

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Hygiene
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. Alexander Mellmann -

Institutsbereich Mikrobielle Genomplastizität
- Direktor des Institutsbereichs: Univ.-Prof. Dr. Ulrich Dobrindt -
„Untersuchungen zur Biofilmbildung als einem Risikofaktor bei
katheterassoziierten Harnwegsinfektionen“

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Schmidt, Patrick
aus Wertheim
2019

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Dr. h.c. Sven Meuth

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Dobrindt

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Barbara Kahl

Tag der mündlichen Prüfung: 27.8.2019

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Hygiene
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Alexander Mellmann -

Institutsbereich Mikrobielle Genomplastizität
- Direktor des Institutsbereichs: Univ.-Prof. Dr. Ulrich Dobrindt -

Referent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Dobrindt
Koreferent: Prof. Dr. med. Barbara Kahl

ZUSAMMENFASSUNG

„Untersuchungen zur Biofilmbildung als einem Risikofaktor bei
katheterassoziierten Harnwegsinfektionen“

Schmidt, Patrick

Nosokomiale Harnwegsinfektionen gehören zu den häufigsten bakteriellen Infektionen in Industrienationen und werden in etwa 95 % der Fälle durch Blasenkatheter ausgelöst. Biofilmbildung ermöglicht *Escherichia coli* als häufigstem Erreger eine verlängerte Persistenz im Harntrakt und eine erhöhte Resistenz gegen antimikrobielle Substanzen. In einem statischen Biofilmmodell konnte ein inhibitorischer Effekt auf die Biofilmbildung des uropathogenen *E. coli* Isolates UTI89 durch die Urinbestandteile Harnstoff, Harnsäure, Natriumchlorid, Kreatinin und Eisen(II)sulfat gezeigt werden. Magnesiumionen förderten das bakterielle Wachstum und die Biofilmbildung. Untersuchungen von jeweils zehn Isolaten katheterassoziierter Harnwegsinfektionen, nicht-katheterassoziierter Harnwegsinfektionen sowie von Fäkalisolaten in einem Flussmodell mit kontinuierlichem Medienaustausch von M63 oder künstlichem Urin zeigten keinen signifikanten Unterschied der Biofilmbildung zwischen den Untersuchungsgruppen in beiden Medien. Ein signifikanter Einfluss des Mediums (M63 Medium im Vergleich zu künstlichem Urinmedium) auf die Biofilmbildung wurde gezeigt. Das Polysaccharid β -1,6-N-Acetyl-D-Glucosamin (PGA) ist Teil der Biofilmmatrix von *E. coli*. Ein Reportergerüst zum Nachweis der *pga*-Expression auf Transkriptions- und Translationsebene durch das gelb fluoreszierende Protein *venus* wurde mittels Rekombination erstellt. Das *csrA*-Gen, das für einen posttranskriptionalen Regulator der PGA-Expression kodiert, wurde in den Reportergerüsten zusätzlich inaktiviert. Die Ergebnisse zeigen, dass das Medium und Testsystem, in dem die Biofilmbildung uropathogener *E. coli* gemessen werden, für das Ausmaß der Biofilmbildung entscheidend sind. Urin oder urinähnliche Medien führen zu meist geringerer Biofilmbildung als gängige Labormedien. Eine vermehrte Biofilmbildung von Isolaten katheterassoziierter Harnwegsinfektionen konnte im Flussmodell nicht nachgewiesen werden. Die Reportergerüste können für weitere Forschungen zur Regulation der PGA-Bildung eingesetzt werden.

Tag der mündlichen Prüfung: 27.8.2019

ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel

„Untersuchungen zur Biofilmbildung als einem Risikofaktor bei katheterassoziierten Harnwegsinfektionen“

im Institut für Hygiene unter der Anleitung von Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Dobrindt

1. selbstständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Münster, 27.8.2019

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Plehmick', is enclosed in a light gray rectangular box.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Harnwegsinfektionen.....	1
1.1.1 Katheterassoziierte Harnwegsinfektionen	3
1.2 <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).....	4
1.2.1 Adhäsine und Fimbrien	4
1.2.2 Autotransporter.....	5
1.2.3 Lipopolysaccharide	6
1.2.4 Biofilmbildung	6
1.2.5 Extrazelluläre Polysaccharide	7
1.3 β -1,6-N-Acetyl-D-Glucosamin (PGA).....	8
1.3.1 PGA-Regulation	8
1.3.2 Der Carbon Storage Regulator A (CsrA) als Einflussfaktor der PGA-Translation ...	10
1.4 Fragestellung und Zielsetzung.....	11
1.4.1 Modelle zur Biofilmmessung	12
1.4.2 Prinzip von Reporterfusionen.....	13
2. Material.....	14
2.1 Chemikalien, Geräte & Verbrauchsmaterial	14
2.2 Nähr- und Selektivmedien.....	15
2.3 Verwendete Bakterienstämme	18
2.4 Puffer und Lösungen.....	19
2.5 Primer.....	20
2.6 Verwendete Enzyme.....	22
2.7 Verwendete Plasmide	22
2.9 Biofilm-Mikrofermenter-Material.....	23
2.10 Software	23
3. Methoden.....	24
3.1 Stammhaltung und Bakterienanzucht.....	24
3.2 Sammelurin.....	24
3.3 Analyse der Biofilmbildung in Mikrofermentern	24
3.3.1 Vorbereitung und Sterilisation der benötigten Komponenten.....	25
3.3.2 Aufbau der Mikrofermenter	25
3.3.3 Abbau, Messung und Reinigung der Mikrofermenter	28

3.4	Transformation und Klonierung.....	28
3.4.1	Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation (nach Sambrook (67), modifiziert)	28
3.4.2	Plasmid-Präparation (NucleoSpin® Plasmid, Fa. Macherey-Nagel).....	29
3.4.3	Restriktionsverdau und Kontroll-PCR.....	30
3.4.4	Erstellung des Rekombinations-Templates.....	31
3.4.5	Aufreinigung des PCR-Produkts (NucleoSpin® Gel and PCR CