toxine und Proteasen

Toxine werden von Bakterien entweder zur Abwehr von anderen Mikroorganismen im Wirt eingesetzt oder dienen der Erreichung von Nährstoffen und notwendigen Wachstumsfaktoren, die sich intrazellulär in eukaryotischen Zellen befinden. Beides kann zur weitgehenden Zerstörung der Wirtszellen führen.

Shiga Toxine

Das gefährlichste Toxin, das von *E. coli* – Stämmen produziert wird, ist das Shiga Toxin (Stx). Die Familie der Stx wird generell in Stx1 und Stx2 unterteilt, die in der Zusammensetzung ihrer Aminosäuren (AS) 55%ige Identität aufweisen. Weiterhin wird Stx1 in die Subtypen Stx1a und Stx1c sowie Stx2 in Stx2a bis Stx2f mit einer AS-Homologie zwischen den Stx2-Varianten von 84% bis 99% unterschieden (Johannes und Römer, 2010).

Alle Mitglieder der Stx-Familie bestehen aus der enzymatisch aktiven, 32 kDa großen A-Untereinheit und fünf homologen, 7,7 kDa großen nicht kovalent miteinander verbundenen B-Untereinheiten, die für die Bindung an Oberflächenrezeptoren eukaryotischer Zellen verantwortlich sind (**Abb. 4**). Jede Untereinheit des B-Pentamers weist drei Bindungsstellen für den Hauptrezeptor der Stx, dem Globotriaosylceramid (Gb3Cer bzw. CD77), einem neutralen Glykosphingolipid (GSL) auf, wodurch sich je Stx-Holotoxin 15 Bindestellen für Gb3Cer ergeben. Im Periplasma von *E. coli* werden das B-Pentamer und die A-Untereinheit nicht kovalent miteinander verbunden. Das C-terminale Ende der A-Untereinheit fädelt sich durch die Pore des B-Pentamers hindurch, wodurch das AB₅-Holotoxin komplettiert wird (Johannes und Römer, 2010).

Nach der Bindung von Stx durch die B-Untereinheiten an die Rezeptoren der betroffenen Zellen, erfolgt entweder eine Clathrin-abhängige oder unabhängige Endozytose des gesamten AB₅-Komplexes. Nach der Clathrin-abhängigen Endozytose lösen sich die Clathrinmoleküle auf und die entstandenen Vesikel bilden das frühe Endosom. Die Stx-Holotoxine werden weiter in das *trans*-Golgi

Netzwerk und danach zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) transportiert. Bei Inhibierung der Clathrin-abhängigen Endozytose wird Stx über Caveolae-Endozytose in die Zellen aufgenommen. Caveolae bilden die an GSL reichen Mikrodomänen der Zellmembran aus, welche eine charakteristische Zusammensetzung von Proteinen und Lipiden aufweisen (Bauwens, 2010). Eine dritte Möglichkeit der Internalisierung von Stx in Epithelzellen kann von Stx selbst durch Clusterbildung von GSL-Rezeptoren ausgelöst werden. Diese Invagination erfolgt durch einen zelleigenen Mechanismus ohne die cytosolische Maschinerie, aber mit Hilfe von Dynamin, Aktin sowie dem Cholesterin der Plasmamembran (Römer *et al.*, 2007; Johannes und Römer, 2010).

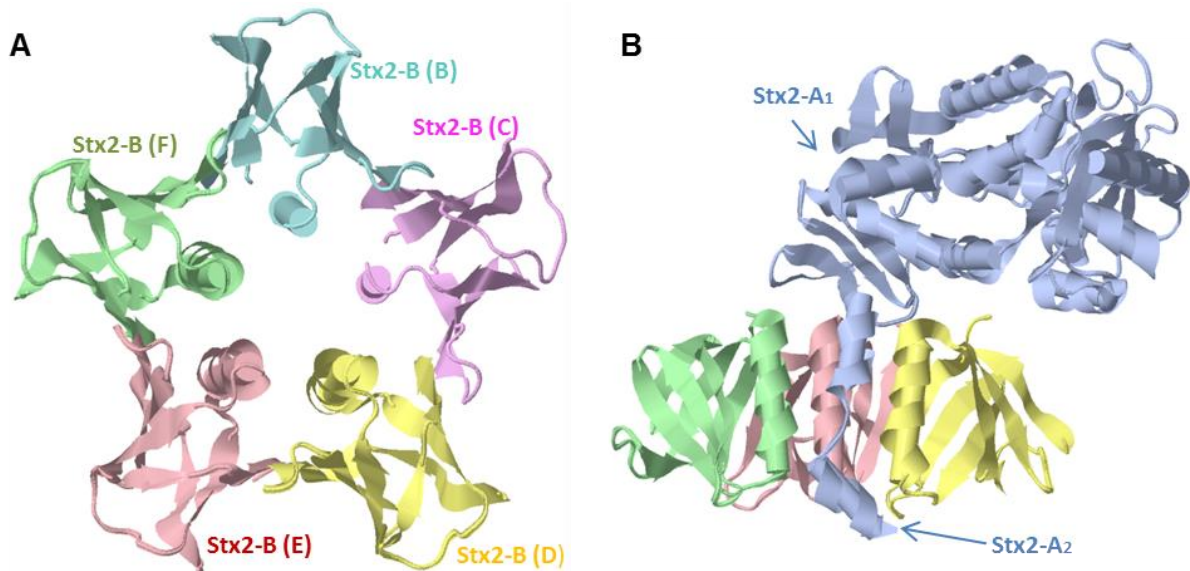


Abb. 4: Shiga Toxin 2 (Stx2) aus *E. coli* O157:H7.

(A) Pentamer der B-Untereinheiten; (B) Stx2 mit der A-Untereinheit in blau und drei B-Untereinheiten (Farbkodierung wie unter (A)), Seitenansicht. Modifiziert nach Fraser *et al.*, 2004, gezeichnet mit Jalview nach PDB-Modell 2GA4.

Im ER wird anschließend mit Hilfe der membranständigen Protease Furin die Disulfidbrücke der Stx A – Untereinheit zwischen den Cysteinmolekülen Cys₂₄₂ und Cys₂₆₁ gespalten (Garred *et al.*, 1995). Die 27,5 kDa große A1-Untereinheit wird dabei in das Cytosol sezerniert und übt hier ihre rRNA N-Glykosidase-Aktivität aus. Dabei spaltet sie Adenin₄₃₂₄ der 28S Ribosomen-rRNA und inhibiert somit die Proteinbiosynthese der Zellen, was schließlich zum Zelltod führen kann. Die durch Stx inhibierte Proteinbiosynthese wurde nicht nur in den Endothelzellen der Niere und der Epithelzellen des Darms beobachtet, sondern auch in Zellen des Zentralnervensystems und in anderen Organen. Auch andere Bakterien des tierischen und menschlichen Darms können betroffen sein, wodurch sich Stx-Produzenten selektive Vorteile verschaffen können (Johannes und Römer, 2010).

In *E. coli* wurden alle *stx*-Gene als Teile von Phagen-genomen identifiziert. Die Stx-Produktion wird durch die Aktivität des Phagen-genoms und die Kopieanzahl dieser Gene bestimmt, wobei durch die Externalisierungsrate selbst ebenfalls die *stx*-Expression kontrolliert werden kann. Zusätzlich kann beispielsweise die *stx1*-Expression durch ansteigende Eisenkonzentrationen unterdrückt und dadurch ebenfalls reguliert werden (Gyles, 2007). Die blutige Diarrhö ist somit eines der klinischen Symptome, die den Stx-Produzenten in erster Linie wichtige Nährstoffe, darunter Eisen sowie weitere Wachstumsfaktoren, verschafft (Johannes und Römer, 2010). Die Inhibierung der Proteinbiosynthese ist zwar die wichtigste Funktion der Stx, aber nicht die einzige. Durch die Bindung an Zelloberflächen und Internalisierung von Stx werden verschiedene Signalkaskaden mit diversen zellulären Funktionen ausgelöst. Darunter zu finden ist die Sekretion der Zytokine (IL-8: Interleukin 8) bei Monozyten und

Makrophagen oder das Auslösen der Apoptose bei Epithelzellen des Darms (Johannes und Römer, 2010).

Für Stx wurde noch keiner der bekannten Sekretionswege für extrazelluläre Bakterienproteine nachgewiesen. Phageninduzierte Lyse wird als der Hauptmechanismus für die Freisetzung von Stx in die bakterielle Umgebung angesehen. Zudem zeigen letzte Erkenntnisse, dass exozytotische Vesikel für den Transport von Stx an die Oberfläche von *E. coli* verantwortlich sind und sich an der Internalisierung durch eukaryotische Zellen beteiligen. Die OMV (*outer membrane vesicles*) werden von Bakterien während der Infektionsphase in hoher Anzahl sezerniert, wobei hier noch der Nachweis des direkten Einflusses auf die Entwicklung von HUS aussteht (Schüller, 2011).

Das α -Hämolsin

Das α -Hämolsin (HlyA) von *E. coli* ist ein Poren-formendes Protein mit einer Größe von ca. 107 kDa. Es besitzt die Fähigkeit, Erythrozyten zu lysieren und die Zellmembran eukaryotischer Zellen zu perforieren. Das *hlyA*-Gen bildet mit weiteren Genen für Hämolsin (*hlyB*, *hlyD* und *hlyC*) ein Gencluster und wurde bislang auf PAI bei UPEC und auf Plasmiden der EHEC-Stämme nachgewiesen. Auf den PAI finden sich die *hly*-Gene zusammen mit den Genclustern für P-Fimbrien und CNF1 (*cytotoxic necrotizing factor 1*). Dies gilt allerdings nicht für plasmidkodierte *hly*-Gene (Hacker, 2000). Die durch den Typ I – Sekretionsweg (vgl. Kapitel 1.3.7) exprimierten HlyB und HlyD unterstützen den Transport von HlyA aus der Bakterienzelle, und HlyC sorgt für die posttranslationale Aktivierung von HlyA (Schmidt *et al.*, 1996). Die direkte Zytotoxizität von HlyA gegenüber Erythrozyten wird mit der Freisetzung von Hämoglobin und der damit leichter zugänglichen Eisenquelle erklärt. Die indirekte Endothelschädigung wird durch die Hly-abhängige Abgabe des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β von Monozyten in Verbindung gebracht (Taneike *et al.*, 2002). Dabei stimuliert IL-1 β die Expression des Stx-Rezeptors Gb3Cer der Zellmembran von Endothelzellen. Auf diese Weise wird die Wirkungsweise von Stx durch HlyA erhöht. Durch membranvesikelassoziierte Sekretion von HlyA durch die EHEC-Stämme wird eine bis zu 80-fach höhere HlyA-Stabilität und dadurch verlängerte hämolytische Aktivität vermittelt (Aldick *et al.*, 2009).

Serinproteasen

Namensgeber für eine Reihe von Proteasen, bei denen sich diese AS im katalytischen Zentrum des Enzyms befindet, ist das Serin. Darunter befinden sich auch die bakteriellen Serinproteasen EspC (Esp: *extracellular serine protease*) der EPEC und EspP der EHEC. EspC wird durch eine 15 kb große PAI im Chromosom von *E. coli* und EspP auf einem Plasmid kodiert. Die Degradierung der Cytoskelett-Proteine, die Spaltung der Immunglobuline und die indirekte Regulation des Komplementsystems zählen zu den wichtigsten Aufgaben dieser Autotransporterproteasen (Hacker und Kaper, 2000). Weiterhin kann EspP das von den Zellen der Magenschleimhaut gebildete Pepsin abbauen und weist weiterhin die Fähigkeit zur Spaltung von Faktor V auf, eines Kofaktors in der Blutgerinnungskaskade des Menschen. Serinproteasen stellen somit wichtige Virulenzfaktoren von EHEC dar, da sie die Blutkoagulation hemmen und Blutungen des Darmes verstärken (Brunner *et al.*, 1997).

Das cytolethal distending toxin (CDT)

Einige gramnegative Bakterien exprimieren das *cytolethal distending toxin* (CDT), ein AB-Toxin aus drei heteromeren Einheiten. CdtB stellt die aktive Untereinheit dar und weist Homologien zu Enzymen der Phosphodiesterase-Familie auf, darunter auch der humanen DNase I. CdtA und CdtC

verursachen die Arrestierung der betroffenen Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus, welche zur Apoptose dieser Zellen führen kann. Allein CdtB, wie es bei *Salmonella enterica typhi* vorgefunden wird, kann auf die betroffenen Zellen toxisch wirken. Epithel-, Endothel- und Fibroblasten-Zelllinien können der Apoptose durch verschiedene Mechanismen entgehen. Die blutbildenden Zellen hingegen reagieren sehr sensitiv auf eine CDT-Behandlung und zeigen nach kurzer Zeit Anzeichen des programmierten Zelltodes (Jinadasa *et al.*, 2011). Gemeinsam exprimierte Gene von CDT wie *cdtA*, *cdtB* und *cdtC* konnten bei *E. coli* chromosomal kodiert nachgewiesen werden. Untersuchungen der benachbarten Bereiche der *cdt*-Sequenzen ergaben aber auch Gene der lambdoiden Phagen, was auf die horizontale Genübertragung von *cdt* der Bakterien hindeutet und die Zugehörigkeit der *cdt* zu GEI andeutet (Janka *et al.*, 2003).

Das vakuolisierende Toxin

Das vakuolisierende Toxin (Vac) wurde zuerst als ein Zytotoxin des gramnegativen Bakteriums *Helicobacter pylori* identifiziert. Diese Bakterien verursachen die Typ-B – Gastritis beim Menschen, welche zu Magengeschwüren oder auch Magenkrebs führen kann. Zwei Gene werden mit der Virulenz von *H. pylori* assoziiert, das *vacA* und *cagE*, wobei *cagE* mit anderen *cag*-Genen zu der Cag-PAI gehört und mithilfe des Typ IV – Sekretionssystems (vgl. Kapitel 1.3.7) in die Epithelzellen transferiert wird (Viala *et al.*, 2004). Bakterien, die das aktive Autotransportertoxin VacA exprimieren, sind gewöhnlich auch *cagA* positiv, wobei das VacA durch das Typ V – Sekretionssystem exprimiert wird (Ogura *et al.*, 2000).

Auch bei EHEC wurde ein Toxin, das EHEC-Vac, mit ähnlicher Auswirkung wie die von VacA identifiziert. Das EHEC-Vac zeigt einen VacA-ähnlichen phänotypischen Mechanismus bei GMVEC (*glomerular microvascular endothelial cell*) und bei HBMEC (*human brain microvascular endothelial cell*). Die betroffenen Zellen zeigen eine starke Vakuolisierung und gehen üblicherweise in den nekrotischen Zustand über (Bielaszewska *et al.*, 2009). Durch diese nekrotische Wirkung und die Fähigkeit der IL-6 – Ausschüttung bei HBMEC, kann das EHEC-Vac ebenfalls zur Pathogenität von *E. coli* beitragen.

1.3.2 Synthese der O-Antigene

Der Synthese von LPS werden insgesamt mehr als 50 Gene zugerechnet, die entweder in großen Clustern oder auch einzeln auf dem *E. coli* – Chromosom gefunden wurden. Dass die Gene für LPS und somit für O-Antigene auf mobilen Einheiten des Genoms von Bakterien liegen müssten, wurde nach einem Ausbruch von *Vibrio cholerae* in Indien und Bangladesch bekannt. Der Austausch eines O1-Antigens gegen das O139-Gen machte den, zuvor meist nur für unter 15-Jährige toxischen *V. cholerae* – Stamm, für Erwachsene ebenso gefährlich (Hacker und Kaper, 2000).

Die Rolle von LPS bei der Adhärenz von Bakterien wurde durch Mutation von einigen dieser Gene gezeigt (Genevaux *et al.*, 1999). Die Inaktivierung des Gens für die Glykosyltransferase des Core-Polysaccharids von LPS (*waaG*) beim uropathogenen Stamm 536 führte zur Entstehung von Bakterienzellen mit dem rauen (*rough*) Phänotyp. Diese verloren dadurch jegliche Fähigkeit, Biofilme auszubilden (Beloin *et al.*, 2006).

In der gleichen Arbeit (Beloin *et al.*, 2006) wurde ebenfalls eine andere Auswirkung der Mutation LPS-assoziiierter Gene gezeigt. Die Inaktivierung des *rfaH*-Gens (vgl. Kapitel 1.5), das einen transkriptionalen Antiterminator kodiert, führte zum Expressionsanstieg der *flu*-Gene, die ein für

Autoaggregation und Biofilmbildung bekanntes Autotransporterprotein, das Antigen43 (Ag43), kodieren (vgl. auch Kapitel 1.3.7). Abgesehen von dieser indirekten Aktivierung der Adhärenzfaktoren bei *E. coli*, können Mutationen oder das Fehlen von LPS zum Aufdecken von adhäsionsvermittelnden Strukturen an der Oberfläche der Bakterien führen. Da Veränderungen in der LPS-Synthese auch Auswirkungen auf Typ1-Pili und Colensäure haben, welche ebenfalls bei der Biofilmbildung eine Rolle spielen, sollte die Rolle der O-Antigene für die Besiedlung neuer Lebensräume der Bakterien nicht unterschätzt werden (Romeo, 2008).

1.3.3 Synthese der K-Antigene

Wie LPS, kann die Veränderung der Kapsel-Synthese eine indirekte Rolle in der Biofilmbildung der Bakterien spielen. An der Oberfläche der Bakterienmembran können Kapseln die Adhäsionsfaktoren verdecken und somit die direkte Adhäsion verhindern. Weiterhin können die Polysaccharide der K-Antigene in die bakterielle Umgebung sezerniert werden, was durch die Instabilität der Phosphodiester-Bindung zwischen dem K-Polysaccharid und dem Anker in der Phospholipidmembran ermöglicht wird (Whitfield, 2006). Diese Instabilität muss ebenfalls bestimmten aber noch unbekannt, Regulationen unterliegen, da die Sezernierung der K-Polysaccharide in großen Mengen stattfindet und eine biofilmunterdrückende Wirkung bei gramnegativen und grampositiven Bakterien hat. In Bezug auf andere Bakterien des menschlichen Darms und der Harnwege können freigesetzte K-Polysaccharide auf das Bakterienwachstum inhibierend wirken und somit den K-Antigen – exprimierenden Bakterien einen Selektionsvorteil verschaffen. Die Verteilung der inzwischen über 80 beschriebenen K-Antigene im Genom der Bakterien ist bislang noch unzureichend aufgeklärt, wobei in der Umgebung der K-Antigen – Sequenzen auch tRNA-Loki gefunden wurden, was ein Indiz für eine PAI-Kodierung der Kapselgene ist (Hacker und Kaper, 2000). Insgesamt sind die genetischen Loki für K-Polysaccharide denen der LPS sehr ähnlich aufgebaut und oft ebenfalls mit der Regulation von RfaH verknüpft (Whitfield, 2006), was eine vergleichbar wichtige Rolle bei der Biofilmbildung, wie die der LPS vermuten lässt.

1.3.4 Serumresistenz

Bei der Serumresistenz von *E. coli* muss zwischen der aktiven und passiven Serumresistenz unterschieden werden. Aktive Resistenzen gegenüber dem Immunsystems des Wirtes gehen von den durch Bakterien sezernierten Proteasen, wie z. B. der IgA-Protease SigA von *Shigella flexneri* (Al-Hasani *et al.*, 2000) oder der StcE-Protease von *E. coli*, aus (Lathem *et al.*, 2004). Bei SigA handelt es sich um ein Autotransporterprotein, das auf der SHE-1 – PAI kodiert ist, welche auch die Gene für die Pic-Serinprotease (*protein involved in intestinal colonization*) beinhaltet. Die Metalloprotease StcE spaltet den C1-INH (C1-Esteraseinhibitor), einen wichtigen Regulator der klassischen Komplementkaskade des Immunsystems, und verhindert somit den Anstieg pro-inflammatorischer Komponenten. Für enterobakterielle Proteasen, wie z. B. Tsh, EspC oder EspP, konnte IgA-degradierende Wirkung nicht nachgewiesen werden. Allerdings konnte für Serinproteasen anderer pathogener Bakterien, wie z. B. der aus *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* oder *Streptococcus pneumoniae*, IgA-Protease – Aktivität gezeigt werden, wobei die Gene für diese Proteasen nicht ausdrücklich einer PAI-Kodierung zugeordnet werden konnten (Hacker und Kaper, 2000). Für die Pic-Serinproteasen von *Shigella flexneri* und *E. coli* konnte nicht nur eine große Homologie in der Sequenz zu der SPATE-Gruppe (Serin Protease Autotransporter von *Enterobacteriaceae*), sondern auch die Kodierung auf der SHE-1 – PAI nachgewiesen werden (Henderson *et al.*, 1999).

Viele weitere bakterielle Toxine können ebenfalls zur aktiven Serumresistenz beitragen. Dazu gehört z. B. das phagenkodierte Leucocidin aus *Staphylococcus aureus*, welches die Granulozyten und Makrophagen zerstören kann. Auch das Exotoxin A (ToxA, virulentes Lektin) aus *Pseudomonas aeruginosa* sowie Perfringolysin O (ein cholesterolabhängiges Zytolysin) aus *Clostridium perfringens* sind mit direkten Angriffen der Wirtszellen assoziiert worden. Die eindeutige Zuordnung zu PAI-Kodierung fehlt aber bislang.

Alle Oberflächen-Antigene können den Bakterien eine passive Serumresistenz verleihen. Die stärksten Immunantworten lösen die O- und K-Antigene aus, deren Kodierung bereits den PAI zugesprochen wurde (vgl. Kapitel 1.3.2 und 1.3.3). Die LPS und die Kapselpolysaccharide stellen zwar selbst Komplement-aktivierende Komponenten dar, können aber durch erhöhte Expression andere Oberflächen-assoziierte Strukturen von *E. coli*, wie Adhäsionsproteine, vor dem Immunsystem verbergen, und damit eine Immunantwort des Wirtes verhindern. Durch horizontalen Gentransfer von LPS- und Kapsel-Genen, welcher durch die Kodierung auf mobilen PAI erleichtert wird, können unter den Stämmen einer oder mehreren Spezies Gene für weitere Oberflächenmoleküle übertragen werden. Durch die Expression dieser neuerhaltenen Gene können Empfängererreger die Aktivierung immunkompetenter Wirtszellen verzögern und den Kolonisationsprozess beschleunigen. Die meisten LPS und Kapsel-Polysaccharide werden während der Biofilmbildung besonders stark exprimiert und sezerniert, was zum Entstehen einer schützenden Matrix für die Bakterien führt. Diese EPS-Hülle (Exopolysaccharid) schützt Bakterien nicht nur vor Angriffen immunantwortauslösender Zellen des Wirtes, sondern vermittelt auch Resistenzen gegen einige Antibiotika, verhindert das Auswaschen wichtiger Enzyme von der Oberfläche der Bakterien und führt zur Akkumulation von Nährstoffen in der Nähe der Bakterien (Romeo, 2008). Die Mobilität der Bakterien vor der Ausbildung Biofilm-assoziiierter Strukturen wird mittels F- und H-Antigenen aufrechterhalten. Die passende Kombination aus Oberflächenantigenen und Proteasen sowie die Anpassung der Expressionsstärke dieser Moleküle entscheiden letztendlich über den Erfolg bakterieller Kolonisation im Wirtsorganismus. Zusammenhänge zwischen der Signalvermittlung und Regulation der Expression dieser Fitness- bzw. Virulenzfaktoren werden im Kapitel 1.5 dargestellt.

1.3.5 Eisenaufnahmesysteme

Für viele enzymatische Reaktionen brauchen Bakterien Eisen als essentiellen Kofaktor (Schaible und Kaufmann, 2005). Da in Wirtsorganismen das verfügbare Eisen meistens durch verschiedene Proteine komplexiert ist (z. B. durch Ferritin, Hämproteine, Transferrin, Laktoferrin), entwickelten Bakterien Strategien, um an Eisen zu gelangen und dieses ebenfalls zu binden. Die apoptotische und nekrotische Zerstörung eukaryotischer Zellen als Folge des bakteriellen Befalls führt auch zur Freisetzung von nicht gebundenem Eisen. Durch die von Bakterien sezernierten Siderophore, niedermolekulare und für Eisen hochaffine Metallchelatoren, nehmen diese dann das freie Eisen aus der Umgebung auf.

Die Gencluster für die Siderophoren Yersiniabactin aus *Yersinia pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* sowie das Aerobactin aus *E. coli* wurden als Komponenten von PAI identifiziert (Buchrieser *et al.*, 1998; Hacker und Kaper, 2000). Das von den Siderophoren komplexierte Eisen wird durch die äußere und die innere Membran der Bakterien von einer Reihe an Proteinen durchgeführt, die nur für diesen Zweck synthetisiert werden. Das Aerobactin von *E. coli* wird z. B. durch FepA (*ferric enterobactin permease*) gebunden und das Eisen ins Periplasma transportiert. Das Eisen wird dann weiter über ein ABC-Transportsystem ins Cytoplasma transferiert. Dieses ABC-Transportsystem (ATP-

binding cassette) wird aus den Proteinen TonB, ExbB sowie ExbD gebildet und durch das Fur-Protein (*ferric uptake repressor*) reguliert (Braun, 2003). Beim *hmsT*-Promoter von *Y. pestis*, dem bei der LPS-Synthese und Biofilmbildung eine wichtige Bedeutung zugesprochen wird, konnte eine Fur-bindende Region identifiziert werden, wodurch eine weitere Verbindung zwischen LPS-Synthese und dem Eisenaufnahmesystem gezeigt wurde. Die *hms*-Gene von *Y. pestis* ähneln stark denen von *pga*-Genen bei *E. coli* oder den *ica*-Genen von *Staphylococcus epidermidis* (Hinnebusch und Erickson, 2008). Diese werden ihrerseits durch c-di-GMP (*cyclic diguanylate guanosine monophosphate*) beeinflusst, deren Rolle in der Biofilmbildung nachgewiesen wurde (Romeo, 2008). Diese Zusammenhänge zwischen der Aufnahme von Nährstoffen oder Spurenelementen durch Bakterien und den regulatorischen Systemen sind sehr komplex und hängen oft mit den örtlichen Bedingungen der zu besiedelnden Bereiche des Wirtes ab. Unterschiedliche und sich verändernde Bedingungen werden von Bakterien wahrgenommen und dadurch entsprechende Reaktionen, z. B. Veränderungen der Regulation diverser Oberflächen-assoziiierter Komponenten, ausgelöst.

1.3.6 Adhäsine

Adhäsine ermöglichen es den Bakterien, an bestimmte Strukturen im Wirtorganismus anzuhaften und erschweren dadurch den Abtransport, z. B. durch den Harnfluss oder die natürliche Darmperistaltik des Wirtes. Adhäsine spielen somit eine zentrale Rolle bezüglich der Kolonisation betroffener Biotope, die unter Umständen zu einer bakteriellen Infektion führen kann. Die Expression von Adhäsinen ist jedoch von den Umgebungsbedingungen im oder auch außerhalb des Wirts abhängig und kann in Art und Stärke erheblich variieren. Grundsätzlich wird zwischen fimbriellen und nichtfimbriellen Adhäsinen unterschieden.

Zu den fimbriellen Adhäsinen zählen die P- bzw. die S-Fimbrien sowie *Curli*, aber auch bestimmten F-Pili werden Adhäsionseigenschaften beigemessen (Ghigo, 2001). Die uropathogenen P-Fimbrien (*pap*, *prs*) sind auf den UPEC-spezifischen PAI kodiert und mit den Genen für die Toxine Hämolyysin (*hly*) und CNF1 (*cytotoxic necrotizing factor 1*) verlinkt, was auf eine gemeinsame Evolution hindeutet. S-Fimbrien der UPEC unterscheiden sich von den P-Fimbrien in der Erkennung von sialylierten Rezeptoren an Epithelzellen der Harnwege, wie auch bestimmter Gehirnzellen. Die Gene für S-Fimbrien (*sfa*) wurden bei Salmonella-Stämmen auf den gleichen PAI identifiziert, welche auch die Gene für das Eisenaufnahmesystem kodieren, was ebenfalls als ein Zeichen gemeinsamer Regulation gedeutet wird (Hacker und Kaper, 2000). Die Expression von FimH, einer Typ 1 – Fimbrie, vermittelt nicht nur die Adhäsion an abiotische Oberflächen (Pratt und Kolter, 1998), sondern verlangsamt die Expression von verschiedenen OMP (*outer membrane proteins*), wie OmpA, OmpX, Slp oder TolC (Otto *et al.*, 2001). Weiterhin wird bei abfallenden Konzentrationen von OmpX ein Expressionsanstieg der EPS-Strukturen beobachtet (Otto und Hermansson, 2004). Zusammengefasst weisen diese Beobachtungen darauf hin, dass nach dem fimbriellen Oberflächenkontakt eine Anpassung der Bakterien an die Oberfläche ausgelöst wird. Dieses äußert sich in der verstärkten Ausbildung der EPS-Strukturen und somit dem Ausbau eines Biofilms.

Intimin stellt den wichtigsten nicht-fimbriellen Adhäsionsfaktor der EPEC sowie der EHEC dar und wird durch das Gen *eae* auf der LEE-PAI (*locus of enterocyte effacement*) kodiert. Das ca. 100 kDa große OM-Protein wird durch den Typ III – Sekretionsweg (Kapitel 1.3.7) an die Oberfläche von *E. coli* transportiert und sorgt für die Bindung der Bakterien an die Darmmukosa des Wirts. Intimin nutzt dabei das ebenfalls auf der LEE-PAI kodierte Rezeptor-Protein Tir bzw. HP-90, welches in die Oberfläche der befallenen tierischen Zellen eingebaut wird und somit die Adhäsion durch Intimin

ermöglicht (Kenny *et al.*, 1997). Dieser Eingriff ruft in den betroffenen Epithelzellen die A/E-Läsion (A/E: *attaching and effacing*) hervor, die durch Ausbildung typischer zellulärer Ausstülpungen gekennzeichnet ist. EspA, EspB und EspD sind ebenfalls an der Ausbildung von A/E-Läsionen beteiligt, wobei die genauen Wechselwirkungen und Signalinduktionskaskaden bisher nicht geklärt werden konnten (Phillips *et al.*, 2000). Als sicher gilt die Beteiligung der LEE-kodierten Gene an der Veränderung im Aktin-Cytoskelett und der Adhärenz von Bakterien an das Darmepithel.

Die Kodierung von Adhärenzfaktoren auf PAI bei gramnegativen Bakterien muss nicht unbedingt mit einer Adhäsion an Epithelzellen einhergehen, wie es anhand von TCP (*toxin coregulated pilus*) aus *Vibrio cholerae* gezeigt werden konnte. TCP ist ein Typ 4 Pilus, welcher auf der Vibrio-PAI (VPI) kodiert ist und einen essenziellen Kolonisationsfaktor dieser Bakterien darstellt. Zwar ist TCP an der Kolonisation von *V. cholerae* in intestinalen Systemen beteiligt (Kaper *et al.*, 1995), wurde aber nie als Adhäsionsfaktor für die Bindung an Epithelzellen nachgewiesen. Während z. B. das AcfA-Protein (*accessory colonization factor*), welches auf der gleichen VPI kodiert ist, eine Rolle in der Chemotaxis spielt und an der intestinalen Kolonisation beteiligt ist, vermittelt das TCP die Interaktion zwischen den Bakterien selbst und ermöglicht damit eine Akkumulation der Bakterienmasse an den Kolonisationsorten.

Weitere wichtige Adhäsine gramnegativer Bakterien sind z. B. das YadA aus *Y. enterocolitica* oder AIDA sowie das Antigen43 aus *E. coli*. Diese Proteine werden durch das Typ V – Sekretionssystem auf bakteriellen Oberflächen exprimiert und im Folgenden näher erläutert.

1.3.7 Bakterielle Sekretionssysteme

Mindestens fünf unterschiedliche Sekretionswege wurden in den letzten Jahren bei gramnegativen Bakterien entdeckt, die unabhängig voneinander für den Transport verschiedener Moleküle durch die inneren und äußeren Membranen verantwortlich sind. Diese werden in die Gruppen I bis V unterteilt, wobei Typ IV und V sich sehr ähneln (vgl. auch **Abb. 5** und **Abb. 6**). Mittlerweile hat sich Typ V als der Sekretionsweg für Autotransporter erwiesen (Henderson *et al.*, 2004). Die fünf Sekretionswege sind für den Transport verschiedener Virulenzfaktoren an die Oberfläche der Bakterienzellen und in einigen Fällen sogar für die direkte Translokation in die Wirtszellen erforderlich.

Die Sekretionswege der Typen II, IV und V sind auf die Proteine des *sec*-Systems angewiesen. Dazu gehören die ATPase SecA, integrale Membranproteine (SecD, SecE, SecF, SecG und SecY), eine Signalpeptidase und das cytoplasmatische Chaperon SecB. Für die Erkennung durch das *sec*-System benötigen die zu sekretierenden Proteine eine 20 bis 30 Aminosäuren lange Signalsequenz am N-terminalen Ende, welche durch die Signalpeptidase vor der endgültigen Sekretion abgespalten wird (Henderson *et al.*, 2004). Diese Signalsequenzen dienen als Ribosom-zu-Membran-Adressen der zu sekretierenden Proteine (Chatzi *et al.*, 2013). Die Sekretionstypen III und IV sind meistens auf PAI kodiert, wobei die Typen I, II und V PAI-assoziiert nachgewiesen wurden (Hacker und Kaper, 2000).

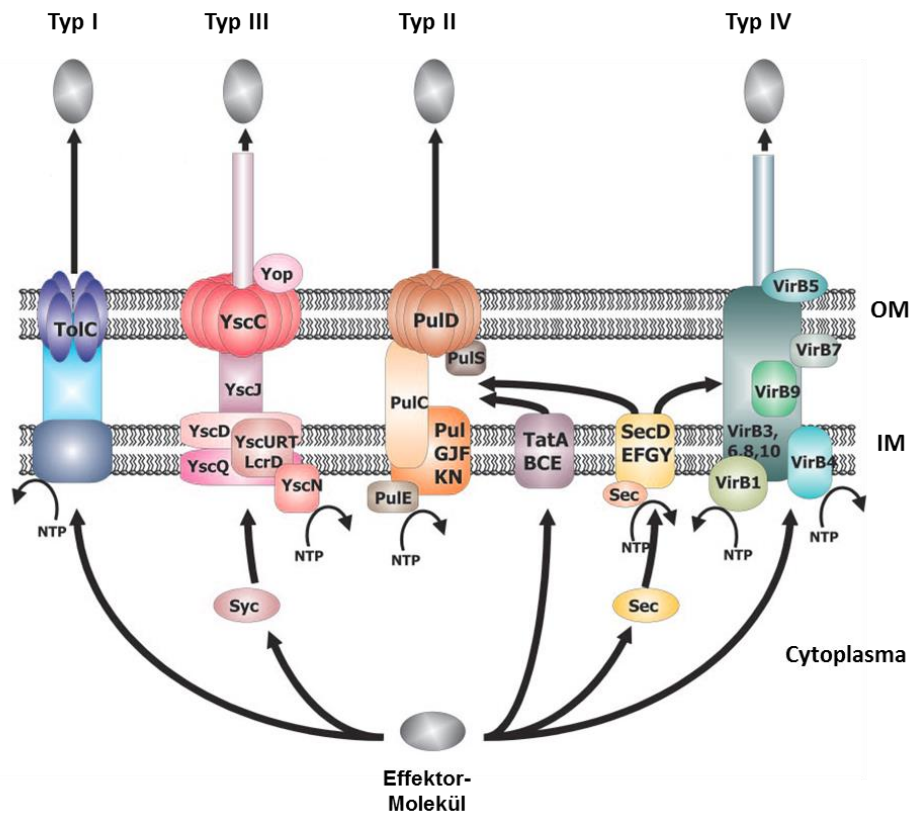


Abb. 5: Sekretionssysteme I bis IV mit den jeweiligen Komponenten aus Beispielorganismen. Modifiziert nach Henderson *et al.*, 2004.

Typ I – Sekretionssystem

Als erstes Protein des Typ I – Sekretionsweges (**Abb. 5**) wurde das *E. coli* – Hämolyysin (HlyA) beschrieben (vgl. auch Kapitel 1.3.1). Das Gen für HlyA befindet sich auf den PAI der meisten UPEC- sowie plasmidkodiert bei den EHEC-Stämmen. Drei Hilfsproteine werden bei diesem Sekretionsweg vom Bakterium eingesetzt: eine energiebereitstellende ATPase (HlyB für das *E. coli* – Hämolyysin), eine poren-formende Einheit für den Transport innerhalb des Periplasmas (HlyD) und ein OMP für den Transport durch die äußere Membran (TolC). Die zu sekretierenden Proteine besitzen eine spezifische C-terminale Signalsequenz, die mit der ATPase interagieren und somit die Synthese der Proteine des Sekretionsweges induzieren kann. Nach der Erkennung durch die ATPase wird die Interaktion zwischen dem MFP (*membrane fusion protein*), hier HlyD, sowie der Einheit in der äußeren Membran (TolC) gestartet und das zu sekretierende Protein zur Zelloberfläche transportiert. Nach der Sekretion wird die Verbindung zwischen HlyD und TolC aufgelöst und erst bei der Aktivierung von HlyB wieder aufgebaut.

Die Kristallstrukturanalyse von TolC hat gezeigt, dass es sich um ein Trimer handelt, welches insgesamt mit 12 antiparallelen β -Faltblättern eine zylindrische Pore in der äußeren Bakterienmembran ausbildet. In das Periplasma erstreckt sich eine, für Porine unübliche, α -Helix-Struktur von TolC, die ebenfalls eine zylindrische Pore darstellt. Da HlyD ebenfalls eine trimerische Struktur ausbildet, wird angenommen, dass nach der HlyB-Aktivierung die Monomere von HlyD und TolC so nah aneinander kommen, dass die Sekretionsproteine leicht durch die gemeinsame große Pore hindurch transportiert werden können (Hacker und Kaper, 2000; Henderson *et al.*, 2004).

Typ II – Sekretionssystem

Der Typ II – Sekretionsweg wird oft als Beispiel für den *sec*-System – abhängigen Transportweg genannt, wobei die Anzahl der Komponenten nach der Sekretion ins Periplasma von dem jeweiligen Organismus abhängt und zwischen 12 und 16 verschiedene Proteine aufweisen kann. Die Typ II – Sekretion wurde als erstes in *Klebsiella oxytoca* für PulA (Pullulanase), ein Stärke-hydrolysierendes Lipoprotein, beschrieben, wodurch auch die Namensgebung für einige der beteiligten Proteine zustande kommt. Das in der äußeren Membran porenformende Protein PulD ist für den letzten Schritt in der Sekretion der Proteine, den Transport auf die bakterielle Oberfläche, zuständig. Sowohl PulD, als auch andere Proteine des Typ II – Sekretionsweges, weisen Homologien zu einigen Proteinen anderer Sekretionswege auf, wie z. B. das YscC beim Typ III – Transportweg. Auch weitere Komponenten des Typ III – Weges, welche z. B. in die Sekretion von Typ 4 – Pili eingebunden sind, sind den Proteinen des Typ II – Weges sehr ähnlich. Der Unterschied dieser Sekretionswege liegt in den zu transportierenden Proteinen und der Beteiligung des *sec*-Systems, für welches die Initialproteine eine N-terminale Signalsequenz aufweisen müssen (Henderson *et al.*, 2004).

Der Typ II – Sekretionsweg ist meistens mit der Sekretion von Abbauenzymen verschiedener Bakterien in Verbindung gebracht worden. Die Zellulasen und Pektinasen von *Erwinia*, die Phospholipase C sowie das Toxin A von *Pseudomonas aeruginosa*, die Amylasen und Proteasen von *Aeromonas hydrophila* und die Chitinase sowie das Cholera-Toxin von *Vibrio cholerae* gehören dazu. Die Gene für Proteine des Typ II – Sekretionsweges sind entweder als Cluster auf mobilen genetischen Elementen oder fest im Kernchromosom kodiert vorgefunden worden. Die Gene für die zu sekretierenden Proteine sind in einigen Fällen in der Nähe dieser Cluster gefunden worden, aber auch auf weit entfernten Stellen des Chromosoms und sogar auf anderen Chromosomen, wie z. B. bei *V. cholerae* (Hacker und Kaper, 2000).

Typ III – Sekretionssystem

Die Gene für viele Komponenten des Typ III – Sekretionssystems wurden auf PAI von verschiedenen pathogenen gramnegativen Bakterien entdeckt. Sie sind hochkonserviert und bilden den größten Teil der Gene, die überhaupt auf PAI vorgefunden wurden (Hacker und Kaper, 2000). Dabei sind die durch diesen Sekretionsweg transportierten Proteine sehr unterschiedlich und weisen keine konservierten Signalsequenzen auf, was auf deren Unabhängigkeit von dem *sec*-System hindeutet. Dennoch gibt es Hinweise, dass die ersten 20 N-terminalen Aminosäuren der Effektorproteine eine Rolle bei der Adressierung der Proteine spielen könnten (Hueck, 1998).

Die meisten der ca. 20 Proteine, die an diesem Sekretionsweg beteiligt sind, werden an die innere Membran der Bakterien gebunden. Die restlichen Komponenten bilden zwischen der inneren und der äußeren Membran eine Art Nadel, die in den extrazellulären Raum hinein ragt. Belegt wurde diese Struktur mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen von *S. enterica* und *S. flexneri*. Genau dieser Fortsatz wird von den Bakterien für das Einschleusen einiger Sekretionsfaktoren in die eukaryotischen Zellen eingesetzt. Dieser Prozess wird bei einem Teil der sekretierten Proteine erst durch den Kontakt zu den Wirtszellen ausgelöst, wobei zu beachten ist, dass nicht jede Typ III – Sekretion kontaktabhängig ist. Viele Virulenzfaktoren werden auf diese Weise durch die Membranen der Bakterien transportiert, wie z. B. einige LEE-PAI – kodierte Proteine (EspA, EspB, EspD, Tir). Dabei sind nicht alle Virulenzfaktoren selbst auf den PAI für die Typ III – Sekretion kodiert, sondern können sich auch außerhalb dieser Gene befinden und trotzdem diesen Sekretionsweg nutzen (Hacker und Kaper, 2000).

Typ IV – Sekretionssystem

Dieser Sekretionsweg wurde als erstes in *Agrobacterium tumefaciens* entdeckt. Durch die Typ IV – Sekretion schleusen diese Bakterien die T-DNA sowie weitere, für die Ausbildung von Wurzelhalsgallentumoren (*crown gall tumors*) notwendige Proteine in die Pflanzenzellen hinein. Andere Bakterien nutzen dieses Sekretionssystem ebenfalls zu konjugativen Zwecken, und bei einigen davon wird die Virulenz erst in Verbindung mit diesem System vollständig ausgebildet, wie z. B. bei *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila*, *Brucella suis*, *Bartonella henselae* sowie *Helicobacter pylori*. Zwei unterschiedliche Subtypen dieses Sekretionssystems werden voneinander unterschieden. Das Typ IVa – System beinhaltet Komponenten, wie sie *A. tumefaciens*, und Typ IVb, wie sie *Shigella flexneri* einsetzen, wobei beide Subtypen die Unterstützung des *sec*-Systems benötigen. Die wesentlichen Unterschiede werden wieder auf die Art der zu sezernierenden Produkte zurückgeführt (Henderson *et al.*, 2004).

Wie beim Typ III, sind auch viele Gene des Typ IV – Sekretionssystems auf PAI kodiert. Beim *A. tumefaciens* ist es z. B. ein ca. 200 kb großes Ti-Plasmid, welches alle notwendigen Gene für die Sekretion, die Konjugation und die Regulation der T-DNA, welche ebenfalls auf dem Ti-Plasmid kodiert ist, in sich trägt. Mehr als 20 Proteine sind an dem Transport aller erforderlichen Komponenten für den Aufbau dieser bakteriellen Virulenz beteiligt. Viele der Vir-Proteine des Typ IV – Sekretionsweges von *A. tumefaciens* weisen zu den Sekretionsproteinen anderer pathogener Bakterien hohe Ähnlichkeiten auf, wie z. B. zu den Cag-PAI – Komponenten von *H. pylori* oder den Ptl-Proteinen aus *B. pertussis*. Dabei wird von *B. pertussis* das Pertussis Toxin, ein AB₅-Toxin, nicht in die tierischen Zellen injiziert, sondern in den extrazellulären Raum sezerniert. Erst durch die Anbindung an seinen Rezeptor auf der Wirtszelle entfaltet es seine virulente Wirkung.

Die zu sekretierenden Moleküle unterscheiden sich also sowohl hinsichtlich ihres Kodierungsortes als auch in der Wirkung nach der Sekretion. Jedoch sind fast alle diese Komponenten virulent für die Wirtszellen oder spielen eine wichtige Rolle bei dem Transport weiterer Virulenzfaktoren in die Umgebung von Bakterien.

Typ V – Sekretionssystem

Das Typ V – Sekretionssystem (**Abb. 6**) ist im Vergleich zu den anderen Sekretionssystemen sehr einfach aufgebaut. Dies ist von den Autotransporterfähigkeiten der Effektormoleküle abhängig, welche über diesen Transportweg zur bakteriellen Außenmembran gebracht werden. Diese Autotransporter werden durch das *sec*-System und damit einhergehender Abspaltung der Signalsequenz in das Periplasma exportiert. Das C-terminale Ende der Autotransporter bildet von der Periplasmaseite ein β -Barrel (β -Fass) in der äußeren Membran und dient als eine Art Pore für die Sekretion des restlichen Peptides in den extrazellulären Raum. Einige Autotransporterproteine verbleiben danach auf der Oberfläche der Bakterien, wohingegen andere am Ansatz des β -Barrels gespalten werden und in die Umgebung der Bakterien sezerniert werden. Dabei liegen die Gene für das zu sekretierende Protein sowie die Gene für den Sekretionsapparat selbst meistens innerhalb einer ORF (*open reading frame*) nah beieinander und bilden eine PAI, wie z. B. im Falle des EspC von EPEC, die IgA-Protease von *Neisseria gonorrhoeae* oder SigA sowie Pic von *Shigella flexneri*, die sogar beide auf der gleichen PAI (SHI-1) kodiert sind (Hacker und Kaper, 2000).

Charakteristisch für den Aufbau der Autotransporter ist eine N-terminale Signalsequenz, die von dem *sec*-System erkannt und abgespalten wird, die *Passenger* Domäne (α -Domäne, N-Domäne), die

verschiedene Funktionen des jeweiligen Autotransporters kodiert, sowie die Translokationsdomäne (β -Domäne, Helferdomäne, Autotransporterdomäne) am C-terminalen Ende, welche die Translokation der *Passenger* Domäne durch die äußere Bakterienmembran durchführt. Die C-terminale β -Domäne beinhaltet bei einer Reihe von Autotransportern eine Linkregion, bestehend aus α -Helizes, die mit dem β -Barrel verbunden sind. Drei Subtypen dieses Sekretionsweges werden voneinander unterschieden: Typ Va, Vb und Vc (vgl. **Abb. 6**).

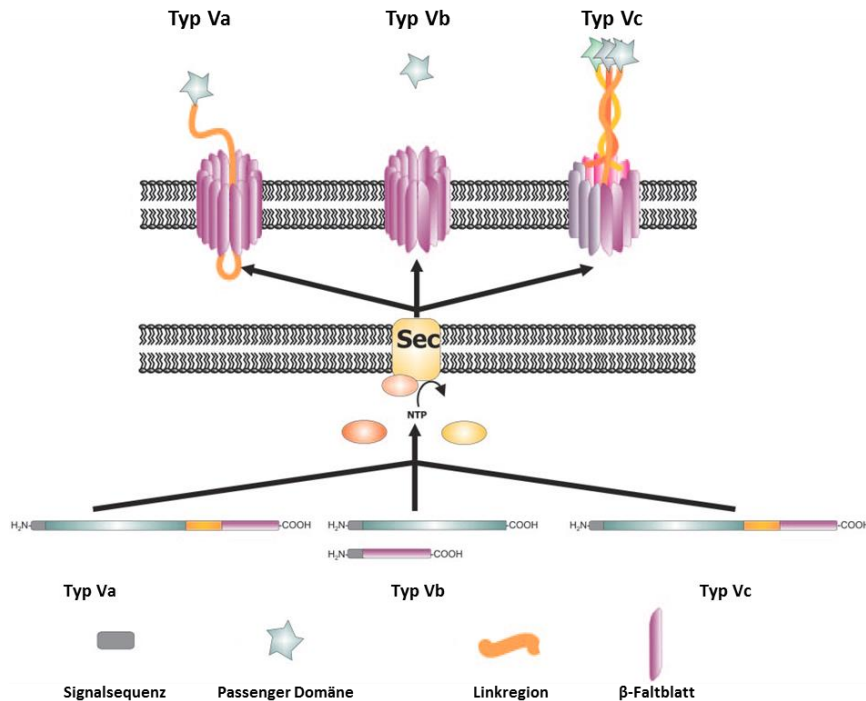


Abb. 6: Typ V – Sekretionsweg mit den Subtypen Va, Vb und Vc. Modifiziert nach Henderson *et al.*, 2004.

Das wesentliche Unterscheidungsmerkmal dieser drei Subtypen ist der letzte Schritt in der Sezernierung des Proteins. Bei Typ Va, wie es z. B. für IgA1-Protease von *N. gonorrhoeae* beschrieben wurde, bildet das C-terminale Ende ein eigenständiges β -Barrel für die Sekretion der *Passenger* Domäne. Für Typ Vc muss das β -Barrel aus drei homologen Präproteinen gebildet werden, um den Transport der *Passenger* Domäne zu gewährleisten. Beim Typ Vb liegen die *Passenger*- und die Translokationsdomäne auf zwei verschiedenen Präproteinen, die beide über ähnliche Signalsequenzen verfügen (Henderson *et al.*, 2004).

Die Sequenzen an den C-terminalen Enden verschiedener Autotransporter können sich zwar stark unterscheiden; durch bioinformatische Analysen konnten aber starke Ähnlichkeiten in dem gebildeten β -Barrel vorgefunden werden. Die Anzahl der β -Faltblätter kann sich in verschiedenen Subtypen dieser Sekretionsklasse ebenfalls unterscheiden; die Synthese der antiparallelen Stränge ist aber bei allen Autotransportern generell sehr ähnlich. Während die Translokationseinheiten bei den verschiedenen Subtypen des Typ V – Sekretionsweges hohe Homologien im Aufbau aufweisen, unterscheiden sich die *Passenger* Domänen sehr stark, sowohl in der Sequenz, als auch in der Funktion der sezernierten Proteine. Allen bisher entdeckten *Passenger* Domänen konnte eine Beteiligung an bestimmten Virulenzen der Trägerbakterien zugeschrieben werden, wobei enzymatische Aktivitäten (Proteasen, Lipasen, Esterasen) und Adhäsionsfunktionen sowie die Produktion von Immunmodulatoren, Toxinen und Proteinen der bakteriellen Motilität nachgewiesen wurden. Bei einigen Autotransportern konnte eine hohe Homologie der *Passenger* Domäne zu

Funktionseinheiten ähnlich agierender Proteine nachgewiesen werden, wie z. B. der *Passenger* Domäne der IgA1-Protease von *N. gonorrhoeae* und des Serinproteaseautotransporters (SPATE) von *E. coli*. Evolutionär betrachtet gehören diese *Passenger* Domänen zur gleichen Familie der Serinproteasen, wobei die Translokationsdomänen unterschiedlichen Ursprungs zu sein scheinen. Diese und andere Daten deuten auf horizontalen Gentransfer der *Passenger* Domänen einerseits, aber auch auf vielfältige Fusionen mit anderen Genen hin, wie die Verbindungen der Signalsequenzen, der *Passenger* Domänen und der Translokationsdomänen zu einer funktionierenden Einheit aufweisen. Aufgrund der phylogenetischen Daten der Autotransporter-exprimierenden Bakterien werden die Autotransporter in elf verschiedene Cluster unterteilt, wobei den einzelnen Clustern nicht nur Proteine des gleichen Ursprungs, sondern auch mit ähnlichen Funktionen zugeordnet wurden (Yen *et al.*, 2002).

Kontrovers diskutiert wird der Transportweg der *Passenger* Domänen zwischen dem Periplasma und dem extrazellulären Raum. Die Fragen ohne eindeutige Antworten bleiben: wann werden die AS-Sequenzen zum fertigen Protein gefaltet, wird erst das N-terminale Ende oder ein Teil der *Passenger* Domäne durch das β -Barrel transportiert und werden die monomeren Einheiten trimerischer Autotransporter des Typ Vc – Sekretionsweges im Periplasma oder erst außerhalb der Zelle zum Trimer gefaltet? Die Porengröße innerhalb des β -Barrels beträgt ca. 2 nm und ist somit eigentlich zu klein um endgültig gefaltete Proteine hindurchzulassen. Andererseits fehlen den meisten *Passenger* Domänen der Autotransporter Cysteinreste und somit Disulfidbrücken, welche auch weit entfernte Regionen einer AS-Kette zusammenbringen würden und somit die Oberflächen der entstandenen Tertiärstrukturen erhöhen würden (Henderson *et al.*, 2004).

Untersuchungen anderer OMP von Bakterien haben gezeigt, dass diese erst durch den Einsatz verschiedener Transport- und Faltungshelfer auf die Membranoberfläche der Bakterien transferiert werden. Das OmpA, ein Porin von *E. coli*, dem kürzlich auch eine Bedeutung in der Biofilmbildung zugesprochen wurde (Ma und Wood, 2009), wird durch das Chaperon Skp und den Bam-Komplex (auch Omp85 oder YaeT) in die äußere Bakterienmembran eingebaut. Der Bam-vermittelte Einbau des β -Barrels in die äußere Membran konnte daraufhin für Autotransporter von *E. coli* ebenfalls nachgewiesen werden (Ieva und Bernstein, 2009). Zu dem Bam-Komplex gehören das integrale Membranprotein BamA sowie mehrere Lipoproteine (BamB bis BamE). Dabei zeigt BamA große Ähnlichkeiten zu Proteinen mit gleichen Funktionen aus anderen Bakterien, Mitochondrien und Chloroplasten, weshalb diese zu der Bam-Superfamilie zusammengefasst werden.

Obwohl der Einbau der β -Barrel durch den Bam-Komplex für viele Autotransporter nachgewiesen wurde, wird über die Beteiligung von BamA an der Sekretion der *Passenger* Domäne kontrovers diskutiert (Ieva und Bernstein, 2009, Mikula *et al.*, 2012). Die verschiedenen Versionen der Translokation von *Passenger* Domänen sind in **Abb. 7** dargestellt. Dabei ist die Frage, ob die *Passenger* Domäne mit dem N-terminalen oder dem C-terminalen Ende zuerst durch die Pore des β -Barrels hindurch kommt, immer noch offen.

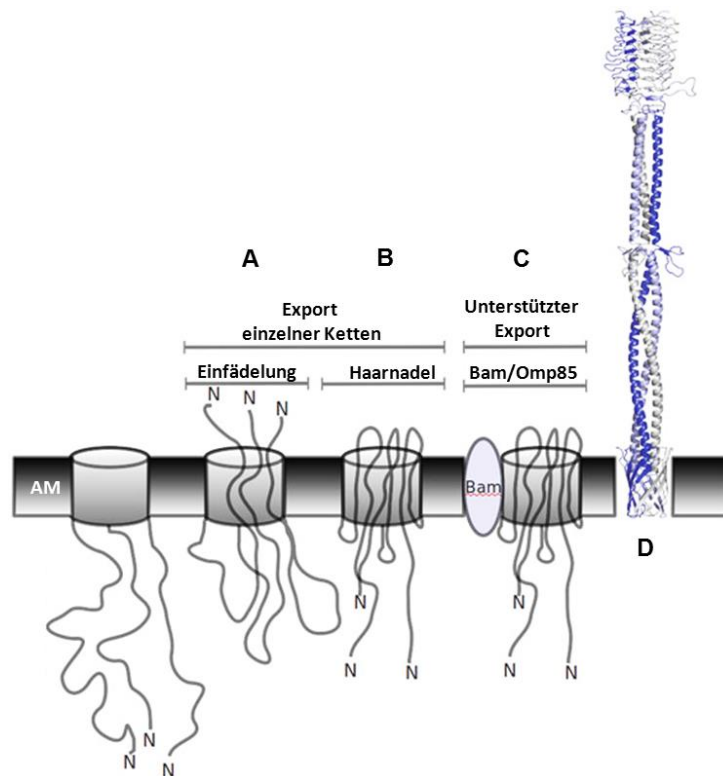


Abb. 7: Mögliche Transportwege der *Passenger* Domänen von Autotransportern durch die äußere Bakterienmembran am Beispiel eines trimerischen Autotransporter Adhäsins (TAA). Modifiziert nach Łyskowski *et al.*, 2011.

Vergleich der Protein-Translokation an der äußeren Membran (AM) von Bakterien durch den Export einzelner Ketten (A und B) und den Export des Proteinkomplexes mittels Bam (C). (A) Einfädung einzelner AS-Ketten mit dem N-terminalen Ende voran; (B) Haarnadel-Modell mit C-terminalen Aminosäuren der *Passenger* Domäne voran; (C) Bam/Omp85-Komplex verbindet die einzelnen AS-Ketten im Periplasma zum Proteinkomplex und exportiert diese dann durch die AM; (D) fertig gefaltetes TAA-Protein.

AIDA-I

AIDA-I (*adhesin involved in diffuse adherence*) gehört zu der größten Gruppe der Autotransporter, derer Repräsentanten schon in verschiedenen Bakterienspezies entdeckt wurden (*E. coli*, *S. enterica*, *Y. pestis*, *N. meningitidis*, *Pasteurella multocida*, *A. tumefaciens*, *Mesorhizobium loti*, *Brucella melitensis*). Der AIDA-Familie werden mittlerweile über 50 Proteine zugeordnet, unter anderem das IcsA von *S. flexneri*, ein wichtiger Mobilitätsfaktor innerhalb der Wirtszellen, oder das Antigen43 aus *E. coli*, welches verstärkt an der Biofilmbildung beteiligt ist. Aber auch außerhalb der AIDA-Familie findet man Proteine, die andere Sekretionsmechanismen durchlaufen als die Autotransporter, welche aber große Homologien zu den *Passenger* Domänen der AIDA-Mitglieder aufweisen, wie z. B. das FHA aus *B. pertussis* oder RtxA aus *V. cholerae* (Henderson *et al.*, 2004).

Unter diffuser Adhärenz versteht man die verstreute Adhäsion der Bakterienzellen auf HeLa-Zellen (permanente Zelllinie aus Gebärmutterhalskrebszellen). Im Vergleich zur diffusen Adhärenz werden zwei weitere phänotypische Adhärenzmuster der *E. coli* – Stämme unterschieden: die lokalisierte Adhärenz (*localized pattern*) in bestimmten Regionen auf den HeLa-Zellen und die enteroaggregative Adhärenz, die sich in der Verklumpung der Bakterien zeigt (Jallat *et al.*, 1993). Dabei weisen Bakterien mit diesen verschiedenen Adhärenzmustern auch unterschiedliche Adhäsions- und Virulenzfaktoren auf und zeigen unterschiedliche Kolonisationseigenschaften und Pathogenitätsverläufe bei den betroffenen tierischen Zellen (Nataro und Kaper, 1998).

Das AIDA-I enteropathogener *E. coli* besteht aus der 79,5 kDa großen *Passenger* Domäne und der 47,5 kDa großen β -Domäne. Nach der Sekretion sind diese beiden Domänen nicht kovalent miteinander verknüpft, und die *Passenger* Domäne kann durch Erhitzen der Zellen auf 60 °C von der Zelloberfläche abgetrennt werden. Aufreinigungsversuche von AIDA-I mittels Gelfiltration zeigten, dass die *Passenger* Domäne in Fraktionen mit 450 bis 600 kDa großen Proteinen eluiert wird, was auf eine Oligomerisierung zu pentameren oder hexameren Strukturen hinweist. Sowohl AIDA-I als auch das ähnliche, Adhäsion- und Invasions- der Epithelzellen vermittelnde TibA von *E. coli*, sind glykosyliert, unterscheiden sich aber in der Art und dem Ort der Glykosylierung und dadurch auch in den Rezeptoren (gp119 für AIDA-I, ein Oberflächenprotein der intestinalen Epithelzellen) der betroffenen tierischen Zellen (Laarmann und Schmidt, 2003). Das Zusammenspiel von AIDA-I, den F18-Pili und dem Stx2e konnte bei einer Ferkelinfektion durch ETEC-Stämme nachgewiesen werden (Niewerth *et al.*, 2001). AIDA-I und TibA sind häufig an Infektionen durch *E. coli* beteiligt und tragen nicht unwesentlich zur Pathogenität der Trägerstämme bei.

Antigen43

Das aus der gleichen AIDA-Familie stammende Antigen43 (Ag43) wird aus zwei Präproteinen, α^{43} und β^{43} , zu der *Passenger*- (50 kDa) und der β -Domäne (53 kDa) zusammengefügt, wonach es eine 75%ige Homologie in der AS-Sequenz zu AIDA-I und TibA aufweist. Die beiden Proteindomänen sind ähnlich wie bei AIDA-I nicht kovalent miteinander verknüpft und können durch Hitzebehandlung der Bakterienzellen bei 60 °C voneinander getrennt werden. Das nicht-glykosylierte und unter allen Trägerorganismen sehr stark konservierte *agn43* (*flu*) verursacht, im Vergleich zu *agn43*⁻ – Zellen, eine flache, zerklüftete und irreguläre Morphologie der entstandenen Kolonien, welche eher zirkuläre und glänzende Kolonien ausbilden und durch einen hohen Gehalt an LPS zu erklären sind (Henderson *et al.*, 1997; Kjaergaard *et al.*, 2000a).

Im Unterschied zu AIDA-I verleiht Ag43 den exprimierenden Bakterien eher eine autoaggregative Funktion und ist aktiv an der Biofilmbildung beteiligt. Der durch Ag43 vermittelte Zell-Zell-Kontakt führt zu einer schnellen Verklumpung der Bakterien in Flüssigmedien und dem dadurch ausgelösten schnellen Absinken der Bakterien auf die Gefäßböden. Diese Bakterienklumpen können als Ausgangsstadium für die Ausbildung der Biofilmmatrix angesehen werden. Auch verschiedene *agn43*⁺ – Spezies können sich durch die *Passenger* Domänen von Ag43 zusammenlagern und somit gemischte Biofilmformationen ausbilden, wie es in Versuchen mit *agn43*⁺ *E. coli* und *P. aeruginosa* gezeigt werden konnte (Kjaergaard *et al.*, 2000b). Die Aggregationsmuster der Ag43-vermittelten Bindung der Bakterien sind unterschiedlich, was auf eine variable Oberflächenbeschaffenheit der verschiedenen Bakterienspezies zurückzuführen ist. Im Vergleich zu Aggregationsmustern von *agn43*⁺ bei *E. coli* oder *Pseudomonas fluorescens*, welche eine klumpenartige Struktur aufweisen, bilden *agn43*⁺ von *Klebsiella pneumoniae* kettenartige Aggregate, die nicht so schnell zum Absinken von Bakterien führen, wie z. B. in *agn43*⁺ *E. coli* (Kjaergaard *et al.*, 2000a, Kjaergaard *et al.*, 2000b).

Mutationsexperimente an Regulationsregionen auf dem *E. coli* – Chromosom zeigten, dass die Expression von Ag43 durch OxyR von *E. coli*, einem Abwehrprotein gegen oxidativen Stress, reprimiert wird und durch das Dam-Protein, einem DNA-methylierenden Protein, hochreguliert wird. Das OxyR hat sich als ein Repressor des *agn43*-Promoters erwiesen. Die DNA-Methylierung vor dem *agn43*-Promoter durch Dam verhindert die Anbindung von OxyR und begünstigt somit die Transkription von *agn43* (Schembri und Klemm, 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression der Typ 1 – Fimbrien zu Veränderungen der Ag43-vermittelten Phänotypen führt,

wobei sich diese Regulation nicht auf der genetischen Ebene vollzieht, sondern durch die sterische Abdeckung von Ag43 auf der Membranoberfläche durch die Fimbrien ausgelöst wird (Schembri und Klemm, 2001). Ag43 und Typ I – Fimbrien werden in verschiedenen Phasen der Biofilmbildung unterschiedlich stark exprimiert. Diese Phasenabhängigkeit wird nachfolgend im Kapitel 1.5 erläutert.

Wichtige Autotransporter, die über den Typ Vc – Sekretionsweg an die Membranoberflächen von Bakterien transportiert werden, weisen eine trimerische homologe Struktur auf und werden somit als Trimerische Autotransporter Adhäsine (TAA) bezeichnet. Vertreter dieser TAA werden im folgenden Kapitel genauer beschrieben.

1.4 TRIMERISCHE AUTOTRANSPORTER ADHÄSINE

Trimerische Autotransporter Adhäsine (TAA) sind Mitglieder einer Virulenz-vermittelnden Proteinfamilie, die von gramnegativen Bakterien sekretiert werden und durch den Sekretionsweg Vc (Linke *et al.*, 2006) an die Oberflächen der Bakterien gelangen. Alle TAA sind Homotrimere mit einer konservierten C-terminalen AS-Sequenz, die einen 12 Strang β -Barrel ausbildet und somit die Verankerung der Proteine an die äußere Bakterienmembran gewährleistet.

1.4.1 YadA

Das wohl am besten charakterisierte TAA ist YadA (auch P1) aus enteropathogenen *Yersinia* Bakterien, welches die Adhäsion an Kollagen, Fibronectin sowie Laminin vermittelt und dadurch die Bindung von *Yersinia* an intestinale Epithelzellen und Granulozyten des Wirtes ermöglicht (Roggkamp *et al.*, 1996). Durch die Kolonisation von *Yersinia* ist YadA an verschiedenen Erkrankungen des Menschen, wie der Diarrhö, der Sepsis, der Lymphadenitis (reaktive Lymphknotenschwellung) oder der reaktiven Arthritis beteiligt (Linke *et al.*, 2006). Weiterhin ist YadA auch bei der Autoaggregation von *Yersinia* beteiligt, was wesentlich zur Kolonisation beiträgt. Die AS-Sequenzen von *Yersinia pseudotuberculosis* (YadA_{pstb}) und *Yersinia enterocolitica* (YadA_{ent}) unterscheiden sich geringfügig am N-terminalen Ende, was jedoch zu wesentlichen Schwankungen in der Adhäsion an die Komponenten der extrazellulären Matrix der Wirtszellen führen kann. Deletionsmutanten von YadA_{pstb} bewirkten den Verlust der Adhäsion an Fibronectin sowie der invasiven Fähigkeiten von *Y. pseudotuberculosis*, und wiesen somit die üblichen Eigenschaften von YadA_{ent} auf. Dies zeigte, dass auch sehr ähnliche Adhäsine durch den Verlust von einigen Aminosäuren sehr stark in ihrer Bindungsfähigkeit eingeschränkt werden können (Heise und Dersch, 2006).

YadA weist die für TAA typischen sechs Domänen in der Tertiärstruktur des Gesamtproteins auf: die N-terminale Signalsequenz, die Kopfdomäne, den Nackenbereich, den Stiel, die Link-Region und die C-terminale Region, welche für die Ausbildung des β -Barrels mit zwei weiteren β -Regionen der YadA-Monomeren verantwortlich ist. Das β -Barrel wird aus insgesamt 12 antiparallel laufenden β -Faltblättern gebildet, wobei jedes der YadA-Monomere vier dieser Faltblätter zur Gesamtstruktur des β -Barrels beiträgt. Das β -Barrel von YadA ist dem β -Barrel von TolC (vgl. auch Kapitel 1.3.7) sehr ähnlich, obwohl bei TolC das gesamte Protein das β -Barrel ausbildet und bei YadA nur einen kleinen Teil des Proteins ausmacht. Die wichtigste Funktion des β -Barrels von YadA ist dabei die Sekretion der *Passenger* Domäne durch die innere Pore und die daraufhin folgende Verankerung des gesamten Protein-Komplexes in der äußeren Bakterienmembran. Große Homologien zu der β -Region von YadA

wurden auch in den OMP anderer Bakterien gefunden und lieferten somit die ersten Hinweise auf deren trimere Strukturen. Dazu gehören z. B. die UspA1 und UspA2 von *Moraxella catarrhalis* sowie Hia aus *Haemophilus influenzae*. An die β -Domäne vom C-terminalen Ende aus folgende Linker-Region ist ebenfalls an der Translokation der vollständigen *Passenger* Domäne beteiligt. Bei Mutationen in diesem Bereich wird sogar das gesamte Protein abgebaut. Ähnliche Linkerregionen sind unter den Autotransportern weit verbreitet, wobei bisher keine Sequenzhomologien bekannt sind, was an der monomeren Struktur anderer Vertreter der Autotransporter zu liegen scheint. Die folgende Stiel-Region wird aus den drei monomeren Strukturen von YadA als eine sich linksdrehende Spirale aus α -Helizes aufgebaut (*coiled coil structure*), die dann in der als Nacken (*neck*) bezeichneten Struktur endet. Zusammen mit der Kopfdomäne bildet die ca. 20 Aminosäuren große Nackenregion den bindungsvermittelnden Teil von YadA. Deletionsmutanten des Nackenbereichs zeigten verringertes Adhäsionsverhalten von YadA, hatten aber keine Auswirkung auf die Serumresistenz, welche von manchen Autotransportern, sowie auch von dem mutationsfreien YadA, vermittelt werden kann. Die wichtigste Domäne für die Bindung an verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix der Wirtszellen ist an dem äußersten Ende von YadA lokalisiert. Die Kopfdomäne zeigt auch zu anderen N-terminalen Enden verschiedener TAA große Homologien, welche die Adhärenzfähigkeiten dieser Proteine ausmachen (Roggenkamp *et al.*, 2003; Henderson *et al.*, 2004). Deletionen der YadA₂₉₋₈₁-Bereiche führten zum Adhäsionsverlust an neutrophile Granulozyten des Wirtes, wobei die Bindung zu Kollagen und Laminin immer noch vorhanden war. Die Kollagenaffinität und die Autoagglutinationsfähigkeit von YadA wurden durch die Deletion von YadA₈₃₋₁₀₄ gänzlich aufgehoben. Durch weitere Versuche mit Deletionsmutanten konnten die AS-Sequenzen für die Kopfdomäne (YadA₂₆₋₁₉₄) und für den Nackenbereich (YadA₁₉₅₋₂₁₉) exakt ermittelt werden (Nummelin *et al.*, 2004).

YadA-Gene sind auf dem Virulenzplasmid von *Yersinia* kodiert und weisen in der monomeren exprimierten Form ein ca. 44 kDa großes Protein in SDS-PAGE – Gelen auf. Die trimere Proteinform von YadA ist sehr stabil, und auch 20-minütige Behandlungen bei 80 °C oder mit 1 M Harnstoff konnten die Bindung an Kollagen (Typ I) nicht verringern. Die trimere Form von YadA kann auch nach dem Aufkochen der Proben in den SDS-PAGE – Gelen nachgewiesen werden, was ebenfalls auf die sehr starken Bindungen der einzelnen Monomere zueinander hinweist. Nach Infektion der intestinalen Mukosa durch *Yersinia*-Bakterien und der Invasion durch die chromosomal kodierten *Yersinia*-Proteine Invasin und Ail bildet YadA den wichtigsten Adhäsionsfaktor an Epithelzellen (Nummelin *et al.*, 2004).

1.4.2 EibD

Untersuchungen neueren Datums mit weiteren TAA-Vertretern lieferten einen vertieften Einblick in die Struktur von YadA und ähnlichen Proteinen (UspA1, UspA2 und Hia). Das aus der Eib-Familie (Kapitel 1.7) stammende EibD (*E. coli* *immunglobulin binding protein* D) konnte 2011 durch Kristallstrukturanalysen verschiedener Bereiche der *Passenger* Domäne sowohl als TAA bestätigt werden, als auch mehr Informationen zum Aufbau und zur Funktionsweise ähnlicher Proteine liefern. EibD wird von Intimin-negativen STEC-Stämmen exprimiert und vermittelt erhöhte Adhärenz von *E. coli* an intestinale Epithelzellen; außerdem bindet es an humanes IgA und IgG und ist an der Serumresistenz der STEC beteiligt (Leo *et al.*, 2011).

Zwei Bereiche von EibD (EibD₁₆₁₋₄₁₈ und EibD₃₉₁₋₄₄₀) wurden experimentell genauer untersucht wonach ein Modell von EibD mit einer verlängerten Lutscher ähnlichen – Struktur (*elongated lollipop-*

like structure) postuliert wurde (**Abb. 8**). Dieser besteht aus einer linksdrehenden parallelen β -roll Domäne, EibD₁₆₀₋₂₉₁ (LPBR: *left-handed parallel β -roll domain*), die der Kopfdomäne von YadA sehr ähnelt, aus dem Nacken-Bereich und aus dem Stielbereich. Der YadA-ähnliche Kopfbereich von EibD setzt sich aus mehreren Wiederholungssequenzen und somit aus β -Faltblättern zusammen, die sowohl hydrophobe intramolekulare, als auch hydrophile Bereiche zwischen den einzelnen drei Monomeren aufweisen. Eine Besonderheit von EibD ist hier ein hervorstehender Bereich zwischen den beiden letzten Sequenzwiederholungen für das β -Blatt. Dieser Bereich gehört zu dem sich anschließenden Baustein von EibD, dem Nacken, welcher den Rest des Polypeptids um 120° im Uhrzeigersinn rotieren lässt. Der Stiel von EibD wird in drei weitere Bereiche unterteilt: den rechtsdrehenden *coiled-coil* Bereich unter dem Nackenbereich (EibD₂₉₂₋₃₄₉), den Sattelbereich (EibD₃₄₅₋₃₈₀) und den linksdrehenden *coiled-coil* Bereich unterhalb des Sattels (EibD₃₈₁₋₄₁₇). Der Sattelbereich ist für die weitere Windungsänderung innerhalb der Proteinstruktur verantwortlich, wodurch der linksdrehende Bereich um 120° zu dem vorherigen Verlauf gedreht wird.

Durch die Generierung von Punktmutationen in EibD konnten die Bindungsdomänen für IgA und für IgG identifiziert werden. Die Expression von EibD an der Oberfläche der Bakterien wurde durch Elektronenmikroskopie sowie Autoaggregationstests untersucht, wobei in flüssigen Nährmedien ein ähnlich schnelles Absinken der Bakterien auf die Gefäßböden festgestellt wurde, wie dies auch für andere Bakterien mit Autotransportern, wie z. B. mit Ag43, typisch ist. EM-Aufnahmen zeigten weiterhin die Expression von EibD an der bakteriellen Oberfläche und in den Bereichen des bakteriellen Zell-Zell-Kontakts. Dies lässt die Vermutung zu, dass EibD partiell an der Aggregation der Zellen beteiligt ist. Die Kettenausbildung der EibD-positiven Stämme konnte von Lu *et al.* allerdings nicht gezeigt werden, wobei die Bakterien eher zur Verklumpung tendieren. Als Erklärung wird das Fehlen physiologischer Bedingungen in *ex-vivo* Experimenten aufgeführt, welche zur Kettenausbildung beitragen sollen (Lu *et al.*, 2006). In weiteren Experimenten wurde die Formierung von Biofilmen durch EibD-positive Bakterien nachgewiesen.

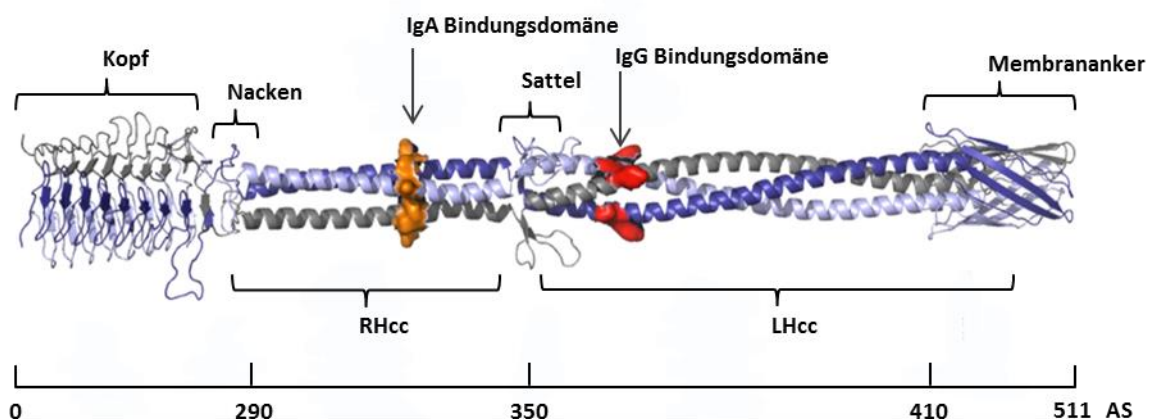


Abb. 8: EibD mit einzelnen strukturellen Bereichen. Modifiziert nach Leo *et al.*, 2011.

(Kopf und Nacken) EibD₁₆₀₋₂₉₁; **(RHcc)** rechtsdrehender *coiled-coil* Bereich, EibD₂₉₂₋₃₄₉; **(Sattel)** EibD₃₄₅₋₃₈₀; **(LHcc)** linksdrehender *coiled-coil* Bereich, EibD₃₈₁₋₄₁₇; **(Membrananker)** EibD₄₁₇₋₅₁₁; **(IgA-Bindungsdomäne)** EibD₃₂₉₋₃₄₄; **(IgG-Bindungsdomäne)** EibD₃₈₄₋₄₁₈.

Weiterhin konnte beim EibD die Bindung an IgG Fc mit Protein A aus *Staphylococcus aureus* (SpA) blockiert werden, was auf ähnliche Affinitätsbereiche zu IgG Fc hindeutet. Von Lu *et al.* wurde leider wenig auf die Signalsequenz von EibD eingegangen, welche ja nur die ersten 20 bis 30 AS ausmachen soll. Der Bereich EibD₁₋₁₅₉ blieb somit nur ungenau untersucht. Im Vergleich zu YadA müsste der AS-

Bereich EibD₂₆₋₂₆₀ noch zur Kopf-Domäne gehören und die restlichen Aminosäuren(EibD₂₆₀₋₂₉₁) müssten zum Nacken gezählt werden. Rein rechnerisch ergibt sich daher ein ca. 60-70 Aminosäuren langer Bereich, der noch nicht genau untersucht wurde und dessen Funktionen noch nicht bekannt sind.

1.5 BIOFILMAUSBILDUNG DURCH BAKTERIEN

Bakterielle Biofilme werden unter verschiedensten Umweltbedingungen ausgebildet und müssen bei pathogenen Mikroorganismen generell als ein übergeordneter Virulenzfaktor betrachtet werden. So können Bakterien in Biofilmen tausendfach höhere Resistenzen gegenüber Antibiotika im Vergleich zu nomadischen Einzellern aufbauen. Damit kann eine Biofilmbildung auch als ein bakterieller Schutzmechanismus gegen die Wirkung von Antibiotika angesehen werden. Durch die Adsorption von toxisch wirkenden Stoffen, die katalytische Aktivität der extrazellulären Matrix und die reduzierte Wachstumsgeschwindigkeit können Bakterien in Biofilmen ihre Lyse, zumindest temporär, hinauszögern oder gänzlich umgehen (Russell, 2003; Fux *et al.*, 2005). Weiterhin gibt die Aggregation zu Biofilmen einen gewissen zusätzlichen Schutz vor Austrocknung oder vor UV-Strahlen sowie eine bessere Anpassung bei extremen pH-Bereichen oder hohen Salzkonzentrationen (Ghigo, 2003).

1.5.1 Definition und Eigenschaften von Biofilmen

Als Biofilme werden organisierte Ansammlungen von Mikroorganismen bezeichnet, die an Grenzflächen (fest oder flüssig) Agglomerate ausbilden, welche meistens von einer gelartigen Matrix eingeschlossen sind. Diese Matrix besteht aus einer komplexen Mischung von extrazellulären Sacchariden, Proteinen oder auch DNA und ist mit Kanälen für die Versorgung der eingeschlossenen Bakterien mit Nährstoffen durchsetzt (Hall-Stoodley *et al.*, 2004).

Der Wechsel vom nomadischen Einzellerdasein zu sesshaften Multizellulär-Komplexen wird durch eine Reihe von Umweltfaktoren beeinflusst, unter anderem durch die Umgebungstemperatur, den pH-Wert, den Sauerstoffpartialdruck, die Osmolarität, das Vorhandensein bestimmter Nährstoffe und die hydrodynamischen Gegebenheiten der Umgebung. Dabei durchlaufen Bakterien einen starken Wechsel in der Expression zahlreicher Gene und die daraus resultierende Veränderung der phänotypischen Merkmale, wie z. B. den Wechsel zu veränderten Adhäsionsstrukturen an der Membranoberfläche oder den temporären Verlust von Motilitätsfaktoren. Die durch Flagellen vermittelte Mobilität spielt bei der Besiedlung neuer Lebensräume sowie der anfänglichen Kolonisierung eine wichtige Rolle. Der Verlust der Flagellenbildung, z. B. durch gezielte Mutation der *fliC*-Gene, führt zur verminderten Fähigkeit Biofilme auszubilden (Pratt und Kolter, 1998). Das bedeutet aber nicht, dass von vornherein nicht-motile Organismen keine Biofilme ausbilden können. Unter geeigneten Umweltbedingungen exprimieren z. B. *Staphylococcus*-Stämme verstärkt Adhäsine an ihrer Zelloberfläche, wie z. B. das große Bap-Protein (ca. 2000 AS, Länge variabel), wodurch die Zell-Zell-Adhäsion enorm erhöht und die Ausbildung der extrazellulären Matrix beschleunigt wird (Lasa und Penadés, 2006).

1.5.2 Stadien der Biofilmbildung

Generell werden bei Bakterien fünf aufeinander folgende Schritte beim Aufbau eines Biofilms unterschieden. Diese sind bei gramnegativen Bakterien (O'Toole *et al.*, 2000):

1. Oberflächenadhäsion
2. Monolayerausbildung
3. Multilayerausbildung
4. Produktion extrazellulärer Matrix
5. Biofilmreifung

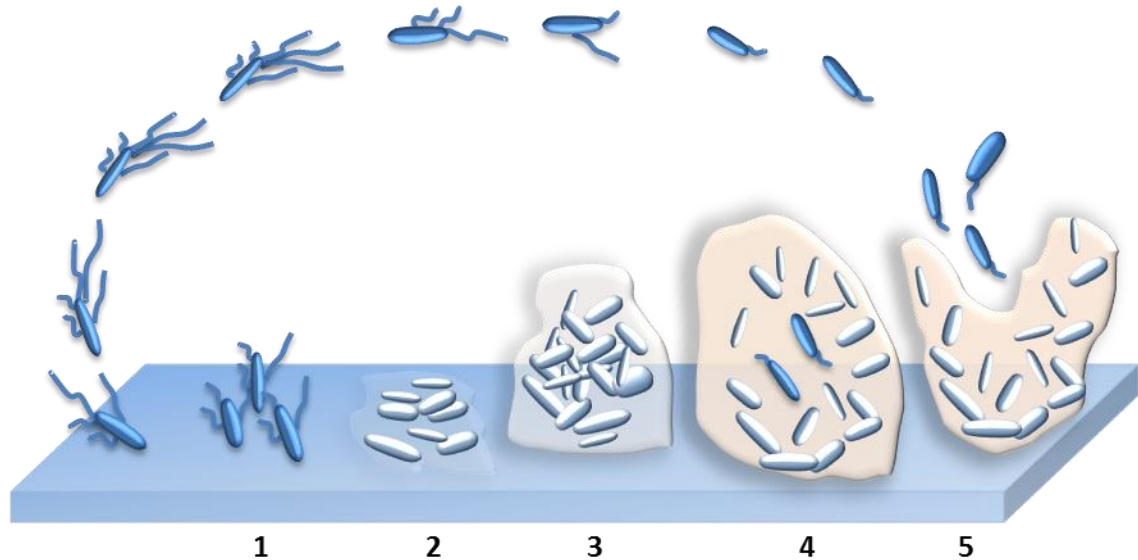


Abb. 9: Phasen der Biofilmbildung bei gramnegativen Bakterien. Modifiziert nach Romeo, 2008.

(1) Polare Adhäsion; **(2)** laterale Adhäsion, Monolayerausbildung; **(3)** Multilayerausbildung; **(4)** verstärkte Produktion extrazellulärer Matrix; **(5)** reifer Biofilm mit vereinzelt motilen Bakterien.

Die Regulation der notwendigen Gene und das phänotypische Erscheinungsbild können bei verschiedenen Bakterienspezies erheblich variieren. Die Fähigkeit zur Motilität und zur Adhäsion durch Flagellen und Pili wird bei grampositiven Bakterien durch andere Moleküle ersetzt, da diese z. B. keine Typ IV – Pili ausbilden können. Die planktonischen Einzeller-Bakterien bewegen sich mittels Flagellen bzw. Pili in der ersten Phase der Biofilmbildung auf der zu kolonisierenden Oberfläche, wobei sie dann unter geeigneten Bedingungen wie z. B. günstigem Substratangebot an diese adhären. Bei diesem Erstkontakt wird zunächst eine reversible Bindung ausgebildet, die oft polarer Natur ist (vgl. **Abb. 9**). Bei ungünstiger Veränderung beispielsweise der Umgebungsparameter können sich die Bakterien relativ schnell wieder von der Oberfläche lösen und durch die immer noch ausgebildeten Motilitätseinheiten einen anderen Lebensraum besiedeln.

Wenn die Umgebung und die Lebensbedingungen günstig sind, beginnt die Ausbildung eines Monolayers der Bakterien, wobei auch laterale Anhaftungen durch Adhäsionsfaktoren an die Besiedlungsoberfläche erfolgen. Die Bakterien beginnen dann mit verstärkter Expression von Substanzen für den Aufbau der extrazellulären Matrix (EZM). Die Motilitätselemente werden nicht mehr ausgebildet und an deren Stelle werden immer häufiger proteinogene, nicht-fimbrielle Adhäsionsmoleküle zur verstärkten Zell-Zell-Adhäsion exprimiert. Dadurch wächst der Biofilm nicht nur flächenmäßig, sondern gewinnt an Volumen und es erfolgt die Ausbildung einer

dreidimensionalen Struktur. Die Bedürfnisse der Bakterien ändern sich erheblich durch diesen Phasenwechsel von der planktonischen zur sesshaften Lebensweise. Dies äußert sich in der Veränderung der Expressionsraten von lebenswichtigen Metaboliten, dem O₂-Verbrauch und der Form der Abbauprodukte, die natürlich von den vorhandenen Nährstoffen bestimmt werden. Für gramnegative Bakterien sind polyanionische und neutrale extrazelluläre Matrices charakteristisch, wohingegen von grampositiven Biofilmen eher eine polykationische Matrix aus Polysacchariden gebildet wird (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Bei Veränderung der Umgebungsparameter können Bakterien schnell wieder zur motilen Form wechseln, sich aus der Biofilmmatrix lösen und neue Lebensräume besiedeln.

Da Untersuchungen zu einzelnen Biofilmphasen meist unter kontrollierten Laborbedingungen stattfinden, können die Vielfalt und die Variabilität der Biofilmbildung bei Bakterien nur aus dieser eingeschränkten Sichtweise heraus beschrieben werden. Äußere Einflüsse, die zur Biofilmbildung führen, sowie Regulationsmechanismen der Bakterien als Antwort auf veränderte Umweltbedingungen werden immer wieder in neuen Zusammenhängen entdeckt und vervollständigend schrittweise das komplizierte Bild der Biofilmbildung. In den folgenden Abschnitten wird ein kleiner Teil dieser Entdeckungen beschrieben, von den Umweltbedingungen ausgehend bis hin zu den intrazellulären Regulationsmechanismen gramnegativer Bakterienpopulationen, speziell der von *E. coli*.

1.5.3 Oberflächeneigenschaften für die bakterielle Biofilmbildung

Alle Arten von Oberflächen, an die Bakterien anhaften können, werden als Substrate bezeichnet. Dabei sind die meisten Bakterien in der Lage, stärker an hydrophobe Oberflächen, wie z. B. Plastik, zu binden, als an hydrophile Substrate, wie Glas oder Metall (Donlan, 2002). Eventuell vorhandene Proteine auf diesen Oberflächen können die Adhäsion noch verstärken, wie es bei klinischen Geräten und Kathetern mit direktem Kontakt zu Blutströmen oder Körperflüssigkeiten oft der Fall ist. Diese werden beispielsweise durch Plasma- oder Gewebeproteine (Albumine, Fibronectine, Laminine) beschichtet und dadurch affiner für Bakterien (Stoodley *et al.*, 2002).

Wenn die zu besiedelnden Oberflächen Flüssigkeitsströmungen ausgesetzt sind, haben diese eine enorme Auswirkung auf die Stärke der Adhäsion. *E. coli* – Stämme, die auf mannosebeschichteten Oberflächen über Typ IV – Pili adhären, wandern bei leichten Strömungen in einer rollenden Bewegung über die Oberflächen. Beim Anstieg der Strömungsstärke adhären die Bakterien viel stärker an die Oberflächen. Unter diesen Bedingungen werden mehr Mikrokolonien ausgebildet als bei leichten Strömungen, welche zur Verbreitung von *E. coli* – Zellen genutzt werden. Die hydrodynamischen Bedingungen der bakteriellen Umgebung spielen also ebenfalls eine Rolle bei der Art und Struktur der ausgebildeten Kolonien und somit für die Ausbildung von Biofilmen (Anderson *et al.*, 2007).

1.5.4 Erste Kontakte mit der Oberfläche

Können Bakterien die Beschaffenheit der Oberflächen, auf denen sie sich befinden, wahrnehmen? Die Chemotaxis spielt beim Auffinden von Nährstoffen eine große Rolle und bestimmt die Bewegungsrichtung der Bakterien. Für die Biofilmbildung ist die Chemotaxis aber eher irrelevant (Pratt und Kolter, 1998) und könnte nur in der Form von *Quorum Sensing*, der bakteriellen Kommunikation untereinander, die Bakterien an die zu besiedelnden Orte führen (Park *et al.*, 2003).

Nach dem Erreichen des Substrats erfolgt die passive Adhäsion der Bakterien durch Fimbrien, proteinogene Oberflächenadhäsine und Polysaccharide an geeignete Rezeptoren.

Das Zweikomponenten-System Cpx von *E. coli* könnte an der Weiterleitung der Signale beim Oberflächenkontakt beteiligt sein. Dieses System besteht aus der Sensor kinase CpxA und dem DNA-bindenden Regulatorprotein CpxR. Die Genexpression der *cpx*-Gene wird durch die Berührung mit Oberflächen erhöht, wobei Stressreaktionen wie Überproduktion und falsche Faltung der Membranproteine als Auslöser gelten (Raivio und Silhavy, 1997). Als Folge werden die Gene für Proteinchaperone und Proteasen, wie z. B. *dsbA* und *degP*, verstärkt exprimiert. Mutanten von *cpxR* bilden veränderte Zellaggregate auf Oberflächen, und *cpxA*-Mutationen führen zu Kolonien mit geringerer Biomasse im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Stämmen, wobei sich Mutationen auch auf die Transkription des *Curli*-kodierenden Gens *csfA* auswirken (Otto und Silhavy, 2002). Zusätzlich zu der Fähigkeit, Veränderungen auf der Zelloberfläche wahrzunehmen, kann das Cpx-System die Nähe zu Nachbarbakterien an die Zelle signalisieren, was allerdings erst im späten Stadium der Biofilmbildung bedeutsam wird (Beloin *et al.*, 2004).

Ein weiteres Phosphorylierungs-System, welches an der Kontrolle der Flagellen sowie der Kapseln beteiligt ist, wird bei Störungen der äußeren bakteriellen Membran aktiv (vgl. **Abb. 10**). Das RcsCDB-System wird bei Oberflächenkontakt in der späten Phase der Biofilmbildung aktiviert. Dabei unterdrückt das Rcs-System die Expression von Oberflächenadhäsionsfaktoren wie *Curli*, Fimbrien oder Antigen43, und reguliert die Induktion der Gene für die Synthese der Colansäure, die für die Synthese der EZM benötigt wird (Prigent-Combaret *et al.*, 2000). Diese Erkenntnisse verdeutlichen die Rolle von Rcs als Repressor für die nicht mehr notwendigen Adhäsionsfaktoren in der späten Biofilmphase, wenn die Energie der Bakterien für die Ausbildung der Biofilmmatrix benötigt wird (Majdalani und Gottesman, 2005).

1.5.5 Reversible Adhäsion

Mittels Flagellen können Bakterien die zu besiedelnden Oberflächen erreichen, die aber für die Adhäsion an das Substrat nicht unbedingt notwendig sind. In der folgenden Biofilmbildung spielen die physikalischen, chemischen und elektrostatischen Wechselwirkungen mit der bakteriellen Umgebung eine wichtige Rolle. Eine zentrale Funktion für die Regulation der Flagellensynthese, der Motilität und der Chemotaxis wird dem FlhDC-Komplex zugesprochen. Die DNA-bindende Komponente dieses Komplexes interagiert mit den Promoter-Regionen der kontrollierten Gene und reguliert so die Transkription von diesen. Die Expression des FlhDC-Komplexes wird seinerseits durch verschiedene Regulatoren kontrolliert, welche selbst durch die vorhandenen Umweltbedingungen reguliert werden (Romeo, 2008). Diese werden im Folgenden kurz vorgestellt.

Eine hohe Osmolarität in der Umgebung der Bakterien und hohe Konzentrationen an Acetyl-Phosphaten (AcP) inhibieren die Expression von *flhDC*-Genen und dadurch die Expression von Flagellen (Shin und Park, 1995). AcP ist eines der zwei entdeckten Signalmoleküle, über die Bakterien auf Veränderungen im Nahrungsangebot der Umgebung reagieren. AcP akkumuliert intrazellulär, sobald ein Überangebot an kohlenstoffreichen Nährstoffen eintritt oder sich niedrige O₂-Konzentrationen einstellen. Weiterhin erhöht AcP die Genexpression der Typ I – Pili sowie der Enzyme für die Synthese von Colansäure und trägt damit zur Ausbildung der Biofilmmatrix bei. Es besteht die Hypothese, dass AcP als Phosphatdonor für weitere Regulatoren wie FimZ, OmpR und RcsB fungiert, die ebenfalls in die Regulation von Biofilmen involviert sind (Wolfe *et al.*, 2003).

Bei Nährstoffmangel akkumuliert das zweite Signalmolekül innerhalb der Bakterienzellen, das Alarmon Guanosin-3',5'-bispyrophosphat (ppGpp). Diese Anreicherung führt zur erhöhten Expression der Typ I – Fimbrien, die ihrerseits das Zellwachstum verlangsamen und dadurch das Überleben unter stressreichen Bedingungen ermöglichen. Somit kann die Induktion von ppGpp ein Signal für den Übergang zur sesshaften Lebensform sein (Aberg *et al.*, 2006).

Veränderungen der Osmolarität, des pH-Wertes, des Sauerstoffgehalts und der Umgebungstemperatur werden von *E. coli* durch die Regulation des H-NS – Proteins an weitere Transkriptionsparameter übermittelt. Dabei reguliert H-NS eine Vielzahl an Genen in *E. coli* – Zellen, wobei die Auswirkung einzelner Umweltstimuli nur schwer bestimmten Kontrollmechanismen zugeordnet werden kann. Mutationen der *hns*-Gene bewirken eine verminderte Wachstumsgeschwindigkeit, wobei weitere Regulationsantworten nicht klar definiert sind. H-NS vermittelt die Expression von Genen, die von der σ^S -Untereinheit der RNA-Polymerase (kodiert durch *rpoS*-Gene) abhängig sind (Barth *et al.*, 1995). Dabei kann H-NS sowohl aktivierend als auch repressiv wirken, was auch während der Genexpression vieler Proteine in der exponentiellen Wachstumsphase geschieht (Beloin *et al.*, 2004).

Das EnvZ/OmpR, ein weiteres signalübermittelndes Zweikomponenten-System von *E. coli*, reagiert ebenfalls auf die Osmolarität in der bakteriellen Umgebung, reprimiert die Gene für die Flagellenexpression und aktiviert die *Curli*-Expression. Dabei phosphoryliert OmpR den *Curli*-Regulator CsgD, aktiviert dadurch diesen und trägt zur Ausbildung des Biofilms bei (Oshima *et al.*, 2002). Weiterhin wird bei Veränderungen in der Osmolarität die Transkription der *ompF*- und *ompC*-Gene, Porine in der äußeren *E. coli* – Membran, durch das EnvZ/OmpR – System reguliert. Dadurch wird die Aufnahme von Nährstoffen und eine Anpassung an die extrazelluläre Osmolarität gewährleistet.

Ein Anstieg von Glucose wird über das cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat), einem Sekundärbotenstoff, an die Zellen über das Rezeptorprotein CRP vermittelt. Dabei verursacht der Glucoseanstieg eine Expressionsaktivierung der *flhDC*-Gene und führt zu einem Anstieg der Flagellenexpression. Dadurch wird die Biofilmbildung verlangsamt, und der Anteil an motilen Zellen erhöht sich (Jackson *et al.*, 2002a).

Ein weiteres Zweikomponenten-System, das auf äußere Einwirkungen reagiert, ist das Csr-System (*carbon storage regulator*), bestehend aus CsrA und CsrB. CsrA unterdrückt normalerweise die Gluconeogenese und aktiviert die Glykolyse sowie den Acetat-Metabolismus. Das Homoserinlaktone SdiA, ein während des *Quorum Sensings* von Bakterien verwendetes Signalmolekül (Ahmer, 2004), kann dabei die Expression von CsrA begünstigen. Das Csr-System aktiviert dann die Flagellenexpression durch Regulation der *flhDC*-Gene und leitet die Auflösung des Biofilms ein (Wei *et al.*, 2001). Des Weiteren unterdrückt Csr die Expression des Polysaccharidadhäsins PGA und unterbindet dadurch weitere Zell-Zell-Kontakte zwischen den *E. coli* – Zellen (Jackson *et al.*, 2002a). Damit könnte die Biofilmbildung durch wechselseitige Signale der bakteriellen Zellen ebenfalls gesteuert werden.

Der einer Regulation durch SdiA und CsrA entgegenwirkende sekundäre Botenstoff c-di-GMP (*cyclic diguanylate Guanosinmonophosphate*) wurde in hoher Konzentration bei biofilmbildenden Zellen und in niedriger Konzentration in motilen Bakterien nachgewiesen (Simm *et al.*, 2004). Die Synthese von c-di-GMP wird durch Proteine mit GGDEF-Domänen begünstigt und durch EAL-Domänen – haltige Proteine reprimiert. Die Umweltfaktoren für die Regulation von c-di-GMP sind noch

weitgehend unbekannt; trotzdem wird c-di-GMP zu den wichtigsten Biofilm-kontrollierenden Faktoren in Bakterien gezählt, da es die Expression von proteinogenen und polysaccharidhaltigen Adhäsionsfaktoren begünstigt und die Expression von Flagellen- und Pili-Genen unterdrückt (Jenal und Malone, 2006).

1.5.6 Irreversible Oberflächenadhäsion

Zur Verstärkung der bakteriellen Adhäsion und des Zell-Zell-Kontakts werden von Bakterien extrazelluläre Adhäsionsfaktoren wie Fimbrien, *Curli* und Pili eingesetzt (vgl. auch Kapitel 1.2.4). Im fortschreitenden Stadium der Biofilmbildung werden dann weitere proteinogene Adhäsine exprimiert, wodurch der Zell-Zell-Kontakt weiterhin verstärkt wird. Diese proteinogenen Adhäsine werden auch in geringen Konzentrationen im motilen Zustand der Bakterien exprimiert und tragen, wie z. B. AIDA-I, zur Adhäsion von Bakterien an die Wirtszellen bei (Kapitel 1.3.6.). Im Zuge der erhöhten Produktion verschiedener Fimbrien und Pili verdecken diese hochmolekularen Strukturen allerdings die meisten membranständigen Adhäsine der Bakterien.

Experimente mit *fimH*-Mutanten mit veränderten äußeren Adhäsionseinheiten der Typ I – Fimbrien haben gezeigt, dass FimH nicht nur für die Adhäsion an mannosehaltige Oligosaccharide der Wirtszellen verantwortlich ist, sondern auch für die initiale Adhäsion der Bakterien an verschiedene abiotische Oberflächen (Beloïn *et al.*, 2004). Innerhalb einer Zellpopulation wird die Expression der Typ I – Fimbrien bei Körpertemperatur, also bei 37 °C, aktiviert, bei hoher Osmolarität und niedrigem pH-Wert jedoch reprimiert (Schwan *et al.*, 2002). Der Transkriptionsregulator LrhA, welcher auch als Repressor der Gene für die Flagellen und der Chemotaxis fungiert, unterdrückt auch die Expression der Typ I – Fimbrien. Die Inaktivierung von LrhA führt daher zur verstärkten Ausbildung eines Biofilms, wohingegen eine Überexpression von LrhA zum totalen Verlust der Biofilmbildung führt (Blumer *et al.*, 2005). Zusammenfassend kann man sagen, dass die Produktion von Typ I – Fimbrien auf der bakteriellen Zelloberfläche einer komplexen Regulation unterliegt, wie z. B. bei der entgegengesetzten Aktivierung durch AcP bei Nährstoffüberfluss und durch ppGpp bei Nährstoffmangel, sowie durch verschiedene Stressfaktoren, wie niedrigem pH-Wert, niedriger Temperatur oder hoher Osmolarität, die reprimierend wirken. Die *fim*-Gene unterliegen den Kontrollmechanismen des Biofilmphasenwechsels von der motilen zur sesshaften Form bei *E. coli* und ebenfalls in dem Wechsel zurück zur motilen Form, weshalb die genauen Regulationsparameter schwer zu ermitteln sind (Romeo, 2008).

Curli werden durch die *csgBA*- und *csgDEFG*-Operons kodiert, vermitteln die Adhäsion an extrazelluläre Matrixproteine der eukaryotischen Zellen, wie Fibronectin oder Laminin, und tragen somit zur Kolonisation und Biofilmbildung bei. Die *csg*-Gene werden ihrerseits durch mindestens drei verschiedene Signalvermittlungssysteme reguliert. Dazu gehört das bereits erwähnte EnvZ/OmpR – Zweikomponentensystem, welches bei niedriger Osmolarität die Transkription des *csgD*-Gens aktiviert. Bei hohen Salzkonzentrationen wird durch das ebenfalls bereits erwähnte CpxR-Protein die *csgD*-Expression reprimiert. Hohe Saccharosekonzentrationen führen zur Inhibierung der *csgD*-Expression durch das H-NS – Protein, wogegen mikroaerophile Bedingungen zur Aktivierung der *csgD*-Gene führen. Auch das RcsCDB-System kann die Expression der *csg*-Gene inhibieren und damit gleichzeitig die Synthese von Flagellen oder *Curli* kontrollieren. Demnach werden von *E. coli* verschiedene Systeme zur Ermittlung der extrazellulären Osmolarität eingesetzt, die dann zur Regulation von *Curli* führen (Jubelin *et al.*, 2005). Osmolaritätsanstieg durch Salze und Glucose führt aber grundsätzlich zur Inhibierung der *Curli*-Produktion.

Die proteinogenen Autotransporter wie Antigen43, TibA oder AIDA-I (vgl. auch Kapitel 1.3.6) bringen die bakteriellen Zellen näher zusammen, da die Reichweite von diesen Adhäsinen kleiner ist als die von Fimbrien und *Curli*. Die Zellaggregation, die durch diese Adhäsine vermittelt wird, scheint durch oxidativen Stress beschleunigt zu werden, da an der Regulation, z. B. von Antigen43, das Redoxsensor-System OxyR/Dam beteiligt ist (Schembri *et al.*, 2003). Auch der Abfall des extrazellulären pH-Wertes führt zur Antigen43-vermittelten Zellaggregation, welche dadurch ebenfalls eine Schutzfunktion ausübt und das Überleben der Bakterien, z. B. im Magen-Darm-Trakt oder den Harnwegen, sichert (Klemm *et al.*, 2006). Zusammen mit der Expression von Autotransporter-Genen, welche in der späten Phase der Biofilmbildung ansteigt, konnte auch ein Rückgang der Motilitätsfähigkeit der Bakterien beobachtet werden, wobei unklar ist, ob diese Aktivitäten einer wechselseitigen Regulation unterliegen (Ulett *et al.*, 2006). Extreme Lebensbedingungen führen also zu einer bakteriellen Zellaggregation, da Bakterien in größeren Konglomeraten im Vergleich zum Einzeller-Stadium geschützt sind.

Durch den Wechsel vom motilen, Flagellen-reichen Zustand zur sesshaften, mit verschiedenen Adhäsionsfaktoren ausgestatteten, Lebensweise, durchleben die Bakterien eine Art Phasenvariation, während der die Genexpression für Flagellen, Fimbrien und weiteren proteinogenen Adhäsinen durch Umweltstimuli von der „An“-Position zur „Aus“-Position (oder umgekehrt) wechselt (van der Woude und Bäuml, 2004). Die Expression der Typ I – Fimbrien und von Antigen43 unterliegen solchen Phasenvariationen. Bei Typ I – Fimbrien sorgen die beiden Rekombinasen FimB und FimE für die jeweilige An- bzw. Abschaltung weiterer *fim*-Gene. FimB und FimE konkurrieren dabei um die Ausübung ihrer Aktivitäten und können durch verschiedene Signalmoleküle, wie H-NS, IHF (*integration host factor*, DNA-biegender Protein) oder Lrp (Repressor der Gene für Flagellen), reguliert werden. Im Fall von Antigen43 wird nach der DNA-Replikation dessen Expression durch OxyR aktiviert, es sei denn, Dam methyliert die OxyR-Bindungsstellen, wodurch Antigen43 nicht mehr exprimiert werden kann. Damit wird schon kurz nach der Zellteilung festgelegt, ob dieses Adhäsine exprimiert wird oder nicht. Dabei kann die Überproduktion an Typ I – Fimbrien die Expression von Antigen43 unterbinden (Schembri *et al.*, 2002). Der reziproke Fall, in dem Antigen43 oder OxyR Einfluss auf die Expression der Flagellen haben, ist nicht bekannt. Damit wird deutlich, dass die Typ I – Fimbrien, die in den Anfangsstadien der Biofilmbildung verstärkt exprimiert werden, die Ag43 Expression reprimieren und erst durch die Herunterregulation der *fim*-Gene Antigen43 exprimiert wird. Da die Antigen43-Expression die *fim*-Gene nicht steuern kann, können diese durch bestimmte Umweltfaktoren wieder aktiviert werden und die Expression von Antigen43 erneut unterbinden.

1.5.7 Biofilmreifung

In der weiteren Entwicklung der Biofilmmatrix werden also die Motilitätsgene für Flagellen reprimiert und die Gene der proteinogenen Adhäsine hochreguliert. In der folgenden Biofilmmatrixausbildung werden nun vermehrt zuckerhaltige Strukturen exprimiert, die die dreidimensionale Form der bakteriellen Zellaggregate stabilisieren. Die wichtigsten Komponenten der extrazellulären Matrix von Bakterien bilden im fortgeschrittenen Stadium der Biofilmbildung drei Exopolysaccharide: PGA, Zellulose und die Colansäure. Lipopolysaccharide und Kapselpolysaccharide sind für die Ausbildung und den Erhalt der Biofilmmatrix nicht unbedingt notwendig, können aber auch akkumuliert auftreten.

PGA oder PNAG (Poly- β -1,6-N-Acetylglucosamine, Poly- β -1,6-GlcNAc) sind sowohl in die Zell-Zell-Adhäsion als auch in die Adhäsion an verschiedene Oberflächen involviert und werden nicht nur im

späten Biofilmstadium exprimiert (Agladze *et al.*, 2005). PGA-exprimierende Bakterien interagieren mittels ihrer Zellpole mit den Oberflächen, wodurch eine temporäre Adhäsion erzielt wird, die bei günstigen Bedingungen zur permanenten Bindung an die zu besiedelnde Oberfläche führt. In dieser Adhäsionsphase, so die Theorie, werden die Umgebungsbedingungen von Bakterien wahrgenommen und die darauf folgenden Reaktionen eingeleitet (Caiazza und O'Toole, 2004). Bei hohen pH-Werten oder hohen Na⁺-Konzentrationen in der bakteriellen Umgebung werden die *pga*-Gene durch das NhaR-Protein, ein Mitglied des LysR-Systems (Regulation von verschiedenen Motilitätsgenen bei Osmolaritätsänderung), reguliert und aktivieren diese (Goller *et al.*, 2006). Bei Einwirkungen auf die äußere Zellmembran wird durch CsrA (vgl. auch Kapitel 1.5.5) die Synthese von PGA inhibiert und durch niedrige Temperaturen mittels c-di-GMP erhöht (Wang *et al.*, 2005). Dies führt zu der Annahme, dass Stressfaktoren, wie niedrige Temperatur, hoher pH-Wert und hohe Na⁺-Konzentrationen, die Adhäsion und die Biofilmbildung durch erhöhte Expression von PGA einerseits beschleunigen und andererseits erhöhte Scherkräfte eher die Ausbildung von Motilitätsfaktoren, wie beispielsweise von Flagellen, mit sich bringen. Mutationen in *pga*-Genen führen zum Verlust der Fähigkeit, von der polaren in die laterale Adhäsion überzugehen (Agladze *et al.*, 2005). Behandlungen mit Metaperiodat oder β -Hexosaminidase führten zum Abbau von PNAG und damit zur Auflösung der Biofilmmatrix (Itoh *et al.*, 2005).

Abgesehen von pflanzlichen Zellwänden, wird Zellulose auch von zahlreichen Bakterien synthetisiert, wobei dieser Befund für *E. coli* erst in den letzten Jahren bekannt wurde. Die bei *Salmonella* nachgewiesenen *bcsABZC*- und *bcsEFG*-Operons, die die Synthese von Zellulose steuern, wurden auch im Genom weiterer Enterobakterien detektiert (Zogaj *et al.*, 2003). Die Expression dieser Gene wird durch c-di-GMP gesteuert, womit diesem Signalmolekül, neben der Regulation von Adhäsinen und Flagellen, auch die Steuerung der Biosynthese von Zellulose und anderen Polysacchariden zugesprochen wird (Jenal und Malone, 2006).

Colansäure besteht überwiegend aus negativ geladenen Polymeren und bildet unter bestimmten Umweltbedingungen Kapselstrukturen im extrazellulären Raum der Bakterien. Die Synthese der Colansäure wird durch 19 Gene desselben Genclusters *wca* (*cps*) kodiert und durch das Phosphorylierungs-System RcsCDB sowie RcsA induziert (Stevenson *et al.*, 1996). Das Rcs-System reprimiert dabei die Expression von Fimbrien und Antigen43 und trägt somit entscheidend zu der späten Biofilmbildung bei (Majdalani und Gottesman, 2005).

Die Synthese von LPS unterliegt der Kontrolle von mehr als 50 Genen, wobei die Darstellung der verschiedenen Regulationsmechanismen den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde. Auf die wichtigsten Glykosyltransferasen, die an der Synthese von LPS beteiligt sind, sollte kurz eingegangen werden. Mutationen von *waaG*, dem Gen für die Synthese der LPS – Core-Struktur, führen zu verkürzten LPS-Strukturen und rauen Phänotypen, welche damit die Fähigkeit Biofilme auszubilden komplett verlieren, wie z. B. im Fall des Stammes 536 der uropathogenen *E. coli* (Beloin *et al.*, 2006). Mutationsexperimente haben gezeigt, dass Veränderungen des Transkriptionselongationsfaktors *rfaH* eine verminderte LPS-Expression bei *E. coli* zur Folge haben. RfaH reguliert die Transkription vieler bakterieller Moleküle, die in der Zellmembran lokalisiert sind oder in den extrazellulären Raum sezerniert werden. Die Manipulation von *waaG* und *rfaH* kann also zu kürzeren LPS-Molekülen führen und somit die durch LPS verursachte Maskierung proteinogener Adhäsine, wie z. B. von AIDA-I oder auch Antigen43, aufheben, was eine erhöhte Adhäsionsfähigkeit der Bakterien zur Folge haben kann (Beloin *et al.*, 2006).

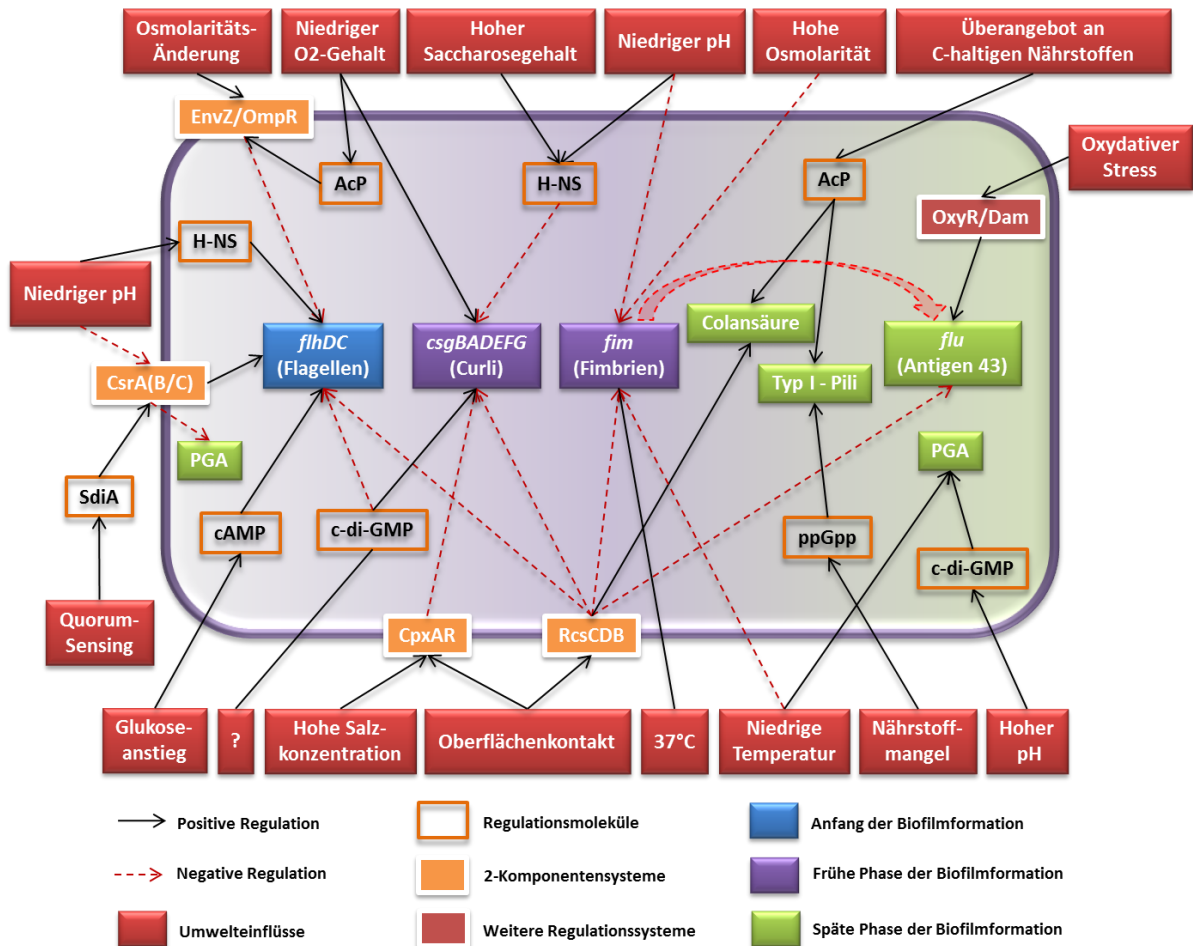


Abb. 10: Regulation der Biofilmbildung von *E. coli* durch verschiedene Umwelteinflüsse.

1.5.8 Auflösung des Biofilms

Unter bestimmten Umweltbedingungen ist es für Bakterien vorteilhaft, zum motilen Zustand zurückzukehren und der Biofilmmatrix zu entweichen. Dazu zählen Veränderungen im Nährstoffangebot, rasante pH-Veränderungen und Sauerstoffmangel sowie durch andere Bakterien ausgesandte Signale des *Quorum Sensing*. Insgesamt ähnelt das Transkriptommuster von Bakterien in der Biofilmmatrix demjenigen der stationären Wachstumsphase und weniger dem der exponentiellen Phase (Beloin *et al.*, 2006; Waite *et al.*, 2005). Einer der wichtigsten Regulatoren ist dabei das CsrA(B/C) Zweikomponentensystem, das die Wiederaufnahme der Flagellenexpression bestimmt (Jackson *et al.*, 2002b). Gleichzeitig inhibiert CsrA die Transkription von PGA (vgl. auch Kapitel 1.5.7), was erhebliche Auswirkungen auf die weitere Biofilmbildung hat (Wang *et al.*, 2005). Sowohl in *E. coli* als auch in anderen gramnegativen Bakterien kann die Synthese der Biofilmkomponenten durch Signale von benachbarten Bakterien beeinflusst werden. Es wäre also durchaus zu erwarten, dass eben diese Signalmoleküle auch die Rückkehr zur mobilen Form von *E. coli* auslösen könnten (Romeo, 2008).

1.6 IMMUNGLOBULIN-BINDEnde PROTEINE VON BAKTERIEN

Bakterielle Proteine mit der Fähigkeit, Immunglobuline (Ig) des Wirtes in der konstanten Region (Fc) zu binden, können wesentlich zur Pathogenität eines Erregers beitragen. Dabei kann die Immobilisierung der Antikörper die Bakterien vor dem Komplementsystem, der Opsonisierung und der Phagozytose schützen, wodurch diese dem Immunsystem des Wirtes entkommen. Derartige Immunglobulin-bindende Proteine (IBP) wurden sowohl auf den Oberflächen von Bakterien, eingebunden in Kapseln, als auch in sekretierter Form nachgewiesen. Die IBP treten als monomere oder oligomere Strukturen auf und variieren in ihrer Größe zwischen 14 und 350 kDa. Die Affinität zu Immunglobulinen verschiedener Spezies variiert ebenfalls unter den IBP, die auf Unterschieden in den Bindungsstellen, der Stärke und den Klassen der gebundenen Antikörper beruht. Viele der bisher beschriebenen IBP sind multifunktionale Proteine, wobei als Bindungspartner neben Immunglobulinen auch andere Proteine des Immunsystems nachgewiesen wurden. Weiterhin können einige Bakterien gleichzeitig mehrere verschiedene IBP exprimieren, wobei die Expression stark von den Wachstumsbedingungen und der Mediumzusammensetzung abhängt (Sidorin und Solov'eva, 2011). Nach einem kurzen Umriss der Immunglobuline werden im Folgenden die wichtigsten IBP grampositiver und gramnegativer Bakterien vorgestellt.

1.6.1 Immunglobuline

Antikörper oder Immunglobuline werden von allen Wirbeltieren produziert und haben als Komponenten des Immunsystems essentielle Funktionen, wie die Erkennung und Immobilisierung von pathogenen Mikroorganismen, Neutralisierung toxischer Antigene und Verstärkung des Komplementsystems. Immunglobuline des Menschen kommen in fünf verschiedenen Typen vor: IgA mit zwei Subtypen (IgA1 und IgA2), IgG mit vier Subtypen (IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4) sowie IgD, IgE und IgM. Die verschiedenen Subtypen haben unterschiedliche Aufgaben, üben ihre Funktion in unterschiedlichen Bereichen des Körpers aus und weisen verschiedene Spezifikationen auf. IgA tritt z. B. vorzugsweise im Gastrointestinaltrakt der Wirbeltiere auf, IgD kommt an den Oberflächen der Lymphozyten vor und IgE ist unter anderem für allergische Reaktionen verantwortlich. IgG ist das am häufigsten vorkommende Immunglobulin und besitzt eine sehr lange Halbwertszeit im Körper. IgM wird beim Kontakt mit Antigenen als erstes in großer Menge gebildet, was auf eine akute Infektion hindeutet (Narciso *et al.*, 2012).

Immunglobuline vom Typ G bestehen aus einem tetrameren Polypeptid, den zwei leichten (L: *light*) und zwei schweren (H: *heavy*) Ketten (**Abb. 11**). Die leichten und schweren Ketten sind unabhängig voneinander gefaltet und über Disulfidbrücken verknüpft. Die leichte Kette besteht aus zwei Domänen und die schwere Kette aus vier Domänen (fünf bei IgE und IgM). Die leichte und schwere Kette sind normalerweise über eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft. Die Anzahl der Disulfidbrücken zwischen den schweren Ketten kann zwischen einer oder mehreren variieren. Die N-terminalen Domänen der leichten (V_L) und schweren (V_H) Ketten variieren unter den Antikörpern und beinhalten die variablen Erkennungsbereiche für spezifische Antigene. Die konstanten Domänen der kurzen (C_L) und der schweren Ketten (C_{H1} , C_{H2} und C_{H3}) sind für den jeweiligen Ig-Typ identisch. Obwohl jede Domäne eine eigene individuelle tertiäre Einheit bildet, weisen bestimmte Bereiche zwischen den Domänen große Nähe zueinander auf. Diese wird durch die Disulfidbrücken (C_L und C_{H1} ; C_{H2} und C_{H2}) und durch weitere sterische Wechselwirkungen (V_L und V_H ; C_{H3} und C_{H3}) vermittelt. Dadurch bekommen Antikörper eine relativ feste Struktur, die durch die *Hinge* Region (Scharnier

Region) dennoch flexibel bleibt. Die variablen Bereiche aller Ketten (V_L und V_H) von einem Antikörper werden F_v (*Fragment, variable*) genannt und zusammen mit den dazugehörigen konstanten Bereichen (C_L und C_{H1}) bis zum *Hinge* Bereich als F_{ab} (*Fragment, antigen binding*) bezeichnet. Die restlichen Bereiche (C_{H2} und C_{H3}) werden zusammen als F_c (*Fragment, crystalline*) benannt, nach der Form des ersten in kristalliner Form dargestellten IgG F_c – Fragments aus Kaninchen. Das F_c -Fragment wird über F_c -Rezeptoren von Makrophagen erkannt und übt somit eine Effektorfunktion des Antikörpers aus (Sidorin und Solov'eva, 2011).

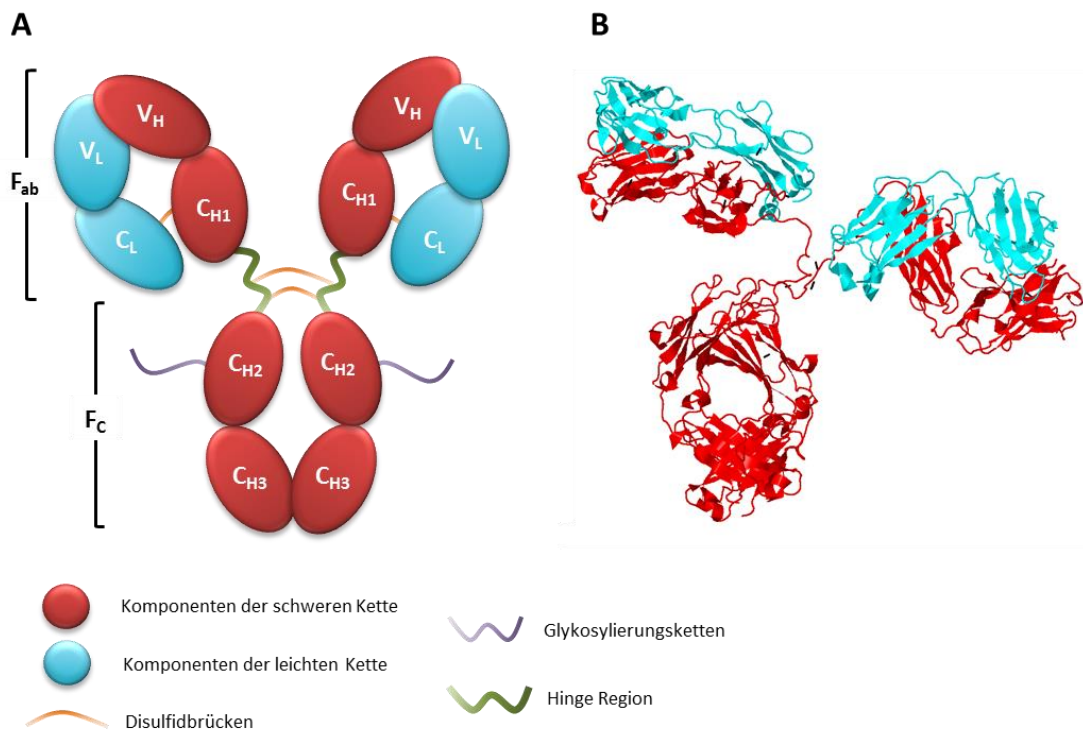


Abb. 11: Immunglobulin G und seine 3D-Struktur am Beispiel eines Maus-IgG₂. Modifiziert nach Harris *et al.*, 1997.

(A) IgG; **(Fab)** variabler Bereich; **(Fc)** konstanter Bereich; **(V_H)** variabler Bereich der schweren Kette; **(V_L)** variabler Bereich der leichten Kette; **(C_{H1} bis C_{H3})** konstante Bereiche der schweren Kette; **(C_L)** konstanter Bereich der leichten Kette; **(B)** 3D-Struktur eines Maus IgG₂ (PDB-ID: 1IGT); **(rot)** schwere Ketten; **(cyan)** leichte Ketten; **(schwarz)** Disulfidbrücken.

Aufgrund der vielfältigen Bindungsmöglichkeiten mit der gegebenen Spezifität werden Antikörper für medizinische und diagnostische Verfahren eingesetzt. Oft werden weitere bakterielle Proteine eingesetzt, welche die Antikörper selbst am F_c - oder auch F_{ab} -Fragment binden und diese immobilisieren können, die IBP.

1.6.2 IBP grampositiver Bakterien

Die Mehrheit der IBP grampositiver Bakterien binden an das F_c -Fragment der Antikörper, weisen dabei unterschiedliche Primärstrukturen auf und deuten damit verschiedene evolutionäre Entwicklungen pathogener Bakterien an. Die C-terminalen Enden der IBP grampositiver Bakterien sind sehr homolog und enthalten viele konservierte Bereiche, die meist für Verankerungsstrukturen der IBP in der bakteriellen Zellmembran kodieren. Das z. B. oft vorkommende LPXTG-Motiv ist in der kovalenten Bindung an das Peptidoglykan involviert. Das SpA- und das Sbi-Protein aus *Staphylococcus aureus* sowie das SpG (Protein G) von Streptokokken werden für analytische Zwecke

verwendet und sind in vielen kommerziellen Präparaten zu finden, da sie eine hohe Affinität zu einem weiten Spektrum an Antikörpern aufweisen.

IBP der Staphylokokken

Schon 1958 wurde die Fähigkeit von *S. aureus*, Antikörper zu präzipitieren, entdeckt. Später wurde diese Eigenschaft dem Ig-bindenden Protein, SpA (*Staphylococcal protein A*), zugeschrieben. SpA ist ein oberflächenassoziiertes Protein mit variabler Molekularmasse zwischen 45 und 57 kDa. Das Molekül besteht aus der Signalsequenz (S-Region) am N-terminalen Ende, fünf IgG-bindenden Domänen und dem C-terminalen Teil für die Verankerung in der Membran. Es können IgG-bindende Domänen in der Proteinstruktur von SpA fehlen, wodurch variable Massen dieses Proteins entstehen. SpA-Proteine sind hochgradig resistent gegenüber denaturierenden Bedingungen, thermo- und pH-stabil und können durch Trypsin nicht verdaut werden. Erst bei sehr hohen Salzkonzentrationen (7,5% (w/v) NaCl) wird die Biosynthese von SpA inhibiert. Durch Kultivierungen von *S. aureus* in Blut oder Blutserum wird die Expression von SpA verstärkt. SpA kann mit Immunglobulinen verschiedener Klassen (IgM, IgA, IgG und IgE) interagieren, wobei verschiedene Regionen der Ig (Fc, Fab) mit unterschiedlicher Affinität binden.

Weitere Ig-bindende Proteine der Staphylokokken sind das Sbi-Protein, welches dem SpA-Protein sehr ähnlich ist, das IsaB (*immunodominant staphylococcal antigen B*), ein dem TSST1-Toxin ähnliches SSL-Protein (*staphylococcal superantigen like*) und das SSL10. Diese binden ebenfalls an Immunglobuline, besitzen aber bei weitem nicht das Affinitätsspektrum von SpA. SSL10 und das diesem sehr ähnliche Protein SSL7 weisen am N-terminalen Ende eine globuläre Domäne mit einer β -Barrel – Struktur auf, welche Oligonukleotide, Oligosaccharide und Proteine binden kann und zusätzlich eine enzymatische Aktivität aufweist. Die Ig-Bindungsdomäne dieser SSL ist bislang noch nicht identifiziert worden; der Bindungsbereich beim Fc-Fragment liegt jedoch in der Region zwischen der C_{H2}- und der C_{H3}-Domäne der Antikörper (Sidarin und Solov'eva, 2011).

IBP der Streptokokken

Die grampositiven Streptokokken werden aufgrund der Stärke ihrer hämolytischen Wirkung in verschiedene Gruppen (A, B, C, D, F, G und H) eingeteilt, wobei die meisten Infektionen von der Gruppe A (GAS: *group A streptococcus*) herrühren. Die meisten der GAS-Gruppe zugehörigen IBP bilden die Superfamilie der M-Proteine (*mucoïd*) und sind oberflächenassoziierte, fimbriäre Proteine, die aus zwei Untereinheiten bestehen. Die beiden Untereinheiten bilden durch eine regelmäßige Abfolge von sieben AS, von denen jeweils die erste und die vierte unpolar sind, eine lange dimere α -Helix-Struktur (*coiled coil*). Wie die meisten IBP, sind die M-Proteine der Streptokokken multifunktional und können neben Immunglobulinen eine Reihe weiterer Proteine, wie z. B. Albumin, Fibrinogen oder Kininogen binden. Die Ig-Bindungsregionen können sich allerdings auch bei diesen IBP unterscheiden. So liegen z. B. die IgG Fc – Bindungsstellen von Protein H direkt an dem N-terminalen Ende des Moleküls, wohingegen sich beim M1-Protein die Bindungsstelle in der Mitte des Proteins befindet (Sidarin und Solov'eva, 2011).

Als erstes IBP der Streptokokken wurde ein Protein der Gruppen C und G der Streptokokken identifiziert, und zwar das 1977 entdeckte Protein SpG (Protein G). SpG kann alle vier Subtypen menschlicher und tierischer IgG-Antikörper binden und weist zusätzlich Affinität zu Albuminen, Kininogenen und α 2-Makroglobulinen auf, die wichtige Proteasen des Immunsystems der Wirbeltiere darstellen. SpG ist ebenfalls über sein C-terminales Ende in der bakteriellen Membran verankert und

weist wie die M-Proteine repetitive Sequenzen auf, die verschiedene IgG-Subtypen und andere Proteine mit unterschiedlichen Affinitäten binden können. Das SpG ist im Gegensatz zu den M-Proteinen kein Dimer, wobei die molekulare Masse von SpG stammabhängig ist und zwischen 58 kDa und 65 kDa variieren kann. SpG wird mittlerweile für viele diagnostische Zwecke eingesetzt und ist als rekombinantes Protein G fester Bestandteil vieler Affinitätschromatographischer Verfahren für die Aufreinigung von Immunglobulinen.

IBP-Komplexierung mit IgG

IBP sind in der Lage, verschiedene Bereiche von IgG zu binden und zeigen Unterschiede in ihren AS-Sequenzen, die für diese Bindung verantwortlich sind. Die meisten IBP grampositiver Bakterien binden an die IgG Fc-Region zwischen den beiden letzten konstanten Domänen (C_{H2} und C_{H3}) der schweren Kette (Sauer-Eriksson *et al.*, 1995). Aufgrund ihres ähnlichen Bindungsverhaltens konkurrieren SpA, SpG und M-Proteine untereinander um die Bindung an dieser Stelle (Lewis *et al.*, 2008). Obwohl SSL7 nur IgA-Moleküle bindet, liegt die Interaktionsstelle ebenfalls im Bereich zwischen C_{H2} und C_{H3} . Allerdings gibt es unter diesen IBP auch erhebliche Unterschiede in der physikochemischen Natur der Interaktion mit Immunglobulinen. SpG bindet über polare, geladene AS-Reste an die C_{H2} - C_{H3} -Region unter Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und ionischen Verbindungen. Die Interaktion zwischen SpA mit dem Fc-Fragment der Antikörper wird im Gegensatz zu SpG durch hydrophobe Interaktionen und nicht über polare Kontaktstellen stabilisiert. Es tritt auch nicht exakt die gleiche AS-Abfolge für den Kontakt der beiden Proteine am Fc-Fragment auf, wodurch sich die Bindungsstellen überlappen und die Proteine um die Bindung konkurrieren können (Lewis *et al.*, 2008). Auch in den Interaktionen mit dem Fab-Fragment von Immunglobulinen weisen SpA und SpG unterschiedliche Bindungsorte auf. SpA bindet an die variable Region (V_H) und SpG an die konstante Region (C_{H1}) der schweren Kette (Graille *et al.*, 2000; Sidorin und Solov'eva, 2011). Zusammenfassend kann man sagen, dass die IBP grampositiver Bakterien sich nicht nur im Ort und in der Art der Interaktionsstellen unterscheiden, sondern auch hinsichtlich der Bindungsbereiche der Immunglobuline und der Affinität, mit der die IBP an Antikörper binden, voneinander abweichen. Im Laufe der Evolution haben die Bakterien ganz offensichtlich verschiedene Strategien entwickelt, um dem Immunsystem des Wirtes zu widerstehen, so dass bei jedem neuentdeckten IBP die Bindungseigenschaften nicht genau vorhergesagt werden können und aufs Neue ermittelt werden müssen.

1.6.3 IBP gramnegativer Bakterien

Generell unterscheiden sich die IBP grampositiver und gramnegativer Bakterien nur geringfügig in ihrem Aufbau. Auch die IBP gramnegativer Bakterien besitzen eine Signalsequenz am N-terminalen Ende, die funktionellen Bereiche in der Mitte des Proteins und die C-terminale Verankerung in der Membran. Auch hier wurden die meisten IBP auf der Zellmembran der Bakterien detektiert (Labbé und Grenier, 1995). Ähnlich den grampositiven Bakterien werden einige IBP der gramnegativen Bakterien sekretiert und akkumulieren in den Kapseln oder werden weiter in die bakterielle Umgebung abgegeben (Tolo und Helgeland, 1991).

Bei verschiedenen *Yersinia*-Arten konnten IBP nur in *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* nachgewiesen werden. PsaA (auch pH6-Antigen) aus *Yersinia pestis* ist ein Oligomer mit hohem Molekulargewicht, welches Pili-ähnliche Strukturen auf der Zelloberfläche ausbildet. PsaA ist thermostabil, resistent gegenüber denaturierenden Agenzien und vielen Proteasen. Dabei kann PsaA

nur die humanen IgG der Subtypen 1, 2 und 3 binden und reagiert nicht mit den IgG anderer Vertebraten, was auf eine Spezialisierung bzw. Anpassung dieser Bakterien an den Menschen als Wirt hinweist. Weitere IBP von *Yersinia* sind das IBP14- und das IBP16-Protein mit Molekulargewichten von 14 und 16 kDa, die von *Y. pseudotuberculosis* exprimiert werden. Diese zeigen eine hohe Affinität zu IgG Fc-Fragmenten von Antikörpern aus Mensch und Kaninchen. IBP14 ist, wie PsaA, ein thermostabiles Protein und interagiert mit IgG Fc-Fragmenten am stärksten bei pH 6,0 (Sidorin *et al.*, 2006). IBP16 wurde als das Skp-Chaperon der *Y. pseudotuberculosis* identifiziert und reagiert mittels hydrophiler Aminosäuren mit der C_{H2}-C_{H3}-Region des Fc-Fragments (Sidorin *et al.*, 2009).

Weitere IBP gramnegativer Bakterien sind in *Fusobacterium nucleatum*, ein in Schleimhäuten des Mundbereichs vorkommender Erreger, identifizierte Proteine mit Molekulargewichten von 40 und 42 kDa, deren N-terminale AS-Sequenz homolog zur Sequenz des bakteriellen Porins FomA ist. In *Histophilus somni* – Stämmen (früher *Haemophilus somnus*) wurden vier IBP mit unterschiedlichen Molekulargewichten identifiziert, deren Affinität zu Immunglobulinen aus Rind mit zunehmender Größe ansteigt. Das größte der vier IBP aus *H. somni* (270 kDa) tritt wahrscheinlich in oligomeren Form auf und zeigt, neben der Fähigkeit, IgG, IgA und IgM aus Rindern zu binden, auch eine hohe Affinität gegenüber IgG aus Pferd, Kaninchen, Schwein, Katze, Hund und Schaf, jedoch keine Bindung an IgG aus Mensch, Maus, Ratte, Huhn und Meerschweinchen. Auch weitere IBP gramnegativer Bakterien weisen variierende Bindungsprofile gegenüber Immunglobulinen aus verschiedenen Spezies auf. IBP aus *Prevotella intermedia* interagiert z. B. mit IgG Fc aus Mensch, Affe, Schwein und Rind, zeigt aber keine Affinität zu IgG aus Kaninchen, Maus, Ratte und Schaf. Ein 30 kDa großes IBP aus *Pseudomonas maltophilia* besitzt die Fähigkeit, an IgG Fc-Fragmente aller humanen IgG-Subtypen und darüber hinaus an IgG aus Kaninchen sowie an IgG und IgA aus Maus zu binden und weist damit ein Bindungsprofil auf, wie es vorher noch nicht bekannt war (Sidorin und Solov'eva, 2011).

Auch die Fähigkeit zur Bindung von IBP an Fab-Fragmente beschränkt sich nicht auf grampositive Bakterien. Das 60 kDa große IBP aus *Helicobacter pylori*, welches auch als Hsp60 (*heat shock protein*) bezeichnet wird, interagiert mit Fab-Bereichen von humanem IgG und IgM und zeigt keine Affinität zu humanem IgA oder IgG aus Maus und Kaninchen (Amini *et al.*, 1996).

Ähnlich den IBP grampositiver Bakterien wird deren Expression bei gramnegativen Erregern durch Umwelteinflüsse wie Temperatur, pH-Wert oder Mediumzusammensetzung reguliert. Bei vielen gramnegativen Bakterien ist die Expressionsrate von IBP in der stationären Phase bei einer Temperatur von 37 °C am höchsten (Sandt *et al.*, 1997). Die maximale Expression von PsaA aus *Y. pseudotuberculosis* wurde z. B. bei 37 °C festgestellt, wobei der pH-Wert niedriger als 6,5 sein musste. Die Aktivität der IBP variiert in Abhängigkeit von unterschiedlichen Umweltbedingungen (Naberezhnykh *et al.*, 2006). Die höchste Aktivität von PsaA wurde z. B. bei 4 °C und einem pH-Wert von 6,0 gemessen, während andere IBP eine optimale Bindung bei einer Körpertemperatur der Wirbeltiere von 37 °C zeigten (Sidorin und Solov'eva, 2011).

IBP gramnegativer Bakterien können ebenfalls multifunktional sein und an andere Proteine des Wirtes binden. Diese Eigenschaften wurden allerdings noch zu wenig untersucht, und die strukturellen Details sind noch weitgehend unbekannt (Makoveichuk *et al.*, 2003). Außerdem können von einem Bakterienstamm mehrere IBP gleichzeitig exprimiert werden, wie z. B. die IBP aus *H. somni* und *E. coli* – Proteine der Eib-Familie (*E. coli* *immunglobulin binding proteins*), deren Mitglied, das EibG, in dieser Arbeit genauer untersucht wurde. Die Eib-Proteine können an IgG Fc-Fragmente von IgA und IgG binden und zeigen keine Affinität zu Fab-Fragmenten dieser Ig-Subtypen.

Abhängig von dem jeweiligen Stamm kann eines oder mehrere dieser IBP gleichzeitig exprimiert werden (Sandt und Hill, 2001; Lu *et al.*, 2006).

Abschließend muss angemerkt werden, dass IBP grampositiver Bakterien bei Weitem intensiver untersucht wurden als die gramnegativer Bakterien, so dass die Bindungsbereiche und Bindungsbedingungen von IBP gramnegativer Bakterien noch weitgehend unbekannt sind. Da IBP verschiedener grampositiver Bakterienpezies unterschiedliche Bindungsareale auf Immunglobulinen erkennen und die Affinitäten zu Antikörpern verschiedener Wirte stark variieren, ist zu vermuten, dass die Bindungsdomänen von IBP gramnegativer Bakterien auch ein hohes Ausmaß an Bindungsvariabilität hinsichtlich der Art und Stärke aufweisen.

1.7 EIB-FAMILIE

Die Proteine der Eib-Familie bilden eine Gruppe von sieben ähnlichen Proteinen EibA, EibC, EibD, EibE, EibF, EibG und EibH der Shiga Toxin produzierenden *E. coli* und gehören zu den Trimerischen Autotransporter Adhäsinen (TAA) (vgl. auch Kapitel 1.4). Eib-Proteine binden an die Fc-Fragmente von IgG und IgA verschiedener Tierspezies und erhöhen die Serumresistenz dieser Bakterien. Weiterhin sind einige dieser TAA an der Adhäsion an Epithelzellen beteiligt (Sandt und Hill, 2000; Sandt und Hill, 2001; Lu *et al.*, 2006; Leo *et al.*, 2011).

1.7.1 Entdeckung der Eib-Familie

Die erste Beschreibung der IgG-Fc Bindungsfähigkeit bei *E. coli* erfolgte von Sandt *et al.* (1997). Zelllysate von sechs *E. coli* – Stämmen aus der ECOR-Kollektion (*Escherichia coli reference collection*, Ochman und Selander, 1984) zeigten Affinitäten zu den Fc-Fragmenten von IgG aus Esel, Schaf, Ziege, Kaninchen und Mensch. Die Stämme ECOR-2, ECOR-9, ECOR-12, ECOR-43, ECOR-54 und ECOR-72 wurden daraufhin auch auf die Fähigkeit Fab-Fragmente zu binden untersucht, mit dem Ergebnis, dass nur Esel-IgG-Fab von diesen gebunden werden können. Alle anderen ECOR-Stämme waren bezüglich der IgG Fab-Bindung negativ. Durch Behandlungen der Zellen mit Proteinase K und Trypsin konnte nachgewiesen werden, dass sich die IgG-Bindungskomponenten auf der Oberfläche der *E. coli* befinden. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen haben dieses bestätigt und auch gezeigt, dass nicht alle *E. coli* – Zellen humanes IgG Fc binden können, wobei der Grund dafür in den verschiedenen Wachstumsstadien der jeweiligen Zellen zu liegen scheint. Eine maximale Expression von IgG Fc – bindenden Proteinen wurde bei 37 °C in der stationären Wachstumsphase sowohl im LB-Medium als auch in einer 1:10 Verdünnung des LB-Mediums festgestellt. Bei Temperaturen von 31 °C und 42 °C wurde nur noch eine sehr geringe Expression der IgG-bindenden Komponenten festgestellt, und bei 27 °C fehlte diese völlig. Interessant waren hier die SDS-PAGE – und die Westernblot–Untersuchungen der Zelllysate, die verschiedene Banden in höheren Molekulargewichtsbereichen zeigten (zwischen 100 und 250 kDa) und dadurch die Vermutung der Existenz von verschiedenen IgG-bindenden Proteinen in diesen Stämmen bestärkten (Sandt *et al.*, 1997).

1.7.2 Erste genetische Identifizierung der *eib*-Gene

Der Grund für die Variabilität im Molekulargewicht der neuentdeckten IgG-bindenden Proteine konnte drei Jahre später von derselben Arbeitsgruppe um Sandt aufgeklärt werden (Sandt und Hill,

2000). Durch Klonierungsarbeiten gelang es, die IgG-bindenden Bereiche im Genom zu lokalisieren. Vier verschiedene ORF (*open reading frames*) konnten an verschiedenen Stellen im *E. coli* – Genom den *eibA*-, *eibC*-, *eibE*- und *eibD*-Genen zugeordnet werden. In der Nähe der *eib*-Gene konnten zusätzlich Gene des Atlas-Prophagen nachgewiesen werden, womit der horizontale Gentransfer zwischen verschiedenen ECOR-Stämmen erklärt werden konnte. Im Referenzstamm ECOR-9 konnten alle vier *eib*-Gene identifiziert werden. Die anderen *eib*-positiven ECOR-Stämme wiesen mindestens zwei der *eib*-Gene auf. Zwei der identifizierten *eib*-Gene, *eibA* und *eibC*, wurden in direkter Verlinkung mit den *eea*-Genen vorgefunden, welche für ein Autotransporterprotein der SPATE-Familie (vgl. auch Kapitel 1.3.4) kodieren. SPATE-Proteine pathogener Bakterien verleihen diesen Bakterien unter anderem Serumresistenzen. Allerdings wurden die Experimente zur Serumresistenz in dieser Arbeit aus dem Jahr 2000 nur mit klonierten Eib-Proteinen und nicht mit den dazugehörigen *eea*-Genen durchgeführt, was eventuell die ohne hin schon sehr hohe Serumresistenz, welche durch die *eib*-Gene verursacht wird, eventuell noch gesteigert hätte. Die aus den Gen-Sequenzen ermittelten AS-Sequenzen für die vier Eib-Proteine ergaben kleinere Molekulargewichte als bis dato mittels SDS-PAGE detektiert worden war. EibA sollte mit 392 Aminosäuren ein 42 kDa großes Protein ausbilden; in Gelen wurden jedoch immer Banden zwischen 121 und 131 kDa detektiert. Ähnlich verhielt es sich auch mit den anderen Eib-Proteinen, deren AS-Ketten zwischen 487 und 511 Aminosäuren variieren und die in den Gelen etwa dreimal so große Proteinbanden ergaben wie aufgrund ihrer AS-Abfolge zu erwarten gewesen wäre. Diese Feststellung sowie die Sequenzhomologien zu dem OMP YadA aus *Yersinia*-Stämmen und UspAll aus *Moraxella catarrhalis* deuteten auf eine trimere Oligomerisierung der Eib-Proteine hin. Allerdings konnten die postulierten trimere Strukturen der Eib-Proteine selbst durch Behandlungen mit Detergenzien, 8 M Harnstoff oder hohe Temperaturen nicht monomerisiert werden. Erst eine Behandlung mit 88%igem (v/v) Phenol bei 70 °C (Hancock und Nikaido, 1978) führte zum Auftreten monomerer Strukturen der Eib-Proteine, wie sie gemäß der genetischen Identifizierung vorhergesagt wurden bzw. vorliegen sollten. Aufgrund von AS-Homologien konnten bestimmten Bereichen der Sequenzen Blöcke mit spezifischen Funktionen zugeordnet werden (vgl **Abb. 12**).

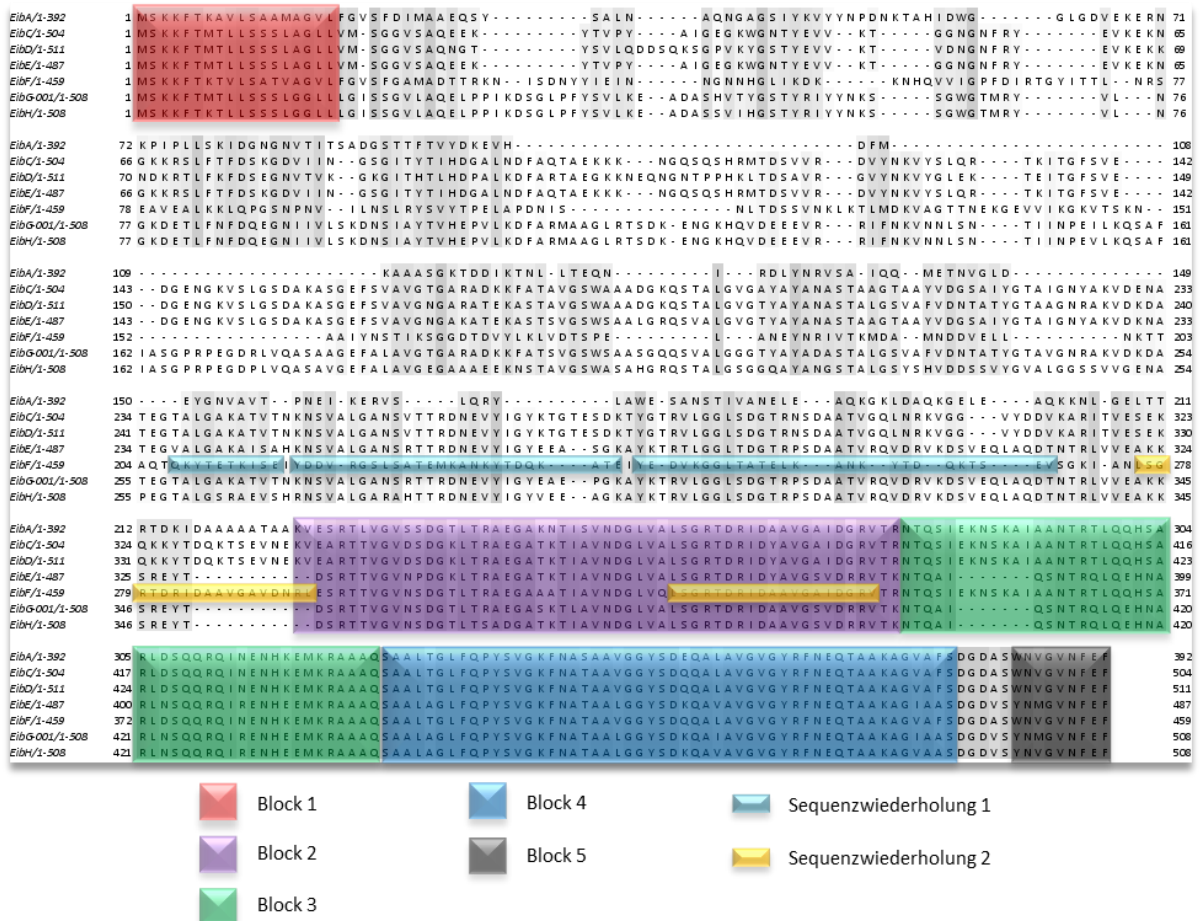


Abb. 12: AS-Sequenzvergleich von allen Mitgliedern der Eib-Familie mit konservierten und homologen Bereichen. Modifiziert nach Sandt und Hill, 2000; Sandt und Hill, 2001.

(**Block 1**) Signalsequenz; (**Block 2**) homologe Sequenz innerhalb der Eib-Familie; (**Block 3**) Bildung der *coiled-coil* Struktur; (**Block 4**) homologe Sequenz innerhalb einiger OMP, wie YadA und UspAll; (**Block 5**) Verankerung in der äußeren Bakterienmembran; (**Sequenzwiederholung 1**) EibF-Bereiche für die IgA-Bindung; (**Sequenzwiederholung 2**) EibF-Bereiche für die IgG-Bindung.

1.7.3 Homologien der Eib-Sequenzen

Weitere Untersuchungen der ECOR-Stämme auf mögliche IgA-Bindung durch Lysatkomponenten zeigten eine ungewöhnlich starke Affinität der Proteine des Referenzstammes ECOR-2 zu IgA (Sandt und Hill, 2001). Es konnte ein weiteres Eib-Protein, das EibF, identifiziert werden, welches sowohl IgG als auch IgA binden konnte und in der SDS-PAGE – Auftrennung multimere Strukturen bildete. Auch das Vorkommen der Phagengene, wie es schon für *eibA*, C, D und E festgestellt wurde, konnte für *eibF* nachgewiesen werden. Klonierungsarbeiten mit verschiedenen Bereichen des *eibF*-Gens führten zur Detektion verschiedener AS-Sequenzen für die Bindung an IgA und IgG sowie für die Multimerisierung von EibF. Dabei konnte die IgA-Bindung mehreren Wiederholungssequenzen innerhalb des *eibF*-Gens zugeordnet werden (**Abb. 12**, Sequenzwiederholung 1). Bei parallel dazu untersuchten Trägern des *eibA*-Gens aus dem Referenzstamm ECOR-9 konnte keine der drei IgA-Bindungssequenzen von EibF gefunden werden. Später durchgeführte Sequenzvergleiche konnten die bei EibF gefundenen IgA-Bindungsstellen lediglich für EibC und EibD nachweisen (Lu *et al.*, 2006). Dafür wurde eine weitere Sequenzwiederholung (**Abb. 12**, Sequenzwiederholung 2) entdeckt, die sowohl bei EibF als auch bei allen anderen bis dato identifizierten Eib-Proteinen vorkam. Dieser Bereich konnte experimentell als die IgG Fc-Bindungsdomäne identifiziert werden. Weiterhin konnte

gezeigt werden, dass für die Bereiche der IgA- und IgG-Bindung keine multimere Struktur des EibF-Proteins erforderlich ist; eine Oligomerisierung verstärkte jedoch die Bindung von EibF an Immunglobuline.

Aus allen bisherigen Untersuchungen mit Eib-Proteinen konnten aufgrund der Homologien in der DNA- und der abgeleiteten AS-Sequenz mehrere Bereiche bestimmt werden, die verschiedene Funktionen ausüben. In **Abb. 12** sind die AS-Sequenzen aller Eib-Proteine vergleichend dargestellt (*UniProt-Alignement*, Darstellung durch *Jalview*), wobei die konservierten Bereiche grau gekennzeichnet sind. Besonders das C-terminale Ende weist bei allen Eib-Proteinen große Homologien auf. Hier befinden sich die Sequenzen für die Verankerung in der Membran (Block 5), Sequenzen für die Ausbildung der *coiled-coil*-Struktur (Block 3), Bereiche mit hohen AS-Übereinstimmungen innerhalb der Eib-Proteine (Block 2) sowie AS-Homologien zu OMP anderer Bakterienspezies (Block 4). Auch die Signalsequenzen am N-terminalen Ende, welche für den Transport zu der bakteriellen Membran sorgen, sind unter den Eib-Proteinen konserviert (Block 1). Der Bereich zwischen Block 1 und Block 2 ist einerseits variabel, weist aber andererseits auch einige homologe Sequenzen auf (grau unterlegt). Da hier die Bindungsstellen für Immunglobuline vermutet werden, könnten aufgrund dieser Variation die unterschiedlichen Bindungsstärken von Eib-Proteinen zu IgG und IgA erklärt werden.

1.7.4 Kettenartige Aggregation der *E. coli* – Bakterien

Bei Untersuchungen von kettenbildenden Bakterien (Lu *et al.*, 2006) wurde 2006 ein neues *eibG*-Gen, und zwar das *eibG*, identifiziert, welches bei O91-Serotypen von *E. coli* für die kettenartige Adhäsion (CLA: *chain-like adhesion*) an Epithelzellen verantwortlich sein könnte. Schon im Jahr 2000 wurden kettenartige Adhäsionsmuster von *E. coli* aus Stuhlproben von Kindern in Brasilien beobachtet (Gioppo *et al.*, 2000). Diese wurden nur für Stämme beschrieben, die nicht mit Durchfall-Erkrankungen in Verbindung standen. Das *eibG*-Gen konnte in den Experimenten von Lu (Lu *et al.*, 2006) in 23 *E. coli* – Stämmen identifiziert werden, von denen zwei aus erwachsenen Patienten mit blutiger Diarrhö stammten. Alle *eibG*-positiven Stämme waren sowohl *eae*- als auch *saa*-negativ, exprimierten also nicht die Gene für die beiden STEC-Adhäsionsfaktoren, Intimin und Saa (STEC *autoagglutinating adhesin*). Die Ausweitung der Suche nach *eibG*-Genen auch bei nicht O91-Serotypen von *E. coli* ergab, dass *eibG* nur bei LEE-negativen O91-Serotypisierten sowie *eae*- und *saa*-negativen *E. coli* auftrat.

Nur fünf der von Lu *et al.* untersuchten *eibG*-positiven Stämme haben aber tatsächlich CLA ausgebildet. Durch Expression von *eibG* im *E. coli* – K-12 Stamm MC4100, der vorher keine Adhäsion an HEp-2 – Zellen (menschliche Epidermiskrebszellen: *human epidermoid cancer cells*) zeigte, konnte ebenfalls eine kettenartige Anhaftung erzielt werden. Somit konnte das beobachtete Adhäsionsverhalten bei *eibG*-positiven Stämmen an Epithelzellen auf das EibG-Protein zurückgeführt werden. Das EibG zeigt große AS-Übereinstimmung zu den EibC-, EibE- und EibD-Proteinen (bis zu 68% zu EibD) und etwas geringere Homologie zu den EibA- und EibE-Proteinen (45%). Dabei kann EibG humanes IgG und IgA binden und bildet multimere Formen in elektrophoretischen Auftrennungen. Das *eibG*-Gen ist, wie die *eibA*- und *eibC*-Gene, von Phagengenen flankiert, was einen horizontalen Gentransfer als sehr wahrscheinlich erscheinen lässt. Adhäsionstests mit den Referenzstämmen ECOR-2 (EibF) und ECOR-9 (EibACDE) zeigten, dass auch diese Stämme eine Adhäsion an HEp-2 – Zellen durchführen. Da diese *E. coli* – Stämme kein *eibG*-Gen besitzen, ist wahrscheinlich EibG nicht allein für die Adhäsion an Epithelzellen verantwortlich, sondern könnte

auch durch andere Eib-Proteine verursacht werden. Bis heute gibt es keine Untersuchungen von einzelnen isolierten *eib*-Genen, die belegen könnten, welches der Eib-Proteine ebenfalls eine Adhäsion an Epithelzellen vermitteln kann, und ob Epithelzellen für die Autoagglutination von *E. coli* notwendig sind.

Bisher konnte eine Ausbildung von Ketten bei Bakterien nur bei Streptokokken beobachtet werden, deren Kettenausbildung schon während der Zellteilung einsetzt und teilweise durch Sauerstofflimitierung reguliert wird. Im Jahr 1994 wurden bei maritimen Bakterien SW5 aus der Gattung *Mariniflexile* kettenartige Agglomerate nachgewiesen (Dalton *et al.*, 1994), die auf die Anhaftung der gramnegativen Bakterien an hydrophile Oberflächen zurückgeführt werden konnte. Mit den bereits beschriebenen Untersuchungen von *E. coli* aus Stuhlproben brasilianischer Kinder (Gioppo *et al.*, 2000) gab es erste Hinweise auf kettenbildende *E. coli*. Der Grund für die Kettenbildung konnte zwar nicht ermittelt werden, jedoch führten die Untersuchungen von Lu *et al.* (2006) zur Entdeckung von EibG, für das eine Beteiligung an der Kettenausbildung bei *E. coli* postuliert wurde. Im Jahr 2009 wurden kettenförmige Agglomerate beim *E. coli* K-12 Stamm SAR19 entdeckt und deren Vorkommen auf das Autotransporterprotein Antigen43 zurückgeführt (Vejborg und Klemm, 2009). Dieses wird vorwiegend an den Polen der Bakterienzellen exprimiert und ist durch die interzelluläre Ag43-Ag43 – Verknüpfung Urheber der Kettenbildung. Bei Klonierungsarbeiten konnte festgestellt werden, dass bei einer Überexpression von Antigen43 dieses nicht mehr an den Zellpolen, sondern peritrich auf die ganze Oberfläche von *E. coli* verteilt wird und eine verstärkte Agglomeration in Form von Zellklumpen verursacht. Die Studien von Jain *et al.* (2006) hatten schon zuvor gezeigt, dass bestimmte Autotransporterproteine in WT-Stämmen gramnegativer Bakterien mit intakter LPS-Expression polar sezerniert werden. Da viele K-12 – Laborstämme Störungen in den LPS-Synthesewegen aufweisen, konnte die Kettenausbildung nur selten beobachtet werden. *E. Coli* SAR19 weist eine intakte LPS-Expressionsmaschinerie auf, wobei eine Kettenausbildung auch bei normalen Expressionsraten von Ag43 beobachtet werden konnte (Vejborg und Klemm, 2009).

Im Gegensatz zu den maritimen SW5-Stämmen kann *E. coli* SAR19 sowohl auf hydrophilen als auch auf hydrophoben Oberflächen kettenförmige Agglomerate ausbilden. Dies bestärkte die Vermutung, dass Antigen43 erst in der späteren Biofilmformation eine Rolle spielt und nicht der initialen Adhäsion an Oberflächen dient. Der Wildtypstamm *E. coli* 83972, der für Harnwegserkrankungen verantwortlich ist, bildete ebenfalls Ketten aus, jedoch nicht bei stationären Kultivierungsbedingungen, was ihn von dem SAR19-Stamm unterschied und auf eine abweichende Regulierung der Antigen43-Expression zurückgeführt wurde (Vejborg und Klemm, 2009). In welchem Ausmaß sich ändernde Umweltbedingungen auf die Gene der Kettenausbildung auswirken, ist bislang noch nicht untersucht worden.

Die Experimente von Lu *et al.* (2006) beinhalteten keine Arbeiten zu anderen möglichen Autotransporterproteinen, und in der Arbeit von Vejborg (Vejborg und Klemm, 2009) wurden keine Experimente mit Eib-Proteinen oder anderen TAA durchgeführt. Dies negiert natürlich nicht die Aussagen der durchgeführten Experimente, lässt aber einen Spielraum für weitere mögliche Beteiligung anderer Adhäsionsfaktoren an der Kettenausbildung offen.

1.8 ZIELSETZUNG

Durch die im Vorfeld zu dieser Arbeit von Frau Dr. med. Barbara Ohder durchgeführten Studien zu EibG konnte das *eibG*-Gen in 36 von insgesamt 379 untersuchten STEC-Stämmen identifiziert werden. Adhäsionstests, die mit humanen intestinalen Epithelzellen durchgeführt wurden, zeigten das Auftreten unterschiedlicher STEC-Phänotypen hinsichtlich ihrer Bindungsmuster. Unter den 36 *eibG*-positiven *E. coli* – Stämme wurden Kettenformationen (CLAP) unterschiedlicher Länge detektiert, die stammspezifisch waren. Weiterhin wurden mittels SDS-PAGE und Immunblot ebenfalls stammspezifische und unterschiedliche EibG-Expressionen nachgewiesen.

Die auf diesen Erkenntnissen aufbauende vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die möglichen Ursachen für die beobachtete phänotypische Variabilität aufzuklären. Dabei sollten das *eibG*-Gen und eventuelle Mutationen unter Zuhilfenahme der von Lu *et al.* (2006) beschriebenen Primer im Genom der 36 *eibG*-positiven STEC identifiziert und die *eibG*-Gene sequenziert werden. Daraus ergab sich die Frage, ob die Unterschiede in der EibG-Protein – Expression der verschiedenen STEC-Stämme auf Variabilitäten innerhalb des *eibG*-Gens beruhen und ob es darüber hinaus einen Zusammenhang zu den verschiedenen CLAP und den jeweiligen STEC-Serotypen gibt. Neben den humanen Epithelzellen standen für die geplanten Adhäsionstests stand intestinale Epithelzellen aus weiteren Säugetierspezies zur Verfügung, wobei bovine Epithelzellen besonders intensiv auf mögliche Unterschiede der CLAP-Muster im Vergleich zu humanen intestinalen Epithelzellen untersucht werden sollten. Nach Transfer des *eibG*-Gens in *E. coli* mit (im Vergleich zu den Wildtypstämmen) abweichendem genetischen Hintergrund war darüber hinaus der Vergleich der von *eibG*-positiven Wildtypstämmen hervorgerufenen Kettenausbildung und den generierten *eibG*-Klonen von besonderem Interesse. Als nächstes sollte die Frage beantwortet werden, ob die Kettenausbildung durch die Zusammensetzung des Kulturmediums oder durch unterschiedliche Kultivierungsbedingungen, wie sie z. B. bei statischen und geschüttelten Kulturen vorliegen, beeinflusst wird und ob der *E. coli* – Serotyp bei der Ausprägung unterschiedlicher Phänotypen eine Rolle spielt.

Ein weiteres Ziel bestand darin, das EibG-Protein von den restlichen *E. coli* – Proteinen abzutrennen und mit EibG-angereicherten Präparationen dessen Aminosäuresequenz massenspektrometrisch mittels MALDI-MS zu bestimmen. Mit dieser Technik sollte es dann auch möglich sein, Sequenzunterschiede im Vergleich zu weiteren Mitgliedern der Eib-Familie zu ermitteln. Das Auftreten von verschiedenen oligomeren Formen von EibG in der SDS-PAGE und in Immunblots sollte gegebenenfalls zur Aufreinigung von EibG ausgenutzt werden. Affinitätsbestimmungen von EibG gegenüber IgG verschiedener Säugerspezies, insbesondere von domestizierten bzw. landwirtschaftlich genutzten Tieren, sollten Aussagen zur Interaktion von EibG mit dem humoralen Immunsystem erlauben. Dazu musste eine speziell auf EibG zugeschnittene ELISA-Methode mit verschiedenen Immobilisierungs- und Detektionsmethoden etabliert werden.

Die Ermittlung der Beteiligung von EibG an der *E. coli* – Biofilmbildung war ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Doktorarbeit. Der zeitliche Verlauf und die Stärke der Biofilmbildung von *eibG*-positiven STEC-Wildtypstämmen und Klonen sollten ermittelt und die Unterschiede unter Berücksichtigung des jeweiligen Serotyps bzw. der *eibG*-Expression evaluiert werden. Als weiteres Vorhaben war geplant, das Proteom von *eibG*-positiven Wildtypstämmen unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen auf Veränderungen zu überprüfen. Dazu sollten eine 2D-Gelelektrophoresemethode entwickelt und das Proteom von *eibG*-positiven *E. coli* einerseits auf die durch Variation der Kultivierungsparameter beruhenden Unterschiede und andererseits auf das

Vorkommen von Proteinen, die in die Biofilmbildung involviert sind, massenspektrometrisch analysiert werden. Das finale Ziel bestand darin, mittels 3D-Modellierung den strukturellen Besonderheiten und verschiedenen submolekularen Bereichen von EibG eine mögliche Funktion bei zellulären Interaktionsprozessen zuzuordnen.

2. MATERIALIEN

2.1 CHEMIKALIEN

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck Biosciences, Schwalbach; Carl Roth, Karlsruhe; BioRad Laboratories, München; Greiner Bio-One, Frickenhausen; Eppendorf, Hamburg; Peqlab Biotechnologie, Erlangen; Nunc, Wiesbaden; Applichem, Darmstadt; Sigma-Aldrich, Taufkirchen; PE Applied Biosystems, Weiterstadt; Qiagen, Hilden; PAA Laboratories, Cölbe; Novagen (Merck KGaA), Darmstadt; Cell signaling technology, Boston (MA, USA); Serva, Heidelberg; Lonza, Köln; Fluka (Sigma-Aldrich), Taufkirchen; New England BioLabs, Ipswich (MA, USA); Dako, Hamburg; Affimetrix, High Wycombe (Wales, UK); Finnzymes, Espoo, Finnland; Biochrom, Berlin; Thermo Fisher Scientific, Ulm; Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden; USB Amersham, Cleveland (OH, USA); BD (Becton, Dickinson und Company), Heidelberg und Promega, Mannheim bezogen.

Chemikalie	Hersteller
10x Taq+KCl Puffer (ohne MgCl ₂)	Qiagen
2-Mercaptoethanol	Carl Roth
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat (BCIP)	Carl Roth
5x Enhancer	Qiagen
<i>Accutase</i>	PAA Laboratories
Aceton	Carl Roth
Acrylamid	Carl Roth
Agar-Agar	Carl Roth
Agarose (low EEO, Typ I)	Sigma-Aldrich
Aluminiumsulfat Hexadecahydrat	Sigma-Aldrich
Ameisensäure	Sigma-Aldrich
Ammoniumhydrogencarbonat	Carl Roth
Ammoniumperoxidsulfat	Carl Roth
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth
<i>Benzonase Nuclease</i>	Novagen
Bromphenolblau	Merck
BSA (Fraction V, lyophilisiert)	Serva
Calciumchlorid	Carl Roth
CHAPS	Sigma-Aldrich
<i>CHELEX</i>	Qiagen
CMF-PBS	Lonza
DAPI	Cell signaling technology
dATP	Qiagen
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat	Fluka
Dithiothreitol	Fluka
DMEM F12 (ZK-Medium)	Lonza
dNTP	Qiagen
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	Fluka
Essigsäure	Carl Roth
Ethanol	Carl Roth
Ethidiumbromid	BioRad
Exonuklease I	New England BioLabs
<i>ExoSAP-IT – Mix</i>	Affymetrix
FBS-Gold	PAA Laboratories

Fischhautgelatine	Sigma-Aldrich
Fluorescent mounting medium	Dako
Folin-Ciocalteu-Phenol	Sigma-Aldrich
Formaldehyd (37%)	Merck
Giemsa-Konzentrat	Carl Roth
Glucose (D)	Sigma-Aldrich
Glutamin (L)	Lonza
Glycerin (86%, 99%)	Carl Roth
Harnstoff	Carl Roth
Hefeextrakt	Carl Roth
HEPES	Carl Roth
HiDi Formamid	PE Applied Biosystems
<i>High-fidelity DNA-Polymerase Phusion Hot Start II</i>	Finnzymes
Iodacetamid	Fluka
Isopropyl-thio-galaktosid	Carl Roth
Kaliumchlorid	Carl Roth
Kalium-Natrium-Tartrat	Merck
Kollagen A	Biochrom AG
Kupfer-II-sulfat	Merck
Lysozym	Roche
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Carl Roth
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Carl Roth
Methanol	Carl Roth
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	Carl Roth
N,N'-Methylenbisacrylamid (Bis)	Serva
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumdesoxycholat	AppliChem
Natriumdodecylsulfat	Serva
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydroxid-Plätzchen	AppliChem
Natriumkarbonat	Merck
Natrium-Pyruvat	AppliChem
Natriumthiosulfat	Fluka
Nitroblau-Tetrazolium	Sigma-Aldrich
n-Octyl- β -D-glucopyranosid	AppliChem
o-Phenylendiamin	Thermo Fisher Scientific
Pepton aus Soja	Carl Roth
<i>Protease Inhibitor Mix</i> – Tablette	Roche
RPMI 1640 (ZK-Medium)	Lonza
Saccharose	Carl Roth
Salzsäure (25%)	Carl Roth
<i>Servolyte</i>	Serva
<i>Shrimp</i> alkalische Phosphatase	USB Amersham
Silbernitrat	Sigma-Aldrich
Taq-Polymerase	Qiagen
Trichloressigsäure	Carl Roth
Trifluoressigsäure	Sigma-Aldrich
tri-Natriumphosphat-Dodecanhydrat	Carl Roth
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (Ultra)	Carl Roth
Tris-hydrochlorid	Carl Roth
Trypton/Pepton aus Casein	Carl Roth
TSB-Medium	BD
Tween 20	Merck
Wasserstoffperoxid (30%)	Carl Roth
X-Gal	Carl Roth

2.2 ANTIKÖRPER

Antikörper (aus Spezies)	Hersteller	Produkt-Nr.
IgG (Mensch)		009-000-003
IgG-HRP (Mensch)		009-030-003
IgG Fc-HRP (Mensch)		009-030-008
IgG Fc – Alexa-488, Alexa Fluor® 488-ChromPure (Mensch)	Jackson ImmunoResearch, Europe Ltd.	009-540-003
IgG-HRP (Rind)		001-030-003
IgG-HRP (Schaf)		013-030-003
IgG-HRP (Ziege)		005-030-003
IgG-HRP (Huhn)		003-030-003
IgG anti-humanes IgG (H+L), 12 nm Gold-konjugat (Ziege)		109-205-088

2.3 TECHNISCHE GERÄTE

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
ABI-Sequenzierer	<i>ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyser</i>	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Analysewaage	<i>CPA225D</i>	Sartorius, Göttingen
Autoklav	<i>Varioklav E500</i>	H+P Labortechnik, München
CO ₂ -Inkubator	<i>Hera Cell</i>	Kendro, Hanau
CO ₂ -Inkubator	<i>MCO-20 AIC</i>	Sanyo, München
CO ₂ -Inkubator	<i>B50/61 EC/CO2</i>	Heraeus, Hanau
ELISA Reader	<i>Opsys MR</i>	Dynex, Berlin
Heizrührer	<i>SB162</i>	Stuart, Staffordshire, UK
Kryotank	<i>600 Serie, MVE TEC 3000</i>	Chart, Solingen
Lyophilisator	<i>Alpha Christ</i>	Martin Christ GmbH, Osterode am Harz
Mehrkanalpipette	<i>Transferpette®-8</i>	Brand, Wertheim
Mikroskop (invers)	<i>Axiovert 25</i>	Zeiss, Jena
Mikroskop (invers)	<i>Axiovert 40</i>	Zeiss, Jena
Mikroskop (Fluoreszenz)	<i>Axiolmager A1</i>	Zeiss, Jena
NanoDrop	<i>Nanodrop 2000</i>	Thermo Fisher Scientific, Ulm
nanoESI Q-ToF	<i>SYNAPT G2-S</i>	Micromass/Waters, Manchester, UK
o-TOF Massenspektrometer	<i>oTOF: prOTOF</i>	Perkin-Elmer (Waltham, MA, USA)
o-TOF Massenspektrometer	<i>MALDI: QStar</i>	AB Sciex, MDS Sciex, Concord, Canada
PCR-Cycler	<i>TPersonal 20</i>	Biometra, Göttingen
PCR-Cycler	<i>TPersonal 48</i>	Biometra, Göttingen
Peristaltikpumpe (UF)	<i>FH15</i>	Thermo Fisher Scientific, Ulm
pH-Meter	<i>Seven Easy</i>	Mettler Toledo, Gießen
pH-Meter	<i>766 Calimatic</i>	Knick, Berlin
Photo-Imager	<i>ChemiDoc XRS</i>	BioRad, München
Pipetten	<i>Research, Reference</i>	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	<i>Pipetboy acu</i>	IBS Integra Bioscience, Zizers, Schweiz
Schüttelinkubator	<i>Certomat R/H</i>	Sartorius BBI Systems, Melsungen
SDS-PAGE-Apparatur	<i>BioRad Protean 3</i>	BioRad, München
Sicherheitswerkbank (<i>E. coli</i>)	<i>BioChemGARD® e3 Class II Type B2</i>	Baker Company, Sanford, Maine, USA
Sicherheitswerkbank (Zellkultur)	<i>SterilGuard Class II Type A/B3</i>	Baker Company, Sanford, Maine, USA

Speedvac	<i>Concentrator 5301</i>	Eppendorf, Hamburg
Tankblottingapparatur	<i>Universal 320 R</i>	BioRad, München
TEM	<i>FEI-Tecnai 12 electron microscope</i>	FEI, Eindhoven, Netherlands
Tischzentrifugen	<i>Mini Spin Plus</i>	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifugen	<i>Biofuge A</i>	Hettich, Tuttlingen
Trockenschrank	<i>ULM 500</i>	Memmert, Schwabach
Ultraschallbad	<i>5510</i>	Branson, Dietzenbach
Ultrazentrifuge	<i>Optima L</i>	Beckman Coulter, Krefeld
Vortexer	<i>Genie 2</i>	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Vortexer	<i>Vortex Genius 3</i>	IKA, Staufen
Waage	<i>Scout 2</i>	OHAUS, Pine Brook, NJ, USA
Waage	<i>Explorer</i>	OHAUS, Pine Brook, NJ, USA
Waage	<i>MP-300</i>	Chyo, Japan
Wasseraufbereitungssystem	<i>Synergy UV</i>	Millipore Corporation, Billerica, USA
Wasserbad	<i>SWB 25</i>	Haake, Karlsruhe
Wasserbad	<i>Typ 1063</i>	GFL, Burgwedel
Wippe	<i>KS250 BASIC</i>	IKA LABORTECHNIK, Staufen
Wippe	<i>Vari Mix Platform Rocker, M79735</i>	Thermo Fisher Scientific, Ulm
Zentrifuge	<i>Rotana 480 RS</i>	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge	<i>Universal 320 R</i>	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge	<i>MiniSpin plus</i>	Eppendorf, Hamburg

2.4 WEITERE VERBRAUCHSMATERIALIEN

Materialien	Bezeichnung	Hersteller
Chemolumineszenz – Kit	<i>SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate</i>	Thermo Fisher Scientific, Ulm
Dialyse-Schläuche	12-14 kDa, Größen 5 und 10	Medicel International Ltd., UK
DNA-Aufreinigung – Kit	<i>Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System</i>	Promega, Mannheim
Dotblot-Apparatur	<i>96-well Dot Blot Hybridization Manifold</i>	Denville Scientific Inc., USA
Gewebekulturflaschen	<i>tissue flask</i> , T-Flasche, 25 mL und 75 mL	Corning, Wiesbaden
Kapillarenzieher	ESI-MS Kapillarenzieher	Hilgenberg, Malsfeld
Klonierungsvektor	<i>pGEM-T Easy</i>	Promega, Mannheim
MTP für Zellkultur	<i>Cellstar</i>	Greiner, Frickenhausen
MultiScreen HV Platte	<i>MultiScreen®_{HTS} HV 96-well-Platten</i>	Millipore, Merck, Schwalbach
Nitrocellulosemembran	Protran BA85 Nitrocellulose-Membrane	Whatman, GE, Freiburg
PCR-Produktaufreinigungen – Kit	<i>QIAquick PCR Purification – Kit</i>	Qiagen, Hilden
Protein Konzentrationsbestimmungs – Kit	<i>BioRad Protein Assay Dye Reagent Concentrate</i>	BioRad, München
QIAquick PCR Purification – Kit	<i>QIAquick PCR Purification – Kit</i>	Qiagen, Hilden
Sequenzierungs – Kit	<i>ABI Prism BigDye™ Terminator Reaction Cycle Sequencing – Kit</i>	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Sterilfilter	0,2 µm Porengröße	Whatman, GE, Freiburg
TEM-Grids	Formvar-Karbonfilm beschichtet, 200 mesh	Science Services GmbH, München
Ultrafiltrationseinheit	<i>Vivaflow 200</i>	Sartorius Stedim, Göttingen
Ultrafiltrationseinheit	<i>Vivaspin 6, Vivaspin 20</i>	Sartorius Stedim, Göttingen

UZ-tubes	<i>Tube, 13,2 mL, Thinwall, Ultra-Clear™</i>	Beckman Coulter, Krefeld
UZ-Rotor	SW 41 Ti Rotor, Swinging Bucket, Titanium	Beckman Coulter, Krefeld
ZipTip Entsalzungstips	ZipTip-C ₁₈ -Spitzen	Millipore, Merck, Schwalbach

2.5 SOFTWARE

Software	Hersteller
<i>Delta2D, Demoversion</i>	Decodon, Greifswald
<i>LC2Tune</i>	PE-Sciex, Concord, Canada
<i>Jalview, Version 2</i>	Java, EMBL-EBI, Dundee, Scotland, UK
<i>m over z</i>	Genomic Solutions, Huntingdon, UK
<i>MS-Fit</i>	UC San Francisco, CA, USA
<i>Mascot</i>	Matrix Science Inc., Boston, MA, USA
<i>Mikroskopie-Software</i>	AxioVision LE, Carl Zeiss Ltd., Cambridge, UK
<i>Office-Packet, 2010</i>	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
<i>oMALDI-Server</i>	Applied Biosystems, MDS-Sciex, Concord, Canada
<i>Photoshop, 4CS</i>	Adobe Systems, San Jose, CA, USA
<i>ProFound</i>	The Rockefeller University, New York, NY, USA
<i>Ridom Seqsphere, Version 0.9 beta</i>	Ridom GmbH, Würzburg
<i>TOF-MA</i>	Spicer und Ens, Universität Manitoba, Winipeg, Canada
<i>TOFmulti</i>	Spicer und Ens, Universität Manitoba, Winipeg, Canada
<i>Vector NTI</i>	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
<i>Windows 7, Ultimate</i>	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
<i>Windows XP</i>	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA

2.6 BIOLOGISCHES MATERIAL

2.6.1 Intestinale Epithelzelllinien

Die humane Zelllinie HCT-8 (*human ileocecal adenocarcinoma epithelial cells*) wurde von der ATCC (*American Type Culture Collection*) durch LGC Standards GmbH, Wesel, bezogen (ATCC CCL-244).

Die bovine Zelllinie FDK-R 971 aus Rind (*fetal intestinal jejunal epithelial cell*) wurde vom Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit (FLI), Greifswald, Insel Riems, erhalten.

2.6.2 Verwendete STEC Wildtyp-Stämme

Stamm-Nr.	Serotyp	stx-Typ	Stamm-Nr.	Serotyp	stx-Typ
06-03233	O152:H ⁻ [H14]	1	393/98	O91:H ⁻ [H14]	1
06-03229	O152:H ⁻ [H14]	1	4798/97	O91:Hnt [H14]	1
1809/00	O91:H14 [H14]	1	02-07123	O91:H ⁻ [H14]	1
06-08452	O91:H ⁻ [H14]	1	4884/97	OR:Hnt [H14]	1
27358/97	O91:H14 [H14]	1	2875/96	O91:H14 [H14]	1
4308/98	O91:H14 [H14]	1	3671/97	O91:H ⁻ [H14]	1
3558/96	Ont:H ⁻ [H14]	1	4789/97-1	O146:H21	1+2d
7140/96	O91:H ⁻ [H14]	1	4141/96	OR:H21	1
6705/95	OR:H14 [H14]	1	4831/97	OR:H45	2d
07-00349	O91:H ⁻ [H14]	1	6451/98	OR:H45	2+2d
172/98	OR:H ⁻ [H14]	1	0550/01	O91:H14 [H14]	1
01/E243	O91:H ⁻ [H14]	1	06-07635	O91:H14 [H14]	1
02-03777	O91:H ⁻ [H14]	1	06-07349	O91:H14 [H14]	1
07-00739	O91:H ⁻ [H14]	1	ST234	O146:H28	2
4792/97	O91:H ⁻ [H14]	1	ST295/1	O146:H28	2
6561/95	Ont:H ⁻ [H14]	1	99-02787	OR:H10	1
07-00740	O91:H ⁻ [H14]	1	0519/99	OR:Hnt	2d
02-03884	O91:H ⁻ [H14]	1	0520/99	Ont:H30	2d

2.6.3 In dieser Arbeit hergestellte gentechnisch veränderte Organismen (GVO)

Gen-Spender		Gen-Empfänger		Entstandene GMO		Nukleinsäuren	
Bezeichnung	Serotyp	Bezeichnung	Bezeichnung	<i>eibG</i> -Subtyp	Primer-Paar	Allel	
<i>E. coli</i> – 1809/00	O91:H14	<i>E. coli</i> – DH5α	K-1-10	<i>eibG</i> -α	orf1FW/orf1RW	<i>eibG</i> -001	
<i>E. coli</i> – 1809/00	O91:H14	<i>E. coli</i> – BL21(DE3)	B-1-10	<i>eibG</i> -α	orf1FW/orf1RW	<i>eibG</i> -001	
<i>E. coli</i> – 1809/00	O91:H14	<i>E. coli</i> – DH5α	K-1-13	<i>eibG</i> -α	orf1FW/orf1RW	<i>eibG</i> -001	
<i>E. coli</i> – 1809/00	O91:H14	<i>E. coli</i> – BL21(DE3)	B-1-13	<i>eibG</i> -α	orf1FW/orf1RW	<i>eibG</i> -001	
<i>E. coli</i> – 1809/00	O91:H14	<i>E. coli</i> – DH5α	K-1-22	<i>eibG</i> -α	orf1FW/orf1RW	<i>eibG</i> -001	
<i>E. coli</i> – 1809/00	O91:H14	<i>E. coli</i> – BL21(DE3)	B-1-22	<i>eibG</i> -α	orf1FW/orf1RW	<i>eibG</i> -001	
<i>E. coli</i> – 06-03233	O152:H ⁻ [H14]	<i>E. coli</i> – DH5α	K-20-1	<i>eibG</i> -β	orf1FW/orf1RW	<i>eibG</i> -020	
<i>E. coli</i> – 06-03233	O152:H ⁻ [H14]	<i>E. coli</i> – BL21(DE3)	B-20-1	<i>eibG</i> -β	orf1FW/orf1RW	<i>eibG</i> -020	
<i>E. coli</i> – 172/98	OR:H ⁻ [H14]	<i>E. coli</i> – DH5α	K-5-1	<i>eibG</i> -α	orf1FW/orf1RW	<i>eibG</i> -014	
<i>E. coli</i> – 172/98	OR:H ⁻ [H14]	<i>E. coli</i> – DH5α	K-5-4	<i>eibG</i> -α	orf1FW/orf1RW	<i>eibG</i> -014	
<i>E. coli</i> – 4884/97	OR:Hnt [H14]	<i>E. coli</i> – DH5α	K-11-8	<i>eibG</i> -α	orf1FW/orf1RW	<i>eibG</i> -015	
<i>E. coli</i> – 4884/97	OR:Hnt [H14]	<i>E. coli</i> – DH5α	K-11-10	<i>eibG</i> -α	orf1FW/orf1RW	<i>eibG</i> -015	
<i>E. coli</i> – 0520/99	Ont:H30	<i>E. coli</i> – BL21(DE3)	B-18-2	<i>eibG</i> -γ	<i>eibG</i> _3305f/orf1RW	<i>eibG</i> -021	
<i>E. coli</i> – 0520/99	Ont:H30	<i>E. coli</i> – JM109	J-18-7	<i>eibG</i> -γ	<i>eibG</i> _3305f/orf1RW	<i>eibG</i> -021	

<i>E. coli</i> – 0520/99	Ont:H30	<i>E. coli</i> – BL21(DE3)	B-18-7	<i>eibG</i> - γ	<i>eibG</i> _3305f/orf1RW	<i>eibG</i> -021
<i>E. coli</i> – 4141/96	OR:H21	<i>E. coli</i> – BL21(DE3)	B-19-11	<i>eibG</i> - γ	<i>eibG</i> _3305f/orf1RW	-
<i>E. coli</i> – 4789/97-1	O146:H21	<i>E. coli</i> – BL21(DE3)	B-10-9	<i>eibG</i> - α	<i>eibG</i> _3305f/orf1RW	<i>eibG</i> -015
<i>E. coli</i> – 03/06687	O128:H2	<i>E. coli</i> – BL21(DE3)	B-H-7	<i>eibE</i>	orf1FW/orf1RW	-
<i>E. coli</i> – 03/06687	O128:H2	<i>E. coli</i> – BL21(DE3)	B-H-10	<i>eibE</i>	orf1FW/orf1RW	-
<i>E. coli</i> – 0653/99	O128:H2	<i>E. coli</i> – BL21(DE3)	B-22-5	<i>eibE</i>	orf1FW/orf1RW	-
<i>E. coli</i> – 1809/00	O91:H14	<i>E. coli</i> – DH5 α	K-1-10	<i>eibG</i> - α	orf1FW/orf1RW	<i>eibG</i> -001
<i>E. coli</i> – 1809/00	O91:H14	<i>E. coli</i> – BL21(DE3)	B-1-10	<i>eibG</i> - α	orf1FW/orf1RW	<i>eibG</i> -001
<i>E. coli</i> – 1809/00	O91:H14	<i>E. coli</i> – DH5 α	K-1-13	<i>eibG</i> - α	orf1FW/orf1RW	<i>eibG</i> -001
<i>E. coli</i> – 1809/00	O91:H14	<i>E. coli</i> – BL21(DE3)	B-1-13	<i>eibG</i> - α	orf1FW/orf1RW	<i>eibG</i> -001
<i>E. coli</i> – 1809/00	O91:H14	<i>E. coli</i> – DH5 α	K-1-22	<i>eibG</i> - α	orf1FW/orf1RW	<i>eibG</i> -001
<i>E. coli</i> – 1809/00	O91:H14	<i>E. coli</i> – BL21(DE3)	B-1-22	<i>eibG</i> - α	orf1FW/orf1RW	<i>eibG</i> -001
<i>E. coli</i> – 06-03233	O152:H ⁻ [H14]	<i>E. coli</i> – DH5 α	K-20-1	<i>eibG</i> - β	orf1FW/orf1RW	<i>eibG</i> -020
<i>E. coli</i> – 06-03233	O152:H ⁻ [H14]	<i>E. coli</i> – BL21(DE3)	B-20-1	<i>eibG</i> - β	orf1FW/orf1RW	<i>eibG</i> -020
<i>E. coli</i> – 172/98	OR:H ⁻ [H14]	<i>E. coli</i> – DH5 α	K-5-1	<i>eibG</i> - α	orf1FW/orf1RW	<i>eibG</i> -014
<i>E. coli</i> – 172/98	OR:H ⁻ [H14]	<i>E. coli</i> – DH5 α	K-5-4	<i>eibG</i> - α	orf1FW/orf1RW	<i>eibG</i> -014
<i>E. coli</i> – 4884/97	OR:Hnt [H14]	<i>E. coli</i> – DH5 α	K-11-8	<i>eibG</i> - α	orf1FW/orf1RW	<i>eibG</i> -015
<i>E. coli</i> – 4884/97	OR:Hnt [H14]	<i>E. coli</i> – DH5 α	K-11-10	<i>eibG</i> - α	orf1FW/orf1RW	<i>eibG</i> -015
<i>E. coli</i> – 0520/99	Ont:H30	<i>E. coli</i> – BL21(DE3)	B-18-2	<i>eibG</i> - γ	<i>eibG</i> _3305f/orf1RW	<i>eibG</i> -021
<i>E. coli</i> – 0520/99	Ont:H30	<i>E. coli</i> – JM109	J-18-7	<i>eibG</i> - γ	<i>eibG</i> _3305f/orf1RW	<i>eibG</i> -021
<i>E. coli</i> – 0520/99	Ont:H30	<i>E. coli</i> – BL21(DE3)	B-18-7	<i>eibG</i> - γ	<i>eibG</i> _3305f/orf1RW	<i>eibG</i> -021

2.6.4 STEC ohne *eibG*-Gene

Bezeichnung	Alias	Serotyp	<i>stx</i>	Symptome
00/02717	Wgd38/334	O91:H21	1+2+2d _{act}	Diarrhö
01/09282	Wgd1	O91:H21	2+2d _{act}	Diarrhö
02/02596	Wgd41	O91:H21	2d _{act}	HUS
1745/98	-	O91:H21	2+2d _{act}	Diarrhö

2.6.5 Antigen43- und EhaA-positive *E. coli*

EDL933 (O157:H7)

3. METHODEN

3.1 KULTIVIERUNG DER *E. COLI* – STÄMME

In dieser Arbeit wurden verschiedene *E. coli* – Stämme für unterschiedliche Zwecke kultiviert. Alle im Folgenden beschriebene Kultivierungen erfolgten bei 37 °C und einer unregelmäßigen relativen Luftfeuchtigkeit in Schüttelinkubatoren.

3.1.1 Medien

Die tiefgefrorenen Glycerin-Kulturen wurden als erstes auf LB-Agar nach Lennox (Bertani, 1951) ausplattiert (vgl. **Tabelle 1**) und nach einer 24 h – Inkubation in LB-Medium aufgenommen. Abhängig vom weiteren Einsatz der Kulturen variierten die Kulturvolumina und die Kultivierungsdauer, die in den jeweiligen Kapiteln angegeben sind. Das im Weiteren verwendete SOC-Medium wurde in den Transformationsversuchen eingesetzt. Hierbei handelt es sich um ein mit Glucose angereichertes Medium, welches den durch die Anpassung an niedrige Temperaturen und dem darauf folgenden Wärme-Schock angegriffenen Zellen während eines Transformationsvorgangs bessere Regenerationsbedingungen verschafft. Beachtet werden muss, dass Glucose nicht zusammen mit anderen Stoffen autoklaviert werden sollte und mit Hilfe eines Sterilfilters zu den restlichen, dampfsterilisierten, Komponenten zugegeben werden sollte (Hanahan, 1983).

Tabelle 1: Zusammensetzung der für die Kultivierung von *E. coli* verwendeten Medien

Medium	Komponente ^a	Konzentration
LB-Agar	Caseinpepton	10 g/L
	Hefeextrakt	5 g/L
	NaCl	5 g/L
	Agar	15 g/L
LB	Caseinpepton	10 g/L
	Hefeextrakt	5 g/L
	NaCl	5 g/L
SOC	Trypton	20 g/L
	Hefeextrakt	5 g/L
	NaCl	0,5 g/L
	KCl	1,86 g/L
	Glucose ^b	4 g/L
	MgCl ₂ ^b	0,95 g/L
M9	Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O	12,8 g/L
	KH ₂ PO ₄	3 g/L
	NaCl	0,5 g/L
	NH ₄ Cl	1 g/L
	MgSO ₄ ^b	2 mM
	CaCl ₂ ^b	0,1 mM
	Glucose ^b	0,4% (w/v)

(^a) Alle Lösungen wurden mit ddH₂O hergestellt.

(^b) Komponenten erst nach Dampfsterilisierung der restlicher Bestandteile hinzugeben.

3.1.2 Herstellung von Kryokulturen

Zur Stammhaltung wurden von den benötigten Stämmen Kryokulturen erstellt. Dazu wurden die über Nacht kultivierten *E. coli* (ÜN-Kulturen: 5 mL, 16 h, 180 rpm, 37 °C) bei 6000 *g* und 4 °C für 15 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das jeweilige Sediment wurde in 1 mL TSB (*tryptic soy broth*) – Medium und 0,3 mL 87%igem (w/v) sterilen Glycerin aufgenommen und bei -70 °C eingefroren (Marshall, 1992).

3.1.3 Bestimmung der optischen Dichte

Zur näherungsweise Bestimmung der Konzentration der Zellen in der Kultursuspension wurde die optische Dichte in Polystyrol-Küvetten bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm (OD_{600}) gegen das entsprechende Medium als Referenz gemessen. Da die Linearität der Messung ab einer OD_{600} von 1,0 nicht mehr gegeben ist, wurden ab diesem Wert die Proben mit dem entsprechenden Medium soweit verdünnt, dass dieser zwischen OD_{600} 0,1 und 1,0 lag (Bergter, 1983).

3.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN MIT DNA

Arbeiten mit DNA-Material erfolgten in Räumen ohne Luftverwirbelung bei geschlossenen Türen.

3.2.1 Isolierung chromosomaler DNA von *E. coli*

Für den schnellen Nachweis von *eibG* in den untersuchten STEC-Stämmen wurden zwei Kolonien von einer LB-Agar-Platte in 100 μ L sterilem ddH₂O gelöst, 10 min bei 100 °C aufgeköcht und 5 min bei 7500 *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde dem PCR-Mix hinzugefügt.

Die DNA-Isolierung für Sequenzierungen oder Klonierungen wurde mit der *CHELEX*-Methode (Walsh *et al.*, 1991) durchgeführt. Hierfür wurde das Kunstharzpartikel-haltige Medium von Qiagen eingesetzt, welches Iminodiacetat-Ionen als Matrix auf der Oberfläche der Partikel aufweist. Diese Matrix bindet bivalente Ionen wie Ca²⁺ bzw. Mg²⁺ und deaktiviert somit die vorhandenen DNasen und destabilisiert gleichzeitig das Cytoskelett der Bakterienzellen. Mehrere *E. coli* – Kolonien wurden in 100 μ L 5%iger *CHELEX*-Lösung aufgenommen und 10 min bei 100 °C lysiert. Die Zelltrümmer wurden dann bei 7500 *g* 5 Minuten lang abzentrifugiert und der Überstand dem PCR-Mix hinzugefügt.

3.2.2 *polymerase chain reaction* (PCR)

Die DNA-Amplifikation erfolgte mittels *polymerase chain reaction* (Mullis und Faloona, 1987). Dabei werden mit Hilfe sequenzspezifischer Oligonukleotide (Primer), Nukleosidtriphosphate (dNTP) und einer thermostabilen DNA-Polymerase aus kleinen DNA-Mengen spezifische Amplifikate hergestellt, welche dann in Agarose-Gelen nach Größe aufgetrennt und unter UV-Licht mittels interkalierender Färbemittel sichtbar gemacht werden, so dass diese aufgrund ihrer Länge bestimmten Sequenzabschnitten zugeordnet werden können.

Primer-Design

Die Identifizierung der *eibG*-Gene in den untersuchten STEC-Stämmen erfolgte mit denen von Lu *et al.* beschriebenen Primern 1114orf1Fp und 1114orf1Rp (Lu *et al.*, 2006). Mit diesen Primern wurde ein 548 bp langes PCR-Produkt hergestellt. Für die Sequenzierungen und weitere gentechnische Arbeiten wurden die ebenfalls von Lu *et al.* beschriebenen Primer orf1Fw und orf1Rw eingesetzt, die das komplette *eibG*-Gen flankieren und ein PCR-Produkt von 1804 bp generieren. Um alle in den STEC-Stämmen möglichen *eibG*-Allele detektieren zu können, wurden sieben weitere Primer mit dem Programm Vektor NTI konstruiert, die sowohl innerhalb als auch außerhalb des *eibG*-Gens an das bakterielle Chromosom binden und verschiedene PCR-Produkte erzeugen (**Abb. 13** und **Tabelle 2**). Als Referenzsequenz wurde der 6557 bp lange, *eibG* – haltige Chromosomabschnitt gewählt (Lu *et al.*, 2006).

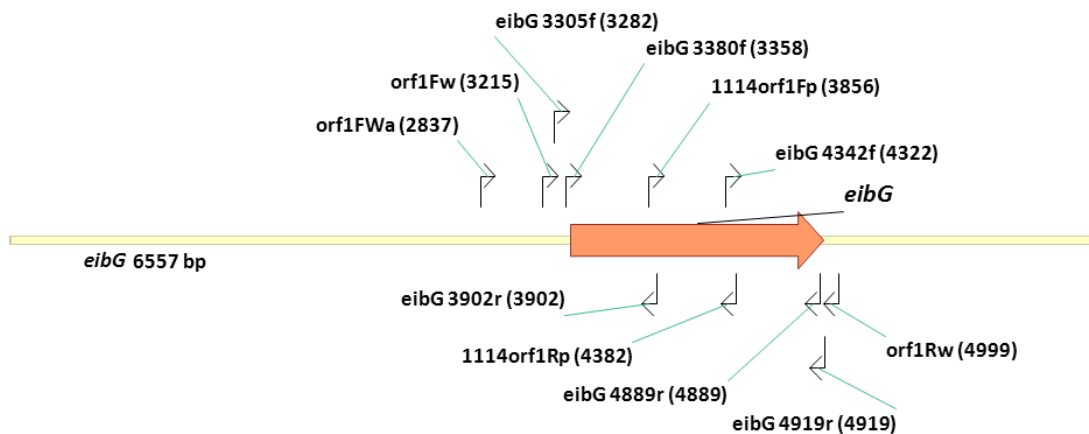


Abb. 13: Verwendete Primer für die PCR und Sequenzierung von *eibG*.

Zahlen in den Klammern: Primer-Anfangspositionen bezogen auf die Referenzsequenz (Genbank: AB255744.1).

Tabelle 2: Eingesetzte Primer mit der 5'→3' – Sequenz

Nr.	Bezeichnung	Sequenz
1	1114orf1Fp	5'-ATCGGCTTTCATCGCATCAGG-3'
2	1114orf1Rp	5'-CCACAAGGCGGGTATTCGTATC-3'
3	orf1Fw	5'-GTGAGCAGGTATGCCAGAAT-3'
4	orf1Rw	5'-CGGGTCGCCAGAATCACTTT-3'
5	orf1FWa	5'-GGCGACAAAGATATTGAGATG-3'
6	<i>eibG</i> _3305f	5'-TTTCGGAATATCCTGAATAAAGCCG-3'
7	<i>eibG</i> _3902r	5'-CGCCGCACTAGCCTGAAC-3'
8	<i>eibG</i> _4342f	5'-GATGCTGCAACCGTTCGTGTCAG-3'
9	<i>eibG</i> _4889r	5'-TTAAACTCGAAGTTAACGCC-3'
10	<i>eibG</i> _4919r	5'-GCCGTCATGCTTCATGTCAC-3'
11	<i>eibG</i> _3380f	5'-CAGATAATTTAACAGGATATCCA-3'

Ansetzen des PCR-Mix

Für jeden PCR-Ansatz wurden die in **Tabelle 3** aufgelisteten Komponenten in speziellen PCR-Reaktionsgefäßen vereint und die DNA-Sequenzen mit einem Thermocycler amplifiziert.

Tabelle 3: Einzelne Komponenten für jeden PCR-Ansatz

Komponente	Volumen in μL
Genomische DNA	0,5 ^a
dNTP (2,5 mmol/L)	0,5
Primer <i>forward</i>	0,5 (30 pmol/L)
Primer <i>reverse</i>	0,5 (30 pmol/L)
MgCl ₂	0,75 (25 mmol/L)
5x Enhancer	5,0
10x Taq+KCl Puffer (ohne MgCl ₂)	2,5
H ₂ O	14,65
Taq-Polymerase	0,1 (1,25 U)

(^a) Bei der Negativkontrolle wurde statt DNA 1 μL ddH₂O eingesetzt.

Durchführung einer PCR

Durch das Einleiten bestimmter Temperaturabfolgen wird die doppelsträngige DNA denaturiert, so dass spezifische Primer an die DNA binden können. Danach kann die DNA-Polymerase den komplementären DNA-Strang durch die Elongation der Primer ausbilden. Durch die exponentielle Vermehrung der DNA-Produkte, deren Sequenz zwischen den anlagernden Primern kodiert ist, erhöht sich die Konzentration der gesuchten PCR-Amplifikate und ermöglicht dadurch deren Detektion. Die einzelnen Schritte der PCR sind in **Tabelle 4** dargestellt.

Tabelle 4: PCR-Schritte für die Amplifikation eines PCR-Produktes mit einer Länge von ca. 1000 bp^a

Schritt	Aufgabe	Zeit in s	Temperatur in °C	Zyklen
0	Aufheizen	-	104	-
1	Anfangsdenaturierung	300	94	1
2	Denaturierung	30	94	34
	<i>annealing</i>	60	60 ^b	
2	<i>elongation</i>	90	72	34
	Abschlußelongation	300	72	

(^a) Für PCR-Produkte mit einer Länge von 1500 bis 2000 bp wurde die *annealing*-Zeit auf 90 bzw. 150 s eingestellt.

(^b) Die *annealing*-Temperatur wurde für einzelne Primer-Paare teilweise variiert, um optimale Bedingungen für die Bindung der Primer zu erreichen.

Elektrophoretischer Nachweis der PCR-Amplifikate

Der Nachweis der PCR-Amplifikate erfolgte mittels elektrophoretischer Auftrennung in einem 1,5%igen (w/v) Agarosegel (Adkins und Burmeister, 1996). Dafür wurde 1 g Agarose in 67 mL 0,5-fachem TBE-Puffer (TRIS-Borat-EDTA: 89 mmol/L Tris-Base, 89 mmol/L Borsäure, 2 mmol/L EDTA, pH 8) gelöst und 30 s gekocht. Nach dem Erstarren des Agarose-Gels in der Gießschiene wurde dieses in eine mit 0,5-fachem TBE-Puffer gefüllte Kammer überführt. Die PCR-Amplifikate wurden in die dafür vorgesehenen Taschen des Gels eingebracht. Vor der Gelbeladung wurden 10 μL jedes PCR-Amplifikats mit 2 μL Agarosegel-Probenpuffer (TBE-Puffer mit 10% (w/w) Glycerin und 0,03% (w/w) Bromphenolblau) vermischt und davon je 8 μL in die jeweilige Geltasche überführt. Je nach Größe des Gels wurden die PCR-Produkte bei einer Spannung von 100 bzw. 120 V aufgetrennt. Nach dem

Lauf wurde das Gel 20 min in einem Ethidiumbromid-Bad (0,5 µg/mL) lichtgeschützt inkubiert; die Amplifikate wurden anschließend mittels UV-Transillumination bei 320 nm detektiert (Waring, 1965).

3.2.3 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) erfolgte mit dem *ABI Prism BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing* – Kit. Die dNTP (Desoxyribonukleosidtriphosphate) in diesem Kit sind mit spezifischen Fluorochromen gekoppelt, welche die Detektion einzelner DNA-Basen nach der Elongation der Primer im PCR-Cycler ermöglichen (Lee *et al.*, 1997).

Aufreinigung der PCR-Produkte

Vor der Sequenzierung wurden die entstandenen PCR-Produkte mit dem *QIAquick PCR Purification* – Kit aufgereinigt (Durchführung vgl. Anleitung). Das Prinzip der Aufreinigung basiert auf der Bindung von DNA an die Silika-Membran der im Kit vorhandenen Reaktionsgefäße bei hoher Salzkonzentration, während eventuelle Kontaminationspartikel ausgewaschen werden. Die DNA kann dann mit nukleasefreiem Tris-Puffer bzw. Wasser eluiert werden.

Sequenzierung der *eibG*-Amplifikate

Vor der Sequenzierung wurde das *eibG*-PCR-Amplifikat zunächst mit den hydrolytischen Enzymen Exonuklease I (1 U/µL, Funktion: Abspalten der DNA-Monomere) und SAP (*shrimp alkaline phosphatase*; 1 U/µL, Funktion: Dephosphorylierung) aufbereitet und so von überschüssiger Einzelstrang-DNA und verbliebenen dNTP befreit. Hierfür wurden jeweils 5 µL des entstandenen Amplifikats mit 2 µL des *ExoSap*-Mix, der beide Enzyme und den notwendigen Puffer enthält, vermischt und bei 37 °C für 45 min inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme für 15 min bei 80 °C hitzedeaktiviert und die Proben bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Für jede Probe wurde ein Mastermix erstellt, bestehend aus *Big-Dye™*-Premix (dNTP), 5x ABI Sequenzierungspuffer, den notwendigen Primer und HPLC-grade Wasser. 8 µL von dem Mastermix wurden mit 2 µL des aufgereinigten PCR-Produkts vermischt, kurz bei 1500 g für 5 s zentrifugiert und dem Sequenzierungs-PCR-Programm (Tabelle 5) unterzogen.

Tabelle 5: Einzelne Schritte der Sequenzierungs-PCR

Schritt	Aufgabe	Zeit in s	Temperatur in °C	Zyklen
0	Heizdeckel	-	106	-
	Denaturierung	10	96	
1	<i>annealing</i>	5	60 ^a	24
	<i>elongation</i>	120	60	
2	Pause	-	4	-

(^a) Temperatur ist Primer-abhängig und kann von diesem Wert abweichen.

Sephadex G-50 – Aufreinigung nach der Sequenzierungs-PCR

Nach der Sequenzierungs-PCR wurden die entstandenen Produkte zur Aufreinigung über Kunstharzsäulen gegeben. Hierfür wurden 45 µL *Sephadex G 50 Superfine* Kunstharz Pulver mit 300 µL HPLC-grade Wasser in eine *MultiScreen HV* Platte überführt und für 3 h bei Raumtemperatur (RT) quellen gelassen, dann wurde das restliche Wasser mittels Zentrifugation für 5 min bei 250 g

abgetrennt. Nach einem weiteren Waschschriff mit HPLC-grade Wasser wurden die Säulen mit dem PCR-Produkt beladen und dieses durch Zentrifugation bei 250 g für 5 min in eine Mikrotiterplatte eluiert. Diese DNA wurde anschließend für 20 min bei 45 °C im Vakuumkonzentrator *Speedvac Concentrator* 5301 eingedampft und in 20 µL HiDi-Formamid gelöst. Die automatische Sequenzierung erfolgte dann mit dem *ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer* und die entstandenen DNA-Sequenzen wurden mit der *Ridom Seqsphere* – Software bestimmt.

3.2.4 Transformation von *eibG* in den Expressionsstamm *E. coli* – BL21(DE3)

Um *EibG* auf seine Funktionalität in den *E. coli* – Stämmen mit einem von den Wildtypen abweichendem genetischen Hintergrund zu untersuchen, wurden verschiedene Allele von *eibG* mittels des Vektorplasmids *pGEM-T Easy* erst in den Transformationsstamm *E. coli* – DH5α und danach in den Expressionsstamm *E. coli* – BL21(DE3) transformiert und die Expression von *EibG*-Proteinen durch IPTG-Induktion (Endkonzentration 1 mmol/L) ausgelöst.

Das *pGEM-T Easy* – System

Nach der Amplifikation der *eibG*-Gene mit Hilfe der PCR wurden diese in den *pGEM-T Easy* – Vektor (Abb. 14) ligiert. Das *pGEM-T Easy* – Plasmid liegt dabei vorerst linearisiert vor und weist an den äußeren Enden mehrere Thymin-Basen auf. Die Adenin-Reste an den äußeren Enden der Inserts erleichtern den Einbau in das Plasmid. Das 3015 bp lange *pGEM-T Easy* – Plasmid verfügt über eine *multiple cloning site* (MCS) mit Erkennungsstellen für eine Reihe an Restriktionsenzymen und zwei Promotoren, jeweils einer auf verschiedenen Seiten der MCS. Weiterhin sind eine Ampicillin-Resistenz (*bla*) sowie Gene für β -Galaktosidase (*lacZ*) vorhanden. Die MCS ist so im *pGEM-T Easy* inseriert, dass beim Einbau von Inserts das *lacZ*-Gen gespalten wird und somit die Galaktosidase nicht mehr transkribiert werden kann. Dies ermöglicht bei Anwesenheit von X-Gal die Blau-Weiß-Selektion und somit Erkennung von Zellen nach erfolgreicher Klonierung.

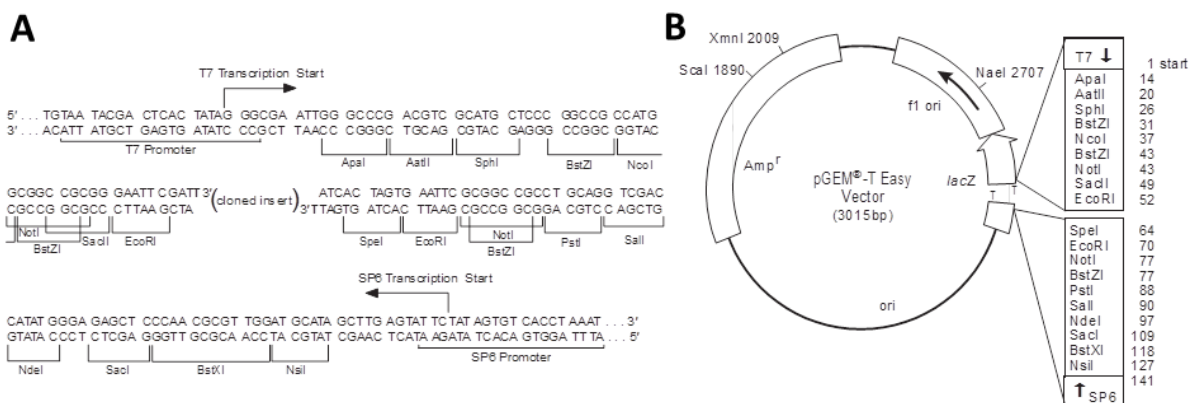


Abb. 14: *pGEM-T Easy* – Vektorsystem.

(A) Der T7-Promoter und die *multiple cloning site* (MCS) mit Spaltstellen für verschiedene Restriktionsenzyme;
 (B) schematische Darstellung des gesamten Vektors mit dem unterbrochenen *lacZ*-Gen.

DNA-Amplifikation für Klonierungen in das *pGEM-T Easy* – System

Für den Einbau von *eibG* in das *pGEM-T Easy* – Vektorsystem wurde die *high-fidelity* DNA-Polymerase *Phusion Hot Start II* verwendet. Diese Polymerase weist sehr hohe 5'→3'-Polymeraseaktivität und 3'→5'-Exonukleaseaktivität auf und erzeugt glatte Schnitte (*blunt ends*) an den Enden der DNA-

Sequenzen. Da die Synthesekorrekturrate sehr hoch ist, eignet sich diese DNA-Polymerase besonders für PCR-Amplifikationen, bei denen es auf eine korrekte DNA-Sequenzsynthese ankommt.

Tabelle 6: PCR-Schritte für DNA-Amplifikation mit der *high-fidelity* DNA-Polymerase *Phusion Hot Start II*^a

Aufgabe	Zeit in s	Temperatur in °C	Zyklen
Denaturierung	30	94	
<i>annealing</i>	60	60	34
<i>elongation</i>	150	72	

^a *Phusion Hot Start II* benötigt keine Anfangsdenaturierung.

Die glatten Schnitte an den 3'-Enden der *eibG*-Amplifikate wurden mittels der *Taq* DNA-Polymerase aus dem *pGEM-T Easy* – System und Deoxyadenosinphosphaten (dATP) mit terminalen Adenin-Resten versehen, wodurch die Ligation mit dem *pGEM-T Easy* – Vektor vereinfacht wird. Da die *Phusion Hot Start II* Polymerase die neuentstandenen Adenin-Reste wieder abspalten würde, wurden die PCR-Amplifikate vor der Behandlung mit der *Taq*-Polymerase auch hier mit dem *QIAquick PCR Purification* – Kit aufgereinigt. Von jedem PCR-Ansatz wurden 5 µL aufgereinigtes DNA-Amplifikat mit 1 µL des 10x *Reaction Buffer* mit MgCl₂, dATP (Endkonzentration 0,2 mM) und 5 U der *Taq* DNA-Polymerase vermischt und mit dampfsterilisiertem ddH₂O auf 10 µL Gesamtvolumen gebracht. Nach 30 min bei 70 °C konnten *eibG*-Amplifikate für die Ligation mit dem *pGEM-T Easy* – Vektorsystem eingesetzt werden.

***pGEM-T Easy* – Ligation**

Die Lösung mit dem *pGEM-T Easy* – Vektor wurde kurz zentrifugiert, und je *eibG*-Allel – Ansatz wurden 1 µL des Vektors, 2 µL des PCR-Produkts, 1 µL der T4-DNA-Ligase, 5 µL des 2x *Rapid Ligation Buffers* und 1 µL dampfsterilisiertem ddH₂O vereinigt. Die Ligationsansätze wurden anschließend über Nacht bei 4 °C inkubiert. Alle notwendigen Komponenten für die Ligase sind in dem 2x *Rapid Buffer* enthalten (ATP, MgCl₂, Tris, DTT). Die Ligase verbindet somit die einzelsträngigen DNA-Reste des Vektors mit denen der *eibG*-PCR – Produkte.

3.2.5 Blau-Weiß-Selektion

Zur Überprüfung einer erfolgreichen Ligation der *eibG*-Gene in den *pGEM-T Easy* – Vektor wurden die entstandenen Klone einer Blau-Weiß-Selektion unterzogen. Hierfür wird das Gen für β-Galaktosidase, das *lacZ*, eingesetzt. Somit wird die β-Galaktosidase, die Laktose in Galaktose und Glucose spaltet, als Reporter gen ausgenutzt. Anstatt Laktose wird X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indol-β-D-Galaktosid) als Substrat eingesetzt, das enzymatisch in Galaktose und den blauen Farbstoff 5-Bromo-4-Chloro-3-Indol umgesetzt wird, durch den die Kolonien gefärbt werden. Wenn ein DNA-Insert in das *lacZ*-Gen eingebaut ist, wird das Leseraster des Gens zerstört und die β-Galaktosidase kann nicht mehr synthetisiert werden. Die betroffenen Kolonien bleiben farblos bzw. weiß. Als Induktor für die β-Galaktosidase dient Isopropyl-thio-galaktosid (IPTG), welches jedoch nicht durch die β-Galaktosidase abgebaut werden kann (Ullmann *et al.*, 1967). Zusätzlich wird eine Antibiotika-Resistenz mit dem *pGEM-T Easy* – Vektor erzeugt, so dass nur Bakterien wachsen, die auch einen Vektor durch die Transformation aufgenommen haben. Die weißen Kolonien werden nach der Ausplattierung von den Agar-Platten ausgewählt und weiter kultiviert.

Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Um Plasmide in Bakterien einzubringen, müssen diese im Vorfeld „sensibilisiert“ werden. Das Prinzip beruht auf dem Einsatz von Calciumchlorid, wodurch die Zellmembranen während eines Hitzeschocks für kleinere DNA-Fragmente, wie z. B. Plasmide, aufnahmefähig bzw. durchlässiger werden (Cohen *et al.*, 1972). ÜN-Kulturen von *E. coli* – DH5 α und *E. coli* – BL21(DE3) wurden in 50 mL LB-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,2 verdünnt und bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 weiter kultiviert. Die Bakterien wurden nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis anschließend bei 4000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Sediment wurde in 50 mL Calciumchlorid-haltigem Puffer (0,1 mol/L CaCl₂, 2 mmol/L Tris-HCL, pH 7,4) resuspendiert und erneut bei 4000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das entstandene Sediment wurde erneut in 3 mL des Calciumchlorid-haltigem Puffers resuspendiert und für 60 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,6 mL 99%igem (w/v) Glycerin wurden die Bakterienzellen als 100 μ L – Aliquots in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und bei -70 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Herstellung von LB/Amp/IPTG/X-Gal – Petrischalen

Für die Blau-Weiß-Selektion der entstandenen Klone wurde der dampfsterilisierte LB-Agar auf 55 °C abgekühlt; auf je 100 mL LB-Agar wurden 100 μ L einer 0,1 molaren Ampicillin-Lösung, 48 μ L einer 0,1 molaren IPTG-Lösung und 144 μ L einer 2%igen (w/v) X-Gal – Lösung (in Dimethylformamid) hinzugegeben. Nach dem Abkühlen der Platten konnten diese ein Monat im Dunkeln gelagert werden.

Hitzeschock-Transformation in kompetente *E. coli* – Zellen

Die kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Zu jeder Zellsuspension wurden 2 μ L des jeweiligen *pGEM-T Easy* – *eibG* Ligationsansatzes hinzugegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Die Transformationsansätze wurden danach für 90 s einem Hitzeschock bei 42 °C unterzogen und für 2 min erneut auf Eis inkubiert. Zu jedem Ansatz wurden 950 μ L 37 °C warmes SOC-Medium hinzugegeben und 90 min bei 37 °C und 110 rpm inkubiert. Je Transformationsansatz wurden 100 μ L auf LB/Amp/IPTG/X-Gal – Petrischalen ausplattiert. Die restliche Suspension wurde bei 1000 g für 6 min zentrifugiert, ausplattiert (10x Konzentration) und anschließend für 24 h bei 37 °C inkubiert.

Da in den Klonen mit Insert die Sequenz für β -Galaktosidase im *pGEM-T Easy* zerstört und dadurch die Fähigkeit zur Spaltung von X-Gal eliminiert ist, wurden alle weißen Kolonien nach der Inkubationszeit auf LB/Amp – Platten und in Kulturröhrchen mit LB/Amp-Medium (Ampicillinendkonzentration 100 μ g/L) überführt. Die ausplattierten Stämme dienten der zusätzlichen Kontrolle für die Präsenz des Vektors und die Flüssigkulturen als Ausgangslösung für die Plasmidisolierung.

Plasmidisolierung

Um sicher zu stellen, dass die *eibG*-Allele richtig in das *pGEM-T Easy* – System transformiert wurden und um die Plasmide aus dem Transformationsstamm *E. coli* – DH5 α in den Expressionsstamm *E. coli* – BL21(DE3) zu überführen, wurden die Plasmide mit dem *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) aus den Bakterien isoliert. Das Prinzip der Plasmidisolierung ist eine Kombination aus einer alkalischen Lyse zur DNA-Aufreinigung und einer chromatographischen Trennung mit Silika-Minisäulen. Das Vorgehen bei der Plasmidisolierung erfolgte nach den Angaben

des Herstellers. Die Identifizierung der *eibG*-Sequenzen erfolgte mittels M13f- (5'-GTAAACGACGGCCAGT-3') und M13r- (5'-AGGAAACAGCTATGACC-3') Primer. Für eine doppelte Sequenzabdeckung und Bestätigung der *eibG*-Sequenz sowie die Orientierung in dem *pGEM-T Easy* – Vektor wurden ebenfalls die für die Isolierung der jeweiligen *eibG*-Allele eingesetzten Primer (Tabelle 2) verwendet.

EibG-Induktion durch IPTG

In allen im Folgenden beschriebenen Experimenten mit *eibG*-Klonen wurden für die ÜN-Kulturen mehrere Kolonien eines *eibG*-positiven BL21(DE3) – Stammes in LB-Medium mit einer Endkonzentration von 1 mg/mL an Ampicillin überführt. Nach der 16 h ÜN-Kultivierung bei 37 °C und 180 rpm wurden die Kulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,2 eingestellt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 kultiviert. Hiernach wurde die IPTG-Induktion mit einer 1 mmol/L Endkonzentration an IPTG ausgelöst und weitere 3 h unter den gewünschten Bedingungen (0 bzw. 180 rpm) inkubiert. Die Klon-Suspensionen wurden hiernach geerntet.

3.3 KULTIVIERUNG INTESTINALER EPITHELZELLEN

Für die Adhäsionstests mit *eibG*-positiven STEC-Stämmen wurden humane HCT-8 (*human ileocecal adenocarcinoma epithelial cells*) und intestinale Epithelzellen bovinen Ursprungs FDK-R 971 (*fetal intestinal jejunal epithelial cells*) verwendet. Die Epithelbereiche des jeweiligen Wirtes sind natürliche Besiedlungsorte pathogener und apathogener *E. coli*, so dass beide Epithelzelllinien adäquate Voraussetzungen für Adhäsionsexperimente mit den STEC-Stämmen bieten. Da es sich hierbei um adhärente Zelllinien handelt, die ihre Proliferation nach dem Erreichen der Konfluenz einstellen, werden sie routinemäßig bei ca. 75% Konfluenz passagiert.

Kulturmedien und Kultivierungsbedingungen für intestinale Epithelzellen

Für die humane Zelllinie HCT-8 wurde RPMI 1640 – Medium (RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*) verwendet, welches auf einem Hydrogencarbonat-Puffersystem basiert und eine Mischung von Glucose, Salzen, Aminosäuren und Vitaminen darstellt (Moore *et al.*, 1967). Als Indikator für den pH-Wert dient Phenolrot. Dem Medium wurden zusätzlich noch 10% (v/v) FBS-Gold (FBS: *foetal bovine serum*), 1% (v/v) 1 mmol/L Natrium-Pyruvat und 1% (v/v) 2 mmol/L L-Glutamin zugesetzt. Bei serumfreier Kultivierung wurde das FBS-Gold weggelassen.

Die bovine Zelllinie FDK-R 971 wurde im DMEM F-12 – Medium (DMEM: *Dulbecco's modified Eagle medium*) kultiviert, welches eine etwas andere Zusammensetzung an Glucose, Salzen, Aminosäuren und Vitaminen aufweist als RPMI 1640. Pufferung, pH-Indikation und Zusatz von 10%igem (v/v) FBS-Gold erfolgten analog zum RPMI 1640 – Medium.

Für die Adhäsionstests wurden tiefgefrorene tierische Zellen nach dem Auftauen zwei Wochen lang bei 37 °C und 5% CO₂ angezüchtet. Während der ca. 48-stündigen Kultivierung der Zelllinien bis zur nächsten Passage wurde täglich die Morphologie der Zellen kontrolliert. Hierfür wurde der Konfluenzgrad der Zellen in den Kulturflaschen lichtmikroskopisch bestimmt und für die jeweilige Passage die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Vor Passagierung wurden die Zellen mit 0,2 mL/cm² CMF-PBS (*calcium- and magnesium-free – phosphate buffered saline*) gewaschen, um den Gehalt an den im Medium enthaltenen Proteaseinhibitoren und die Konzentration an bivalenten

Kationen zu verringern. Die Zellen wurden anschließend durch Zugabe von 0,04 mL/cm² einer Trypsinlösung (Accutase) für 10 Minuten bei 37 °C und 5% CO₂ vom Kulturflaschenboden abgelöst. Das zusätzlich in dem Proteasen-Mix enthaltene EDTA komplexiert zweiwertige Kationen und fördert die Zellvereinzelnung. Die Aktivität der Proteasen wurde durch Zugabe von 10 mL des jeweiligen Mediums mit FBS gestoppt, und die Zellen wurden mit einer Konzentration von 1,0x10⁵ Zellen/mL in eine neue Gewebekulturflasche eingesät.

3.4 MIKROSKOPIE

Die phänotypische Charakterisierung der verwendeten STEC-Stämme wurde auf Objektträgern aus Glas und aus Polystyrol (*Permanox*) der Firma Nunc durchgeführt. Diese sind durch einen Aufsatz und eine biokompatible Silikondichtung in vier bzw. acht gleich große Kammern unterteilt (*chamber slides*) und eignen sich besonders gut für die Mikroskopie, wenn mehrere Kulturen gleichzeitig untersucht werden sollen. Die *Permanox*-Objektträger sind, wie die Gewebekulturflaschen, hydrophilisiert und benötigen somit keine zusätzliche Beschichtung für die Anhaftung von Zellen. Die Aufnahmen der Zellen wurden mit der Kamera des Fluoreszenzmikroskops *Axiolmager A1* der Firma Zeiss und Objektiven mit 40- und 100-facher Vergrößerung ohne Phasenfilter durchgeführt. Dieses Mikroskop kann auch als Lichtmikroskop eingesetzt werden und liefert mit der dazugehörigen Software kontrastreiche Aufnahmen.

3.4.1 Aggregation EibG-positiver STEC-Stämme

Da EibG-positive STEC-Stämme unterschiedliche kettenförmige Aggregate ausbilden, wurde deren Morphologie mikroskopisch genauer untersucht, um Zusammenhänge zwischen der Kettenlänge und der Kettenart bei den verwendeten Stämmen aufzuklären (Cowan und Fletcher, 1987, Genevaux *et al.*, 1996). Dafür wurden zwei bis drei Bakterienkolonien in 5 mL LB-Medium suspendiert und bei 37 °C für 20 h bei 180 rpm kultiviert. Abhängig von der Art der anschließenden Kultivierung (0 rpm bzw. 180 rpm) wurden geschüttelte Hauptkulturen in einer 1:100 Verdünnung und die nicht geschüttelten in einer 1:50 Verdünnung in jeweils 30 mL LB-Medium angelegt. Dies führte zu einer ähnlich hohen OD₆₀₀ der Hauptkulturen nach der folgenden 20-stündigen Kultivierung. Die Bakterienkonzentration wurde über die Bestimmung der OD₆₀₀-Werte auf 5,0x10⁸ Zellen/mL eingestellt, und diese Kultur wurde mit einer Konzentration von 1,4x10⁸ Zellen/cm² für Kultivierungen in den jeweiligen Kammern der Objektträger eingesetzt. Bei Experimenten mit den *eibG*-Klonen wurden die Zellsuspensionen ebenfalls auf 5,0x10⁸ Zellen/mL eingestellt. Nach einer 1 h Kultivierung bei 37 °C und 180 rpm folgte die Überführung in die Kammern der Objektträger. Nach weiteren 3 h Inkubation bei 37 °C und 0 bzw. 180 rpm wurden die Bakterien dreimal mit CMF-PBS (mit CaCl₂ und MgCl₂) gewaschen und für 5 min mit 70%igem (v/v) Ethanol auf den Objektträgern fixiert.

Färbung der bakteriellen und tierischen Zellen für lichtmikroskopische Untersuchungen

Um Bakterien auf den Objektträgern unter einem Lichtmikroskop sichtbar zu machen und um bei tierischen Zellen verschiedene Zellkompartimente voneinander unterscheiden zu können, wurde die Giemsa-Färbemethode eingesetzt (Giemsa, 1904). Dabei handelt es sich um eine modifizierte Romanowsky-Färbung (Romanowsky D.L., 1890). Die Giemsa-Lösung besteht aus einer Mischung der Farbstoffe Azur A-Eosinat, Azur B-Eosinat, Methylenblau-Eosinat und aus Methylenblaulorid, gelöst

in Methanol mit Glycerin als Stabilisator. Das Giemsa-Konzentrat wurde 1:10 in sterilem ddH₂O verdünnt und mittels eines Sterilfilters (0,2 µm Porengröße, Schleicher & Schuell) von möglichen Kristallen befreit. Je Kammer wurden dann 0,25 mL der Giemsa-Färbelösung auf je 1 cm² Bodenfläche aufgegeben und 30 min bei RT inkubiert. Die fixierten Zellen wurden danach mit ddH₂O gewaschen und die Objektträger vor der Mikroskopie 1 h lang getrocknet.

Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Lokalisierung molekularer Strukturen wird durch die an spezifische Antikörper konjugierte Fluorochrome ermöglicht. Die Primärantikörper binden an die zu detektierenden Strukturen der Zellpräparate, welche dann durch fluorochrommarkierte Sekundärantikörper nachgewiesen werden. Die Fluorochrome werden mit Licht definierter Wellenlängen angeregt und emittieren dann Licht mit einer längeren Wellenlänge, das dann photographisch dokumentiert wird. Durch gezielten Einsatz von Antikörpern für verschiedene Zielstrukturen und durch Fluorochromkonjugate mit unterschiedlichen Absorptionsmaxima und Emissionswellenlängen können so mit geeigneten Filterkombinationen Fluoreszenzaufnahmen in verschiedenen Kanälen von einem Zellpräparat gemacht werden. Mit Hilfe der Mikroskopie-Software werden dann mehrere Farbaufnahmen übereinander gelegt, die in der Summe eine verschiedenfarbige Darstellung subzellulärer Strukturen von Zellen in ein und demselben Ausschnitt eines Präparates erlauben.

Die Bakterien wurden nach 5-minütiger Fixierung mit 70%igem (v/v) Ethanol dreimal mit CMF-PBS gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden für 2 h mit 5% (w/v) BSA (bovines Serumalbumin) und 0,2% (w/v) FSG (*fish skin gelatine*, Fischhautgelatine) in CMF-PBS blockiert. Nach erneutem dreifachen Waschen mit CMF-PBS wurde der humane polyklonale IgG Fc – Antikörper, konjugiert mit *Alexa-488* (1 mg/mL, 1:500 Verdünnung in 1% (w/v) BSA in CMF-PBS), in einem Volumen von 0,25 mL/cm² auf das Präparat gegeben. Das Fc-Fragment des humanen IgG sollte dabei von EibG-Proteinen an der Oberfläche der Bakterien gebunden werden und somit EibG-positive Bakterienzellen bei einer Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm sichtbar machen. Nach 2-stündiger Inkubation bei RT unter Lichtausschluss wurden die Präparate erneut dreimal mit CMF-PBS gewaschen und für 15 min mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, 1 mg/mL, 1:1000 in CMF-PBS verdünnt) gefärbt. DAPI lagert sich bevorzugt an Adenin-Thymin – reiche DNA-Bereiche an und dient somit der Anfärbung der Zellkerne tierischer bzw. der DNA-haltigen Bereiche bakterieller Zellen. DAPI fluoresziert nach Anregung von 358 nm mit einer intensiven blauen Farbe. Nach weiterem Waschen der Präparate mit CMF-PBS wurden diese 1 Stunde lang getrocknet, danach mit *Fluorescent Mounting Medium* überschichtet und für die Fluoreszenzmikroskopie geeigneten Deckgläsern abgedeckt. Die Trocknung des Mediums erfolgte über Nacht bei RT.

3.4.2 Blockierung von EibG mit humanem IgG Fc

Um den Einfluss von EibG auf die Ausbildung der bakteriellen Kettenaggregate zu untersuchen, sollte EibG durch Zugabe von humanem polyklonalem IgG Fc – Fragment blockiert werden. Dafür wurden die Bakterien wie im Abschnitt 3.4.1 beschrieben kultiviert. Vor der 3-stündigen Inkubation auf den Objektträgern wurde das humane IgG Fc (1,1 mg/mL, 1:500 Verdünnung im LB-Medium) hinzugegeben, die Bakterien gemäß Kapitel 3.4.1 weiter kultiviert und für die jeweilige Färbung präpariert.

3.4.3 Biofilmuntersuchung

Der Einfluss von EibG auf die Biofilmbildung der STEC wurde unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen getestet. Da eine Vielzahl von Stämmen untersucht werden sollte, wurden für effizienteres Arbeiten sterile vorbehandelte Polystyrol-Mikrotiterplatten (MTP) mit 96 *wells* und flachem Boden (*F-bottom*) verwendet (*Cellstar*, Greiner), welche dann auch für die Aufnahmen mit dem inversen Lichtmikroskop (*Axio 40*, Zeiss) eingesetzt wurden. Weiterhin sollte der Einfluss einer Kollagenbeschichtung der MTP auf die Biofilmbildung untersucht werden. Hierfür wurde Kollagen A in seiner monomerisierten Form (50 µg/mL in CMF-PBS mit 20 mmol/L Essigsäure, pH 3,5) in einem Volumen von 50 µL je Kammer in den MTP-*wells* aufgebracht und über Nacht bei RT inkubiert. Nach einmaligem Waschen der MTP mit 100 µL CMF-PBS je *well* wurden die Kollagen-MTP für die Biofilmversuche eingesetzt.

Die ÜN-Kulturen wurden auf eine Konzentration von $1,0 \times 10^8$ Zellen/mL eingestellt und in jedes MTP-*well* 100 µL der jeweiligen Zellsuspension eingesät. Die Klone wurden 3 h nach Inokulation mit IPTG induziert und parallel zu den Wildtyp-Stämmen insgesamt 6, 12 bzw. 24 h bei 0 rpm bzw. 180 rpm und 37 °C inkubiert. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Bakterien-Suspensionen abgenommen und in eine neue MTP überführt. Die *wells* der Einsaat-MTP wurden vorsichtig mit 100 µL CMF-PBS gewaschen und diese ebenfalls in die MTP mit der vorher abgenommenen Suspension überführt; die Anzahl der nicht adhärenierten Zellen wurde mittels OD₆₀₀ bestimmt. Die adhärenierten Bakterien wurden bei 80 °C für 30 min hitzefixiert und mit 100 µL einer 0,25%igen (w/v) Kristallviolett-Lösung (KV) je *well* für 30 min gefärbt (O'Toole und Kolter, 1998, Silagyi *et al.*, 2009). Die KV-Lösung wurde danach verworfen und die *wells* mit 250 µL CMF-PBS kurz gewaschen, wonach diese Lösung ebenfalls verworfen wurde. Die KV-gefärbten Bakterien wurden dann mit 96%igem (v/v) Ethanol für 30 min vom Boden der MTP abgelöst, diese Lösungen in neue MTP überführt und die Extinktion bei 570 nm gemessen. Für die Giemsa-Färbung wurden die MTP nach der Hitzefixierung bei 4 °C luftdicht 16 h lang aufbewahrt und danach pro *well* 100 µL Giemsa-Lösung (vgl. Kapitel 3.4.1) zugegeben und gefärbt. Die mit Giemsa gefärbten Bakterien wurden unter dem Inversmikroskop untersucht und photographisch dokumentiert.

3.4.4 Adhäsions-Assays von EibG-positiven STEC und intestinalen Epithelzellen

Um die Adhäsionsmuster (Lu *et al.*, 2006) der EibG-positiven STEC-Stämme auf intestinalen Epithelzellen zu untersuchen, wurden humane und bovine Epithelzellen zunächst in Gewebekulturflaschen für mindestens zwei Wochen vorkultiviert (vgl. Kapitel 3.3). Danach wurden die Zellen mit einer Konzentration von $3,0 \times 10^4$ Zellen je Kammer auf die *Permanox*- bzw. Glas-Objektträger überführt und weitere zwei Tage bis zum Erreichen einer 75%igen Konfluenz kultiviert. Die jeweiligen Kulturüberstände wurden danach verworfen.

Die *E. coli* – Stämme wurden wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben angezüchtet und auf eine Konzentration von $1,0 \times 10^8$ Zellen/mL eingestellt. Danach wurden die Bakterien zweimal mit dem jeweiligen Zellkulturmedium gewaschen. Dafür wurden $1,0 \times 10^8$ Bakterienzellen für 5 min mit 1000 g bei RT zentrifugiert. Das Sediment wurde in 250 µL des Zellkulturmediums gelöst, und die intestinalen Epithelzellen wurden mit den suspendierten Bakterien überschichtet. Nach 1 bzw. 3 h Inkubation bei 37 °C und 0 bzw. 180 rpm wurden die Bakterien suspensionen abgenommen und die Objektträger mit CMF-PBS (500 µL je Kammer) dreimal gewaschen. Die Fixierung erfolgte danach mit 70%igem (v/v) Ethanol (vgl. Kapitel 3.4.1), wonach die Bakterien entweder mit der Giemsa-Lösung

gefärbt oder die immunhistologische Färbung für die anschließende Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt wurde (vgl. Kapitel 3.4.1).

3.5 ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN

Die elektronenmikroskopischen Experimente wurden im Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung (ZMBE) der Westfälischen Wilhelms – Universität (WWU) Münster am Institut für Infektiologie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. M. Alexander Schmidt, von Lilo Greune durchgeführt. EibG-positive STEC wurden dabei als Suspension fixiert, blockiert und mit zwei Antikörpern (vgl. nächsten Abschnitt) gefärbt. Erst nach diesen Schritten wurden die Bakterien dann auf spezielle Halterungen, sogenannte *grids* (200 *mesh* Kupfergrids mit 0,2% (w/w) Formvar mit Chloroform befilmt, Plano GmbH), platziert und mit dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM: TecnaiTM 12 *electron microscope*, FEI) untersucht.

Die EibG-positiven STEC wurden zunächst für 20 h bei 37 °C und 180 rpm angezchtet, danach 1:100 für die geschüttelte und 1:50 für die nicht geschüttelte Inkubation mit LB-Medium verdünnt und bei 0 rpm und 37 °C für weitere 20 h kultiviert. Zwei Milliliter der jeweiligen Suspension wurden bei 1000 *g* für 2 min zentrifugiert; der Überstand wurde verworfen und das Sediment zweimal mit CMF-PBS gewaschen. Die Fixierung wurde als Suspension-Fixierung mit 70%igem Ethanol durchgeführt, wonach die Bakterien ein weiteres Mal mit CMF-PBS gewaschen wurden. Die Blockierung erfolgte mit 1% (w/v) BSA (*EM-grade*) in CMF-PBS für 15 min, wonach der Primärantikörper, unkonjugiertes humanes polyklonales IgG (1 mg/mL Stocklösung, Verdünnung 1:500 in CMF-PBS mit 0,1% (w/v) BSA) zu den Bakterien hinzu gegeben wurde. Nach 16-stündiger Inkubation bei RT auf einem Thermoschüttler (300 rpm) wurden die Suspensionen dreimal mit CMF-PBS gewaschen. Die Bakterien wurden dann mit einem gegen humanes IgG (H+L) gerichteten IgG-Antikörper aus der Ziege (1 mg/mL Stocklösung), welcher mit 12 nm großen Goldpartikeln konjugiert ist, in einer Verdünnung von 1:20 in CMF-PBS 1 Stunde lang inkubiert. Danach wurden die Bakterien erneut dreimal mit CMF-PBS gewaschen, wieder in CMF-PBS aufgenommen und auf die *EM-grids* aufgetropft. Nach 15-minütiger Sedimentation bei RT wurde die Suspension vorsichtig abgezogen, und die *grids* wurden mit 2% (v/v) Phosphorwolframsäure (pH 7,2) für 2 min überschichtet. Danach wurde auch diese Lösung verworfen und die für die Elektronenmikroskopie präparierten *grids* auf Filterpapier getrocknet. Das TEM wurde bei 80 kV betrieben.

3.6 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN MIT *E. COLI* – PROTEINEN

Für die Analytik der verschiedenen EibG-Proteine wurden die STEC-Bakterien mit verschiedenen Methoden aufgeschlossen, um optimale EibG-Ausbeuten zu erlangen. Nach Optimierung der Proteinfällungsmethoden wurden die Proteingemische elektrophoretisch aufgetrennt und mittels verschiedener Proteinfärbemethoden sichtbar gemacht. Immunhistologische Nachweise wurden mit modifizierten Westernblot- und ELISA-Verfahren durchgeführt. Der Gesamtproteingehalt der EibG-Produzenten wurde mittels 2D-Gelelektrophorese und *MS-fingerprinting* untersucht. Aus konzentrierten EibG-Lösungen wurden die verschiedenen EibG-Subtypen mittels SDS-PAGE von den restlichen *E. coli* – Proteinen getrennt und die EibG-Bande mittels nanoESI-MS-MS fragmentiert sowie die entstandenen Peptidfragmente sequenziert.

3.6.1 Aufschluss der *E. coli* – Zellen

Da EibG durch die innere und die äußere *E. coli* – Membran sekretiert und dann in der äußeren Membran verankert wird, müssen zur weiteren Aufkonzentrierung von EibG die Bakterienzellen aufgeschlossen werden. Hierfür wurden verschiedene Aufschluss-Methoden der Bakterien auf ihre Effektivität bezüglich der EibG-Wiederfindungsrate ausgetestet. Bei der einfachsten Methode handelt es sich um die Hitzelyse der Bakterienzellen bei 100 °C, wobei mit TBS (*tris-buffered saline*, 50 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, pH 7,5) gewaschene Bakterien erneut im TBS aufgenommen und 10 min bei 600 rpm auf einem Thermocycler erhitzt wurden. Danach folgten SDS-PAGE und Immunblotting (Kapitel 3.6.4).

Weiterhin wurden verschiedene chemische, physikalische und Kombinationen von diesen Methoden zum Aufschluss der Zellen vergleichend getestet. Bei diesen Methoden lag der Schwerpunkt auf der Abscherung membranassoziierter Proteine. Für jedes Experiment wurden 10 mL einer ÜN-Kultur verwendet, die bei 5000 *g* und 4 °C für 10 min abzentrifugiert wurde. Das Sediment wurde dann in einer der folgenden Lösungen aufgenommen und bearbeitet:

1. CMF-PBS und Ultraschall (US):
 - Sediment in CMF-PBS resuspendiert und dreimal 20 Sekunden lang mit US behandelt, zwischen den Schritten für 30 s auf Eis gestellt
 - Zentrifugation bei 13000 *g* und 4 °C für 5 min
 - Überstand auf das Vorkommen und Konzentration von EibG untersucht

2. Lysispuffer und US (Hoiczky *et al.*, 2000):
 - Sediment im Lysispuffer (300 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Na₂HPO₄, 5 mmol/L Na₂EDTA, pH 8) resuspendiert
 - US-Behandlung wie in Punkt 1
 - Zentrifugation wie in Punkt 1
 - Überstand wurde auf EibG-Vorkommen untersucht

3. Periplasmatischer Aufschluss (Drew *et al.*, 2006):
 - Das Sediment in 500 µL Puffer A (200 mmol/L Tris, 100 mmol/L EDTA, 200 g/L Saccharose, pH 8,0) resuspendiert und 20 min unter ständigem Schütteln auf Eis inkubiert
 - Die Suspension wie in Punkt 1 zentrifugiert und der Überstand verworfen
 - Das entstandene Sediment in 500 µL Puffer B (10 mM Tris, 10 mM MgSO₄, pH 8,0) aufgenommen und weitere 10 min auf Eis inkubiert
 - Nach der erneuten Zentrifugation wurde der Überstand auf Periplasma-Proteine untersucht

4. pH-Verschiebung mit NaOH (Fujiki *et al.*, 1982):
 - Sediment in eiskaltem 1 mmol/L NaOH, angesetzt im Lysispuffer (Punkt 2), pH 11 resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert
 - Zentrifugation wie in Punkt 1
 - Überstand wurde auf EibG untersucht

5. Hohe Salzkonzentrationen:

- Sediment in 700 mmol/L NaCl, angesetzt im Lysispuffer, resuspendiert (NaCl, Endkonzentration 1 mol/L) und wie in Punkt 1 behandelt

6. Hitzeabscherung (Tsuchido *et al.*, 1985):

- Sediment im Lysispuffer (Punkt 2) aufgenommen
- Behandlung 1: 60 °C für 90 min
- Behandlung 2: 90 °C für 60 min
- Zentrifugation wurde bei 8000 g für 10 min durchgeführt
- Der Überstand wurde abgenommen und mit verschiedenen Proteinfällungsmethoden (vgl. Kapitel 3.6.2) behandelt

7. Saure Dissoziation durch HCl:

- Sediment wurde in 200 µL Lysispuffer (Punkt 2) aufgenommen, danach wurden 2 µL 25%iger (v/v) HCl hinzugegeben
- Inkubation bei 95 °C für 10 min
- Zentrifugation wie im Schritt 6
- Fällungsmethoden wie in Kapitel 3.6.2

8. Lyse mit Detergenzien, Membrandestabilisierung (Rehm, 2006):

- Das Sediment wurde in 300 µL 50 mmol/L n-Octyl- β -D-glucopyranosid (β -OG), gelöst im Lysispuffer (Punkt 2), aufgenommen und 2 h bei 4 °C auf dem Thermoschüttler bei 300 rpm inkubiert
- Nach der Zentrifugation bei 5000 g und 15 °C für 15 min wurde der Überstand abgenommen und auf EibG untersucht

9. Osmotischer Schock mit Lysozym und Saccharose (Bannwarth und Schulz, 2003, Chen *et al.*, 2004):

- Das Sediment wurde in Saccharose-haltigem Puffer (OS-1: 100 mmol/L Tris-HCl, pH 7,0, 0,75 mol/L Saccharose, 1,5 mmol/L EDTA, 1 mg/mL Lysozym) gelöst; je 1 g Feuchtbioasse wurden in 10 mL OS-1 gelöst und 15 min bei ständiger Durchmischung auf einer Wippe (15% Neigung, 30 Schwenkungen/min) bei RT inkubiert
- Eiskalter OS-2-Puffer (100 mmol/L Tris-HCl, pH 7,8, 1,5 mmol/L EDTA, 100 µL 1 mol/L MgCl₂, 2,5 U/mL *Benzonase Nuclease*) wurde schnell zu der Zellsuspension hinzugegeben (10 mL auf 1 g Feuchtbioasse) und für 20 min bei RT auf einer Wippe weiter inkubiert
- Diese Suspension wurde danach bei 15000 g und 4 °C für 12 min zentrifugiert und der Überstand verworfen
- Zu dem Sediment wurde langsam OS-3 – Puffer (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7,8, 1,5 mmol/L EDTA, 100 µL 1 mol/L MgCl₂, 2,5 U/mL *Benzonase Nuclease*, *Protease Inhibitor Mix* – von Roche: 1 Tablette auf 10 mL) hinzu gegeben und für 15 min auf Eis bei leichtem Schütteln weiter resuspendiert

- Die Zentrifugation der Zelltrümmer, der ausgefallenen Proteine, DNA- und RNA-Reste erfolgte dann bei 4500 *g* und 4 °C für 5 min. Der Überstand mit Sphäroplasten und Membranproteinen wurde vorsichtig abgezogen und auf EibG untersucht

10. Kombinierte Lyse mit Lysozym und β -OG:

- Das *E. coli* – Sediment wurde in TBS/Wasser (1:1) zweimal gewaschen und zwischen den Waschschritten mit 6000 *g* und 4 °C für 12 min zentrifugiert
- Je 1 g gewaschenes Sediment wurde in 10 mL OG-Lysepuffer aufgenommen (Lysepuffer mit 25 mmol/L β -OG); anschließend wurden 100 μ L 1 mol/L MgCl₂, 2,5 U/mL *Benzonase Nuclease*, 1 Tablette *Protease Inhibitor Mix* – und 20 mg Lysozym frisch hinzu gegeben
- Die Suspension wurde dann 2 h auf Eis bei ständigem Schütteln inkubiert und danach zentrifugiert
- Die solubilisierten Proteine im Überstand wurden dann vorsichtig abgenommen und mit einem Sterilfilter mit 0,2 μ m Porengröße von eventuell noch vorhandenen *E. coli* – Zellen befreit
- Die entstandene Lösung wurde entweder direkt auf EibG-Gehalt mittels SDS-PAGE überprüft oder für andere Experimente mittels Ultrafiltration aufkonzentriert (vgl. 3.6.2).

3.6.2 Konzentrierung von Proteingemischen

Die aus den Zellaufschluss-Experimenten stammenden Proteinlösungen lagen häufig in hohen Verdünnungen vor, die vor weiterer Aufarbeitung aufkonzentriert werden mussten. Hierfür wurden mehrere Proteinfällungsmethoden getestet. Als Ziel dieser Experimente galt es eine Methode zu finden, bei der EibG effizient und im aktiven Zustand aufkonzentriert werden kann, so dass das Protein seine Fähigkeit zur Bindung von IgG nicht verliert. Im Anschluss erfolgte immer eine Überprüfung der konzentrierten Proteinfractionen durch SDS-PAGE und weiter durch den Westernblot (Kapitel 3.6.4).

Proteinfällung

Die im Folgenden beschriebenen Methoden basieren auf dem Einsatz von Chemikalien, die die Wasserstoffbrückenbindungen der Proteine destabilisieren und somit die Löslichkeit der Proteine in Wasser herabsetzen, was zu deren Präzipitation führt.

1. Aceton-Fällung (Scopes, 1994):

- Zu 200 μ L proteinhaltiger Probe wurden 800 μ L eiskaltes Aceton hinzu gegeben und 1 h bei -20 °C inkubiert
- Die Zentrifugation der gefällten Proteine erfolgte bei 14000 *g* und 4 °C für 5 min
- Das Präzipitat wurde dann in 20 bis 50 μ L große Aliquots (abhängig von der gewünschten Konzentration) ddH₂O bzw. TBS gelöst und wurde bei -20 °C bis zur weiteren Untersuchung gelagert werden

2. TCA-Fällung (Polacheck und Cabib, 1981):

- Die Probe wurde 1:1 mit 10% (v/v) TCA (*trichloroacetic acid*, Trichloressigsäure) vermischt und für 1 h auf Eis inkubiert

- Zentrifugation erfolgte bei 14000 g und 4 °C für 5 min
- Das Sediment wurde dann in 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert
- Das Präzipitat wurde dann im gewünschten Volumen an TBS aufgenommen und bis zur Untersuchung eingefroren

3. Ammoniumsulfat (England und Seiffter, 1990):

- Zehn Teile der Probe wurden mit einem Teil 1 mol/L Tris-HCl vermischt, wodurch eine pH-Stabilität im neutralen Bereich gewährleistet wurde
- Eine gesättigte Lösung Ammoniumsulfat wurde in Verhältnissen von 1:1, 4:1 und 1:4 zu der Proteinlösung tropfenweise hinzu gegeben (25% (w/v), 50% (w/v) bzw. 75% (w/v) Sättigung) und 1 h auf Eis bzw. ÜN auf Eis bei 4 °C inkubiert
- Zentrifugation erfolgte bei 10000 g und 4 °C für 20 min
- Das Präzipitat wurde dann wieder in der Lösung an Ammoniumsulfat in TBS gelöst, welche für die Fällung verwendet wurde. Es folgte erneute Zentrifugation
- Sowohl der Überstand (nicht gefällte Proteine) als auch das Sediment (gefällte Proteine) wurden auf ihren Gehalt an EibG untersucht.

Mechanische Proteinkonzentrierung

Da die Proteinpräzipitate teilweise noch hohe Salzkonzentrationen aufwiesen und diese die Untersuchungen mit SDS-PAGE stören, wurden die Suspensionen mit kommerziell erhältlichen Ultrafiltrationseinheiten (UF) entsalzt und weiter aufkonzentriert. Die Lösungen mit Volumina bis 20 mL wurden mit den *Vivaspin 6* bzw. *Vivaspin 20* der Firma Sartorius Stedim mit unterschiedlicher Ausschlussgrenze (NMWC: *nominal molecular weight cut-off*) von 3, 10, 30, 50 bzw. 100 kDa (Kilodalton) aufgearbeitet. Hierbei handelt es sich um aus zwei Hauptteilen bestehende UF-Reaktionsgefäße: dem oberen Reservoir mit der Polyethersulfon-Membran am Boden sowie aus dem darunter aufzubringenden Behälter für das Permeat. Durch die Zentrifugalkräfte wird beim Einsatz der UF-Einheiten die zu entsalzende Lösung durch die Membran gepresst und die nicht-löslichen Komponenten werden aufgrund ihrer Molekularmasse im oberen Reservoir zurückgehalten bzw. wandern durch die Membran in den unteren Auffangbehälter. Die hierfür eingesetzte Zentrifuge der Firma Hettich, *Rotana 480 RS*, wurde mit verschiedenen Rotoren für die verschiedenen Größen der UF-Einheiten betrieben.

Für Volumina unter 1 mL wurden die Zentrifugen-Filtereinheiten der Firma Millipore mit der *Low-binding Durapore® PVDF* – Membran mit variablem NMWC eingesetzt. Diese funktionieren nach dem gleichen Prinzip wie die *Vivaspin*-Einheiten.

Für Volumina größer als 100 mL wurde die Ultrafiltrationseinheit *Vivaflow 200* der Firma Sartorius verwendet, die aus einer Doppelkammer mit dazwischen liegender Membran aus Polyethersulfon (NMWC: 100 kDa) mit 200 cm² Membranfläche besteht. Die Filtration erfolgt nach dem Prinzip des Querstroms bzw. Tangentialflusses, wobei die zu filtrierende Lösung mittels einer Peristaltikpumpe in die erste Kammer der Einheit gedrückt wird. Das Filtrat wird auf der anderen Seite der Membran aufgefangen, wieder zurück in das Probengefäß geleitet und kann erneut durch die UF-Einheit geleitet werden. In **Abb. 15** ist der Aufbau einer *Vivaflow 200* – Einheit schematisch dargestellt.

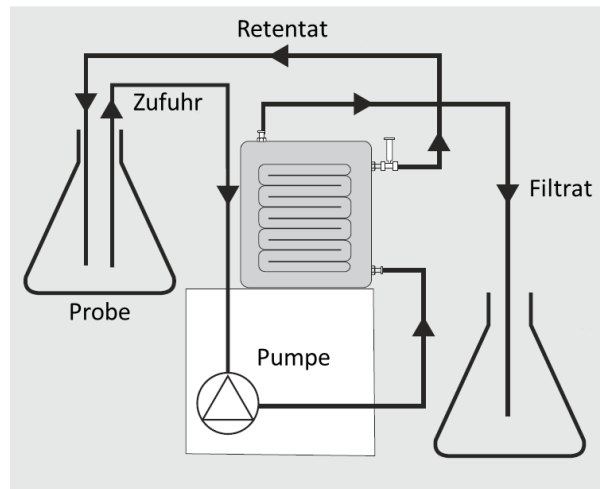


Abb. 15: Das Vivaflow 200 – System für die Ultrafiltration nach dem Querstromprinzip (*crossflow*).

Alle Experimente mit *Vivaflow 200* wurden gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.6.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

NanoDrop-Schnelltest

Um die im Folgenden beschriebenen kolorimetrischen Proteinkonzentrationsbestimmungen genauer und schneller durchführen zu können, wurden proteinhaltige Proben erst mittels einer spektroskopischen Methode auf die gewünschten Proteinkonzentrationen eingestellt. Es wurden 2 μL der jeweiligen Probe mit dem *NanoDrop* bei 280 nm vermessen, womit die ungefähren Konzentrationen an Protein bestimmt wurden.

Markwell-Assay

Die genauen Proteingehaltsbestimmungen verschiedener EibG-haltiger Lysate erfolgten nach der Methode von Markwell *et al.* (1978). Hierbei handelt es sich um eine modifizierte Methode nach Lowry *et al.* (1951), mittels einer Kombination der Biuret-Reaktion mit dem Folin-Ciocalteu-Phenol – Reagenz. Im wässrigen, alkalischen Milieu komplexieren Peptidbindungen Cu^{2+} . Dabei entsteht ein rot-violett – gefärbter Kupfer-Protein-Komplex, der wiederum ursächlich für die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ -Ionen in Verbindung mit dem Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz ist. Die tief blaue Färbung kann bei 630 nm gemessen werden. Die Bestandteile der verwendeten Lösungen sind in

Tabelle 7 aufgelistet. Da je nach Versuchsansatz sehr viele Proben auf deren Proteingehalt gleichzeitig untersucht wurden, wurden die Experimente in Mikrotiterplatten mit anschließender Messung im ELISA-Reader durchgeführt. Je 2 bzw. 5 μL der zu untersuchenden Probe wurden mit ddH_2O auf 60 μL Gesamtvolumen gebracht. Dieser Lösung wurden dann 200 μL Lösung C hinzugegeben und 15 min bei RT inkubiert. Zu jeder Probe wurden danach 20 μL Lösung D hinzu gegeben und 45 min bei RT weiter inkubiert, wonach die Proben bei 630 nm gegen einen Blindwert (ddH_2O) gemessen wurden. Die notwendigen Kalibrierungsgeraden wurden mittels einer BSA-Verdünnungsreihe erstellt. Dabei wurde BSA (1 mg/mL), ähnlich den zu bestimmenden Proben, in verschiedenen Konzentrationen mit ddH_2O verdünnt und parallel zu den Proben vermessen.

Tabelle 7: Lösungen für die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Markwell et al. (1978)

Lösung	Bestandteile
Lösung A	2% (w/v) Na ₂ CO ₃ , 0,17% (w/v) K-Na-Tartrat, 1% SDS (w/v), 10% (v/v) 1 mol/L NaOH
Lösung B	4% (w/v) CuSO ₄
Lösung C	Lösung A/Lösung B (99/1)
Lösung D	Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz/ddH ₂ O (1/1)

Bradford-Assay

Eine wesentlich schnellere und gegenüber verschiedenen Pufferbestandteilen unempfindlichere Proteinkonzentrationsbestimmung stellt der Bradford-Assay dar (Bradford, 1976). Hierbei wird der blaue Säurefarbstoff Coomassie-Brillantblau G 250 verwendet, der im sauren Milieu und in Gegenwart von Proteinen eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm erfährt. Als Bradford-Reagenz wurde das kommerziell erhältliche BioRad *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* – Reagenz eingesetzt. Dafür wurde ein Teil dieses Reagenzes mit vier Teilen Wasser vermischt, und zu je 10 µL der zu untersuchenden Probe wurden 200 µL des verdünnten Konzentrats gegeben. Nach 10 min Inkubation wurden die Ansätze mit dem ELISA-Reader bei 595 nm vermessen.

3.6.4 Gelelektrophoretische Auftrennung EibG-positiver *E. coli* – Lysate

SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

Die SDS-PAGE ist eine Standardmethode zur Trennung von Proteingemischen in einzelne Proteinfractionen. Das negativ geladene SDS überdeckt die Eigenladungen von Proteinen so, dass sich pro Gramm Protein 1,4 Gramm SDS anlagern und somit eine konstante Ladungsverteilung erfolgt. Durch die Zugabe des 4x Lämmli-Puffers (200 mmol/L Tris-HCl, pH 6,8, 5% (v/v) 2-Mercaptoethanol, 8% (w/v) SDS, 0,4% (w/v) Bromphenolblau, 40% (w/v) Glycerin; Laemmli, 1970) wurden SDS und 2-Mercaptoethanol im Überschuss zu den Proteinen hinzugegeben. Durch Erhitzung der Lösung auf 100 °C werden die Sekundär- und die Tertiär-Strukturen von Proteinen durch Aufbrechung der Wasserstoffbrücken und Disulfidbrücken zerstört. Im elektrischen Feld wirkt das Polyacrylamid-Gel (PA-Gel) als eine Art Sieb, und nach entsprechender Zeitvorgabe, die von der angelegten Spannung und der Dichte des Gels abhängt, werden Proteine unterschiedlicher Größen getrennt. Die PA-Gele entstehen durch Quervernetzung von Acrylamid und dem Vernetzer N,N'-Methylenbisacrylamid (Bis), die in einem Verhältnis von 37,5/1 eingesetzt wurden. Die Vernetzungsreaktion wird durch freie Radikale gestartet, die bei den Wechselwirkungen von Ammoniumpersulfat (APS) und dem tertiären aliphatischen Amin, Tetramethylethyldiamin (TEMED), entstehen. Die Größe der Hohlräume zwischen den Polymerketten ist von der Konzentration der einzelnen Bestandteile (Acrylamid, Bis) abhängig.

Bei dem diskontinuierlichen Trennsystem nach Lämmli wird ein großporiges Sammelgel mit einem engporigen Trenngel überschichtet, wobei sich die pH-Werte der Gelpuffer unterscheiden (**Tabelle 8**). Beim Anlegen der elektrischen Spannung an das Gel setzen sich die Cl⁻-Ionen mit hoher Geschwindigkeit in Bewegung. Aufgrund des pH-Wertes von 6,8 liegen die Glycin-Moleküle, die mit dem Elektrodenpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS) in das Gel einwandern, mit einer Nettoladung von ca. Null vor und bleiben hinter den Chlorid-Ionen zurück. Zwischen den beiden

Ionen-Feldern entwickelt sich eine Zone geringer Ionendichte, was einen steilen Feldstärke-Gradienten zur Folge hat. In dieser Zone konzentrieren sich die mit SDS beladenen Proteine und wandern als schmale Bande in das Trenngel ein. Der Anstieg des pH-Wertes im Trenngel auf 8,8 bewirkt eine negative Ladung von Glycin-Molekülen, so dass diese die Proteine überholen und schließlich aus dem Gel vor den Proteinen herauswandern. Die Proteinmischung wird im Trenngel aufgrund des „Molekularsiebeffekts“ in Fraktionen gleicher Molekulargewichte aufgetrennt, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit umgekehrt proportional zu dem Molekulargewicht des Proteins ist. Eine Massenzuordnung wird durch die gleichzeitige Verwendung von Molekulargewichtsmarkern erleichtert. Nach der Trennung erfolgt die Anfärbung der Gele (vgl. Kapitel 3.6.5.).

Tabelle 8: Bestandteile der SDS-PAGE – Gele nach Lämmli für zwei Minigele

	10% Trenngel	6% Sammelgel
Bestandteile in mL		
Trenngelpuffer (0,75 mol/L Tris-HCl, pH 8,8)	7,00	-
Sammelgelpuffer (0,25 mol/L Tris-HCl, pH 6,8)	-	3,50
10% (w/v) SDS	0,28	0,14
ddH ₂ O	2,00	1,93
Acrylamidlösung: 30% (w/w) Acrylamid, 0,8% (w/w) Bis	4,68	1,40
10% (w/v) Ammoniumpersulfat	0,07	0,04
TEMED	0,02	0,01
Gesamt	14,04	7,02

Die zu untersuchenden Proteinproben wurden im Verhältnis 4:1 mit dem Lämmli-Puffer verdünnt und bei 100 °C 10 Minuten lang aufgeköcht. Nach kurzer Zentrifugation in der Tischzentrifuge wurden die Proben in die Geltaschen pipettiert. Die Gelelektrophorese erfolgte für ca. 30 min bei 90 V; nach dem Einwandern der Proben in das Trenngel wurde die Spannung auf 110 V gesetzt. Nachdem die Bromphenolblaubande aus dem Gel herausgewandert war und die zu untersuchenden Proteine die gewünschte Laufhöhe erreichten, wurde die Gelelektrophorese gestoppt.

Proteintransfer auf Trägermembranen (Westernblot)

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine können aus PA-Gelen elektrophoretisch auf Nitrocellulose-Membranen übertragen werden (Towbin *et al.*, 1979). Dabei entsteht auf der Membran das genaue Abbild des Bandenprofils wie im PA-Gel, und die Proteine können durch immunhistochemische Färbemethoden spezifisch nachgewiesen werden. In dieser Arbeit erfolgte der Westernblot nach dem Prinzip des Tank- bzw. Nasszellen-Blottings. Dabei wurden das Gel, die Membran und das Filterpapier als eine Art Sandwich zwischen vertikal angebrachten Elektroden der Blotapparatur, welche auch für die SDS-PAGE verwendet wurde, angeordnet und der ganze Behälter mit dem Blotpuffer (25 mmol/L Tris, 192 mmol/L Glycin, 0,1% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol) gefüllt. Die Geometrie dieses Gerätes und der geringe Abstand zwischen den Elektroden begünstigen den Aufbau von starken homogenen elektrischen Feldern bei geringen Stromstärken und verkürzen dadurch die Transferzeit der Proteine auf die Membran.

Vor dem Blotten wurden die Gele, die Nitrocellulose-Membran und das Filterpapier für 15 min im Blotpuffer inkubiert. Die angelegte Stromstärke betrug für 1 h 250 mA und für weitere 2 h 500 mA

mit einem möglichen Anstieg der Spannung bis 100 V für die erste Stunde und bis 200 V für die verbleibende Transferzeit. Methanol verstärkt die hydrophoben Interaktionen zwischen den Proteinen und der Membran, wobei die optimale Konzentration von diesem erst experimentell ermittelt werden musste. Nach dem Transfer wurden die Proteine auf der Membran mittels Immunfärbung identifiziert (vgl. Kapitel 3.6.5).

Dotblot-Assay

Der *Dotblot*-Test wurde aufgrund des geringen Verbrauchs an Probenmaterial als schnelle Methode zur Analyse EibG-haltiger Lysate ausgewählt. Dabei wurden die Nitrocellulose-Membran und das Filterpapier im Blotpuffer getränkt und dann in die spezielle *Dotblot*-Apparatur (Denville Scientific Inc.) eingespannt. Diese Apparatur besteht aus einem, einer 96-well Mikrotiterplatte ähnlichem, Oberteil mit 96 Öffnungen, der unter dem Oberteil eingespannten Membran und einem Reservoir darunter, an den mit einer Wasserstrahlpumpe Unterdruck angelegt wird. Durch den Unterdruck unter der Membran werden die durch die Öffnungen zupipettierten Proteinlösungen auf die Membran gezogen, wo die überschüssige Flüssigkeit abgesaugt wird. Von den immobilisierten Proteinen konnten dann mittels Immunfärbung die gesuchten Proteine sichtbar gemacht werden. So wurden EibG-haltige Fraktionen von denen ohne EibG unterschieden. Das Einsatzvolumen betrug je nach Experiment zwischen 10 und 50 µL je Öffnung.

3.6.5 Proteinfärbemethoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Arten der Proteinfärbung eingesetzt: die Färbung mit einem Triphenylmethan-Farbstoff, dem Coomassie-Brilliantblau, und die Färbung durch Reduktion von Silber zu Silbernitrat, die sogenannte Silberfärbung.

Färbung mit Coomassie-Brilliantblau

Der Farbstoff Coomassie-Brilliantblau G-250 bindet durch elektrostatische Wechselwirkungen unter sauren Bedingungen an freie geladene Amino- und Imino-Gruppen und färbt die sich im Gel befindenden Proteine. Aufgrund der schnellen Durchführbarkeit und der hohen Sensitivität durch die hohe Auswascheffizienz nicht gebundener Coomassie-Partikel aus dem Gel, wurde die Färbemethode ohne Alkohole und ohne Essigsäure durchgeführt. Dafür wurden die SDS-PAGE – Gele nach dem Lauf dreimal mit 35 mmol/L HCl 5 Minuten lang gewaschen, wobei nach jedem Wechsel der Waschlösung das Gel für 30 s in einem handelsüblichen Mikrowellen-Ofen (750 W) erhitzt wurde (ohne Kochen). Das Gel wurde danach mit der Coomassiefärbelösung (100 mg Coomassie-Brilliantblau G-250, 35 mmol/L HCl in 1 L ddH₂O, gelöst auf einem Magnetrührer ÜN) überschichtet, für 15 s im Mikrowellen-Ofen erhitzt und weitere 30 min inkubiert. Die Entfärbung wurde mit dem Waschpuffer (35 mM HCl) und dem Filterpapier, welches an den Rändern in die Färbeschalen gesteckt wurde, durchgeführt. Wenn die Proteine anschließend massenspektrometrisch analysiert wurden, wurde das Erhitzen im Mikrowellen-Ofen ausgelassen. Stattdessen wurden die Inkubationszeiten auf das Vierfache verlängert, wodurch die Entfärbung über Nacht dauerte.

Färbung mit Silbernitrat

Die Silberfärbung wurde nach dem Protokoll von Mortz *et al.* (2001) durchgeführt, das die modifizierte Methode nach Heukeshoven und Dernick (1988) darstellt. Bei der Silberfärbung werden die in den Gelen enthaltenen Proteine erst mit 10%iger (v/v) Essigsäurelösung in Methanol fixiert und dann mit einer Natriumthiosulfat-Lösung behandelt. Die Silbernitrat-Ionen werden durch die Aminosäuren Glutamat, Aspartat und Cystein zu metallischem Silber reduziert, wodurch dieses ausfällt und die Proteine braun bis schwarz angefärbt werden. Verwendetes Na-Thiosulfat, Natriumcarbonat und Formaldehyd liefern die für die Reduktionsreaktion notwendigen Bedingungen. Um nicht alle sonst noch im Gel vorhandenen Silber-Ionen zu reduzieren und um die Hintergrundfärbung niedrig zu halten, wurde die Entwicklungsreaktion nach dem Sichtbarwerden von Proteinbanden durch starke pH-Änderung gestoppt. Weiterhin können die Silber-Ionen auch mit Nukleinsäuren, Lipopolysacchariden, Lipiden und Glykolipiden reagieren und diese anfärben. Die verwendeten Lösungen und die Dauer der einzelnen Färbeschritte sind in **Tabelle 9** aufgeführt.

Tabelle 9: Für die Silber-Färbung verwendete Lösungen und Dauer der einzelnen Färbeschritte

Vorgang	Lösung	Dauer
Fixierung	40% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure	1 h
Waschen	ddH ₂ O	1 h bzw. ÜN
Sensibilisierung	0,2% (w/v) Na-Thiosulfat (Na ₂ S ₂ O ₃)	1 min
Waschen	ddH ₂ O	3x 30 s
Versilberung	0,1% (w/v) Silbernitrat (AgNO ₃), 0,02% (v/v) 37%iges Formaldehyd ^a , 4 °C	20 min
Waschen	ddH ₂ O	3x 30 s
Gelüberführung	in eine neue Färbeschale	
Waschen	ddH ₂ O	1 min
Entwicklung	3% (w/v) Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃), 0,05% (v/v) 37%iges Formaldehyd	(1) 1 min (2) 3 bis 7 min
Waschen	ddH ₂ O	20 s
Stoppen	5% (v/v) Essigsäure	5 min
Aufbewahrung	4 °C in 1% (v/v) Essigsäure	

(^a) Formaldehyd wird erst kurz vor Gebrauch hinzugegeben. Alle Lösungen wurden mit ddH₂O hergestellt.

Luminometrische Immundetektion der Peroxidase

Die Detektion von EibG auf der Nitrocellulose-Membran erfolgte über den luminometrischen Nachweis. Dabei wird eine luminogene Substanz durch elektronische Anregung in ein Photonen-emittierendes Produkt umgewandelt (Albrecht *et al.*, 1994). Hierfür wurde das humane polyklonale IgG Fc – Fragment, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (HRP: *horse radish peroxidase*), eingesetzt. Das HRP setzt im Beisein von H₂O₂ unter alkalischen Bedingungen das Luminophor Luminol (3-Aminophthalhydrazid) zu einem kurzlebigen energiereichen Peroxid um, welches unter Aufspaltung der Peroxidbindung in das 3-Aminophthalat-Dianion übergeht. Die dabei entstehende Energie führt zur Anregung der Carbonylbindungen und emittiert dadurch Lichtphotonen mit dem Absorptionsmaximum bei 428 nm (Thorpe und Kricka, 1986).

Die Nitrocellulose-Membranen mit den darauf immobilisierten Proteinen wurden dreimal mit TBS-T (TBS mit 0,05% (w/v) Tween 20) für je 10 min gewaschen, um alle nicht gebundenen Proteine und eventuelle Acrylamidreste zu entfernen. Die Blockierung der Membran wurde mit 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-T für 1 h bei RT unter ständigem Schütteln durchgeführt. Nach erneutem drei-maligen Waschen mit TBS-T wurde der Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:4000 in TBS-T auf die Membran gegeben und 16 h bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran erneut dreimal mit TBS-T gewaschen und je Membran wurden 3 mL Gesamtvolumen der vereinten Puffer (1/1) des *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* von Thermo Scientific hinzugegeben. Nach 5 min Inkubation wurden die Signale mit dem BioRad-Imager bei 428 nm für die Dauer von 20 min mit insgesamt vier durchgeführten Aufnahmen detektiert. Hiernach konnten weitere Proteine auf der Nitrocellulose-Membran mit Antikörpern, die mit alkalischer Phosphatase konjugiert sind, detektiert werden.

Kolorimetrische Immundetektion mittels alkalischer Phosphatase

Der kolorimetrische Nachweis von EibG und OmpA erfolgte über einen mit alkalischer Phosphatase markierten Sekundär-Antikörper (Sekundär-AK), welcher die an Proteine gebundene Primär-Antikörper (Primär-AK) erkannte. Der eigentliche kolorimetrische Nachweis mit 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat (BCIP) wurde dann durch die alkalische Phosphatase katalysiert, welche die Abspaltung des Phosphatrestes von BCIP bewirkte und zum Entstehen eines Indoxylderivats führte. Das entstandene Indoxylderivat wurde durch das Nitroblau-Tetrazolium (NBT) oxidiert und in einen unlöslichen 5,5'-Dibrom-4,4'-Dichlor-Indigo – Farbstoff umgewandelt. Das NBT wurde dabei zu einem purpur gefärbten Diformazin reduziert. Die farbbildende Reaktion kann auch nur mit BCIP erfolgen, doch NBT katalysiert die Gesamtreaktion, so dass bereits nach zehn Minuten ein sichtbares Ergebnis ausgewertet werden kann (Francí und Vidal, 1988). Als weiterer Vorteil von NBT gilt die Stabilität des entstandenen Farbkomplexes, welcher nicht ausbleichen kann. Die einzelnen Schritte der Immundetektion mittels alkalischer Phosphatase sind in **Tabelle 10** dargestellt. Der NBT-BCIP – Puffer wurde wie folgt hergestellt: 100 µL der NBT-BCIP – Stammlösung (18,75 mg/mL NBT, 9,4 mg/mL BCIP, in 67% (v/v) DMSO) wurden mit 10 mL Puffer (0,1 mol/L Tris-HCl, pH 9,5, 0,1 mol/L NaCl, 0,05 mol/L MgCl₂) vermischt und auf die Membran gegeben.

Tabelle 10: Für die kolorimetrische Immundetektion mittels alkalischer Phosphatase verwendete Lösungen und einzelne Schritte der Farbreaktion

Schritt	Lösung	Dauer in min
Blocken	TBS-T mit 5% (w/v) Magermilch	60
Waschen	TBS-T	10
Primär-AK	1:4000 in TBS-T	60 bei RT oder ÜN bei 4 °C
Waschen	TBS-T	3x10
Sekundär-AK	1:8000 in TBS-T	60
Waschen	TBS-T	3x10
Färben	10 mL NBT-BCIP-Puffer	10 bis 15
Waschen	ddH ₂ O	1

3.6.6 Auftrennung der inneren und der äußeren *E. coli* – Membran

Um die Konformation von EibG in der inneren und der äußeren *E. coli* – Membran zu untersuchen, wurden diese mittels Saccharosegradienten-Zentrifugation aufgetrennt. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Membrandichte, können die beiden Membrantypen voneinander getrennt werden. Dazu wurde die Methode der Sphäroplasten-Isolierung nach Witholt *et al.* (1976) und Hill und Sillence (1997) modifiziert, wobei die generelle Vorgehensweise aus der Sphäroplasten-Isolierung, der osmotischen Schockbehandlung und der Saccharosegradienten-Trennung der inneren und der äußeren Membranen besteht. Der Ablauf ist in **Abb. 16** dargestellt.

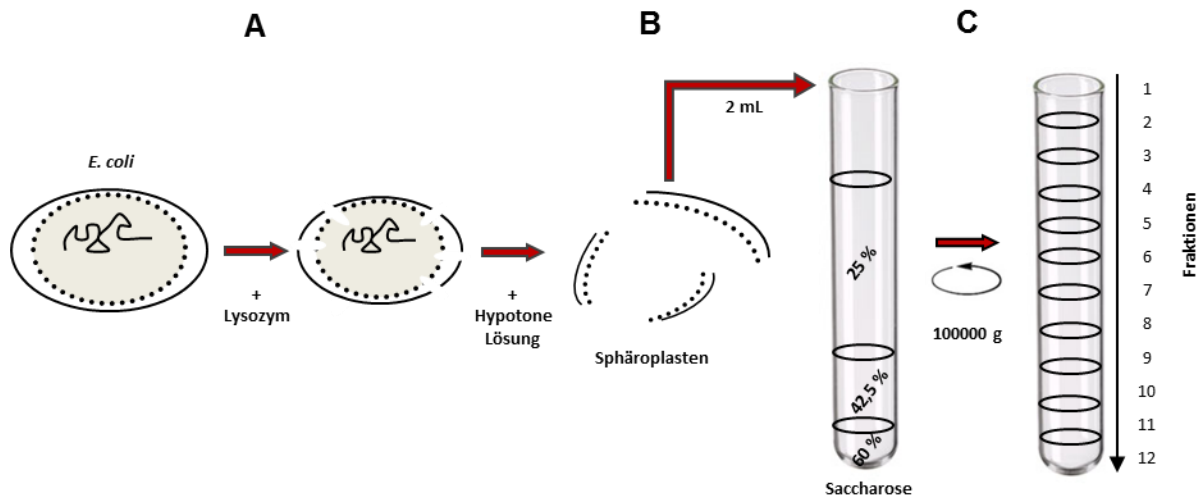


Abb. 16: Herstellung bakterieller Sphäroplasten und Abtrennung der inneren und der äußeren Membran von *E. coli*.

(A und B) enzymatische und osmotische Lyse; (C) Auftrennung der inneren und äußeren Membran des *eibG*-positiven STEC-Stammes 1809/00 mithilfe der Saccharosegradienten-Zentrifugation.

Die Sphäroplasten-Isolierung wurde gemäß der in Kapitel 3.6.1 (Punkt 10) beschriebenen Bakterienlyse durchgeführt. Dabei wurden mit 50 mL einer ÜN-Kultur 500 mL der Hauptkultur inokuliert und die Zellen nach 20 h Wachstum lysiert. Für den Saccharosegradienten wurden in den speziellen Ultrazentrifugations-Reaktionsgefäßen (UZ-tubes, 13,2 mL, *Ultra-Clear tubes*, Beckman) 1 mL 60%ige (w/w), 2 mL 42,5%ige (w/w) und 5 mL 25%ige (w/w) Saccharoselösung übereinander geschichtet. Die Saccharose wurde vorher in 10 mM HEPES, 5 mM EDTA, pH 7,5 gelöst. Danach wurden 2 mL der Sphäroplasten-Suspension über den Saccharosegradienten langsam aufgetragen, die UZ-tubes auf einer Waage mit dem HEPES-Puffer austariert und für 16 h bei 100.000 g und 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Zentrifugat wurde in 1 mL Fraktionen von oben aus den UZ-tubes abgenommen, für drei Tage gegen VE-H₂O dialysiert, eingefroren und mit dem Lyophilisator gefriergetrocknet, um das Wasser zu entfernen. Die Bestandteile der Fraktionen wurden in 50 µL 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8,0 gelöst, mit Lämmli-Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE und Immunblot mit humanem IgG Fc-HRP auf EibG-Gehalt überprüft.

3.7 AUFKONZENTRIERUNG VON EIBG MITTELS HITZEEXTRAKTION

Als Aufkonzentrierungsmethode für EibG wurde die Hitzeextraktion eingesetzt. Hierfür wurden die ÜN-Kulturen der EibG-positiven STEC 1:50 verdünnt und in 30 mL LB-Medium bei 37 °C und 180 rpm

für weitere 4 h kultiviert. Die Kulturen der Stämme wurden dann auf die gleiche OD_{600} eingestellt und mit 6000 *g* bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die Sedimente wurden dann je Stamm in 10 mL 0,9%iger (w/v) NaCl-Lösung aufgenommen, resuspendiert, zentrifugiert und der Waschschrift zweimal wiederholt. Die gewaschenen *E. coli* – Sedimente wurden anschließend in 10 mL 0,5 mmol/L Tris, 75 mmol/L NaCl, pH 7,4 nach Zugabe einer *Protease Inhibitor Mix* – Tablette aufgenommen und für 20 min bei 60 °C auf einer Wippe unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die *E. coli* – Suspensionen auf Eis gestellt und nach 10 min Inkubation sechsmal für 10 s mit dem Vortexer intensiv gemischt. Die extrahierten Membranproteine wurden dann mittels Zentrifugation (12000 *g*, 4 °C, 15 min) von den übrigen Zelltrümmern abgetrennt. Der Membranprotein-haltige Überstand wurde mittels TCA-Fällung (vgl. Kapitel 3.6.2) aufkonzentriert und die gefällten Proteine in 100 µL 10 mmol/L Tris, pH 8,0 aufgenommen, die dann mittels SDS-PAGE und ELISA (vgl. Kapitel 3.8) analysiert wurden.

3.8 AFFINITÄT VERSCHIEDENER EIBG-SUBTYPEN GEGENÜBER IMMUNGLOBULINEN VERSCHIEDENER SÄUGERSPEZIES

Die Affinität verschiedener EibG-haltiger Lysate an Immunglobuline wurde mittels ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) untersucht. Hierfür wurden die durch Hitzeextraktion (Kapitel 3.7) aufkonzentrierten *E. coli* – Lysate verwendet. Die Lysate wurden mit dem basischen 2-fach – Beschichtungspuffer (60 mmol/L Na_2CO_3 , 140 mmol/L $NaHCO_3$, pH 9,5) 1:1 verdünnt und diese Lösungen dann mit einem Gesamtproteingehalt von 0,1 mg je *well* in die *Maxisorp*-MTP von Nunc überführt. Als Negativkontrolle wurde der Beschichtungspuffer eingesetzt. Jede Analyse wurde als 3-fach – Bestimmung durchgeführt. Nach ÜN-Immobilisierung der Proteine (16 h) bei 4 °C und weiterer Inkubation für 4 h bei RT auf einer Wippe wurden die EibG-Lysate abgenommen, und jedes *well* der MTP wurde zweimal mit je 270 µL TBS gewaschen. Als Blockierungsreagenz freier Bindungsflächen wurde 8%iges (w/v) BSA in TBS eingesetzt, mit dem die MTP-*wells* für 3,5 h bei RT auf einer Wippe inkubiert wurden. Nach Entfernung der Blockierlösung wurden die MTP erneut zweimal mit TBS gewaschen und die Detektionsantikörper in einem Volumen von 100 µL (2 µg/mL in TBS-T mit 25 mmol/L $CaCl_2$) je MTP-*well* aufgegeben. Als Detektionsantikörper wurden polyklonale Antikörper der Spezies Mensch, Rind, Schaf, Ziege, Schwein und Huhn verwendet, welche mit HRP konjugiert waren. Die Bindungsstudien der Antikörper mit EibG wurden, ähnlich der Immunfärbung, ÜN bei RT unter leichtem Schütteln durchgeführt. Nach Absaugen der Antikörper-Lösungen wurden die MTP-*wells* viermal mit TBS gewaschen, gefolgt von dem kolorimetrischen Nachweis der HRP mit dem Substrat OPD (*o*-Phenylendiamin). Das chromogene Diaminobenzol OPD wird durch Peroxidase in Gegenwart von H_2O_2 in das lösliche Produkt 2,3-Diaminophenazin umgewandelt. Für eine MTP wurden 10 mg OPD in 10 mL OPD-Puffer (50 mmol/L Zitronensäure, 50 mmol/L Na_3PO_4 , pH 5) gelöst und kurz vor dem Einsatz 10 µL 30%iges (v/v) H_2O_2 hinzugegeben. Je *well* wurde die Enzymreaktion durch die Zugabe von 100 µL dieser Lösung gestartet; nach 15 min wurde die Reaktion mit 100 µL 2,5 mol/L Schwefelsäure gestoppt. Die Farbintensitäten wurden mit dem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 492 nm vermessen.

3.9 2D-GELELEKTROPHORESE

Die Proteome EibG-positiver STEC bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen wurden mittels 2D-Gelelektrophorese (2D-GE) und dem anschließenden *peptide mass fingerprint* (vgl. Kapitel 3.10.2) analysiert. Nach intensiver Methodenoptimierung wurde die im Folgenden vorgestellte Lysemethode, die eine Kombination aus mehreren etablierten Bakterienlysemethoden (Nandakumar *et al.*, 2003) darstellt, als die beste erachtet.

3.9.1 Lyse EibG-positiver STEC für 2D-GE

EibG-positive Stämme wurden in 10 mL LB-Medium bei 37 °C und 180 rpm für 20 h kultiviert und 1:100 für geschüttelte bzw. 1:50 für nicht geschüttelte Anzüchtungen in 30 mL LB-Medium verdünnt und weitere 20 h bei 37 °C kultiviert. Die Bakterien wurden bei 5000 *g* und 15 °C für 15 min zentrifugiert und die Sedimente weitere dreimal mit 10 mL 10 mmol/L Tris, pH 8,0 gewaschen. Die Bakteriensedimente wurden danach in 5 mL Lysispuffer (300 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Na₂HPO₄, 5 mmol/L Na₂EDTA, pH 8) mit 20 mg Lysozym, ½ *Protease Inhibitor Mix* – Tablette und 0,5 mL 10%iger (w/v) β-OG – Lösung (in ddH₂O gelöst) aufgenommen. Nach 30 min Inkubation bei RT auf einer Wippe wurden die Bakterien-Suspensionen dreimal für 20 s mit Ultraschall bei 70% Intensität behandelt. Zwischen den US-Schritten wurden die Proben für 1 min auf Eis gestellt. Jede Probe erhielt 2,5 U/mL *Benzonase Nuclease* sowie 50 µL 1 mol/L MgCl₂-Lösung und wurde weitere 30 min bei RT auf einer Wippe inkubiert. Die Zellrückstände wurden danach mit 5000 *g* bei 15 °C für 15 min zentrifugiert, die Überstände abgenommen und die Proteine mit 20% TCA (v/v) und 0,02% (w/v) DOC (*deoxycholate*, Natriumdesoxycholat), gefällt. DOC ist ein anionisches Tensid und vermittelt die Solubilisierung von Membranproteinen. Die präzipitierten Proteine wurden mit 10000 *g* bei 4 °C für 15 min zentrifugiert und das entstandene Sediment mit eiskaltem Aceton gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Proteinpräzipitate für 2 min im Vakuumkonzentrator getrocknet und danach sofort in 100 µL 200 mmol/L NaOH aufgenommen. Nach 3 min Inkubation wurden die Proteinlösungen mit 400 µL SSSB-Puffer (*standard sample solubilization buffer*; 8 mol/L Harnstoff, 4% (w/v) CHAPS, 1% (w/v) DTT, 2% (v/v) *Servolyte* (3-10 linear, Serva)) verdünnt. Nach weiterer Resuspendierung der Proteine für 30 min auf der Wippe wurden die Proben mit dem Bradford-Assay auf ihren Proteingehalt überprüft (vgl. Kapitel 3.6.3) und bei -20 °C eingefroren.

3.9.2 Rehydratisierung

Vor der Isoelektrischen Fokussierung (IEF) müssen die IPG-Streifen (IPG: immobilisierter pH-Gradient) rehydratisiert werden. Dabei wurde die Methode der aktiven Rehydratisierung eingesetzt, wobei die Proteinproben zusammen mit dem Rehydratisierungsreagenz auf die IPG-Streifen aufgetragen wurden. Die aus Polyacrylamid bestehenden IPG-Streifen enthalten an den Enden saure bzw. alkalische Acrylamidderivate, wodurch ein stabiler pH-Gradient gebildet wird. Die geringe Spannung bei dem Rehydratisierungsschritt sorgt für die anfängliche Bewegung der Proteine zu deren pI-Null – Werten und somit in die Richtung des passenden pH-Bereichs auf dem IPG-Streifen.

Je Probe wurden 150 µg Gesamtprotein im SSSB-Puffer mit dem Rehydratisierungspuffer (8 mol/L Harnstoff, 2% (w/v) CHAPS, 13 mmol/L DTT, 0,6% (v/v) *Servolyte*, 0,002% (w/v) Bromphenolblau) auf ein Probenvolumen von 350 µL eingestellt. Die Proben wurden gleichmäßig in die dafür vorgesehenen Kanäle in der Rehydratisierungsschale verteilt und die IPG-Streifen mit der Gelseite nach unten auf die Proben luftblasenfrei platziert. Die IPG-Streifen wurden mit je 2,5 mL Mineralöl

zum Schutz vor Austrocknung bedeckt. Die Schale mit den Streifen wurde in das IEF-Gerät (*Protean IEF Cell*, BioRad) eingesetzt und das Rehydratisierungsprogramm gestartet (12 h, 20 °C, 50 V, 50 µA je Streifen).

3.9.3 Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)

Aufgrund ihrer Zusammensetzung aus sauren und basischen Aminosäuren wandern Proteine im elektrischen Feld zu dem pH-Bereich des IPG-Streifens, in dem sich die positiven und negativen Ladungen aufheben, dem isoelektrischen Punkt (pI). An diesem Punkt heben sich die Kräfte des elektrischen Feldes auf und die Proteine verbleiben in einem für jedes Protein spezifischen pI-Bereich. Diejenigen Proteine, welche aus dem pI-Null- in den benachbarten pH-Bereich einwandern, verändern dabei ihre elektrische Ladung und wandern wieder zurück zu ihrem pI-Null – Bereich.

Nach dem Rehydratisierungsschritt wurden die IPG-Streifen in dem IEF-Gerät belassen und die Laufparameter (vgl. **Tabelle 11**) für die Fokussierung neu eingegeben, wobei jedoch die Stromstärke und die Temperatur gleich bleiben (50 µA je Streifen, 20 °C).

Tabelle 11: Programm für die Isoelektrische Fokussierung

Schritt ^a	Spannung in V	Spannungsanstieg	Dauer in h
1	250	schnell	1
2	500	schnell	1
3	10000	schnell	2
4	10000	schnell	4
5	7500	langsam	2
6	5000	langsam	2
7	1500	langsam	1

(^a) Bis zur Entnahme der IPG-Streifen aus dem IEF-Gerät konnte nach dem letzten Schritt eine geringe Spannung (50 V) eingestellt werden, um eine Diffusion der Proteine zu unterbinden.

3.9.4 Äquilibration

Während der Äquilibration werden die auf den IPG-Streifen immobilisierten Proteine für die Auftrennung in der zweiten Dimension mittels SDS-PAGE vorbereitet. Die Proteine werden hierfür im ersten Schritt der Äquilibration mit DTT reduziert. Im zweiten Schritt werden die bei der Reduktion entstandenen Sulfhydryl-Gruppen mit Iodacetamid alkyliert. In beiden Schritten wird SDS für die Linearisierung der Proteine eingesetzt.

Bei beiden Äquilibrationsschritten wird die Äquilibrations-Stammlösung (50 mmol/L Tris, pH 8,8, 6 mol/L Harnstoff, 30% (v/v) Glycerol, 2% (w/v) SDS, 0,002% (w/v) Bromphenolblau) verwendet. Je IPG-Streifen wurden 10 mL dieser Lösung mit 1% (w/v) DTT versetzt und die Streifen wurden unter leichtem Schütteln für 15 min äquilibriert. Danach wurde die Lösung verworfen, und die IPG-Streifen wurden in 10 mL Äquilibrations-Stammlösung mit 2,5% (w/v) Iodacetamid erneut für 15 min unter leichtem Schütteln äquilibriert. Vor dem Einsatz der IPG-Streifen für die anschließende SDS-PAGE wurden diese noch kurz in den Elektrophoresepuffer getaucht, um überschüssige Chemikalien abzuwaschen. Danach wurden die Streifen auf die vorbereiteten SDS-PAGE – Gele platziert.

3.9.5 SDS-PAGE (2. Dimension)

Die Polyacrylamid-Gele für die SDS-PAGE wurden einen Tag vor Benutzung in einer speziellen Vorrichtung mit der Gießkassette zwischen zwei Glasplatten mit 20 cm Breite gegossen. Das 10%ige Trenngel wurde gemäß der Beschreibung für die eindimensionale SDS-PAGE (vgl. **Tabelle 8**) hergestellt und im Elektrophoresepuffer bei 4 °C aufbewahrt. Am Einsatztag wurden die Gele wieder in die Gekassette eingespannt und alle kritischen Bereiche mit 1%iger (w/v) Agarose-Lösung abgedichtet. Die äquilibrierten IPG-Streifen wurden mit dem Plastikstreifen nach außen auf den SDS-PAGE – Gelen positioniert, und das Sammelgel (vgl. Kapitel 3.6.4) wurde mit 0,002% (w/v) Bromphenolblau blasenfrei über die IPG-Streifen gegossen. Ein 1 cm² großer Filterstreifen wurde mit 10 µL des Molekulargewichtmarkers (*Precision Plus Dual Color Standards* von BioRad) versehen und neben den IPG-Streifen auf das Trenngel geschoben. Nach dem Erstarren der Sammelgele wurde die Gießkassette in den *PROTEAN II XL Cell* von BioRad eingespannt und die obere Pufferkammer mit dem 2x Elektrophoresepuffer (50 mmol/L Tris, 384 mmol/L Glycin, 0,2% (w/v) SDS) und die untere Pufferkammer mit dem 1x Elektrophoresepuffer gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte für 1 h bei 100 V und weitere 5 h bei 250 V, wobei die Kühlung auf 19 °C eingestellt war. Nach dem Auswandern der Bromphenolblaubande wurden die Gele aus der Gießkassette entnommen und gemäß Kapitel 3.6.5 mit Coomassie bzw. mit Silbernitrat gefärbt.

3.10 MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSE VERSCHIEDENER EIBG-SUBTYPEN

Die Identifizierung verschiedener EibG-Subtypen wurde mittels *peptide mass fingerprinting* mit einem UV-MALDI-o-TOF – Massenspektrometer (*ultra-violet matrix-assisted laser desorption/ionization orthogonal-time-of-flight mass spectrometer*) und der darauf folgenden nanoESI-Q-TOF – MS (*nanoelectrospray ionization quadrupole-time-of-flight mass spectrometry*) durchgeführt.

3.10.1 UV-MALDI-o-TOF – MS

Bei der MALDI-Massenspektrometrie (MALDI-MS) werden Peptide oder Proteine mit einem großen Überschuss an Matrix-Molekülen, wie z. B. DHB (Dihydroxybenzoesäure) oder HCCA (α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure), auf einen Probenhalter (*target*) aufgetragen. Nach Auskristallisierung werden die Analyten mit einem UV-Laser für einige Nanosekunden bis zu 200 ns Laserimpuls bestrahlt. Dabei übertragen die UV-absorbierenden Matrix-Moleküle, welche aufgrund aromatischer Funktionsgruppen π -Elektronensysteme besitzen, die absorbierte Energie auf die Analytmoleküle und es kommt zu einem Protonentransfer auf die Analyten. Die Laserenergie erlaubt eine explosionsartige Energieübertragung von den Matrixmolekülen auf die Analytmoleküle, wonach diese in die Gasphase übergehen.

Geladene Analytmoleküle werden mittels einer Elektrode beschleunigt und in einem luft- und feldfreien Analysator während des Fluges nach ihrer Größe getrennt. Dabei sind kleinere Teilchen schneller als größere und erreichen somit eher den Detektor. Die Zeit zwischen dem Laserimpuls und dem Auftreffen der Moleküle auf dem Detektor wird gemessen (TOF: *time of flight*) und dokumentiert, wobei die Flugzeit der Größe und der Ladung des Analyten proportional ist. Bei der Ionisierung der Analyte werden nicht immer alle Moleküle gleichzeitig ionisiert und beschleunigt, und so entstehen Wolken aus ionisierten Teilchen. Um die Analytmoleküle in richtiger Reihenfolge, also kleine zuerst und große zuletzt, detektieren zu können, gibt es unterschiedliche Techniken, um

zeitungleiche Ionisierungsprozesse auszugleichen. Dazu gehören die verzögerte Ionenextraktion, durch die mit zeitversetztem Einschalten elektrischer Beschleunigungsfelder den Analyten unterschiedliche Energien verliehen werden, oder auch der Ionenreflektor, welcher durch einen Richtungswechsel der beschleunigte Analytmoleküle eventuelle Ionisierungsverzögerungen korrigiert. Bei MALDI-o-TOF – MS wird eine andere Technik verwendet, um die gesamte Problematik zu beheben. In orthogonal zu der ursprünglichen Flugrichtung angelegten Feldern werden Analyt-Ionen auf ihrer Flugbahn „portionsweise“ als eine Art Paket orthogonal abgelenkt und erst dann im TOF-Analysator beschleunigt. Hier passieren die Analytmoleküle erneut einen Ionenreflektor und werden in ihrem echten Masse-zu-Ladung – Verhältnis (m/z -Wert) „verbessert“ dem Detektor zugeführt. Durch die gemessene Flugzeit werden die Massen der Analytmoleküle indirekt bestimmt und die m/z -Werte mithilfe der eingesetzten Software in einem Spektrum dargestellt. Die Massenzuordnung der Peaks kann dann durch online zugängliche Datenbanken erhalten werden (*peptide mass fingerprinting*). Die schematische Darstellung eines MALDI-o-TOF – Massenspektrometers ist in **Abb. 17** dargestellt.

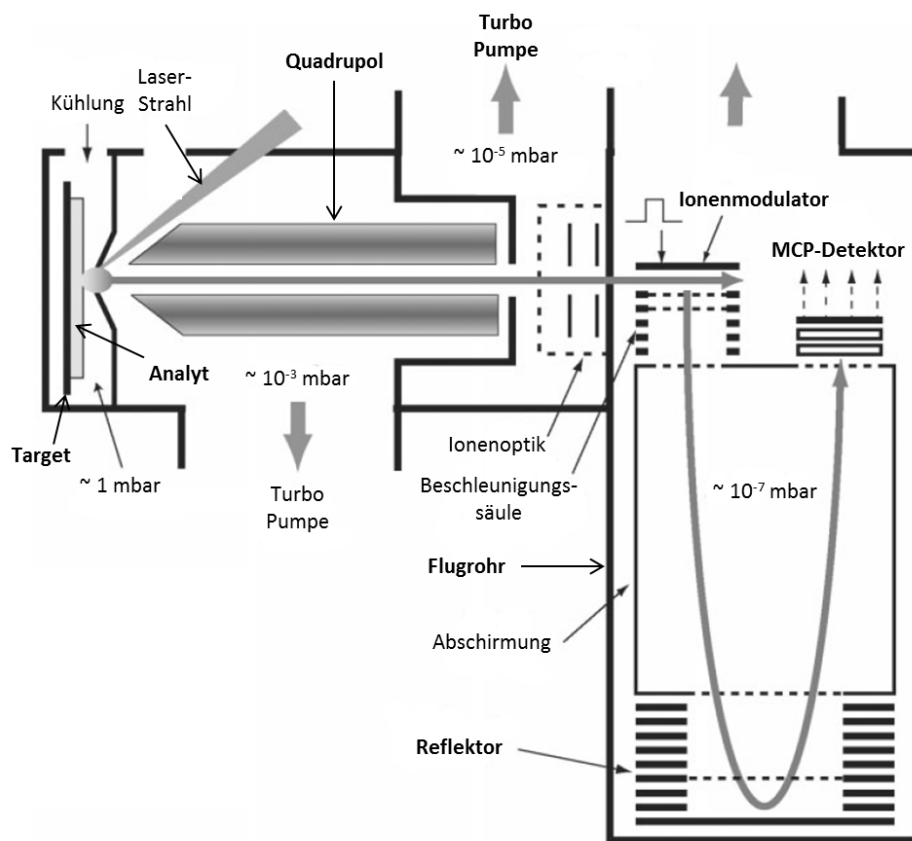


Abb. 17: Aufbau eines UV-MALDI-o-TOF – Massenspektrometers. Modifiziert nach Loboda *et al.*, 2003.

Bei dem eingesetzten Massenspektrometer handelt es sich um den Prototypen des kommerziell erhältlichen *prOTOF* von Perkin-Elmer (Waltham, MA, USA). Die Ausführung der MALDI-Quelle ist identisch mit der *QStar*-Serie der Firma AB Sciex (Concord, ON, Kanada) und die Flugzeitbestimmung ist von der Ionenerzeugung entkoppelt. Der MALDI-Prozess findet unter Vakuumbedingungen bei ca. 1 mbar statt, wobei ein Quadrupol mit Stoßgasfokussierung den Ionen transfer gewährleistet. Die hochfrequenten Spannungsimpulse (ca. 7,4 kHz) leiten die Ionen pakettweise mit einer Beschleunigungsspannung von ca. 10 kV ins Hochvakuum des TOF-Flugrohres. Mithilfe von zwei MCP

(*multi-channel-plates*) und einem TDC (*time-to-digital-converter*) werden die Ionen mit einer Massenauflösung von 10000 detektiert (Soltwisch *et al.*, 2012).

3.10.2 Probenvorbereitung für das *peptide mass fingerprinting*

Der Im-Gel-Verdau von im Acrylamid-Gel getrennten Proteinen dient als Vorbereitung für die massenspektrometrische Analyse. Die zu untersuchenden Proteinbanden wurden hierfür mit einem Skalpell herausgeschnitten und die Gelstücke in Eppendorfgefäße überführt.

Entfärbung der Gelbanden

Die Gelstücke der mit Coomassie oder Silbernitrat gefärbten Proteine wurden zunächst mehrmals mit sterilem ddH₂O gewaschen (200 µL je Gelstück). Danach wurden die Gelstücke mit einer 1:1 Mischung aus 100 mmol/L (NH₄)HCO₃ und Methanol für 5 min entfärbt. Die Dehydrierung erfolgte mit 200 µL einer 1:1 Mischung aus 25 mmol/L (NH₄)HCO₃ und ACN (Acetonitril) für 5 min und danach mit 100% ACN für 1 min. Alle Inkubationsschritte wurden auf einem Thermoschüttler bei 25 °C durchgeführt. Nach der letzten Inkubation mit ACN wurde das Gelstück im Vakuumkonzentrator für 2 min getrocknet.

Reduktion und Alkylierung

Durch Reduktion und anschließende Alkylierung wurden die Disulfidbrücken der Proteine mit Dithiothreitol und Iodacetamid irreversibel getrennt. Die Gelstücke wurden in 100 µL der Reduktionslösung (25 mmol/L DTT in 25 mmol/L (NH₄)HCO₃) 20 min bei 56 °C auf dem Thermoschüttler (300 rpm) inkubiert. Nach Verwerfen der Reduktionslösung wurden zu jeder Probe 100 µL der Alkylierungslösung (55 mmol/L Iodacetamid in 25 mmol/L (NH₄)HCO₃) hinzugegeben, und der Ansatz wurde für weitere 20 min bei 25 °C unter UV-undurchlässigem Deckel auf dem Thermoschüttler inkubiert. Durch Alkylierung mit Iodacetamid werden die nach der Reduktion freiliegenden SH-Gruppen in ein stabiles S-Carboxyamidomethylcystein (CAM; Addukt: -CH₂-CONH₂) überführt. Dadurch erhöht sich die spezifische Masse von Cystein von 103,01 Da auf 160,03 Da, was bei der Zuordnung der Peaks berücksichtigt werden muss. Die Gelstücke wurden mit 400 µL ddH₂O für 1 min gewaschen und danach 5 Minuten lang mit 200 µL einer 1:1 Mischung aus 25 mmol/L (NH₄)HCO₃ und 100% ACN dehydriert. Mit 100% ACN wurden die Gelstücke für 1 min vollständig dehydriert und danach im Vakuumkonzentrator 2 min lang getrocknet.

Proteolytischer Verdau mit Endopeptidasen

Die Serinprotease Trypsin spaltet Peptidbindungen der noch im Gel vorhandenen Proteine nach den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin, wodurch Peptide mit charakteristischen Massen entstehen. Je weiter die Inkubation mit der Protease voranschreitet und je weniger Substrat für das Trypsin vorhanden ist, umso mehr spaltet die Protease sich selbst, wodurch vermehrt Trypsin-Fragmente gebildet werden und zusätzliche Peaks in den Peptidspektren auftreten. Zunächst wurden 25 µL der Enzymlösung (10 ng/µL Trypsin in 25 mmol/L (NH₄)HCO₃ und 3% (v/v) ACN, pH 8,5) zu jeder Probe hinzugegeben und 30 min bei RT inkubiert. Die nicht durch die Gelstücke aufgenommene überschüssige Enzymlösung wurde entfernt, da das hier enthaltene Enzym sich nur selbst verdauen würde. Die rehydrierten Gelstücke wurden mit 150 µL 25 mmol/L (NH₄)HCO₃ versehen und 20 h bei 37 °C auf einem Thermoschüttler (300 rpm) inkubiert.

Extraktion der proteolytischen Peptide

Nach dem tryptischen Verdau wurden die entstandenen Peptide aus dem Gel isoliert. Dazu wurden die Peptide in mehreren Schritten mit verdünnter Ameisensäure extrahiert. Der Zusatz an ACN verhindert das Anhaften der Peptide an die Wände der Eppendorfgefäße. Die einzelnen Schritte sind in **Tabelle 12** aufgeführt.

Tabelle 12: Schritte zur Extraktion proteolytischer Peptide

Schritt	Lösungen	Dauer
1	5 mmol/L (NH ₄)HCO ₃	10 min
2	50% (v/v) ACN; 5% (v/v) Ameisensäure	3x 10 min
3	75% (v/v) ACN; 5% (v/v) Ameisensäure	10 min
4	100% ACN	5 min
Überstände in ein neues Eppendorfgefäß überführt		

Die trypsinisierten Peptide wurden in einem neuen Eppendorfgefäß gesammelt und anschließend im Vakuumkonzentrator getrocknet. Die Gelstücke wurden hiernach bis zur Analyse bei -20 °C aufbewahrt.

Aufreinigung der Peptide mittels ZipTip-C₁₈ – Minisäulen

Die durch die Extraktionsprozedur eingebrachten Salze wurden mit einer miniaturisierten Umkehrphasenchromatographie unter Zuhilfenahme von ZipTip-C₁₈ – Pipettenspitzen, die immobilisiertes C₁₈-Material enthalten, entfernt. Die im letzten Extraktionsschritt getrockneten Peptide wurden in 10 µL 0,5% (v/v) TFA (*trifluoroacetic acid*) aufgenommen. Es folgten zwei Äquilibrationsschritte für die ZipTip-C₁₈ – Spitzen, wonach der Peptidextrakt durch mehrmaliges Aufziehen auf die Säulchen aufgebracht wurde. Hierbei binden in wässriger Lösung Peptide durch hydrophobe Wechselwirkungen an die hydrophobe Matrix, wonach Salze ausgewaschen werden. Nach den Waschsritten wurden die Peptide in einem Stufengradienten mit ansteigender Konzentration an ACN von der Matrix eluiert und in einem Eppendorfgefäß vereinigt. Die einzelnen Schritte mit den dazugehörigen Lösungen sind in **Tabelle 13** aufgelistet. Die vereinten Eluate wurden im Vakuumkonzentrator getrocknet und bei -20 °C aufbewahrt.

Tabelle 13: Arbeitsschritte zur Entsalzung proteolytischer Peptidfraktionen mittels ZipTip-C₁₈

Schritt	Lösungen	Wiederholungen ^a	Eluat überführt in
Äquilibration 1	50% (v/v) ACN	3	Sammelgefäß
Äquilibration 2	0,1% (v/v) TFA	5	Sammelgefäß
Probenauftragung	Peptide in 0,5% (v/v) TFA	10	Sammelgefäß
Waschschrift	0,1% (v/v) TFA	3	Sammelgefäß
Extraktion 1	50% (v/v) ACN; 0,1% (v/v) TFA	5	Probengefäß
Extraktion 2	80% (v/v) ACN; 0,1% (v/v) TFA	5	Probengefäß
Extraktion 3	100% ACN	3	Probengefäß

^(a) Mit Wiederholungen ist die Anzahl der Pipettierschritte gemeint, die für die jeweilige Aktion notwendig sind.

Probenvorbereitung für die MALDI-TOF – Analyse

Die aufgereinigten Peptide wurden vor der Auftragung auf den Probenhalter in 10 µL ddH₂O gelöst. Als Matrix für die Untersuchungen mittels MALDI-MS wurde HCCA eingesetzt, da sich diese besonders für die Kokristallisierung von Peptiden und Proteinen eignet und gute Absorptionseigenschaften im eingesetzten UV-Bereich (337 nm) aufweist. Die Auftragung auf den Probenhalter erfolgte durch abwechselnde wiederholte Aufgabe von 0,5 µL Matrix (10 mmol/L HCCA in 70% (v/v) ACN, 0,1% (v/v) TFA) und 0,5 µL Probe. Danach wurde die Präparation an der Luft getrocknet.

Messparameter der UV-MALDI-o-TOF-MS – Analyse

Das verwendete Gerät (*QStar* von AB Sciex, Canada) wurde mit einem Stickstoff-Laser betrieben. Während der Messung wurde der Laser auf 30 Hz eingestellt und die Matrix-Analyt-Kristalle mit 78-85% Laserenergie 90 Sekunden lang beschossen. Dies entspricht einer Fluenz (Energie pro Fläche) von 80-160 J/m² und somit typischen MALDI-Bedingungen. Zur Kalibrierung des Detektors wurden zusätzlich Standardpeptide vermessen, deren Molekulargewichte in **Tabelle 14** aufgeführt sind.

Tabelle 14: Zur Kalibrierung des MALDI-Detektors verwendete Referenzpeptide

Protein	Molekulargewicht in Da
Angiotensin I	1296,685
Bradikinin	757,408
Mellitin	2845,762
Neurotensin	1672,917
Substance P	1347,736

Während der Messung wurden die Signale in Form von *m/z*-Werten mit der Software *TOF-MA* aufgezeichnet. Die weitere Bearbeitung der erzeugten Daten und das Erstellen der Peakliste erfolgten mit der *m over z* – Software. Für die Proteinidentifizierung anhand der detektierten Peptidmassen wurden die Onlinesuchmaschinen *ProFound*, *MS-Fit* und *Mascot* eingesetzt. Die Treffer mit den höchsten Wahrscheinlichkeiten wurden notiert und mit den AS-Sequenzen vermuteter Proteine verglichen.

3.10.3 nanoESI-Q-TOF – MS

Die Arbeiten an dem nanoESI-Q-TOF – Massenspektrometer (*SYNAPT G2-S*, Micromass/Waters, Manchester, UK) wurden von PD Dr. Gottfried Pohlentz am Institut für Hygiene der WWU Münster durchgeführt. Durch den Einsatz der nanoESI-Ionisierung und der darauf folgenden Fragmentierung der tryptischen Peptide mittels CID (*collision-induced dissociation*) können einzelne Aminosäuren und deren Abfolge in den Peptiden bestimmt werden.

Der generelle Aufbau eines nanoESI – Massenspektrometers ist prinzipiell ähnlich dem eines MALDI – MS und beinhaltet eine Ionenquelle, den Massenanalysator und die Detektoreinheit, wobei sich die Einzelkomponenten erheblich von denen des MALDI-MS unterscheiden. Die sanfte Ionisierung der Analyten findet unter Atmosphärendruck statt, wobei ein kontinuierlicher Analytstrom durch eine sehr feine Glas- bzw. Metall-Kapillare in die ESI-Quelle eingeleitet wird (vgl. **Abb. 18**). Durch das angelegte elektrische Feld zwischen der Kapillarspitze und der am gegenüberliegenden Ende der ESI-Quelle liegenden Kathode (im Positivionenmodus) trennen sich die geladenen Analyt-Tröpfchen

entsprechend ihrer Ladung, ähnlich der Trennung während einer Elektrophorese, auf. Die Ionen in diesen Tröpfchen werden während des Sprühvorgangs derart nach ihrer Ladung getrennt, so dass die positiven Ionen an die Tröpfchenoberfläche und die negativen Ionen in das Tröpfcheninnere wandern. Bei sehr hohen elektrischen Spannungen bildet sich an der Kapillarspitze der typische Taylor-Konus aus, da die positiven Ionen an der Tröpfchenoberfläche weiter in Richtung der Kathode gezogen werden. Mit zunehmender Entfernung der Analyt-Tröpfchen von der Anode verdampft die Trägerflüssigkeit immer weiter, so dass der Taylor-Konus an der Kapillarspitze instabil wird. An dem sogenannten Rayleigh-Limit zerfallen schließlich die Tröpfchen aufgrund der Abstoßung gleicher Ladungen in einer Coulomb-Explosion in viele sehr kleine Tröpfchen von wenigen Nanometern Durchmesser.

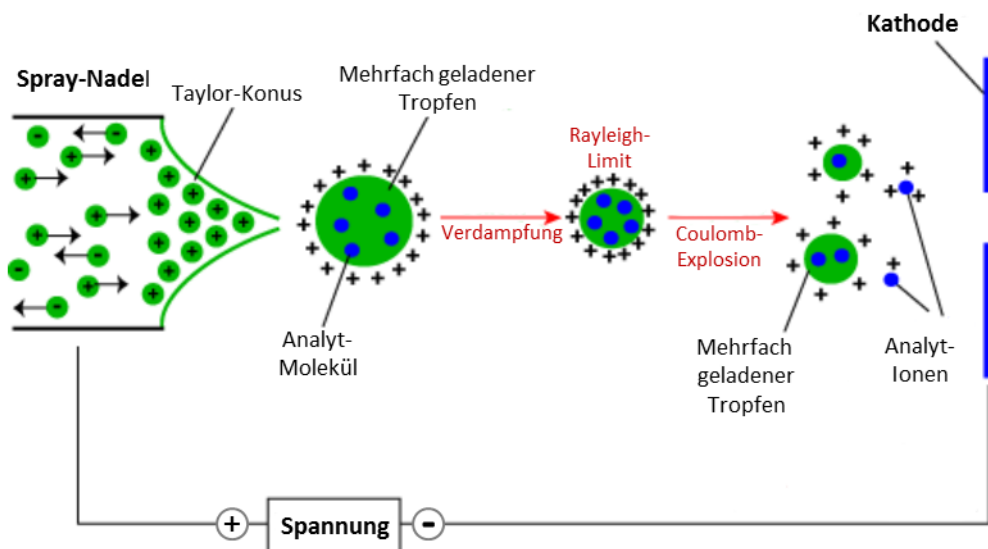


Abb. 18: Ionisierungsvorgänge in einer ESI-Quelle. Modifiziert nach Dr. Paul Gates, School of Chemistry, University of Bristol (<http://www.bris.ac.uk/>).

Am *interface* (vgl. auch **Abb. 19**), der Schnittstelle zu der eigentlichen Massenanalyse, die in Hochvakuum erfolgt, wird über den Vorvakuumraum Stickstoffgas so eingeleitet, dass keine neutralen Teilchen in den dahinter liegenden Raum einwandern können. Zusätzlich hilft der Stickstoffstrom bei der Desolvatisierung der Ionen und ermöglicht die freie Wanderung der zu untersuchenden geladenen Analytmoleküle in den Hochvakuum-Bereich des Massenspektrometers.

Nach Passage durch das *interface* werden die Analytmoleküle durch den *StepWaveTM*-Ionenleiter von den eventuell noch vorhandenen neutralen Teilchen isoliert. In dem sich anschließenden Quadrupol werden die Analytmoleküle das erste Mal nach ihrem m/z -Verhältnis durch Variation der angelegten Spannung selektiert. Die zu untersuchenden Analyte durchwandern den Quadrupol, während andere Moleküle mit den Quadrupol-Stäben kollidieren.

Die durch den Quadrupol selektierten Analytmoleküle gelangen in die hinter dem Quadrupol liegende Ionenfalle. Hier findet nun die Fragmentierung der Peptide in kleinere Einheiten statt, wobei die Ionenfalle als eine Art Massefilter (Kanu *et al.*, 2008) fungiert. Der Aufbau dieser Ionenfalle unterscheidet sich beim *SYNAPT G2-S* im physikalischen Aufbau von den „klassischen“ Ionenfallen, da sie nicht aus einer Ringelektrode besteht, sondern aus vielen hintereinander geschalteten Ringen, deren Spannungspotentiale wellenartig variieren, wodurch sich der Transport von Analytmolekülen gestaltet. Eine weitere wichtige Funktion dieser Ionenfalle besteht in der Unterbrechung der

ansonsten kontinuierlichen Analytzufuhr, um die Ionen „paketweise“ in die IMS (Ionen-Mobilitäts-Spektrometer)-Zelle weiterzuleiten.

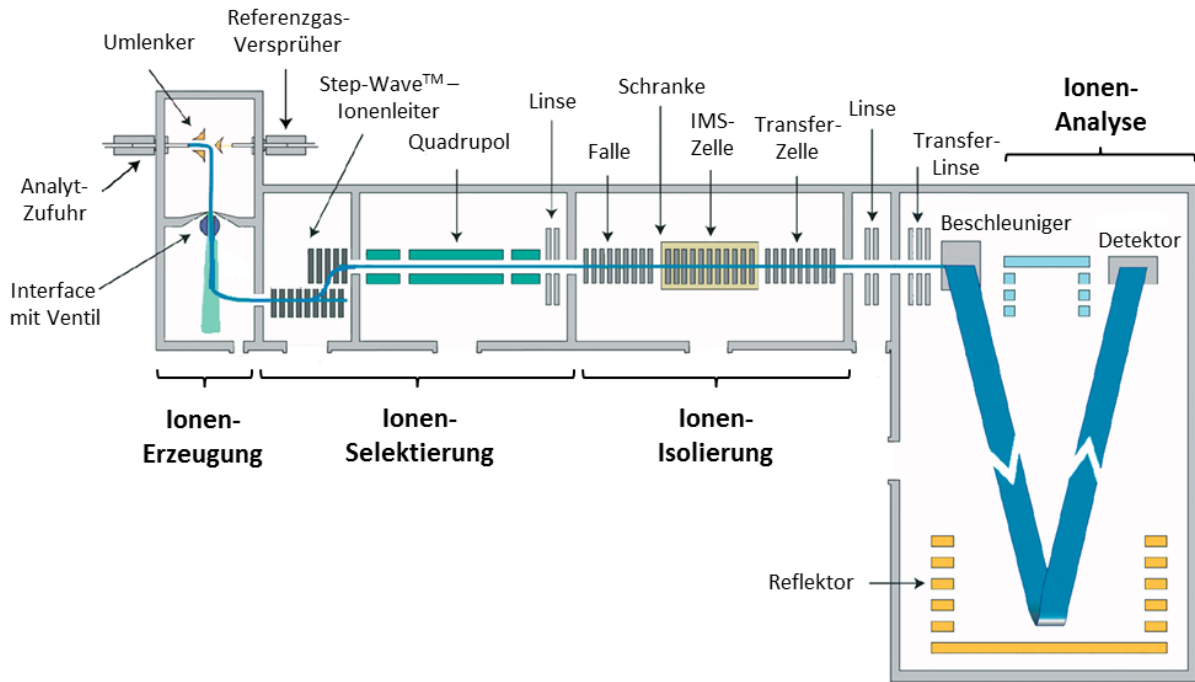


Abb. 19: nanoESI-Q-TOF Massenspektrometer *SYNAPT G2-S* von Waters. Modifiziert nach Kanu *et al.* (2008).

Vor dem Eintritt in die IMS-Zelle müssen die Analytmoleküle eine Heliumschranke passieren, die einen verbesserten Übergang von der Niederdruck-Zelle der Ionenfalle zu der bei Normaldruck arbeitenden IMS-Zelle gewährleistet. In der IMS-Zelle kollidieren die Analyten mit dem Stickstoffgas und durchfliegen die Zelle mit einer für sie charakteristischen Geschwindigkeit, die je nach Größe, Temperatur, Druck und vor allem der Geometrie der Analytmoleküle variiert. Daher werden hier die Ionen nach ihrer Mobilität getrennt, wobei z. B. isomere Formen eines Moleküls aufgrund einer unterschiedlichen Geometrie voneinander unterschieden werden können.

Die hinter der IMS-Einheit angebrachte Transferzelle kann ebenfalls als ein Massefilter genutzt werden. Da die Trennung der Ionen in der IMS-Zelle in Millisekunden erfolgt und die TOF-Detektion in Mikrosekunden, können für jedes Ionenmobilitätsspektrum mehrere hundert zweidimensionale Massenspektren generiert werden, in denen die Mobilität und die Masse der Ionen abgebildet werden. Die TOF-Analyse eines *SYNAPT G2-S* funktioniert analog zu den üblichen oTOF-Massenanalysatoren (vgl. Kapitel 3.10.1).

Peptidfragmentierung

Während der MS/MS-Analyse können Peptide mittels CID in kürzere Peptidfragmente und einzelne Aminosäuren durch Bruch der Peptidbindungen fragmentiert werden. Je nachdem, ob die Ladung auf der N-terminalen oder auf der C-terminalen Seite der Peptide erhalten bleibt, werden Ionen der sogenannten a, b, c – oder x, y, z – Serien gebildet (Roepstorff und Fohlman, 1984). In **Abb. 20** sind diese beiden Serien anhand der Fragmentierung eines Tetrapeptids dargestellt.

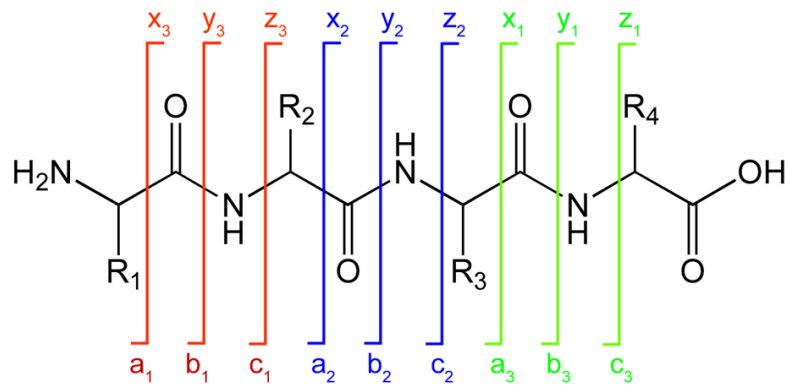


Abb. 20: Fragmentierungsschema eines Tetrapeptids nach Roepstorff und Fohlman (1984).

Bei niedrigen Kollisionsenergien werden die Peptide überwiegend an der Bindung zwischen der Ketogruppe der N-terminalen Aminosäure und der Aminogruppe der benachbarten Aminosäure gespalten, und es entstehen vorwiegend b- und y-Ionen. Die erzeugten Spektren werden dann basierend auf den Massen der Peptidfragmente und AS ausgewertet.

Probenvorbereitung für nanoESI-Q-TOF – MS

Die trypsinierten Proteinpräparationen, die auch für die MALDI-Analyse eingesetzt wurden (vgl. Kapitel 3.10.2), wurden mit einem Vakuumkonzentrator eingengt und in 30 μL ACN/ddH₂O/Ameisensäure (50/50/2) gelöst. Die Glaskapillaren wurden mit dem Kapillarenzieher kurz vor dem Einsatz hergestellt. Das *SYNAPT G2-S HDMS* wurde mit folgenden Einstellungen betrieben: Kapillarspannung: 800 V; Spannung hinter dem Interface: 20 V; Heizblock der ESI-Quelle: 80 °C; Desolvatisierungsgas: Stickstoff (500 L/h) bei 150 °C.

3.11 SEQUENZVERGLEICHE UND 3D-MODELLIERUNG

Die DNA- und AS-Sequenzen wurden von dem *NCBI-Server (National Center for Biotechnology Information)* erhalten und durch *UniProt (Universal Protein Database)* bestätigt. Die Vergleiche der DNA- bzw. der AS-Sequenzen wurden durch den *UniProt-Server ExPASy (Expert Protein Analysis System)* durchgeführt und die Daten mittels *Jalview (Waterhouse et al., 2009)* bearbeitet. Die 3D-Modellierung erfolgte mithilfe des *SWISS-MODEL – Servers vom SIB (Swiss Institute of Bioinformatics)*, dem *Swiss Model Workspace* und die weitere Verarbeitung mit der *Jalview-Software*. Strukturinformationen der hinterlegten 3D-Proteinstrukturen wurden von dem *RCSB-PDB – Server (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics – Protein Data Bank)* erhalten und mit *Jalview* bearbeitet. Die Erstellung der Grafiken erfolgte mit *Photoshop CS4* von Adobe Systems und *PowerPoint 2010* von Microsoft.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 ALLELVARIATION VON *eibG*

Die in diesem Kapitel dargestellten Daten basieren auf Teilergebnissen der Dissertation von Frau Dr. Barbara Ohder, die durch eigene neue Experimente und Resultate ergänzt wurden. Die Aufgabe von Frau Dr. Ohder war es, die Expression des *eibG*-Gens bei einer kleinen Anzahl ausgesuchter Stämme aus der *E. coli* – Stammsammlung des Instituts für Hygiene, Universitätsklinikum Münster, zu überprüfen. Eines ihrer Hauptziele bestand darin, nicht nur O91-Serotypen von *E. coli*, sondern noch weitere verschiedene Serotypen der pathogenen STEC auf das Vorkommen von *eibG* zu untersuchen.

4.1.1 Vorliegende Daten zu Beginn der Arbeit

Mittels PCR und den Primern 1114orf1Fp und 1114orf1Rp (Lu *et al.*, 2006) wurden die in **Tabelle 15** aufgelisteten *E. coli* – Serotypen auf das Vorkommen der *eibG*-Gene untersucht.

Tabelle 15: Verteilung von *eibG* bei *eae*-positiven und *eae*-negativen STEC

<i>eae</i> -Status	Gesamtzahl getesteter Stämme	Anzahl <i>eibG</i> -positiver Stämme (%)	Untersuchte Serotypen (Anzahl getesteter Stämme des jeweiligen Serotyps) ^a
Positiv	157	0	O26:H11/H ⁻ (53), O103:H2/H ⁻ (13), O111:H8/H ⁻ (14), O121:H19 (1), O145:H25/28/H ⁻ (25), O157:H7/H ⁻ (NSF) (40), O157:H ⁻ (SF) (6), Ont:H18/H ⁻ (2), OR:H11 (1), OR:H ⁻ (2)
Negativ	240	36 (15,0)	O1:H10/Hnt (2), O3:H2 (1), O3:H10 (1), O5:H ⁻ (5), O6:H ⁻ (1), O6:Hnt (2), O8:H ⁻ (4), O8:H10 (2), O8:H14 (1), O8:H19 (1), O8:Hnt (2), O15:H21 (1), O22:H8 (7), O23:H15 (2), O23:H19 (1), O40:H8 (4), O41:H ⁻ (1), O55:Hnt (1), O68:H4 (1), O74:H42 (2), O75:H8/H21 (2), O76:H19 (4), O78:H ⁻ (3), O86:H ⁻ (2), O91:H8 (1), O91:H10 (2), O91:H14/H ⁻ /Hnt ^b (22), O91:H21 (19), O104:H16 (1), O104:H21 (1), O106:H18 (2), O112:H2 (1), O113:H4 (10), O113:H21 (4), O115:H ⁻ (2), O116:H21 (1), O118:H12 (1), O128:H2 (10), O128:H ⁻ (3), O146:H ⁻ (2), O146:H8 (2), O146:H21 (2), O146:H28 (6), O146:H31 (1), O146:H51 (1), O152:H ⁻ (2), O152:H4 (1), O153:H18 (3), O153:H25 (1), O154:H20/H31/Hnt (3), O163:H19 (2), O168:H8 (1), O174:H ⁻ (1), O174:H2 (4), O174:H8 (3), O174:H21 (1), O175:H16 (2), O175:H28 (1), O176:H ⁻ (1), O178:H ⁻ (3), O178:H8 (2), O178:H19 (5), O181:H16 (2), O181:H49 (1), Ont:H ⁻ (14), Ont:H2/H4/H10/H14/H19 (5), Ont:H18 (3), Ont:H21 (4), Ont:H28 (2), Ont:H30 (1), Ont:Hnt (1), OR:H ⁻ (8), OR:H2 (2), OR:H10/H14 (2), OR:H21 (6), OR:H45 (2), OR:Hnt (3)

^(a): **(H⁻)** nicht beweglich (*non motile*); **(OR)** Stämme mit hohem Autoagglutinationspotential (*O rough*); **(Ont)** O-Antigen durch Antikörpertest nicht typisierbar (*O non typeable*).

^(b): **(Hnt)** H-Antigen durch Antikörpertest nicht typisierbar (*H non typeable*).

Zusätzlich wurden die vorhandenen Informationen über das Vorkommen von Intimin (*eae*) und Stx in den untersuchten STEC-Stämmen hinzugenommen. Insgesamt wurden 379 STEC-Stämme untersucht, von denen 36 positiv für das *eibG*-Gen befunden wurden (**Tabelle 16**).

Tabelle 16: Verteilung der sechs verschiedenen *eib*-Gene in *eibG*-positiven STEC

VM-Nr. ^a	Stamm-Nr.	Serotyp	<i>stx</i>	<i>eibG</i>	<i>eibA</i>	<i>eibC</i>	<i>eibD</i>	<i>eibE</i>	<i>eibF</i>
1	1809/00	O91:H14 [H14] ^b	1	+	-	-	-	-	-
2	3558/96	Ont:H ⁻ [H14]	1	+	-	-	-	-	-
3	99-02787	OR:H10	1	+	-	-	-	-	-
4	7140/96	O91:H ⁻ [H14]	1	+	-	-	-	-	-
5	172/98	OR:H ⁻ [H14]	1	+	-	+	-	+	-
6	393/98	O91:H ⁻ [H14]	1	+	-	-	-	-	-
7	4798/97	O91:Hnt [H14]	1	+	-	-	-	-	-
8	4831/97	OR:H45	2d	+	-	+	-	+	-
9	6451/98	OR:H45	2+2d	+	-	+	-	+	-
10	4789/97-1	O146:H21	1+2d	+	-	-	-	-	-
11	4884/97	OR:Hnt [H14]	1	+	-	+	-	+	-
12	2875/96	O91:H14 [H14]	1	+	-	-	-	-	-
13	3671/97	O91:H ⁻ [H14]	1	+	-	+	-	+	-
14	6705/95	OR:H14 [H14]	1	+	-	-	-	-	-
15	6561/95	Ont:H ⁻ [H14]	1	+	-	+	-	+	-
16	01/E243	O91:H ⁻ [H14]	1	+	-	-	-	-	-
17	ST234	O146:H28	2	+	-	-	-	-	-
18	0520/99	Ont:H30	2d	+	-	-	-	-	-
19	4141/96	OR:H21	1	+	-	-	-	-	-
20	06-03233	O152:H ⁻ [H14]	1	+	-	-	-	+	-
21	06-03229	O152:H ⁻ [H14]	1	+	-	+	-	+	-
22	06-08452	O91:H ⁻ [H14]	1	+	-	-	-	-	-
23	27358/97	O91:H14 [H14]	1	+	-	-	-	-	-
24	4308/98	O91:H14 [H14]	1	+	-	-	-	-	-
25	07-00349	O91:H ⁻ [H14]	1	+	-	-	-	+	-
26	02-03777	O91:H ⁻ [H14]	1	+	-	-	-	-	-
27	07-00739	O91:H ⁻ [H14]	1	+	-	+	-	+	-
28	4792/97	O91:H ⁻ [H14]	1	+	-	+	-	+	-
29	07-00740	O91:H ⁻ [H14]	1	+	-	+	-	+	-
30	02-03884	O91:H ⁻ [H14]	1	+	-	+	-	+	-
31	02-07123	O91:H ⁻ [H14]	1	+	-	+	+	-	-
32	0550/01	O91:H14 [H14]	1	+	-	-	-	-	-
33	06-07635	O91:H14 [H14]	1	+	-	-	-	-	-
34	06-07349	O91:H14 [H14]	1	+	-	-	-	-	-
35	ST295/1	O146:H28	2	+	-	-	-	-	-
36	0519/99	OR:Hnt	2d	+	-	-	-	-	-

(^a) VM-Nr.: Viktor Merkel Nummerierung; (^b) [H14]: Stämme positiv auf *fliC*_{H14}-Gen getestet.

Alle *eibG*-positiven STEC sind *eae*-negativ, wodurch Intimin als Adhäsionsfaktor für die folgenden Experimente zum Adhäsionsverhalten *eibG*-positiver Stämme ausgeschlossen werden konnte. Die Daten aus diesem Teilerperiment bestätigten die Annahme, dass *eibG* nicht nur von den O91-Serotypen exprimiert wird, sondern auch bei den Serotypen O152:H⁻ [H14], O146:H21, O146:H28, OR:H10, OR:H14 [H14], OR:H21, OR:H45, Ont:H30, OR:Hnt, OR:Hnt [H14] und Ont:H⁻ [H14] vorkommt. Allerdings wurde *eibG* nicht bei den für den Menschen gefährlichsten STEC-Serotypen O157, O26, O103, O111 oder O145 (Karch *et al.*, 2005) gefunden. In keinem der 72 Stämme aus der ECOR-Kollektion (Ochman und Selander, 1984), in denen die fünf *eib*-Gene *eibA*, *eibC*, *eibD*, *eibE* und *eibF* (vgl. auch Kapitel 1.7.1) identifiziert wurden, konnte das Gen für *eibG* detektiert werden.

Alle *eibG*-positiven Stämme wurden zusätzlich auf das Vorkommen anderer Eib-Familienmitglieder durch Frau Dr. Barbara Ohder und Frau Dr. Wenlan Zhang mittels PCR untersucht (Sandt und Hill, 2000a, 2001). Die 36 *eibG*-positiven STEC-Stämme sind in **Tabelle 16** mit den dazugehörigen Daten über das Vorkommen weiterer *eib*-Gene aufgelistet. Insgesamt 14 der *eibG*-positiven Stämme enthalten weitere *eib*-Gene, am häufigsten das *eibE* mit 13 Stämmen, gefolgt von *eibC* mit 12 Stämmen. Die Gene *eibA* und *eibF* wurden in keinem der 36 *eibG*-positiven Stämme gefunden, und das *eibD*-Gen trat nur einmal in der Kombination mit *eibG* und *eibC* auf. Die Kombination von drei gleichzeitig vorkommenden *eib*-Genen kam innerhalb der *eibG*-positiven Stämme insgesamt elfmal mit *eibC* und *eibE* sowie einmal mit *eibC* und *eibD* vor. Von den 36 *eibG*-positiven Stämmen produzierten 29 ausschließlich Stx1, wohingegen sieben Stx2 bzw. Stx2d exprimierten.

4.1.2 DNA-Isolierung für die Sequenzierung von *eibG*

Mit den Primern 1114orf1Fp und 1114orf1Rp (PP 1) konnte ein PCR-Produkt von ca. 550 bp aus dem inneren Bereich des *eibG*-Gens erzeugt werden (**Abb. 21**). Um das komplette *eibG*-Gen sequenzieren zu können, wurden die Primer orf1Fw und orf1Rw (Lu *et al.*, 2006) für die 36 *eibG*-positiven Stämme eingesetzt. Da nicht bei jedem der getesteten Stämme ein ausreichend großes PCR-Produkt von ca. 1800 bp erzeugt werden konnte, mussten weitere Primer konstruiert werden. Sämtliche für die Sequenzierung von *eibG* verwendeten Primer-Paare und die Längen der korrespondierenden PCR-Produkte, gemäß der von Lu *et al.* veröffentlichten Daten sind in **Tabelle 17** aufgeführt.

Tabelle 17: Eingesetzte Primer-Paare und erzeugte PCR-Produkte

Primer-Paar (PP)	Primer	Bezeichnung	Länge des PCR-Produkts in bp
1	1 und 2	1114orf1Fp und 1114orf1Rp	548
2	3 und 4	orf1Fw und orf1Rw	1804
3	3 und 9	orf1Fw und <i>eibG</i> _4889r	1695
4	3 und 10	orf1Fw und <i>eibG</i> _4919r	1724
5	5 und 4	orf1FWa und orf1Rw	2182
6	5 und 9	orf1FWa und <i>eibG</i> _4889r	2073
7	5 und 10	orf1FWa und <i>eibG</i> _4919r	2102
8	6 und 4	<i>eibG</i> _3305f und orf1Rw	1737
9	11 und 4	<i>eibG</i> _3380f und orf1Rw	1661
10	11 und 9	<i>eibG</i> _3380f und <i>eibG</i> _4889r	1552
11	11 und 10	<i>eibG</i> _3380f und <i>eibG</i> _4919r	1581

Das 6557 bp lange DNA-Fragment, welches das *eibG*-Gen mit den flankierenden Regionen umfasst (NCBI-Accession: AB255744.1), diente für das Primer-Design als Template. Die DNA-Fragmente, die mit diesen Primer-Paaren mittels PCR erzeugt werden sollten, sind in **Abb. 21** dargestellt.

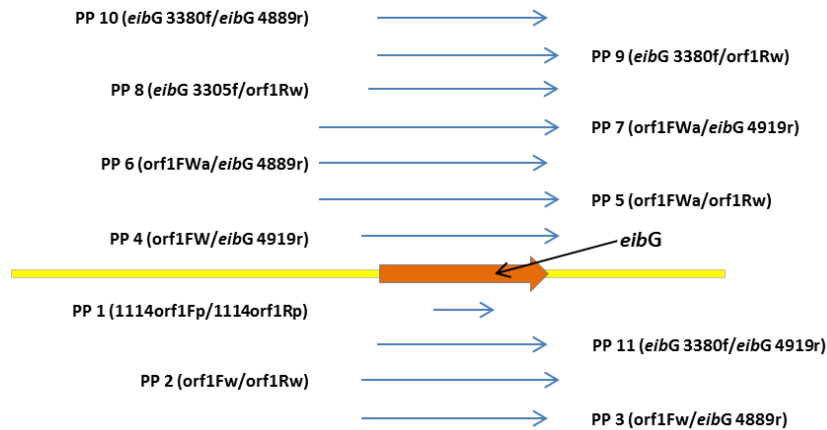


Abb. 21: Kombinationen von Primer-Paaren für die Sequenzierung von *eibG*-PCR-Produkten. Erstellt mit Vector NTI.

(gelb) das 6547 bp lange *eibG*-Fragment mit benachbarten Regionen (NCBI-Accession: AB255744.1); (orange) *eibG* mit 1527 bp (Lu *et al.*, 2006); (blau) durch die Primer-Paare theoretisch erzeugten DNA-Fragmente anhand des 6547 bp langen *eibG*-Templates.

Nicht bei allen *eibG*-positiven Stämmen konnte mit dem Primer-Paar (PP) 2, das schon von Lu *et al.* (2006) verwendet wurde, ein *eibG*-haltiges PCR-Fragment erzeugt werden. In **Abb. 22** ist exemplarisch das Ergebnis einer PCR dargestellt, bei welcher fünf verschiedene *eibG*-positive Stämme (vgl. **Tabelle 16**) mit dem PP 2 und PP 8 (vgl. auch **Tabelle 17**) getestet wurden.

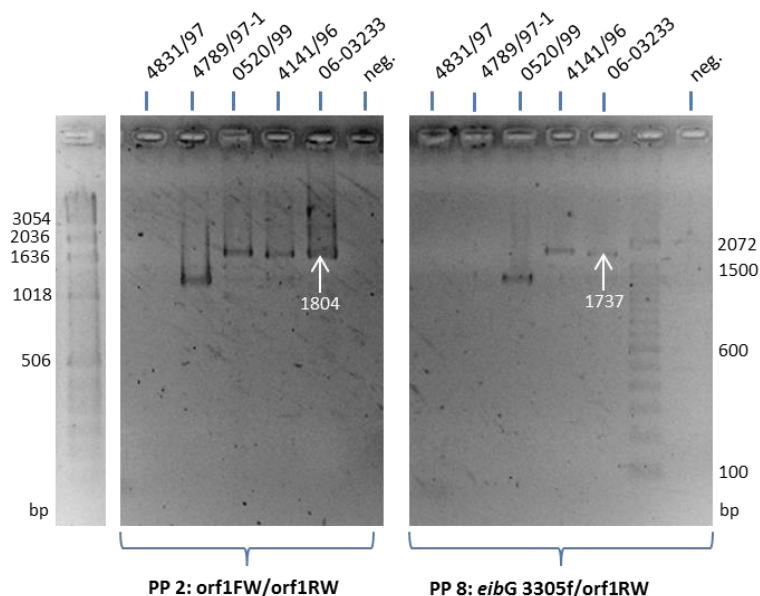


Abb. 22: *eibG*-Amplifikate, die mit den Primer-Paaren 2 und 8 gewonnen wurden.

Agarosegel mit PCR-Produkten, erzeugt durch PP 2 und PP 8. PCR-Durchführung vgl. Kapitel 3.2.2; *annealing*-Temp.: 60 °C; (neg.) nur Primer, keine *E. coli* – DNA (Überprüfung auf eventuelle DNA-Kontamination der Reagenzien).

Bei einigen der in **Abb. 22** dargestellten STEC-Stämme konnte kein *eibG*-Amplifikat mit den eingesetzten Primer-Paaren PP 2 und PP 8 erzeugt werden, so dass weitere Primer-Paare getestet und Variationen der *annealing*-Temperatur vorgenommen wurden. In **Abb. 23** ist das Ergebnis einer PCR mit dem Stamm ST234, den Primer-Paaren PP 2 bis PP 7 und PP 9 bis PP 11 und einem vierstufigen Temperaturgradienten von 50,0 °C, 52,1 °C, 56,9 °C und 60,2 °C für die neun Primer-Paare PP 2 bis PP 7 und PP 9 bis PP 11 dargestellt.

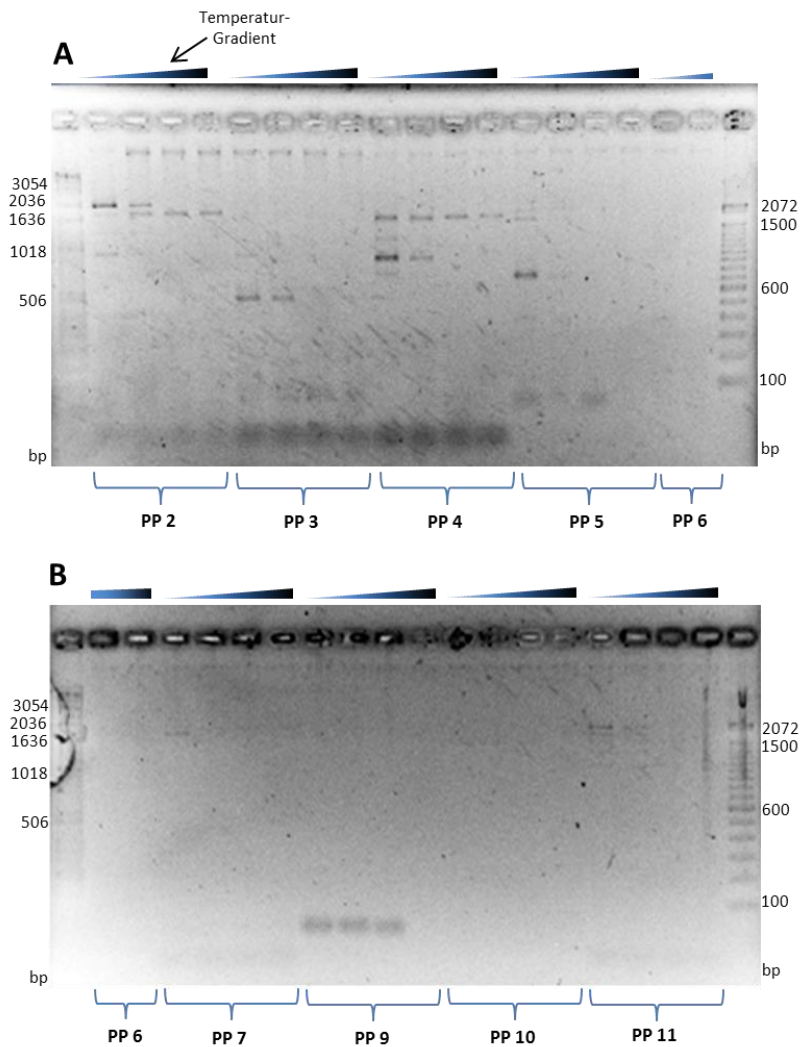


Abb. 23: *eibG*-Amplifikate, gewonnen aus der DNA des Stammes ST234 mit verschiedenen Primer-Paaren bei unterschiedlichen *annealing*-Temperaturen.

Ein Temperatur-Gradient von 50 bis 60,2 °C (50; 52,1; 56,9 und 60,2 °C) wurde für den *annealing*-Schritt mit jeweils 4 Proben der angegebenen Primer-Paare angewandt.

Nur PP 2 und PP 4 erzeugten in diesem Fall PCR-Fragmente mit einer für die Sequenzierung von *eibG* ausreichenden Länge, und zwar ca. 1800 bp bei PP 2 und 50 °C sowie ca. 1700 bei PP 4 und 56,9 °C. Ähnlich wie in **Abb. 23** dargestellt, wurde mit allen *eibG*-positiven STEC-Stämmen verfahren, bei denen nicht schon mit dem PP 2 ein PCR-Produkt ausreichender Länge (über 1527 bp) erzeugt werden konnte.

In **Abb. 24** ist ebenfalls exemplarisch das Ergebnis einer PCR mit den sechs *eibG*-positiven Stämmen 1809/00, 4789/97-1, ST234, 4141/96 und 06-03233 unter Verwendung des PP 2 dargestellt. In diesem Versuch wurden die Stämme 4789/97-1 und ST234 wiederholt mit dem PP 2 untersucht. In **Abb. 24 A** sind die PCR-Produkte der Stämme 1809/00 und 06-03233 auf einer Höhe von ca. 1800 bp und das PCR-Produkt des Stammes 4141/96 bei einer Höhe von ca. 1500 bp zu sehen. Nach Aufreinigung (vgl. Kapitel 3.2.3) der PCR-Produkte (**Abb. 24 B**) ist dieser Größenunterschied ebenfalls detektierbar (**Abb. 24 B**, Pfeile). Dieses Ergebnis weist auf eine Differenz bei Stamm 4141/96 im Vergleich zu den zwei anderen Stämmen *eibG*-Gen hin.

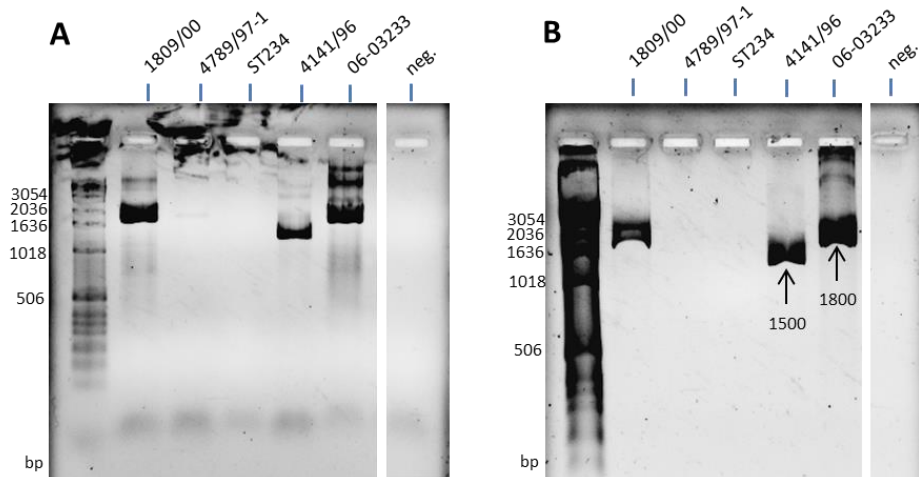


Abb. 24: *eibG*-Amplifikate, die mit dem Primer-Paar 2 (*orf1Fw* und *orf1Rw*) erzeugt wurden.

(A) PCR-Durchführung vgl. Kapitel 3.2.2, *annealing*-Temperatur: 60 °C; (B) PCR mit aufgereinigten *eibG*-Amplifikaten vgl. Kapitel 3.2.3.

Mit dem Einsatz verschiedener Primer-Paare konnte bei 32 der mit dem PP 1 *eibG*-positiv getesteten, STEC-Stämmen die vollständige *EibG*-Sequenz detektiert werden (vgl. auch **Tabelle 18**). Bei den Stämmen 4141/96, ST234, ST295/1 und 06-03229 konnten mit den eingesetzten Primern nur einige Bereiche in der *eibG*-Sequenz identifiziert werden. In weiteren Experimenten wurden diese vier Stämme nur teilweise verwendet.

4.1.3 *Multilocus sequence typing (MLST)*

Alle 36 *eibG*-positiven STEC-Stämme wurden durch PD Dr. Alexander Mellmann mittels MLST auf ihre phylogenetische Verwandtschaft im Vergleich zu HUS-assoziierten Stämmen der HUSEC-Kollektion (Mellmann *et al.*, 2008) analysiert. Die Multilokus – Sequenztypisierung (*multilocus sequence typing*) ist ein geeignetes Werkzeug, um Bakterienstämme untereinander auf ihren Verwandtschaftsgrad zu untersuchen. Durch Ermittlung der Abweichungen in der Basensequenz bestimmter konstitutiv exprimierter Gene (*housekeeping genes*), welche mittels PCR identifiziert und danach sequenziert werden, kann die evolutionäre Entwicklung der Bakterien verfolgt werden. Die Sequenzierungsdaten der, meistens sieben, untersuchten Gene werden mit speziellen Algorithmen (Aanensen und Spratt, 2005) analysiert und die Stämme aufgrund der phylogenetischen Zugehörigkeit in baumähnlichen Diagrammen zusammengefasst (MLST – *minimum spanning tree*).

In **Abb. 25** sind die *eibG*-positiven STEC-Stämme in einem MLST – *minimum spanning tree* im Vergleich zu den 42 Stämmen der HUSEC-Kollektion dargestellt. Die ermittelten Sequenztypen (ST-Typen) zeigen, dass die *eibG*-positiven Stämme wenig miteinander verwandt sind und im Vergleich zu den Stämmen der HUSEC-Kollektion weit auseinander liegen. Von den 36 *eibG*-positiven Stämmen konnten 22 dem ST-Typ 33 zugeordnet werden. Von diesen 22 Stämmen weisen 17 den Serotyp O91 auf. Die große Anzahl von Stämmen mit dem gleichen ST-Typ spricht für eine klonale Vererbung des *eibG*-Gens innerhalb der O91-Stämme. Die Streuung hinsichtlich der Sequenztypen der verbleibenden 14 *eibG*-positiven Stämme (**Abb. 25**) deutet aber auch auf einen möglichen horizontalen Transfer des *eibG*-Gens hin. Die ST-Typen aller *eibG*-positiven STEC sind in **Tabelle 18** aufgelistet.

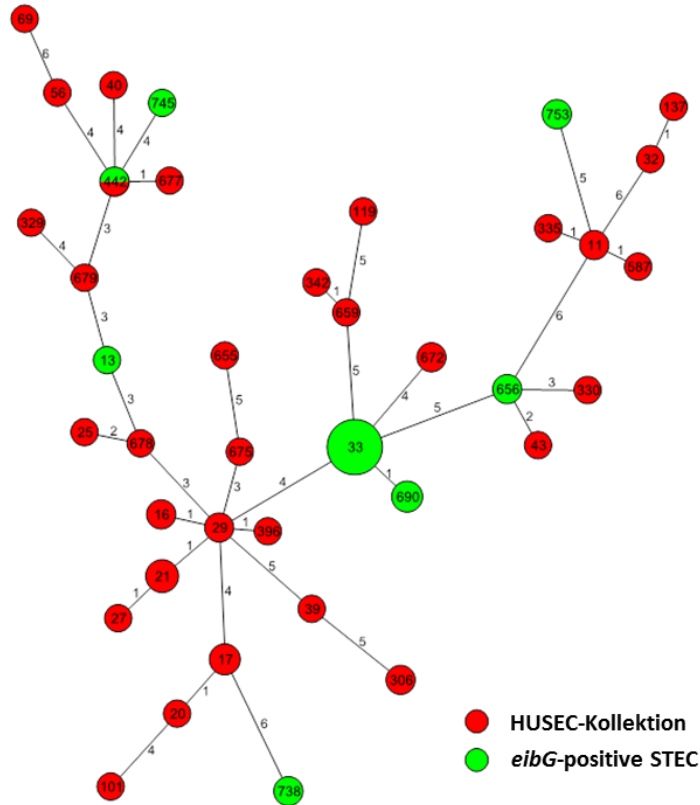


Abb. 25: MLST – minimum spanning tree von *eibG*-positiven STEC im Vergleich zur HUSEC-Kollektion.

(rot) Vertreter der HUSEC-Kollektion; (grün) *eibG*-positive STEC; (Zahlen in den Kreisen) Sequenztyp (ST-Typ); (Radien der Kreise) Durchmesser proportional zur Anzahl der mit diesem ST-Typ identifizierten Stämme; (Linien) Längen proportional zum Verwandtschaftsgrad; (Zahlen an den Linien) Anzahl nicht übereinstimmender Gene zwischen zwei Stämmen nach dem MLST-Vergleich.

4.1.4 Gruppierung der sequenzierten *eibG*-Allele

Die Sequenzierung der 32 vollständigen *eibG*-Gene (vgl. auch Kapitel 3.2.3) ergab 21 verschiedene *eibG*-Allele (Abb. 26).

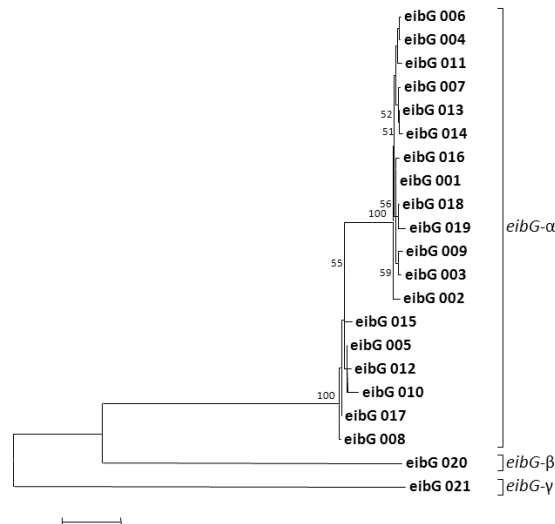


Abb. 26: Gruppierung identifizierter *eibG*-Allele in drei Untergruppen in einem unrooted neighbor – joining tree.

(Zahlen über den Verzweigungen) bootstrap values nach 1000 Replikationen, (Balken) = 0,01.

Tabelle 18: Sero- und ST-Typen der 36 *eibG*-positiven Stämme

VM-Nr.	Stamm Nr.	Serotyp	Sequenz Typ	<i>eibG</i> -Allel (Genbank-Nr.)	Identität zur Referenzsequenz von 1527 ^a bp in %	<i>eibG</i> - Subtyp
1	1809/00	O91:H14 [H14]	33	001 (AB255744)	100	α
2	3558/96	Ont:H ⁻ [H14]	33	001 (AB255744)	100	α
3	99-02787	OR:H10	745	002 (GU295802)	99,87	α
4	7140/96	O91:H ⁻ [H14]	33	003 (GU295803)	99,87	α
5	172/98	OR:H ⁻ [H14]	33	005 (GU295805)	99,08	α
6	393/98	O91:H ⁻ [H14]	33	013 (GU295813)	99,93	α
7	4798/97	O91:Hnt [H14]	33	013 (GU295813)	99,93	α
8	4831/97	OR:H45	656	014 (HM236815)	99,87	α
9	6451/98	OR:H45	656	014 (HM236815)	99,87	α
10	4789/97-1	O146:H21	442	015 (HM236816)	99,02	α
11	4884/97	OR:Hnt [H14]	33	015 (HM236816)	99,02	α
12	2875/96	O91:H14 [H14]	33	016 (HM236817)	99,93	α
13	3671/97	O91:H ⁻ [H14]	33	017 (HM236818)	99,08	α
14	6705/95	OR:H14 [H14]	33	004 (GU295804)	99,87	α
15	6561/95	Ont:H ⁻ [H14]	33	010 (GU295810)	98,89	α
16	01/E243	O91:H ⁻ [H14]	33	006 (GU295806)	99,87	α
17	ST234	O146:H28	738	k.A.	k.A.	-
18	0520/99	Ont:H30	753	021 (HM236822)	88,11	γ
19	4141/96	OR:H21	442	k.A. ^b	k.A.	-
20	06-03233	O152:H ⁻ [H14]	13	020 (HM236821)	90,39	β
21	06-03229	O152:H ⁻ [H14]	13	k.A.	k.A.	-
22	06-08452	O91:H ⁻ [H14]	33	001 (AB255744)	100	α
23	27358/97	O91:H14 [H14]	33	001 (AB255744)	100	α
24	4308/98	O91:H14 [H14]	33	001 (AB255744)	100	α
25	07-00349	O91:H ⁻ [H14]	33	005 (GU295805)	99,08	α
26	02-03777	O91:H ⁻ [H14]	33	007 (GU295807)	99,87	α
27	07-00739	O91:H ⁻ [H14]	33	008 (GU295808)	99,02	α
28	4792/97	O91:H ⁻ [H14]	33	009 (GU295809)	99,87	α
29	07-00740	O91:H ⁻ [H14]	33	011 (GU295811)	99,87	α
30	02-03884	O91:H ⁻ [H14]	33	012 (GU295812)	99,02	α
31	02-07123	O91:H ⁻ [H14]	33	013 (GU295813)	99,93	α
32	0550/01	O91:H14 [H14]	690	018 (HM236819)	99,93	α
33	06-07635	O91:H14 [H14]	690	018 (HM236819)	99,93	α
34	06-07349	O91:H14 [H14]	690	019 (HM236820)	99,8	α
35	ST295/1	O146:H28	738	k.A.	k.A.	-
36	0519/99	OR:Hnt	753	021 (HM236822)	88,11	γ

(^a) Genbank-Nr.: AB255744.1; (^b) k.A., keine Anwendbarkeit der Primer bei diesen Stämmen.

Die Übereinstimmungen in der Basensequenz variieren dabei zwischen 88,11 und 100% zu der von Lu *et al.* (2006) publizierten Referenzsequenz von 1527 bp (Genbank-Nr.: AB255744.1). Anhand der Abweichungen in der Basensequenz wurden drei Cluster der *eibG*-Allele definiert (**Abb. 26**). Diese wurden als Cluster *eibG*- α , *eibG*- β und *eibG*- γ bezeichnet, wobei *eibG*- α mit 19 Allelen und 33 STEC-Stämmen die größte *eibG*-Untergruppe darstellt (**Tabelle 18**).

In den Stämmen 06-03229, 4141/96, ST234 und ST295/1 konnte mit den eingesetzten Primern keine vollständige *eibG*-Sequenz bestimmt werden. Die Sequenzen wiesen entweder Deletionen im 5'-Bereich des *eibG*-Gens auf (ST234, ST295/1), oder die Sequenzen konnten aufgrund unterschiedlicher Kopien des Gens keiner *eibG*-Sequenz eindeutig zugewiesen werden (06-03229, 4141/96). Da große Teile der detektierten Basensequenzen mehr dem *eibG*-Gen als anderen *eib*-Genen entsprachen, wurde die Kennzeichnung als *eibG*-positive Stämme beibehalten.

4.1.5 Sequenzvergleich aller *eibG*-Allele

Die Basensequenzen der 21 *eibG*-Allele sind vergleichend in **Abb. 27** dargestellt. Identische Basen im Vergleich zum *eibG*-001 (Referenz) sind durch Punkte gekennzeichnet; die Basenaustausche sind kenntlich gemacht. Die größten Unterschiede zur Referenzsequenz sind erwartungsgemäß in den Allelen 20 (*eibG*- β) und 21 (*eibG*- γ) zu erkennen.

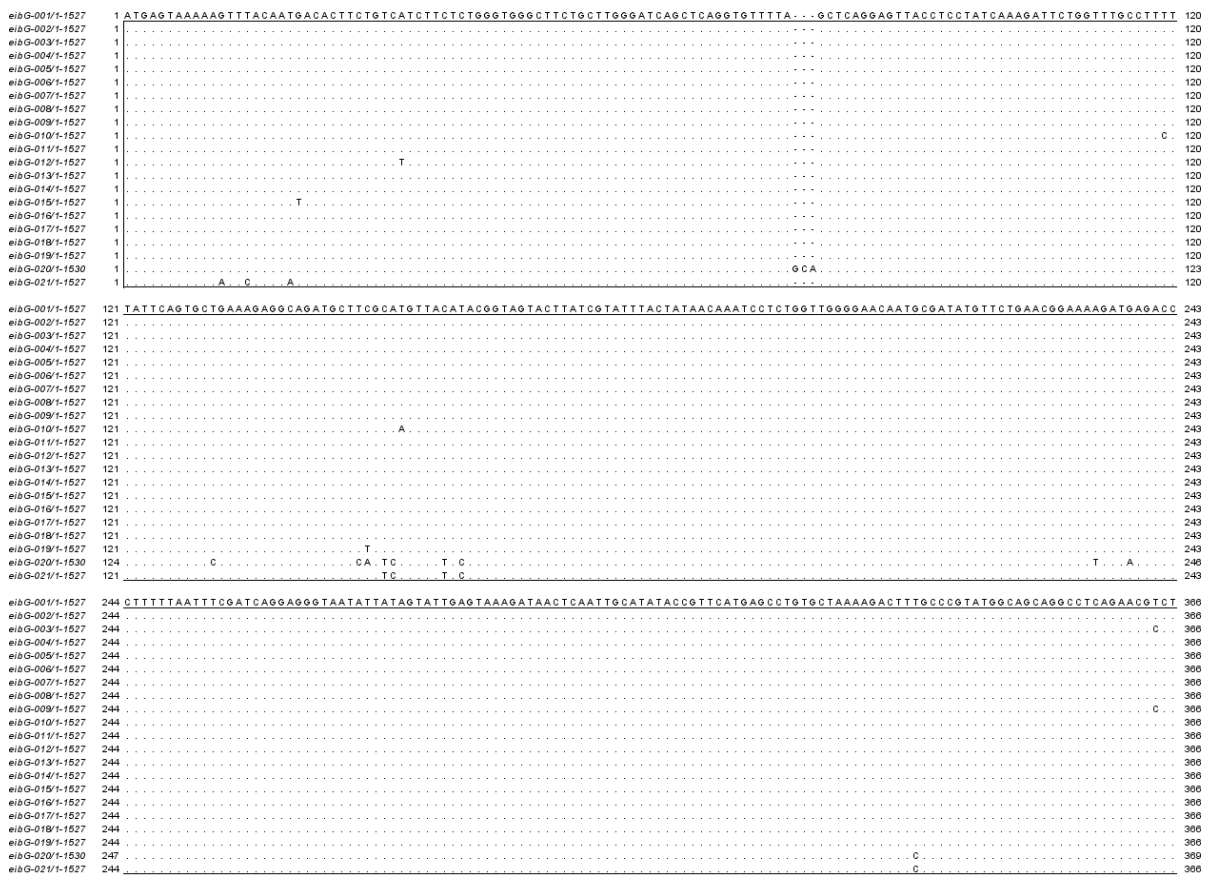


Abb. 27 (Teil 1): Vergleich der sequenzierten 21 *eibG*-Allele untereinander.

Punkte markieren identische Basen im Vergleich zur Referenzsequenz *eibG*-001 (obere Zeile). Basenaustausche sind gekennzeichnet.

eibG-001/1-1527	307	GACAAAGAAAACGGTAAGCATCAGGTTGATGAGGAGGAGGTCGGCCGGATCTTCAATAAAGTTAATAATCTATCAAATACTATTATTAATCCTGAATAATTAACAAACATCGGCTTTCATCGCA	489
eibG-002/1-1527	307		489
eibG-003/1-1527	307		489
eibG-004/1-1527	307		489
eibG-005/1-1527	307		489
eibG-006/1-1527	307		489
eibG-007/1-1527	307		489
eibG-008/1-1527	307		489
eibG-009/1-1527	307		489
eibG-010/1-1527	307		489
eibG-011/1-1527	307		489
eibG-012/1-1527	307		489
eibG-013/1-1527	307		489
eibG-014/1-1527	307		489
eibG-015/1-1527	307		489
eibG-016/1-1527	307		489
eibG-017/1-1527	307		489
eibG-018/1-1527	307		489
eibG-019/1-1527	307		489
eibG-020/1-1530	370	G . C A	492
eibG-021/1-1527	307		492
eibG-001/1-1527	400	T C A G G A C C A G G T C C G G A A G G T A C C G G T T T G G T T C A G G C T A G T C G G G C G G G A A T C G C T C T G G C T T T G G T A C A G G G C C A G A G C G G A T A A A A A A A A T T G C A A C A T C A G T G G G A T C A T G G T C T	612
eibG-002/1-1527	400		612
eibG-003/1-1527	400		612
eibG-004/1-1527	400		612
eibG-005/1-1527	400		612
eibG-006/1-1527	400		612
eibG-007/1-1527	400		612
eibG-008/1-1527	400		612
eibG-009/1-1527	400		612
eibG-010/1-1527	400		612
eibG-011/1-1527	400		612
eibG-012/1-1527	400		612
eibG-013/1-1527	400		612
eibG-014/1-1527	400		612
eibG-015/1-1527	400		612
eibG-016/1-1527	400		612
eibG-017/1-1527	400		612
eibG-018/1-1527	400		612
eibG-019/1-1527	400		612
eibG-020/1-1530	400		612
eibG-021/1-1527	400		612
eibG-001/1-1527	613	G C A G C A A G T G G A C A G C A A A G T G T G C C T T A G G T G G G G A A C A T A T G C T T A T G C A G A T G C A T T A C A G C C C T G G G A A G C G T T G C A T T T G T G A T A A C A C G G C T A C A T A T G G C A G G C A G T A G G T	735
eibG-002/1-1527	613		735
eibG-003/1-1527	613		735
eibG-004/1-1527	613		735
eibG-005/1-1527	613		735
eibG-006/1-1527	613		735
eibG-007/1-1527	613		735
eibG-008/1-1527	613		735
eibG-009/1-1527	613		735
eibG-010/1-1527	613		735
eibG-011/1-1527	613		735
eibG-012/1-1527	613		735
eibG-013/1-1527	613		735
eibG-014/1-1527	613		735
eibG-015/1-1527	613		735
eibG-016/1-1527	613		735
eibG-017/1-1527	613		735
eibG-018/1-1527	613		735
eibG-019/1-1527	613		735
eibG-020/1-1530	616	T . T . G G A C . T A . A A C A . . C . G . A . T G C T . A G C C . . C A . C . . T . A G G T T . T T T T . C . . T A .	738
eibG-021/1-1527	613	A G T . T C A . G A G A . G . A C T . A . A A . T . G G G G C . G T A . G T . A . C . G T T T A . T . T C A . G . G . T T . A T . C G T T G T T . G .	739
eibG-001/1-1527	736	A A C C G A G C C A A A G T T G A T A A A G A T G C A A C A G A A G G T A C T G C G T T A G G G C C A A G G C C A A C A G T A A C A A A T A A A A A C A G T T T G C A T T A G G A G C T A A T T C A C G C A C A A C C G T G A C A A T G A G G T	858
eibG-002/1-1527	736		858
eibG-003/1-1527	736		858
eibG-004/1-1527	736		858
eibG-005/1-1527	736		858
eibG-006/1-1527	736		858
eibG-007/1-1527	736		858
eibG-008/1-1527	736		858
eibG-009/1-1527	736		858
eibG-010/1-1527	736		858
eibG-011/1-1527	736		858
eibG-012/1-1527	736		858
eibG-013/1-1527	736		858
eibG-014/1-1527	736		858
eibG-015/1-1527	736		858
eibG-016/1-1527	736		858
eibG-017/1-1527	736		858
eibG-018/1-1527	736		858
eibG-019/1-1527	736		858
eibG-020/1-1530	739	T T A C . A G A T G T A A . C . A T T C T G . C G . C G . A . C . C . A . C . T T A .	861
eibG-021/1-1527	730	G G . A . C T . T G T T . G . G . G . A C C . C C A C . G . A A G C . G A . G G A . T T . T C . G . T T G . G . G A G . G A . T T A .	868
eibG-001/1-1527	859	T A T A T C G G T T A T G A A G C A G A G C G G G T A A G G C T T A T A A A C C C G G G T G C T T G G T G C T G A G T A C C G T A C T G C T C C T C A G A T G C T G C A A C C G T T C G T A G G T T G A C C G T G A A A A G A C A G T	981
eibG-002/1-1527	859		981
eibG-003/1-1527	859		981
eibG-004/1-1527	859		981
eibG-005/1-1527	859		981
eibG-006/1-1527	859		981
eibG-007/1-1527	859		981
eibG-008/1-1527	859		981
eibG-009/1-1527	859		981
eibG-010/1-1527	859		981
eibG-011/1-1527	859		981
eibG-012/1-1527	859		981
eibG-013/1-1527	859		981
eibG-014/1-1527	859		981
eibG-015/1-1527	859		981
eibG-016/1-1527	859		981
eibG-017/1-1527	859		981
eibG-018/1-1527	859		981
eibG-019/1-1527	859		981
eibG-020/1-1530	862	C . T A G . C T T . T A . A C A C C A . A T C . T . A C . A . C A T G .	984
eibG-021/1-1527	859	C . C . T . A . A G C T . T C A A T G .	981

Abb. 27 (Teil 2): Vergleich der sequenzierten 21 *eibG*-Allele untereinander.

Punkte markieren identische Basen im Vergleich zur Referenzsequenz *eibG*-001 (obere Zeile). Basenaustausche sind gekennzeichnet.

<i>eibG-001/1-1527</i>	982	GTTGAGCAACTGGCTCAGGATACGAATACCCGCTTGTGGTTGAAGCGAAAAGCTCGTGAATATACAGACTCCAGAACACGAGTTGGTGTAACTCCGACGGAAACCTGACCCGTTGCAGAA	1104
<i>eibG-002/1-1527</i>	982		1104
<i>eibG-003/1-1527</i>	982		1104
<i>eibG-004/1-1527</i>	982		1104
<i>eibG-005/1-1527</i>	982		1104
<i>eibG-006/1-1527</i>	982		1104
<i>eibG-007/1-1527</i>	982		1104
<i>eibG-008/1-1527</i>	982		1104
<i>eibG-009/1-1527</i>	982		1104
<i>eibG-010/1-1527</i>	982		1104
<i>eibG-011/1-1527</i>	982		1104
<i>eibG-012/1-1527</i>	982		1104
<i>eibG-013/1-1527</i>	982		1104
<i>eibG-014/1-1527</i>	982		1104
<i>eibG-015/1-1527</i>	982		1104
<i>eibG-016/1-1527</i>	982		1104
<i>eibG-017/1-1527</i>	982		1104
<i>eibG-018/1-1527</i>	982		1104
<i>eibG-019/1-1527</i>	982		1104
<i>eibG-020/1-1530</i>	985		1107
<i>eibG-021/1-1527</i>	982	A C T G T	1104
<i>eibG-001/1-1527</i>	1105	GGAGCCAGCAAAACCCCTCGCTGTTAATGACGGCTAGTTGCTTGTCCGGCAGAACAGACCGTATTGATGCTGCAGTTGGTAGCGTTGACCCGGGGTTACTAAAAATACAGAGCGTATTTCAG	1227
<i>eibG-002/1-1527</i>	1105	T	1227
<i>eibG-003/1-1527</i>	1105		1227
<i>eibG-004/1-1527</i>	1105		1227
<i>eibG-005/1-1527</i>	1105	C T C A G A T C C C	1227
<i>eibG-006/1-1527</i>	1105		1227
<i>eibG-007/1-1527</i>	1105		1227
<i>eibG-008/1-1527</i>	1105	C T C A G A T C C C	1227
<i>eibG-009/1-1527</i>	1105		1227
<i>eibG-010/1-1527</i>	1105	C T C A G A T C C C	1227
<i>eibG-011/1-1527</i>	1105		1227
<i>eibG-012/1-1527</i>	1105	C T C A G A T C C C	1227
<i>eibG-013/1-1527</i>	1105		1227
<i>eibG-014/1-1527</i>	1105		1227
<i>eibG-015/1-1527</i>	1105	C T C A G A T C C C	1227
<i>eibG-016/1-1527</i>	1105		1227
<i>eibG-017/1-1527</i>	1105	C T C A G A T C C C	1227
<i>eibG-018/1-1527</i>	1105		1227
<i>eibG-019/1-1527</i>	1105		1227
<i>eibG-020/1-1530</i>	1106	C T C A G A T C C C	1230
<i>eibG-021/1-1527</i>	1105	C T C A G A T C C C	1227
<i>eibG-001/1-1527</i>	1228	TCCAAATACGCGCAGTTGCGAGGACATAAATGCAAGCCGTAACAGCCAGCAGCGAGATTCGTAAGAAACCCAGAGAGATGAAGCGTGCAGCAGCACAGAGTGCAGCCGCTGGCGGGTCTTTTC	1350
<i>eibG-002/1-1527</i>	1228		1350
<i>eibG-003/1-1527</i>	1228		1350
<i>eibG-004/1-1527</i>	1228		1350
<i>eibG-005/1-1527</i>	1228		1350
<i>eibG-006/1-1527</i>	1228		1350
<i>eibG-007/1-1527</i>	1228		1350
<i>eibG-008/1-1527</i>	1228		1350
<i>eibG-009/1-1527</i>	1228		1350
<i>eibG-010/1-1527</i>	1228		1350
<i>eibG-011/1-1527</i>	1228		1350
<i>eibG-012/1-1527</i>	1228		1350
<i>eibG-013/1-1527</i>	1228		1350
<i>eibG-014/1-1527</i>	1228		1350
<i>eibG-015/1-1527</i>	1228		1350
<i>eibG-016/1-1527</i>	1228		1350
<i>eibG-017/1-1527</i>	1228		1350
<i>eibG-018/1-1527</i>	1228		1350
<i>eibG-019/1-1527</i>	1228		1350
<i>eibG-020/1-1530</i>	1231	A G T	1353
<i>eibG-021/1-1527</i>	1228	A G T	1350
<i>eibG-001/1-1527</i>	1351	CAGCCGTACAGTGTGGGAAATTCACAGCCAGCCGAGCCCTGGGTTACAGCGATAAACAGGCGATGCTGTAGGTTGGTTACCCTTTCACAGCAGCAGACCCGAGCGAAAGCGGGTATT	1473
<i>eibG-002/1-1527</i>	1351		1473
<i>eibG-003/1-1527</i>	1351		1473
<i>eibG-004/1-1527</i>	1351		1473
<i>eibG-005/1-1527</i>	1351		1473
<i>eibG-006/1-1527</i>	1351		1473
<i>eibG-007/1-1527</i>	1351		1473
<i>eibG-008/1-1527</i>	1351		1473
<i>eibG-009/1-1527</i>	1351		1473
<i>eibG-010/1-1527</i>	1351		1473
<i>eibG-011/1-1527</i>	1351		1473
<i>eibG-012/1-1527</i>	1351		1473
<i>eibG-013/1-1527</i>	1351		1473
<i>eibG-014/1-1527</i>	1351		1473
<i>eibG-015/1-1527</i>	1351		1473
<i>eibG-016/1-1527</i>	1351		1473
<i>eibG-017/1-1527</i>	1351		1473
<i>eibG-018/1-1527</i>	1351		1473
<i>eibG-019/1-1527</i>	1351		1473
<i>eibG-020/1-1530</i>	1354	T T G C	1476
<i>eibG-021/1-1527</i>	1351	T G C G T A A G G	1473
<i>eibG-001/1-1527</i>	1474	GCAGCGAGTGATGGCGATGTGCTACAAACATGGGTTAACTTCGAGTTTTAA	1527
<i>eibG-002/1-1527</i>	1474		1527
<i>eibG-003/1-1527</i>	1474		1527
<i>eibG-004/1-1527</i>	1474		1527
<i>eibG-005/1-1527</i>	1474		1527
<i>eibG-006/1-1527</i>	1474		1527
<i>eibG-007/1-1527</i>	1474		1527
<i>eibG-008/1-1527</i>	1474		1527
<i>eibG-009/1-1527</i>	1474		1527
<i>eibG-010/1-1527</i>	1474		1527
<i>eibG-011/1-1527</i>	1474		1527
<i>eibG-012/1-1527</i>	1474		1527
<i>eibG-013/1-1527</i>	1474		1527
<i>eibG-014/1-1527</i>	1474		1527
<i>eibG-015/1-1527</i>	1474		1527
<i>eibG-016/1-1527</i>	1474		1527
<i>eibG-017/1-1527</i>	1474		1527
<i>eibG-018/1-1527</i>	1474		1527
<i>eibG-019/1-1527</i>	1474		1527
<i>eibG-020/1-1530</i>	1477		1530
<i>eibG-021/1-1527</i>	1474	G A T G T	1527

Abb. 27 (Teil 3): Vergleich der sequenzierten 21 *eibG*-Allele untereinander.

Punkte markieren identische Basen im Vergleich zur Referenzsequenz *eibG-001* (obere Zeile). Basenaustausche sind gekennzeichnet.

Durch die Bestimmung der Basensequenzen der verschiedenen *eibG*-Allele konnten die AS-Sequenzen der exprimierten Proteine ermittelt werden. Diese sind in Abb. 28 dargestellt.

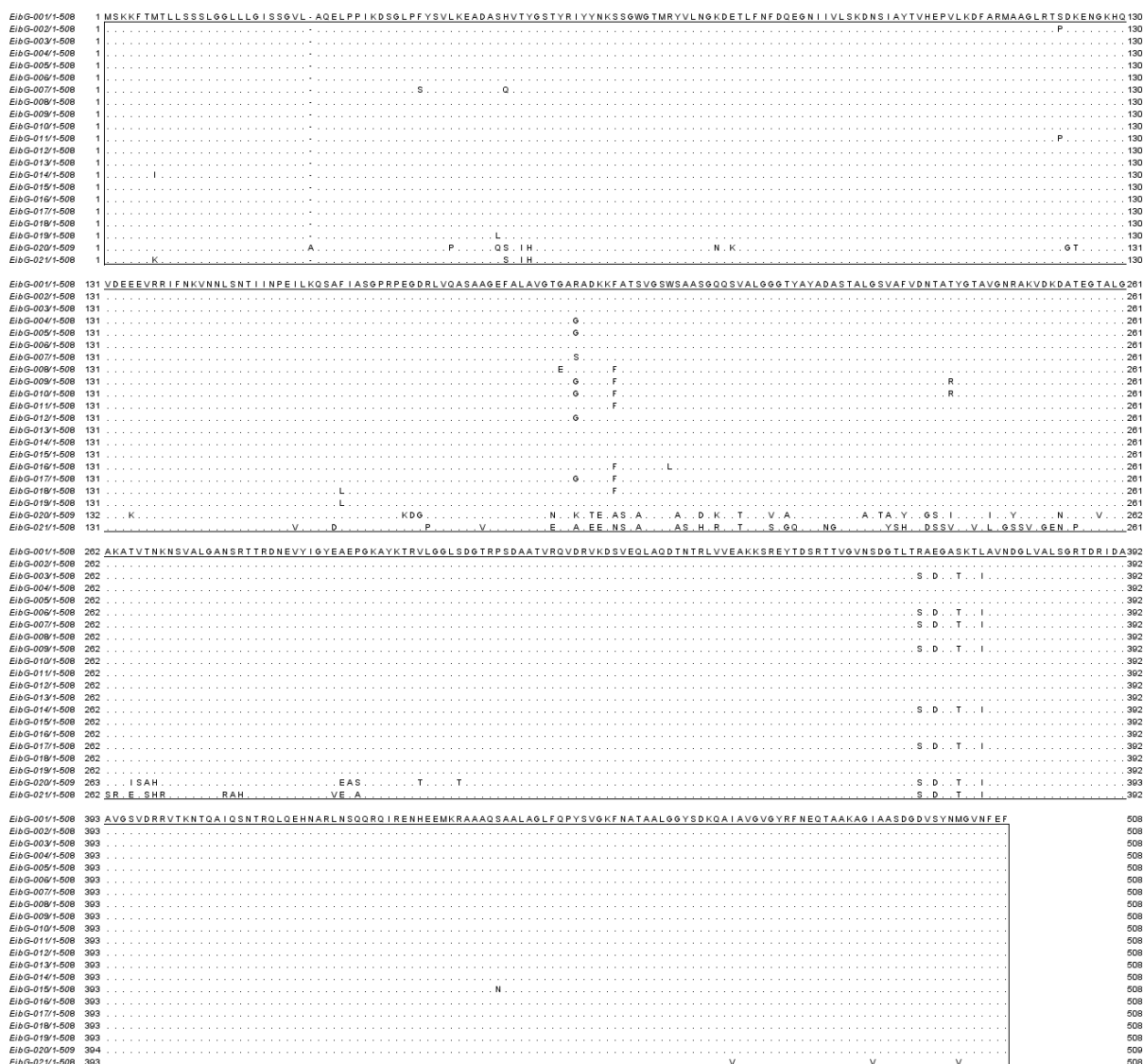


Abb. 28: Theoretische AS-Sequenzen der 21 *eibG*-Allele.

Punkte markieren identische Aminosäuren im Vergleich zur Referenzsequenz EibG-001 (obere Zeile). AS-Austausch sind gekennzeichnet.

Differenzen zwischen den EibG-Proteinen nehmen in den mittleren Bereichen der AS-Sequenzen zu und sind sowohl am N-Terminus (Signalsequenz) als auch am C-terminalen Ende weniger ausgeprägt. Der funktionelle mittlere Bereich von EibG könnte durch die Allelvariation zu Veränderungen in den Proteineigenschaften führen. Mögliche funktionelle Unterschiede galt es mit den folgenden Experimenten herauszufinden.

4.2 PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG *EIBG*-POSITIVER STEC

Phänotypische Unterschiede der *eibG*-positiven Stämme wurden als Erstes hinsichtlich ihrer Adhäsion an humane intestinale Epithelzellen (HCT-8) überprüft. Dabei sollte die Untersuchung der EibG-vermittelten Bakterienketten-Ausbildung und der Variabilität dieser Ketten im Vordergrund stehen. Exemplarisch wurden mehrere EibG- α sowie EibG- β und EibG- γ *E. coli* – Stämme überprüft. Die Adhäsionsassays wurden gemäß Kapitel 3.4.1 durchgeführt.

4.2.1 Adhäsion *eibG*-positiver STEC an humane intestinale Epithelzellen

In **Abb. 29** sind die mikroskopischen Aufnahmen der Adhäsionsassays verschiedener *eibG*-positiver STEC dargestellt. Abb. 29 A bis D zeigt die Adhäsion von EibG- α – positiven STEC. In Abb. 29 E ist der EibG- β Stamm und in den Abb. 29 F und G sind die Adhäsionsmuster der EibG- γ Stämme abgebildet. Abb. 29 H zeigt den *eibG*-negativen O91-Stamm 1745/98.

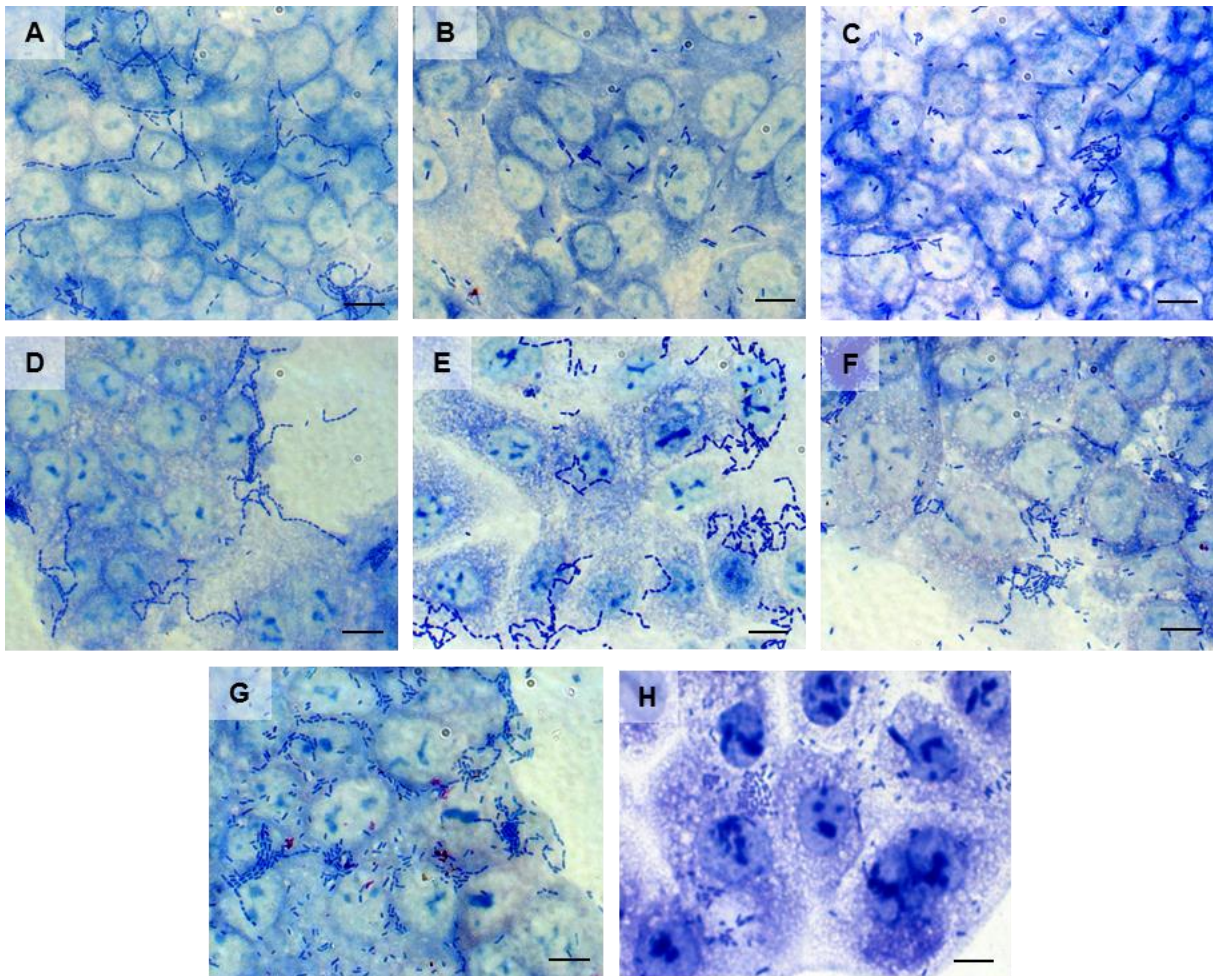


Abb. 29: Adhäsion verschiedener *eibG*-positiver STEC-Stämme an humane intestinale Epithelzellen HCT-8.

Die Teilabbildungen A bis H zeigen das Adhäsionsverhalten folgender Stämme dargestellt (Stamm Nr., *E. coli* – Serotyp, *eibG*-Subtyp und *eibG*-Allel): **(A)** 1809/00 (O91:H14 [H14], *eibG*- α , 001); **(B)** 4789/97-1 (O146:H21, *eibG*- α , 015); **(C)** 4831/97 (OR:H45, *eibG*- α , 014); **(D)** 99-02787 (OR:H10, *eibG*- α , 002); **(E)** 06-03233 (O152:H [H14], *eibG*- β , 020); **(F)** 0519/99 (OR:Hnt, *eibG*- γ , 021); **(G)** 0520/99 (Ont:H30, *eibG*- γ , 021); **(H)** 1745/98 (O91:H21, *eibG*-negativ). Balken = 10 μ m, Giemsa-Färbung.

Die in Abb. 29 gezeigten EibG- α Stämme repräsentieren unterschiedliche Serotypen, um mögliche Variationen in der Kettenausbildung auch unter dem Aspekt verschiedener Oberflächenstrukturen vergleichen zu können. Die Adhäsionstests zeigen für die Stämme 1809/00 (O91:H14, Abb. 29 A) und 99-02787 (OR:H10, Abb. 29 D) sehr lange Bakterienketten (20-40 μ m) auf den humanen Epithelzellen; der Stamm 4831/97 (OR:H45, Abb. 29 C) weist etwas kürzere, nicht so stark verzweigte Ketten (10-20 μ m), und Stamm 4789/97-1 (O146:H21, Abb. 29 B) kurze Bakterienketten auf (bis 10 μ m). Beide EibG- α Stämme mit den langen Bakterienketten (1809/00 und 99-02787) exprimieren die *eibG*-Allele 001 und 002, die untereinander 99,61% AS-Identität aufweisen. Der Stamm mit den kurzen Ketten (4789/97-1) exprimiert das *eibG*-Allel 015, welches ebenfalls eine 99,61%ige Identität mit dem Referenzallel 001 aufweist. Der Stamm mit der mittleren Kettenlänge (4831/97) und dem

eibG-Allel 014 weist hingegen eine Übereinstimmung von lediglich 98,82% im Vergleich zu dem Referenzallel auf. Da die bakteriellen Ketten bei diesem Stamm länger sind als die des Stammes 4789/97-1, können die relativ geringen Unterschiede in der AS-Sequenz nicht der alleinige Grund für die unterschiedlichen Kettenlängen sein. Die Stämme mit den langen Ketten gehören zum Serotyp O91:H14 bzw. OR:H10, wohingegen die beiden anderen *EibG*- α Stämme mit den kürzeren Ketten den Serotypen OR:H45 bzw. O146:H21 angehören. Daher kann vermutet werden, dass Oberflächenstrukturen die durch *EibG* verursachte Kettenform beeinflussen.

Der *EibG*- β Stamm (06-03233, Abb. 29 E) exprimiert das *eibG*-Allel 020 mit 89,98%iger Identität im Vergleich zu dem Referenzallel 001 und zeigt lange verzweigte Bakterienketten in den Adhäsionsassays mit humanen intestinalen Epithelzellen. Der Serotyp dieses Stammes (O152:H) könnte durch das Fehlen der Flagellen einen Einfluss auf die Kettenausbildung haben und diese begünstigen. Die beiden *EibG*- γ Stämme (0519/99, Abb. 29 F und 0520/99, Abb. 29 G) bilden, wie der *EibG*- α Stamm 4789/97-1 (Abb. 29 B), nur kurze Ketten auf HCT-8 aus. Die Serotypen dieser beiden *EibG*- γ Stämme (OR:Hnt und Ont:H30) können nicht in den Vergleich der Kettenlängen einbezogen werden, da weder der O- noch der H-Serotyp bestimmt werden konnte. Sowohl das *eibG*-Allel als auch die O- und H-Antigene von *E. coli* können die kettenförmigen Agglomerate (CLAP: *chain like adhesion pattern*) in Länge und Art (Ketten oder Cluster) beeinflussen. Der *EibG*-negative *E. coli* – Stamm (Abb. 29 H) wies, wie zu erwarten war, keine Kettenbildung auf.

4.2.2 Adhäsion *eibG*-positiver STEC an bovine intestinale Epithelzellen

Adhäsionsassays mit intestinalen Epithelzellen aus Rind (FDK-R 971) sollten zeigen, ob die Kettenausbildung bei *eibG*-positiven STEC einen Unterschied zu humanen Epithelzellen aufweist. Die Adhäsionstests wurden analog zu den Assays mit humanen Epithelzellen (HCT-8, vgl. Kapitel 4.2.1) durchgeführt. In **Abb. 30** sind mikroskopische Aufnahmen der Adhäsionsassays mit Rinderepithelzellen dargestellt. Es wurden mehrere *EibG*- α exprimierende Stämme (Abb. 30 A bis E) sowie jeweils ein Stamm mit *EibG*- β (Abb. 30 F) und *EibG*- γ (Abb. 30 G) im Vergleich zu dem *eibG*-negativen Stamm 1745/98 (Abb. 30 H) untersucht.

Der Stamm 1809/00 (O91:H14, *eibG*- α , Allel 001, Abb. 30 A) bildete auch auf Rinderepithelzellen lange, verzweigte CLAP, und der Stamm 4789/97-1 (O146:H21, *eibG*- α , Allel 015, Abb. 30 C) kurze Ketten, wie bei der Adhäsion an humane Epithelzellen. Damit ähnelte er dem CLAP des Stammes 4141/96 (OR:H21, *eibG*- α , Allel nicht ermittelbar, Abb. 30 E). Bei dem ebenfalls zusätzlich überprüften Stamm ST234 (O146:H28, *eibG*- α , Abb. 30 D) konnte, wie auch beim Stamm 4141/96, kein definiertes *eibG*-Allel identifiziert werden. Dennoch unterscheiden sich die CLAP dieser beiden Stämme erheblich; während für 4141/96 sehr kurze Ketten charakteristisch sind, bildet ST234 sehr lange und verzweigte Ketten aus. Die unterschiedlichen Serotypen dieser beiden Stämme, denen verschiedene Oberflächenstrukturen der Bakterien zugrunde liegen, könnten für die Heterogenität der Bakterienketten verantwortlich sein.

Der *EibG*- β Stamm 06-03233 (O152:H, Abb. 30 F) und *EibG*- γ Stamm 0520/99 (Ont:H30, Abb. 30 G) wiesen beim Vergleich ihrer Adhäsion an humane und bovine Epithelzellen ebenfalls keine Veränderungen in ihren CLAP-Mustern auf. 06-03233 bildete lange, verzweigte Ketten und 0520/99 eher kurze, Cluster-ähnliche Ketten. Der *eibG*-negative Stamm (1745/98, O91:H21) zeigte auch auf Rinderepithelzellen keine Kettenausbildung.

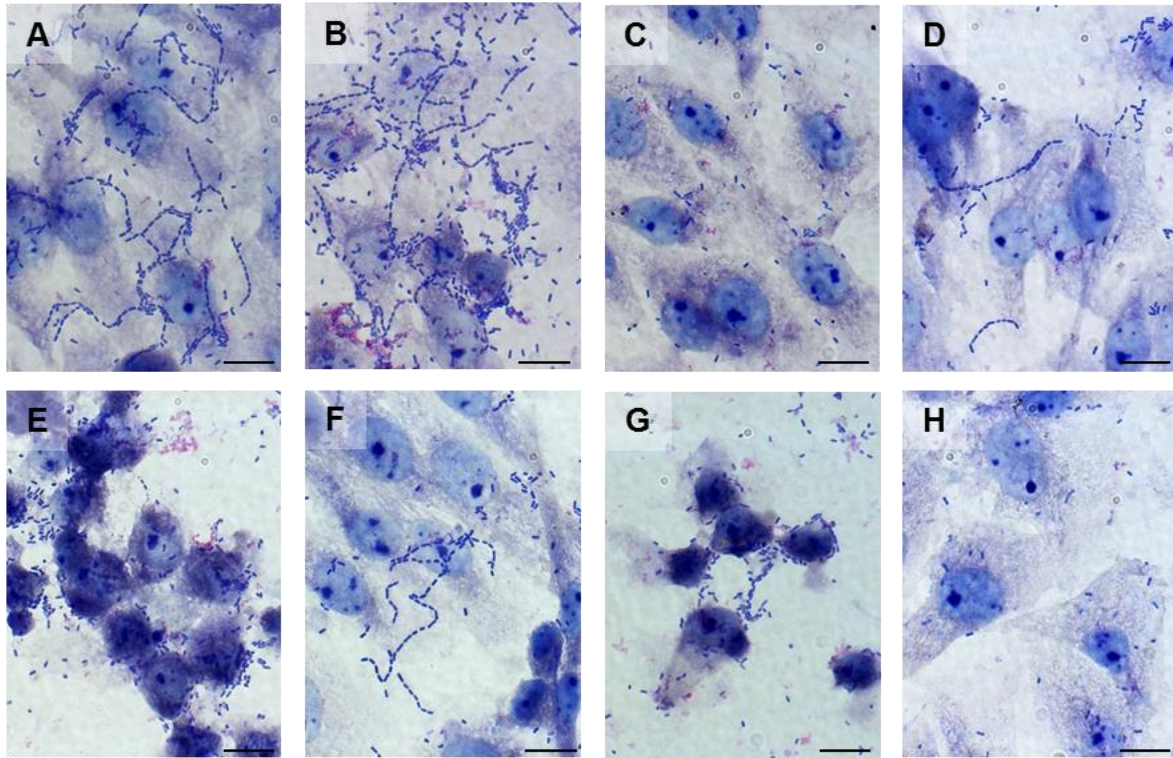


Abb. 30: Adhäsion verschiedener *eibG*-positiver STEC-Stämme an bovine intestinale Epithelzellen FDK-R 971.

Die Teilabbildungen A bis H zeigen das Adhäsionsverhalten folgender Stämme (Stamm Nr., *E. coli* – Serotyp, *eibG*-Subtyp und *eibG*-Allel): **(A)** 1809/00 (O91:H14 [H14], *eibG*- α , 001); **(B)** 172/98 (OR:H⁻ [H14], *eibG*- α , 005); **(C)** 4789/97-1 (O146:H21, *eibG*- α , 015); **(D)** ST234 (O146:H28, *eibG*- α , k.A.); **(E)** 4141/96 (OR:H21, *eibG*- α , k.A.); **(F)** 06-03233 (O152:H⁻ [H14], *eibG*- β , 020); **(G)** 0520/99 (Ont:H30, *eibG*- γ , 021); **(H)** 1745/98 (O91:H21 *eibG*-negativ). k.A.: keine Angabe zum Allel möglich. Balken = 20 μ m, Giemsa-Färbung.

4.2.3 Kettenausbildung von *eibG*-positiven STEC auf abiotischer Oberfläche

Es sollte im Folgenden untersucht werden, ob *eibG*-positive STEC auch in Abwesenheit von intestinalen Epithelzellen auf abiotischen Oberflächen, hier Permanox-Objektträger, Ketten ausbilden können. Da *EibG*- α – Produzenten grundsätzlich längere Ketten auf Epithelzellen ausbilden, als es bei *EibG*- β – oder *EibG*- γ – Produzenten der Fall war, wurden für diese Tests *EibG*- α Stämme eingesetzt. In **Abb. 31** sind die CLAP-Muster von vier *eibG*- α – positiven STEC-Stämmen gezeigt.

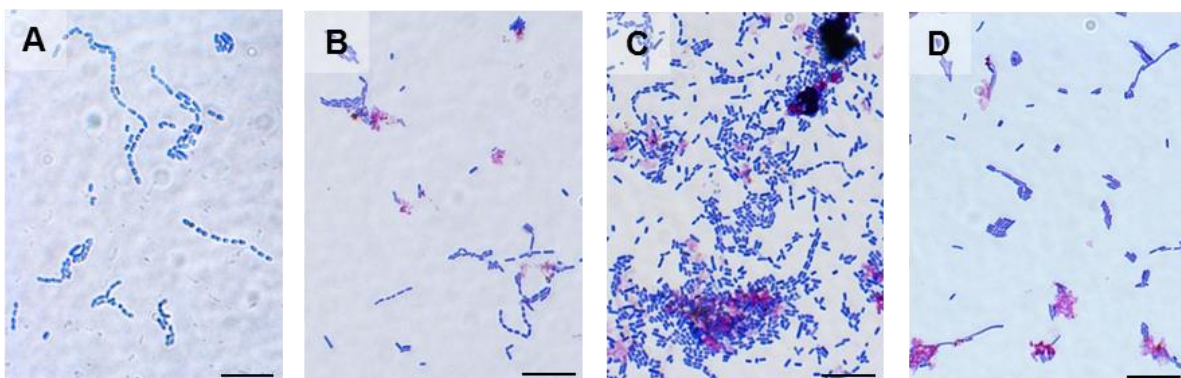


Abb. 31: Ausbildung bakterieller Ketten von *eibG*- α – positiven STEC auf abiotischer Oberfläche.

Die Teilabbildungen A bis D zeigen das Adhäsionsverhalten folgender Stämme: **(A)** 1809/00 (O91:H14 [H14], *eibG*- α , Allel 001); **(B)** 7140-96 (O91:H⁻ [H14], *eibG*- α , Allel 003); **(C)** 99-02787 (OR:H10, *eibG*- α , Allel 002); **(D)** 3558/96 (Ont:H⁻ [H14], *eibG*- α , Allel 001). Balken = 10 μ m, Giemsa-Färbung.

Der Stamm mit dem *eibG*- α – Referenzallel 001 (1809/00, Abb. 31 A) weist auch bei der Adhäsion an abiotische Oberfläche die längsten Ketten auf. Stamm 99-02787 (Abb. 31 C), für den im Adhäsionsversuch mit humanen Epithelzellen ebenfalls lange CLAP charakteristisch waren (vgl. Kapitel 4.2.1), bildete zwar auch ohne Epithelzellen lange Ketten, zeigte aber zusätzlich eine erhöhte Clusterbildung. Stamm 7140-96 (O91:H⁻, Allel 003, Abb. 31 B), mit einer AS-Übereinstimmung zum Allel 001 von 99,02%, zeigte CLAP mittlerer Länge. Bei Stamm 3558/96 (Ont:H⁻, Abb. 31 D), mit dem identischen *eibG*-Allel wie Stamm 1809/00 (Referenzallel 001), konnten keine langen CLAP beobachtet werden. Das nicht typisierbare O-Antigen und fehlende H-Antigene stellen die wesentlichen Unterschiede in den Oberflächenstrukturen dieser beiden *eibG*- α (Allel 001) – Produzenten dar. Somit konnte festgestellt werden, dass *eibG*-positive STEC in der Lage sind, auch auf abiotischen Oberflächen Kettenformationen auszubilden. Deren Ausprägung hinsichtlich der Länge und Clusterbildung scheint aber nicht ausschließlich vom *eibG*-Allel abhängig zu sein, sondern wird offenbar durch die O- und H-Antigene der Bakterien beeinflusst.

4.2.4 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Bindung von IgG Fc-Fragmente an *eibG*-positive STEC

EibG sollte durch seine Fähigkeit zur Bindung an IgG Fc – Fragmente auf der Oberfläche von *E. coli* detektierbar sein. Mit fluorogenen humanen IgG Fc – Konjugaten wurden Färbungen mit auf Objektträgern immobilisierten *eibG*-positiven STEC durchgeführt (vgl. Kapitel 3.4.1). In **Abb. 32** sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von sieben *eibG*-positiven STEC-Stämmen und einem *eibG*-negativen STEC-Stamm als Negativkontrolle dargestellt.

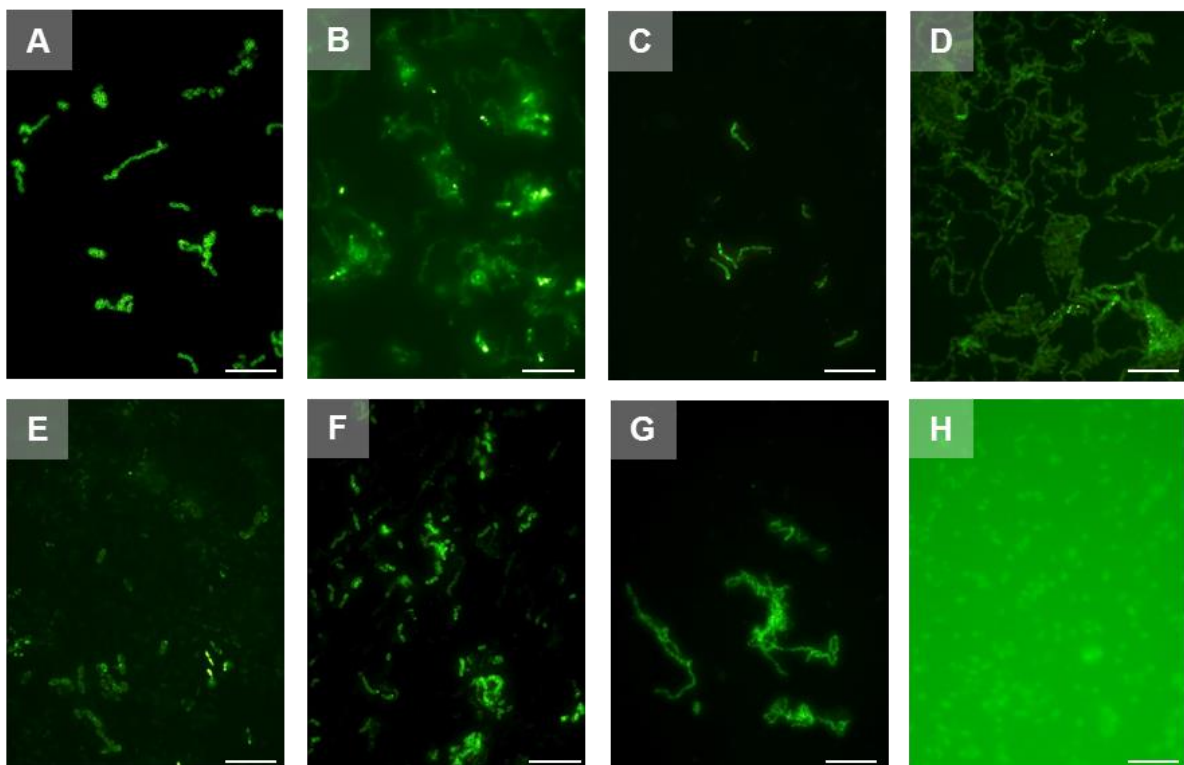


Abb. 32: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der IgG Fc-Interaktion bei verschiedenen *eibG*-positiven STEC.

Die Teilabbildungen A bis H zeigen folgende Stämme (Stamm Nr., Serotyp, *eibG*-Typ und *eibG*-Allel): **(A)** 99-02787 (OR:H10, *eibG*- α , 002); **(B)** 2875-96 (O91:H14, [H14], *eibG*- α , 016); **(C)** 4141/96 (OR:H21, *eibG*- α , k.A.); **(D)** 7140/96 (O91:H⁻, *eibG*- α , 003); **(E)** ST234 (O146:H28, *eibG*- α , k.A.); **(F)** 06-03233 (O152:H⁻ [H14], *eibG*- β , 020); **(G)** 0520/99 (Ont:H30, *eibG*- γ , 021); **(H)** 1745/98 (O91:H21, *eibG*-negativ). k.A.: keine Angabe zum Allel möglich. Balken = 10 μ m. Detektion mit humanem IgG Fc – Alexa 488.

Bei der Negativkontrolle (Abb. 32 H) wurde eine längere Belichtungszeit verwendet, um die Bakterien sichtbar zu machen, wodurch der Hintergrund durch unspezifisch gebundenes IgG Fc – Alexa 488 stark grün erscheint. Alle *eibG*-positiven Stämme (Abb. 32 A bis G) weisen teilweise eine kräftige Grünfärbung auf. Einige immobilisierte Bakterien sind allerdings nur leicht gefärbt, obwohl sie sich teilweise in direkter Nachbarschaft zu den Bakterien mit deutlich sichtbarer Färbung befinden (Abb. 32 B, E oder F). Verschiedene Wachstumsstadien der Bakterien und die damit einhergehende Unterschiede bezüglich der Oberflächenstrukturen könnten der Grund dafür sein.

Ungewöhnlicher Weise bildete bei diesem Versuch der EibG- γ Stamm (Abb. 32 G) sehr lange Ketten aus, und der EibG- β Stamm (Abb. 32 F) wies eher kürzere CLAP-Muster auf, als dies in den Versuchen mit intestinalen Epithelzellen der Fall war (vgl. Kapitel 4.2.1, Abb. 29). Der Stamm 7140/96 (EibG- α , Abb. 32 D) hat in diesem Fall aber ebenfalls sehr lange Ketten ausgebildet, und lichtmikroskopische Untersuchungen der bakteriellen CLAP (Abb. 31 B) zeigten eher mittellange Ketten. Obwohl die Versuche zur Kettenausbildung (Abb. 31) und zum IgG Fc – vermittelten Nachweis (Abb. 32) ähnlich durchgeführt wurden, konnte keine eindeutige Aussage gemacht werden, was diesen Wechsel in den CLAP-Mustern bei den EibG- α und - β Stämmen erklären könnte. Die Anzahl der eingesäten Bakterien könnte beispielsweise variiert haben, was Abweichungen in den CLAP-Mustern zur Folge haben könnte. Der wesentliche Unterschied zwischen den Adhäsionsassays ist das Fehlen der intestinalen Epithelzellen beim Letzteren. Die Anhaftung an Epithelzellen kann bei *E. coli* metabolische Veränderungen verursachen, was ohne Epithelzellen nicht der Fall wäre.

Die erzielten Ergebnisse belegen, dass IgG-Moleküle über das Fc-Fragment an EibG auf der Oberfläche *eibG*-positiver Stämme binden. Die Verteilung der IgG Fc – bindenden EibG-Moleküle auf der *E. coli* – Oberfläche ist von Stamm zu Stamm unterschiedlich, und selbst bei ein und demselben *E. coli* – Stamm binden die Zellen unterschiedlich viele Antikörper. Bakterien innerhalb einer Kette weisen jedoch meistens eine ähnliche Intensität in der Färbung mit IgG Fc – Alexa 488 auf. Dies deutet auf eine ähnlich hohe Expression IgG-bindender Strukturen auf Bakterien ein und derselben Kette hin.

Die Adhäsionsassays mit intestinalen Epithelzellen sind realitätsnäher als einfache Inkubationen von *E. coli* in LB-Medium. Die Adhäsionsassays wurden mit einigen *eibG*-positiven Stämmen mehrfach durchgeführt, und die CLAP-Muster der Bakterien auf den Epithelzellen systematisch ausgewertet. Die Ergebnisse der Adhäsionsassays mit humanen intestinalen Epithelzellen HCT-8 sind in **Tabelle 19** zusammengefaßt. Über die durchschnittliche Länge der Bakterienketten und die Clusterbildung wurde der Adhärenztyp definiert. EibG- α exprimierende Stämme bildeten eher lange bis sehr lange verzweigte Ketten. Ausnahmen sind die Stämme 4789/97-1 (O146:H21, *eibG*-Allel 015) und 4831/97 (OR:H45, *eibG*-Allel 014), für die überwiegend kurze Ketten auf HCT-8 typisch waren. Der EibG- β exprimierende Stamm 06-03233 (O152:H $\bar{1}$, *eibG*-Allel 020) wies bei der Adhäsion mit HCT-8 meistens lange Ketten aus, und die beiden EibG- γ Stämme (0519/99, OR:Hnt und 0520/99, Ont:H30; *eibG*-Allel 021) zeigten vergleichsweise kurze Ketten.

Tabelle 19: Zuordnung der CLAP-Muster zu verschiedenen *eibG*-Typen

Stamm Nr.	Serotyp ^a	<i>eibG</i> - Allel	<i>eibG</i> - Subtyp	Basensequenz- übereinstimmung ^b in %	Adhärenz-Typ ^c
1809/00	O91:H14 [H14]	001	α	100,00	Lange Ketten
3558/98	Ont:H ⁻ [H14]	001	α	100,00	Lange Ketten
7140/96	O91:H ⁻ [H14]	003	α	99,87	Lange Ketten
07-00349	O91:H ⁻ [H14]	005	α	99,08	Lange Ketten
02-03777	O91:H ⁻ [H14]	007	α	99,87	Lange Ketten
07-00739	O91:H ⁻ [H14]	008	α	99,02	Lange Ketten
4792/97	OR:H ⁻ [H14]	009	α	99,87	Lange Ketten
07-00740	O91:H ⁻ [H14]	011	α	99,87	Lange Ketten
02-03884	O91:H ⁻ [H14]	012	α	99,02	Lange Ketten
3671/97	O91:H ⁻ [H14]	017	α	99,08	Lange Ketten
4789/97-1	O146:H21	015	α	99,02	Kurze Ketten, kleine Cluster und einzelne Bakterien
4831/97	OR:H45	014	α	99,87	Kurze Ketten, kleine Cluster und einzelne Bakterien
0550/01	O91:H14 [H14]	018	α	99,93	Lange Ketten
06-07349	O91:H14 [H14]	019	α	99,80	Lange Ketten
99-02787	OR:H10	002	α	99,87	Lange Ketten
06-03233	O152:H ⁻ [H14]	020	β	90,39	Lange Ketten
0519/99	OR:Hnt	021	γ	88,11	Kurze Ketten, kleine Cluster
0520/99	Ont:H30	021	γ	88,11	Kurze Ketten, oft parallel

(^a) ([H14]) Stämme weisen *fliC_{H14}* auf; (^b) mit der Referenzsequenz *eibG*-001; (^c) entstanden bei Adhäsionstests mit humanen intestinalen Epithelzellen HCT-8 (^d) als lange Ketten wurden CLAP mit überwiegend mehr als 10 Bakterien eingestuft; als kurze Ketten CLAP mit überwiegend weniger als 10 Bakterien eingestuft; als kleine Cluster wurden Zellansammlungen von ca. 100 Bakterien eingestuft.

4.2.5 Blockierung der Kettenausbildung durch humanes IgG Fc

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der IgG Fc – Bindung auf der *E. coli* – Oberfläche und der Kettenbildung aufzuzeigen, wurden vor der Immobilisierung der Bakterien auf Objektträgern Blockierungen von EibG durch humanes IgG durchgeführt (vgl. Kapitel 3.4.2).

In **Abb. 33** sind vier *eibG*-positive Stämme abgebildet, jeweils mit und ohne Blockierung mittels humanem IgG. Als generelle Tendenz konnte ein Verlust der Kettenausbildung durch vorherige Blockierung mit IgG beobachtet werden. Die Bakterienzellen verlieren jedoch nicht gänzlich ihr Adhärenzvermögen gegenüber Nachbarzellen, sondern gehen zur Bildung von Clustern über, die bis zu mehrere hundert Bakterienzellen ausmachen können. Bei gleicher Belichtungszeit zeigen die Aufnahmen der nicht blockierten *E. coli* eine höhere Signalintensität als Bakterien nach der Blockierung (vgl. **Abb. 33 A, B und E, F**). Es bleibt festzuhalten, dass die Kettenausbildung offenbar durch Oberflächenstrukturen begünstigt wird, die IgG binden oder sich in unmittelbarer Nähe zu IgG-bindenden Molekülen befinden. Gebundene Antikörper verändern wahrscheinlich die Zugänglichkeit der kettenausbildenden Strukturen auf den Bakterien. Die Kettenausbildung würde dann sowohl durch eine, als auch durch mehrere benachbarte Strukturen verhindert werden. Selbst bei IgG-

blockierten *E. coli* – Stämmen sind Zellen mit schwacher und ausgeprägter Färbung durch IgG Fc – Alexa 488 (Abb. 33 C oder G) nachweisbar. Demnach exprimieren *eibG*-positive STEC-Stämme auch nach IgG-Blockierung, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, IgG Fc – bindende Einheiten auf ihren Oberflächen.

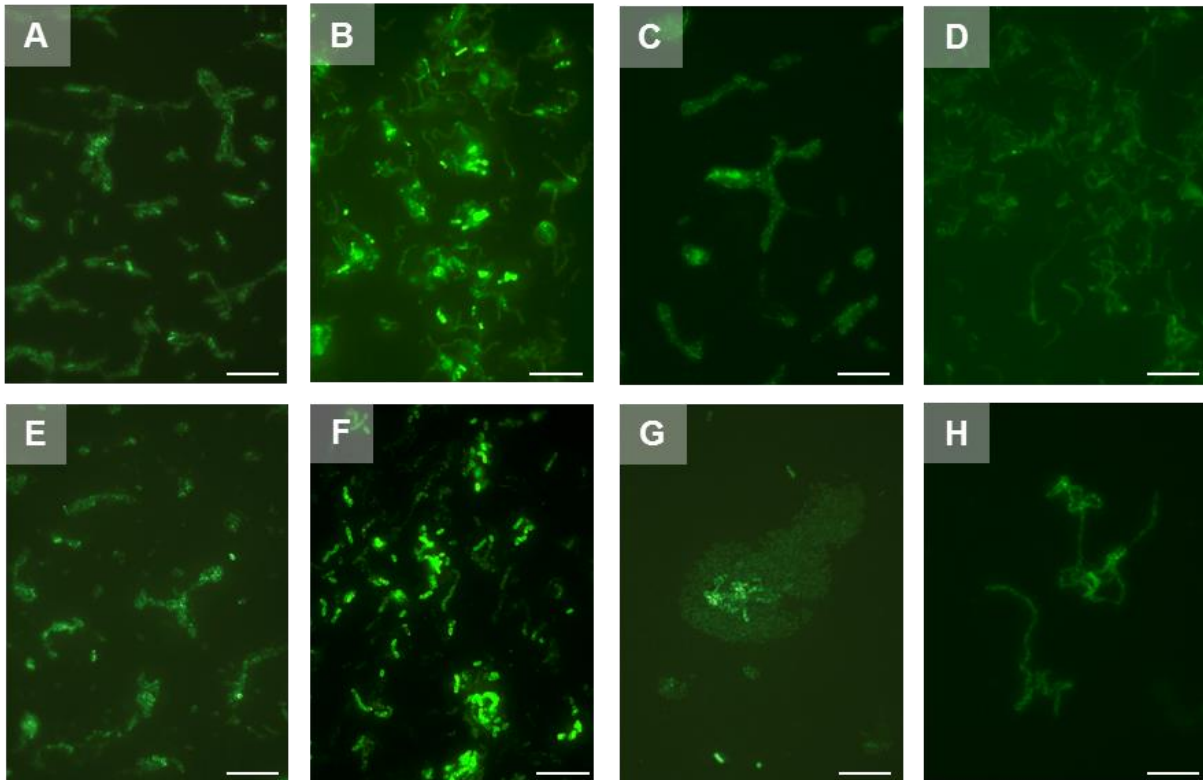


Abb. 33: Blockierung von oberflächenassoziiertem EibG verschiedener *eibG*-positiver STEC-Stämme mit humanem IgG.

Die Teilabbildungen A bis H zeigen folgende Stämme (Stamm Nr., *eibG*-Typ): **(A)** 2875-96 (*eibG*- α) + humanes IgG; **(B)** 2875-96 (*eibG*- α); **(C)** 7140/96 (*eibG*- α) + humanes IgG; **(D)** 7140/96 (*eibG*- α); **(E)** 06-03233 (*eibG*- β) + humanes IgG; **(F)** 06-03233 (*eibG*- β); **(G)** 0520/99 (*eibG*- γ) + humanes IgG; **(H)** 0520/99 (*eibG*- γ). Balken = 10 μ m, Detektion mit humanem IgG Fc – Alexa 488.

4.3 EIBG-EXPRESSION IN EIBG-TRANSFORMIERTEN *E. COLI*

Um aufzuklären, ob die unterschiedlichen CLAP-Muster durch verschiedene *eibG*-Allele verursacht werden und um diese unabhängig vom Serotyp der EibG-Produzenten untersuchen zu können, wurde der Expressionsstamm BL21(DE3) mit EibG-Genen mithilfe des Vektorplasmids *pGEM-T Easy* transformiert (vgl. Kapitel 3.2.4).

4.3.1 Transformation von *E. coli* – BL21(DE3) mittels *pGEM-T Easy* – Vektor

Nach der Ligation der *eibG*-Allele in *pGEM-T Easy* – Plasmide wurde der *E. coli* – Transformationsstamm DH5- α zunächst mit diesen transformiert und die Blau-Weiß-Selektion durchgeführt (Kapitel 3.2.5). Die DH5- α – Stämme wurden danach auf den Erhalt des *eibG*-Gens mittels PCR und dem PP 1 getestet. Die Plasmide *eibG*-positiver DH5- α – Klone wurden danach wieder isoliert, um die jeweiligen *eibG*-Allele mittels PCR und den M13-Primern zu amplifizieren und durch Sequenzierung auf die richtige Basenabfolge zu überprüfen. Da bei der Ligation das *eibG*-Allel

in zwei verschiedenen Leserichtungen in das *pGEM-T Easy* – Plasmid eingebaut werden kann, wurden für weitere Experimente nur Plasmide eingesetzt, in denen die *eibG*-Allele hinter dem T7-Promoter die richtige Basenabfolge aufwiesen. Der Expressionsstamm *E. coli* – BL21(DE3) wurde danach mit den entsprechenden Plasmiden transformiert und analog zu den WT-Stämmen (Kapitel 4.2.1) auf die CLAP-Ausbildung untersucht. In **Abb. 34** sind die mit PP 1 erzeugten *eibG*-Amplifikate der vier im Folgenden untersuchten Klone abgebildet. In **Tabelle 20** sind vollständige Daten zu den jeweiligen Klonen dargestellt.

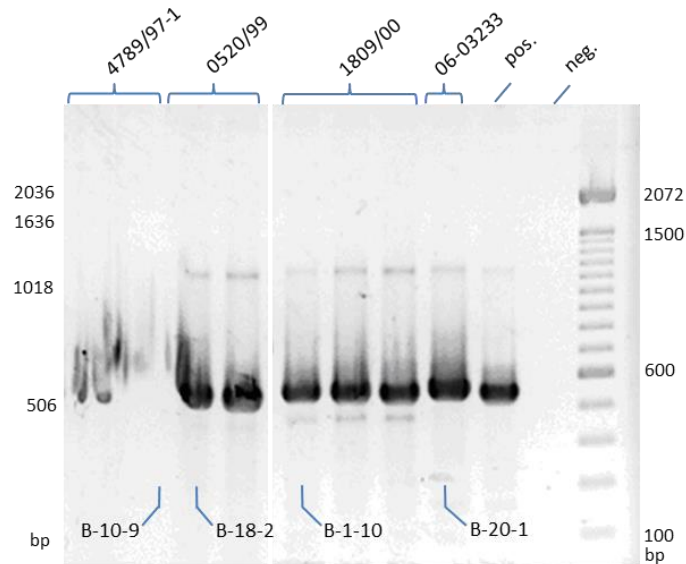


Abb. 34: *eibG*-Amplifikate, die mit PP 1 (1114orf1Fp und 1114orf1Rp) und der DNA aus den BL21(DE3)*eibG*⁺ – Klonen erzeugt wurden.

(**pos.**) Wildtyp: Positivkontrolle (Stamm 06-03233); (**neg.**) Negativkontrolle (PP 1) ohne DNA-Probe.

4.3.2 Adhäsion der *eibG*-Klone an humane intestinale Epithelzellen

In **Abb. 35** sind Adhäsionsassays der generierten BL21(DE3)*eibG*⁺ – Klone (**Tabelle 20**) mit humanen intestinalen Epithelzellen (HCT-8) dargestellt. Diese Assays sind, abgesehen von der Induktion des T7-Promoters mit IPTG (vgl. Kapitel 3.2.4), analog zu denen mit den Wildtypen durchgeführt worden.

Die ohne Kettenbildung wachsenden BL21(DE3) – Bakterien konnten nach der IPTG-Induktion der *eibG*-Allele bakterielle Ketten ausbilden. Die Ketten erreichten bei den Adhäsionsassays mit Epithelzellen jedoch nicht die Längen der bei den WT beobachteten CLAP. Generell bildeten aber *EibG*- α – produzierende Klone längere Ketten als *EibG*- γ – Produzenten, was bereits zuvor bei den WT-Stämmen beobachtet wurde. Die Daten zu den Klonen und ihre Herkunftsstämme sowie die beobachteten CLAP-Muster sind in **Tabelle 20** aufgelistet. Somit konnten unabhängig vom Serotyp der WT-Stämme und der damit einhergehenden Heterogenität der O- und H-Antigene die Längenunterschiede der ausgebildeten CLAP-Muster auf die Allelvariationen von *eibG* zurückgeführt werden.

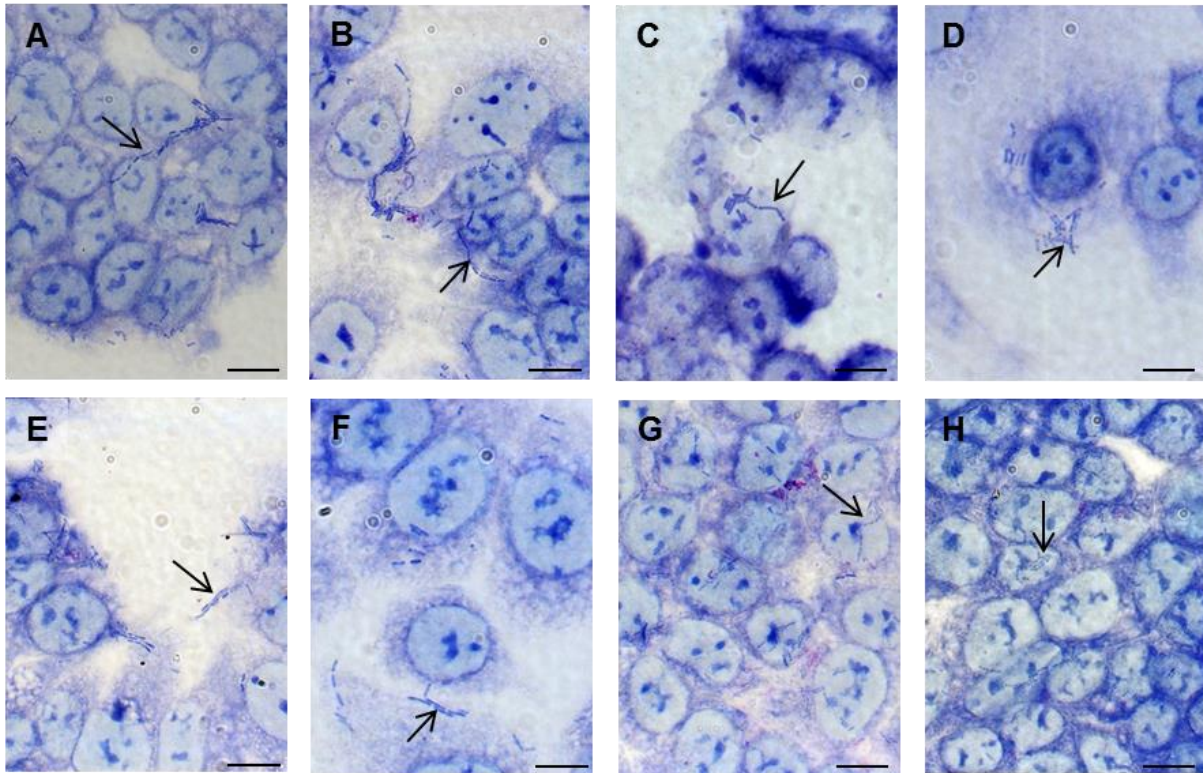


Abb. 35: Adhäsion verschiedener *eibG*-Klone an intestinale humane Epithelzellen HCT-8.

Die Teilabbildungen A bis H zeigen das Adhäsionsverhalten folgender Stämme: **(A), (B):** B-1-10 (*eibG*-α); **(C), (D):** B-10-9 (*eibG*-α); **(E), (F):** B-18-2 (*eibG*-β); **(G), (H):** B-20-1 (*eibG*-γ). Balken = 10 µm, Giemsa-Färbung.

Tabelle 20: *eibG*-positive BL21(DE3) – Stämme mit Herkunftsangaben der *eibG*-Gene und CLAP-Muster

Klon Bezeichnung ^a	Spender-Stamm			CLAP
	Stamm Nr.	Serotyp	<i>eibG</i> -Typ	
B-1-10	1809/00	O91:H14	α	Lange Ketten
B-10-9	4789/97-1	O146:H21	α	Kurze Ketten, kleine Cluster und einzelne Bakterien
B-20-1	06-03233	O152:H ⁻ [H14]	β	Lange Ketten
B-18-2	0520/99	Ont:H30	γ	Kurze Ketten, oft parallel

(^a): **(B)** BL21(DE3) als Expressionsvektor; **(1, 10, 20, 18)** VM-Kennung der eingesetzten WT-Stämme; **(10, 9, 1, 2)** Nr. des *eibG*-positiven Plasmids nach der Blau-Weiß-Selektion.

4.3.3 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Bindung vom IgG Fc-Fragment an *eibG*-positive Klone

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob die *eibG*-positiven Klone unabhängig von ihrer Adhäsion an Epithelzellen CLAP ausbilden können. Gleichzeitig wurden der T7-Promoter auf induktions-unabhängige Transkription der *eibG*-Allele und die damit verbundenen unterschiedlichen Expressionsraten der EibG-Proteine untersucht. In **Abb. 36** sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zweier *eibG*-Klone (B-1-10, *eibG*-α und B-20-1, *eibG*-β; vgl. **Tabelle 20**), eines *eibG*-positiven WT-Stammes (06-03233, *eibG*-β) als Positivkontrolle und des BL21(DE3) – Stammes ohne *eibG*-haltiges Plasmid als Negativkontrolle dargestellt.

Auch EibG-exprimierende Klonstämme bilden bakterielle Ketten aus (Abb. 36 A bis D), welche aber bei gleichen Kultivierungsbedingungen wie bei Wildtypen nicht die Kettenlänge der WT-Stämme erreichen (Abb. 36 E). Die Induktion des T7-Promoters sollte die Transkription der *eibG*-Gene auslösen, wobei der Transport der EibG-Proteine auf die bakterielle Oberfläche durch die Induktion jedoch nicht gewährleistet ist. Die Adhäsionsassays mit humanen intestinalen Epithelzellen zeigen, dass die Expression des *eibG*-Gens durch Plasmidtransformation eine Veränderung hinsichtlich der IgG Fc – Bindung auf der Oberfläche der BL21(DE3)-Zellen hervorruft, wenn man z. B. die Negativkontrolle in Abb. 36 F mit den plasmidhaltigen BL21(DE3)-Stämmen (Abb. 36 A bis D) vergleicht. Durch IPTG-Induktion der Klone erhöht sich aber nicht unbedingt das Ausmaß der Kettenbildung (vgl. Abb. 36 A mit B, bzw. C mit D); diese scheint in einigen Fällen nach IPTG-Induktion sogar eher zurückzugehen. Da bei Verwendung des T7-Promoters eine Basaltranskription nicht auszuschließen ist, wird EibG auch ohne IPTG-Induktion in geringem Maße exprimiert. Durch die Signalsequenz am N-terminalen Ende von EibG wird dieses über das *sec*-Sekretionssystem (vgl. auch Kapitel 1.3.7) auf die bakterielle Membranoberfläche transportiert. Sobald das *sec*-System mit den zu sekretierenden Proteinen ausgelastet ist, erfolgt keine weitere Steigerung der Sekretion von EibG. Da IPTG zudem geringfügig toxisch für *E. coli* ist, kann die Induktion mit IPTG mit dem einhergehenden erhöhten Energieverbrauch durch eine gesteigerte Transkription von durch T7-Promoter regulierten Genen zu Stressreaktionen der Bakterien führen. Eine Stressreaktion könnte beispielsweise die erhöhte Expression von LPS oder von anderen Oberflächen-assoziierten Komponenten der Bakterien sein, welche wiederum die Kettenbildung behindern könnten.

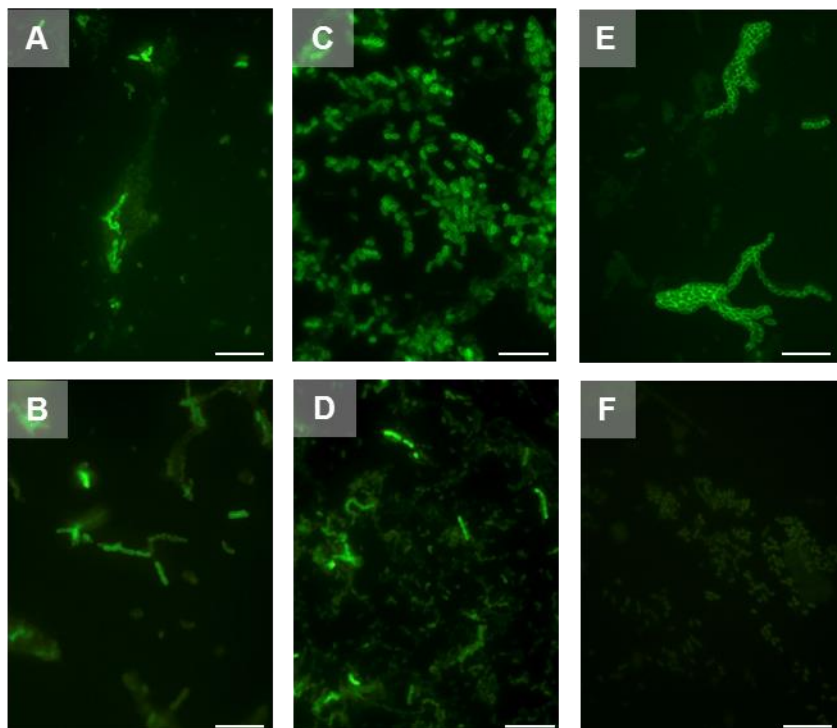


Abb. 36: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der EibG-Expression in verschiedenen *eibG*-positiven Klonen mit und ohne IPTG-Induktion.

Die Teilabbildungen A bis F zeigen folgende Stämme (*eibG*-Typ, IPTG-Induktion, Belichtungszeit): **(A)** B-1-10 (*eibG*- α , IPTG, 770 ms); **(B)** B-1-10 (*eibG*- α , kein IPTG, 356 ms); **(C)** B-20-1 (*eibG*- β , IPTG, 201 ms); **(D)** B-20-1 (*eibG*- β , kein IPTG, 405 ms); **(E)** 06-03233 (*eibG*- β , kein IPTG, 626 ms), Positivkontrolle; **(F)** B21 (DE3) (*eibG*-negativ, kein IPTG, 673 ms). Balken = 10 μ m, Detektion mit humanem IgG Fc – Alexa 488.

EibG-exprimierende BL21(DE3) – Klone bilden auf der Bakterienoberfläche IgG Fc – bindendes EibG in ähnlichem Ausmaß wie die Wildtypen. Dies wird durch den Vergleich von Aufnahmen mit mittlerer Belichtungszeit der Klone (Abb. 36 A bis D), die bei ca. 500 ms liegt, mit der Belichtungszeit der Positivkontrolle (Abb. 36 E, 626 ms; Mittelwert weiterer WT-Aufnahmen liegt bei ca. 750 ms) erkennbar.

4.4 VERÄNDERUNG DER EIBG-EXPRESSION VON WT-STÄMMEN DURCH VERSCHIEDENE KULTIVIERUNGS-BEDINGUNGEN

Da Umwelteinflüsse die Expression von bakteriellen Oberflächenstrukturen verändern können, wurden im folgenden Teil der Arbeit die Kultivierungsbedingungen variiert, um eventuelle Veränderungen in der EibG-Expression von WT-Stämmen nachzuweisen. Dabei wurde auf Bindungsstudien mit intestinalen Epithelzellen verzichtet, um die phänotypischen Veränderungen *eibG*-positiver Stämme unabhängig von einer zellulären Interaktion vergleichen zu können.

4.4.1 Kultivierung *eibG*-positiver Stämme in Minimalmedium M9

Durch den Einsatz von Minimalmedium M9 (vgl. Kapitel 3.1.1) wurde die mögliche Beeinflussung der EibG-Expression durch proteinogene Komponenten während der *E. coli* – Kultivierung, was durch die Supplementierung von Hefe- und Pepton-Extrakte im LB-Medium nicht auszuschließen ist, vermieden. **Abb. 37** zeigt licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen *eibG*-positiver STEC nach 20 h Inkubation in M9-Medium bei 0 und 180 rpm.

Bei der Betrachtung der Spalten 1 und 2 der Abb. 37 (180 rpm) fällt auf, dass das Fehlen proteinogener Mediumkomponenten bei Schüttelkulturen zu verkürzten bakteriellen Ketten führt (vgl. auch mit Abb. 31). Während der fluoreszenzmikroskopischen Analysen war es besonders schwer, intensiv fluoreszierende bakterielle Ketten zu finden, was auf eine schwächere Expression von IgG Fc – bindenden Strukturen auf der Bakterienoberfläche hindeutet. Die Kettenausbildung wurde durch die *E. coli* – Stämme jedoch nicht gänzlich eingestellt, sondern nur stark verringert. Bei nicht geschüttelter Kultivierung (Spalten 3 und 4, 0 rpm) treten jedoch während der Kultivierung in Minimalmedium sehr lange Bakterienketten auf. Dies läßt den Schluss zu, dass das Fehlen proteinogener Substrate nicht zu einer Kettenlimitierung führt, sondern dass offenbar die Scherkräfte in geschüttelten Kulturen CLAP-Muster beeinflussen und dass eine Schüttelkultivierung in Minimalmedium Kettenverkürzungen in beiden *E. coli* WT-Stämmen hervorrufen kann.

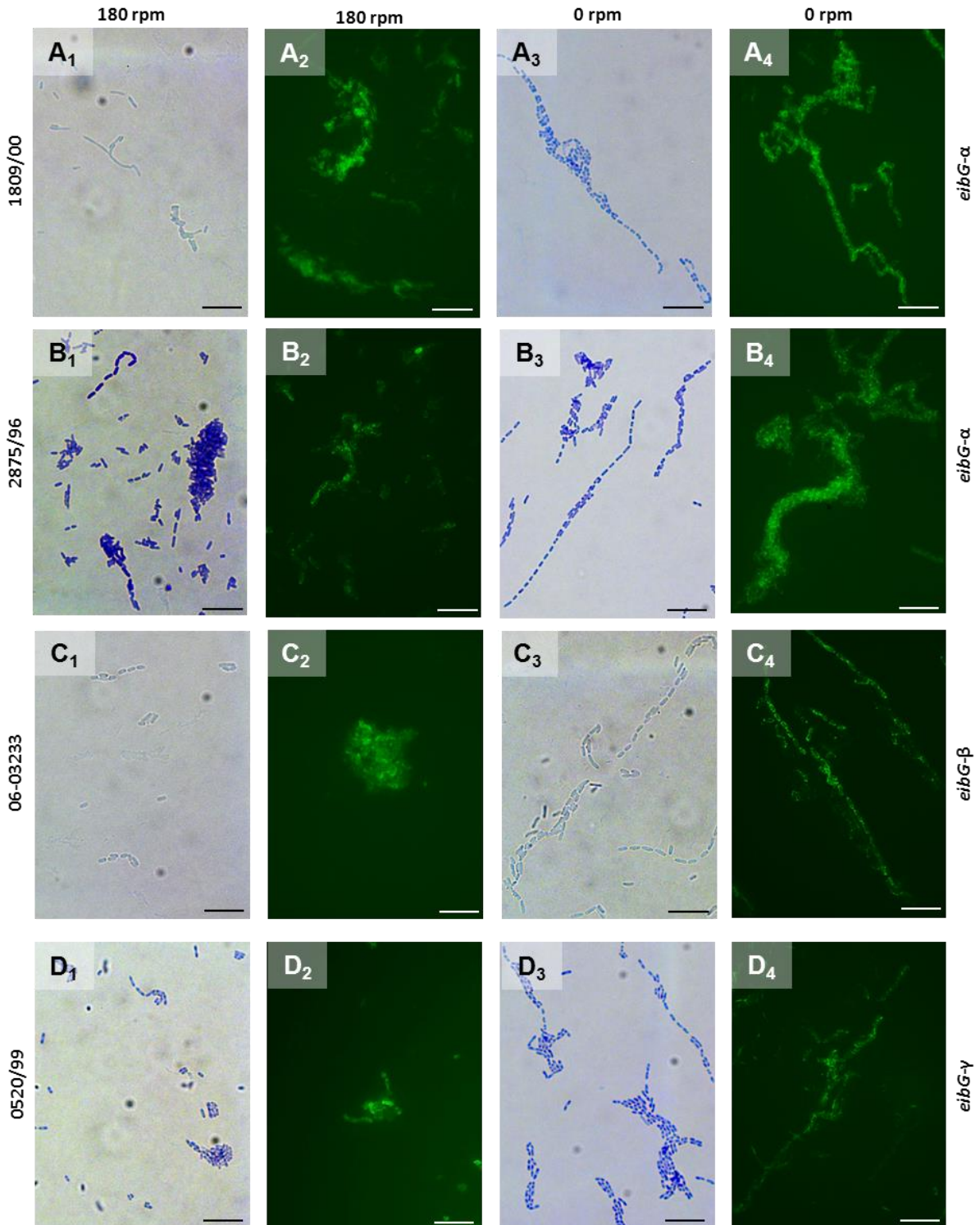


Abb. 37: Unterschiede in der Kettenausbildung *eibG*-positiver STEC in Minimalmedium M9 bei geschüttelten und stationären Kultivierungsbedingungen.

Lichtmikroskopische (LM) und fluoreszenzmikroskopische (FM) Untersuchung. In den Teilabbildungen A bis D sind folgende Stämme gezeigt (Stamm Nr., *eibG*-Typ und *eibG*-Allel): **(Reihe A)** 1809/00 (O91:H14 [H14], *eibG*- α , 001); **(Reihe B)** 2875/96 (O91:H14 [H14], *eibG*- α , 016); **(Reihe C)** 06-03233 (O152:H⁻ [H14], *eibG*- β , 020); **(Reihe D)** 0520/99 (Ont:H30, *eibG*- γ , 021); **(Spalte 1)** LM, 180 rpm; **(Spalte 2)** FM, 180 rpm, mittlere Belichtungszeit ca. 800 ms; **(Spalte 3)** LM, 0 rpm; **(Spalte 4)** FM, 0 rpm, mittlere Belichtungszeit ca. 700 ms. Balken = 10 μ m, Detektion mit humanem IgG Fc – Alexa 488 und Giemsa-Färbung.

4.4.2 EibG-Expression bei geschüttelten und stationären Kulturen in LB-Medium

Um den Einfluss proteinogener Mediumkomponenten auf die Ausbildung bakterieller Ketten bei *E. coli* weiter zu analysieren, wurden die gleichen *eibG*-positiven STEC-Stämme wie im M9-Versuch (Kapitel 4.4.1) in LB-Medium unter geschüttelten und nicht geschüttelten Bedingungen kultiviert. **Abb. 38** zeigt die licht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen *eibG*-positiver STEC nach 20 h Kultivierung in LB-Medium. Sowohl die geschüttelten (Spalte 1 und 2) als auch die nicht geschüttelten Kulturen (Spalten 3 und 4) zeigen eine starke Kettenausbildung, wobei die Ketten in den nicht geschüttelten Kulturen wesentlich länger sind und das Ausmaß an Verzweigungen wesentlich stärker ausgeprägt ist im Vergleich zu den geschüttelten Kulturen. Die mittlere Belichtungszeit der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (Spalten 2 und 4) beträgt bei stationärer Kultivierung ca. 550 ms, wohingegen die der geschüttelten Kulturen bei ca. 700 ms liegt. Somit kann auch auf eine höhere Expression an IgG Fc – bindenden Einheiten bei nicht geschüttelten Kulturen geschlossen werden.

Auffällig ist der *eibG*- γ Stamm (0520/99, Zeile D der Abb. 38), welcher bei vorherigen Experimenten eher kurze Ketten ausgebildet hat, bei 0 rpm hingegen ähnlich den beiden *eibG*- α Stämmen (1800/99 und 2875/96, Zeilen A und B) CLAP mit sehr langen Ketten ausbildet. Aufgrund der Ergebnisse mit diesem Stamm und der extremen Kettenverlängerung der CLAP bei anderen *eibG*-positiven Stämmen kann die stationäre Kultivierung dieser *E. coli* – Stämme als der eigentliche Grund für diese phänotypische Veränderung angesehen werden. Die stationäre Kultivierung löst wahrscheinlich eine Veränderung in den Regulationsmechanismen bei *E. coli* aus, welche im Fall von *eibG*-positiven Stämmen zu einer verstärkten Ausbildung von kettenartigen Agglomeraten führt. Fehlende Scherkräfte bei stationärer Kultivierung wirken sich offenbar günstig auf die Ausbildung von Aggregationen aus. Jedoch wurde in der stationären Kultivierung ein Parameter identifiziert, der bislang noch unbekannt regulatorische Prozesse in *E. coli* – Zellen steuert und zudem sehr einfach zu handhaben ist. Die Negativkontrollen (1745/98, O91:H21, *eibG*-negativ) bei diesen Experimenten zeigten sowohl in M9-Medium als auch in LB-Medium bei 0 und bei 180 rpm keine Kettenausbildung (nicht gezeigte Daten).

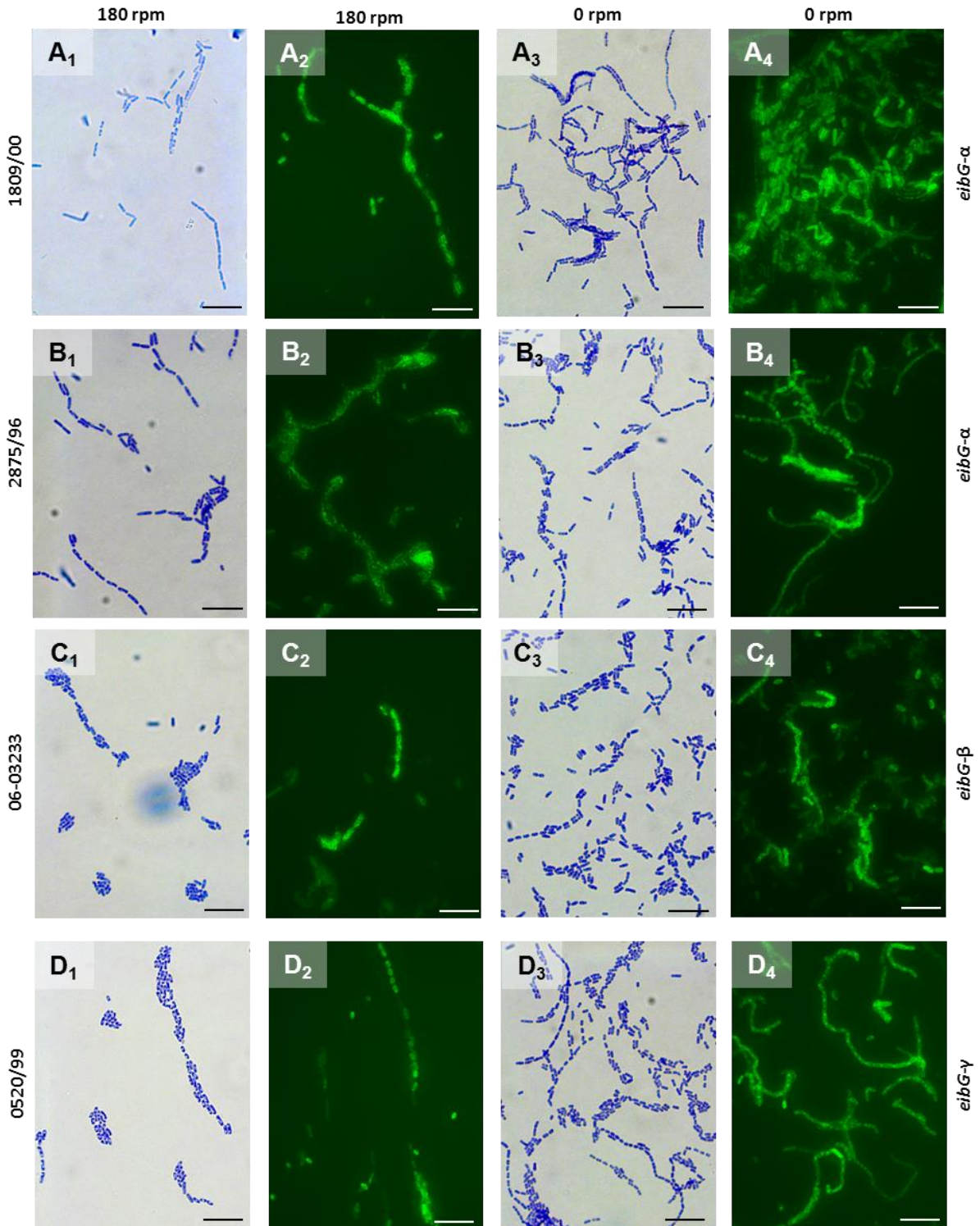


Abb. 38: Unterschiede in der Kettenausbildung *eibG*-positiver STEC in LB-Medium bei geschüttelten und stationären Kultivierungsbedingungen.

Lichtmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchung. In den Teilabbildungen A bis D sind folgende Stämme gezeigt (Stamm Nr., *eibG*-Typ und *eibG*-Allel): **(Reihe A)** 1809/00 (O91:H14 [H14], *eibG*- α , 001); **(Reihe B)** 2875/96 (O91:H14 [H14], *eibG*- α , 016); **(Reihe C)** 06-03233 (O152:H⁻ [H14], *eibG*- β , 020); **(Reihe D)** 0520/99 (Ont:H30, *eibG*- γ , 021); **(Spalte 1)** LM, 180 rpm; **(Spalte 2)** FM, 180 rpm, mittlere Belichtungszeit ca. 700 ms; **(Spalte 3)** LM, 0 rpm; **(Spalte 4)** FM, 0 rpm, mittlere Belichtungszeit ca. 550 ms. Balken = 10 μ m, Detektion mit humanem IgG Fc – Alexa 488 und Giemsa-Färbung.

4.4.3 Adhäsion *eibG*-positiver Wildtypen und Klone an humane intestinale Epithelzellen nach geschüttelter und stationärer Bakterienkultivierung

Mit diesen Adhäsionsstudien galt es, die zellulären Interaktionen von *eibG*-positiven Wildtypen und Klonen nach geschüttelter und stationärer Kultivierung mit intestinalen Epithelzellen zu untersuchen. In **Abb. 39** sind Adhäsionsassays von *eibG*-positiven Wildtypen (Spalten 1 und 2) und der Klone (Spalten 3 und 4) auf humanen intestinalen Epithelzellen (HCT-8) als lichtmikroskopische Aufnahmen dargestellt. Im Unterschied zu den vorherigen Bindungsassays wurde die Inkubationszeit von *E. coli* auf den Epithelzellen von drei Stunden auf eine Stunde reduziert, um wirklich stark bzw. schnell adhärierende Bakterien auf den Epithelzellen zu erfassen.

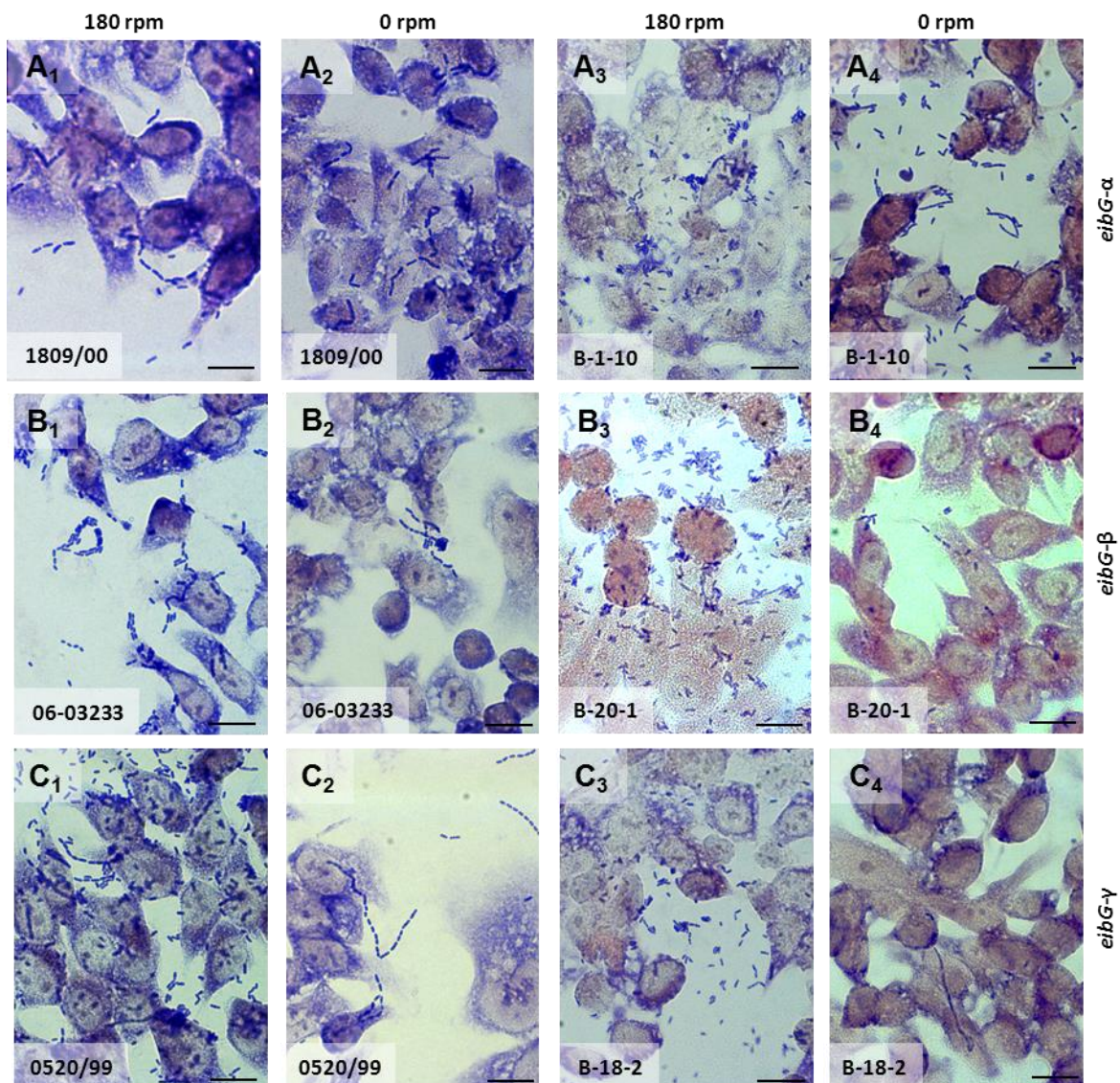


Abb. 39: Adhäsion *eibG*-positiver Wildtypen und Klone an humane intestinale Epithelzellen (HCT-8) bei geschüttelten und stationären Kultivierungsbedingungen.

Die Teilabbildungen A bis C zeigen folgende Stämme: (A₁ und A₂) 1809/00 (*eibG*-α); (A₃ und A₄) B-1-10 (*eibG*-α); (B₁ und B₂) 06-03233 (*eibG*-β); (B₃ und B₄) B-20-1 (*eibG*-β); (C₁ und C₂) 0520/99 (*eibG*-γ); (C₃ und C₄) B-18-2 (*eibG*-γ); (Spalte 1 und 3) 180 rpm; (Spalte 2 und 4) 0 rpm; Balken = 20 µm, Giemsa-Färbung.

Somit sollten durch die verkürzte Inkubationszeit der Bakterien mit den Epithelzellen nur diejenigen Bakterien nachgewiesen werden, welche auf ihren Oberflächen genug Adhäsionsfaktoren ausbilden,

um fest an die Epithelzellen anhaften zu können. Diese Reduktion der Adhäsionszeit auf eine Stunde führte auch zum Nachweis von kürzeren bakteriellen Ketten, wobei nur Bakterien mit ausreichender Anzahl an Adhäsionsfaktoren in dieser Zeit an die Epithelzellen anhaften konnten. In allen Teilabbildungen sind daher nur CLAP mit kurzen bis mittellangen Ketten zu sehen. Um die Rezeptorenausbildung der Epithelzellen nicht durch undefinierte Faktoren zu beeinflussen, wurde bei den Adhäsionstests auf die Zugabe von FBS-Gold (fötales Rinderserum) verzichtet. Verglichen mit den Adhäsionsassays, bei denen FBS-Gold im Medium vorhanden war und bei denen die Adhäsionszeit drei Stunden betrug (Kapitel 4.2.1 und Abb. 29), sind bei verkürzter Adhäsionszeit und Weglassen von Serum die Ketten aller *eibG*-positiven STEC wesentlich kürzer (Abb. 39). Trotzdem besitzen die *eibG*-positiven Wildtypen und auch die *eibG*-positiven Klone weiterhin die Fähigkeit zur Kettenausbildung. Da das Fehlen von FBS die Konzentration von exprimierten Rezeptoren auf der Oberfläche von HCT-8 und deren Konfiguration verändern könnte, aber offensichtlich nicht deren kompletten Rückgang verursacht, kann die Kettenlängenverkürzung ursächlich auf die verringerte Inkubationsdauer zurückgeführt werden. Dabei besitzen einzelne Bakterien und Bakterien in kürzeren Ketten anscheinend mehr Adhäsionsfaktoren pro Zelle für die Anhaftung an Epithelzellen als die Bakterien in den langen Ketten, welche z. B. bei der stationären Kultivierung gebildet werden (vgl. mit Abb. 38).

Demnach führt eine stationäre Kultivierung zu einer erhöhten Expression von Molekülen, die zwar eine Kettenausbildung begünstigen, nicht aber gleichzeitig die Adhäsion an intestinale Epithelzellen vermitteln. Da der Rückgang adhäsionsvermittelnder Faktoren in bestimmten Phasen der Biofilmbildung bei Bakterien bekannt ist (vgl. Kapitel 1.5), wurde im Folgenden die Biofilmbildung bei *eibG*-positiven *E. coli* untersucht.

4.5 BIOFILMAUSBILDUNG

In den folgenden Experimenten wurden einerseits Biofilmformationen auf der Oberfläche des LB-Mediums in stationären Flüssigkulturen mit denen am Gefäßboden verglichen und andererseits der zeitliche Ablauf der Biofilmbildung durch *eibG*-positive *E. coli* in Mikrotiterplatten bestimmt (Silagyi *et al.*, 2009).

4.5.1 Vergleich des Gefäßboden-assoziierten Biofilms mit dem Mediumoberflächen-assoziierten Flocken-Biofilm in stationärer Kultur

Bei stationärer Kultivierung wurde neben der Ausbildung von flockenartigen *E. coli* – Agglomeraten am Gefäßboden auch ein membranartiger Biofilm auf der Mediumoberfläche der nicht geschüttelten Kultur beobachtet (Schlämme). Da die O₂-Konzentration in der oberflächennahen Kulturbrühe viel höher ist als am Gefäßboden, wirkt sich der unterschiedliche Sauerstoffpartialdruck sehr wahrscheinlich nachhaltig auf den Stoffwechsel der Bakterien aus und kann auch die Biosynthese von Zellstrukturen wie LPS oder weiterer Adhäsionsmoleküle betreffen. Somit wurde die *EibG*-vermittelte Ausbildung der CLAP-Muster in Oberflächen- und Gefäßbodenagglomeraten überprüft. Ein Vergleich der licht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der beiden Biofilmarten ist in **Abb. 40** dargestellt.

Am Gefäßboden und an der Oberfläche des LB-Mediums wurden sehr ähnliche Kettenausbildungen bzw. Clusterformationen beobachtet. Die mittlere Belichtungszeit der FM-Aufnahmen des Boden-

assoziierten Biofilms ist etwas niedriger (546 ms) als die des Oberflächenbiofilms (639 ms), wobei aber keine wesentlichen Unterschiede in der Ausbildung IgG Fc – bindender Strukturen zu sehen sind.

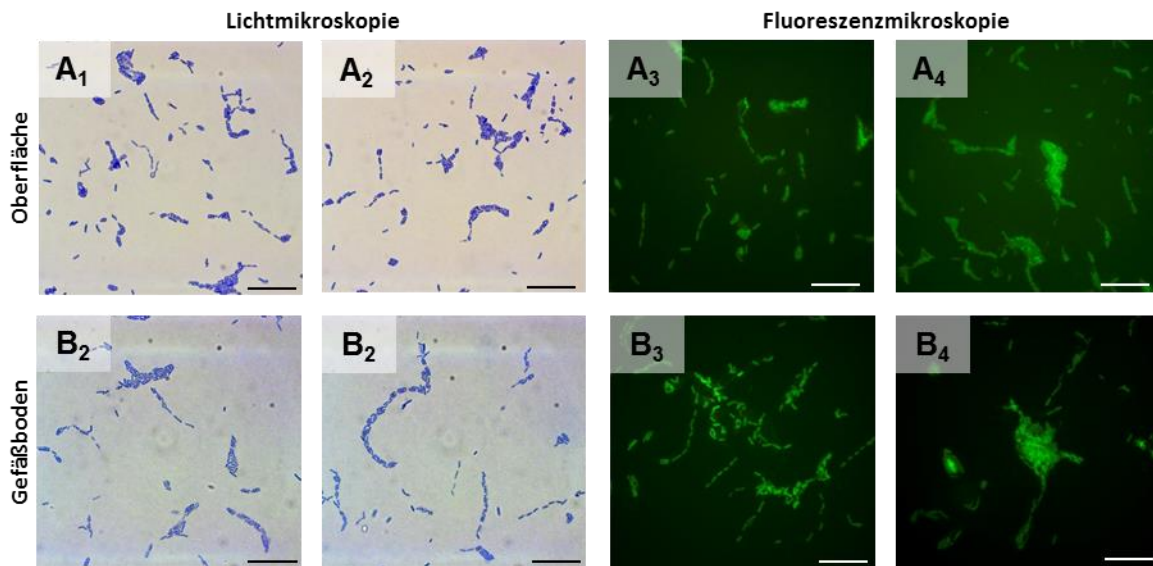


Abb. 40: Phänotypischer und immunhistologischer Vergleich von Oberflächen- und Gefäßbodenbiofilmen aus einer stationären Kultivierung des Stammes 1809/00 (*eibG- α*).

Fixierung nach 20 h Inkubation. (**Reihe A**) Mediumoberflächen-assoziiierter Biofilm; (**Reihe B**) Gefäßboden-assoziiierter Biofilm; (**Spalten 1 und 2**) LM-Aufnahmen; (**Spalten 3 und 4**) FM-Aufnahmen; (A₃ und A₄) mittlere Belichtungszeit 639 ms, (B₃ und B₄) mittlere Belichtungszeit 546 ms. Balken = 20 μ m, Detektion mit humanem IgG Fc – *Alexa 488* und Giemsa-Färbung.

Verschiedene O₂-Partialdrücke in stationärer Kultur haben somit keinen großen Einfluss auf die Kettenausbildung oder die Expression von IgG Fc – bindenden Strukturen auf der *E. coli* – Oberfläche.

4.5.2 Biofilmbildung *eibG*-positiver STEC in stationärer und geschüttelter Kultur

Die Zielsetzung der in diesem Kapitel beschriebenen Experimente richtete sich auf den Nachweis möglicher Unterschiede in der Biofilmbildung bei stationärer und geschüttelter Kultivierung *eibG*-positiver STEC. In **Abb. 41** bis **Abb. 43** sind LM-Aufnahmen von drei in MTP immobilisierten *eibG*-positiven Wildtypen nach 6, 12 und 24 h Kultivierung bei 0 und 180 rpm dargestellt. Um in etwa Standardbedingungen bei den Aufnahmen einzuhalten, wurden diese immer an der gleichen Position in den jeweiligen MTP-*wells* gemacht.

Das Hauptaugenmerk wurde bei diesen Versuchen nicht auf die Morphologie einzelner Bakterien gelegt, sondern auf deren Aggregation auf einer abiotischen Oberfläche und das Vorhandensein von Exopolysaccharid (EPS)-Strukturen. Eine Zunahme an extrazellulärer Matrix wird bei 20-facher Vergrößerung der Giemsa-Färbung an diffuser werdenden Umrissen der einzelnen Bakterien und an der dunkleren Färbung der bakteriellen Umgebung sichtbar. Da hier keine Deckgläser und kein Mounting-Medium verwendet wurden, schwillt die EPS-Matrix durch Aufnahme von Wasser aus der Luft an. Die Aufnahme von Luftfeuchtigkeit wurde durch eine 10 minütige Behandlung bei 80 °C vor jeder mikroskopischen Untersuchung vermindert. Bei den folgenden Abbildungen erscheint der Hintergrund grau bis dunkelblau, was auf die Verwendung handelsüblicher MTP mit für die Mikroskopie eher ungeeigneten Brechungsindizes zurückzuführen ist.

Bei Betrachtung der Aufnahmen des Stammes 1809/00 (*eibG- α* , Abb. 41) fällt auf, dass bei stationärer Kultivierung die EPS-Strukturen schon nach 6 h stark ausgebildet sind (Abb. 41 D) und dass die Bakterienzahl innerhalb dieser Matrix bis zum Ende der Kultivierung nach 24 h kontinuierlich zunimmt. Die bei 180 rpm kultivierten *E. coli* konnten selbst nach 24 h (Abb. 41 C) keine großen Verzweigungen ausbilden, und die Menge an extrazellulärer Matrix erreichte bei Weitem nicht das Ausmaß wie bei der stationären Kultivierung.

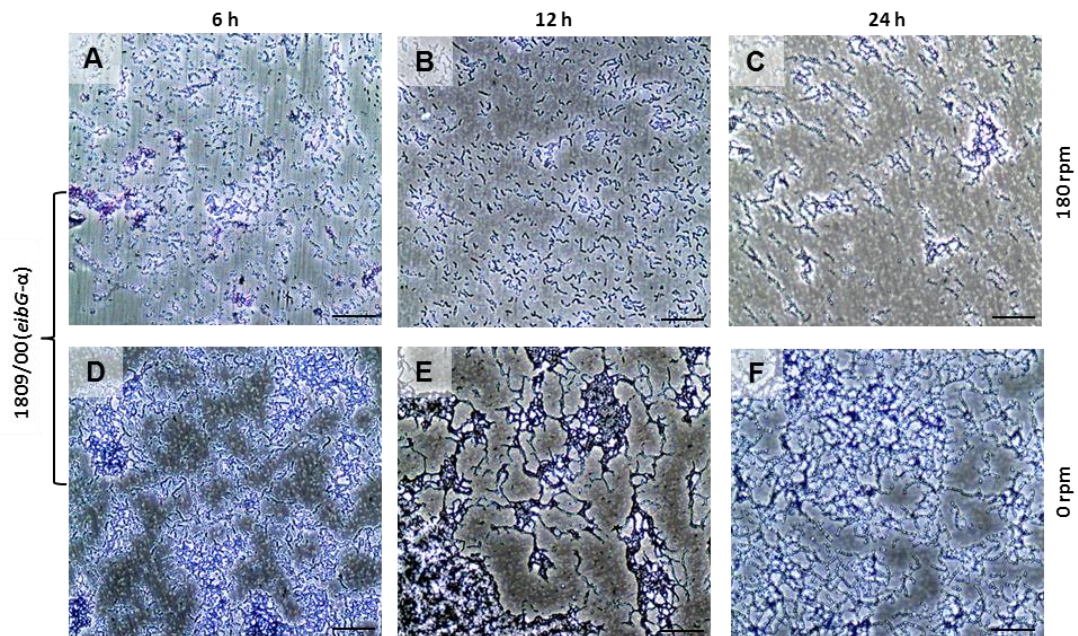


Abb. 41: Biofilmbildung des STEC-Stammes 1809/00 (O91:H14, *eibG- α*) bei geschüttelter und stationärer Kultivierung in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit.

(A, B und C) Aufnahmen nach 6, 12 und 24 h Kultivierung bei 180 rpm; (D, E und F) Aufnahmen nach 6, 12 und 24 h Kultivierung bei stationärer Kultivierung. Balken = 20 μ m, Giemsa-Färbung, LM, 20-fache Vergrößerung.

Die Ausbildung von EPS des Stammes 06-03233 (*eibG- β* , Abb. 42) wies nach 6 h der Kultivierung sowohl bei geschüttelten als auch bei stationären Kultivierungsbedingungen ein fortgeschrittenes Stadium auf. Nach 12 h konnte eine starke Abnahme der EPS-Menge bei 180 rpm, aber eine leichte Zunahme bei 0 rpm beobachtet werden. Nach 24 h nahm auch bei stationärer Kultivierung das Volumen an EPS ab, und bei beiden Kultivierungsarten war eine Zunahme der CLAP zu sehen.

Die Biofilmbildung des *eibG- α* Stammes (1809/00) ähnelte der des Stammes 0520/99 (*eibG- γ* , Abb. 43). Bei stationärer Kultivierung wurde ein hoher Gehalt an EPS in einem ausgeprägten Stadium beobachtet, welches auch nach 12 h und nach 24 h relativ konstant blieb und sich nicht weiter veränderte. Allerdings nahm bei 180 rpm das anfängliche Volumen der EPS-Matrix nach 12 h stark ab, und nach 24 h hatten lediglich die Zellzahl und Kettenlängen in den CLAP zugenommen.

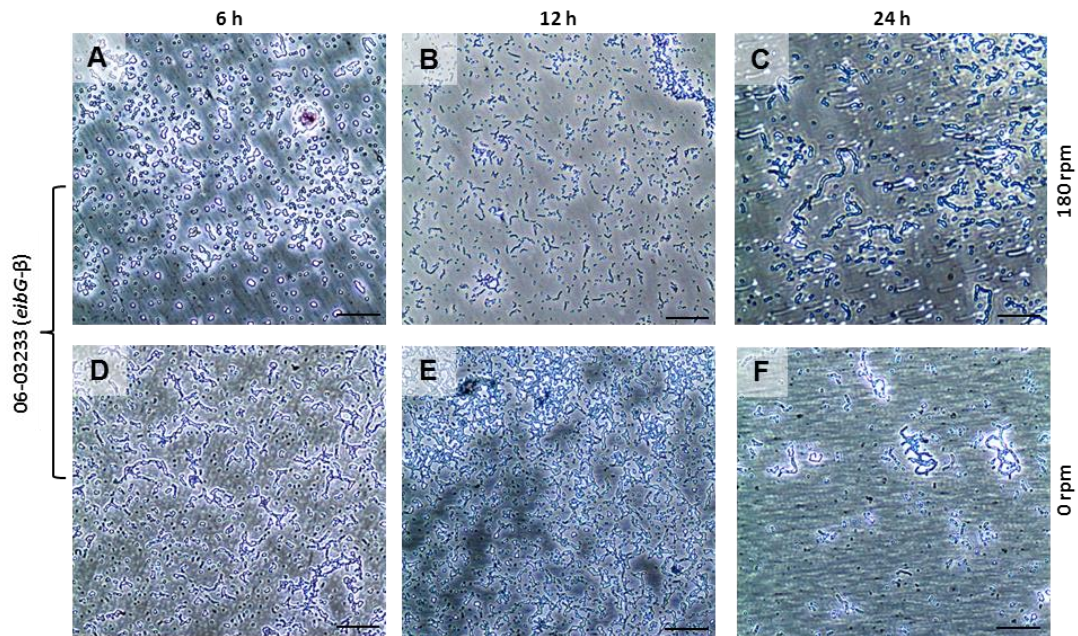


Abb. 42: Biofilmbildung des STEC-Stammes 06-03233 (O152:H⁻, *eibG-β*) bei geschüttelter und stationärer Kultivierung in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit.

(A, B und C) Aufnahmen nach 6, 12 und 24 h bei 180 rpm; (D, E und F) Aufnahmen nach 6, 12 und 24 h bei stationärer Kultivierung; Balken = 20 µm, Giemsa-Färbung, LM, 20-fache Vergrößerung.

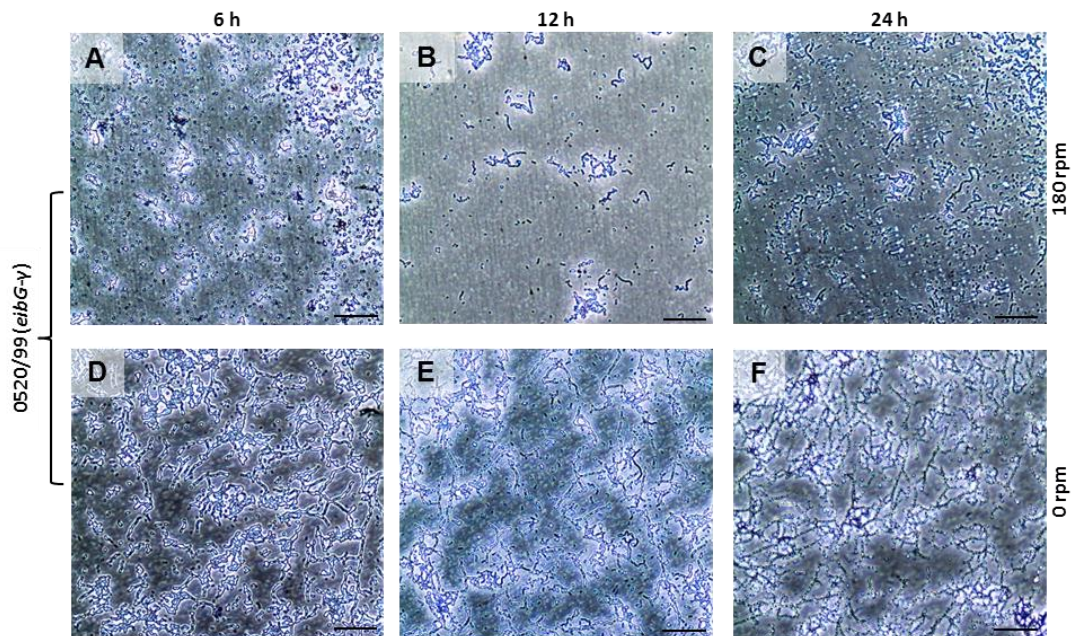


Abb. 43: Biofilmbildung des STEC-Stammes 0520/99 (Ont:H30, *eibG-γ*) bei geschüttelter und stationärer Kultivierung in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit.

(A, B und C) Aufnahmen nach 6, 12 und 24 h bei 180 rpm; (D, E und F) Aufnahmen nach 6, 12 und 24 h bei stationärer Kultivierung; Balken = 20 µm, Giemsa-Färbung, LM, 20-fache Vergrößerung.

4.5.3 Biofilmbildung *eibG*-positiver Klone in stationärer und geschüttelter Kultur

Als nächstes wurde die EibG-vermittelte Biofilmbildung mit den *eibG*-positiven Klonen unter identischen Bedingungen wie für die STEC-Wildtypstämme durchgeführt (Abb. 44 bis Abb. 46).

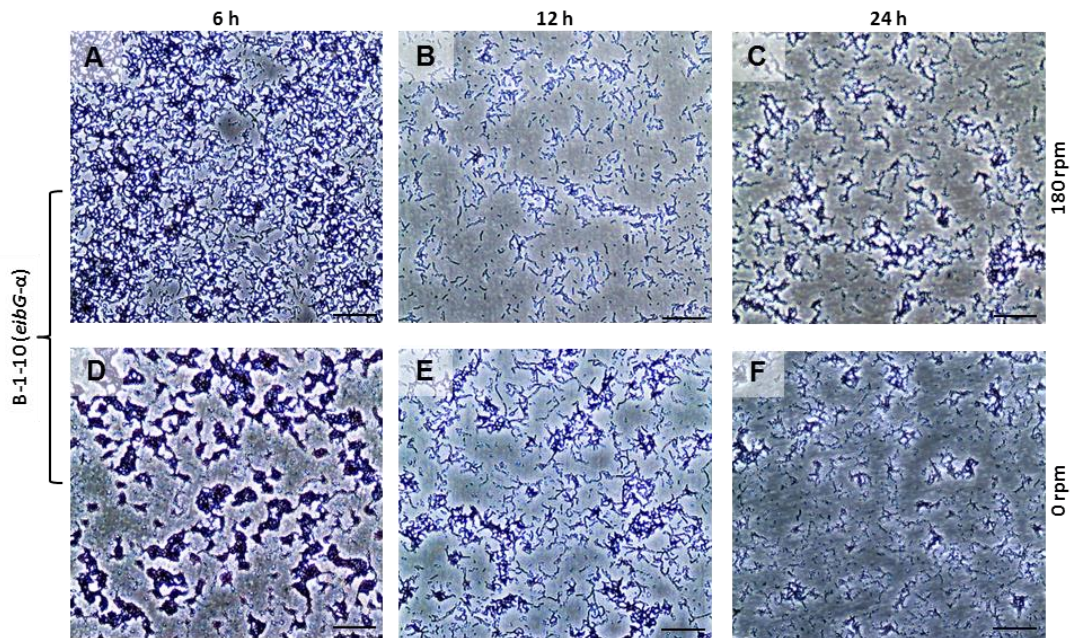


Abb. 44: Biofilmbildung des *eibG*-positiven Klons B-1-10 (*eibG-α*) bei geschüttelter und stationärer Kultivierung in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit.

(A, B und C) Aufnahmen nach 6, 12 und 24 h bei 180 rpm; (D, E und F) Aufnahmen nach 6, 12 und 24 h bei stationärer Kultivierung; Balken = 20 μ m, Giemsa-Färbung, LM, 20-fache Vergrößerung.

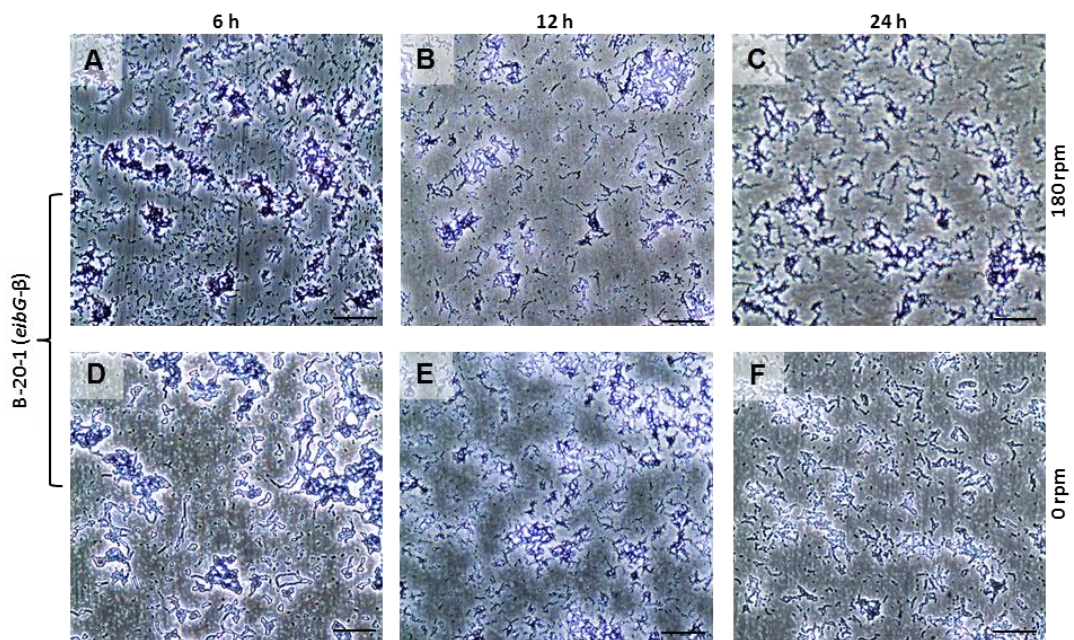


Abb. 45: Biofilmbildung des *eibG*-positiven Klons B-20-1 (*eibG-β*) bei geschüttelter und stationärer Kultivierung in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit.

(A, B und C) Aufnahmen nach 6, 12 und 24 h bei 180 rpm; (D, E und F) Aufnahmen nach 6, 12 und 24 h bei stationärer Kultivierung; Balken = 20 μ m, Giemsa-Färbung, LM, 20-fache Vergrößerung.

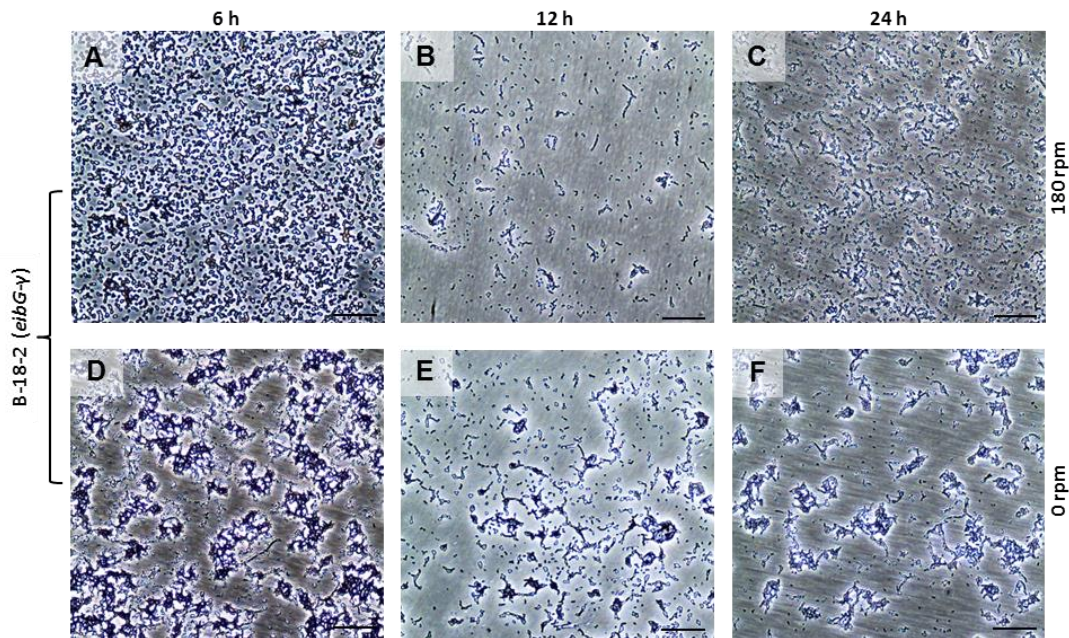


Abb. 46: Biofilmbildung des *eibG*-positiven Klons B-18-2 (*eibG*- γ) bei geschüttelter und stationärer Kultivierung in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit.

(A, B und C) Aufnahmen nach 6, 12 und 24 h bei 180 rpm; (D, E und F) Aufnahmen nach 6, 12 und 24 h bei stationärer Kultivierung; Balken = 20 μ m, Giemsa-Färbung, LM, 20-fache Vergrößerung.

Alle Klone wiesen nach 6 h Kultivierung stark verzweigte Ketten mit einem hohen EPS-Gehalt auf (Abb. 44, Abb. 45 und Abb. 46, Teilabbildungen A und D). Dieser Befund konnte unabhängig von der Kultivierungsart beobachtet werden und kann durch die zuvor eingeleitete starke EibG-Expression mittels IPTG-Induktion erklärt werden. Das Ausmaß an EPS-Matrix nahm bei allen Klonen nach 12 h Kultivierung wieder ab (Abb. 44 bis Abb. 46, Teilabbildungen B und C), wobei diese Abnahme in der stationären Kultur (0 rpm) etwas geringer ausfiel als in der Schüttelkultur bei 180 rpm. Nach 24 h erhöhte sich die Bakterienzahl und die EPS-Matrix gewann wieder etwas mehr an Volumen (Abb. 44 bis Abb. 46, Teilabbildungen C und E). Diese Veränderungen wurden bei allen drei *eibG*-Typen beobachtet.

Demnach bewirkt die IPTG-induzierte EibG-Expression unabhängig vom *eibG*-Typ zunächst eine erhöhte EPS-Expression und verstärkt die Biofilmbildung von *E. coli*. Die Wirkung von IPTG geht nach einigen Stunden der Kultivierung durch die Bindung an den T7-Promoter im Zuge sich immer weiter vermehrender Bakterien zurück, wobei auch die EibG-Expression stark abnimmt. Mit fortschreitender Kultivierung wird somit immer weniger EibG exprimiert und die EPS-Synthese geht ebenfalls zurück. Die EibG-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion bei neugebildeten *E. coli* – Zellen nimmt mit dem Rückgang der EibG-Expression ebenfalls ab. Mit dem Anstieg an Biomasse nach 24 h Kultivierung, der damit einhergehenden Substratlimitierung und dem erhöhten CO₂-Gehalt wird die Biofilmmatrix wieder verstärkt aufgebaut, wobei die Kultivierungsart (geschüttelt bzw. stationär) offensichtlich keine große Rolle mehr spielt.

Im Vergleich zu den Klonen ist der Zeitverlauf der Expressionsstärke von EibG bei *eibG*-positiven WT-Stämmen grundsätzlich verschieden. Während die Menge an EibG bei den Wildtypen kontinuierlich mit dem Anstieg der Biomasse zunimmt, exprimieren EibG-Klone nach wenigen Stunden durch die IPTG-Induktion zunächst sehr viel EibG, dessen Konzentration pro Zelle dann aber im weiteren Kulturverlauf kontinuierlich abnimmt. Der EibG-vermittelte Zell-Zell-Kontakt veranlasst die Klonzellen

zu einer verstärkten Biofilmbildung. Bei abnehmendem Kontakt durch geringere Expression in den neu gebildeten *E. coli* verringern die Zellen die EPS-Sekretion und somit auch die Bildung von Biofilmmatrix.

Bei den WT-Stämmen hingegen erfährt die Biofilmmatrix einen kontinuierlichen Aufbau durch den EibG-vermittelten Zell-Zell-Kontakt, der unter stationären Kultivierungsbedingungen begünstigt wird. Der Anstieg der EibG-Konzentrationen, bedingt durch den Biomasseanstieg der Wildtypen, führt zu der beobachteten Kettenverlängerung, die bei stationärer Kultivierung weiterhin vom verstärkten Biofilmaufbau begleitet wird.

4.5.4 Auswirkung von Kollagen auf die Biofilmbildung *eibG*-positiver Wildtypstämme

Kollagen gehört zu den mengenmäßig vorherrschenden Proteinen in der extrazellulären Matrix vielzelliger Organismen. Zahlreiche Adhäsionsmoleküle pathogener Bakterien besitzen eine spezifische Bindungsdomäne für Kollagen (z. B. das YadA einiger *Yersinia*-Spezies). Durch die Beschichtung der MTP-wells mit Kollagen wurde die Bindungsfähigkeit *eibG*-positiver STEC-Stämme an Kollagen getestet. In **Abb. 47** sind Aufnahmen von vier *eibG*-positiven STEC auf kollagenbeschichtetem und kollagenfreiem Untergrund dargestellt.

Die Aufnahmen wurden nach einer stationären 12-stündigen Kultivierung gemacht, da aus den vorhergehenden Experimenten (Kapitel 4.5.2) schon bekannt war, dass zu diesem Zeitpunkt die Biofilmmatrix gut ausgebildet ist. Der Vergleich der Reihen 1 (kein Kollagen) mit Reihe 2 (Kollagenbeschichtung) zeigt, dass EPS in höheren Konzentrationen auf kollagenfreiem Untergrund produziert wird.

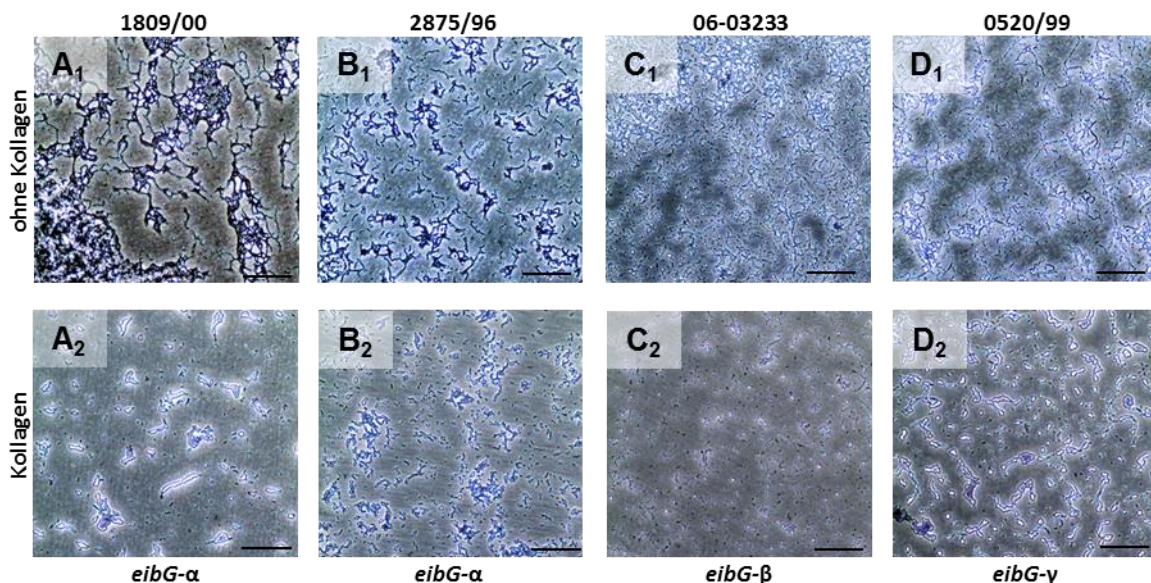


Abb. 47: Auswirkung von Kollagen auf die Biofilmbildung *eibG*-positiver STEC – Wildtypstämme nach 12 h stationärer Kultivierung.

(A₁ und A₂) 1809/00 (*eibG*- α); (B₁ und B₂) 2875/96 (*eibG*- α); (C₁ und C₂) 06-03233 (*eibG*- β); (D₁ und D₂) 0520/99 (*eibG*- γ); (Reihe 1) Keine Kollagenbeschichtung vor Bakterieneinsaat; (Reihe 2) Beschichtung mit Kollagen vor Bakterieneinsaat. Balken = 20 μ m, Giemsa-Färbung, LM, 20-fache Vergrößerung.

4.5.5 Kolorimetrische Quantifizierung der Biofilmbildung *eibG*-positiver Wildtypstämme und Klone

Da die phänotypische Betrachtung keine quantitativen Daten liefert und mikroskopische Vergleiche auf Ausschnitte des MTP-Bodens beschränkt sind, wurde die Ausbildung der Biofilme mittels eines kolorimetrischen Verfahrens vergleichend quantifiziert (vgl. Kapitel 3.4.3). Dabei wurde die Zelldichte nichtadhärierter Bakterien in einem ELISA-Reader bei 630 nm (OD_{630}) bestimmt, und adhärenzte *E. coli* – Zellen wurden mittels Kristallviolett-Färbung und anschließender Extinktionsmessung bei 570 nm (OD_{570}) erfasst. In **Abb. 48** werden vier *eibG*-positive WT-Stämme hinsichtlich ihrer Zellzahl und Ausbildung eines Biofilms auf kollagenfreiem und kollagenbeschichtetem Untergrund in geschüttelten und stationären Kulturen miteinander verglichen.

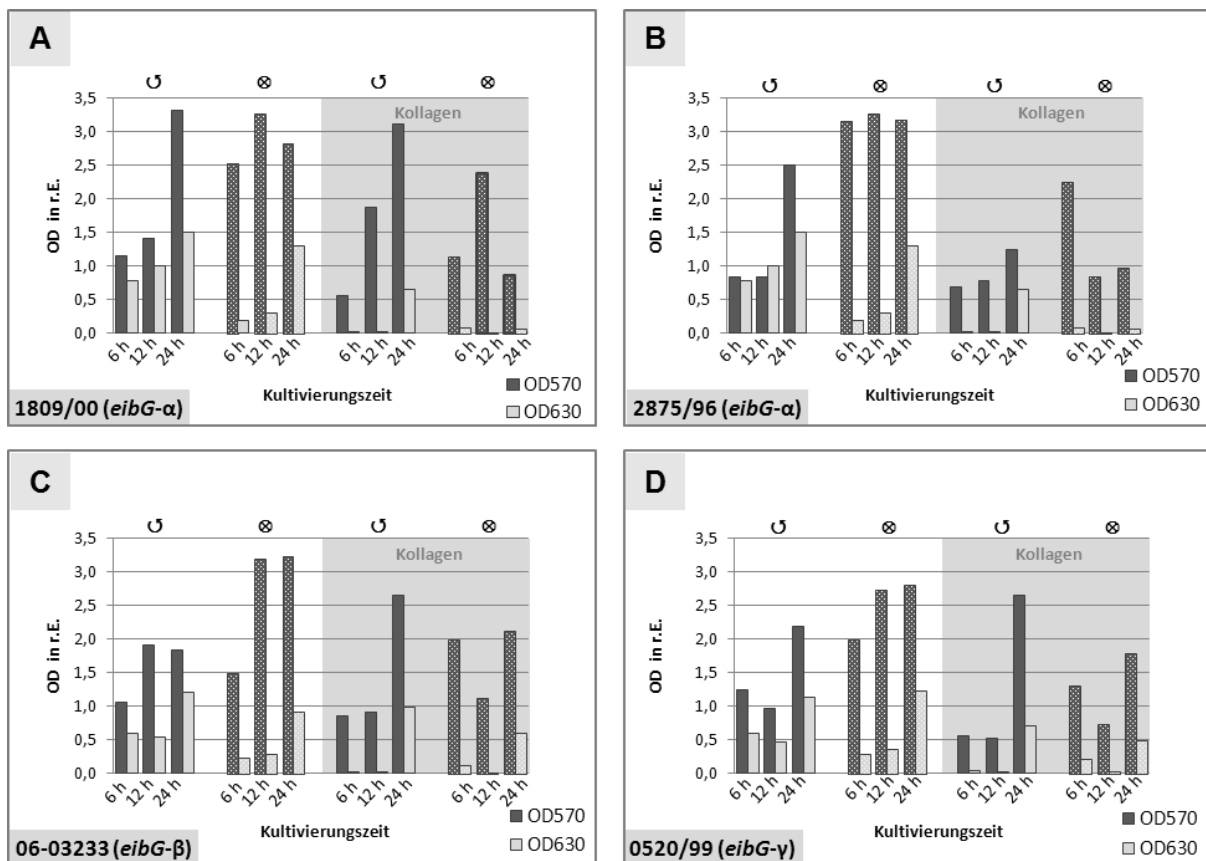


Abb. 48: Biofilmbildung im Verlauf einer 24-stündigen Kultivierung durch *eibG*-positive STEC in geschüttelter und stationärer Kultur.

Vergleich von kollagenbeschichteten zu kollagenfreien Oberflächen. **(A)** 1809/00 (*eibG*- α); **(B)** 2875/96 (*eibG*- α); **(C)** 06-03233 (*eibG*- β); **(D)** 0520/99 (*eibG*- γ); **(dunkle Balken)** OD_{570} , Biofilmbestimmung mit Kristallviolett-Färbung; **(einfarbiger Balkenhintergrund)** 180 rpm (U), **(punktiertes Hintergrund)** 0 rpm (X); **(helle Balken)** OD_{630} , Zellzahlbestimmung der Bakterien in der Suspension, **(einfarbiger Balkenhintergrund)** 180 rpm (U), **(punktiertes Hintergrund)** 0 rpm (X); **(grau-unterlegte Bereiche)** Kollagenbeschichtung vor der Zelleinsaat.

Generell fällt auf, dass die *E. coli* – Stämme unabhängig vom Kultivierungstyp (geschüttelt oder stationär) in den wells mit Kollagenbeschichtung langsamer und in geringerer Zellzahl wachsen als in den wells mit kollagenfreiem Untergrund (helle Balken). Da durch die OD_{630} -Messung die nichtadhärieren Bakterien detektiert werden, könnte die Annahme lauten, dass Bakterien an Kollagen binden und, obwohl sie eigentlich keinen Biofilm ausbilden, durch die OD_{630} -Messung nicht erfasst werden können. Die OD_{570} -Messungen (dunkle Balken) zeigen aber, dass die Zelldichte der adhärenzten *E. coli* – Zellen auf Kollagen entweder genauso hoch ist wie auf kollagenfreiem

Untergrund (vgl. Abb. 48 A, \cup) oder in den meisten Fällen geringer ausfällt. Jedoch adhären auf der Kollagenschicht bei stationärer Kultivierung schon recht früh (6 h) mehr *E. coli* – Zellen, als es bei geschüttelten Bedingungen mit und ohne Kollagen der Fall ist. Die stationäre Kultivierung beschleunigt somit die Adhäsion von *E. coli* an Kollagen; generell wachsen *E. coli* jedoch langsamer, wenn eine Kollagenbeschichtung vorliegt.

Beim Fehlen von Kollagen zeigt sich der stationäre Kultivierungsmodus bei allen *eibG*-positiven STEC als der günstigere für die Adhäsion und die Biofilmbildung (vgl. Abb. 48 A bis D, OD₅₇₀, ohne Kollagen, \otimes). Die Zelldichte adhärierter Zellen ist schon nach 6 h recht hoch und bleibt meist bis zur 24. Stunde auf ähnlichem Level. Dieser hohe Level wird von den geschüttelten Kulturen auch nach 24 h selten erreicht.

Die Beobachtungen der LM-Untersuchungen hinsichtlich des zeit- und kultivierungsartabhängigen Biofilmaufbaus (Kapitel 4.5.2) konnten mit den kolorimetrischen Vergleichen bestätigt werden: bei stationärer Kultivierung wird von *E. coli* schon sehr früh (nach 6 h) viel EPS auf abiotischem Untergrund gebildet; vergleichbare Konzentrationen an EPS werden bei geschüttelten Bedingungen erst nach 24 h erreicht. Diese Beobachtung gilt auch für die kollagen-beschichtete MTP-wells, wobei die Wachstumsgeschwindigkeit von *E. coli* hier etwas verlangsamt und insgesamt weniger Zellmasse produziert wird.

Abb. 49 zeigt den Vergleich der Biofilmbildung *eibG*-positiver Wildtypen und der Klone nach 12 h Kultivierung bei geschüttelten und stationären Bedingungen. Zu diesem Zeitpunkt überwiegen eindeutig die adhärten, biofilmbildenden *E. coli* – Zellen bei stationärer Kultivierung im Vergleich zur geschüttelten Kultur. Die OD₆₃₀-Messung zeigt auch, dass in der Schüttelkultur etwas höhere Zelldichten erzielt werden, was auf einen höheren O₂-Eintrag zurückzuführen ist. Unabhängig vom *eibG*-Subtyp erreichen bei stationärer Kultivierung sowohl WT- als auch Klon-Stämme ähnlich hohe Zelldichten adhäsionsfähiger Zellen.

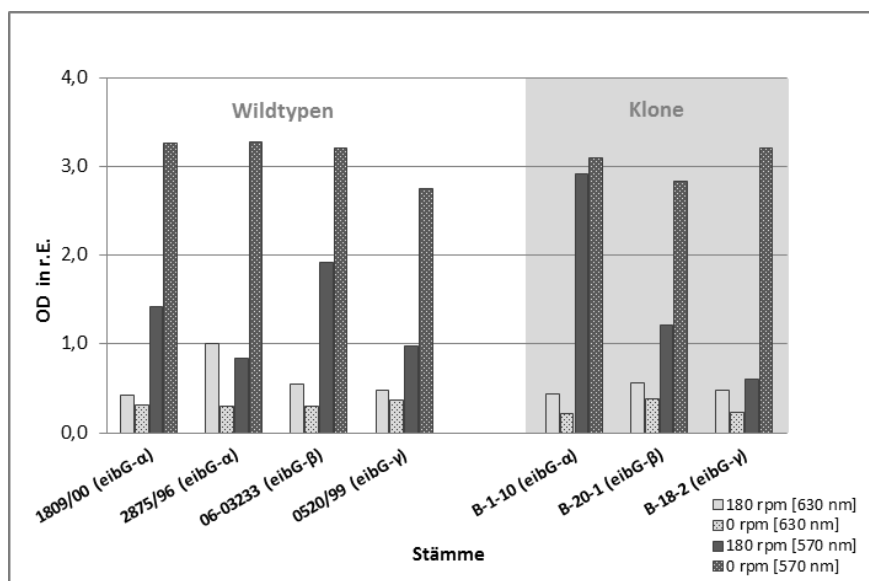


Abb. 49: Biofilmbildung von *eibG*-positiven Wildtypstämmen und Klonen nach 12 h Kultivierung unter geschüttelten und stationären Bedingungen.

Von links nach rechts sind OD-Werte folgender WT-Stämme dargestellt: 1809/00 (*eibG*- α); 2875/96 (*eibG*- α); 06-03233 (*eibG*- β); 0520/99 (*eibG*- γ); *eibG*-positive Klone: B-1-10 (*eibG*- α); B-20-1 (*eibG*- β); B-18-2 (*eibG*- γ); (**dunkle Balken**) OD₅₇₀, Biofilmbestimmung mit Kristallviolett färbung, (**gleichmäßige Füllung**) 180 rpm, (**punktierte Füllung**) 0 rpm; (**helle Balken**) OD₆₃₀, Zelldichtebestimmung der Bakterien in Suspension, (**gleichmäßige Füllung**) 180 rpm, (**punktierte Füllung**) 0 rpm.

Interessant ist die Biofilmbildung bei geschüttelter Kultivierung: generell ist diese niedriger als bei stationärer Kultivierung; die Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen sind aber unter Schüttelbedingungen sehr groß. Während bei den Wildtypen der *eibG*- β – Stamm (06-03233) die höchste Dichte an adhären, biofilmbildenden Zellen produziert, ist bei den Klonen eine eindeutige Abnahme an biofilmbildenden Zellen von *eibG*- α – bis hin zu *eibG*- γ – exprimierenden Klonen zu erkennen (dunkle Balken). Dieser Sachverhalt wurde durch die phänotypische LM-Analyse nicht erkannt, wodurch die Wichtigkeit komplementärer Methoden zur Mikroskopie, wie z. B. die Kolorimetrie, verdeutlicht wird.

Unterschiede in den Oberflächenstrukturen sind bei den WT-Stämmen wahrscheinlich der Grund für ein abweichendes Adhäsionsverhalten im Vergleich zu den Klonen und somit für eine Biofilmbildung im Kultivierungsverlauf. Das Fehlen der Flagellen beim *eibG*- β – Stamm (06-03233, O152:H⁻) verringert die Mobilität dieses Stammes und begünstigt dadurch die Adhäsion an die Oberflächen der MTP-*wells* und an benachbarte Zellen. Bei den Klonen entfallen solche Unterschiede und allein der *eibG*-Subtyp entscheidet über die Stärke des Zell-Zell-Kontakts und der damit einhergehenden Adhäsion an biotische und abiotische Oberflächen.

4.6 GELELEKTROPHORETISCHE ANALYSE EIBG-POSITIVER *E. COLI* – LYSATE

Durch die gelelektrophoretische (GE) Auftrennung von Lysaten *eibG*-positiver *E. coli* sollten die exprimierten mono- und multimeren Formen der EibG-Proteine visualisiert werden. Zudem erfolgte bei den im Folgenden beschriebenen Versuchen der EibG-Nachweis mittels SDS-PAGE und Westernblot (vgl. Kapitel 3.6.4), um die Expressionsrate und Konzentration von EibG in den Präparationen zu bestimmen.

4.6.1 Visualisierung von EibG mit humanem IgG Fc-HRP

Die Visualisierung von EibG und seinen Subtypen erforderte eine aufwändige und relativ langwierige Optimierung der SDS-PAGE – Parameter und des Proteinblotverfahrens. Unterschiedliche oligomere Formen von EibG und insbesondere die Hydrophobizität dieses Membranproteins erschwerten die Analyse, für die standardisierte Gelelektrophorese-Bedingungen. Da am Anfang dieser Arbeit noch nichts über die oligomere Formen von EibG bekannt war, mussten zunächst die optimalen Konzentrationen der Lysate, der Trennbereich für die SDS-PAGE, eine geeignete Trägermembran und die Parameter für das Blotting-Verfahren ermittelt werden. Sequenzierungsdaten ergaben für EibG das Fehlen von Cystein und damit die Ausschließung von Disulfidbrücken. Auf den Einsatz von reduzierenden Agenzien wurde aber trotzdem nicht verzichtet, da die reduktive Spaltung von Fremdproteinen eine bessere Trennung der EibG-Proteine ermöglichte. Die Detektion von EibG erfolgte auf der Blotmembran (Nitrocellulose) mittels humanem IgG Fc-HRP. Da das immobilisierte EibG-Protein den Antikörper über den Fc-Teil bindet und der Antikörper selbst nicht gegen das zu detektierende Protein gerichtet ist, musste die Bindungszeit beim Western-Blot von üblicherweise einer bis zwei Stunden auf über 16 h ausgedehnt werden. Um eine möglichst hohe Affinität von EibG zu IgG Fc zu gewährleisten, mussten die optimalen Inkubationsparameter (Pufferzusammensetzung, Einsatz von Detergenzien, Waschlösung und Waschdauer, Konzentrationen von IgG Fc-HRP, etc.) ebenfalls erst noch ermittelt werden.

Abb. 50 zeigt den mittels Western-Blot geführten Nachweis von EibG des WT-Stammes 1809/00 und des Klons B-1-10 mit identischem *eibG*- α – Allel (*eibG*-001) auf einer Nitrocellulosemembran. Die *E. coli* – Lysate wurden mit und ohne (*) reduzierendem Agens (2-Mercaptoethanol) im Probenpuffer auf 100 °C bzw. 60 °C (*) erhitzt und auf ein 10%iges SDS-PAGE – Gel aufgetragen. Während die Zugabe von 2-Mercaptoethanol sowohl beim WT-Stamm als auch beim Klon eine Tetramerisierung von EibG (die durch DNA-Sequenzierung bestimmte Monomergröße betrug 54 kDa) zur Folge hat (ca. 200 kDa), bewirken der Verzicht auf 2-Mercaptoethanol und das Erhitzen auf nur 60 °C die Beibehaltung der nativen trimeren Form (ca. 150 kDa). Zusätzlich wird beim Wildtyp unter nicht-reduzierenden Bedingungen eine hochmolekulare oligomere Form von EibG detektiert, dessen Größe aber nicht genau bestimmt werden konnte, da dieses Oligomer nur wenig in das Gel einwanderte und somit außerhalb der Skala des mitgeführten Molekulargewichtsmarkers lag.

Das Aufkochen EibG-haltiger Lysate unter reduzierenden Bedingungen bewirkt anscheinend die Dissoziation der trimeren Form von EibG, welches sich während der Gelelektrophorese wieder zur dimeren und/oder tetrameren Form zusammenlagert. Die Erhitzung der Lysate auf lediglich 60 °C bewirkt eine ausreichend gute Dissoziation von Fremdproteinen; außerdem unterscheidet sich das Laufverhalten von EibG nach milder Erhitzung nur wenig von den auf 100 °C erhitzten Proben (vgl. die trimere EibG-Form des WT-Stammes 1809/00 in beiden Spuren). Bei 60 °C konnte also im Falle des WT-Stammes 1809/00 kein Aufbrechen der trimeren EibG-Form erreicht werden, weshalb es sich nicht wieder zu Dimeren oder Tetrameren zusammenlagern konnte; unter diesen Bedingungen konnte die oligomere EibG-Form ebenfalls nicht dissoziieren. Aufgrund stark hydrophober Bereiche am C-terminalen Ende von EibG erfolgt nach dem Aufbrechen der bakteriellen Membran und der Freisetzung von EibG in den Lysispuffer eine mizellenartige Zusammenlagerung der EibG-Moleküle. Diese hochmolekulare Struktur ist sehr stabil und wird erst durch Aufkochen bei 100 °C aufgelöst und bleibt nach sofortiger Auftragung auf das GE-Gel destabilisiert.

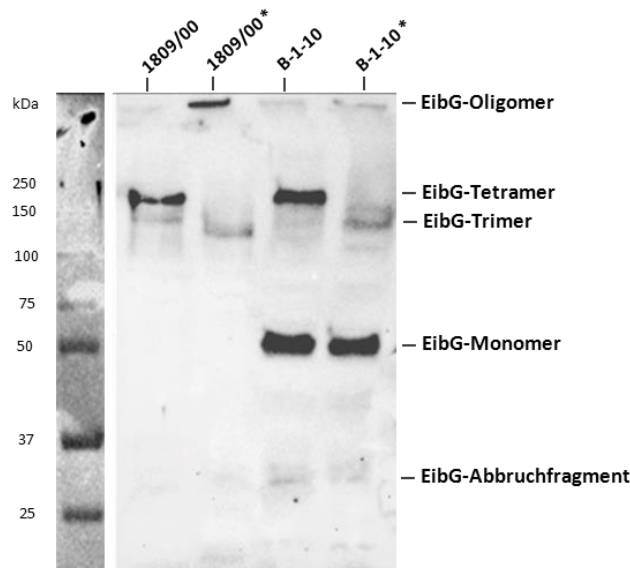


Abb. 50: Visualisierung von EibG des Wildtypstammes 1809/00 (*eibG*- α , Allel 001) und des Klons B-1-10 (*eibG*- α , Allel 001) mit humanem IgG Fc-HRP.

Lysate der beiden Stämme in Probepuffer mit und ohne (*) reduzierende Agenzien wurden auf 100 °C bzw. 60 °C (*) erhitzt und die Proteinmischungen mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

Durch IPTG-Induktion des *eibG*-Gens erfolgt eine hohe Expression von EibG-Monomeren beim Klon B-1-10. Der Transfer von EibG auf die Membranaußenseite wird durch das *sec*-System limitiert,

sodass nur eine begrenzte Menge an tri- bzw. tetrameren Formen von EibG auf der Membranaußenseite gebildet wird. Die synthetisierten EibG-Monomere akkumulieren daher im Zellinneren und stellen die Hauptkomponente in der SDS-PAGE (vgl. beide Spuren der B-1-10 – Lysate). Das Aufkochen der Lysate bei 100 °C bewirkt, ähnlich wie beim Wildtyp, eine erhöhte Bildung der tetrameren Form von EibG. Die Behandlung bei 60 °C belässt das EibG in seiner trimeren Form, und diese oligomere Form von EibG wird ebenfalls ähnlich wie beim Wildtyp nicht zerstört.

Zusätzlich tritt sporadisch eine gefärbte Bande im Bereich von 30 bis 37 kDa auf, die das IgG Fc-HRP darstellt (vgl. beide Spuren von B-1-10). Durch die Hitzelyse der Zellen kommt es zum Abbruch der Assemblierung der EibG-Trimere auf der Bakterienoberfläche, wodurch die EibG-Transmembrandomäne vom restlichen Protein abgetrennt wird und im SDS-PAGE – Probenpuffer weiter dissoziiert. Das 54 kDa große EibG wird bei diesem Prozess etwa in seiner Mitte gespalten, wodurch es zur Detektion von Abbruchfragmenten kommt.

4.6.2 1D-GE *eibG*-positiver Wildtypstämme

Ziel der Experimente war es, die EibG-Expression in verschiedenen WT-Stämmen nachzuweisen. Hierfür wurden die geschüttelten ÜN-Kulturen von 20 *eibG*-positiven STEC mittels OD₆₃₀-Messung auf die gleiche Zellzahl eingestellt, Aliquots im Probenpuffer bei 100 °C aufgeköcht und identische Volumina per SDS-PAGE aufgetrennt. Die Coomassie-gefärbten Gele und der immunchemische Nachweis von EibG mit humanem IgG Fc-HRP sind in **Abb. 51** dargestellt.

Es zeigt sich, dass in Schüttelkultur die 20 verschiedenen *eibG*-positiven STEC unterschiedliche EibG-Mengen exprimieren. Da es sich hier um die Auftragung von Bakterienlysaten ohne jegliche Proteinaufreinigung handelt, sind die detektierten IgG Fc – bindenden Proteine als die Gesamtheit antikörperbindender Moleküle nach ÜN-Kultivierung anzusehen. Diese „Momentaufnahme“ zeigt, dass unabhängig vom *eibG*-Allel oder Subtyp die verschiedenen *E. coli* – Serotypen unterschiedliche Mengen an EibG exprimieren. Die Serotypen mit den höchsten detektierten EibG-Mengen sind Ont:H⁻, O91:H⁻, OR:H⁻, O91:Hnt und O91:H14. Die niedrigsten EibG-Mengen wurden in diesem Versuch bei den Serotypen O91:H14, OR:H10, OR:H45, O146:H21, O91:H⁻, OR:H14, O146:H28, Ont:H30 und OR:H21 detektiert. Ein mittlerer EibG-Gehalt konnte bei den Serotypen OR:H45, OR:Hnt, Ont:H⁻ und O152:H⁻ nachgewiesen werden. Obwohl nur eine kleine Kollektion verschiedener Serotypen untersucht wurde, fällt auf, dass mehr EibG pro Bakterienzelle von den *E. coli* – Serotypen mit fehlenden oder nicht typisierbaren Flagellen exprimiert wird als von Serotypen mit nachweisbaren H-Antigenen. Eine eingeschränkte Mobilität von *E. coli* durch eine verringerte Expression oder das Fehlen von Flagellen scheint die Expression von nichtfimbriellen Adhäsinen wie EibG bei geschüttelter Kultivierung zu begünstigen.

Diese Ergebnisse bestärken die schon in den Kapiteln 4.2.1 und 4.5.5 beschriebenen Ergebnissen, dass das Fehlen der Flagellen die Adhäsion von *E. coli* an Oberflächen begünstigt und die Ausbildung längerer Ketten zur Folge hat. Die Expression von EibG wird durch den Verlust an Mobilität bei H⁻- oder Hnt-Stämmen verstärkt und führt schließlich zu erhöhtem Zell-Zell-Kontakt und einer damit einhergehenden erhöhten Biofilmbildung.

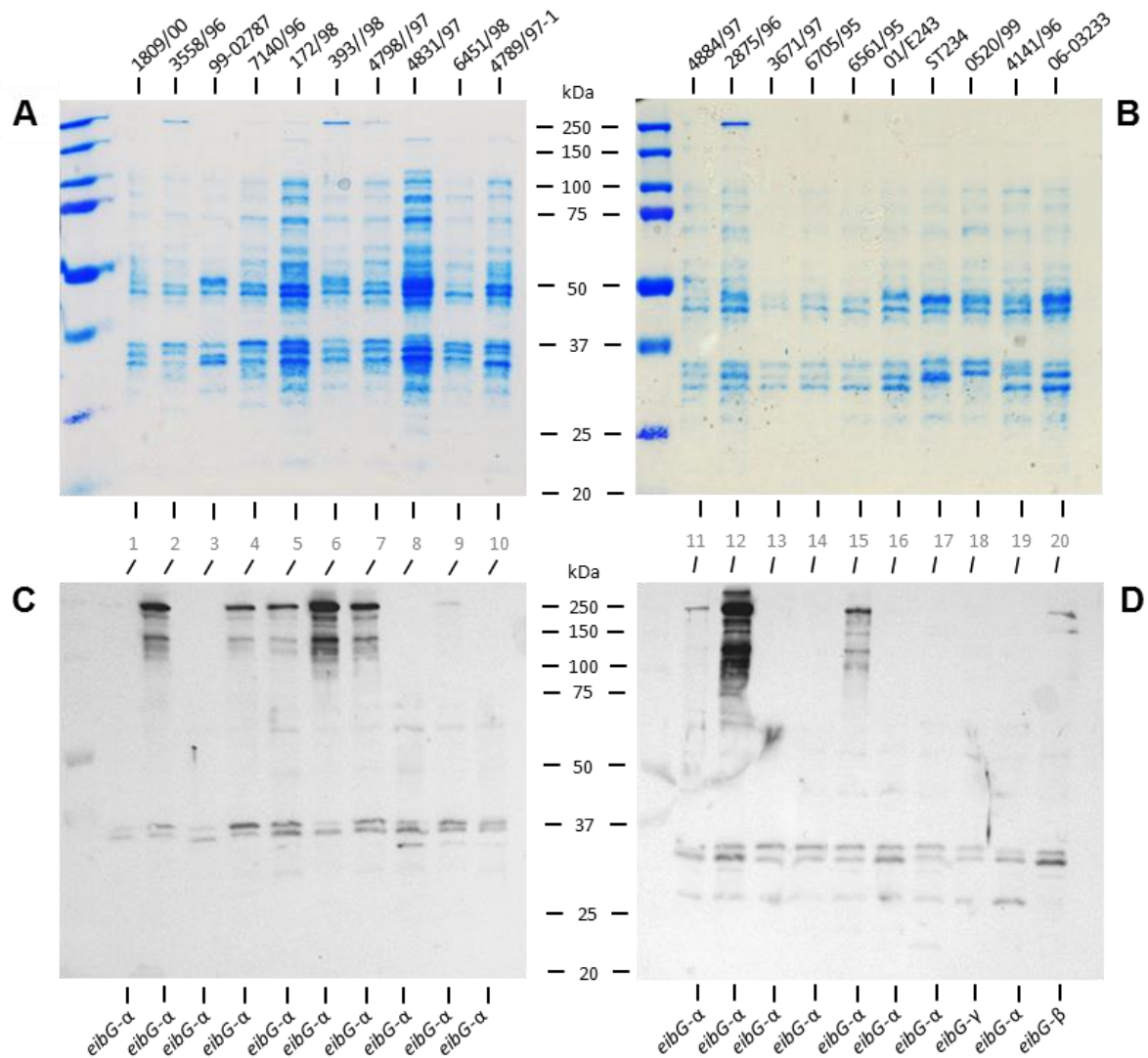


Abb. 51: Expression von EibG in verschiedenen *eibG*-positiven Wildtypstämmen.

SDS-PAGE – Gele (A und B) und Immunblots (C und D) von Lysaten folgender Stämme sind in den Teilabbildungen A bis D dargestellt: von links nach rechts: **(1)** 1809/00 (O91:H14 [H14], *eibG*-α); **(2)** 3558/96 (Ont:H⁻ [H14], *eibG*-α); **(3)** 99-02787 (OR:H10, *eibG*-α); **(4)** 7140/96 (O91:H⁻ [H14], *eibG*-α); **(5)** 172/98 (OR:H⁻ [H14], *eibG*-α); **(6)** 393/98 (O91:H⁻ [H14], *eibG*-α); **(7)** 4798/97 (O91:Hnt [H14], *eibG*-α); **(8)** 4831/97 (OR:H45, *eibG*-α); **(9)** 6451/98 (OR:H45, *eibG*-α); **(10)** 4789/97-1 (O146:H21, *eibG*-α); **(11)** 4884/97 (OR:Hnt [H14], *eibG*-α); **(12)** 2875/96 (O91:H14 [H14], *eibG*-α); **(13)** 3671/97 (O91:H⁻ [H14], *eibG*-α); **(14)** 6705/95 (OR:H14 [H14], *eibG*-α); **(15)** 6561/95 (Ont:H⁻ [H14], *eibG*-α); **(16)** 01/E243 (O91:H⁻ [H14], *eibG*-α); **(17)** ST234 (O146:H28, *eibG*-α); **(18)** 0520/99 (Ont:H30, *eibG*-γ); **(19)** 4141/96 (OR:H21, *eibG*-α); **(20)** 06-03233 (O152:H⁻ [H14], *eibG*-β). Detektion in (A und B): Coomassie; Detektion in (C und D): humanes IgG Fc-HRP.

4.6.3 Einfluss von geschüttelter und stationärer Kultivierung auf die EibG-Expression und Biofilmbildung von Wildtypen und Klonen

Mit diesem Vergleich wird in diesem Kapitel die EibG-Expressionsstärke von Wildtypen und Klonen in Abhängigkeit von der Kultivierungsart und der Kultivierungsdauer in Bezug zur Biofilmbildung beschrieben. Innerhalb einer 24-stündigen Kultivierung von *eibG*-positiven Wildtypen und Klonen wurden in bestimmten Zeitabständen Kulturproben genommen, mittels OD₆₀₀- und OD₅₇₀-Messungen das Wachstumsverhalten bzw. die Biofilmbildung der *E. coli* untersucht, Lysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mithilfe des Westernblots die EibG-Expression bestimmt.

EibG-exprimierende Wildtypen

In **Abb. 52 A** sind die Wachstumskurven der WT-Stämme 1809/00 (*eibG*- α), 2875/96 (*eibG*- α), 06-03233 (*eibG*- β) und 0520/99 (*eibG*- γ) der geschüttelten im Vergleich zu den stationären Kulturen gegeneinander aufgetragen. Durch die geschüttelten Bedingungen (durchgezogene Linien) und den dadurch bedingten höheren O₂-Eintrag erreichen die Zellen bereits nach ca. 5 bis 6 h die stationäre Wachstumsphase, wonach die OD₆₀₀ und damit die Zelldichte bis zum Ende des Versuchs (24 h) auf dem gleichen Level bleibt. Die bei 0 rpm kultivierten Stämme (gestrichelte Linien) weisen keine exponentielle Wachstumsphase auf und zeigen vier- bis fünfmal niedrigere OD₆₀₀-Werte bis zur 12. Kultivierungsstunde. Nach 24 h betragen die OD₆₀₀-Werte etwa die Hälfte der Werte der geschüttelten Kulturen, wobei durch das Fehlen der Messwerte zwischen der 12. und der 24. Stunde keine Aussage gemacht werden kann, ob sich die Bakterienzellen der stationären Kultivierung am Ende des Versuchs in der exponentiellen oder schon in der stationären Wachstumsphase befunden haben.

In **Abb. 52 B** sind die OD₅₇₀-Werte der Biofilmbildung ab der 6. Stunde der Kultivierung dargestellt (Kristallviolett-Färbung, vgl. Kapitel 4.5.5). Diese zeigen, dass die *eibG*-positiven Stämme in den stationären Kulturen bereits nach 6 Stunden ein höheres Autoagglutinationsverhalten aufweisen als in den geschüttelten Kulturen. Die Biofilmbildung bleibt bei den stationären Kulturen bis zum Ende der Kultivierung nach 24 h auf ähnlich hohem Niveau und wird in den geschüttelten Kulturen erst zum Kulturrende nahezu eingeholt.

In **Abb. 52 C** ist der immunchemische Nachweis von EibG der Wildtypen im Verlauf der geschüttelten und stationären Kultivierungen dargestellt. Durch die exponentielle Zunahme der Zellzahl in den geschüttelten Kulturen wird EibG in den Lysaten bis zur 12. Stunde in ansteigenden Konzentrationen detektiert (obere Blots der jeweiligen Stämme). Zum Ende der geschüttelten Kultivierung nimmt die EibG-Konzentration entweder wieder ab (vgl. Stämme 1809/00 und 06-03233) oder bleibt auf dem nach 12 h erreichten Niveau (vgl. Stämme 2875/96 und 0520/99). Ab diesem Zeitpunkt sinkt die Expression von EibG. Die Ausnahme stellt Stamm 2875/96 dar, der erst in nach 24 h die maximale Zelldichte erreicht hat. Durch die Darstellung in **Abb. 52 B** wird die Zunahme adhärenter Zellen von Stunde 12 bis zur 24. Stunde der geschüttelten Kulturen deutlich. Zusammen lassen diese Daten folgende Aussage zu: Während der geschüttelten Kultivierung wird EibG in höheren Konzentrationen in der stationären Phase exprimiert, und bei Beginn der Biofilmbildung nach der 12. Stunde wird die EibG-Expression wieder vermindert.

Während der ersten 12 Kultivierungsstunden bei 0 rpm und nur langsam ansteigender Zellzahl (**Abb. 52 A**) bleibt die EibG-Expression der WT-Stämme relativ gleich (**Abb. 52 C**), wobei sich die Anzahl der adhärenter Zellen nach 12 h bereits auf dem höchsten Niveau befindet (**Abb. 52 B**). Zwischen der 12. und 24. Stunde steigt die EibG-Expression bei dieser stationären Kultur stark an, wobei sich die Zellzahl in diesem Zeitraum fast verdoppelt und die Anzahl der adhärenter Zellen nur geringfügig erhöht oder sogar etwas abfällt (**Abb. 52 B**, Stamm 1809/00). Mit dem Anstieg der Biomasse in der stationären Kultivierung steigt zwar auch die EibG-Expression, die Anzahl der biofilmbildenden Bakterien verändert sich aber nicht. Da sich die Bakterien nach 24 Stunden der ungeschüttelten Kultivierung wahrscheinlich in der stationären Wachstumsphase befinden, kann im Vergleich zur geschüttelten Kultivierung festgestellt werden, dass die EibG-Expression während der stationären Wachstumsphase zwar am höchsten ist, die Höhe der EibG-Expression jedoch nicht mit der Ausbildung oder dem Abbau des Biofilms korreliert.

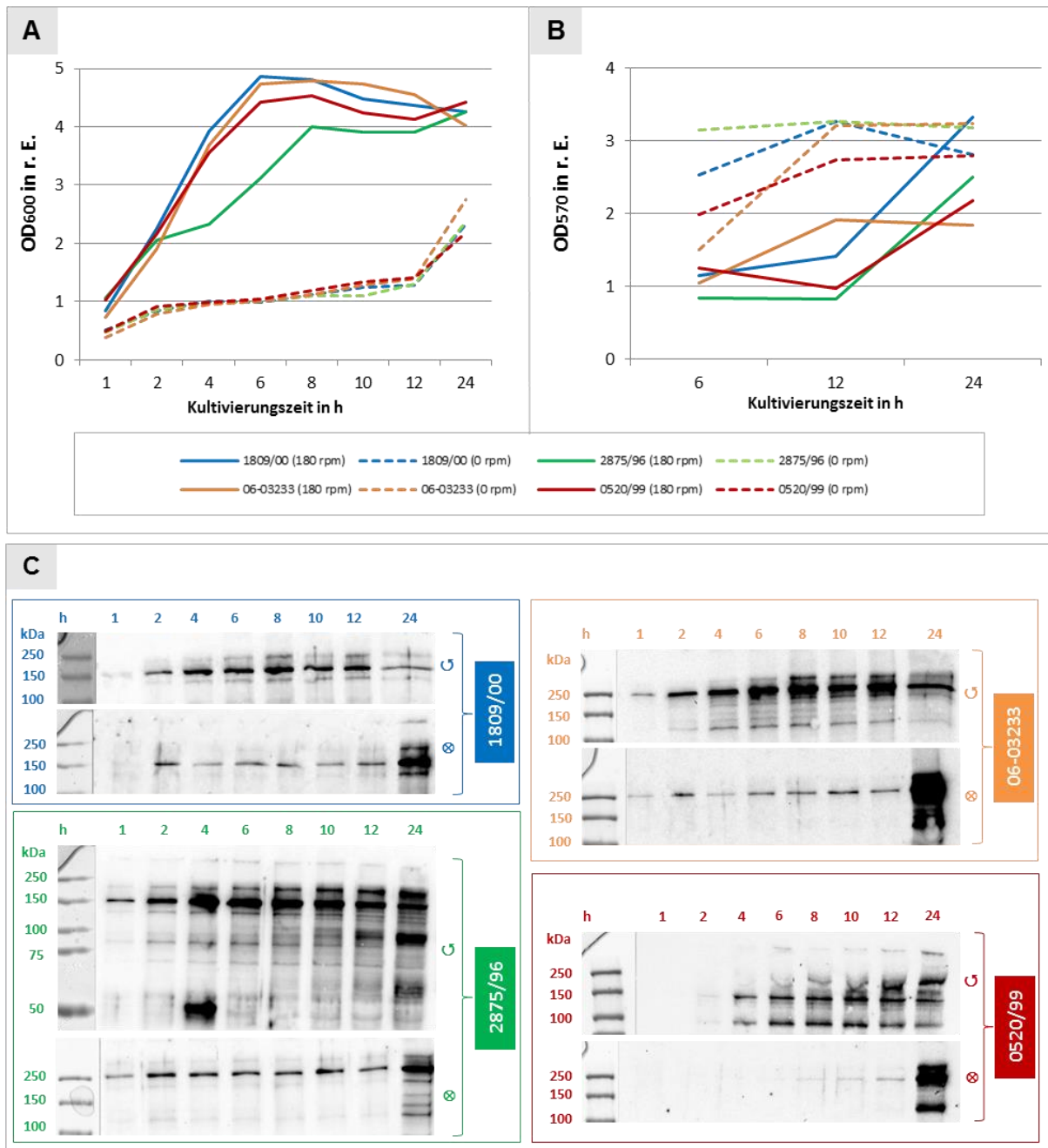


Abb. 52: EibG-Expression bei geschüttelter und stationärer Kultivierung der *eibG*-positiven Wildtypen im Verlauf einer 24-stündigen Kultivierung.

(A) Wachstumskurven *eibG*-positiver STEC, Messung bei 600 nm: (blau) 1809/00 (O91:H14 [H14], *eibG*- α); (grün) 2875/96 (O91:H14 [H14], *eibG*- α); (orange) 06-03233 (O152:H⁻ [H14], *eibG*- β); (rot) 0520/99 (Ont:H30, *eibG*- γ); (durchgezogene Linien) Kultivierung bei 180 rpm; (gestrichelte Linien) Kultivierung bei 0 rpm. (B) Biofilmbildung, Kristallviolett-Färbung, Messung bei 570 nm: Farbkodierung wie in (A). (C) Immunblots mit Kulturproben in (A): Farbkodierung wie in (A); (U) Kultivierung bei 180 rpm; (X) Kultivierung bei 0 rpm. Detektion mit humanem IgG Fc-HRP, Sensitivität des Imagers überall gleich (Vergleichsmöglichkeit).

EibG-exprimierende Klone

Abb. 53 zeigt die Ergebnisse der EibG-exprimierenden Klone B-1-10 (*eibG*- α), B-20-1 (*eibG*- β) und B-18-2 (*eibG*- γ) nach gleicher Experimentdurchführung. Durch die IPTG-Induktion und dem damit einhergehenden Energieaufwand für die EibG-Expression sind die detektierten OD₆₀₀-Werte etwas niedriger als bei den WT-Stämmen, was auf eine verlangsamte exponentielle Wachstumsphase hindeutet. Während der Kultivierung bei 180 rpm wird die stationäre Phase der Klone (Abb. 53 A)

etwas später erreicht (8. bis 12. h) im Vergleich zu den WT-Stämmen bei geschüttelter Kultivierung. Ähnlich den Wildtypen sind die OD_{600} -Werte bei der stationären Kultivierung viel niedriger als bei geschüttelten Kulturen und steigen in der 24. Stunde nur bei den Stämmen B-1-10 und B-20-1 an, während die Zelldichte bei Stamm B-18-2 zum Ende des Experiments sogar abfällt.

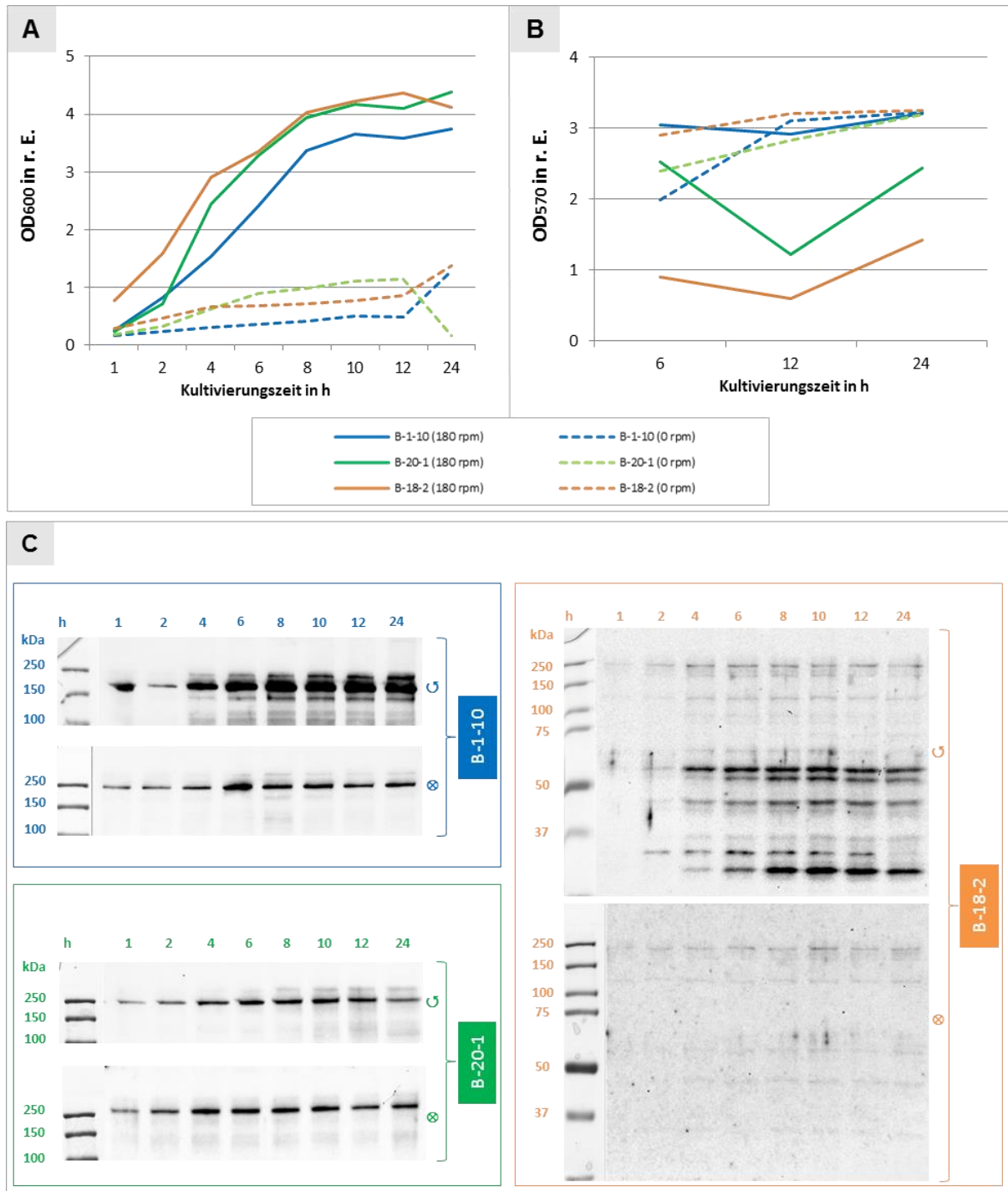


Abb. 53: EibG-Expression bei geschüttelter und stationärer Kultivierung der EibG-exprimierenden Klone im Verlauf einer 24-stündigen Kultivierung.

(A) Wachstumskurven *eibG*-positiver Klone, Messung bei 600 nm: (blau) B-1-10 (*eibG*- α); (grün) B-20-1 (*eibG*- β); (orange) B-18-2 (*eibG*- γ); (durchgezogene Linien) Kultivierung bei 180 rpm; (gestrichelte Linien) Kultivierung bei 0 rpm. (B) Biofilmbildung, Kristallviolett-Färbung, Messung bei 570 nm: Farbkodierung wie in (A). (C) Immunblots mit Proben der Kulturen in (A): Farbkodierung wie in (A); (U) Kultivierung bei 180 rpm; (X) Kultivierung bei 0 rpm. Detektion mit humanem IgG Fc-HRP, Sensitivität des Imagers überall gleich (Vergleichsmöglichkeit).

Bei der stationären Kultivierung bilden die Klone in dem Zeitintervall von Stunde 6 bis 12 ebenfalls, ähnlich den WT-Stämmen, eine hohe Anzahl adhärerender Zellen. Dieser Wert bleibt bis zum Ende des Experiments auf nahezu gleichem Niveau. Anders als die WT-Stämme verhalten sich die Klone während der Kultivierung bei 180 rpm: die Zahl an adhärenenten Zellen nach 6 Stunden ist fast so hoch wie bei der stationären Kultivierung, steigt jedoch nicht wie bei den Wildtypen bis zur 12. Stunde an, sondern sinkt wieder ab. Erst zum Ende des Experiments steigt die OD_{570} bei geschüttelter Kultivierung wieder an. Klon B-1-10 (*eibG- α*) erreicht bei geschüttelter Kultivierung eine ähnlich hohe Anzahl an adhärenenten Zellen wie bei der stationären Kultivierung.

Die hohe EibG-Expression wird durch die IPTG-Induktion künstlich herbeigeführt und erreicht schon nach 4 bis 6 Stunden fast ihr Maximum, unabhängig von der Kultivierungsart. Jedoch weichen die von den Klonen exprimierte EibG-Konzentrationen von Stamm zu Stamm erheblich voneinander ab (Abb. 53 C). Während die EibG-Konzentration des Klons B-1-10 (*eibG- α*) bei 180 rpm ständig ansteigt, bleibt sie bei 0 rpm ab der 6. Stunde auf gleichem Niveau. Stamm B-20-1 (*eibG- β*) exprimiert sowohl bei 180 rpm als auch bei 0 rpm ähnliche Konzentrationen an EibG, die aber niedriger sind als die des Stammes B-1-10 bei 0 rpm. Stamm B-18-2 (*eibG- γ*) exprimiert bei 180 rpm ähnlich hohe Konzentrationen an EibG wie der Stamm B-20-1, stellt die EibG-Expression jedoch bei 0 rpm fast vollständig ein. Darüber hinaus zeigen die Blots der Lysate des Stammes B-18-2 verstärkt monomere Strukturen von EibG und dessen Abbruchfragmente. Die trimere Form ist so gut wie nicht detektierbar.

Verglichen mit den Wildtypen ergibt sich bei den Klonen ein etwas anderes Adhäsionsbild. Die hohe EibG-Expression in den ersten Stunden der Kultivierung bewirkt eine hohe Zell-Zell-Adhäsion nach 6 Stunden (Abb. 53 B). Während der weiteren Kultivierung bei 180 rpm erhöht sich die Zellzahl bei gleichbleibender EibG-Expression und die Konzentration an adhärerenden Zellen sinkt etwas ab, was auf die Scherkräfte bei 180 rpm zurückgeführt werden kann. Obwohl nach 24 Stunden dann die exprimierte EibG-Konzentration pro Zelle niedriger ist, hat sich die Anzahl der adhärerenden Zellen zu diesem Zeitpunkt wieder erhöht. Die Anzahl adhärenenter Zellen wird somit nicht durch eine ansteigende EibG-Expression bewirkt, sondern durch andere, bislang noch unbekannte Faktoren.

Direkter Vergleich der EibG-Expression von *eibG*-positiven Wildtypen und *eibG*-exprimierenden Klone

Abb. 54 zeigt den Vergleich von *eibG*-exprimierenden WT- und Klon-Stämmen (vgl. Abb. 52 und Abb. 53). Durch diese Gegenüberstellung sollten die EibG-Konzentrationen verschiedener EibG-positiver Stämme nach 12 und 24 h Kultivierung bei geschüttelten und stationären Bedingungen direkt miteinander verglichen werden.

Nach 12 h Kultivierung ist bei allen hier verglichenen Stämmen die EibG-Expression nach geschüttelter Kultivierung höher als nach stationärer Kultivierung. Am höchsten wird EibG von dem WT-Stamm 2875/96 und dem Klon B-1-10 (*eibG- α*) und am niedrigsten von dem WT-Stamm 0520/99 und dem Klon B-18-2 (*eibG- γ*) exprimiert. Die höhere Zelldichte der geschüttelten Kulturen zu diesem Zeitpunkt suggeriert eine höhere EibG-Expression bei diesen. Überraschend ist die unterschiedliche Expression von EibG durch die Klone. Obwohl mit gleicher Zellzahl eingesät und mit gleicher Konzentration an IPTG induziert, produziert der Klon B-1-10 (*eibG- α*) die höchste, Klon B-20-1 (*eibG- β*) eine mittlere und Klon B-18-2 (*eibG- γ*) die geringsten EibG-Mengen. Dieser Unterschied bleibt bis zur 24. Kultivierungsstunde erhalten, obwohl der Klon B-20-1 den Klon B-1-10 in der EibG-Konzentration zu diesem Zeitpunkt fast einholt. Dieser Befund bestätigt die Annahme aus dem

Kapitel 4.5.5 (vgl. Abb. 49), dass bei geschüttelter Kultivierung die *eibG*-positiven Klone von *eibG*- α zu *eibG*- γ abfallende Konzentrationen an EibG exprimieren, obwohl die OD₆₀₀-Werte, und somit die theoretische Zellzahl, ähnlich hoch sind.

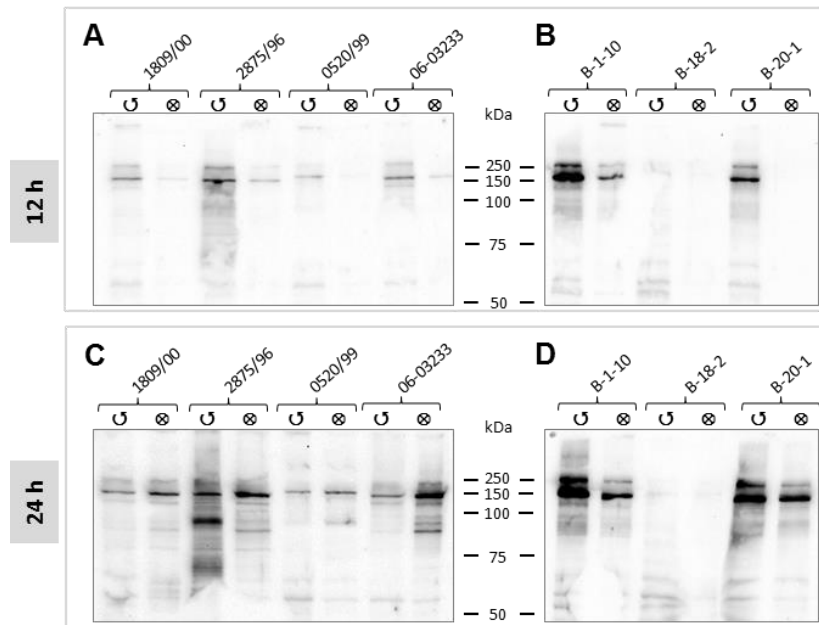


Abb. 54: EibG-Expression bei geschüttelter und stationärer Kultivierung der *eibG*-positiven Wildtypen und *eibG*-exprimierenden Klone nach 12- und 24-stündiger Kultivierung.

Immunblots folgender Stämme sind in den Teilabbildungen A bis D dargestellt: **(A und C)** 1809/00 (*eibG*- α); 2875/96 (*eibG*- α); 0520/99 (*eibG*- γ); 06-03233 (*eibG*- β); **(B und D)** B-1-10 (*eibG*- α); 0520/99 (*eibG*- γ); B-20-1 (*eibG*- β). Gleiche Probevolumina an Kulturbrühe aus geschüttelter (U) und stationärer (⊗) Kultur des jeweiligen Stammes wurden aufgetragen. **(A und B)** Probenahme nach 12 h; **(C und D)** Probenahme nach 24 h. Detektion mit humanem IgG Fc-HRP.

Bei den Wildtypen bleibt der Stamm 2875/96 (*eibG*- α) auch nach 24 h der beste EibG-Produzent bei geschüttelten Bedingungen. Alle anderen WT-Stämme weisen nach 24 h stationärer Kultivierung etwas höhere EibG-Konzentrationen im Vergleich zur Schüttelkultivierung auf. Beim Vergleich der WT-Stämme 2875/96 (*eibG*-Allel 016) und 1809/00 (*eibG*-Allel 001) fällt auf, dass diese beiden *eibG*- α Wildtypen von Stämmen des gleichen Serotyps (O91:H14 [H14]) und des gleichen Sequenztyps (MLST-Daten: ST 33, vgl. Kapitel 4.1.3) produziert werden und somit verwandt sind. Die Übereinstimmung in der AS-Sequenz von EibG beträgt 99,80% und beide Allele unterscheiden sich nur in der Aminosäure EibG₂₀₃, und zwar TRP-203 bei Stamm 1809/00 und LEU-203 bei Stamm 2875/96. Alle anderen 19 *eibG*-Allele weisen, wie der Stamm 1809/00, ebenfalls TRP an der Position EibG₂₀₃ auf. Da der WT-Stamm 2875/96 bei allen Experimenten die höchste EibG-Konzentration aufwies, kann vermutet werden, dass die Mutation LEU-203 eine erhöhte Expression von EibG zur Folge hat. Eine bessere „Erkennung“ durch das *sec*-System, verbunden mit einer höheren Affinität durch die LEU-Mutation, könnte eine Erklärung für die höhere Sekretions- und somit höhere Expressionsrate von EibG-016 sein.

4.7 AUFTRENNUNG DER INNEREN UND ÄUßEREN *E. COLI* – MEMBRANEN

Die Verteilung von EibG innerhalb der inneren und äußeren Membranen sollte in den folgenden Experimenten untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden nach einer 20-stündigen Kultivierung

des Stammes 1809/00 (*eibG-α*) bei 180 rpm aus den *E. coli* – Zellen zunächst Sphäroplasten hergestellt. Diese wurden dann durch osmotischen Schock zum Platzen gebracht (vgl. Kapitel 3.6.6). Dadurch entstehen Membrankonglomerate, die sich aufgrund ihrer Dichteunterschiede in innere und äußere Membranen abtrennen lassen. In **Abb. 55** sind die Ergebnisse einer Saccharosegradienten-Zentrifugation von Membranfragmenten und der Nachweis von EibG und OmpA in den Membranfraktionen mittels SDS-PAGE und Immunblot gezeigt. Von links nach rechts sind die aus den Zentrifugationsgefäßen von oben nach unten abgenommenen Fraktionen abgebildet. Die Bestandteile der inneren Membran sollten in den oberen Fraktionen und die der äußeren Membran in den unteren Fraktionen enthalten sein. In **Abb. 55 A** wurden die Bestandteile der Fraktionen mit Coomassie gefärbt. Die meisten Proteine befinden sich in den oberen Fraktionen, wobei größere Proteine mit ansteigender Konzentration in den unteren Fraktionen akkumulieren. In der unteren Fraktion (F 12) sind überwiegend kleinere Proteine erkennbar, die sich wahrscheinlich in der äußeren Membran befunden haben und mit äußeren Membrankomponenten innerhalb des Saccharosegradienten in die unteren Bereiche des Gradienten der Zentrifugationsgefäße gekommen sind. Des Weiteren werden in den letzten drei Fraktionen (F 10 bis F 12) nicht in das Gel eingewanderte Proteine detektiert. Entweder haben sich diese zu größeren Proteinkonglomeraten zusammengelagert, oder die Membrankomponenten wurden während der Probenvorbereitung nicht gelöst, so dass diese immer noch intakt waren und durch ihre Größe nicht in das Gel einwandern konnten.

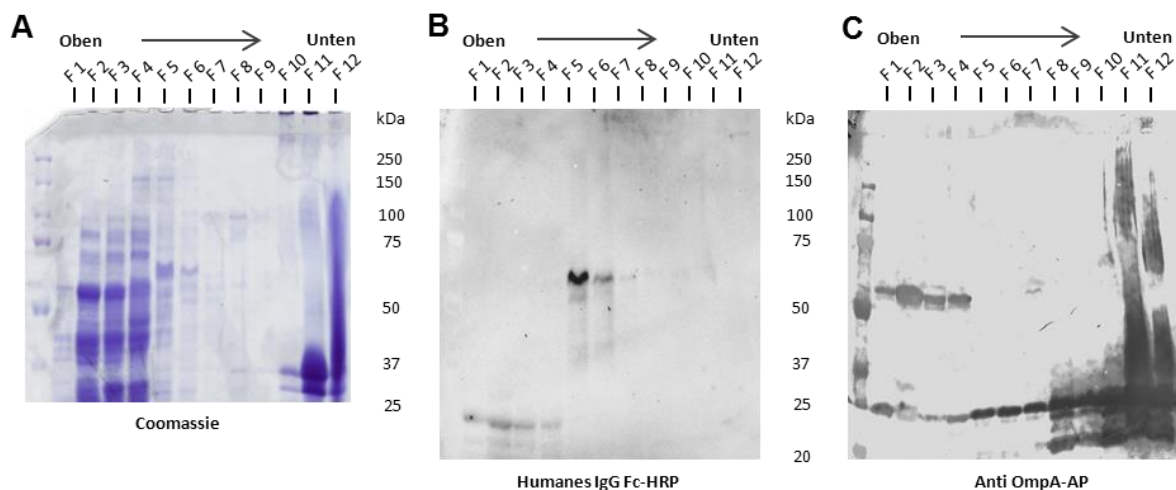


Abb. 55: Auftrennung der inneren und der äußeren Membranen von Sphäroplasten des Wildtypstammes 1809/00 mit Hilfe eines Saccharosegradienten.

Detektion einzelner Fraktionen mittels Coomassie (**A**), humanem IgG-HRP (**B**) und Rabbit-anti-OmpA – AP (**C**). Aufgetragen sind in jeder Abbildung von links nach rechts bzw. von oben nach unten die Fraktionen F 1 bis F 12.

In **Abb. 55 B** ist ein Immunblot dargestellt, der zum Nachweis von EibG mittels humanem IgG Fc-HRP eingesetzt wurde. In den oberen Fraktionen (F 1 bis F 4) sind EibG-positive Proteine im Bereich von ca. 25 kDa zu erkennen, bei denen es sich um die leichteren EibG-Abbruchfragmente handelt. In den Fraktionen 5 bis 7 ist das EibG-Monomer sichtbar, das in den unteren Fraktionen 8 bis 10 nur ganz schwach detektiert werden kann und in Fraktion 11 gar nicht mehr sichtbar ist. In Fraktion 12, die Membrankomponenten der äußeren *E. coli* – Membran enthält, ist EibG relativ schwach in seiner oligomeren Form erkennbar. Da die Proben vor der SDS-PAGE auf 100 °C erhitzt wurden, um die Membranstruktur zu desintegrieren, ist EibG nicht in seiner nativen trimeren Form erhalten geblieben und daher nicht zu sehen (vgl. auch Kapitel 4.6.1).

Inwieweit sich innere und äußere Membranen voneinander trennen ließen, wurde durch weitere Immunfärbung des Blots in Abb. 55 B mit dem Rabbit-anti-OmpA-AP – Antikörper untersucht. OmpA (*outer membrane protein A*) kann als Marker für die äußere Membran gramnegativer Bakterien ausgenutzt werden und zeigt in Abb. 55 C von den oberen zu den unteren Fraktionen ein immer stärker werdendes Signal. Somit weisen die unteren Fraktionen einen höheren Gehalt an Komponenten der äußeren Bakterienmembran auf.

Die Ergebnisse zeigen, dass EibG in der inneren *E. coli* – Membran als Monomer vorliegt und in der äußeren Membran, wenn auch in relativ geringer Konzentration, als oligomere Struktur detektiert werden kann, was einen ersten Hinweis auf seine Synthese als Trimer im Periplasma liefert.

4.8 AUFKONZENTRIERUNG VON EIBG

Für die anstehende massenspektrometrische Identifizierung und AS-Sequenzierung von EibG wurde versucht, dieses Protein so weit wie möglich von anderen Lysatproteinen zu befreien bzw. aufzureinigen.

4.8.1 Chromatographische Aufkonzentrierung von EibG

Zum Zweck der Aufreinigung von EibG wurden verschiedene chromatographische Methoden eingesetzt. Nach Kultivierung der WT-Stämme 1809/00 und 2875/96 und des Klons B-1-10 (*eibG- α*) in 1 L LB-Medium bei 0 bzw. 180 rpm wurden die Zellen lysiert. Mit verschiedenen FPLC (*fast protein liquid chromatography*; ÄKTA *prime plus*, GE Healthcare) -Säulen variierender Größen (1, 5 bzw. 100 mL) wurden die Komponenten EibG-haltiger – Lysate aufgetrennt. Zu den eingesetzten Methoden gehörten die Ionenaustauschchromatographie (CM FF, DEAE FF, Q FF (*HiTrap*, GE)), die hydrophobe Interaktionschromatographie (Phenyl FF *low sub*, Phenyl FF *high sub* (*HiTrap*, GE)) und die Größenausschlusschromatographie (*Sephadex G-25*, *Sephadex G-100*, *Sephacryl S-200*, *Sephacryl S-400*). Darüber hinaus wurde humanes IgG an verschiedene Trägermaterialien gekoppelt, und zwar Dynabeads (Invitrogen), HiTrap NHS-aktivierte *Sepharose* (GE)), und es wurden kommerziell erhältliche Matrices mit gekoppeltem humanem IgG (*IgG Sepharose 6 Fast Flow*, GE) für die affinitätschromatographische Aufreinigung von EibG getestet. Mittels SDS-PAGE und immunchemischem Nachweis mit humanem IgG Fc-HRP wurden die erhaltenen Fraktionen auf das Vorkommen von EibG getestet.

Aufgrund des variablen EibG-Laufverhaltens während der chromatographischen Aufreinigung, seiner unvorhersehbaren Dissoziation zu Monomeren bzw. der wieder eintretenden Assoziation zu Multimeren in verschiedenen Pufferlösungen, mit und ohne Detergenzien (SDS, β -OG), konnten keine Fraktionen identifiziert werden, in denen EibG in ausreichender Menge als einziges Protein vorlag. Auch die Hintereinanderschaltung verschiedener Chromatographien ergab nicht das gewünschte Ergebnis. Um dennoch weitere Experimente mit EibG durchführen zu können, wurde auf eine EibG-Aufreinigung verzichtet und EibG mittels Hitzeabscherung aufkonzentriert.

4.8.2 Hitzeextraktion oberflächenassoziierter *E. coli* – Proteine

Nach Inkubation der *E. coli* – Bakterien bei 60 °C, einem darauf folgenden Kälteschock und Scherstressbehandlung (intensive Mischung mit dem Vortexer) wurden die Membranproteine der

äußeren Membran extrahiert und mittels Zentrifugation von den restlichen Zellen und Zelltrümmern getrennt (vgl. Kapitel 3.7). Danach konnten in den erhaltenen Präparationen mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung EibG-angereicherte Fraktionen detektiert werden. Aufgrund seiner Größe und Bildung von multimeren Strukturen chromatographiert EibG in der SDS-PAGE als eines der am langsamsten wandernden Proteine und separiert in den oberen Bereichen der GE-Gele.

Durch stationäre Kultivierung konnten Extrakte mit relativ hohen EibG-Konzentrationen für die anschließenden ELISA und massenspektrometrischen Untersuchungen produziert werden. In **Abb. 56** sind ein SDS-PAGE – Gel und der zugehörige mit humanem IgG Fc-HRP durchgeführte Western-Blot der EibG-Extrakte aus geschüttelter und stationärer Kultivierung von mehreren EibG-exprimierenden WT-Stämmen gezeigt. Durch die stationäre Kultivierung konnten auch aus kleineren Kulturvolumina (30 mL) ausreichend hohe EibG-Mengen für die anstehenden ELISA- und Massenspektrometrie-Experimente produziert werden.

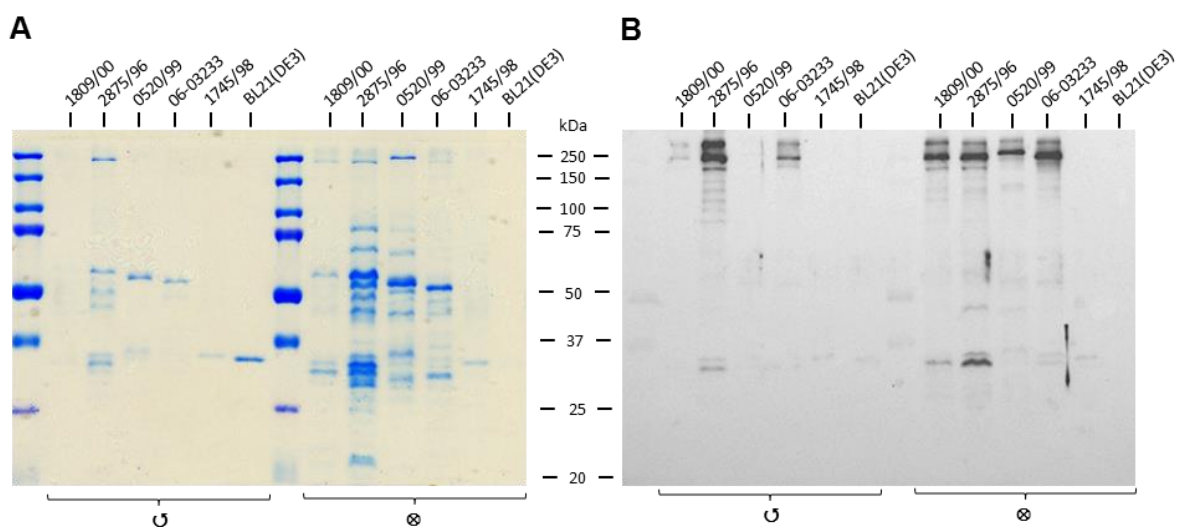


Abb. 56: Nachweis von EibG in hitzeextrahierten Lysaten *eibG*-positiver Wildtypstämmen bei geschüttelter und stationärer Kultivierung.

SDS-PAGE – Gel (**A**) und Immunblot (**B**) der folgenden Stämme sind in den Teilabbildungen A und B dargestellt: von links nach rechts: 1809/00 (*eibG*- α); 2875/96 (*eibG*- α); 0520/99 (*eibG*- γ); 06-03233 (*eibG*- β); 1745/98 (*eibG*-negativ); BL21(DE3) Expressionsstamm der EibG-Klone ohne das *pGEM-T Easy* – Plasmid. Gleiches Volumen an Kulturbrühe aus geschüttelter (**U**) und stationärer (**⊗**) Kultur des jeweiligen Stammes wurden mittels Hitzeextraktion aufgearbeitet und aufgetragen. Detektion in (**A**): Coomassie. Detektion in (**B**): humanes IgG Fc-HRP.

4.9 AFFINITÄT VON EIBG ZU IMMUNGLOBULINEN VERSCHIEDENER SPEZIES

Da eine Aufreinigung von hochreinem EibG nicht möglich war, wurde bei den folgenden Experimenten mit den EibG-angereicherten *E. coli* – Lysaten gearbeitet. Die EibG-haltigen Lysate wurden auf MTP immobilisiert (vgl. Kapitel 3.8) und die Affinität zu Immunglobulinen verschiedener Spezies untersucht. In **Abb. 57** sind die Ergebnisse der ELISA-Messungen mit Immunglobulin-HRP – Konjugaten verschiedener Säugerspezies dargestellt. Immobilisiertes EibG-Lysat des WT-Stammes 2875/96 (*eibG*- α) aus einer stationären Kultivierung wurde vorgelegt und mit IgG-HRP – Konjugaten verschiedener Tierspezies für 16 h inkubiert; gebundene Antikörper wurden mittels Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 492 nm nachgewiesen.

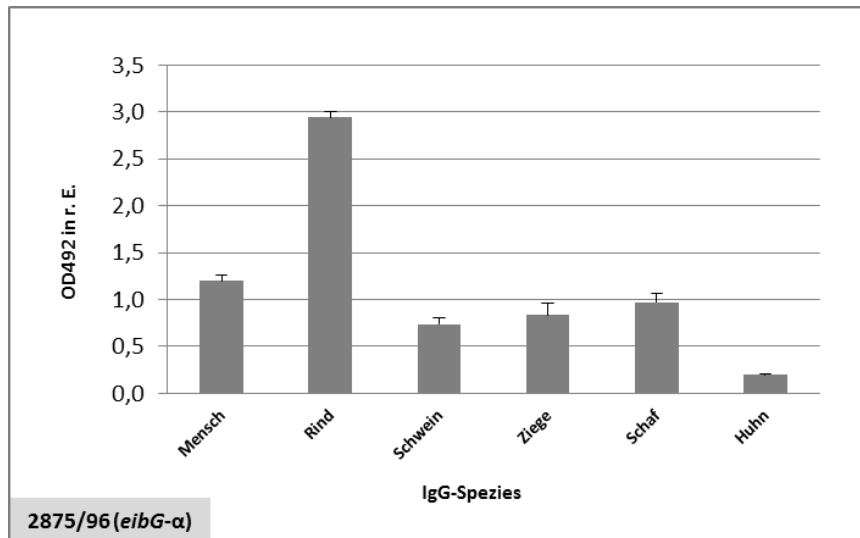


Abb. 57: Affinität von EibG- α zu Immunglobulinen verschiedener Tierspezies.

Vergleich mittels ELISA von hitzeextrahierten EibG- α angereicherten Lysaten des WT-Stammes 2875/96 (Vorlage von 1,0 mg/well Gesamtprotein) und jeweils 5 μ g an IgG-HRP aus Mensch, Rind, Schwein, Ziege, Schaf oder Huhn. Detektion erfolgte bei 492 nm.

Die Signale von IgG aus Mensch, Schwein, Ziege und Schaf zeigen ähnliche Intensitäten, die noch etwas höher liegen als die der mit Huhn-IgG erzielten Werte. IgG aus Rind weist die höchste Affinität zu dem EibG-haltigen Lysat auf. Da in jedem MTP-well die gleiche Menge an EibG vorgelegt wurde und die Versuche mehrfach wiederholt wurden, kann aus den Ergebnissen gefolgert werden, dass EibG- α eine ca. dreifach höhere Affinität zu IgG aus Rind besitzt als zu IgG der anderen untersuchten Spezies, einschließlich IgG des Menschen. Die einzige IgG-Spezies bei diesem Experiment, die nicht von Säugetieren, sondern vom Huhn stammt, zeigt die niedrigste Affinität gegenüber EibG.

In **Abb. 58** sind die Ergebnisse weiterer ELISA-Messungen zur Bestimmung der Affinität von humanem IgG Fc-HRP gegenüber verschiedenen EibG-Subtypen dargestellt. Dafür wurden die WT-Stämme 1809/00 (*eibG- α*), 2875/96 (*eibG- α*), 06-03233 (*eibG- β*), 0520/99 (*eibG- γ*) und 1745/98 (*eibG-negativ*) 20 h bei 0 bzw. bei 180 rpm kultiviert und EibG-Lysate wieder mittels Hitzeextraktion hergestellt. Das applizierte Gesamtprotein der Lysate betrug 0,5 mg je MTP-well.

Generell wird durch die stationäre Kultivierung mehr EibG pro Zelle exprimiert (Stamm 1809/00, 06-03233 und 0520/99), wodurch der relative Anteil von EibG in den vorgelegten 0,5 mg Gesamtprotein erhöht ist. Die Ausnahme bildet hier der Stamm 2875/96 (*eibG- α*), bei dem die Werte der geschüttelten Kultivierung im Durchschnitt die der stationären Kulturen übersteigen. Aufgrund dieser Abweichung von dem generellen Affinitätsmuster im Vergleich zu den anderen WT-Stämmen konnte daher keine eindeutige Aussage getroffen werden, welcher der verschiedenen EibG-Subtypen eventuell über eine höhere Affinität zu humanem IgG verfügt. Anhand der Negativkontrolle (Stamm 1745/98), deren Signalstärke sich bei geschüttelter und stationärer Kultivierung kaum unterscheidet, kann die Veränderung der EibG-Konzentration in Lysaten *eibG*-positiver Stämme erneut auf unterschiedliche Kultivierungsbedingungen zurückgeführt werden. Die Messwerte *eibG*-positiver Stämme sind einerseits höher als die der Negativkontrolle, aber andererseits weichen die Signalstärken bei verschiedenen Stämmen und Kultivierungsbedingungen voneinander ab. Dies führt zu höheren Signalen bei den stationär kultivierten Stämmen. Die Abweichungen in den AS-Sequenzen bezogen auf die Affinitätsmuster würden zur weiteren Aufklärung der IgG-Bindungsstelle am EibG beitragen.

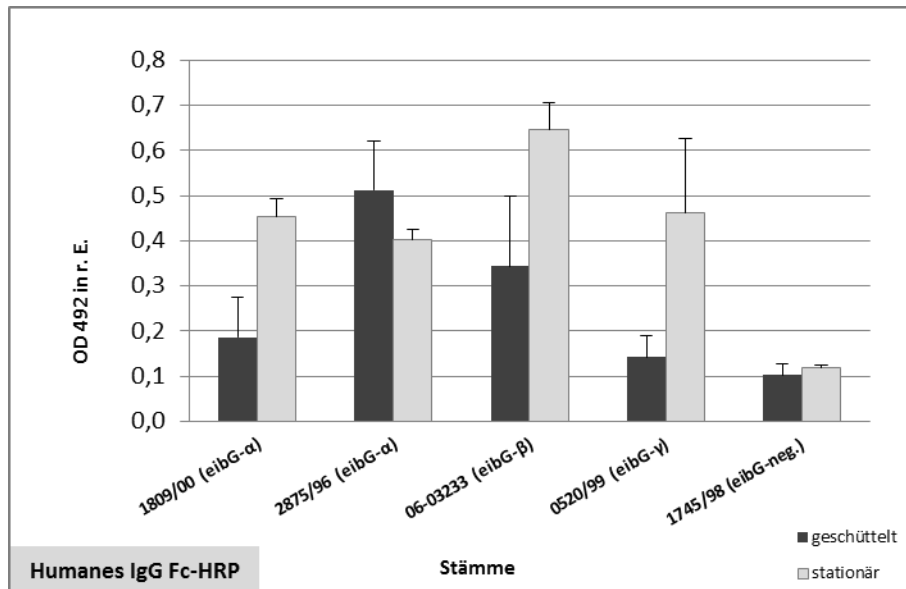


Abb. 58: Affinität von humanem IgG Fc-HRP gegenüber verschiedenen EibG-Subtypen aus Wildtypstämmen nach geschüttelter und stationärer Kultivierung.

Vergleich mittels ELISA von hitzeextrahierten EibG-Lösungen (Vorlage je *well* 0,5 mg Gesamtprotein) der folgenden WT-Stämme: 1809/00 (*eibG-α*); 2875/96 (*eibG-α*); 06-03233 (*eibG-β*); 0520/99 (*eibG-γ*); 1745/98 (*eibG-negativ*). Detektion erfolgte bei 492 nm.

4.10 1D – PEPTIDE MAPPING

Durch das MS – *peptide mapping* können gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine nach Trypsinierung anhand der charakteristischen Peptidmuster identifiziert werden. Es wurden EibG-Lysate von mehreren *eibG*-positiven WT-Stämmen mittels Hitzeextraktion hergestellt (vgl. Kapitel 4.8.2) und SDS-PAGE – Trennungen durchgeführt. Es folgten Mehrfachauftragungen der EibG-haltigen Lysate, so dass ein Teil des SDS-PAGE – Gels abgetrennt und für den Western-Blot mit dem IgG Fc-HRP – Konjugat und der andere Teil für das *peptide mapping* eingesetzt werden konnte.

In **Abb. 59** sind SDS-PAGE – Gele von vier *eibG*-positiven WT-Stämmen mit den dazugehörigen Immunblots dargestellt. Die sich auf einer Höhe mit der IgG Fc-HRP gefärbten Bande befindenden Proteine wurden mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und wie in Kapitel 3.10.2 beschrieben für MALDI-TOF-MS vorbereitet.

In **Abb. 60** sind die gemessenen MALDI-TOF-MS – Spektren von trypsinierten IgG Fc – bindenden Proteinen der vier *eibG*-positiven STEC abgebildet. Als das jeweilige Hauptbild der Teilabbildungen sind die Spektren der Peptidmassen (*peptide maps*) dargestellt. In der Mitte der Teilabbildungen sind die durch die Peptidfragmente identifizierten Peptide (rot) innerhalb des jeweiligen, in AS-Sequenz translatierten, *eibG*-Allels aufgezeigt.

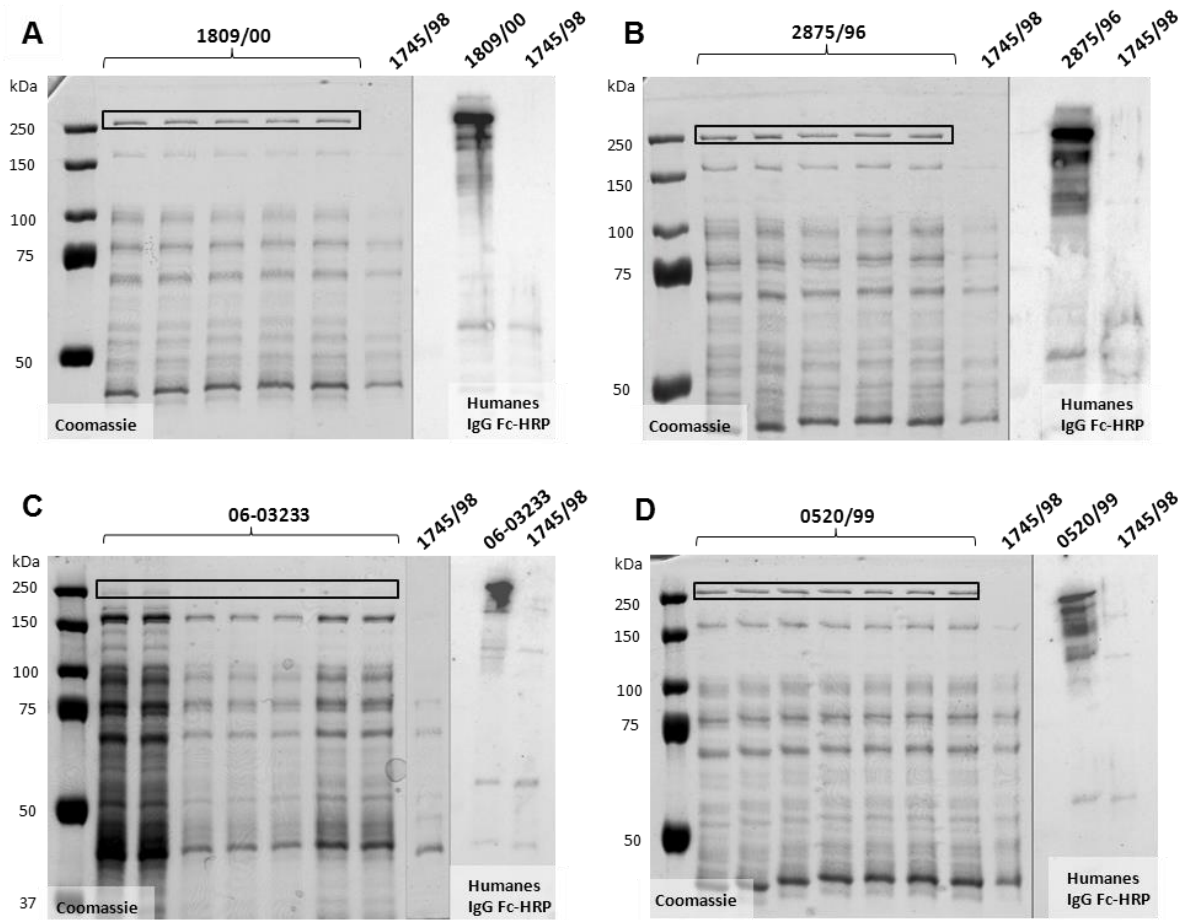


Abb. 59: Gelpräparation für Peptidmassen-Fingerabdruck mit MALDI-TOF-MS und ESI-MS.

In den einzelnen Teilabbildungen sind SDS-PAGE – Gele und Immunoblots von EibG-Lysaten folgender Wildtypstämme dargestellt: **(A)** Stamm 1809/00 (*eibG-α*); **(B)** Stamm 2875/96 (*eibG-α*); **(C)** Stamm 06-03233 (*eibG-β*); **(D)** Stamm 0520/99 (*eibG-γ*); **(rechte Teile der Abbildungen)** Immunblots mit Teilen der gleichen Gele und Detektion mit humanem IgG Fc-HRP und dem Stamm 1745/98 (*eibG*-negativ) als Negativkontrolle. Detektion der Proteine in den Gelen: Coomassie. Mit schwarzen Rechtecken sind die für MS ausgeschnittenen Proteinbanden markiert.

Auffällig in den Peptidspektren ist, dass sich die identifizierten Peptide überwiegend in der Mitte der AS-Sequenz des Proteins befinden und keine Peptide des N- bzw. C-terminalen Endes nachweisbar waren bzw. nicht identifiziert werden konnten. Aufgrund der abgespaltenen Signalsequenz am N-terminalen Ende können logischerweise auch keine Peptide von diesem Ende detektiert werden. Das C-terminale Ende von EibG könnte bei der Hitzeabscherung zum Teil noch in der äußeren Membran verankert und mit dieser von der untersuchten Fraktion abgetrennt worden sein. Andererseits kommen am C-terminalen und nach der Signalsequenz auch am N-terminalen Ende viele hydrophobe Aminosäuren vor, welche bei der ZipTip-C₁₈ – Entsalzung eventuell nicht von dem Säulenmaterial eluiert wurden und damit verloren gegangen sind.

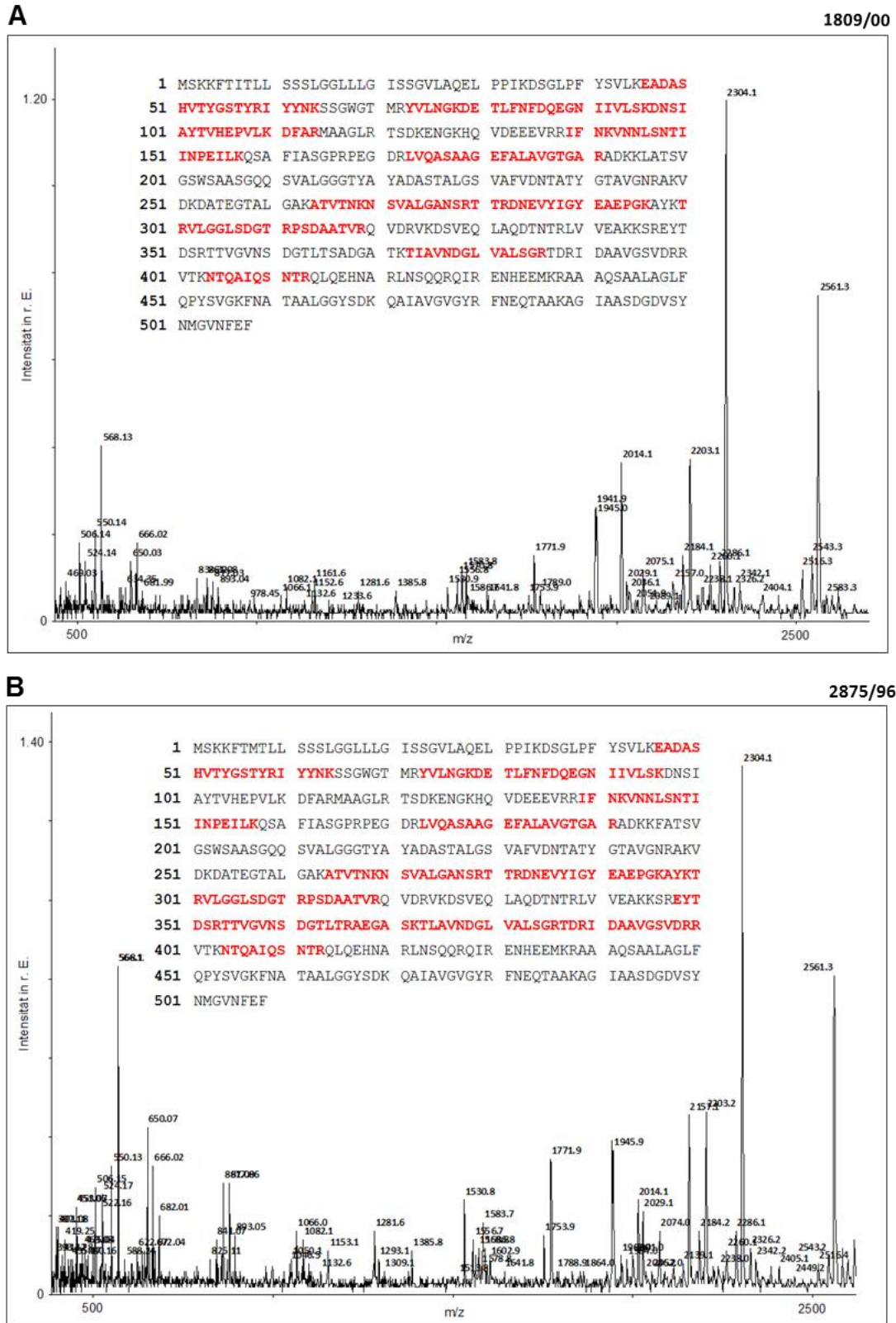


Abb. 60 (Teil 1): Peptidspektren der EibG-Gelspots von vier *eibG*-positiven Wildtypstämmen mittels MALDI-TOF-MS mit den identifizierten Treffern.

In einzelnen Teilabbildungen sind EibG-Spektren folgender Stämme dargestellt: (A) Stamm 1809/00 (*eibG*- α); (B) Stamm 2875/96 (*eibG*- α). Identifizierte Peptide innerhalb der EibG-Sequenz sind rot markiert.

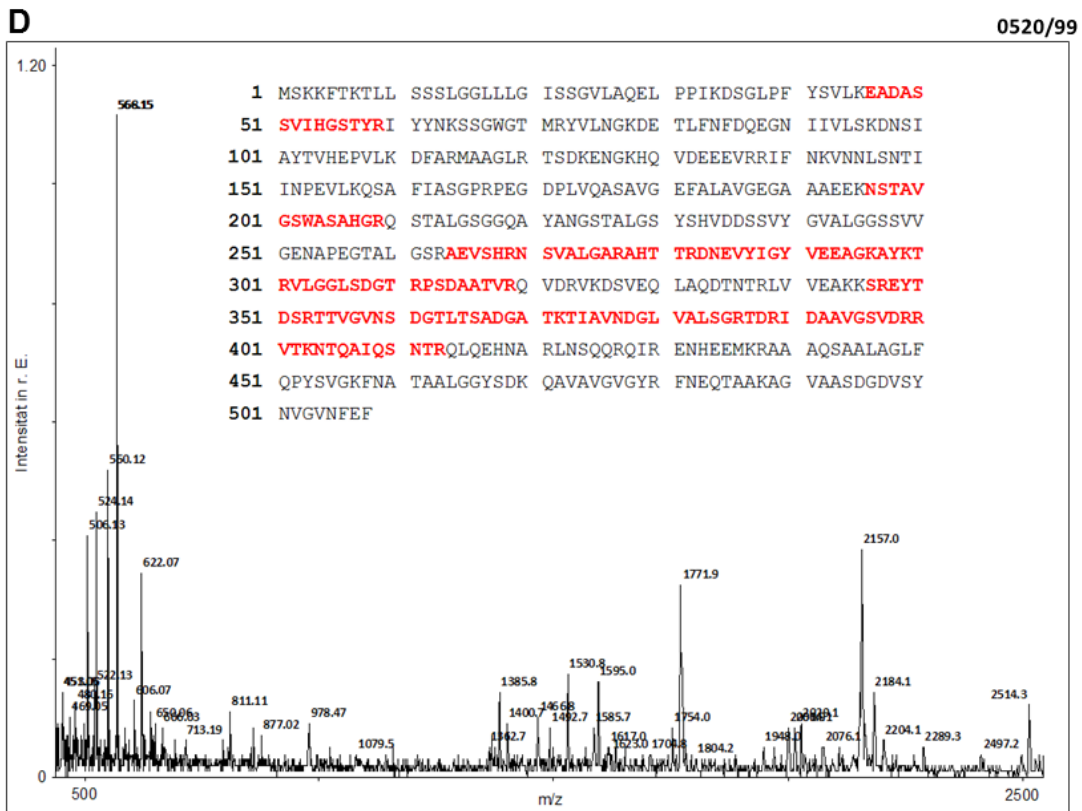
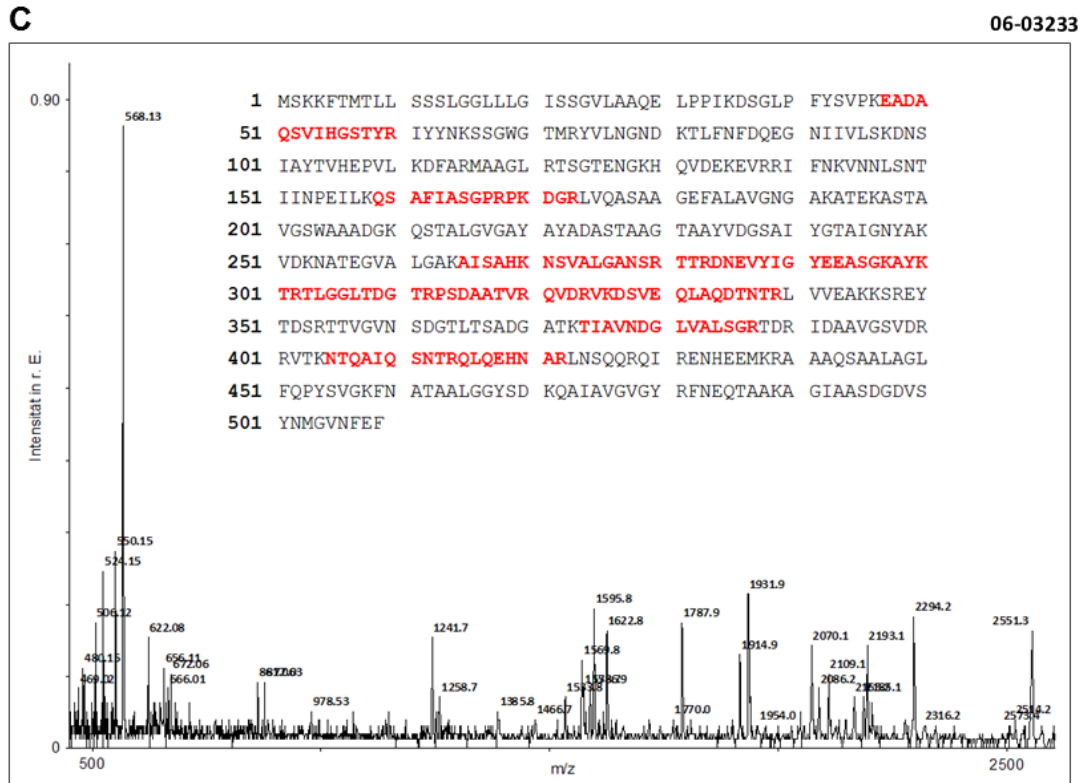


Abb. 60 (Teil 2): Peptidspektren der EibG-Gelspots von vier *eibG*-positiven Wildtypstämmen mittels MALDI-TOF-MS mit den identifizierten Treffern.

In einzelnen Teilabbildungen sind EibG-Spektren folgender Stämme dargestellt: **(C)** Stamm 06-03233 (*eibG*-β); **(D)** Stamm 0520/99 (*eibG*-γ). Identifizierte Peptide innerhalb der EibG-Sequenz sind rot markiert.

In **Abb. 61** ist das Peptidspektrum von EibG- α , welches durch den Klon B-1-10 exprimiert wurde, dargestellt. Auch hier befinden sich die meisten identifizierten Peptide in der Mitte der AS-Sequenz.

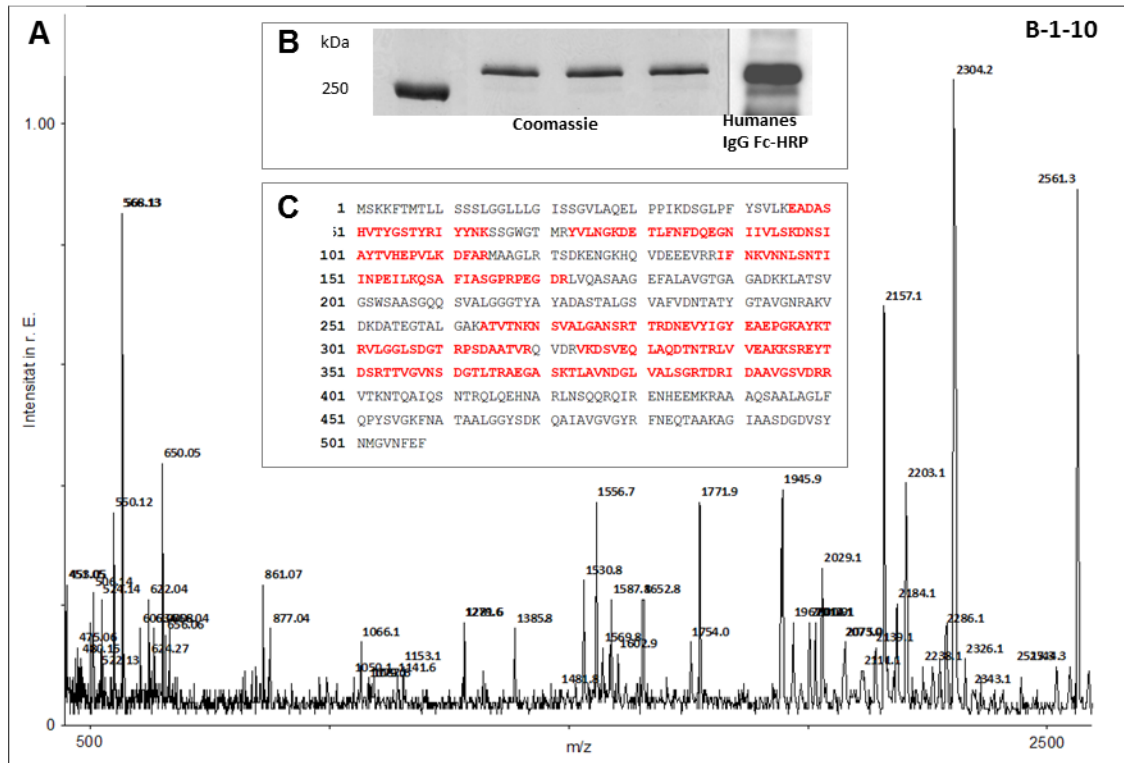


Abb. 61: peptide mass fingerprint von EibG des Stammes B-1-10 (*eibG*- α).

In den Teilabbildungen sind dargestellt: **(A)** Gesamtspektrum aller Peptide nach Trypsinverdau von EibG; **(B)** SDS-PAGE – Gel mit B-1-10 – Lysat und Immunblot mit humanem IgG Fc-HRP; **(C)** identifizierte Peptide innerhalb der EibG-Sequenz sind rot markiert.

In **Tabelle 21** sind die durch MALDI-TOF-MS identifizierten IgG Fc – bindenden Proteine aufgelistet. Die durchschnittliche Abdeckung der identifizierten Sequenz (*sequence coverage*) vom WT-EibG liegt bei 32% und vom Klon-EibG sogar bei 44% der Gesamtsequenz. Alle IgG Fc – bindenden Proteine wurden als EibG identifiziert und konnten dem entsprechenden *eibG*-Allel bzw. einem Allel mit geringer Abweichung in der AS-Sequenz zugeordnet werden (z. B. Stamm 1809/00: detektiertes Allel 015; Übereinstimmung mit realem Allel 001 beträgt 98,82%). Dadurch konnte auch massenspektrometrisch nachgewiesen werden, dass es sich bei den im Immunblot an IgG Fc – bindenden Proteinen um EibG handelt.

Tabelle 21: Mittels MALDI-TOF-MS identifizierte drei EibG-Subtypen

Stamm	<i>eibG</i> -Subtyp	Sequenz-abdeckung in %	score	expect	Identifizierte Peptide	Identifiziertes Protein	Zugehöriges <i>eibG</i> -Allel
1809/00	(<i>eibG</i> - α)	34	92	$2,4 \cdot 10^{-4}$	13	gi 299150308	015 (<i>eibG</i> - α)
2875/96	(<i>eibG</i> - α)	39	98	$6,4 \cdot 10^{-5}$	17	gi 299150310	016 (<i>eibG</i> - α)
06-03233	(<i>eibG</i> - β)	26	76	$8 \cdot 10^{-3}$	13	gi 299150318	020 (<i>eibG</i> - β)
0520/99	(<i>eibG</i> - γ)	29	90	$3,3 \cdot 10^{-4}$	13	gi 299150320	021 (<i>eibG</i> - γ)
B-1-10	(<i>eibG</i> - α)	44	112	$2,3 \cdot 10^{-6}$	17	gi 299150326	004 (<i>eibG</i> - α)

4.11 SEQUENZIERUNG VON PEPTIDEN MITTELS NANOESI-Q-TOF – MS

Mit Hilfe der nanoESI-Q-TOF MS wurden Peptide trypsinierter EibG-Proteine sequenziert, womit Strukturinformation, die über die Identifizierung der Peptidmassen mittels MALDI-MS hinausgehen, in Form der exakten AS-Sequenzen erhalten wurden (vgl. Kapitel 3.10.3). In

Tabelle 22 sind die AS-Abfolgen der sequenzierten Peptide mit den experimentell ermittelten (m/z_{exp}) und den theoretischen (m/z_{calc}) m/z -Werten der Peptide aufgelistet. Die ermittelten AS-Teilsequenzen wurden in **Abb. 62** den jeweiligen *eibG*-Allelen zugeordnet und innerhalb der AS-Gesamtsequenz farblich markiert.

<i>EibG-alpha</i>	1 MSKKFTMTLLSSSLGGLLLG ISSGVLAQEL	PP	IKDSGLPFYSVL	EADASHVTYGSTYRIYYNKSSGWGTMRYVVLNGKDETLFNF85
<i>EibG-beta</i>	1 MSKKFTKTLSSSLGGLLLG ISSGVLAQEL	PP	IKDSGLPFYSVL	EADASSVIGHSTYRIYYNKSSGWGTMRYVVLNGKDETLFNF85
<i>EibG-gamma</i>	1 MSKKFTMTLLSSSLGGLLLG ISSGVLA	QDEL	PPIKDSGLPFYSVL	EADALHVTYGSTYRIYYNKSSGWGTMRYVVLNGKDETLFNF85
<i>EibG-alpha</i>	86 DQEGNIIIVLSKDNSIAYTVHEPVLKDF	ARMAAGLR	TS	SDKENGKHQVDEEEVRRIFNKVNNLSNTIINPEILKQSAFIASGPRPEG170
<i>EibG-beta</i>	86 DQEGNIIIVLSKDNSIAYTVHEPVLKDF	ARMAAGLR	TS	SDKENGKHQVDEEEVRRIFNKVNNLSNTIINPEVLLKQSDFIASGPRPEG170
<i>EibG-gamma</i>	86 DQEGNIIIVLSKDNSIAYTVHEPVLKDF	ARMAAGLR	TS	SDKENGKHQVDEEEVRRIFNKVNNLSNTIINPEILKQSALFIASGPRPEG170
<i>EibG-alpha</i>	171 DRLVQASAAEGEFALAVGTGARADK	KFA	TSVGSWSAASGQQSVALGGGTYAYADASTALGSVAFVDNTATYGTAVGNRAKVDKDAT255	
<i>EibG-beta</i>	171 DPLVQASAVGEFALAVGEGAAAEK	NI	STAVGSWASAHGR	QSTALGSQQAYANGSTALGSYSHVDDSSVYGVALLGGSSVVGENAP255
<i>EibG-gamma</i>	171 DRLVQASAAEGEFALAVGTGARADK	KLAT	SVGSWSAASGQQSVALGGGTYAYADASTALGSVAFVDNTATYGTAVGNRAKVDKDAT255	
<i>EibG-alpha</i>	256 EGTALGAK	TTTRDNEVYIGYEAEPGKAYK	TRV	LGGLSDGTRPSDAATVRQVDRVKDSVEQLAQQDTNTRLV340
<i>EibG-beta</i>	256 EGTALGSRAEVSHRNSVALGAR	AHTTRDNEVYIGYEEAGKAYK	TRV	LGGLSDGTRPSDAATVRQVDRVKDSVEQLAQQDTNTRLV340
<i>EibG-gamma</i>	256 EGTALGAKATVTNKNSVALGANSR	TTTRDNEVYIGYEAEPGKAYK	TRV	LGGLSDGTRPSDAATVRQVDRVKDSVEQLAQQDTNTRLV340
<i>EibG-alpha</i>	341 VEAKKSR	EY	TD	SRTTVGVNSDGLTTRAEGASKTLAVNDGLVALSGRTDRIDAAVGSVDRRVTKNTQAIQSNTRQLQEHNARLNSQ425
<i>EibG-beta</i>	341 VEAKKSR	EY	TD	SRTTVGVNSDGLTTSADGATKTLAVNDGLVALSGRTDRIDAAVGSVDRRVTKNTQAIQSNTRQLQEHNARLNSQ425
<i>EibG-gamma</i>	341 VEAKKREY	TD	SRTTVGVNSDGLTTRAEGASKTLAVNDGLVALSGRTDRIDAAVGSVDRRVTKNTQAIQSNTRQLQEHNARLNSQ425	
<i>EibG-alpha</i>	426 QRQIRENHEEMKRAAAQSAALAGLFQ	PYSV	GKFNATAALGGYSDKQAI	AVGVGYRFNEQTAAKAGIAASDGDVSYNMGVNF EF 508
<i>EibG-beta</i>	426 QRQIRENHEEMKRAAAQSAALAGLFQ	PYSV	GKFNATAALGGYSDKQAVAVGVGYRF	NEQTAAKAGVAASDGDVSYNMGVNF EF 508
<i>EibG-gamma</i>	426 QRQIRENHEEMKRAAAQSAALAGLFQ	PYSV	GKFNATAALGGYSDKQAI	AVGVGYRFNEQTAAKAGIAASDGDVSYNMGVNF EF 508

Abb. 62: Mit nanoESI-Q-TOF MS/MS sequenzierte Peptide innerhalb der AS-Gesamtsequenzen der drei EibG-Subtypen.

(rot) Stamm 1809/00, Peptide innerhalb der EibG- α – Sequenz (Allel 001); (blau) Stamm 2875/96, Peptide innerhalb der EibG- α – Sequenz (Allel 16); (hellgrün) Stamm 06-03233, Peptide innerhalb der EibG- β – Sequenz; (dunkelgrün) Stamm 0520/99, Peptide innerhalb der EibG- γ – Sequenz; (grau) Stamm B-1-10, Peptid innerhalb der EibG- α – Sequenz; (Farbverläufe) je dunkler die Farbe, umso mehr Peptide wurden in diesem AS-Bereich eindeutig zugeordnet.

Auch durch die nanoESI-Q-TOF – MS konnten überwiegend Peptide aus den inneren Bereichen der AS-Sequenz des Proteins identifiziert werden. Bei dem durch den Klon B-1-10 exprimierten EibG konnte nur ein Peptidfragment eindeutig identifiziert werden. Durch die anschließende Sequenzierung mittels Tandem-MS (MS/MS) wurden zum ersten Mal AS-Teilsequenzen der drei EibG-Subtypen bestimmt und allelbedingte Unterschiede der EibG-Subtypen auf Proteinbasis ermittelt.

Tabelle 22: Mittels ESI-MS/MS sequenzierte EibG-Peptide

Stamm (<i>eibG</i> -Subtyp)	Probe Nr.	Sequenz Identifizierter Peptide	AS-Bereich innerhalb der EibG-Sequenz	m/z_{exp}	m/z_{calc}
1809/00 (<i>eibG</i> - α)	1_886			886,466 ⁺²	886,4685 ⁺²
	1_591	VLGGLSDGT RPSDAATVR	301-318	591,316 ⁺³	591,3148 ⁺³
	1_801	ATVTNKN SVALGANSR	264-279	801,930 ⁺²	801,9315 ⁺²
	1_780	GGLSDGT RPSDAATVR	304-319	780,397 ⁺²	780,3922 ⁺²
	1_729	VDRVKDSVEQ LAQDTNTR	320-337	729,029 ⁺³	729,0330 ⁺³
	1_693	TLAVNDGL VALSGR	373-386	693,393 ⁺²	693,3910 ⁺²
	1_660	TTVGVNS DGTLTR	354-366	660,840 ⁺²	660,8413 ⁺²
	1_654			654,569 ⁺⁴	654,5690 ⁺⁴
	1_872	EYT DSRTTVGVNS DGTTLRAEGA SK	348-372	872,421 ⁺³	872,4230 ⁺³
	1_622	TTVGVNS DGTTLRAEGA SK	354-372	621,984 ⁺³	621,9851 ⁺³
1_1007	EL PPIKDSGLPF YSVLK	28-44	1007,547 ⁺³	1007,5484 ⁺²	
2875/96 (<i>eibG</i> - α)	2_677	T RVLGGLSDGT RPSDAATVR	300-319	677,029 ⁺³	677,0310 ⁺³
	2_566	NTQAIQS NTR	404-413	566,786 ⁺²	566,7889 ⁺²
	2_535	ATVTNKN SVALGANSR	264-279	534,958 ⁺²	534,9568 ⁺²
	2_510	TDRI DAAVGSVDRR	387-400	510,938 ⁺³	510,9376 ⁺³
	2_932	TTVGVNS DGTTLRAEGA SK	354-372	932,475 ⁺²	932,4740 ⁺²
06-03233 (<i>eibG</i> - β)	3_629	AHT TRDNEVIYIG VEEAGKAYK	278-299	629,314 ⁺⁴	629,3119 ⁺⁴
	3_898	TTVGVNS DGTLSADGA TK	354-372	897,935 ⁺²	897,9394 ⁺²
	3_849	EYT DSRTTVGVNS DGTLSADGA TK	348-372	849,401 ⁺³	849,3999 ⁺³
	3_793_1	DNEVIYIG VEEAGK	283-296	793,377 ⁺²	793,3727 ⁺²
	3_793_2	DNSI AYTVEHPVLK	97-110	793,418 ⁺²	793,4147 ⁺²
	3_746	EADASVIHGSTYR	56-68	746,848 ⁺²	746,8550 ⁺²
0520/99 (<i>eibG</i> - γ)	3_700	NSTAV GSWASAHGR	196-209	700,833 ⁺²	700,8369 ⁺²
	4_696	AQE LPPIKDSGLP FYSVPK	28-46	696,043 ⁺³	696,0455 ⁺³
	4_894	TLGGLTDG TRPSDAATVR	303-320	894,463 ⁺²	894,4659 ⁺²
	4_787	GGLTDG TRPSDAATVR	305-320	787,396 ⁺²	787,4001 ⁺²
4_765	TTRDNEVIYIG YEEASGKAYK	281-300	765,370 ⁺³	765,3694 ⁺³	
B-1-10 (<i>eibG</i> - α)	5_802	ATVTNKN SVALGANSR	264-279	801,933 ⁺²	801,9315 ⁺²

(m/z_{exp}) experimentell ermittelte Masse des Peptidfragments; (m/z_{calc}) theoretisch ermittelte Masse des Peptidfragments.

4.12 IDENTIFIZIERUNG DER SIGNALSEQUENZ VON EIBG

Durch den *SignalP-4.0* – Server (Petersen *et al.*, 2011) sollten die Signalsequenz von EibG und die mittels MS nicht bestimmte Bereiche in der AS-Sequenz identifiziert werden. Basierend auf Daten zahlreicher oberflächenassoziierter Proteine gramnegativer Bakterien können die Signalsequenzen neu entdeckter Proteine vorhergesagt werden. In **Abb. 63** ist das Ergebnis der Signalsequenzbestimmung der ersten 70 Aminosäuren von EibG des *eibG*-Allels 001 dargestellt.

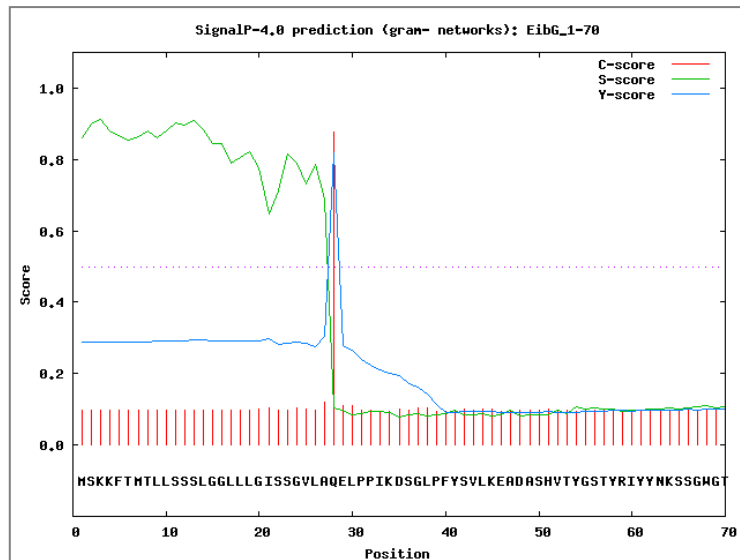


Abb. 63: Berechnung der Signalsequenz von EibG-001.

Screenshot der Auswertung auf dem SignalP 4.0 – Server.

Demnach bilden die ersten 27 Aminosäuren die Signalsequenz von EibG, welche durch das *sec*-System erkannt und an der Stelle VLA-QE von der restlichen AS-Kette abgespalten wird. Die durchschnittliche Masse der Signalsequenz von EibG-001 mit 27 Aminosäuren beträgt 2712,3 Da. Die Differenz innerhalb einer trimeren EibG-Struktur beträgt somit 8136,9 Da, wodurch einige Abweichungen vom theoretischen Gewicht eines EibG-Trimers in den SDS-PAGE – Gelen erklärt werden können.

<i>EibG-alpha/1-27</i>	1	MSKKFTMTLLSSSLGGLLLGISSGVL - A
<i>EibG-beta/1-28</i>	1	MSKKFTMTLLSSSLGGLLLGISSGVLAA
<i>EibG-gamma/1-2</i>	1	MSKKFTKTLSSSLGGLLLGISSGVL - A

Abb. 64: Vergleich der theoretisch bestimmten Signalsequenzen der drei EibG-Subtypen.

(EibG-alpha) Allel *eibG*-001; (EibG-beta) Allel *eibG*-020; (EibG-gamma) Allel *eibG*-021. Berechnung mit Jalview.

In **Abb. 64** wurden die ersten 27 bzw. 28 Aminosäuren der drei EibG-Subtypen miteinander verglichen. Zwei wesentliche Unterschiede konnten hier festgestellt werden: die Abweichungen in der 7. und 28. Aminosäure innerhalb der EibG-Subtypen. EibG- α (Allel 001) und EibG- β (Allel 020) weisen an Position 7 die Aminosäure Methionin auf, während sich beim EibG- γ (Allel 021) an dieser Stelle Lysin befindet, was einen Austausch von einer unpolaren mit einer basischen Aminosäure darstellt. Nur die Signalsequenz von einem EibG- α – Allel (Allel 015) unterscheidet sich ebenfalls in der 7. Aminosäure. An dieser Stelle wurde Methionin durch Isoleucin ersetzt, wobei hier zwei hydrophobe Aminosäuren gegeneinander ausgetauscht wurden. Weiterhin ist die Spaltstelle beim EibG- β um einen Alanin-Rest länger als bei den beiden anderen EibG-Subtypen. Somit besteht eine geringe, aber eventuell funktionell relevante Differenz zwischen den Signalsequenzen der EibG-Subtypen, die sich z. B. auf die Erkennung durch das *sec*-System auswirken könnte.

4.13 2D-GELELEKTROPHORESE

Verschiedene Kultivierungsbedingungen können den Stoffwechsel von *E. coli* insofern beeinflussen, als dass die Expression einiger Proteine hoch- bzw. herunterreguliert wird. Um kulturbedingte

Veränderungen der Proteinexpression zu analysieren, wurden *eibG*-positive STEC bei 0 bzw. 180 rpm kultiviert und die Zelllysate mittels 2D-GE untersucht.

4.13.1 2D-Gele *eibG*-positiver STEC-Stämme

In **Abb. 65** bis **Abb. 67** sind die 2D-Gele von Zelllysaten der WT-Stämme 1809/00 (*eibG*- α), 06-03233 (*eibG*- β) und 0520/99 (*eibG*- γ) nach geschüttelter und stationärer Kultivierung vergleichend dargestellt. Schon mit bloßem Auge lassen sich einige Unterschiede im Proteommuster der Stämme aus geschüttelter und stationärer Kultur erkennen. Vor allem im Bereich der 2D-Gele mit saurem pI (pI 3 bis pI 7) wurden einige Proteine mit unterschiedlichen Signalstärken detektiert.

Um kulturbedingte Expressionsunterschiede nachweisen zu können, wurden alle Ansätze gleich behandelt. Dies ist die Voraussetzung dafür, um die z. T. geringen Abweichungen in den Proteinspots auch wirklich auf eine veränderte Proteinexpression von *E. coli* zurückführen zu können. In **Abb. 66** (Stamm 06-03233) und **Abb. 67** (Stamm 0520/99) treten, wie schon in **Abb. 65** (Stamm 1809/00) gezeigt, ebenfalls Intensitätsunterschiede bei einigen Proteinspots auf. Da sich die Proteommuster dieser *E. coli* – Stämme sehr ähneln, konnte davon ausgegangen werden, dass reproduzierbare Probenaufbereitungen und 2D-Gelelektrophoresen gelungen waren.

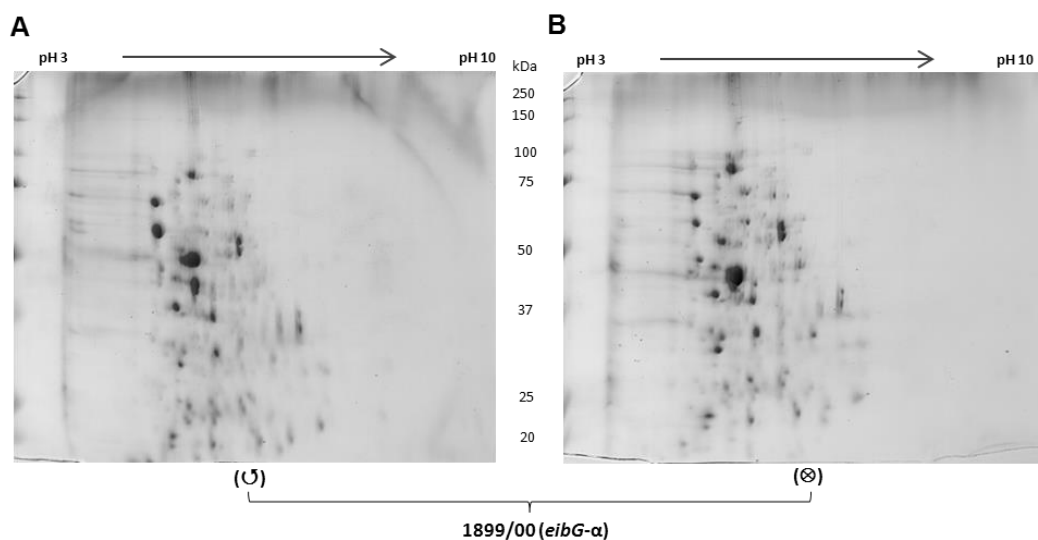


Abb. 65: 2D-Gelelektrophorese vom Gesamtzelllysate des Wildtypstammes 1899/00 (*eibG*- α).

(A) Stamm wurde bei 180 rpm kultiviert (U); (B) Stamm wurde bei 0 rpm kultiviert (O). Gesamtproteinauftrag pro Gel: 150 μ g. Färbung: Coomassie.

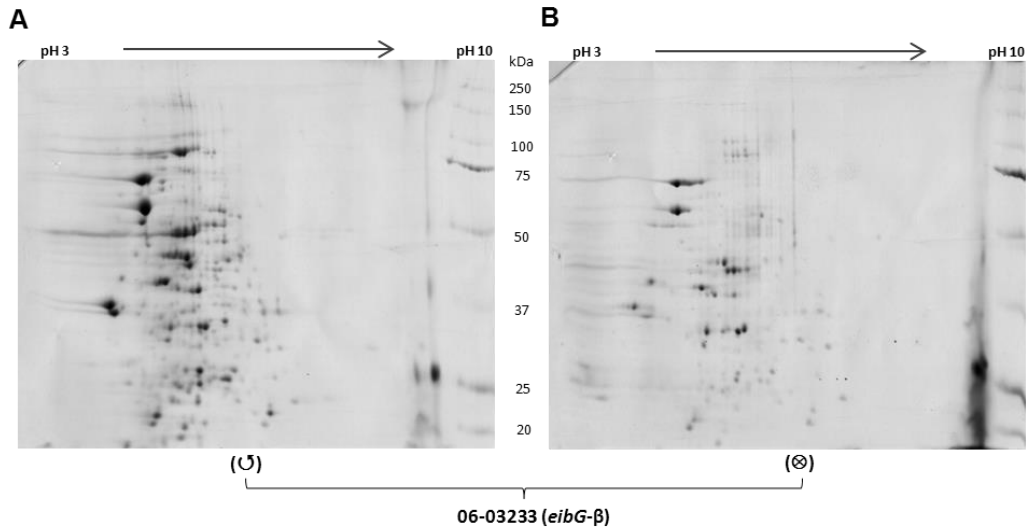


Abb. 66: 2D-Gelelektrophorese vom Gesamtzelllysate des Wildtypstammes 06-03233 (*eibG-β*).

(A) Stamm wurde bei 180 rpm kultiviert (U); (B) Stamm wurde bei 0 rpm kultiviert (O). Gesamtproteinauftrag pro Gel: 150 µg. Färbung: Coomassie.

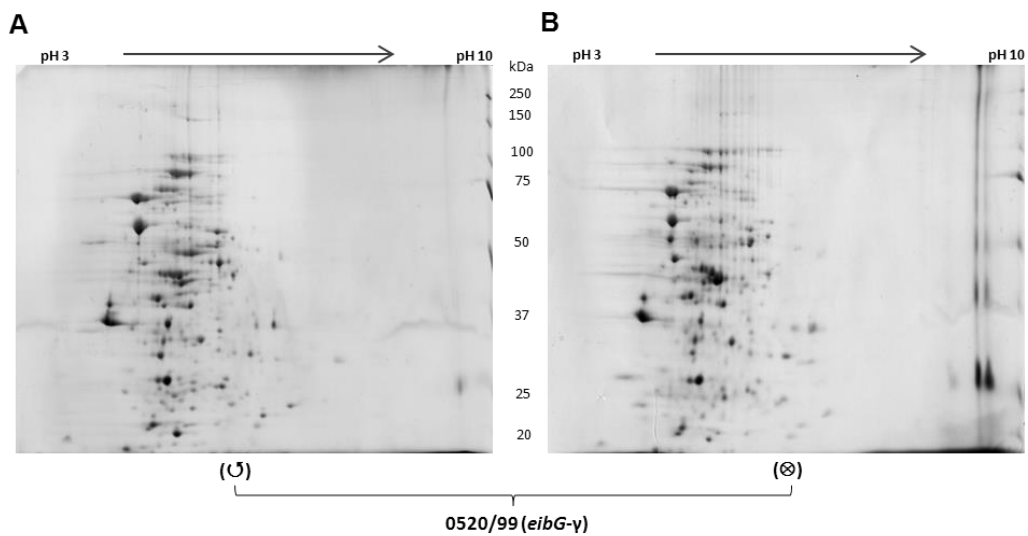


Abb. 67: 2D-Gelelektrophorese vom Gesamtzelllysate des Wildtypstammes 0520/99 (*eibG-γ*).

(A) Stamm wurde bei 180 rpm kultiviert (U); (B) Stamm wurde bei 0 rpm kultiviert (O). Gesamtproteinauftrag pro Gel: 150 µg. Färbung: Coomassie.

Um weitere Aussagen über die Veränderungen im Proteommuster nach geschüttelter und stationärer Kultivierung machen zu können, wurden aus den Gelspots die Proteine isoliert, die sich in ihrer Intensität unterschieden, und diese mittels MALDI-TOF-MS *peptide mass fingerprinting* identifiziert.

4.13.2 2D – peptide mapping

In diesem Abschnitt wird das Prozedere des 2D – *peptide mappings* am Beispiel von dem *eibG*-positiven WT-Stamm 1809/00 dargestellt. In **Abb. 68** sind die 2D-Gele des Lysats des Stammes 1809/00 nach Kultivierung bei 0 und 180 rpm gezeigt (vgl. Kapitel 3.9).

Nach der Coomassiefärbung (Abb. 68 Reihe A) der beiden Gele wurden einige sich in ihrer Intensität unterscheidende Proteinspots ausgeschnitten und die Gele weiter einer Silbernitratfärbung (Reihe B) unterzogen. Die jeweiligen Abbildungen einer Färbung wurden mittels der *Delta2D*-Software (Demo-Version, Decodon; *Millioni et al.*, 2010) überlagert (Abb. 68 A₂ bzw. B₂) und sowohl die gemeinsamen als auch die abweichenden Spots (Abb. 68 A₃ bzw. B₃) farblich unterscheidbar markiert.

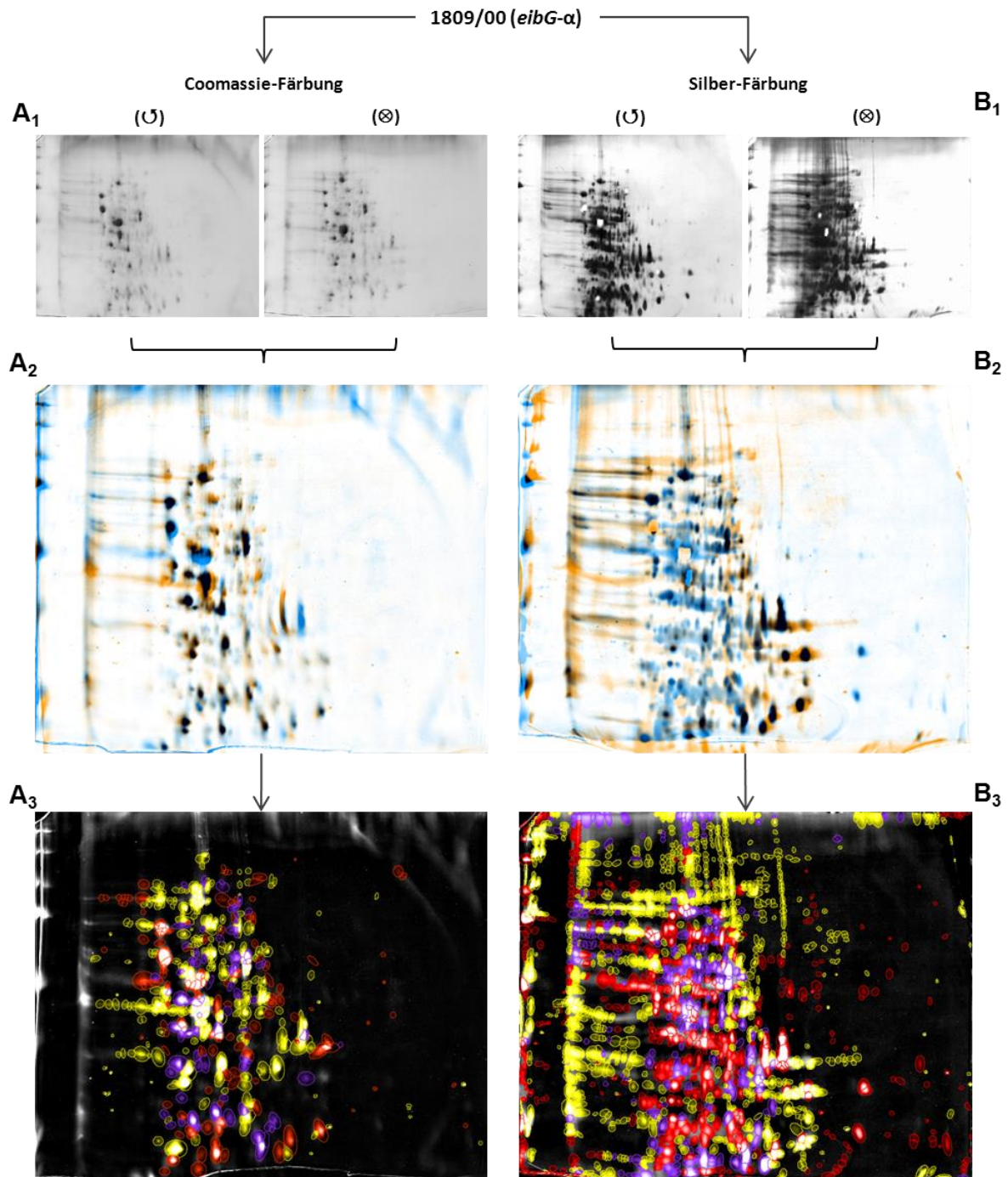


Abb. 68: Unterschiede im Proteommuster zwischen geschüttelter (U) und stationärer (⊗) Kultivierung des Wildtypstammes 1809/00 (*eibG-α*).

Zusammenführung der mit Coomassie (**Spalte A**) und mit Silbernitrat (**Spalte B**) gefärbten 2D-Gele. (**A₁ und B₁**) Gele vor der Zusammenführung; (**A₂ und B₂**) Gele nach dem Übereinanderlegen (*warping*); (**A₃ und B₃**) Detektion der Spots: (**gelb**) Proteinspots nach geschüttelter Kultivierung; (**rot**) Proteinspots nach stationärer Kultivierung, (**violett**) gemeinsame Spots.

In **Abb. 69** sind die beiden 2D-Geltrennungen der Lysate des WT-Stammes 1809/00 (*eibG-α*) der geschüttelten (Abb. 69 A₁ und A₂) und stationären (Abb. 69 B₁ und B₂) Kulturen nach Coomassie- bzw. Silberfärbung noch einmal einzeln abgebildet. Aus beiden Gelen wurden diejenigen in den Gelen markierten Proteinspots herausgeschnitten, die jeweils nur in einem Gel auftraten bzw. sich in ihrer Intensität unterschieden.

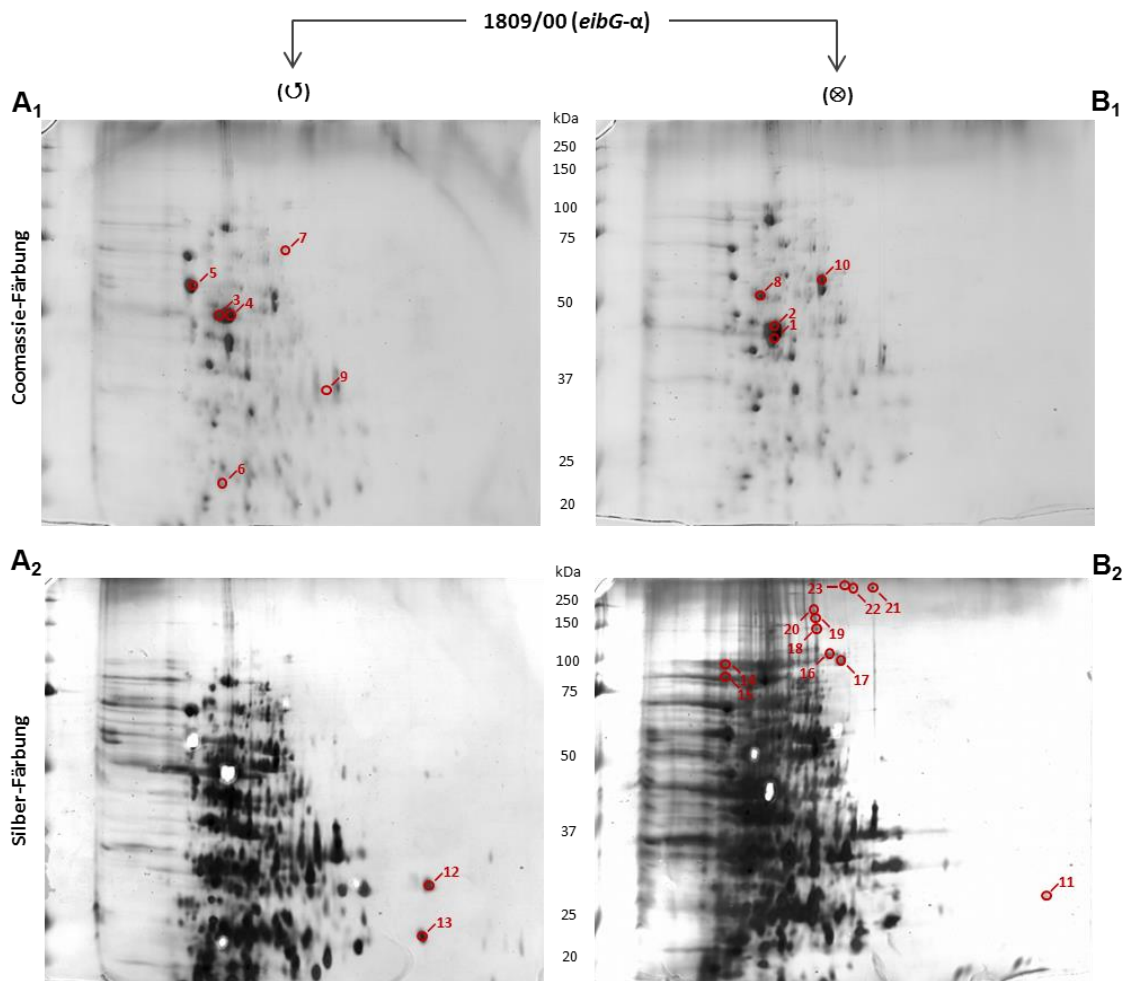


Abb. 69: Ausgeschnittene Proteinspots aus vier Gelen der Lysate des Wildtypstammes 1809/00 (*eibG-α*) nach verschiedener Kultivierung für die MALDI-MS – Identifizierung.

(**Spalte A**) Gele mit Proteom aus geschüttelter (U) Kultur des Stammes; (**Spalte B**) Gele mit Proteom aus stationärer (O) Kultur; (**A₁ und B₁**) mit Coomassie gefärbte Gele; (**A₂ und B₂**) mit Silber gefärbte Gele; 1 bis 23: Nummerierung der ausgeschnittenen Gelspots.

Es wurden insgesamt 23 Proteinspots ausgewählt und aus den beiden Gelen ausgeschnitten, deren Proteine dann mittels MALDI-TOF-MS und *peptide mass fingerprinting* (vgl. Kapitel 3.10) identifiziert wurden. In **Abb. 70** sind exemplarisch zwei Peptidspektren von Spot 2 (Coomassie-färbung) und Spot 15 (Silberfärbung) dargestellt.

Mit Coomassie gefärbte Proteine konnten aufgrund des geringen Hintergrundrauschens (Abb. 70 A) und den größeren Peptidpeaks leichter identifiziert werden als die mit Silbernitrat gefärbten Proteine. Jedoch konnte durch manuelle Peaksetzung der silbergefärbten Proteine (Abb. 70 B) auch diese zum großen Teil eindeutig unterschieden werden. Die identifizierten Proteine sind in **Tabelle 23** mit der jeweiligen *UniProt-ID*, dem Gennamen, der Sequenzabdeckung und ihrer Funktion aufgelistet.

Die *E. coli* – Zellen wurden nach 20-stündiger Kultivierung lysiert. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich Zellen der geschüttelten Kultivierung in der späten stationären Phase und exprimieren verstärkt Adhäsionsfaktoren zur Biofilmbildung (vgl. Abb. 52 B), wobei die Expression von EibG zu diesem Zeitpunkt bereits leicht zurück geht (vgl. Abb. 52 C). Stationär kultivierte Stämme befinden sich nach 20 h am Ende der exponentiellen bzw. am Anfang der stationären Wachstumsphase und exprimieren zu diesem Zeitpunkt verstärkt EibG.

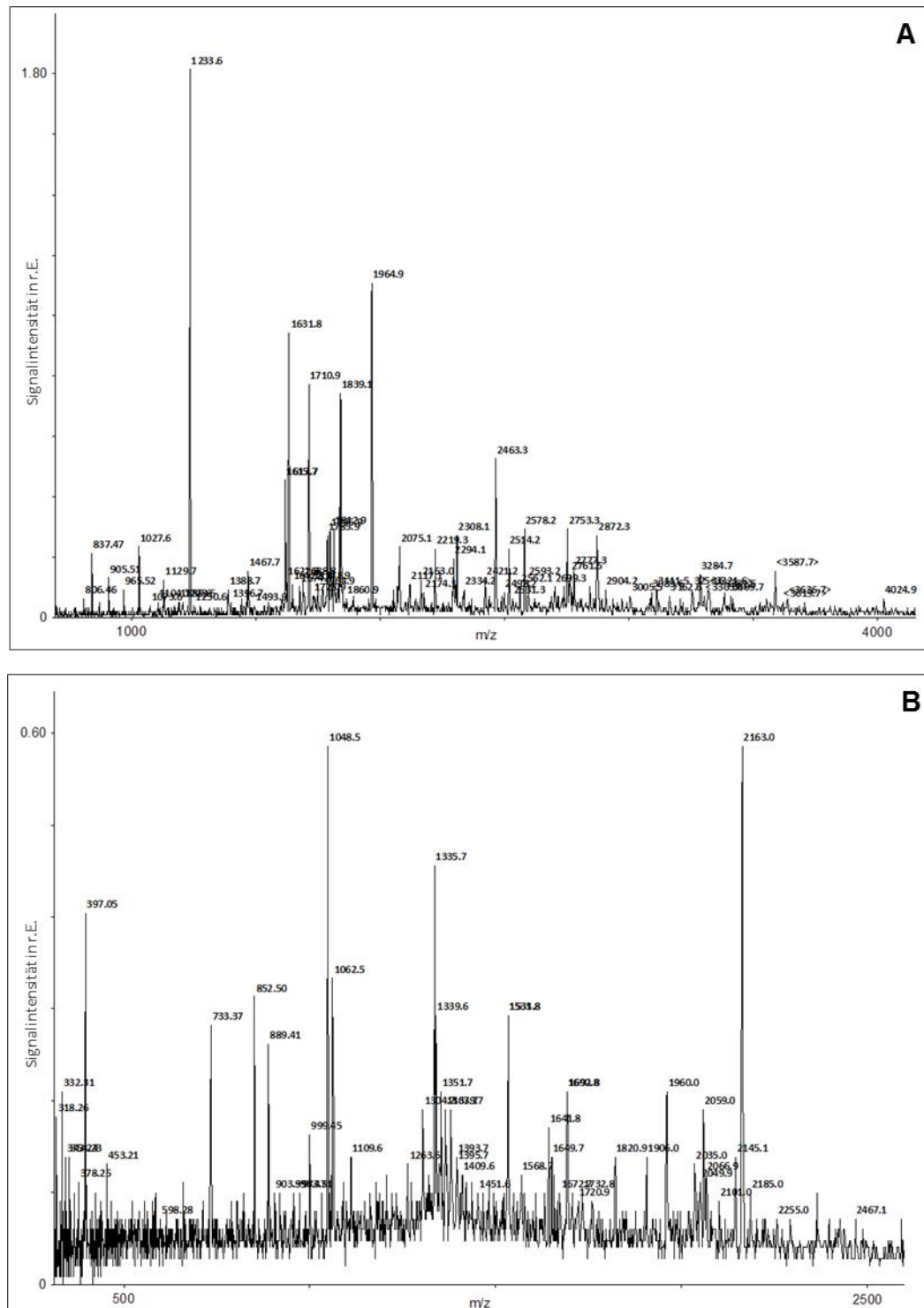


Abb. 70: MS-Spektren der Proteinspots 2 und 15 mit Massenzuweisung der erhaltenen Peaks.

(A) Gel-Spot Nr. 2 aus dem mit Coomassie gefärbten Gel (vgl. Abb. 69 B₁), **(B)** Gel-Spot Nr. 15 aus dem mit Silbernitrat gefärbten Gel (vgl. Abb. 69 B₂).

In keinem der untersuchten Proteinspots konnte EibG nachgewiesen werden. Anscheinend verteilt sich EibG als mono-, di-, tri- oder oligomere Struktur über das gesamte Gel und kann bei der Vielzahl an Proteinspots nicht als ein größerer individueller Spot detektiert werden. Die ersten zehn Proteinspots stammen aus den mit Coomassie gefärbten Gelen. Die Spots mit den größten Intensitätsunterschieden sind Nr. 1 bis 4. Jedoch zeigte sich, dass die Spots 1 und 2 (geschüttelte Kultur, Abb. 69 B₁) sowie 3 und 4 (stationäre Kultur, Abb. 69 A₁) jeweils die gleichen Proteine TufA bzw. GadB darstellen. Sowohl diese vier als auch die weiteren sechs Proteine (Spots 5 bis 10) aus den mit Coomassie gefärbten Gelen gehören zur Grundaustattung hinsichtlich des Stoffwechsels von *E. coli* (wie z. B. *fumA* aus dem Zitratzyklus). Auch die Proteine der Spots 12 (GltL), 13 (GrxB), 17 (SucA), 18 (DmsA), 20 (HsdR) und 22 (Mfd) aus den mit Silbernitrat gefärbten Gelen stellen Proteine dar, die an der Aufrechterhaltung der StoffwechsellLeistungen und Reparaturmechanismen von *E. coli* beteiligt sind. Die Konzentrationen dieser Proteine zeigen leichte Schwankungen durch die unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen.

Interessant sind die Proteine der verbleibenden Spots 11 (MlaC), 14 (LptD), 15 (BamA), 19 (RhsB) und 21 (StfR) der silbergefärbten Gele. Diese wurden im Lysat stationär kultivierter WT-Stämme nachgewiesen und sind alle am Aufbau von Komponenten der äußeren *E. coli* – Membran beteiligt. MlaC und LptD sind am Transport von Phospholipiden in bzw. aus der Zelle beteiligt. BamA (vgl. auch Kapitel 1.3.7) unterstützt die Synthese der β -Barrel – Strukturen von OMP und unter anderem auch der trimerischen Autotransporter. RhsB gehört zur Rhs-Proteinfamilie, die an der Biogenese der äußeren Bakterienmembran beteiligt ist und unter anderem den Transport von Polysacchariden reguliert. StfR unterstützt durch Ausbildung von faserartigen Strukturen die Interaktion zwischen den Zellen und agiert somit direkt bei der Biofilmbildung (Wang *et al.*, 2010).

Da diese Proteine in den Gelen der stationär kultivierten Stämme etwas stärkere Intensitäten aufweisen (vgl. auch Abb. 65 bis Abb. 67) als bei den Schüttelkulturen, kann auf eine verstärkte Biofilmbildung, ausgelöst durch die stationäre Kultivierung, geschlossen werden. Somit wurden durch die 2D-GE weitere, zuvor nicht mit EibG in Verbindung gebrachte Proteine identifiziert werden, die an der Ausbildung der Biofilmmatrix und eventuell auch an der Sekretion von EibG oder weiteren Adhäsionsfaktoren beteiligt sind.

Tabelle 23: Identifizierte Proteinspots aus den 2D-Gelen mittels MALDI-TOF – MS peptide mass fingerprinting

Spot-Nr.	UniProt-ID	Bester Treffer	Genname (Enzym-Nr.)	Sequenzabdeckung in %	MW in Da	pI	Beschreibung
1 (⊗)	E7I2X2 (E7I2X2_ECOLX)	<i>Translation elongation factor Tu</i>	tufA	43,7	40946	5,4	GTP-bindender Elongationsfaktor
2 (⊗)	Q0TCC0 (EFTU1_ECOL5)	<i>Elongation factor Tu 1</i>	tuf1	39,0	43284	5,3	Fördert die GTP-abhängige Bindung der Aminoacyl-tRNA an der A-Seite der Ribosomen während der Proteinbiosynthese.
3 (⊗)	Q8FHG5 (DCEB_ECOL6)	<i>Glutamate decarboxylase beta</i>	gadB (4.1.1.15)	46,8	52654	5,4	Wandelt Glutamat zu Gamma-aminobutyrat (GABA) um. Das <i>gad</i> -System unterstützt die Aufrechterhaltung eines neutralen pH-Wertes bei sauren Bedingungen, wie z. B. im menschlichen Magen-Trakt. Wichtig für die Kolonisation in Säuger-Wirten.
4 (⊗)				wie 3			
5 (⊗)	P0A6F5 (CH60_ECOLI)	60 kDa chaperonin, Cpn60	groL	51,1	57329	4,8	Unterstützt die Proteinfaltung unter Stressbedingungen.
6 (⊗)	H6MLK9_ECOLX	Rekombinationsprotein NinB aus dem Lambda-Phagen	ninB	16,0	16167	7,8	<i>ninB (orf)</i> bildet zusammen mit <i>ninG (rap)</i> die <i>ninR</i> -Rekombinationsregion des Lambda-Phagen und unterstützt die RecF- und RecBCD-Rekombinationswege von <i>E. coli</i> .
7 (⊗)	D7ZF41 (D7ZF41_ECOLX)	Transketolase	(2.2.1.1)	17,2	73011	5,8	Überträgt eine Ketolgruppe von Xylulose-5-phosphat auf ein Aldol und verbindet die Glykolyse mit dem Pentosephosphatweg.
8 (⊗)	Q8XDS0 (ASPA_ECO57)	Aspartase	aspA (4.3.1.1)	42,1	52357	5,2	Lyase
9 (⊗)	P16700 (CYSP_ECOLI)	<i>Thiosulfate-binding protein</i>	cysP	33,7	37615	7,8	Periplasma-bindende Komponente der ABC-Superfamilie. CysP bindet spezifisch an Thiosulfat und ist an seinem Transport zum transmembranen Bereich beteiligt.
10 (⊗)	Q8X4P8 (FUMA_ECO57)	<i>Fumarate hydratase class I</i>	fumA (4.2.1.2)	37,6	60298	6,1	Enzym des Zitratzyklus beim Wachstum in aeroben Bedingungen.
11 (⊗)	P0ADV7 (MLAC_ECOLI)	<i>Putative phospholipid-binding protein, MlaC</i>	mIaC, yrbC	32,2	23963	9,4	Verhindert Akkumulation von Phospholipiden an der Zelloberfläche. Transportiert unter anderem die Phospholipide durch den periplasmatischen Raum und bindet diese an den <i>mIaFEDB</i> -Komplex an der inneren Zellmembran.
12 (⊗)	P37902 (GLTI_ECOLI)	<i>Glutamate/aspartate periplasmic-binding protein</i>	gltI, ybeI	26,2	33420	8,6	Gehört der bakteriellen Protein 3 Familie an, welche für die Bindung gelöster Teilchen zuständig ist (<i>solute-binding</i>). Bindet an Glutamat und Aspartat.

Spot-Nr.	UniProt-ID	Bester Treffer	Genname (Enzym-Nr.)	Sequenzabdeckung in %	MW in Da	pI	Beschreibung
13 (U)	P0AC61 (GLRX2_ECO57)	Glutaredoxin-2, Grx2	grxB, grx2	23,3	24350	7,7	Zusammen mit Glutathion-Reduktase bildet es ein Komplex zur Reduzierung einiger Disulfide. Agiert nicht als Wasserstoff-Doner für Ribonukleotid-Reduktase.
14 (X)	A1A7A3 (LPTD_ECOK1)	<i>LPS-assembly protein, LptD; Organic solvent tolerance protein, OstA</i>	lptD, ostA	15,7	89626	5,1	Zusammen mit <i>lptE</i> ist es in den Einbau von LPS in die äußere Zellmembran involviert. Bestimmt die Toleranz zu N-Hexan und die Permeabilität der äußeren Membran. Essentiell für die Biogenese.
15 (X)	B1LGX9 (BAMA_ECOSM)	<i>Outer membrane protein assembly factor, BamA</i>	bamA, yaeT	28,1	90383	5,0	Vermittelt den Aufbau von β -Barreln der Proteine der äußeren Zellmembran bei Bakterien. Gehört der POTRA-Domän an (<i>polypeptide-transport-associated domain</i>).
16 (X)	Keine Identifizierung						
17 (X)	P0AFG5 (ODO1_ECO57)	<i>2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component, SucA</i>	sucA (1.2.4.2)	8,6	105063	6,0	Der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase Komplex katalysiert die Umwandlung von 2-Oxoglutarat zu Succinyl-CoA und CO ₂ .
18 (X)	P18775 (DMSA_ECOLI)	<i>Dimethyl sulfoxide reductase, DmsA</i>	dmsA (1.8.5.3)	3,2	90399	6,4	DMSO-Reduktase agiert als terminale Reduktase unter anaeroben Bedingungen mit DMSO als terminaler Elektronen-Akzeptor. Export erfolgt größtenteils durch das <i>tat</i> -Sekretionssystem (<i>twin-arginine translocation pathway</i>), kann aber teilweise durch das <i>sec</i> -Sekretionssystem transportiert werden.
19 (X)	P16917 (RHSB_ECOLI)	Protein RhsB	rhsB	4,1	159396	6,3	Rhs-Proteinfamilie spielt eine wichtige Rolle bei der Biogenese der äußeren Bakterienmembran und ist an der Synthese und dem Transport von Polysacchariden beteiligt.
20 (X)	P08956 (T1RK_ECOLI)	<i>Type I restriction enzyme EcoKI R protein</i>	hsdR (3.1.21.3)	4,8	134096	5,7	Endonuklease-aktives Enzym zur Spaltung von DNA mit zufälligen Doppelstrangfragmenten mit terminalen 5'-Phosphatresten als Produkt.
21 (X)	P76072 (STFR_ECOLI)	<i>Side tail fiber protein homolog from lambdoid prophage Rac</i>	stfR, ynaB	1,5	113781	7,3	Unterstützt die Interaktion zwischen Organismen und weist Carboxypeptidase-Aktivität auf.
22 (X)	P30958 (MFD_ECOLI)	<i>Transcription-repair-coupling factor</i>	mfd (3.6.4.-)	3,2	129984	5,8	Reparation falsch transkribierter DNA.
23 (X)	wie 22						

4.14 ELEKTRONENMIKROSKOPIE

Mittels Elektronenmikroskopie sollte die Verteilung von EibG auf der Oberfläche von *E. coli* nachgewiesen werden. Dafür wurden die in den folgenden Abbildungen gezeigten WT-Stämme 20 h bei 0 rpm kultiviert und von diesen Kulturen Zellpräparate für die Elektronenmikroskopie hergestellt (vgl. Kapitel 3.5).

Als Erstes galt es, den Detektionsantikörper (Ziege-anti-human-IgG), der mit 12 nm großen Goldpartikeln konjugiert ist, auf unspezifische Bindung an Oberflächenstrukturen von *E. coli* zu überprüfen. Dafür wurde der *eibG*-negative *E. coli* – Stamm 1745/98 (O91:H21) eingesetzt (**Abb. 71**). Abb. 71 A und B zeigen jeweils eine elektronenmikroskopische Aufnahme einer *E. coli* – Zelle, wobei in beiden Fällen zuerst humanes IgG (ohne Konjugate) und danach der Detektionsantikörper (Goldpartikel-konjugiert) auf die Zellen gegeben wurde. Bei den Darstellungen in Abb. 71 C und D wurde nur der goldkonjugierte Detektionsantikörper eingesetzt.

Sowohl mit beiden als auch nur mit dem Detektionsantikörper können vereinzelte Goldpartikel (schwarze Punkte) detektiert werden. Abb. 71 B und D zeigen Vergrößerungen der *E. coli* – Zelloberfläche, auf der die Fimbrien gut zu erkennen sind. Genau an diesen Fimbrien sind einzelne Goldpartikel, und damit der Detektionsantikörper, zu erkennen. Somit kann eine, wenn auch nur geringe, unspezifische Bindung des Detektionsantikörpers an Fimbrien-assoziierte Strukturen bei den folgenden Untersuchungen zur Oberflächenassoziation von EibG nicht ausgeschlossen werden.

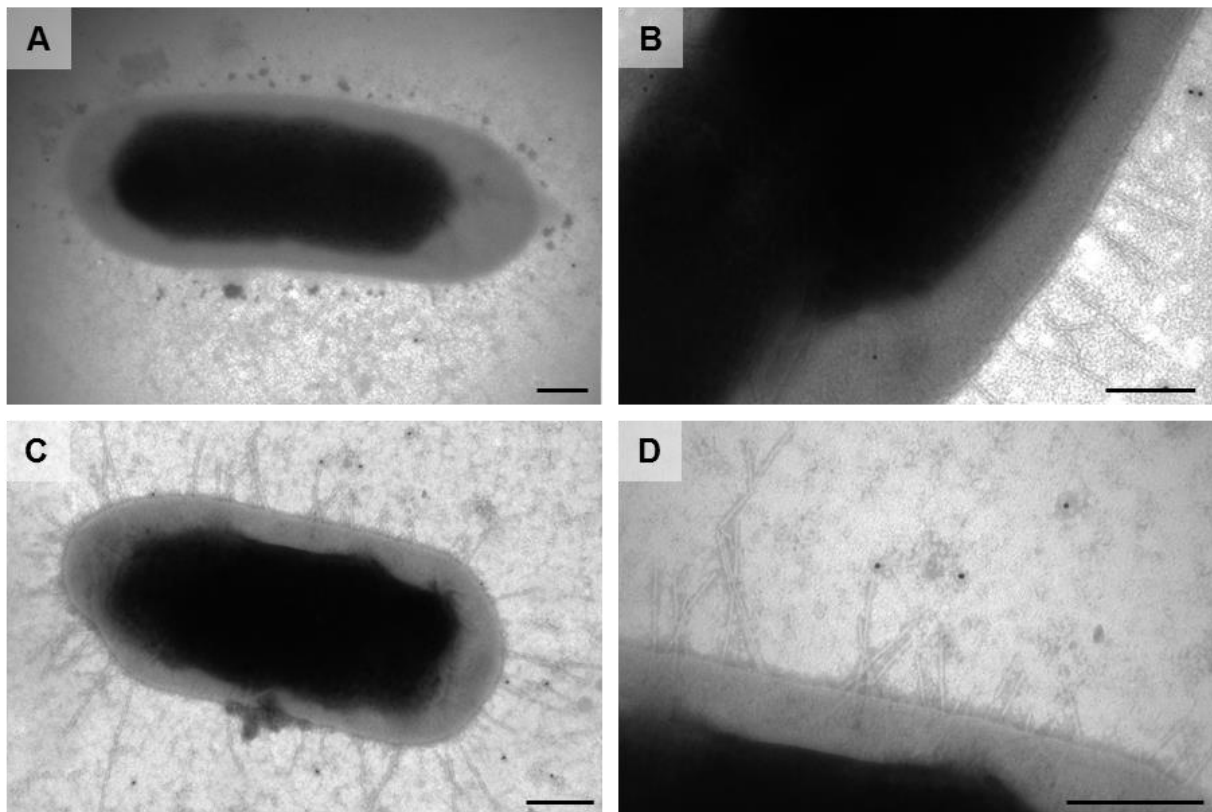


Abb. 71: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Wildtypstammes 1745/98 (O91:H21, *eibG*-negativ).

Behandlung (**A** und **B**): humanes IgG und Ziege-anti-Human-IgG-Gold (12 nm). Behandlung (**C** und **D**): Ziege-anti-Human-IgG-Gold (12 nm). Balken = 200 nm.

Abb. 72 zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen von Zellen des *eibG*-positiven WT-Stammes 2875/96 (O91:H14 [H14], *eibG*- α), die mit humanem IgG und dem Detektionsantikörper (Abb. 72 A bis F) sowie nur mit dem Detektionsantikörper (Abb. 72 G und H) behandelt wurden.

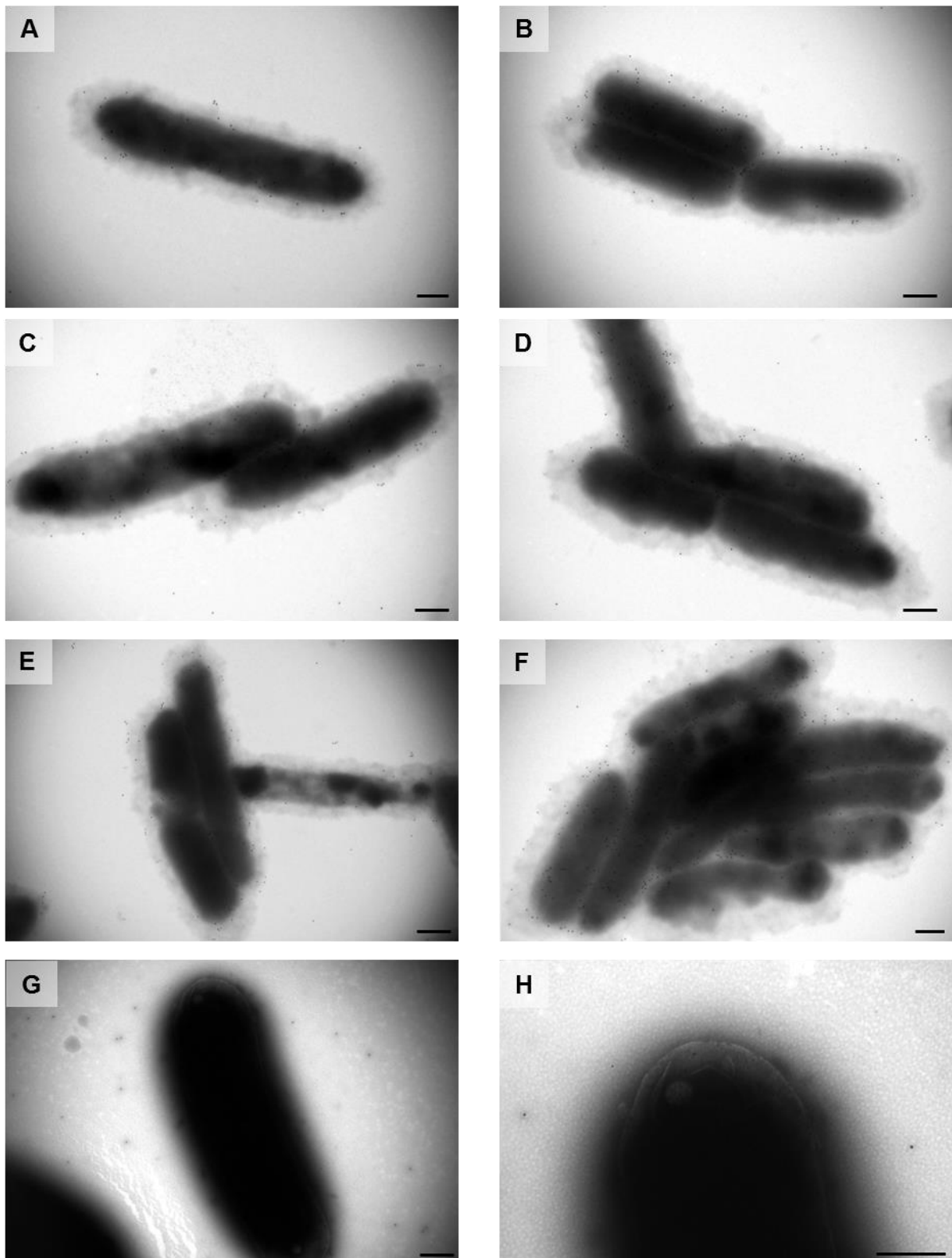


Abb. 72: Nachweis der IgG-EibG – Interaktion mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen des Stammes 2875/96 (O91:H14 [H14], *eibG*- α).

Behandlung (A bis F): humanes IgG und Ziege-anti-Human-IgG-Gold (12 nm) Antikörper. Behandlung bei (G und H): Ziege-anti-Human-IgG-Gold (12 nm). Balken = 200 nm.

Die Anzahl an Goldpartikeln auf der bakteriellen Oberfläche (Abb. 72) ist größer als bei dem *eibG*-negativen Stamm 1745/98 (Abb. 71). Auch das Auftreten fimbrieller Strukturen ist bei Stamm 2875/96 weniger stark ausgeprägt als bei der Negativkontrolle. Somit können eventuelle unspezifische Bindungen des Detektionsantikörpers vernachlässigt und gebundene Goldpartikel überwiegend der IgG Fc-vermittelten Bindung an EibG zugesprochen werden.

Die Goldpartikel, und damit das detektierte EibG, sind jedoch nicht wie erwartet verstärkt an den Polen der Bakterien nachweisbar, sondern erscheinen gleichmäßig über die gesamte Oberfläche verteilt. Durch den engen Zellkontakt und geringen Abstand zwischen den sich in einer Kette befindenden Bakterien könnten dort eventuell in höherer Konzentration vorkommende EibG-Strukturen nicht durch die Detektionsantikörper gebunden werden. Allerdings sollten die freien Pole der Bakterien EibG aufweisen und eine Detektion zulassen. Da dies nicht der Fall ist, kann daraus gefolgert werden: EibG wird von WT-Stämme gleichmäßig auf der gesamten Oberfläche exprimiert und ist wahrscheinlich an der Adhäsion von benachbarten Bakterien beteiligt, kann aber nicht als die Hauptursache für die Kettenausbildung bei den *eibG*-positiven WT-Stämmen angesehen werden. Somit müssen neben EibG noch weitere Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche von *E. coli* vorhanden sein, die relativ zeitgleich mit EibG exprimiert werden, die aber bislang noch unbekannt sind. Um die Expression von EibG nicht durch eine geschüttelte Vorkultivierung zu beeinflussen, wurde bei den folgenden Versuchen bei der 20-stündigen Vorkultur auf das Schütteln verzichtet. In **Abb. 73** sind elektronenmikroskopische Aufnahmen von Zellen des WT-Stammes 2875/96 dargestellt, der nach stationärer Vorkultur und stationärer Hauptkultur analysiert wurde. Auch diese zweimalige schüttelfreie Kultivierung der *E. coli* – Zellen führte nicht zu einer erhöhten EibG-Expression an den Polen der Bakterien.

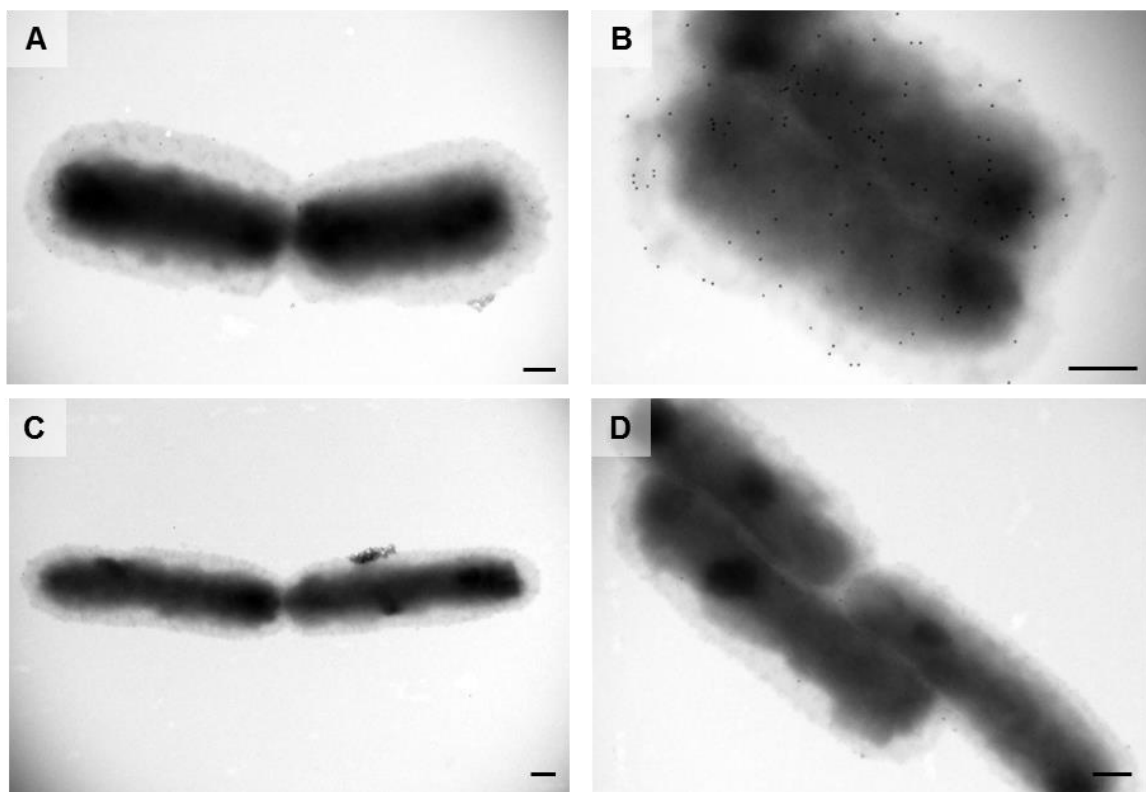


Abb. 73: Nachweis der IgG-EibG – Interaktion mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen des Wildtypstammes 2875/96 (O91:H14 [H14], *eibG*- α) nach stationärer Vor- und Hauptkultur.

Behandlung (A und B): humanes IgG und Ziege-anti-Human-IgG-Gold (12 nm) Antikörper. Behandlung (C und D): Ziege-anti-Human-IgG-Gold (12 nm). Balken = 200 nm.

Als nächstes wurden die WT-Stämme 06-03233 (O152:H⁻ [H14], *eibG*-β) und 0520/99 (Ont:H30, *eibG*-γ) der Elektronenmikroskopie unterzogen (Abb. 74 und Abb. 75). Wie erwartet exprimierte der Stamm 06-03233 (Abb. 74 A bis C) sogar etwas höhere EibG-Mengen auf der gesamten Zelloberfläche als die Stämme 2875/96 und 0520/99. Der Stamm 06-03233 ist der einzige in diesem Experiment ohne detektierbare Flagellen an der Oberfläche (O152:H⁻ [H14]), weshalb sich der damit einhergehende Mobilitätsverlust positiv auf die EibG-Expression auswirken könnte.

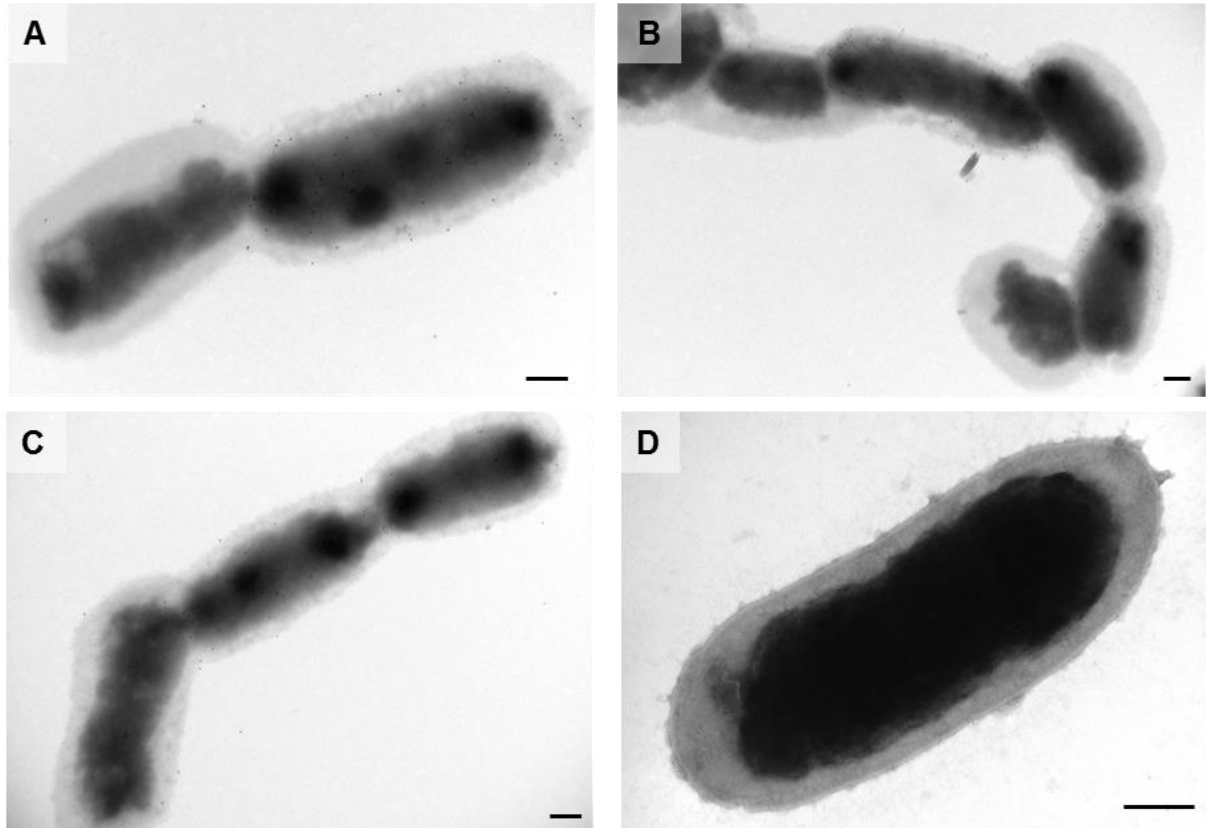


Abb. 74: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Wildtypstammes 06-03233 (O152:H⁻ [H14], *eibG*-β).

Behandlung (A bis C): humanes IgG und Ziege-anti-Human-IgG-Gold (12 nm) Antikörper. Behandlung (D): Ziege-anti-Human-IgG-Gold (12 nm). Balken = 200 nm.

Auch diese Versuche brachten keine weiteren Erkenntnisse, da, wie schon für den Stamm 2875/96 gezeigt (Abb. 73), die IgG Fc-bindenden Moleküle auf der gesamten Oberfläche der Bakterien detektiert wurden. Somit konnte kein vollständiger Nachweis erbracht werden, dass EibG einen direkten Einfluss auf die Kettenausbildung *eibG*-positiver WT-Stämme ausübt. Möglicherweise würde eine elektronenmikroskopische Untersuchung IgG-bindender Moleküle im Inneren von *E. coli* zusätzliche Informationen liefern, die zur Aufklärung des Zusammenhangs zwischen EibG-Expression und Kettenausbildung führen würde.

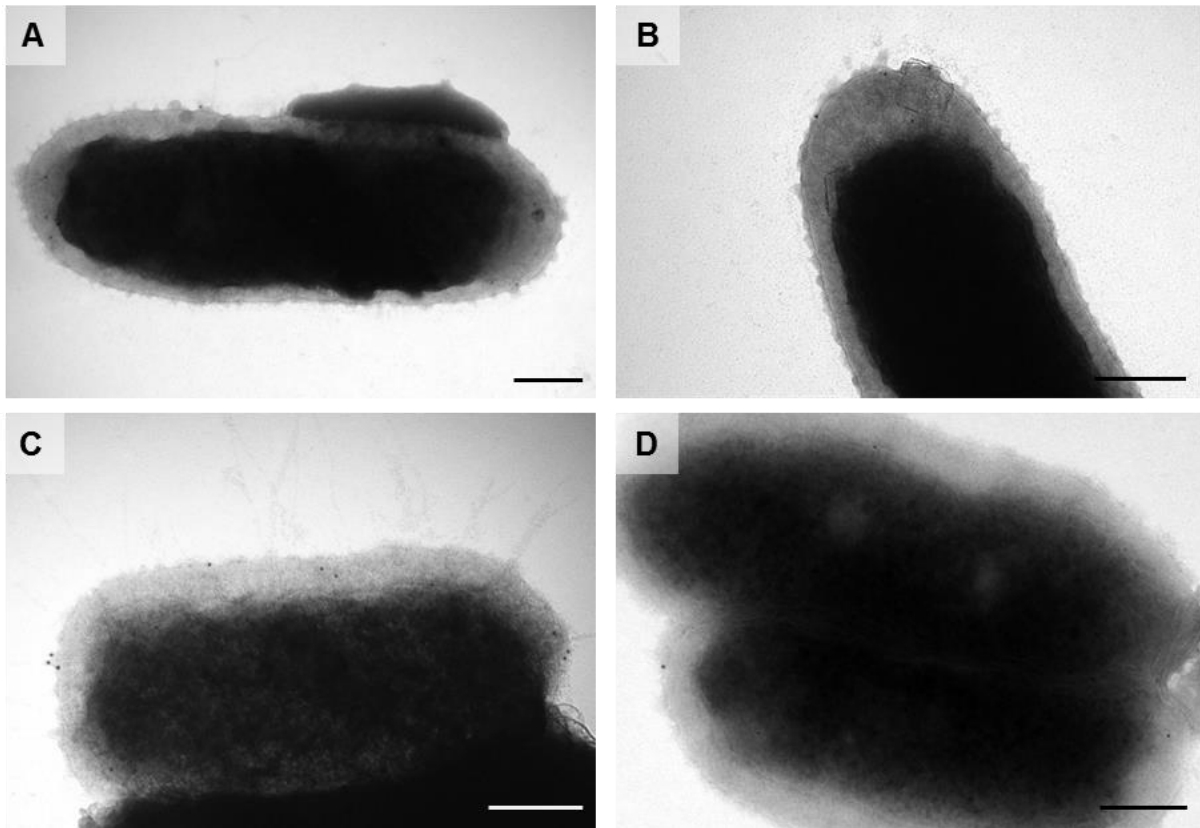


Abb. 75: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Wildtypstammes 0520/99 (Ont:H30, *eibG*- γ).

Behandlung (A bis C): humanes IgG und Ziege-anti-Human-IgG-Gold (12 nm) Antikörper. Behandlung (D): Ziege-anti-Human-IgG-Gold (12 nm). Balken = 200 nm.

4.15 3D-MODELLIERUNG DER EIBG-STRUKTUR

Da diverse Aufreinigungsschritte nicht zu einer ausreichenden Reinheit von EibG für eine Strukturanalyse mittels Proteinkristallographie führten, wurde auf bioinformatische Berechnungsmethoden zur Strukturvorhersage zurückgegriffen. Diese Methoden basieren auf Vergleichen der AS-Sequenzen der zu untersuchenden Proteine mit AS-Sequenzen bereits bekannter Proteine und ihrer kristallographisch ermittelten Strukturen.

4.15.1 *Swiss Model Workspace*

Die über DNA-Sequenzierung ermittelte theoretische AS-Sequenz von EibG-001 wurde als eine 508 AS-Sequenz in die Onlinesuchmaschine für eine Proteinstrukturanalyse *Swiss Model Workspace* (Arnold *et al.*, 2006) eingegeben. In **Tabelle 24** sind 7 vorgeschlagene PDB-Templates aufgelistet, deren AS-Sequenzen zum Teil mit der EibG-001 Sequenz übereinstimmen.

Als wichtigstes Template wurde von *Swiss Model Workspace* erwartungsgemäß das nahe verwandte EibD (2xqhA) vorgeschlagen, da dieses die größten AS-Bereiche (EibG₂₁₋₆₉, EibG₁₄₇₋₂₆₇, EibG₁₇₆₋₄₁₅) mit hoher Sequenzübereinstimmung (14,29 bis 69,57%) abdeckt. YadA (3s6ID und 3lt6F) aus *Yersinia*-Spezies wurde von der Suchmaschine ebenfalls als Template für drei Bereiche innerhalb der EibG-Sequenz (EibG₈₄₋₂₂₀, EibG₁₂₃₋₂₃₇, EibG₄₀₉₋₄₅₀) vorgeschlagen, wobei die Sequenzidentität zwischen 12,41 und 20,00% variiert. Für das C-terminale Ende (EibG₄₁₂₋₅₀₈) wurde mit 17,17%iger Identität die

Transmembrandomäne von HIA (3emoA) aus *Haemophilus influenzae* ermittelt. Allen vorgeschlagenen Templates lag eine trimäre Proteinstruktur zugrunde.

Tabelle 24: Von Swiss Model Workspace vorgeschlagene PDB-Templates mit höchster Sequenzübereinstimmung zu EibG-001

Template Nr.	PDB-ID	Proteinname	NCBI-FASTA-ID	Abgedeckte AS-Sequenz von EibG	Sequenz-Übereinstimmung in %
1	2xqhA	EibD Chain A	gi 340780234	176-415	69,57
2	3s6lD	YadA-like domain of BoaA	gi 340708264	123-237	20,00
3	2xqhA	EibD Chain A	gi 340780234	147-267	19,20
4	3lt6F	YadA Chain F	gi 292659766	409-450	19,05
5	3emoA	HIA_TM	gi 211939384	412-508	17,17
6	2xqhA	EibD Chain A	gi 340780234	21-69	14,29
7	3s6lD	YadA-like domain of BoaA	gi 340708264	84-220	12,41

Zur besseren Übersicht, welche Bereiche in der AS-Sequenz von EibG die ermittelten Templates abdecken, sind diese in **Abb. 76** als Balken parallel zu der linearisierten schematischen EibG-Darstellung dargestellt. Durch die Farbkodierung können diese Templates auch in den folgenden **Abb. 77** und **Abb. 78** nachverfolgt werden.

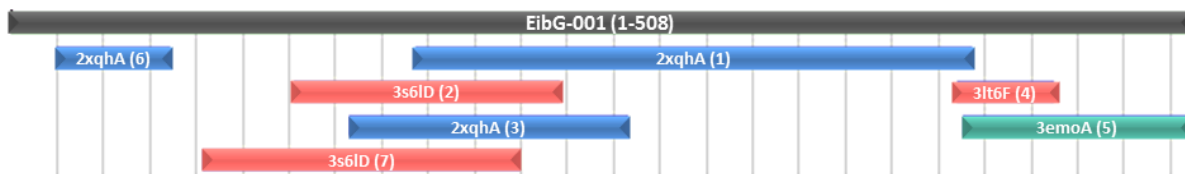


Abb. 76: Templates für 3D-Modellierung von EibG-001.

Identifizierte PDB-ID stehen in den jeweiligen Balken; Länge der Balken entspricht der abgedeckten AS-Sequenz von EibG-001.

4.15.2 RCSB-PDB 3D-Modellierung

Da kein einzelnes, sondern drei Modelle für die EibG-Struktur ermittelt werden konnten, wurden die 3D-Modelle dieses Proteins sowie die in Frage kommenden Bereiche von dem RCSB-PDB – Server (Berman *et al.*, 2002) bezogen und mit *Jalview* (Waterhouse *et al.*, 2009) bearbeitet. In **Abb. 77** sind die drei Templates YadA, EibD und HIA in Form trimerer Schlauchmodelle abgebildet. Für YadA (**Abb. 77 A**) und HIA (**Abb. 77 C**) ist jeweils die monomere Struktur farblich markiert, deren Sequenz in **Tabelle 24** schon vorgestellt wurde (3s6lD und 3emoA). Für EibD (**Abb. 77 B**) konnten mehrere Bereiche innerhalb des Modells 2xqhA ermittelt werden, denen bestimmte Funktionen zugewiesen wurden (Leo *et al.*, 2011) und die somit jeweils eine eigene Farbkodierung bekamen.

Die AS-Sequenzen zu den jeweiligen Templates und Bereiche von EibD wurden mittels *Jalview* mit der EibG-Sequenz verglichen (**Abb. 78**). Zur besseren Übersicht wurde auch hier die Farbkodierung aus **Abb. 77** übernommen und innerhalb des jeweiligen Templates verwendet. Die ersten 83 Aminosäuren von EibG konnten mit den von PDB bezogenen Modellen nicht abgedeckt werden. Jedoch wurde durch das *Swiss Model Workspace* (**Tabelle 24** und **Abb. 76**) das EibD-Template (Template 6) für die entsprechende AS-Sequenz von EibG (EibG₂₁₋₆₉) mit einer Sequenzübereinstimmung von 14,29% angegeben. Diese Übereinstimmung bezieht sich auf die gesamte

Länge von EibG. Beim Vergleich der ersten 85 Aminosäuren von EibG und EibD wurde eine AS-Übereinstimmung von 47,78% berechnet (*Jalview*), wobei die in Abb. 78 dargestellte EibG-Sequenz (EibG₁₋₈₃) nicht mit einem Modell abgedeckt wird und somit zum großen Teil wie die von EibD aussehen muss.

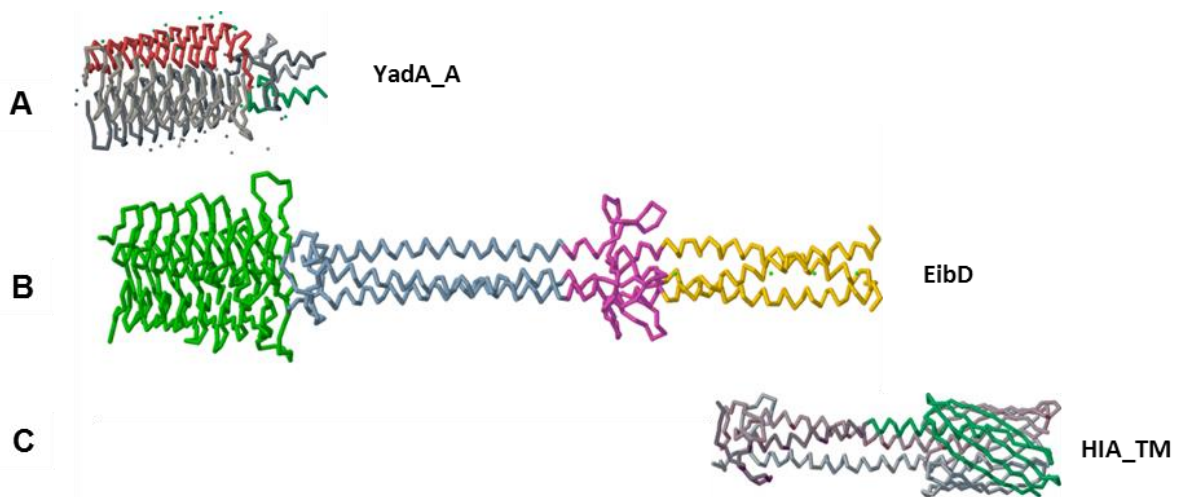


Abb. 77: Schlauchmodelle der drei EibG-Templates als Trimere. Moleküle mit Farbmarkierungen der einzelnen Sequenzbereiche für 3D-Modellierung von EibG.

(A) 3s6LA (YadA_A), (rot) 3S6LAa (YadA₁₁₋₁₄₂); (B) 2xqhA (EibD), (hellgrün) 2XQHA0 (EibD₁₆₀₋₂₉₁), (blau) 2XQHA1 (EibD₂₉₂₋₃₄₉), (magenta) 2XQHAc (EibD₃₄₅₋₃₈₀), (gelb) 2XQHAb (EibD₃₈₁₋₄₁₇); (C) 3emoA (HIA_TM), (dunkelgrün) 3EMOAa (HIA₁₀₂₁₋₁₀₉₈). Darstellung durch *Jalview*.

Da die ersten 160 Aminosäuren von EibD durch Proteinkristallographie nicht modelliert werden konnten (Leo *et al.*, 2011), dafür aber YadA ab der 84. Aminosäure von EibG als geeignetes Template berechnet wurde, bleiben nach der Abspaltung der Signalsequenz noch 57 Aminosäuren ohne ein geeignetes 3D-Modell.

EibG-001/1-508	1	MSKKFTMTLLSSSLGGLLLG I SSGVLAQELPPIKDSGLPFYSVLKE-AD-ASHVTYGSTYRIIYNKSSSGWGTMRV-VLNGK-DE80
EibD/1-511	1	MSKKFTMTLLSSSLAGLLV-MSGGVSAQ-.....N-GTYSVLLQDDSQKSGPKVYGSTYEVS-..KTVDNGNFRYEVEKKNNDK72
YadA_(3S6LAY)1-178	
HIA_(3EMOAY)1-162	
EibG-001/1-508	81	TLFNFDQEGN I I VLSKDNSIAYTVHEPVVLFKDFARMAAGLRTSDKENGK-HQVDEEEVRRIFNKNVNLNTIINPEILKQSAFI162
EibD/1-511	73	RTLKFDFSEGNVTV-..KGGK I IHTLHDPALKDFARTEAGKKNEQNGNTPPHKLTDASAVRGVYNNKVYGLEKT-...EIT--GF SV148
YadA_(3S6LAY)1-178	SPOSMQLSTAVSGGGVRTSSLDGTSAGNGANASGGNGTAVGGASASGTDATALGGASNASGHNHSTALGQASSASGGST80
HIA_(3EMOAY)1-162	
EibG-001/1-508	163	ASPRPEGDRLVQASAAGEFALAVGTGARADKKFATSVGWSAASGQDSVALGGGTAYADASTALGSVAFVDNTATYGTAVGN246
EibD/1-511	140	EDG ENKVSLSG-DARAGGEF SVAVGHCARATENASTAVGSWAAADGHDSTALGHOTVAYANASTALGSAFVDNTATYGTAVGN232
YadA_(3S6LAY)1-178		AVGGAGAFQDDGASAFQDDGALAGGTDSTALGAHSTAAAPHSAAIQANSVASAPHSVSPGSRGHERRLTNVAPGIDGTDAAANMNG164
HIA_(3EMOAY)1-162	
EibG-001/1-508	247	RAKVDKDATEGTLGAKATVTNKNNSVALGANSRTTRDNEVYIGYEA-..EPGKAVKTRVLGGLSDGTRPSDAATVRQVDRVKDSV328
EibD/1-511	233	RAKVDKDATEGTLGAKATVTNKNNSVALGANSRTTRDNEVYIGYKGTGTESDITVGTSLVGLSDGTRNSDAATVGQLNR...Q313
YadA_(3S6LAY)1-178		LWGVQSSVDQAARR-.....
HIA_(3EMOAY)1-162	178
EibG-001/1-508	329	EQLAQDNTNRLVVEAKKSREYTD.....SRTTVGVNSDGLTRAEGASKTLAVNDGLVALSGRTDRIDAAVGSDVDRRV401
EibD/1-511	314	GGVYDDVNRITVSENDKLYTDDGTSEVNEKVEARTTVGVVSDGKLTAEAGATNIAVNDGLVALSIRTPDITLAKKSRK397
YadA_(3S6LAY)1-178	
HIA_(3EMOAY)1-162	1DGTADKTKGEVSNKQVSTDEKHVLSLDPNDQSCKGQGVVDINVDNGDIS48
EibG-001/1-508	402	TKNTQA I Q.....SNTROLQEHNARLNSQQRQ I RENHEEMKRAAQAQAALAGLFPQYSVGFKNATAALGGYSDKQA IAVGVG478
EibD/1-511	398	TKNTQA I Q.....LQQHSARLDSQQRQ I ENNHEEMKRAAQAQAALGFLQFPYSVGFKNATAAAGGGYSDQQLAVGVG481
YadA_(3S6LAY)1-178	
HIA_(3EMOAY)1-162		ATSDA I NGSQLYAVAK...THTLGGVHNLGSIHIVVGHVAFGGVYASALASQVLPQVTPPQVPSVPGSSVGGGNGV IAVVVF132
EibG-001/1-508	479	YRFNEQTAAKAGI AASDGDVSYNMGVNFEF.....
EibD/1-511	482	YRFNEQTAAKAGVAFSDGDASWNVGNFEF.....
YadA_(3S6LAY)1-178	
HIA_(3EMOAY)1-162	33	DHGL I IPLSGTTHSDG I GAAAGVAVV.....
	508
	511
	162

Abb. 78: Sequenzvergleich von EibG und der drei Templates für die 3D-Modellierung mit Farbmarkierungen der einzelnen Sequenzbereiche.

(rot) 3S6LAa (YadA₁₁₋₁₄₂); (grün) 2XQHA0 (EibD₁₆₀₋₂₉₁); (blau) 2XQHA1 (EibD₂₉₂₋₃₄₉); (magenta) 2XQHAc (EibD₃₄₅₋₃₈₀); (gelb) 2XQHAb (EibD₃₈₁₋₄₁₇); (dunkelgrün) 3EMOAa (HIA₁₀₂₁₋₁₀₉₈).

Die erneute Eingabe nur dieser 57 Aminosäuren (EibG₂₈₋₈₅) in die Suchmaske von *Swiss Model Workspace* brachte keine neuen Ergebnisse. Der BLAST-Algorithmus von *UniProt* (Magrane und Consortium, 2011) ermittelte allerdings eine hohe Übereinstimmung des EibG₃₂₋₆₀ – Fragments mit einigen Aminopeptidasen aus der Gattung *Deinococcus*, einem gramnegativen Bakterium. Diese sind wiederum mit der Aminopeptidase AmpS, einer Metalloprotease, aus *Staphylococcus aureus* verwandt. In **Abb. 79** ist der AS-Vergleich von AmpS mit dem Fragment EibG₂₈₋₈₅ dargestellt. Kristallstrukturanalyse von AmpS (Odintsov *et al.*, 2005) ergab ein Dimer mit drei möglichen Bindungsstellen für Metalle (rote Aminosäuren in **Abb. 79**). Aus den insgesamt sieben metallkomplexierenden Aminosäuren von AmpS kommen drei auch in EibG vor: GLU-46, HIS-51 und TYR-58. Diese befinden sich genau in dem EibG-Fragment ohne ein zugewiesenes 3D-Modell und könnten zur Identifizierung von EibG₂₈₋₈₅ als eine Metalloprotease beitragen. Da sich ein 3D-Modell eines Dimers (AmpS) nicht auf die trimere Struktur von EibG oder EibD übertragen lässt, wird dieser N-terminale Bereich von EibG im Folgenden nicht in die Modellierung mit einbezogen.

```
EibG/28-85 .....
AmpS/1-411 1 MTNYKEKLQQAELLVKGMNVQPKQPVFIRSSVETLELTHLIVEEAYHCGASDVRVVYSDPTLKRLKFENESVEHFANH 80

EibG/28-85 .....
AmpS/1-411 81 EIKSYDVEARMDYVKRGAANLALISEDPLMDGIDSQKLQAFQQQNARAFKGYMESVQKNQFPWVVAAFP SKAWAKRVYP 160

EibG/28-85 .....
AmpS/1-411 161 ELSVEEAYIKFIDEVFDIVRIDGNDPVENWRQHIANLSVYAQKLQKKNYHALHYVSEGTDLTVGLAKNHIWEDATSYVNG 240

EibG/28-85 .....
AmpS/1-411 241 KEQAFIANIPTEVF TAPDRNRVDGYVTNKLPLSYNGTIIDQFKLMFKDGEIIDFSAEKGEAVLKDLINTDEGSRRLGIV 320

EibG/28-85 28 ---QELPPIKDSGLPFYS-VLKEADASHVITYGSTYRIYYNKSSGWGTMR-----YVLNGKDET LFNF---- 85
AmpS/1-411 321 ALVPDDSPISNRNTIFYNLTFDENACHLAIGSAFYAFNIQGGTEMTVEEKIASGLNDSNVHVD FMISSDLTIYGI F EDG 400

EibG/28-85 .....
AmpS/1-411 401 SKELVFENG NWASTF ..... 415
```

Abb. 79: Vergleich der AS-Sequenz von AmpS aus *Staphylococcus aureus* mit dem Fragment EibG₂₈₋₈₅.

(blau) Übereinstimmung der Aminosäuren von EibG und AmpS; (rot) metallbindende Aminosäuren innerhalb von AmpS.

4.15.3 3D-Modell von EibG

Die 3D-Modelle der ermittelten Templates Yada, EibD und HIA wurden als PDB-Dateien in *Jalview* importiert und als trimere Bändermodelle bearbeitet (**Abb. 80**). Mit *Swiss Model Workspace* konnte durch das Vereinen der drei Modelle ein monomeres 3D-Modell von EibG erstellt werden (**Abb. 80 D**). Dieses ähnelt erwartungsgemäß in großen Teilen dem Modell von EibD. In **Abb. 81** ist das aus den drei Templates erstellte 3D-Modell von EibG in trimerer Form dargestellt. EibD weist eine AS-Gesamtsequenzübereinstimmung von 61,99% mit EibG auf. Die einzelnen Bereiche Kopf, Nacken, RHcc (rechtsdrehender *coiled-coil* Bereich), Sattel, LHcc (linksdrehender *coiled-coil* Bereich) und Transmembran-Domäne (vgl. auch Kapitel 1.4.2, **Abb. 8**) von EibD werden somit auf EibG übertragen und sind als Vergleich in **Tabelle 25** aufgeführt.

Tabelle 25: Vergleich einzelner EibD-Bereiche mit ähnlichen Bereichen von EibG

EibD-Bereich in AS	Bezeichnung	Ähnliche Bereiche bei EibG	AS-Übereinstimmung in %
1-159	Kopf	1-174	41,38
160-291	Nacken	175-303	78,79
292-349	RHcc	304-353	50,00
345-380	Sattel	352-384	84,85
381-417	LHcc	385-414	63,33
418-511	Transmembran-Domäne	415-508	85,11

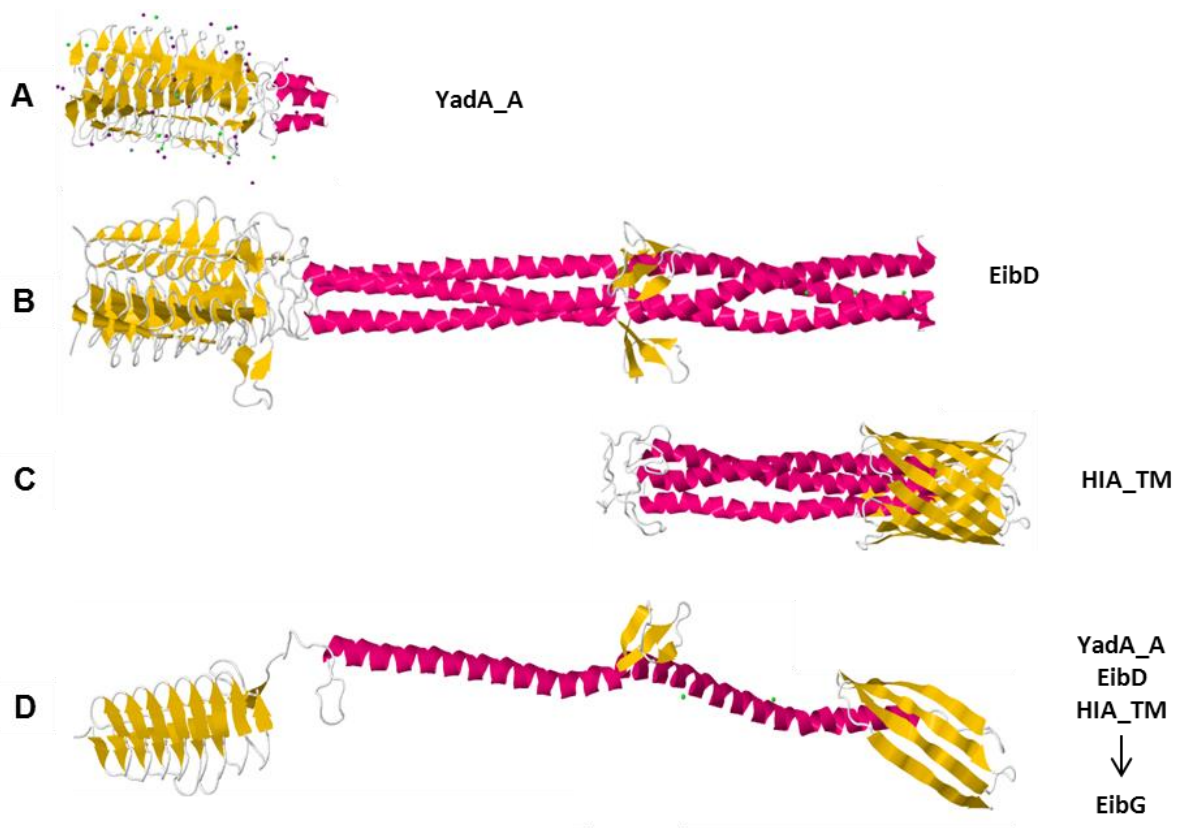


Abb. 80: Bändermodelle der drei Templates als trimere Moleküle und das EibG-Monomermodell.

(A) 3s6LA (YadA_A); (B) 2xqhA (EibD); (C) 3emoA (HIA_TM); (D) Bänderstruktur von EibG-001 als Monomer aus Monomeren der drei Templates. (gelb) β -Faltblätter; (rot) α -Helizes; (grüne Kugeln) Chlorid-Ionen; (violette Kugeln) Iodid-Ionen; (graue Kugeln) Zink-Ionen.

Im direkten Vergleich zeigt sich der Kopfbereich von EibG um 14 Aminosäuren länger als der von EibD, wobei die übrigen Bereiche relativ gleich sind.

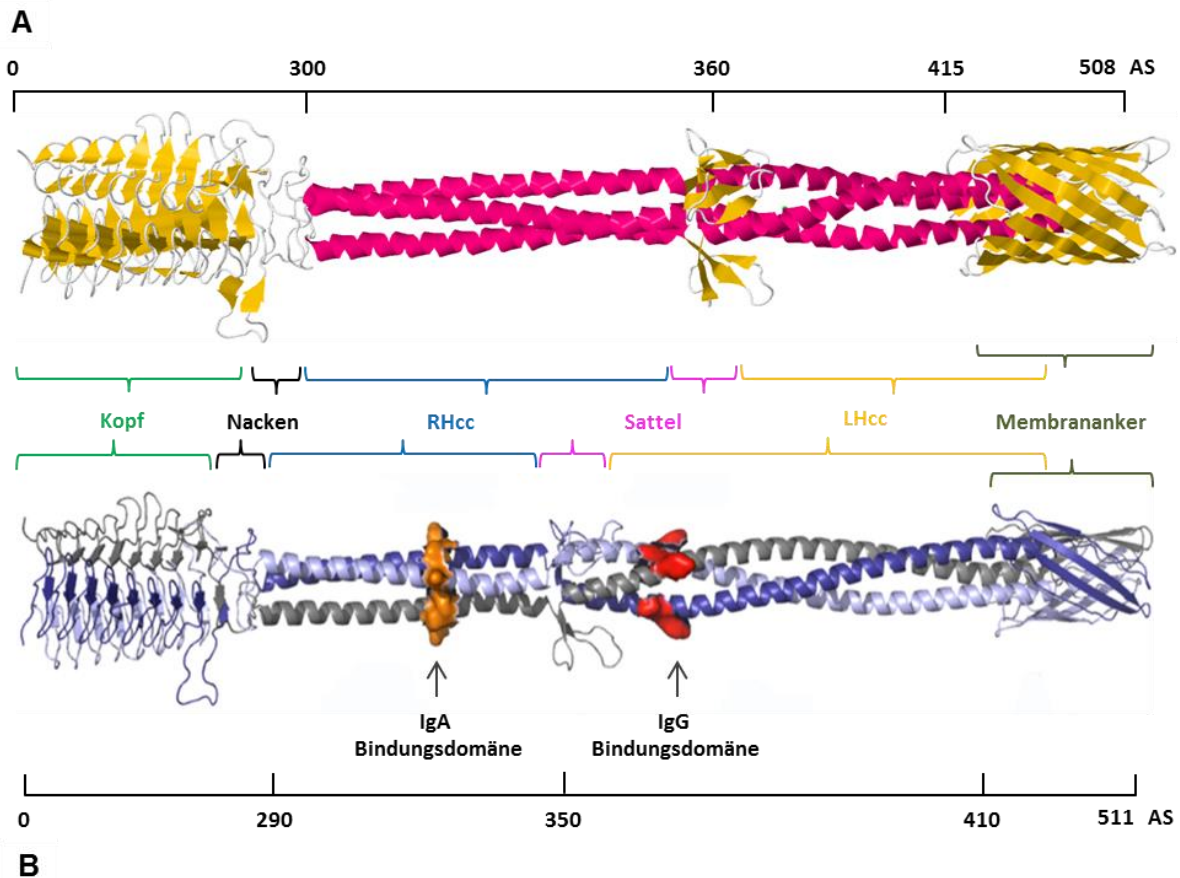


Abb. 81: 3D-Modell von EibG unter Berücksichtigung aller Templates und Vergleich einzelner Sequenzbereiche mit EibD.

(A) EibG; (B) EibD. Farblich zugeordnete Bereiche: (grün) EibD-Kopfbereich, (schwarz) EibD-Nacken; (blau) EibD-RHcc; (magenta) EibD-Sattel; (gelb) EibD-LHcc; (dunkelgrün) Membrananker; farblich markierte Bereiche bei (B): (orange) EibD-IgA Bindungsdomäne; (rot) EibD-IgG Bindungsdomäne. (A) Modellierung mit *Swiss Model Workspace* und *Jalview*; (B) modifiziert nach Leo *et al.* 2011.

4.15.4 Bindungsdomänen für Immunglobuline

Der AS-Sequenzvergleich der IgA Bindungsstelle von EibD (EibD₃₂₉₋₃₄₄) ergibt eine 50%ige Übereinstimmung mit der entsprechenden AS-Sequenz von EibG (EibG₃₄₄₋₃₅₁), obwohl die letztgenannte um 8 Aminosäuren kürzer ist. Der IgG-Bindungsbereich von EibD (EibD₃₈₄₋₄₁₈) zeigt sogar eine 57%ige Homologie zum entsprechenden Bereich innerhalb von EibG (EibG₃₈₈₋₄₁₅) an.

Durch *surface plasmon resonance* (SPR) mit verschiedenen EibD-Mutanten konnten Leo *et al.* exakt die EibD-Aminosäuren ermitteln, die für die IgA- und IgG Fc – Bindung essentiell sind (Leo *et al.*, 2011). Die IgA- und IgG-Bindungsgebiete von EibD sind in **Abb. 82** dargestellt. Demnach sollte für die IgA-Bindung die AS-Abfolge ³³²KKY³³⁴ innerhalb von EibD verantwortlich sein. Übertragen auf EibG ergibt sich der AS-Bereich ³⁴⁷REY³⁴⁹, wobei die Aminosäuren LYS-332 und LYS-333 bei EibD durch die Aminosäuren ARG-347 und GLU-348 bei EibG ausgetauscht sind. Von Leo *et al.* wird genau dieser Austausch für die geringere Affinität von EibE und EibG zu IgA verantwortlich gemacht (Leo *et al.*, 2011). Für die IgG-Bindung kommt die Aminosäure D-387 bei EibD in Frage. Diese ist bei allen Eib-Mitgliedern konserviert und sorgt für eine ähnlich hohe IgG-Affinität bei diesen Proteinen. Innerhalb der EibG-Sequenz ist die entsprechende Aminosäure ASP-391.

```
EibG/1-508 VRQVDRVKDSVEQLAQDTNTRLVVEAKKSREYTD..... 351
EibD/1-511 VGQLNR...KVGGVYDDVKARITVSEKQKKYTDQKTSEVNEKVE 347

EibG/1-508 VALSGRTDRIDAAVGSVDRRVTKNTQAIQ.....SNTRQLQEH 418
EibD/1-511 VALSGRTDRIDYAVGAIDGRVTRNTQSI EKNSKAIAANTRTLQQH 421
```

Abb. 82: IgA- und IgG-Bindungsgebiete von EibD mit Übertragung auf die EibG-Sequenz.

(gelber Rahmen) IgA-Bindungsdomäne von EibD; (roter Rahmen) IgG-Bindungsdomäne von EibD; (gelb-markierte AS) für IgA-Bindung ermittelte AS; (rot-markierte AS) für IgG-Bindung ermittelte AS.

Da EibG ein Trimer ist, könnte die ermittelte Aminosäure innerhalb der Proteinstruktur verdeckt lokalisiert sein und somit nicht für die Bindung an Immunglobuline zur Verfügung stehen. Für diese Fragestellung wurde die Aminosäure ASP-391 innerhalb des 3D-Modells EibG₃₆₀₋₄₁₆ mittels *Jalview* markiert und im Gesamtabbild von EibG gesondert betrachtet. Das Ergebnis ist in **Abb. 83** dargestellt. ASP-391 liegt in den äußeren Bereichen der α -Helizes von EibG und kann daher mit einem IgG Fc – Fragment interagieren und insgesamt drei Bindungsstellen je EibG-Trimer bereit stellen.

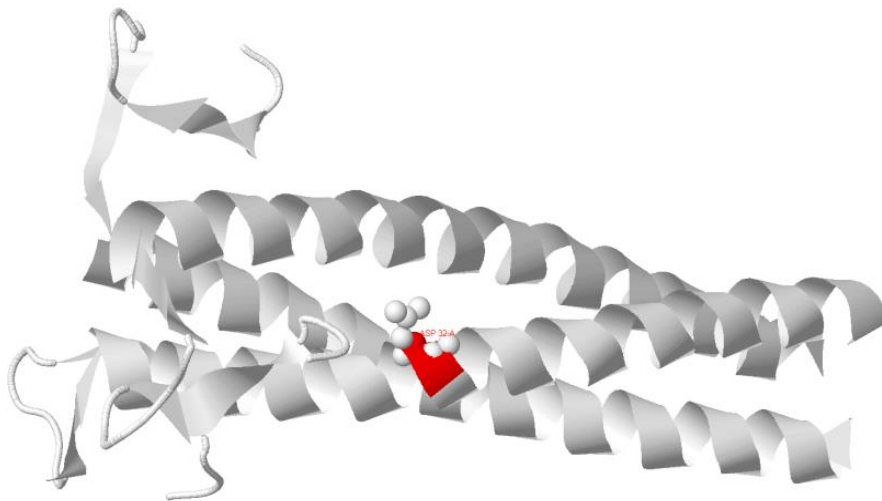


Abb. 83: EibG₃₆₀₋₄₁₆ mit ASP-391 als mögliche Bindungsstelle für IgG Fc.

(rot) ASP-391. Modellierung mit *Swiss Model Workspace*, Bearbeitung mit *Jalview*.

Mithilfe des Sequenzvergleichs könnten also die strukturellen und funktionellen Bereiche von EibD auf EibG übertragen werden: EibG₁₋₁₇₄ Kopfbereich, EibG₁₇₅₋₃₀₃ Nackenbereich, EibG₃₀₄₋₃₅₃ RHcc, EibG₃₅₄₋₃₈₄ Sattelbereich, EibG₃₈₅₋₄₁₄ LHcc, EibG₄₁₅₋₅₀₈ Transmembrandomäne, EibG₃₄₇₋₃₄₉ IgA-Bindungsstelle und EibG₃₉₁ IgG-Bindungsstelle.

4.16 SEQUENZVERGLEICH INNERHALB DER EIB-FAMILIE

Inwieweit sich die für EibD und EibG ermittelten AS-Bereiche auf die übrigen Mitglieder der Eib-Familie übertragen lassen, wurde durch einen Vergleich theoretisch ermittelter Aminosäuren dieser Proteine durchgeführt. Die AS-Sequenzen aller Mitglieder der Eib-Familie wurden mittels *Jalview* miteinander verglichen. In **Abb. 84** sind ihre Übereinstimmungen als grauer Hintergrund gekennzeichnet (vgl. auch Kapitel 1.7).

Die Signalsequenzen, der Sattelbereich und die Transmembrandomänen sind stark konserviert und weisen bei allen Eib-Mitgliedern ein hohes Maß an Übereinstimmung auf. Auch die Aminosäuren des C-terminalen LHcc-Bereichs zeigen bei EibA, EibC, EibD und EibF große Homologien, wobei EibE, EibG

und EibH hier eine Deletion von 7 Aminosäuren aufweisen. Dies entspricht ca. zwei bis drei Windungen der α -Helizes in diesem Bereich. Die Regionen um die IgG Fc – Bindungsaminosäure (EibD₃₈₇ bzw. EibG₃₉₁) sind ebenfalls in allen Eib-Proteinen konserviert, wodurch eine ähnlich hohe Affinität zu IgG Fc zu erwarten ist.

Der von Leo *et al.* identifizierte IgA-Bindungsbereich für EibD (EibD₃₃₂₋₃₃₄) befindet sich in der variablen Region RHcc und besteht bei EibC und EibD aus der AS-Sequenz KKY und variiert bei den restlichen Eib-Mitgliedern. Es ergeben sich folgende Variabilitäten in diesem Bereich: TDK bei EibA und TDR bei EibF sowie REY bei EibE, EibG und EibH. Allerdings ist aus den Untersuchungen von Leo *et al.* (2011) bekannt, dass in EibF mehrere Sequenzwiederholungen im N-terminalen Bereich von RHcc mit den Aminosäuren K und Y vorkommen, die nicht mit dem IgG Fc – Bindungsbereich in Abb. 84 übereinstimmen (vgl. auch Abb. 12 im Kapitel 1.7.3). Daraus ergeben sich eine sehr starke Affinität von EibF, eine starke Affinität von EibC und EibD sowie eine schwache Affinität von EibA, EibE, EibG und EibH zu IgG Fc – Fragmenten.

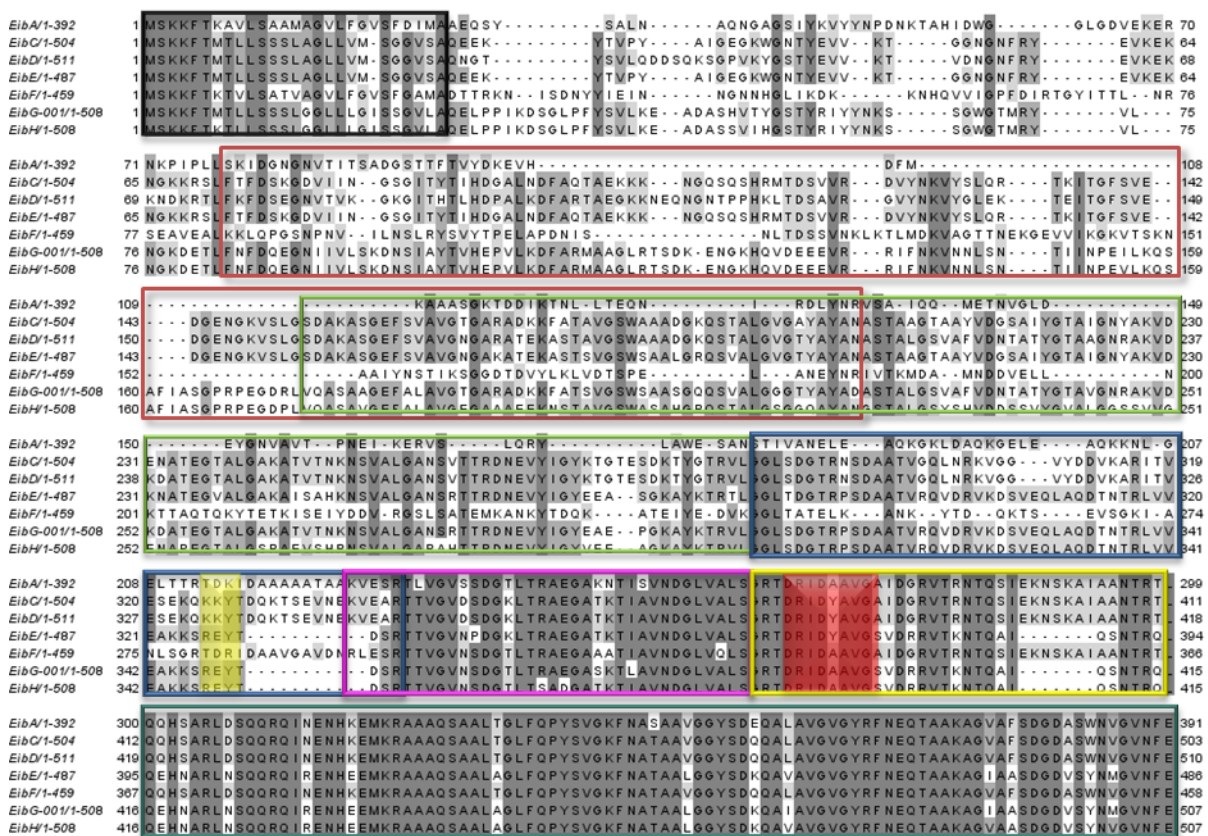


Abb. 84: Sequenzvergleich aller Eib-Proteine und Gruppierung verschiedener funktioneller Bereiche anhand der 3D-Template.

(schwarz) EibG-Signalsequenz; (rot) YadA-Kopfbereich; (grün) EibD-Kopfbereich; (blau) EibD-RHcc; (magenta) EibD-Sattel; (gelb) EibD-LHcc; (dunkelgrün) HIA-TM; (gelber Block) EibD IgA-Bindungsdomäne; (roter Block) EibD IgG-Bindungsdomäne. Erstellt mit Jalview.

Zahlreiche N-terminale Aminosäuren der bisher bekannten Eib-Proteine sind weniger konserviert als die am C-Terminus, wobei bestimmte Bereiche bei allen Eib-Proteinen aber sehr ähnlich sind. Trotz hoher Homologien können sich jedoch die Funktionen dieser Bereiche stark unterscheiden, was experimentell untersucht werden muss.

4.17 WEITERE ADHÄSIONSFAKTOREN INNERHALB DES GENOMS *EIBG*-POSITIVER *E. COLI*

Da eine Vielzahl von Adhäsionsproteinen von *E. coli* an Zell-Zell-Adhäsionsprozessen, einschließlich der Ausbildung von Bakterienketten, verantwortlich sein kann (vgl. auch Kapitel 1.7.4), sollten die in dieser Arbeit untersuchten *eibG*-positiven STEC-Stämme auf das Vorkommen weiterer Adhäsionsfaktoren überprüft werden. Hierfür wurden mit freundlicher Unterstützung von Frau Dr. Barbara Middendorf Primer-Paare für die Gene von Antigen43 (*cah*) sowie für die *Passenger*- und die Translokations-Domänen von EhaA (*ehaA*-PD und *ehaA*-TD) für eine PCR mit DNA der *eibG*-positiven WT-Stämme 1809/00, 2875/96, 0529/00 und 06-03233 sowie des *eibG*-negativen Stammes EDL933 (Positivkontrolle für *cah*, *ehaA*-PD und *ehaA*-TD) eingesetzt. Die Ergebnisse dieser PCR sind in **Abb. 85** dargestellt.

Die WT-Stämme 0529/00 (*eibG*- γ) und 06-03233 (*eibG*- β) besitzen die Gene für das Adhäsionsprotein EhaA und die Stämme 1809/00 sowie 2875/96 (beide *eibG*- α) die EhaA- und Antigen43-Gene. Demzufolge kann zumindest vermutet werden, dass auch die Adhäsionsproteine Antigen43 und EhaA zur Zell-Zell-Adhäsion dieser *eibG*-positiven STEC und damit zu deren Biofilmbildung beitragen könnten.

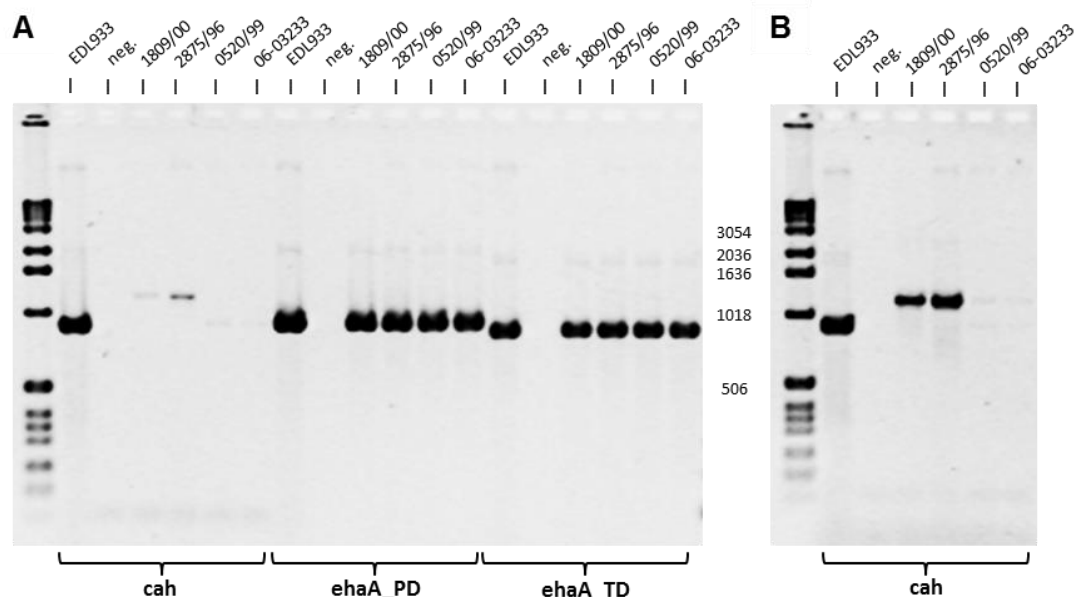


Abb. 85: Überprüfung *eibG*-positiver STEC-Stämme auf *cah*- und *ehaA*-Vorkommen mittels PCR.

(A) PCR mit *annealing*-Temperatur von 58 °C; (B) PCR mit *annealing*-Temperatur von 52 °C. (**cah**) Primer-Paar zur Identifizierung von Antigen43; (**ehaA_PD**) Primer-Paar zur Identifizierung der *Passenger*-Domäne von *ehaA*; (**ehaA_TD**) Primer-Paar zur Identifizierung der Translokationsdomäne von *ehaA*.

Da die Detektion von EibG in dieser Arbeit überwiegend mit humanem IgG durchgeführt wurde, wurden im Folgenden die IgG-bindenden Bereiche von EibG und EibD mit den AS-Sequenzen von

Antigen43 und EhaA verglichen (**Abb. 86**). In Abb. 86 A ist die Übereinstimmung der Aminosäuren dargestellt, wonach die entscheidende Aminosäure für die IgG-Bindung (EibG₃₉₁) bei Antigen43 und EhaA durch Valin ersetzt ist. Da Aspartat eine saure Seitenkette und Valin eine unpolare Seitenkette besitzt, fehlt damit diese Stelle in Antigen43 und EhaA als die wichtigste IgG-Bindungsstelle.

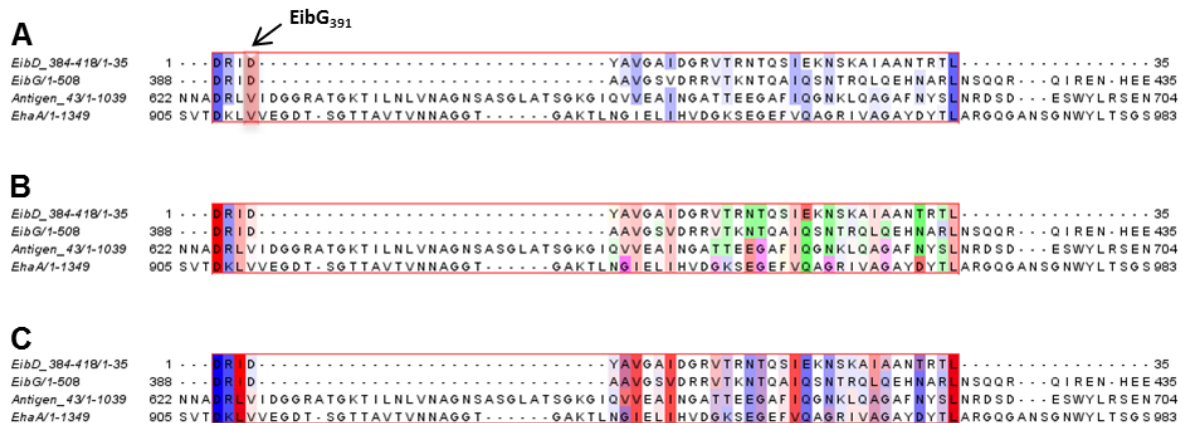


Abb. 86: AS-Sequenzvergleich der IgG Fc-Bindungsstelle von EibD mit den korrespondierenden Sequenzen von EibG, Antigen43 und EhaA.

(A) Übereinstimmung von Aminosäuren; (B) AS-Färbung nach physikalisch-chemischen Eigenschaften (*Zappo*-Färbung): (pink) hydrophobe, (orange) aromatische, (rot) positiv geladene, (grün) negativ geladene und (hellblau) hydrophile AS, (magenta) Prolin/Glycin; (C) Färbung nach der Polarität der AS: (rot) hydrophobe AS, (blau) hydrophile AS, (Farbvariationen dazwischen) abhängig von den Polaritäten benachbarter Aminosäuren (*Jalview*-Algorithmen).

Um die Sequenzbereiche der umliegenden Aminosäuren von EibG₃₉₁ genauer untersuchen zu können, wurden mittels *Jalview* die *Zappo*-Färbung nach physikalisch-chemischen Eigenschaften (Abb. 86 B) und die Färbung nach Polarität (Abb. 86 C) dieser Bereiche vorgenommen. Die hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren der ermittelten Bereiche zeigen das alternierende Auftreten von hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren, was für alle hier abgebildeten AS-Sequenzen zutrifft (Abb. 86 C). Da sowohl Antigen43 als auch EhaA eine um ca. 30 Aminosäuren längere Zwischensequenz im Vergleich zu EibD, EibF und EibG aufweisen, können die Bereiche nach EibG₃₉₂ vernachlässigt werden. Andererseits stimmen die AS-Sequenzen EibG₃₈₈₋₃₉₀, EibD₃₈₄₋₃₈₆, Antigen43₆₂₅₋₆₂₇ und EhaA₉₀₈₋₉₁₀ in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften (Aminosäuren: DRI, DRL bzw. DKL) überein. Diese Abfolge von zwei hydrophilen und einer hydrophoben Aminosäure könnte eine geringe Affinität zu IgG Fc – Fragmenten zur Folge haben, was allerdings zukünftig experimentell untersucht werden muss.

5. ZUSAMMENFASSUNG

5.1 EIBG-POSITIVE STEC

Durch die Untersuchungen von Frau Dr. Barbara Ohder war zu Beginn der Arbeit bekannt, dass es innerhalb von 379 untersuchten STEC-Stämmen 36 *eibG*-positive gab, die 15% der Gesamtanzahl der untersuchten Stämme ausmachten. Dabei kommen *eibG*-Gene nicht nur, wie bisher vermutet (Gioppo *et al.*, 2000, Lu *et al.*, 2006), bei den O91-Serotypen vor, sondern auch bei O152:H⁻ [H14], O146:H21, O146:H28, OR:H10, OR:H14 [H14], OR:H21, OR:H45, Ont:H30, OR:Hnt, OR:Hnt [H14] und Ont:H⁻ [H14]. In denen für den Menschen gefährlichsten STEC-Serotypen O157, O26, O103, O111 und O145 (Karch *et al.*, 2005) konnte allerdings kein *eibG* nachgewiesen werden. Ebenfalls besitzt keiner der Stämme der HUSEC- oder der ECOR-Kollektion die Gene für EibG. Keiner der *eibG*-positiven STEC-Stämme war *eae*- bzw. *saa*-positiv. Damit verbundene Adhäsionen wurden daher nicht in die Untersuchungen einbezogen.

Die Gene für weitere Eib-Proteine wurden bei den 36 *eibG*-positiven STEC für 14 Stämme nachgewiesen. Darunter befanden sich *eibC*, *eibD* und *eibE* in verschiedenen Kombinationen mit *eibG* (vgl. Tabelle 16). Die Stämme mit mehr als nur einem *eib*-Gen wurden bewusst bei den weiteren Experimenten nicht eingesetzt, um die möglichen Veränderungen in der EibG-Expression zu analysieren und die Biofilmbildung auf EibG zurückführen zu können. Unter den untersuchten Stämmen befanden sich 29 Stämme, die ausschließlich Stx1 produzierten. Die sieben weiteren Stämme exprimierten neben Stx1 auch Stx2 bzw. Stx2d (vgl. Tabelle 16).

Der Verwandtschaftsgrad der untersuchten *eibG*-positiven STEC wurde mittels MLST bestimmt. Als Anhaltspunkt diente dafür die HUSEC-Kollektion (vgl. Kapitel 4.1.3). Von den 36 *eibG*-positiven Stämmen weisen 22 den Sequenztyp 33 auf, wobei fast alle den Serotyp O91 aufweisen. Damit kann auf die klonale Vererbung der *eibG*-Gene bei diesen Stämmen geschlossen werden. Weitere 14 *eibG*-positive Stämme gehörten den Sequenztypen 13, 442, 656, 690, 738, 745 und 753 an (vgl. Tabelle 18) und sind mit den Stämmen der HUSEC-Kollektion nicht näher verwandt (Abb. 26). Damit kann bei diesen Stämmen ein horizontaler Transfer der *eibG*-Gene vermutet werden, was schon durch die Nähe der ORF von *eibA*, *eibC*, *eibE* und *eibD* zu den Prophagengenen auf dem *E. coli* – Chromosom der Stämme der ECOR-Kollektion angenommen werden konnte (Sandt und Hill, 2000 b).

5.2 ALLELVARIATION VON *EIBG* UND DIE DAMIT VERBUNDENEN EIGENSCHAFTEN

5.2.1 Unterschiede zwischen den *eibG*-Allelen

Mittels Sequenzierung aller *eibG*-Gene der 36 *eibG*-positiven Stämme konnten 21 verschiedene *eibG*-Allele identifiziert werden. Als Referenzsequenz diente die von Lu *et al.* publizierte *eibG*-Sequenz (Genbank-Nr.: AB255744.1), anhand derer die Unterschiede der *eibG*-Allele bestimmt wurden. Es ergaben sich Übereinstimmungen in den AS-Sequenzen von EibG zwischen 88,11 und 100%. Die größten Unterschiede zur Referenzsequenz wurden bei den Allelen *eibG*-020 (90,30%) und *eibG*-021 (88,11%) festgestellt. Somit konnten drei Subtypen von *eibG* durch die Allel-Heterogenität

identifiziert werden: *eibG- α* , *eibG- β* und *eibG- γ* , wobei *eibG- α* mit 19 Allelen bei 33 STEC-Stämmen die größte *eibG*-Untergruppe darstellte.

Basierend auf den Basensequenzen konnten die theoretischen AS-Sequenzen bestimmt und miteinander verglichen werden (Abb. 28). Die meisten Sequenzabweichungen wurden im mittleren Bereich der AS-Sequenz festgestellt, der auch die häufigsten Differenzen in der AS-Sequenz bei allen anderen Eib-Proteinen aufwies (vgl. Kapitel 4.16).

5.2.2 Signalsequenz

Mit dem *SignalP-4.0* – Server (Petersen *et al.*, 2011) konnte die Signalsequenz von *eibG-001* (Referenzsequenz) den ersten 27 Aminosäuren innerhalb der aus 70 Aminosäuren bestehenden Anfangssequenz von EibG zugeordnet werden (vgl. Abb. 63 und Abb. 64). Der Vergleich von diesen ersten 27 Aminosäuren innerhalb der 21 *eibG*-Allele zeigte eine Homologie zwischen 96,15 und 100%. Dabei ist die Aminosäure Methionin an der Position EibG₀₀₇ bei den Allelen EibG-015 (*eibG- α*) und EibG-021 (*eibG- γ*) durch Lysin ersetzt, und das Allel 020 (*eibG- β*) weist bei EibG₀₂₈ eine Erweiterung der Signalsequenz durch ein zusätzliches Alanin auf.

Der Austausch von Methionin durch Lysin, also einer unpolaren gegen eine basische Aminosäure, wirkt sich anscheinend auf die Erkennung durch das Chaperon SecB des *sec*-Sekretionssystems und somit auf die erfolgreiche Expression des gesamten EibG-Proteins aus. In allen Experimenten, in denen ein unmittelbarer Vergleich der Expression verschiedener EibG-Subtypen möglich war, exprimierten die *eibG- γ* Produzenten insgesamt weniger EibG als die *eibG- α* und *eibG- β* – Stämme.

Bei einem Vergleich von 20 *eibG*-positiven STEC produzierte der Stamm 0520/99 (*eibG- γ*) nach 20 h geschüttelter Inkubation nur sehr wenig EibG (Abb. 51 B und D). Erst in den letzten 4 Stunden der 24-stündigen stationären Kultivierung bildet der Stamm 0520/99 mehr EibG als bei geschüttelter Kultivierung (Abb. 52 C) und produziert bis zu diesem Zeitpunkt fast gar kein EibG. Mittels *eibG*-exprimierender Klone konnte die Variabilität in der Expressionsstärke verschiedener EibG-Subtypen durch Expression im *E. coli* – Stamm BL21(DE3) mit gleichem genetischem Hintergrund nachgewiesen werden. Obwohl die Klon-Stämme B-1-10 (*eibG- α*), B-20-1 (*eibG- β*) und B-18-2 (*eibG- γ*) mit gleicher Zellzahl eingesät, identisch kultiviert und mit IPTG induziert wurden, wurden mit dem *eibG- γ* – Klon immer nur geringere Konzentrationen an EibG- γ erzielt (Abb. 53 und Abb. 54).

Die Ergebnisse aus der Biofilmuntersuchung (Kapitel 4.5.5) zeigen nach einer 12-stündigen Inkubation bei allen stationär kultivierten Klonen eine hohe Anzahl an adhären Zellen (Abb. 49). Diese betragen bei dem *eibG- γ* – Stamm B-18-2 das ca. 6-Fache im Vergleich zur geschüttelten Kultivierung. Dabei ist die EibG-Konzentration zu diesem Zeitpunkt bei stationär kultiviertem B-18-2 viel niedriger als in Schüttelkultur (Abb. 53 C).

Zwei wesentliche Aussagen konnten dadurch gemacht werden: bei gleicher Kultivierungsart exprimieren *eibG- γ* – Produzenten weniger EibG als die Träger anderer *eibG*-Allele, was auf die veränderte Signalsequenz zurückgeführt werden konnte. Die stationäre Kultivierung begünstigt eine verstärkte Biofilmbildung, wobei die Konzentration an EibG bei geschüttelten Kulturen viel höher ist. Damit ist also nicht nur EibG an der Biofilmbildung ab der 12. Kultivierungsstunde beteiligt, sondern es wird diese durch weitere Faktoren begünstigt. Da der Expressionsstamm BL21(DE3) keine Gene für Antigen43 oder EhaA aufweist (Daten durch NCBI-BLAST erhalten), sind diese Adhäsionsproteine nicht an der Biofilmbildung der generierten *eibG*-positiven Klone beteiligt.

5.2.3 Weitere AS-Bereiche von EibG

Mittels *Swiss Model Workspace* konnten drei Templates für ein 3D-Modell von EibG erstellt werden: das YadA aus den *Yersinia*-Spezies, das verwandte EibD und HIA aus *Haemophilus influenzae* (vgl. Kapitel 4.15.1). Aufgrund der hohen Komplexität der vorhergesagten trimeren Struktur von EibG konnte mit den PDB-Daten der Templates (3s6ID, 2xqhA und 3emoA) zumindest eine monomere Darstellung von EibG berechnet werden (Abb. 80). Durch den Vergleich zu der mit 61,99% identischen AS-Sequenz von EibD konnten weiterhin einzelne Bereiche von EibG ermittelt werden: der Kopfbereich (EibG₁₋₁₇₄), der Nackenbereich (EibG₁₇₅₋₃₀₃), der RHcc-Bereich (EibG₃₀₄₋₃₅₃), der Sattelbereich (EibG₃₅₄₋₃₈₄), der LHcc-Bereich (EibG₃₈₅₋₄₁₄), die Transmembrandomäne (EibG₄₁₅₋₅₀₈), die IgA-Bindungsstelle (EibG₃₄₇₋₃₄₉) und die IgG-Bindungsstelle (EibG₃₉₁), woraus ein 3D-Modell erstellt werden konnte (vgl. Tabelle 25 und Abb. 81). Den größten Unterschied zu EibD zeigt dabei der Kopfbereich, welcher bei EibG um 14 Aminosäuren länger ist und mit 41,38% die geringste Übereinstimmung mit EibD im Vergleich zu den anderen Bereichen darstellt.

Mit keinem der vorgeschlagenen Templates konnte die Struktur und Funktion der ersten 83 Aminosäuren von EibG vorhergesagt werden. Nach Abspaltung der theoretisch berechneten Signalsequenz mit 27 Aminosäuren gibt es für den Bereich EibG₂₈₋₈₅ kein geeignetes 3D-Modell. Allerdings konnte eine hohe Homologie der AS-Sequenz dieses Bereichs zu einigen Aminopeptidasen aus *Deinococcus*-Spezies und der Metalloprotease AmpS aus *S. aureus* detektiert werden (BLAST-Algorithmus von *UniProt*). Von den sieben möglichen metallkomplexierenden Aminosäuren von AmpS konnten drei auch im homologen Bereich von EibG identifiziert werden (GLU-46, HIS-51 und TYR-58). Da die 3D-Modellierung diesen Bereich nur mit einer niedrigen Wahrscheinlichkeit im Vergleich zur realen Konformation darstellen würde, konnte theoretisch nicht ermittelt werden, ob sich diese Aminosäuren in den äußeren oder inneren Bereichen des EibG-Trimers befinden. Die polaren Eigenschaften der drei detektierten Aminosäuren deuten aber auf einen der äußeren Bereiche hin.

Die Bereiche von YadA, welche für die Adhäsion an die Wirtszellen (YadA₂₉₋₈₁) und die Kollagenbindung sowie die Autoagglutination (YadA₈₃₋₁₀₄) verantwortlich sind (Nummelin *et al.*, 2004), wurden mittels *Jalview* und *UniProt* miteinander verglichen und homologe Bereiche für EibG identifiziert. Der Bereich EibG₁₄₁₋₁₉₂ weist eine 26,42%ige Homologie zu YadA₂₉₋₈₁ und EibG₁₉₄₋₂₁₅ eine 50,00%ige Homologie zu YadA₈₃₋₁₀₄ auf. Innerhalb der EibG-Sequenz liegen diese Bereiche am Übergang von der Kopfdomäne (EibG₁₋₁₇₄) zum Nacken bzw. im Nackenbereich (EibG₁₇₅₋₃₀₃) von EibG und könnten ähnliche Funktionen wie bei YadA haben. Der Vergleich homologer Bereiche aller EibG-Allele zeigte eine AS-Übereinstimmung zwischen 95,45 und 100%.

Die Gegenüberstellung der IgG- und IgA-Bindungsdomänen von EibD (Leo *et al.*, 2011) erlaubte die Identifizierung der homologen Bereiche innerhalb von EibG (Abb. 82). Mit einer 50%igen Übereinstimmung zu EibD₃₂₉₋₃₄₄ wurde der um acht Aminosäuren kürzere Bereich EibG₃₄₄₋₃₅₁ für die IgA-Bindung bestimmt. Die AS-Abfolge ³⁴⁷REY³⁴⁹ zeigt den Austausch der Aminosäuren LYS-332 und LYS-333 bei EibD gegen die Aminosäuren ARG-347 und GLU-348 bei EibG, was zu einer geringeren Affinität von EibG zu IgA führt. Der Bereich EibG₃₈₈₋₄₁₅ weist eine 57%ige Homologie zum entsprechenden Bereich von EibD mit der für die IgG Fc – Bindung relevanten Aminosäure ASP-391 auf (ASP-387 bei EibD). Dieser Bereich ist bei allen Eib-Mitgliedern konserviert und zeigt bei allen Eib-

Proteinen eine ähnlich hohe Affinität zum IgG Fc. Mittels *Jalview* wurde EibG₃₉₁ in den äußeren Bereichen der α -Helizes unter Zuhilfenahme eines 3D-Modells lokalisiert (Abb. 83), womit diese Aminosäure nicht durch andere EibG-Bereiche verdeckt sein kann und somit für die Bindung an das IgG Fc – Fragment zur Verfügung steht. Je EibG-Trimer gibt es daher drei Bindungsstellen für IgG Fc.

ELISA-Experimente zur Affinitätsbestimmung EibG-haltiger Lysate an IgG-Moleküle verschiedener Spezies (Kapitel 4.9) ergaben eine ca. dreifach höhere Affinität von EibG- α (Stamm 2875/96) zu IgG aus Rind im Vergleich zu IgG der anderen untersuchten Spezies (Abb. 57). Dabei sind die Affinitäten für IgG aus Mensch, Schwein, Ziege und Schaf ähnlich hoch, wobei die Bindung von EibG an IgG aus Huhn nur etwas höher im Vergleich zum Lysat des *eibG*-negativen Stammes 1745/98 ausfällt.

Eine weitere Mutation innerhalb der EibG-Sequenz ist durch erhöhte Expressionsraten des betroffenen EibG-Allels auffällig geworden. Der Stamm 2875/96 (*eibG*- α) wurde in allen Experimenten als der EibG-Produzent mit der höchsten Konzentration an EibG identifiziert. Der verwandte Stamm 1809/00 weist den gleichen Serotyp (O91:H14) und den gleichen Sequenztyp (ST 33) auf. Das Allel *eibG*-001 vom Stamm 1809/00 unterscheidet sich nur in einer Aminosäure von dem Allel *eibG*-016 des Stammes 2875/96: EibG₂₀₃. TRP-203 von *eibG*-001, und auch von allen weiteren sequenzierten *eibG*-Allelen, ist bei *eibG*-016 durch LEU-203 ausgetauscht. Der Austausch dieser beiden hydrophoben Aminosäuren kann eine sterische Veränderung der Sekundärstruktur von EibG an dieser Stelle bewirken und anscheinend die Erkennung durch das *sec*-System oder weiterer Komponenten des EibG-Sekretionsweges begünstigen.

5.2.4 AS-Vergleich innerhalb der Eib-Familie

Der Vergleich der AS-Sequenzen aller Eib-Proteine (Kapitel 4.16) zeigt stark konservierte Bereiche an den N- und C-terminalen Enden sowie variable Sequenzen im mittleren Bereich dieses Proteins (Abb. 84). Dabei sind die Transmembrandomänen, der LHcc-Bereich, der Sattelpbereich mit der angrenzenden IgG-Bindungsstelle und die Signalsequenzen sehr ähnlich aufgebaut. Die von Leo *et al.* (2011) ermittelte IgA-Bindungsstelle von EibD (EibD₃₃₂₋₃₃₄) weicht bei fast allen anderen Eib-Mitgliedern in der AS-Abfolge ab (KKY bei EibC und EibD, TDK bei EibA, TDR bei EibF sowie REY bei EibE, EibG und EibH) und vermittelt somit voneinander abweichende Affinitäten dieser Proteine zu IgA (Leo *et al.*, 2011).

Die für YadA ermittelten Bereiche für die Adhäsion an Wirtszellen sowie für die Kollagenbindung und die Eigenaggregation wurden mit denen von EibG verglichen und ähnlichen Sequenzen der Eib-Familie gegenübergestellt. Es ergibt sich eine Homologie zum postulierten Zelladhäsionsbereich für EibG₁₄₁₋₁₉₂ mit 18,18% (von EibG zu EibF) und 36,96% (von EibG zu EibC). Die entsprechenden möglichen Bereiche für Kollagenbindung und Eigenaggregation (EibG₁₉₄₋₂₁₅) zeigen eine Homologie zwischen 0% (von EibG zu EibA) und 77,27% (von EibG zu EibE bzw. EibC). Damit besteht nur eine geringe Wahrscheinlichkeit, dass der für die Eigenaggregation von EibG ermittelte Bereich (EibG₁₉₄₋₂₁₅) auch bei EibE, EibC und EibD die gleiche Funktion hat, was aber einer weiteren experimentellen Überprüfung bedarf.

5.3 BESTÄTIGUNG VON EIBG ALS EIN IGG Fc – BINDENDEN PROTEIN

Für alle Experimente, bei denen das humane IgG Fc für die Detektion eingesetzt wurde, ist die strukturelle Charakterisierung von EibG als IgG-bindendes Protein innerhalb der untersuchten STEC-Stämme sehr wichtig. Mit Hilfe der MALDI-TOF – MS (Kapitel 4.10) konnten die durch SDS-PAGE und Immunblotting aufgetrennten und IgG Fc – bindenden EibG-Banden mittels *peptide mapping* als EibG-Moleküle identifiziert werden.

Die untersuchten IgG Fc bindenden Proteine wurden mit einer Sequenzabdeckung zwischen 32 und 44% den „richtigen“ EibG-Allelen zugeordnet. Die meisten identifizierten Peptide befinden sich in der Mitte der EibG-Moleküle und konnten zusätzlich durch nanoESI-Q-TOF – MS (Kapitel 4.11) sequenziert und ebenfalls bestätigt werden.

5.4 WEITERE TRIMERISCHE AUTOTRANSPORTER ADHÄSINE EIBG-POSITIVER STEC-STÄMME

Einige *eibG*-positive STEC wurden auf das Vorkommen der Gene für weitere Trimerische Autotransporter Adhäsine untersucht. Mittels PCR konnten die Gene für Antigen43 und EhaA in den Stämmen 1809/00 und 2875/96 (*eibG*- α) sowie das Gen für EhaA in den Stämmen 0529/00 (*eibG*- γ) und 06-03233 (*eibG*- β) sowie in den *eibG*- α – Stämmen (1809/00 und 2875/96) nachgewiesen werden (Kapitel 4.17). Somit besteht die Möglichkeit, dass die untersuchten und weitere *eibG*-positive WT-Stämme neben EibG auch die Adhäsionsproteine Antigen43 und/oder EhaA exprimieren, die zur Adhäsion und Biofilmbildung beitragen können.

Weiterhin wurde die Möglichkeit der Bindung von Antigen43 und EhaA zum IgG Fc – Fragment anhand der AS-Sequenzen relevanter Bereiche untersucht. Dafür wurden die IgG-bindenden Bereiche von EibG und EibD den entsprechenden AS-Bereichen von Antigen43 und EhaA gegenübergestellt (Abb. 86). Die entsprechende Aminosäure in EibG (ASP-391) ist in Antigen43 und EhaA durch Valin ersetzt und sollte, zumindest theoretisch, keine hohe Affinität dieser TAA zu IgG Fc – Fragmenten aufweisen. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der umliegenden Aminosäuren entsprechen aber in allen hier untersuchten TAA dem gleichen Muster mit der Abfolge von zwei hydrophilen und einer hydrophoben AS, woraus eine geringe IgG-Affinität von Antigen43 bzw. EhaA resultieren könnte. Diese Hypothese muss allerdings noch experimentell bestätigt werden.

5.5 GLEICHZEITIG MIT EIBG VERSTÄRKT EXPRIMIERT E. COLI – PROTEINE

Durch unterschiedliche Kultivierungsbedingungen der *eibG*-positiven STEC konnte ein Parameter ermittelt werden, der zur Expression höherer EibG-Konzentrationen führte. Bei stationärer Kultivierung wurde bei allen untersuchten WT-Stämmen nach 24 Stunden eine außergewöhnlich hohe Expression von EibG festgestellt. Dabei wurde etwa die Hälfte der Bakterienzellzahl erreicht, die standardmäßig bei geschüttelten Kulturen erzielt wurde (vgl. Abb. 52 und Abb. 54). Mittels 2D-Gelelektrophorese wurden Lysate *eibG*-positiver STEC nach geschüttelter und stationärer Kultivierung aufgetrennt (Kapitel 4.13.1) und die Spots mit abweichender Intensität mittels *peptide mass fingerprinting* durch MALDI-TOF – MS identifiziert (Kapitel 4.13.2).

Keiner der untersuchten Spots konnte EibG zugeordnet werden. Durch die bereits zuvor festgestellte unterschiedliche Verteilung von EibG innerhalb von SDS-PAGE – Gelen (Kapitel 4.6.1) konnte davon ausgegangen werden, dass EibG in seinen mono-, di-, tri- bzw. tetrameren Formen vorliegt und nicht als ein einzelner Spot in dem 2D-Gel auftrat.

Die meisten der 23 untersuchten Proteinspots mit unterschiedlicher Intensität bei geschüttelten bzw. stationären Kultivierungen (Tabelle 23) konnten Proteinen des Stoffwechselsystems von *E. coli* zugeordnet werden (wie z. B. *fumA* aus dem Zitratzyklus).

Die in höheren Konzentrationen durch die stationäre Kultivierung synthetisierten Proteine der Spots 11 (MlaC), 14 (LptD), 15 (BamA), 19 (RhsB) und 21 (StfR) sind alle am Aufbau von Komponenten der äußeren *E. coli* – Membran beteiligt. Die Proteine MlaC und LptD unterstützen den Transport von Phospholipiden in bzw. aus der Zelle. BamA (vgl. Kapitel 1.3.7) ist an der Synthese sowie dem Einbau der β -Barrel von verschiedenen OMP in die äußere Bakterienmembran, darunter auch von EibG, beteiligt. Die Rhs-Proteinfamilie ist an dem Transport von Polysacchariden durch die *E. coli* – Membran beteiligt und StfR unterstützt die Interaktion zwischen den Zellen durch den Aufbau von faserartigen Strukturen zwischen diesen (Wang *et al.*, 2010). Damit konnten weitere Proteine, die an der Synthese oder dem Transport von Komponenten der bakteriellen Zellmembran, und somit auch an der Ausbildung des Biofilms, beteiligt sind, den *eibG*-positiven STEC zugeordnet werden. Inwieweit diese Proteine an der Ausbildung einer Expression von EibG beteiligt sind, muss durch weitere Experimente geklärt werden.

5.6 EIBG-VERMITTELTE BIOFILMAUSBILDUNG VON *E. COLI*

Während der Kultivierung von *eibG*-positiven STEC konnte durch stationäre Kultivierung eine erhöhte Expression von EibG bei allen Wildtyp-Stämmen nach 20 bis 24 h festgestellt werden. Diese Tatsache wurde in weiteren Experimenten ausgenutzt, um weitere, mit der erhöhten EibG-Expression einhergehende Adhäsions- bzw. Interaktionseigenschaften zu untersuchen.

5.6.1 Einfluss der Medienzusammensetzung auf die *eibG*-vermittelte Kettenausbildung

Durch den Einsatz eines proteinfreien Kulturmediums wurde bei geschüttelter Kultivierung der *eibG*-positiven STEC in Minimalmedium M9 (Kapitel 4.4.1) ein leichter Rückgang in der Kettenlänge der Bakterien im Vergleich zur Kultivierung in LB-Medium beobachtet. Die stationäre Kultivierung führte sowohl in M9- als auch in LB-Medium zur Ausbildung sehr langer Ketten. Somit konnte festgestellt werden, dass die Verwendung von M9-Medium die EibG-Expression nicht verhinderte, sondern dass der Mangel an proteinogenen Substanzen und die Scherkräfte die Ausbildung langer Ketten unter geschüttelten Bedingungen verhinderten. Alle weiteren Kultivierungen wurden daher in LB-Medium durchgeführt.

5.6.2 Variationen in der Expressionsstärke von EibG

Die Gegenüberstellung der Lysate *eibG*-positiver STEC zeigte, dass bei gleicher Kultivierungsart verschiedene STEC unterschiedliche Konzentrationen an EibG exprimierten (vgl. Abb. 51). Die höchsten EibG-Konzentrationen konnten mehrheitlich bei Serotypen mit fehlendem oder nicht typisierbarem H-Antigen (Ont:H⁻, O91:H⁻, OR:H⁻, O91:H^{nt}) und dem Serotyp O91:H14 detektiert

werden. Die niedrigsten EibG-Konzentrationen wurden überwiegend für Serotypen mit nachgewiesenen Flagellen (O91:H14, OR:H10, OR:H45, O146:H21, OR:H14, O146:H28, Ont:H30 und OR:H21) festgestellt. Das Fehlen der Flagellen führt zum Verlust der bakteriellen Motilität und begünstigt offensichtlich die Ausbildung von Adhäsionsfaktoren, in diesem Fall von EibG.

Durch Transformation des Expressionsstammes BL21(DE3) mit dem *pGEM-T Easy* – Vektor konnte die IPTG-induzierte Expression verschiedener *eibG*-Subtypen unabhängig vom *E. coli* – Serotyp untersucht werden (Kapitel 4.3). Mittels Immunblottings konnte ein direkter Vergleich in der Expressionsstärke verschiedener EibG-Subtypen vorgenommen werden (Abb. 54). Bei gleichen Kultivierungsbedingungen exprimiert der *eibG*- α – positive Stamm mehr EibG, als die *eibG*- β und *eibG*- γ – positiven Stämme. Der *eibG*- γ – Stamm war bei allen Experimenten der schwächste EibG-Produzent. Anhand der Unterschiede in den Signalsequenzen konnte dieser Expressionsunterschied auf die geringen Abweichungen in der AS-Abfolge der Signalsequenzen zurückgeführt werden.

5.6.3 Kettenausbildung *eibG*-positiver *E. coli*

Da die EibG-Expression verschiedener *eibG*-Subtypen aufgrund von Mutationen in den Signalsequenzen variierte und die EibG-Expression durch das Fehlen bzw. Mutationen der H-Antigene begünstigt wurde, konnte die Ausbildung verschieden langer Bakterienketten erklärt werden. Die Stämme mit *eibG*- γ (0520/99 und 0519/99) exprimieren aufgrund der mutierten Signalsequenz erheblich weniger EibG als die übrigen EibG-positiven *E. coli* und bilden dadurch überwiegend kurze Ketten aus. Der *eibG*- β – Produzent (06-03233) profitiert durch seinen Serotyp (O152:H⁺) bzw. das Fehlen der Flagellen, so dass eine erhöhte Expression von EibG begünstigt wird, was sich in der Ausbildung langer Bakterienketten manifestiert. Die übrigen *eibG*- α Produzenten weisen Variationen hinsichtlich der Länge der gebildeten Ketten auf, die ebenfalls auf die serotypbedingte Expressionsstärke zurückgeführt werden können. Dabei exprimiert der Stamm 2875/96 am meisten EibG und bildet die längsten Bakterienketten aus. Durch den Allel- und Serotyp-Vergleich dieses Stammes mit weiteren O91:H14 – Stämmen konnte die erhöhte EibG-Expression auf die Mutation im Allel-016 an der Stelle EibG₂₀₃ zurückgeführt werden, die anscheinend eine bessere Erkennung durch das *sec*-System gewährleistet und dadurch höhere EibG-Sekretionsraten ermöglicht. Diese Beobachtungen konnten sowohl in den Adhäsionstests mit humanen (HCT-8, Abb. 29) bzw. bovinen (FDK-R 971, Abb. 30) intestinalen Epithelzellen als auch in zellfreien Systemen (Abb. 31 und Abb. 32) gemacht werden.

Der direkte Vergleich von identisch kultivierten *eibG*-positiven *E. coli* zeigt in den Untersuchungen mit (Abb. 35 und Abb. 39) und ohne (Abb. 36) intestinale Epithelzellen immer längere Bakterienketten bei den Wildtypen als bei den Klonen. Daraus kann auf weitere aber bislang unbekannte Kettenausbildung-fördernde Faktoren bei den *eibG*-positiven Wildtypen geschlossen werden.

5.6.4 Verteilung von EibG auf der *E. coli* – Oberfläche

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurde die Verteilung von EibG auf der bakteriellen Zelloberfläche untersucht (Kapitel 4.14), wobei eine gleichmäßige Verteilung von EibG auf der gesamten Oberfläche der Stämme 2875/96 (*eibG*- α), 06-03233 (*eibG*- β) und 0520/99 (*eibG*- γ) gefunden wurde (vgl. Abb. 72 bis Abb. 75). Da EibG bisher als das entscheidende Protein für die Kettenausbildung bei *eibG*-positiven Stämmen angesehen wurde, war dieser Befund insofern ungewöhnlich, da für die kettenartige Aggregation ein verstärktes Auftreten von EibG an den Polen

der Bakterien erwartet wurde. Während der Probenvorbereitung für die TEM-Mikroskopie waren die Bakterien zahlreichen Inkubations-, Wasch- und Fixierschritten in Lösung und somit ständig starken Schüttelbewegungen ausgesetzt. Danach konnten nur sehr wenige und meist sehr kurze Ketten detektiert werden. Möglicherweise führte die Probenvorbereitung zu Kettenbrüchen; dennoch müssten auch in diesem Fall EibG-Proteine präferentiell an den Polen der Bakterienoberflächen nachweisbar sein.

Die Experimente mit BL21(DE3)*eibG*⁺ ergaben den Nachweis der Notwendigkeit der EibG-Expression zur Kettenausbildung im Vergleich zu dem nicht in Ketten wachsenden BL21(DE3) – Stamm. Durch die BLAST-Überprüfung des Genoms von BL21(DE3) wurden keine Gene für Antigen43, AIDA-I oder EhaA gefunden. Somit ist EibG das einzige Adhäsionsprotein in den *eibG*-positiven Klonen und vermittelt die Kettenausbildung bei BL21(DE3)*eibG*⁺. Es konnte aber auch beobachtet werden, dass die durch die Klone produzierten Ketten generell kürzer sind als die Ketten *eibG*-positiver WT-Stämme (vgl. Abb. 39) und die stationäre Kultivierung nicht, wie bei den Wildtypen, zur verstärkten EibG-Expression führt (vgl. Abb. 53). Daher können bei den *eibG*-positiven Wildtypen zusätzliche Faktoren vermutet werden, welche neben EibG die Kettenformation unterstützen.

Da bei den untersuchten *eibG*-positiven Wildtypen die Gene für Antigen43 bzw. für EhaA vorhanden waren, ergibt sich die folgende Hypothese: EibG ist für die Adhäsion der Bakterienzellen und für die Kettenausbildung verantwortlich, die jedoch durch zusätzliche Mechanismen, die verstärkt an den Polen der Bakterien wirken, unterstützt wird. Durch stationäre Kultivierung wird die Phase der Biofilmbildung in *E. coli* ausgelöst, die sich in einer Expression von zusätzlichen Adhäsionsproteinen äußert, die für den Zell-Zell-Kontakt erforderlich sind. Einige Adhäsionsproteine, wie z. B. das Antigen43, werden in bestimmten Stadien der Biofilmbildung an den Polen von *E. coli* verstärkt exprimiert (Vejborg und Klemm, 2009), wobei die Sekretionsmechanismen in diesen Bereichen der Bakterien aktiviert werden. Da EibG alle Eigenschaften eines TAA aufweist, wird es in Analogie zum Antigen43 bzw. EhaA wahrscheinlich ebenfalls das *sec*-Sekretionssystem für seinen Transport an die Bakterienoberfläche nutzen. Durch das Auslösen der Biofilmbildung werden somit bei *E. coli* die Proteine des *sec*-Systems sowohl von Antigen43 und EhaA als auch von EibG genutzt, um EibG in bestimmten Wachstumsphasen verstärkt an den Polen der Bakterien zu produzieren.

5.6.5 Produktion der Biofilmmatrix durch *eibG*-positive *E. coli*

Unter stationären und geschüttelten Kultivierungsbedingungen wird die Biofilmmatrix von *E. coli* unterschiedlich stark ausgebildet. Während der geschüttelten Inkubation *eibG*-positiver *E. coli* wird ab der 6. Stunde (stationäre Wachstumsphase) EibG in hohen Konzentrationen exprimiert, die Zahl der adhärierenden Zellen ist dabei allerdings sehr niedrig (Abb. 52). Bei stationärer Kultivierung ist die EibG-Expression in der 6. Inkubationsstunde noch relativ gering, die Anzahl an adhärenenten Zellen aber schon sehr hoch, die sich bis zur 24. Stunde nur noch leicht erhöht. In der 24. Stunde geraten die geschüttelten Kulturen in die Absterbephase und stellen die EibG-Expression langsam ein. Zur gleichen Zeit erreichen die Kulturen die stationäre Wachstumsphase, wobei die EibG-Expression zunimmt. Hier wird EibG am Anfang der stationären Wachstumsphase von *E. coli* am stärksten exprimiert, und nach dem Erreichen der Absterbephase nimmt die EibG-Expression wieder ab. Die Höhe der EibG-Expression konnte jedoch bei *eibG*-positiven WT-Stämmen nicht parallel zur Ausbildung adhärenenten Bakterienzellen bzw. der Biofilmmatrix bestimmt werden.

Bei den *eibG*-positiven Klonen wird die EibG-Expression durch IPTG-Induktion zu Beginn der Wachstumsphase künstlich auf ein hohes Niveau gebracht (Abb. 53). Außer bei dem *eibG*- γ exprimierenden Stamm B-18-2, dessen Mutation in der Signalsequenz insgesamt zu niedrigeren Konzentrationen an EibG führt, bilden die Klone sowohl während der geschüttelten als auch während der stationären Kultivierung einen hohen Anteil an adhärenenten Zellen aus. Auch die Biofilmmatrix ist in der 6. Stunde unter beiden Kultivierungsbedingungen sehr gut ausgebildet (vgl. Abb. 44 bis Abb. 46). Da EibG als einziges Adhäsionsprotein bei BL21(DE3)*eibG*⁺ exprimiert wird, folgt die Schlußfolgerung, dass EibG zu einer erhöhten Zell-Zell-Adhäsion und dadurch zur verstärkten Ausbildung des Biofilms führt.

Mit dem Wissen der möglichen Expression von Antigen43 bzw. EhaA bei *eibG*-positiven Wildtypen kann folgende Hypothese aufgestellt werden: durch die stationäre Kultivierung und günstige *eibG*-Allel – Eigenschaften (z. B. *eibG*-016) sowie passende Serotyp-Merkmale (Fehlen vom H-Antigen) erfahren die *E. coli* – Bakterien einen Phasenshift zur Biofilmbildung und erhöhen dadurch die Expression von Adhäsionsproteinen, wie z. B. von Antigen43. Damit bilden sich schon nach 6 Stunden stationärer Inkubation bei 37 °C viele Zell-Zell-Kontakte aus, welche die Ausbildung der Biofilmmatrix begünstigen. Erst zu einem späteren Zeitpunkt wird EibG in höheren Mengen exprimiert, dessen Konzentration an den Bakterienpolen durch das hier lokalisierte *sec*-System erhöht wird. Die geschüttelte Kultivierung veranlasst die Zellen nicht zu einem Phasenshift zur Biofilmbildung, so dass die Gene für Antigen43 oder EhaA nicht schon beim Kultivierungsbeginn hochreguliert werden. Mit dem Eintritt in die stationäre Phase steigt die Expression von EibG an, die Anzahl von Zell-Zell-Kontakten erhöht sich, und die Bakterien erfahren den Phasenshift zur Biofilmbildung. Auch die mit dem Biomasseanstieg einhergehende Limitierung von O₂ und der Abfall des pH-Werts begünstigen die Expression von Adhäsionsproteinen wie Antigen43 und bewirken ebenfalls eine verstärkte Ausbildung der Biofilmmatrix (vgl. auch Kapitel 1.5). Diese Hypothese müßte allerdings durch Bestimmung der Expressionsmengen von Antigen43 und weiterer Adhäsionsproteine in Verbindung mit der EibG-Expressionsrate überprüft werden (z. B. durch die *realtime*-PCR).

Die Studien der EibG-vermittelten Biofilmbildung stehen noch an ihrem Anfang. Durch die in dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse über die variable Expressionsstärke von EibG, die Expressions-Abhängigkeit vom Serotyp des Trägerstammes, die Beteiligung von Oberflächenstrukturen an der Ausbildung der Biofilmmatrix und die daraus resultierenden Zell-Zell-Kontakte sowie die Möglichkeit eines horizontalen Transfers der *eibG*-Gene zwischen verschiedenen *E. coli* – Stämmen unterstreichen die Virulenz von diesem vielseitigen Protein. Die Fähigkeit, IgA bzw. IgG zu binden, erhöht die Fähigkeit der Trägerbakterien, sich dem Immunsystem des Körpers zu entziehen und dadurch eine längere Wirkung toxischer Faktoren, wie z. B. der Shiga Toxine, zu gewährleisten. Somit sollte die durch EibG-exprimierende STEC bestehende Gefahr für Menschen und andere Säugetiere nicht unterschätzt werden. Das Zusammenwirken weiterer EibG-begleitender Faktoren, der gemeinsam genutzte *sec*-Sekretionsweg von weiteren Adhäsionsproteinen sowie die zeitliche Abstimmung der Expression während der Biofilmbildung sollten daher in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

6. ANHANG

6.1 DANKSAGUNG

Die im Folgenden genannten Personen haben wesentlich zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen und haben meinen besonderen Dank an dieser Stelle verdient.

Als Erstes möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Helge Karch, Direktor des Instituts für Hygiene der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität (WWU) in Münster, meinen Dank aussprechen für die Ermöglichung dieser Arbeit und die Erlaubnis der Benutzung der Laboratorien seines Instituts.

Meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Johannes Müthing (Institut für Hygiene der WWU Münster) gilt ebenfalls ein besonderer Dank für die Unterstützung und Begleitung auf dem Weg der Entstehung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Thomas Noll (Institut für Zellkulturtechnik, Universität Bielefeld) danke ich für seine Bereitschaft zur Begutachtung dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. techn. Karl Friehs danke ich für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission, und Herrn Dr. Joe Max Risse als Mitglied der Prüfungskommission möchte ich ebenfalls an dieser Stelle meinen Dank aussprechen.

Für die Benutzung von Laborräumen und des Laborequipments des Instituts für Hygiene am Institut für Chemo- und Biosensorik (ICB, WWU Münster) gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Dobrindt.

Für die Betreuung, intensive Beratung, Erstellung der Sequenzdaten, die Durchführung der MLST-Experimente und fachliche Begleitung bei der Veröffentlichung der Daten möchte ich besonders Herrn PD Dr. med. Alexander Mellmann danken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Klaus Dreisewerd für die Bereitstellung des UV-MALDI-o-TOF Massenspektrometers und Herrn Dr. Michael Mormann für die Möglichkeit, das nanoESI-Q-TOF Massenspektrometer nutzen zu dürfen. Für die Durchführung der Messungen am nanoESI-Q-TOF – Massenspektrometer gilt mein Dank Herrn PD Dr. Gottfried Pohlentz.

Für die Bereitstellung von Primern sowie allzeitliche Hilfestellung und Beratung bei der Durchführung gentechnischer Arbeiten gilt mein Dank Frau Dr. rer. nat. Barbara Middendorf.

Für die Erstellung elektronenmikroskopischer Aufnahmen möchte ich besonders Frau Lilo Greune und Prof. Dr. M. Alexander Schmidt (Institut für Infektiologie, ZMBE der WWU Münster) danken.

Mein Dank gilt auch Alexander Pirkl, Marcel Wiegemann und Jens Soltwisch für die Durchführung der Messungen am UV-MALDI-o-TOF Massenspektrometer.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thorsten Kuczius, Frau PD Dr. Martina Bielaszewska, Frau Dr. med. Wenlan Zhang und Frau Dr. Iris Meisen möchte ich besonders für die spannenden Diskussionen, allzeitliche Hilfsbereitschaft und Beratung danken.

Für das Durchlesen und Korrigieren meiner Arbeit danke ich vielmals Lisa Kunsmann, Wiebke Storck, Dominik Cholewa, Sabina Menke und Jennifer Stamm.

Mein Dank gilt allen Kollegen und Mitarbeitern des Instituts für Hygiene der WWU Münster, aber im Besonderen Wiebke Storck, Josefine Betz, Lisa Kunsmann, Andreas Bauwens, Ivan Kouzel, Jule Krägenbring, Ralph Fischer, Alexander Pirkel, Jens Soltwisch, Lukas Witt, Mona Schulte, Nadine Brandt, Ingmar Zude, Sadrick Schah, Birgit Evert, Francisco Toval, Marina Lichtenwald, André Weiss, Christian-Daniel Köhler, Lena Radamm und Ewald Kalthoff.

Für die mentale Unterstützung danke ich allen meinen Freunden und meinen Eltern.

Die Finanzierung meiner Arbeit erfolgte durch das FBI-Zoo – Projekt „Shiga Toxin-produzierende *Escherichia coli*: Grenzgänger zwischen Umwelt, Tier und Mensch“ mit dem Förderkennzeichen 01KI1012B.

6.2 LITERATURVERZEICHNIS

Aberg, A., Shingler, V. und Balsalobre, C. (2006), "(p)ppGpp regulates type 1 fimbriation of *Escherichia coli* by modulating the expression of the site-specific recombinase FimB", *Molecular microbiology*, Vol. 60 No. 6, S. 1520-1533.

Adkins, S. und Burmeister, M. (1996), "Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands: applications for preparative gels and educational demonstrations", *Analytical biochemistry*, Vol. 240 No. 1, S. 17-23.

Agladze, K., Wang, X. und Romeo, T. (2005), "Spatial periodicity of *Escherichia coli* K-12 biofilm microstructure initiates during a reversible, polar attachment phase of development and requires the polysaccharide adhesin PGA", *Journal of bacteriology*, Vol. 187 No. 24, S. 8237-8246.

Ahmer, B.M.M. (2004), "Cell-to-cell signalling in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*", *Molecular microbiology*, Vol. 52 No. 4, S. 933-945.

Albrecht, S., Brandl, H., Steinke, M. und Freidt, T. (1994), "Chemiluminescent enzyme immunoassay of prostate-specific antigen based on indoxyl phosphate substrate", *Clinical chemistry*, Vol. 40 No. 10, S. 1970-1971.

Aldick, T., Bielaszewska, M., Uhlin, B.E., Humpf, H.-U., Wai, S.N. und Karch, H. (2009), "Vesicular stabilization and activity augmentation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* haemolysin", *Molecular microbiology*, Vol. 71 No. 6, S. 1496-1508.

Al-Hasani, K., Henderson, I.R., Sakellaris, H., Rajakumar, K., Grant, T., Nataro, J.P., Robins-Browne, R. und Adler, B. (2000), "The sigA gene which is borne on the she pathogenicity island of *Shigella flexneri* 2a encodes an exported cytopathic protease involved in intestinal fluid accumulation", *Infection and immunity*, Vol. 68 No. 5, S. 2457-2463.

Amini, H.R., Ascencio, F., Cruz-Villacorta, A., Ruiz-Bustos, E. und Wadström, T. (1996), "Immunochemical properties of a 60 kDa cell surface-associated heat shock-protein (Hsp60) from *Helicobacter pylori*", *FEMS immunology and medical microbiology*, Vol. 16 3-4, S. 163-172.

Anderson, B.N., Ding, A.M., Nilsson, L.M., Kusuma, K., Tchesnokova, V., Vogel, V., Sokurenko, E.V. und Thomas, W.E. (2007), "Weak rolling adhesion enhances bacterial surface colonization", *Journal of bacteriology*, Vol. 189 No. 5, S. 1794-1802.

Bannwarth, M. and Schulz, G.E. (2003), "The expression of outer membrane proteins for crystallization", *Biochimica et biophysica acta*, Vol. 1610 No. 1, S. 37-45.

Bardiau, M., Grégoire, F., Muylaert, A., Nahayo, A., Duprez, J.-N., Mainil, J. und Linden, A. (2010), "Enteropathogenic (EPEC), enterohaemorrhagic (EHEC) and verotoxigenic (VTEC) *Escherichia coli* in wild cervids", *Journal of applied microbiology*, Vol. 109 No. 6, S. 2214-2222.

Barnhart, M.M. und Chapman, M.R. (2006), "Curli biogenesis and function", *Annual review of microbiology*, Vol. 60, S. 131-147.

Barth, M., Marschall, C., Muffler, A., Fischer, D. und Hengge-Aronis, R. (1995), "Role for the histone-like protein H-NS in growth phase-dependent and osmotic regulation of sigma S and many sigma S-dependent genes in *Escherichia coli*", *Journal of bacteriology*, Vol. 177 No. 12, S. 3455-3464.

Bauwens, A. (2010), "Zelluläre Funktionsstudien zum Wirkungsmechanismus von Shiga Toxinen bei mikro- und makrovaskulären Endothelzelllinien", Dissertation, Technische Fakultät, Universität, Bielefeld, 2010.

Beloin, C., Michaelis, K., Lindner, K., Landini, P., Hacker, J., Ghigo, J.-M. und Dobrindt, U. (2006), "The transcriptional antiterminator RfaH represses biofilm formation in *Escherichia coli*", *Journal of bacteriology*, Vol. 188 No. 4, S. 1316-1331.

Beloin, C., Valle, J., Latour-Lambert, P., Faure, P., Kzreminski, M., Balestrino, D., Haagensen, J.A.J., Molin, S., Prensier, G., Arbeille, B. und Ghigo, J.-M. (2004), "Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression", *Molecular microbiology*, Vol. 51 No. 3, S. 659-674.

Bergter, F. (1983), *Wachstum von Mikroorganismen*, 2nd ed., Verl. Chemie, Weinheim, Basel.

- Bertani, G. (1951), "Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*", *Journal of bacteriology*, Vol. 62 No. 3, S. 293-300.
- Bielaszewska, M., Bauwens, A., Greune, L., Kemper, B., Dobrindt, U., Geelen, J.M., Kim, K.S., Schmidt, M.A. und Karch, H. (2009), "Vacuolisation of human microvascular endothelial cells by enterohaemorrhagic *Escherichia coli*", *Thrombosis and haemostasis*, Vol. 102 No. 6, S. 1080-1092.
- Bielaszewska, M., Sinha, B., Kuczius, T. und Karch, H. (2005), "Cytolethal distending toxin from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 causes irreversible G2/M arrest, inhibition of proliferation, and death of human endothelial cells", *Infection and immunity*, Vol. 73 No. 1, S. 552-562.
- Blumer, C., Kleefeld, A., Lehnen, D., Heintz, M., Dobrindt, U., Nagy, G., Michaelis, K., Emödy, L., Polen, T., Rachel, R., Wendisch, V.F. und Udden, G. (2005), "Regulation of type 1 fimbriae synthesis and biofilm formation by the transcriptional regulator LrhA of *Escherichia coli*", *Microbiology (Reading, England)*, Vol. 151 Pt 10, S. 3287-3298.
- Bradford, M.M. (1976), "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical biochemistry*, Vol. 72, S. 248-254.
- Braun, V. (2003), "Iron uptake by *Escherichia coli*", *Frontiers in bioscience a journal and virtual library*, Vol. 8, S. s1409-21.
- Brunder, W., Khan, A.S., Hacker, J. und Karch, H. (2001), "Novel type of fimbriae encoded by the large plasmid of sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H(-)", *Infection and immunity*, Vol. 69 No. 7, S. 4447-4457.
- Brunder, W., Schmidt, H. und Karch, H. (1997), "EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V", *Molecular microbiology*, Vol. 24 No. 4, S. 767-778.
- Buchrieser, C., Brosch, R., Bach, S., Guiyoule, A. und Carniel, E. (1998), "The high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis* can be inserted into any of the three chromosomal *asn* tRNA genes", *Molecular microbiology*, Vol. 30 No. 5, S. 965-978.
- Caiazza, N.C. und O'Toole, G.A. (2004), "SadB is required for the transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14", *Journal of bacteriology*, Vol. 186 No. 14, S. 4476-4485.
- Chatzi, K.E., Sardis, M.F., Karamanou, S. und Economou, A. (2013), "Breaking on through to the other side: protein export through the bacterial Sec system", *The Biochemical journal*, Vol. 449 No. 1, S. 25-37.
- Chen, Y.-C., Chen, L.-A., Chen, S.-J., Chang, M.-C. und Chen, T.-L. (2004), "A modified osmotic shock for periplasmic release of a recombinant creatinase from *Escherichia coli*", *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 19 No. 3, S. 211-215.
- Cohen, S.N., Chang, A.C. und Hsu, L. (1972), "Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 69 No. 8, S. 2110-2114.
- Cowan, M.M. und Fletcher, M. (1987), "Rapid screening method for detection of bacterial mutants with altered adhesion abilities", *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 7 4-5, S. 241-249.
- Dalton, H.M., Poulsen, L.K., Halasz, P., Angles, M.L., Goodman, A.E. und Marshall, K.C. (1994), "Substratum-induced morphological changes in a marine bacterium and their relevance to biofilm structure", *Journal of bacteriology*, Vol. 176 No. 22, S. 6900-6906.
- Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Hartsch, T., Gottschalk, G., Ron, E.Z., Fünfstück, R. und Hacker, J. (2001), "S-Fimbriae-encoding determinant *sfa*(I) is located on pathogenicity island III(536) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536", *Infection and immunity*, Vol. 69 No. 7, S. 4248-4256.
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U. und Hacker, J. (2004), "Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms", *Nature reviews. Microbiology*, Vol. 2 No. 5, S. 414-424.

- Donlan, R.M. (2002), "Biofilms: microbial life on surfaces", *Emerging infectious diseases*, Vol. 8 No. 9, S. 881-890.
- Doughty, S., Sloan, J., Bennett-Wood, V., Robertson, M., Robins-Browne, R.M. und Hartland, E.L. (2002), "Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli*", *Infection and immunity*, Vol. 70 No. 12, S. 6761-6769.
- Drew, D., Lerch, M., Kunji, E., Slotboom, D.-J. und Gier, J.-W. de (2006), "Optimization of membrane protein overexpression and purification using GFP fusions", *Nature methods*, Vol. 3 No. 4, S. 303-313.
- Englard, S. und Seifert, S. (1990), "Precipitation techniques", *Methods in enzymology*, Vol. 182, S. 285-300.
- Fenn, J. (1993), "Ion formation from charged droplets. Roles of geometry, energy and time", *JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MASS SPECTROMETRY* No. 4, S. 524-535.
- Francí, C. und Vidal, J. (1988), "Coupling redox and enzymic reactions improves the sensitivity of the ELISA-spot assay", *Journal of immunological methods*, Vol. 107 No. 2, S. 239-244.
- Fraser, M.E., Fujinaga, M., Cherney, M.M., Melton-Celsa, A.R., Twiddy, E.M., O'Brien, A.D. und James, M.N.G. (2004), "Structure of shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7", *The Journal of biological chemistry*, Vol. 279 No. 26, S. 27511-27517.
- Fruth, A. (2005), "Biodiversität der O- und H-Antigene von *Escherichia coli*: serologische und molekulare Identifizierung", Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg, 2005.
- Fujiki, Y., Hubbard, A.L., Fowler, S. und Lazarow, P.B. (1982), "Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum", *The Journal of cell biology*, Vol. 93 No. 1, S. 97-102.
- Fux, C.A., Costerton, J.W., Stewart, P.S. und Stoodley, P. (2005), "Survival strategies of infectious biofilms", *Trends in microbiology*, Vol. 13 No. 1, S. 34-40.
- Garred, O., van Deurs, B. und Sandvig, K. (1995), "Furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin", *The Journal of biological chemistry*, Vol. 270 No. 18, S. 10817-10821.
- Genevaux, P., Bauda, P., DuBow, M.S. und Oudega, B. (1999), "Identification of Tn10 insertions in the *rfaG*, *rfaP*, and *galU* genes involved in lipopolysaccharide core biosynthesis that affect *Escherichia coli* adhesion", *Archives of microbiology*, Vol. 172 No. 1, S. 1-8.
- Genevaux, P., Muller, S. und Bauda, P. (1996), "A rapid screening procedure to identify mini-Tn10 insertion mutants of *Escherichia coli* K-12 with altered adhesion properties", *FEMS microbiology letters*, Vol. 142 No. 1, S. 27-30.
- Ghigo, J.M. (2001), "Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development", *Nature*, Vol. 412 No. 6845, S. 442-445.
- Ghigo, J.M. (2003), "Are there biofilm-specific physiological pathways beyond a reasonable doubt?", *Research in microbiology*, Vol. 154 No. 1, S. 1-8.
- Giemsa, G. (1904), "Eine Vereinfachung und Vervollkommnung meiner Methylenblau-Eosin-Färbemethode zur Erzielung der Romanowsky-Nocht'schen Chromatinfärbung.", *Centralblatt für Bakteriologie I Abteilung* 32 307-313.
- Gioppo, N.M., Elias, W.P., Vidotto, M.C., Linhares, R.E., Saridakis, H.O., Gomes, T.A., Trabulsi, L.R. und Pelayo, J.S. (2000), "Prevalence of HEp-2 cell-adherent *Escherichia coli* and characterisation of enteroaggregative *E. coli* and chain-like adherent *E. coli* isolated from children with and without diarrhoea, in Londrina, Brazil", *FEMS microbiology letters*, Vol. 190 No. 2, S. 293-298.
- Goller, C., Wang, X., Itoh, Y. und Romeo, T. (2006), "The cation-responsive protein NhaR of *Escherichia coli* activates *pgaABCD* transcription, required for production of the biofilm adhesin poly-beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine", *Journal of bacteriology*, Vol. 188 No. 23, S. 8022-8032.

- Graille, M., Stura, E.A., Corper, A.L., Sutton, B.J., Taussig, M.J., Charbonnier, J.B. und Silverman, G.J. (2000), "Crystal structure of a Staphylococcus aureus protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 97 No. 10, S. 5399-5404.
- Gyles, C.L. (2007), "Shiga toxin-producing Escherichia coli: an overview", *Journal of animal science*, Vol. 85 13 Suppl, S. E45-62.
- Hacker, J. (2000), *Molekulare Infektionsbiologie: Interaktionen zwischen Mikroorganismen und Zellen*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Hacker, J. und Kaper, J.B. (2000), "Pathogenicity islands and the evolution of microbes", *Annual review of microbiology*, Vol. 54, S. 641-679.
- Hacker, J., Hentschel, U. und Dobrindt, U. (2003), "Prokaryotic chromosomes and disease", *Science (New York, N.Y.)*, Vol. 301 No. 5634, S. 790-793.
- Hacker, J., Hochhut, B., Middendorf, B., Schneider, G., Buchrieser, C., Gottschalk, G. und Dobrindt, U. (2004), "Pathogenomics of mobile genetic elements of toxigenic bacteria", *International journal of medical microbiology IJMM*, Vol. 293 7-8, S. 453-461.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. und Stoodley, P. (2004), "Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases", *Nature reviews. Microbiology*, Vol. 2 No. 2, S. 95-108.
- Hanahan, D. (1983), "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids", *Journal of molecular biology*, Vol. 166 No. 4, S. 557-580.
- Hancock, R.E. und Nikaido, H. (1978), "Outer membranes of gram-negative bacteria. XIX. Isolation from Pseudomonas aeruginosa PAO1 and use in reconstitution and definition of the permeability barrier", *Journal of bacteriology*, Vol. 136 No. 1, S. 381-390.
- Harris, L.J., Larson, S.B., Hasel, K.W. und McPherson, A. (1997), "Refined structure of an intact IgG2a monoclonal antibody", *Biochemistry*, Vol. 36 No. 7, S. 1581-1597.
- Heise, T. und Dersch, P. (2006), "Identification of a domain in Yersinia virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 103 No. 9, S. 3375-3380.
- Henderson, I.R., Czczulin, J., Eslava, C., Noriega, F. und Nataro, J.P. (1999), "Characterization of pic, a secreted protease of Shigella flexneri and enteroaggregative Escherichia coli", *Infection and immunity*, Vol. 67 No. 11, S. 5587-5596.
- Henderson, I.R., Meehan, M. und Owen, P. (1997), "Antigen43, a phase-variable bipartite outer membrane protein, determines colony morphology and autoaggregation in Escherichia coli K-12", *FEMS microbiology letters*, Vol. 149 No. 1, S. 115-120.
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R.C. und Ala'Aldeen, D. (2004), "Type V protein secretion pathway: the autotransporter story", *Microbiology and molecular biology reviews MMBR*, Vol. 68 No. 4, S. 692-744.
- Heukeshoven, J. und Dernick, R. (1988), "Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels", *Electrophoresis*, Vol. 9 No. 1, S. 28-32.
- Hill, R.A. und Sillence, M.N. (1997), "Improved membrane isolation in the purification of beta 2-adrenoceptors from transgenic Escherichia coli", *Protein expression and purification*, Vol. 10 No. 1, S. 162-167.
- Hinnebusch, B.J. und Erickson, D.L. (2008), "Yersinia pestis biofilm in the flea vector and its role in the transmission of plague", *Current topics in microbiology and immunology*, Vol. 322, S. 229-248.

- Hoiczky, E., Roggenkamp, A., Reichenbecher, M., Lupas, A. und Heesemann, J. (2000), "Structure and sequence analysis of Yersinia YadA and Moraxella UspAs reveal a novel class of adhesins", *The EMBO journal*, Vol. 19 No. 22, S. 5989-5999.
- Hueck, C.J. (1998), "Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants", *Microbiology and molecular biology reviews MMBR*, Vol. 62 No. 2, S. 379-433.
- Ieva, R. und Bernstein, H.D. (2009), "Interaction of an autotransporter Passenger domain with BamA during its translocation across the bacterial outer membrane", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 106 No. 45, S. 19120-19125.
- Itoh, Y., Wang, X., Hinnebusch, B.J., Preston, J.F. und Romeo, T. (2005), "Depolymerization of beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine disrupts the integrity of diverse bacterial biofilms", *Journal of bacteriology*, Vol. 187 No. 1, S. 382-387.
- Jackson, D.W., Simecka, J.W. und Romeo, T. (2002a), "Catabolite repression of Escherichia coli biofilm formation", *Journal of bacteriology*, Vol. 184 No. 12, S. 3406-3410.
- Jackson, D.W., Suzuki, K., Oakford, L., Simecka, J.W., Hart, M.E. und Romeo, T. (2002b), "Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of Escherichia coli", *Journal of bacteriology*, Vol. 184 No. 1, S. 290-301.
- Jain, S., van Ulsen, P., Benz, I., Schmidt, M.A., Fernandez, R., Tommassen, J. und Goldberg, M.B. (2006), "Polar localization of the autotransporter family of large bacterial virulence proteins", *Journal of bacteriology*, Vol. 188 No. 13, S. 4841-4850.
- Jallat, C., Livrelli, V., Darfeuille-Michaud, A., Rich, C. und Joly, B. (1993), "Escherichia coli strains involved in diarrhea in France: high prevalence and heterogeneity of diffusely adhering strains", *Journal of clinical microbiology*, Vol. 31 No. 8, S. 2031-2037.
- Janka, A., Bielaszewska, M., Dobrindt, U., Greune, L., Schmidt, M.A. und Karch, H. (2003), "Cytolethal distending toxin gene cluster in enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H- and O157:H7: characterization and evolutionary considerations", *Infection and immunity*, Vol. 71 No. 6, S. 3634-3638.
- Jenal, U. und Malone, J. (2006), "Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria", *Annual review of genetics*, Vol. 40, S. 385-407.
- Jinadasa, R.N., Bloom, S.E., Weiss, R.S. und Duhamel, G.E. (2011), "Cytolethal distending toxin: a conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages", *Microbiology (Reading, England)*, Vol. 157 Pt 7, S. 1851-1875.
- Johannes, L. und Römer, W. (2010), "Shiga toxins--from cell biology to biomedical applications", *Nature reviews. Microbiology*, Vol. 8 No. 2, S. 105-116.
- Jubelin, G., Vianney, A., Beloin, C., Ghigo, J.-M., Lazzaroni, J.-C., Lejeune, P. und Dorel, C. (2005), "CpxR/OmpR interplay regulates curli gene expression in response to osmolarity in Escherichia coli", *Journal of bacteriology*, Vol. 187 No. 6, S. 2038-2049.
- Kanu, A.B., Dwivedi, P., Tam, M., Matz, L. und Hill, H.H. (2008), "Ion mobility-mass spectrometry", *Journal of mass spectrometry JMS*, Vol. 43 No. 1, S. 1-22.
- Kaper, J.B., Morris, J.G. und Levine, M.M. (1995), "Cholera", *Clinical microbiology reviews*, Vol. 8 No. 1, S. 48-86.
- Kauffmann, F. und Vahlne, G. (1945), "Über die Bedeutung des serologischen Formenwechsels für die Bakteriophagenwirkung in der Coli-Gruppe.", *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica* No. 22, S. 119-137.
- Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D.J., Frey, E.A. und Finlay, B.B. (1997), "Enteropathogenic E. coli (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells", *Cell*, Vol. 91 No. 4, S. 511-520.
- Kjaergaard, K., Schembri, M.A., Hasman, H. und Klemm, P. (2000a), "Antigen43 from Escherichia coli induces inter- and intraspecies cell aggregation and changes in colony morphology of Pseudomonas fluorescens", *Journal of bacteriology*, Vol. 182 No. 17, S. 4789-4796.

- Kjaergaard, K., Schembri, M.A., Ramos, C., Molin, S. und Klemm, P. (2000b), "Antigen43 facilitates formation of multispecies biofilms", *Environmental microbiology*, Vol. 2 No. 6, S. 695-702.
- Klemm, P., Vejborg, R.M. und Sherlock, O. (2006), "Self-associating autotransporters, SAATs: functional and structural similarities", *International journal of medical microbiology IJMM*, Vol. 296 4-5, S. 187-195.
- Knipschildt, H.E. (1945), "Demonstration of capsula antigens in the colon group", *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, Vol. 22 No. 1, S. 44-64.
- Laarmann, S. und Schmidt, M.A. (2003), "The Escherichia coli AIDA autotransporter adhesin recognizes an integral membrane glycoprotein as receptor", *Microbiology (Reading, England)*, Vol. 149 Pt 7, S. 1871-1882.
- Labbé, S. und Grenier, D. (1995), "Characterization of the human immunoglobulin G Fc-binding activity in *Prevotella intermedia*", *Infection and immunity*, Vol. 63 No. 7, S. 2785-2789.
- Laemmli, U.K. (1970), "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, Vol. 227 No. 5259, S. 680-685.
- Lasa, I. und Penadés, J.R. (2006), "Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation", *Research in microbiology*, Vol. 157 No. 2, S. 99-107.
- Lathem, W.W., Bergsbaken, T. und Welch, R.A. (2004), "Potentiation of C1 esterase inhibitor by StcE, a metalloprotease secreted by Escherichia coli O157:H7", *The Journal of experimental medicine*, Vol. 199 No. 8, S. 1077-1087.
- Lee, L.G., Spurgeon, S.L., Heiner, C.R., Benson, S.C., Rosenblum, B.B., Menchen, S.M., Graham, R.J., Constantinescu, A., Upadhyya, K.G. und Cassel, J.M. (1997), "New energy transfer dyes for DNA sequencing", *Nucleic acids research*, Vol. 25 No. 14, S. 2816-2822.
- Leo, J.C. und Goldman, A. (2009), "The immunoglobulin-binding Eib proteins from Escherichia coli are receptors for IgG Fc", *Molecular immunology*, Vol. 46 8-9, S. 1860-1866.
- Leo, J.C., Lyskowski, A., Hattula, K., Hartmann, M.D., Schwarz, H., Butcher, S.J., Linke, D., Lupas, A.N. und Goldman, A. (2011), "The structure of E. coli IgG-binding protein D suggests a general model for bending and binding in trimeric autotransporter adhesins", *Structure (London, England 1993)*, Vol. 19 No. 7, S. 1021-1030.
- Levine, M.M., Xu, J.G., Kaper, J.B., Lior, H., Prado, V., Tall, B., Nataro, J., Karch, H. und Wachsmuth, K. (1987), "A DNA probe to identify enterohemorrhagic Escherichia coli of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome", *The Journal of infectious diseases*, Vol. 156 No. 1, S. 175-182.
- Lewis, M.J., Meehan, M., Owen, P. und Woof, J.M. (2008), "A common theme in interaction of bacterial immunoglobulin-binding proteins with immunoglobulins illustrated in the equine system", *The Journal of biological chemistry*, Vol. 283 No. 25, S. 17615-17623.
- Linke, D., Riess, T., Autenrieth, I.B., Lupas, A. und Kempf, V.A.J. (2006), "Trimeric autotransporter adhesins: variable structure, common function", *Trends in microbiology*, Vol. 14 No. 6, S. 264-270.
- Loboda, A.V., Ackloo, S. und Chernushevich, I.V. (2003), "A high-performance matrix-assisted laser desorption/ionization orthogonal time-of-flight mass spectrometer with collisional cooling", *Rapid communications in mass spectrometry RCM*, Vol. 17 No. 22, S. 2508-2516.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. und RANDALL, R.J. (1951), "Protein measurement with the Folin phenol reagent", *The Journal of biological chemistry*, Vol. 193 No. 1, S. 265-275.
- Lu, Y., Iyoda, S., Satou, H., Satou, H., Itoh, K., Saitoh, T. und Watanabe, H. (2006), "A new immunoglobulin-binding protein, EibG, is responsible for the chain-like adhesion phenotype of locus of enterocyte effacement-negative, shiga toxin-producing Escherichia coli", *Infection and immunity*, Vol. 74 No. 10, S. 5747-5755.

- Łyskowski, A., Leo, J.C. und Goldman, A. (2011), "Structure and biology of trimeric autotransporter adhesins", *Advances in experimental medicine and biology*, Vol. 715, S. 143-158.
- Ma, Q. und Wood, T.K. (2009), "OmpA influences Escherichia coli biofilm formation by repressing cellulose production through the CpxRA two-component system", *Environmental microbiology*, Vol. 11 No. 10, S. 2735-2746.
- Majdalani, N. und Gottesman, S. (2005), "The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system", *Annual review of microbiology*, Vol. 59, S. 379-405.
- Makoveichuk, E., Cherepanov, P., Lundberg, S., Forsberg, A. und Olivecrona, G. (2003), "pH6 antigen of Yersinia pestis interacts with plasma lipoproteins and cell membranes", *Journal of lipid research*, Vol. 44 No. 2, S. 320-330.
- Markwell, M.A., Haas, S.M., Bieber, L.L. und Tolbert, N.E. (1978), "A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples", *Analytical biochemistry*, Vol. 87 No. 1, S. 206-210.
- Marsh, J.W. und Taylor, R.K. (1999), "Genetic and transcriptional analyses of the Vibrio cholerae mannose-sensitive hemagglutinin type 4 pilus gene locus", *Journal of bacteriology*, Vol. 181 No. 4, S. 1110-1117.
- Marshall, R.T. (1992), *Standard methods for the examination of dairy products*, 16th ed., American Public Health Association, Washington.
- Mikula, K.M., Leo, J.C., Łyskowski, A., Kedracka-Krok, S., Pirog, A. und Goldman, A. (2012), "The translocation domain in trimeric autotransporter adhesins is necessary and sufficient for trimerization and autotransportation", *Journal of bacteriology*, Vol. 194 No. 4, S. 827-838.
- Mikula, K.M., Leo, J.C., Łyskowski, A., Kedracka-Krok, S., Pirog, A. und Goldman, A. (2012), "The translocation domain in trimeric autotransporter adhesins is necessary and sufficient for trimerization and autotransportation", *Journal of bacteriology*, Vol. 194 No. 4, S. 827-838.
- Moore, G.E., Gerner, R.E. und Franklin, H.A. (1967), "Culture of normal human leukocytes", *JAMA the journal of the American Medical Association*, Vol. 199 No. 8, S. 519-524.
- Mortz, E., Krogh, T.N., Vorum, H. und Görg, A. (2001), "Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis", *Proteomics*, Vol. 1 No. 11, S. 1359-1363.
- Mullis, K.B. und Faloona, F.A. (1987), "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction", *Methods in enzymology*, Vol. 155, S. 335-350.
- Müsken, A., Bielaszewska, M., Greune, L., Schweppe, C.H., Müthing, J., Schmidt, H., Schmidt, M.A., Karch, H. und Zhang, W. (2008), "Anaerobic conditions promote expression of Sfp fimbriae and adherence of sorbitol-fermenting enterohemorrhagic Escherichia coli O157:NM to human intestinal epithelial cells", *Applied and environmental microbiology*, Vol. 74 No. 4, S. 1087-1093.
- Müthing, J., Duvar, S., Heitmann, D., Hanisch, F.G., Neumann, U., Lochnit, G., Geyer, R. und Peter-Katalinic, J. (1999), "Isolation und structural characterization of glycosphingolipids of in vitro propagated human umbilical vein endothelial cells", *Glycobiology*, Vol. 9 No. 5, S. 459-468.
- Naberezhnykh, G.A., Sidorin, E.V., Lapshina, L.A., Reunov, A.V. und Solov'eva, T.F. (2006), "Influence of culture conditions and virulence plasmids on expression of immunoglobulin-binding proteins of Yersinia pseudotuberculosis", *Biochemistry. Biokhimiā*, Vol. 71 No. 11, S. 1284-1288.
- Nandakumar, M.P., Shen, J., Raman, B. und Marten, M.R. (2003), "Solubilization of trichloroacetic acid (TCA) precipitated microbial proteins via NaOH for two-dimensional electrophoresis", *Journal of proteome research*, Vol. 2 No. 1, S. 89-93.
- Narciso, J.E.T., Uy, I.D.C., Cabang, A.B., Chavez, J.F.C., Pablo, J.L.B., Padilla-Concepcion, G.P. und Padlan, E.A. (2011), "Analysis of the antibody structure based on high-resolution crystallographic studies", *New biotechnology*, Vol. 28 No. 5, S. 435-447.

Narciso, J.E.T., Uy, I.D.C., Cabang, A.B., Chavez, J.F.C., Pablo, J.L.B., Padilla-Concepcion, G.P. und Padlan, E.A. (2012), "Anatomy of the antibody molecule: a continuing analysis based on high-resolution crystallographic structures", *Philippine Science Letters* No. 1, S. 63-89.

Nataro, J.P. und Kaper, J.B. (1998), "Diarrheagenic *Escherichia coli*", *Clinical microbiology reviews*, Vol. 11 No. 1, S. 142-201.

Nataro, J.P., Kaper, J.B., Robins-Browne, R., Prado, V., Vial, P. und Levine, M.M. (1987), "Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells", *The Pediatric infectious disease journal*, Vol. 6 No. 9, S. 829-831.

Niewerth, U., Frey, A., Voss, T., Le Bouguéneq, C., Baljer, G., Franke, S. und Schmidt, M.A. (2001), "The AIDA autotransporter system is associated with F18 and stx2e in *Escherichia coli* isolates from pigs diagnosed with edema disease and postweaning diarrhea", *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, Vol. 8 No. 1, S. 143-149.

Nummelin, H., Merckel, M.C., Leo, J.C., Lankinen, H., Skurnik, M. und Goldman, A. (2004), "The *Yersinia* adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel beta-roll", *The EMBO journal*, Vol. 23 No. 4, S. 701-711.

Ochman, H. und Selander, R.K. (1984), "Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations", *Journal of bacteriology*, Vol. 157 No. 2, S. 690-693.

Ogura, K., Maeda, S., Nakao, M., Watanabe, T., Tada, M., Kyutoku, T., Yoshida, H., Shiratori, Y. und Omata, M. (2000), "Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil", *The Journal of experimental medicine*, Vol. 192 No. 11, S. 1601-1610.

Orskov, I., Orskov, F., Jann, B. und Jann, K. (1977), "Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*", *Bacteriological reviews*, Vol. 41 No. 3, S. 667-710.

Oshima, T., Aiba, H., Masuda, Y., Kanaya, S., Sugiura, M., Wanner, B.L., Mori, H. und Mizuno, T. (2002), "Transcriptome analysis of all two-component regulatory system mutants of *Escherichia coli* K-12", *Molecular microbiology*, Vol. 46 No. 1, S. 281-291.

O'Toole, G., Kaplan, H.B. und Kolter, R. (2000), "Biofilm formation as microbial development", *Annual review of microbiology*, Vol. 54, S. 49-79.

O'Toole, G.A. und Kolter, R. (1998), "Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis", *Molecular microbiology*, Vol. 28 No. 3, S. 449-461.

Otto, K. und Hermansson, M. (2004), "Inactivation of *ompX* causes increased interactions of type 1 fimbriated *Escherichia coli* with abiotic surfaces", *Journal of bacteriology*, Vol. 186 No. 1, S. 226-234.

Otto, K. und Silhavy, T.J. (2002), "Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 99 No. 4, S. 2287-2292.

Otto, K., Norbeck, J., Larsson, T., Karlsson, K.A. und Hermansson, M. (2001), "Adhesion of type 1-fimbriated *Escherichia coli* to abiotic surfaces leads to altered composition of outer membrane proteins", *Journal of bacteriology*, Vol. 183 No. 8, S. 2445-2453.

Park, S., Wolanin, P.M., Yuzbashyan, E.A., Silberzan, P., Stock, J.B. und Austin, R.H. (2003), "Motion to form a quorum", *Science (New York, N.Y.)*, Vol. 301 No. 5630, p. 188.

Paton, J.C. und Paton, A.W. (1998), "Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections", *Clinical microbiology reviews*, Vol. 11 No. 3, S. 450-479.

Phillips, A.D., Giròn, J., Hicks, S., Dougan, G. und Frankel, G. (2000), "Intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* mediates remodelling of the eukaryotic cell surface", *Microbiology (Reading, England)*, 146 (Pt 6), S. 1333-1344.

Polacheck, I. und Cabib, E. (1981), "A simple procedure for protein determination by the Lowry method in dilute solutions and in the presence of interfering substances", *Analytical biochemistry*, Vol. 117 No. 2, S. 311-314.

- Pratt, L.A. und Kolter, R. (1998), "Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili", *Molecular microbiology*, Vol. 30 No. 2, S. 285-293.
- Prigent-Combaret, C., Prensier, G., Le Thi, T.T., Vidal, O., Lejeune, P. und Dorel, C. (2000), "Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing Escherichia coli strains: role of flagella, curli and colanic acid", *Environmental microbiology*, Vol. 2 No. 4, S. 450-464.
- Raivio, T.L. und Silhavy, T.J. (1997), "Transduction of envelope stress in Escherichia coli by the Cpx two-component system", *Journal of bacteriology*, Vol. 179 No. 24, S. 7724-7733.
- Redford, P. und Welch, R.A. (2002), "Extraintestinal Escherichia coli as a model system for the study of pathogenicity islands", *Current topics in microbiology and immunology*, Vol. 264 No. 1, S. 15-30.
- Rehm, H. (2006), *Der Experimentator: Proteinbiochemie, Proteomics*, 5th ed., Elsevier, Spektrum Akad. Verl., Heidelberg ;, München.
- Rietschel ET, W.O. (1999), "Endotoxin: historical perspectives. In: Brade, H; Morrison, D.C; Opal, S; Vogel, S. [eds.]:", *Endotoxin in Health and Disease. Basel: Marcel Dekker, 1999, 1—30.*, S. 1-30.
- Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Hebert, R.J., Olcott, E.S., Johnson, L.M., Hargrett, N.T., Blake, P.A. und Cohen, M.L. (1983), "Hemorrhagic colitis associated with a rare Escherichia coli serotype", *The New England journal of medicine*, Vol. 308 No. 12, S. 681-685.
- Roepstorff, P. und Fohlman, J. (1984), "Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides", *Biomedical mass spectrometry*, Vol. 11 No. 11, p. 601.
- Roggenkamp, A., Ackermann, N., Jacobi, C.A., Truelzsch, K., Hoffmann, H. und Heesemann, J. (2003), "Molecular analysis of transport and oligomerization of the Yersinia enterocolitica adhesin YadA", *Journal of bacteriology*, Vol. 185 No. 13, S. 3735-3744.
- Roggenkamp, A., Ruckdeschel, K., Leitritz, L., Schmitt, R. und Heesemann, J. (1996), "Deletion of amino acids 29 to 81 in adhesion protein YadA of Yersinia enterocolitica serotype O:8 results in selective abrogation of adherence to neutrophils", *Infection and immunity*, Vol. 64 No. 7, S. 2506-2514.
- Romanowsky D.L. (1890), "К ВОПРОСУ О СТРОЕНИИ ЧУЖЕЯДНЫХ МАЛЯРИИ", *ВРАЧЪ No. 52*, S. 1171-1173.
- Romeo, T. (2008), *Bacterial biofilms*, Springer, Berlin.
- Römer, W., Berland, L., Chambon, V., Gaus, K., Windschiegel, B., Tenza, D., Aly, M.R.E., Fraiser, V., Florent, J.-C., Perrais, D., Lamaze, C., Raposo, G., Steinem, C., Sens, P., Bassereau, P. und Johannes, L. (2007), "Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells", *Nature*, Vol. 450 No. 7170, S. 670-675.
- Russell, A.D. (2003), "Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations", *The Lancet infectious diseases*, Vol. 3 No. 12, S. 794-803.
- Sandt, C.H. und Hill, C.W. (2000), "Four different genes responsible for nonimmune immunoglobulin-binding activities within a single strain of Escherichia coli", *Infection and immunity*, Vol. 68 No. 4, S. 2205-2214.
- Sandt, C.H. und Hill, C.W. (2001), "Nonimmune binding of human immunoglobulin A (IgA) and IgG Fc by distinct sequence segments of the EibF cell surface protein of Escherichia coli", *Infection and immunity*, Vol. 69 No. 12, S. 7293-7303.
- Sandt, C.H., Wang, Y.D., Wilson, R.A. und Hill, C.W. (1997), "Escherichia coli strains with nonimmune immunoglobulin-binding activity", *Infection and immunity*, Vol. 65 No. 11, S. 4572-4579.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977), "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 74 No. 12, S. 5463-5467.
- Sauer-Eriksson, A.E., Kleywegt, G.J., Uhlén, M. und Jones, T.A. (1995), "Crystal structure of the C2 fragment of streptococcal protein G in complex with the Fc domain of human IgG", *Structure (London, England 1993)*, Vol. 3 No. 3, S. 265-278.

- Schaible, U.E. und Kaufmann, S.H.E. (2005), "A nutritive view on the host-pathogen interplay", *Trends in microbiology*, Vol. 13 No. 8, S. 373-380.
- Schembri, M.A. und Klemm, P. (2001), "Coordinate gene regulation by fimbriae-induced signal transduction", *The EMBO journal*, Vol. 20 No. 12, S. 3074-3081.
- Schembri, M.A., Dalsgaard, D. und Klemm, P. (2004), "Capsule shields the function of short bacterial adhesins", *Journal of bacteriology*, Vol. 186 No. 5, S. 1249-1257.
- Schembri, M.A., Hjerrild, L., Gjermansen, M. und Klemm, P. (2003), "Differential expression of the Escherichia coli autoaggregation factor Antigen43", *Journal of bacteriology*, Vol. 185 No. 7, S. 2236-2242.
- Schembri, M.A., Ussery, D.W., Workman, C., Hasman, H. und Klemm, P. (2002), "DNA microarray analysis of fim mutations in Escherichia coli", *Molecular genetics and genomics MGG*, Vol. 267 No. 6, S. 721-729.
- Schmidt, H., Kernbach, C. und Karch, H. (1996), "Analysis of the EHEC hly operon and its location in the physical map of the large plasmid of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:h7", *Microbiology (Reading, England)*, 142 (Pt 4), S. 907-914.
- Schüller, S. (2011), "Shiga toxin interaction with human intestinal epithelium", *Toxins*, Vol. 3 No. 6, S. 626-639.
- Schwan, W.R., Lee, J.L., Lenard, F.A., Matthews, B.T. und Beck, M.T. (2002), "Osmolarity and pH growth conditions regulate fim gene transcription and type 1 pilus expression in uropathogenic Escherichia coli", *Infection and immunity*, Vol. 70 No. 3, S. 1391-1402.
- Scopes, R.K. (1994), *Protein purification: Principles and practice*, 3rd ed., Springer-Verlag, New York.
- Shin, S. und Park, C. (1995), "Modulation of flagellar expression in Escherichia coli by acetyl phosphate and the osmoregulator OmpR", *Journal of bacteriology*, Vol. 177 No. 16, S. 4696-4702.
- Sidorin, E.V. und Solov'eva, T.F. (2011), "IgG-binding proteins of bacteria", *Biochemistry. Biokhimiia*, Vol. 76 No. 3, S. 295-308.
- Sidorin, E.V., Kim, N.Y., Leichenko, E.V., Anastyuk, S.D., Dmitrenok, P.S., Naberezhnykh, G.A. und Solov'eva, T.F. (2006), "Isolation and characterization of a low-molecular-weight immunoglobulin-binding protein from Yersinia pseudotuberculosis", *Biochemistry. Biokhimiia*, Vol. 71 No. 11, S. 1278-1283.
- Sidorin, E.V., Ziganshin, R.H., Naberezhnykh, G.A., Likhatskaya, G.N., Trifonov, E.V., Anastiuk, S.D., Chernikov, O.V. und Solov'eva, T.F. (2009), "Chaperone Skp from Yersinia pseudotuberculosis exhibits immunoglobulin G binding ability", *Biochemistry. Biokhimiia*, Vol. 74 No. 4, S. 406-415.
- Silagyi, K., Kim, S.-H., Lo, Y.M. und Wei, C.-i. (2009), "Production of biofilm and quorum sensing by Escherichia coli O157:H7 and its transfer from contact surfaces to meat, poultry, ready-to-eat deli, and produce products", *Food microbiology*, Vol. 26 No. 5, S. 514-519.
- Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M. und Römling, U. (2004), "GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility", *Molecular microbiology*, Vol. 53 No. 4, S. 1123-1134.
- Soltwisch, J., Jaskolla, T.W., Hillenkamp, F., Karas, M. und Dreisewerd, K. (2012), "Ion yields in UV-MALDI mass spectrometry as a function of excitation laser wavelength and optical and physico-chemical properties of classical and halogen-substituted MALDI matrixes", *Analytical chemistry*, Vol. 84 No. 15, S. 6567-6576.
- Sonnenborn, U. und Greinwald, R. (1991), "Beziehungen zwischen Wirtsorganismus und Darmflora unter besonderer Berücksichtigung von Physiologie und Funktion der normalen Escherichia-coli-Flora", *Schattauer, Stuttgart, Germany*, S. 55-68.
- Spears, K.J., Roe, A.J. und Gally, D.L. (2006), "A comparison of enteropathogenic and enterohaemorrhagic Escherichia coli pathogenesis", *FEMS microbiology letters*, Vol. 255 No. 2, S. 187-202.

- Stevenson, G., Andrianopoulos, K., Hobbs, M. und Reeves, P.R. (1996), "Organization of the Escherichia coli K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid", *Journal of bacteriology*, Vol. 178 No. 16, S. 4885-4893.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G. und Costerton, J.W. (2002), "Biofilms as complex differentiated communities", *Annual review of microbiology*, Vol. 56, S. 187-209.
- Taneike, I., Zhang, H.-M., Wakisaka-Saito, N. und Yamamoto, T. (2002), "Enterohemolysin operon of Shiga toxin-producing Escherichia coli: a virulence function of inflammatory cytokine production from human monocytes", *FEBS letters*, Vol. 524 1-3, S. 219-224.
- Thorpe, G.H. und Kricka, L.J. (1986), "Enhanced chemiluminescent reactions catalyzed by horseradish peroxidase", *Methods in enzymology*, Vol. 133, S. 331-353.
- Tolo, K. und Helgeland, K. (1991), "Fc-binding components: a virulence factor in Actinobacillus actinomycetemcomitans?", *Oral microbiology and immunology*, Vol. 6 No. 6, S. 373-377.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979), "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 76 No. 9, S. 4350-4354.
- Tsuchido, T., Katsui, N., Takeuchi, A., Takano, M. und Shibasaki, I. (1985), "Destruction of the outer membrane permeability barrier of Escherichia coli by heat treatment", *Applied and environmental microbiology*, Vol. 50 No. 2, S. 298-303.
- Ulett, G.C., Webb, R.I. und Schembri, M.A. (2006), "Antigen-43-mediated autoaggregation impairs motility in Escherichia coli", *Microbiology (Reading, England)*, Vol. 152 Pt 7, S. 2101-2110.
- Ullmann, A., Jacob, F. und Monod, J. (1967), "Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of Escherichia coli", *Journal of molecular biology*, Vol. 24 No. 2, S. 339-343.
- van der Woude, M.W. und Bäuml, A.J. (2004), "Phase and antigenic variation in bacteria", *Clinical microbiology reviews*, Vol. 17 No. 3, S. 581-611, table of contents.
- Vejborg, R.M. und Klemm, P. (2009), "Cellular chain formation in Escherichia coli biofilms", *Microbiology (Reading, England)*, Vol. 155 Pt 5, S. 1407-1417.
- Viala, J., Chaput, C., Boneca, I.G., Cardona, A., Girardin, S.E., Moran, A.P., Athman, R., Mémet, S., Huerre, M.R., Coyle, A.J., DiStefano, P.S., Sansonetti, P.J., Labigne, A., Bertin, J., Philpott, D.J. und Ferrero, R.L. (2004), "Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the Helicobacter pylori cag pathogenicity island", *Nature immunology*, Vol. 5 No. 11, S. 1166-1174.
- Waite, R.D., Papakonstantinou, A., Littler, E. und Curtis, M.A. (2005), "Transcriptome analysis of Pseudomonas aeruginosa growth: comparison of gene expression in planktonic cultures and developing and mature biofilms", *Journal of bacteriology*, Vol. 187 No. 18, S. 6571-6576.
- Walsh, P.S., Metzger, D.A. und Higuchi, R. (1991), "Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material", *BioTechniques*, Vol. 10 No. 4, S. 506-513.
- Wang, X., Dubey, A.K., Suzuki, K., Baker, C.S., Babitzke, P. und Romeo, T. (2005), "CsrA post-transcriptionally represses pgaABCD, responsible for synthesis of a biofilm polysaccharide adhesin of Escherichia coli", *Molecular microbiology*, Vol. 56 No. 6, S. 1648-1663.
- Waring, M.J. (1965), "Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids", *Journal of molecular biology*, Vol. 13 No. 1, S. 269-282.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M. und Barton, G.J. (2009), "Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench", *Bioinformatics (Oxford, England)*, Vol. 25 No. 9, S. 1189-1191.

- Wei, B.L., Brun-Zinkernagel, A.M., Simecka, J.W., Prüss, B.M., Babitzke, P. und Romeo, T. (2001), "Positive regulation of motility and flhDC expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*", *Molecular microbiology*, Vol. 40 No. 1, S. 245-256.
- Whitfield, C. (2006), "Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*", *Annual review of biochemistry*, Vol. 75, S. 39-68.
- Whitfield, C. und Roberts, I.S. (1999), "Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*", *Molecular microbiology*, Vol. 31 No. 5, S. 1307-1319.
- WHO (2011), "Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). Fact sheet No. 125. 2005", verfügbar unter: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/>.
- Witholt, B., Boekhout, M., Brock, M., Kingma, J., Heerikhuizen, H.V. und Leij, L.D. (1976), "An efficient and reproducible procedure for the formation of spheroplasts from variously grown *Escherichia coli*", *Analytical biochemistry*, Vol. 74 No. 1, S. 160-170.
- Wolfe, A.J., Chang, D.-E., Walker, J.D., Seitz-Partridge, J.E., Vidaurri, M.D., Lange, C.F., Prüss, B.M., Henk, M.C., Larkin, J.C. und Conway, T. (2003), "Evidence that acetyl phosphate functions as a global signal during biofilm development", *Molecular microbiology*, Vol. 48 No. 4, S. 977-988.
- Yen, M.R., Peabody, C.R., Partovi, S.M., Zhai, Y., Tseng, Y.H. und Saier, M.H. (2002), "Protein-translocating outer membrane porins of Gram-negative bacteria", *Biochimica et biophysica acta*, Vol. 1562 1-2, S. 6-31.
- Zingler, G., Ott, M., Blum, G., Falkenhagen, U., Naumann, G., Sokolowska-Köhler, W. und Hacker, J. (1992), "Clonal analysis of *Escherichia coli* serotype O6 strains from urinary tract infections", *Microbial pathogenesis*, Vol. 12 No. 4, S. 299-310.
- Zogaj, X., Bokranz, W., Nimtz, M. und Römling, U. (2003), "Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family Enterobacteriaceae isolated from the human gastrointestinal tract", *Infection and immunity*, Vol. 71 No. 7, S. 4151-4158.

6.3 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Schematische Darstellung der Oberflächenantigene von <i>Escherichia coli</i> .	2
Abb. 2: Äußere und inneren Membran von <i>E. coli</i> .	3
Abb. 3: Mobile genomische Insel (GEI) auf einem bakteriellen Chromosom.	6
Abb. 4: Shiga Toxin 2 (Stx2) aus <i>E. coli</i> O157:H7.	7
Abb. 5: Sekretionssysteme I bis IV mit den jeweiligen Komponenten aus Beispielorganismen. Modifiziert nach Henderson <i>et al.</i> , 2004.	14
Abb. 6: Typ V – Sekretionsweg mit den Subtypen Va, Vb und Vc. Modifiziert nach Henderson <i>et al.</i> , 2004.	17
Abb. 7: Mögliche Transportwege der <i>Passenger</i> Domänen von Autotransportern durch die äußere Bakterienmembran am Beispiel eines trimerischen Autotransporter Adhäsins (TAA). Modifiziert nach Łyskowski <i>et al.</i> , 2011.	19
Abb. 8: EibD mit einzelnen strukturellen Bereichen. Modifiziert nach Leo <i>et al.</i> , 2011.	23
Abb. 9: Phasen der Biofilmbildung bei gramnegativen Bakterien. Modifiziert nach Romeo, 2008.	25
Abb. 10: Regulation der Biofilmbildung von <i>E. coli</i> durch verschiedene Umwelteinflüsse.	32
Abb. 11: Immunglobulin G und seine 3D-Struktur am Beispiel eines Maus-IgG ₂ . Modifiziert nach Harris <i>et al.</i> , 1997.	34
Abb. 12: AS-Sequenzvergleich von allen Mitgliedern der Eib-Familie mit konservierten und homologen Bereichen. Modifiziert nach Sandt und Hill, 2000; Sandt und Hill, 2001.	40
Abb. 13: Verwendete Primer für die PCR und Sequenzierung von <i>eibG</i> .	54
Abb. 14: <i>pGEM-T Easy</i> – Vektorsystem.	57
Abb. 15: Das <i>Vivaflow 200</i> – System für die Ultrafiltration nach dem Querstromprinzip (<i>crossflow</i>).	69
Abb. 16: Herstellung bakterieller Sphäroplasten und Abtrennung der inneren und der äußeren Membran von <i>E. coli</i> .	75
Abb. 17: Aufbau eines UV-MALDI-o-TOF – Massenspektrometers. Modifiziert nach Loboda <i>et al.</i> , 2003.	80
Abb. 18: Ionisierungsvorgänge in einer ESI-Quelle. Modifiziert nach Dr. Paul Gates, School of Chemistry, University of Bristol (http://www.bris.ac.uk/).	84
Abb. 19: nanoESI-Q-TOF Massenspektrometer <i>SYNAPT G2-S</i> von Waters. Modifiziert nach Kanu <i>et al.</i> (2008).	85
Abb. 20: Fragmentierungsschema eines Tetrapeptides nach Roepstorff und Fohlman (1984).	86
Abb. 21: Kombinationen von Primer-Paaren für die Sequenzierung von <i>eibG</i> -PCR-Produkten. Erstellt mit Vector NTI.	90
Abb. 22: <i>eibG</i> -Amplifikate, die mit den Primer-Paaren 2 und 8 gewonnen wurden.	90
Abb. 23: <i>eibG</i> -Amplifikate, gewonnen aus der DNA des Stammes ST234 mit verschiedenen Primer-Paaren bei unterschiedlichen <i>annealing</i> -Temperaturen.	91
Abb. 24: <i>eibG</i> -Amplifikate, die mit dem Primer-Paar 2 (<i>orf1Fw</i> und <i>orf1Rw</i>) erzeugt wurden.	92
Abb. 25: MLST – <i>minimum spanning tree</i> von <i>eibG</i> -positiven STEC im Vergleich zur HUSEC-Kollektion.	93
Abb. 26: Gruppierung identifizierter <i>eibG</i> -Allele in drei Untergruppen in einem <i>unrooted neighbor – joining tree</i> .	93
Abb. 27 (Teil 1): Vergleich der sequenzierten 21 <i>eibG</i> -Allele untereinander.	95
Abb. 28: Theoretische AS-Sequenzen der 21 <i>eibG</i> -Allele.	98
Abb. 29: Adhäsion verschiedener <i>eibG</i> -positiver STEC-Stämme an humane intestinale Epithelzellen HCT-8.	99
Abb. 30: Adhäsion verschiedener <i>eibG</i> -positiver STEC-Stämme an bovine intestinale Epithelzellen FDK-R 971.	101
Abb. 31: Ausbildung bakterieller Ketten von <i>eibG</i> - α – positiven STEC auf abiotischer Oberfläche.	101
Abb. 32: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der IgG Fc-Interaktion bei verschiedenen <i>eibG</i> -positiven STEC.	102
Abb. 33: Blockierung von oberflächenassoziiertem EibG verschiedener <i>eibG</i> -positiver STEC-Stämme mit humanem IgG.	105

Abb. 34: <i>eibG</i> -Amplifikate, die mit PP 1 (1114orf1Fp und 1114orf1Rp) und der DNA aus den BL21(DE3) <i>eibG</i> ⁺ – Klonen erzeugt wurden.....	106
Abb. 35: Adhäsion verschiedener <i>eibG</i> -Klone an intestinale humane Epithelzellen HCT-8.....	107
Abb. 36: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der EibG-Expression in verschiedenen <i>eibG</i> -positiven Klonen mit und ohne IPTG-Induktion.....	108
Abb. 37: Unterschiede in der Kettenausbildung <i>eibG</i> -positiver STEC in Minimalmedium M9 bei geschüttelten und stationären Kultivierungsbedingungen.....	110
Abb. 38: Unterschiede in der Kettenausbildung <i>eibG</i> -positiver STEC in LB-Medium bei geschüttelten und stationären Kultivierungsbedingungen.....	112
Abb. 39: Adhäsion <i>eibG</i> -positiver Wildtypen und Klone an humane intestinale Epithelzellen (HCT-8) bei geschüttelten und stationären Kultivierungsbedingungen.....	113
Abb. 40: Phänotypischer und immunhistologischer Vergleich von Oberflächen- und Gefäßbodenbiofilmen aus einer stationären Kultivierung des Stammes 1809/00 (<i>eibG</i> - α).....	115
Abb. 41: Biofilmbildung des STEC-Stammes 1809/00 (O91:H14, <i>eibG</i> - α) bei geschüttelter und stationärer Kultivierung in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit.....	116
Abb. 42: Biofilmbildung des STEC-Stammes 06-03233 (O152:H ⁻ , <i>eibG</i> - β) bei geschüttelter und stationärer Kultivierung in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit.....	117
Abb. 43: Biofilmbildung des STEC-Stammes 0520/99 (Ont:H30, <i>eibG</i> - γ) bei geschüttelter und stationärer Kultivierung in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit.....	117
Abb. 44: Biofilmbildung des <i>eibG</i> -positiven Klon B-1-10 (<i>eibG</i> - α) bei geschüttelter und stationärer Kultivierung in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit.....	118
Abb. 45: Biofilmbildung des <i>eibG</i> -positiven Klon B-20-1 (<i>eibG</i> - β) bei geschüttelter und stationärer Kultivierung in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit.....	118
Abb. 46: Biofilmbildung des <i>eibG</i> -positiven Klon B-18-2 (<i>eibG</i> - γ) bei geschüttelter und stationärer Kultivierung in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit.....	119
Abb. 47: Auswirkung von Kollagen auf die Biofilmbildung <i>eibG</i> -positiver STEC – Wildtypstämme nach 12 h stationärer Kultivierung.....	120
Abb. 48: Biofilmbildung im Verlauf einer 24-stündigen Kultivierung durch <i>eibG</i> -positive STEC in geschüttelter und stationärer Kultur.....	121
Abb. 49: Biofilmbildung von <i>eibG</i> -positiven Wildtypstämmen und Klonen nach 12 h Kultivierung unter geschüttelten und stationären Bedingungen.....	122
Abb. 50: Visualisierung von EibG des Wildtypstammes 1809/00 (<i>eibG</i> - α , Allel 001) und des Klon B-1-10 (<i>eibG</i> - α , Allel 001) mit humanem IgG Fc-HRP.....	124
Abb. 51: Expression von EibG in verschiedenen <i>eibG</i> -positiven Wildtypstämmen.....	126
Abb. 52: EibG-Expression bei geschüttelter und stationärer Kultivierung der <i>eibG</i> -positiven Wildtypen im Verlauf einer 24-stündigen Kultivierung.....	128
Abb. 53: EibG-Expression bei geschüttelter und stationärer Kultivierung der EibG-exprimierenden Klone im Verlauf einer 24-stündigen Kultivierung.....	129
Abb. 54: EibG-Expression bei geschüttelter und stationärer Kultivierung der <i>eibG</i> -positiven Wildtypen und <i>eibG</i> -exprimierenden Klone nach 12- und 24-stündiger Kultivierung.....	131
Abb. 55: Auftrennung der inneren und der äußeren Membranen von Sphäroplasten des Wildtypstammes 1809/00 mit Hilfe eines Saccharosegradienten.....	132
Abb. 56: Nachweis von EibG in hitzeextrahierten Lysaten <i>eibG</i> -positiver Wildtypstämme bei geschüttelter und stationärer Kultivierung.....	134
Abb. 57: Affinität von EibG- α zu Immunglobulinen verschiedener Tierspezies.....	135
Abb. 58: Affinität von humanem IgG Fc-HRP gegenüber verschiedenen EibG-Subtypen aus Wildtypstämmen nach geschüttelter und stationärer Kultivierung.....	136
Abb. 59: Gelpräparation für Peptidmassen-Fingerabdruck mit MALDI-TOF-MS und ESI-MS.....	137

Abb. 60 (Teil 1): Peptidspektren der EibG-Gelspots von vier <i>eibG</i> -positiven Wildtypstämmen mittels MALDI-TOF-MS mit den identifizierten Treffern.....	138
Abb. 61: <i>peptide mass fingerprint</i> von EibG des Stammes B-1-10 (<i>eibG</i> - α).....	140
Abb. 62: Mit nanoESI-Q-TOF MS/MS sequenzierte Peptide innerhalb der AS-Gesamtsequenzen der drei EibG-Subtypen.....	141
Abb. 63: Berechnung der Signalsequenz von EibG-001.	143
Abb. 64: Vergleich der theoretisch bestimmten Signalsequenzen der drei EibG-Subtypen.	143
Abb. 65: 2D-Gelelektrophorese vom Gesamtzelllysate des Wildtypstammes 1899/00 (<i>eibG</i> - α).	144
Abb. 66: 2D-Gelelektrophorese vom Gesamtzelllysate des Wildtypstammes 06-03233 (<i>eibG</i> - β).....	145
Abb. 67: 2D-Gelelektrophorese vom Gesamtzelllysate des Wildtypstammes 0520/99 (<i>eibG</i> - γ).....	145
Abb. 68: Unterschiede im Proteommuster zwischen geschüttelter (♫) und stationärer (⊗) Kultivierung des Wildtypstammes 1809/00 (<i>eibG</i> - α).	146
Abb. 69: Ausgeschnittene Proteinspots aus vier Gelen der Lysate des Wildtypstammes 1809/00 (<i>eibG</i> - α) nach verschiedener Kultivierung für die MALDI-MS – Identifizierung.....	147
Abb. 70: MS-Spektren der Proteinspots 2 und 15 mit Massenzuweisung der erhaltenen Peaks.	148
Abb. 71: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Wildtypstammes 1745/98 (O91:H21, <i>eibG</i> -negativ).	152
Abb. 72: Nachweis der IgG-EibG – Interaktion mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen des Stammes 2875/96 (O91:H14 [H14], <i>eibG</i> - α).	153
Abb. 73: Nachweis der IgG-EibG – Interaktion mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen des Wildtypstammes 2875/96 (O91:H14 [H14], <i>eibG</i> - α) nach stationärer Vor- und Hauptkultur.....	154
Abb. 74: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Wildtypstammes 06-03233 (O152:H [H14], <i>eibG</i> - β).....	155
Abb. 75: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Wildtypstammes 0520/99 (Ont:H30, <i>eibG</i> - γ).....	156
Abb. 76: Templates für 3D-Modellierung von EibG-001.	157
Abb. 77: Schlauchmodelle der drei EibG-Templates als Trimere. Moleküle mit Farbmarkierungen der einzelnen Sequenzbereiche für 3D-Modellierung von EibG.....	158
Abb. 78: Sequenzvergleich von EibG und der drei Templates für die 3D-Modellierung mit Farbmarkierungen der einzelnen Sequenzbereiche.	158
Abb. 79: Vergleich der AS-Sequenz von AmpS aus <i>Staphylococcus aureus</i> mit dem Fragment EibG ₂₈₋₈₅	159
Abb. 80: Bändermodelle der drei Templates als trimere Moleküle und das EibG-Monomermodell.....	160
Abb. 81: 3D-Modell von EibG unter Berücksichtigung aller Templates und Vergleich einzelner Sequenzbereiche mit EibD.....	161
Abb. 82: IgA- und IgG-Bindungsgebiete von EibD mit Übertragung auf die EibG-Sequenz.	162
Abb. 83: EibG ₃₆₀₋₄₁₆ mit ASP-391 als mögliche Bindungsstelle für IgG Fc.....	162
Abb. 84: Sequenzvergleich aller Eib-Proteine und Gruppierung verschiedener funktioneller Bereiche anhand der 3D-Templates.....	163
Abb. 85: Überprüfung <i>eibG</i> -positiver STEC-Stämme auf <i>cah</i> - und <i>ehaA</i> -Vorkommen mittels PCR.	164
Abb. 86: AS-Sequenzvergleich der IgG Fc-Bindungsstelle von EibD mit den korrespondierenden Sequenzen von EibG, Antigen43 und EhaA.....	165

6.4 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Zusammensetzung der für die Kultivierung von <i>E. coli</i> verwendeten Medien	52
Tabelle 2: Eingesetzte Primer mit der 5'→3' – Sequenz	54
Tabelle 3: Einzelne Komponenten für jeden PCR-Ansatz	55
Tabelle 4: PCR-Schritte für die Amplifikation eines PCR-Produktes mit einer Länge von ca. 1000 bp ^a	55
Tabelle 5: Einzelne Schritte der Sequenzierungs-PCR	56
Tabelle 6: PCR-Schritte für DNA-Amplifikation mit der <i>high-fidelity</i> DNA-Polymerase <i>Phusion Hot Start II</i> ^a	58
Tabelle 7: Lösungen für die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Markwell et al. (1978)	70
Tabelle 8: Bestandteile der SDS-PAGE – Gele nach Lämmli für zwei Minigele	71
Tabelle 9: Für die Silber-Färbung verwendete Lösungen und Dauer der einzelnen Färbeschritte	73
Tabelle 10: Für die kolorimetrische Immundetektion mittels alkalischer Phosphatase verwendete Lösungen und einzelne Schritte der Farbreaktion	74
Tabelle 11: Programm für die Isoelektrische Fokussierung	78
Tabelle 12: Schritte zur Extraktion proteolytischer Peptide	82
Tabelle 13: Arbeitsschritte zur Entsalzung proteolytischer Peptidfraktionen mittels ZipTip-C ₁₈	82
Tabelle 14: Zur Kalibrierung des MALDI-Detektors verwendete Referenzpeptide	83
Tabelle 15: Verteilung von <i>eibG</i> bei <i>eae</i> -positiven und <i>eae</i> -negativen STEC	87
Tabelle 16: Verteilung der sechs verschiedenen <i>eib</i> -Gene in <i>eibG</i> -positiven STEC	88
Tabelle 17: Eingesetzte Primer-Paare und erzeugte PCR-Produkte	89
Tabelle 18: Sero- und ST-Typen der 36 <i>eibG</i> -positiven Stämme	94
Tabelle 19: Zuordnung der CLAP-Muster zu verschiedenen <i>eibG</i> -Typen	104
Tabelle 20: <i>eibG</i> -positive BL21(DE3) – Stämme mit Herkunftsangaben der <i>eibG</i> -Gene und CLAP-Muster	107
Tabelle 21: Mittels MALDI-TOF-MS identifizierte drei <i>EibG</i> -Subtypen	140
Tabelle 22: Mittels ESI-MS/MS sequenzierte <i>EibG</i> -Peptide	142
Tabelle 23: Identifizierte Proteinspots aus den 2D-Gelen mittels MALDI-TOF – MS <i>peptide mass fingerprinting</i>	153
Tabelle 24: Von <i>Swiss Model Workspace</i> vorgeschlagene PDB-Templates mit höchster Sequenzübereinstimmung zu <i>EibG</i> -001	157
Tabelle 25: Vergleich einzelner <i>EibD</i> -Bereiche mit ähnlichen Bereichen von <i>EibG</i>	160

6.5 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
(NH ₄)HCO ₃	Ammoniumhydrogencarbonat
µL	Mikroliter
2D-GE	Zweidimensionale Gelelektrophorese
A	Amper
A/E	<i>attaching and effacing</i>
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ACN	Acetonitril
AcP	Acetyl-Phosphat
Ag43	Antigen43
AIDA	<i>adhesin involved in diffuse adherence</i>
AM	Äußere Membran von <i>E. coli</i>
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
Bis-Acrylamid	N,N'-Methylenbisacrylamid
bp	<i>base pair</i> , Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
c-di-GMP	<i>cyclic diguanylate guanosine monophosphate</i>
cDNA	Chromosomale DNA
CDT	<i>cytolethal distending toxin</i>
CHAPS	3-((3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio)-1-propansulfonat
CID	<i>collision-induced dissociation</i>
CLA	<i>chain-like adhesion</i>
cm	Zentimeter
CMF-PBS	<i>calcium and magnesium free – phosphate buffered saline</i>
CNF1	<i>cytotoxic necrotizing factor 1</i>
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
ddH ₂ O	<i>double-distilled water</i>
DHB	Dihydroxybenzoesäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOC	Deoxycholate (Natriumdesoxycholat)
DR	<i>direct repeats</i>
DTT	Dithiothreitol
EAEC	Enteroaggregative <i>E. coli</i>
ECOR	<i>Escherichia coli reference collection</i>

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>E. coli</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EM	Elektronenmikroskopie
EMBL-EBI	<i>European Molecular Biology Laboratory European Bioinformatics Institute</i>
EPEC	Enteropathogene <i>E. coli</i>
EPS	Exopolysaccharid
ER	Endoplasmatischen Retikulum
ETEC	Enterotoxische <i>E. coli</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FBS	<i>foetal fovine ferum</i>
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
FM	Fluoreszenzmikroskop
FSG	<i>fish skin gelatine</i> , Fischhautgelatine
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GEI	<i>genomic island</i>
GMVEC	<i>glomerular microvascular endothelial cells</i>
GVO	Gentechnisch veränderter Organismus
h	Stunde
HBMEC	<i>human brain microvascular endothelial cell</i>
HC	Hämorrhagische Kolitis
HCCA	α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure
HEp	<i>human epidermoid cancer cells</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperaziny) – Ethansulfonsäure
HiDi Formamid	<i>highly deionized formamide</i>
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
HUS	Hämolytisch-urämisches Syndrom
Hz	Hertz
IBP	Immunglobulin-bindende Proteine
IEF	Isoelektrischen Fokussierung
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IMS	Ionen-Mobilitäts-Spektrometer
<i>int</i>	Integrase
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
IPTG	Isopropyl-thio-galaktosid
IS	Insertionssequenzen
J	Joul
k	Kilo
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KV	Kristallviolett
L	Liter
LEE	<i>locus of enterocyte effacement</i>
LM	Lichtmikroskop
LPBR	<i>left-handed parallel β-roll domain</i>
Lpf	<i>long polar fimbriae</i>

LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladung
MCP	<i>multi-channel-plates</i> , Multikanalplatten
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MFP	<i>membrane fusion protein</i>
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MTP	Mikrotiterplatte
MW	Molekulargewicht
nanoESI-Q-TOF	<i>nanoelectrospray ionization quadrupole-time-of-flight</i>
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
<i>nm</i>	<i>non motile</i>
nm	Nanometer
NMEC	Neonatale Meningitis <i>E. coli</i>
NMWC	<i>nominal molecular weight cut-off</i>
OD	Optische Dichte
OMP	<i>outer membrane protein</i>
OMV	<i>outer membrane vesicles</i>
OPD	<i>o</i> -Phenylendiamin
ORF	<i>open reading frame</i>
PA	Polyacrylamid
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PAI	<i>pathogenicity island</i>
<i>pap</i>	<i>pyelonephritis-associated pili</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
PGA/PNAG	Poly- β -1,6-N-Acetylglucosamin
pI	Isoelektrische Punkt
PIM	Protease Inhibitor Mix
ppGpp	Guanosin-3',5'-bispyrophosphat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SEPEC	Septikämische <i>E. coli</i>
Sfa	<i>S fimbriae major subunit</i>
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
SPATE	Serinproteasautotransporter
SSSB	<i>standard sample solubilization buffer</i>
STEC	Shiga Toxin bildende <i>E. coli</i>
Stx	Shiga Toxin
TAA	Trimerische Autotransporter Adhäsine
TAbb.	Teilabbildung
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer

TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TCA	Trichloressigsäure
TCP	<i>toxin coregulated pilus</i>
TDC	<i>time-to-digital-converter</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	<i>trifluoroacetic acid</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSB-Medium	<i>tryptic soy broth</i>
U	<i>units</i>
UF	Ultrafiltration
ÜN	Über Nacht
UPEC	Uropathogene <i>E. coli</i>
US	Ultraschall
UV-MALDI-o-TOF	Infrarot-Matrix-unterstützte Laser Desorptions/Ionisations-orthogonal-Flugzeit
UZ	Ultrazentrifugation
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumenanteil)
VE-H ₂ O	Einfach destilliertes Wasser
vgl.	Vergleiche
w/v	<i>weight per volume</i> (Massenkonzentration)
w/w	<i>weight per weight</i> (Massenanteil)
WT	Wildtyp
WWU	Westfälische Wilhelms-Universität
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indol- β -D-Galaktosid
z. B.	Zum Beispiel
ZK	Zellkultur
ZMBE	Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung
β -OG	n-Octyl- β -D-glucopyranosid

6.6 LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Viktor Merkel

Geburtsdatum: 28.09.1978

Geburtsort: Iskitim, Russland

Nationalität: Deutsch

Zivilstand: ledig, keine Kinder

Akademischer Werdegang

08/2009 – heute Universitätsklinikum Münster, Institut für Hygiene
Promotion: „Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des
Immunglobulin-bindenden Proteins EibG aus Shiga Toxin-
produzierenden *Escherichia coli*-Stämmen“

05/2008 – 06/2009 Universitätsklinikum Münster, Institut für Hygiene
Diplomarbeit: „Affinitätschromatographische Aufreinigung von Shiga
Toxinen“; Abschluss: Diplom

03/2003 – 05/2009 Universität Bielefeld, Technische Fakultät
Diplomstudiengang: Molekulare Biotechnologie

Schulbildung

08/2001 – 6/2003 Westfalen-Kolleg Paderborn (Zweiter Bildungsweg)
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

08/1995 – 05/1999 Reismanngymnasium Paderborn
Abschluss: Allgemeine Fachhochschulreife

06/1992 – 06/1995 Hauptschule Borchten
Abschluss: Fachoberschulreife

09/1985 – 05/1992 Mittelschule 3 Iskitim, Russland

Wehrdienst

9/1999 – 06/2000 Augustdorf GFM-Rommel-Kaserne, 3./PzGrenBtl 212

Sprachen

Deutsch: Muttersprachniveau

Russisch: Muttersprachniveau

Englisch: Schriftlich und mündlich sehr gut

Französisch: Grundkenntnisse

7. ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Unterschrift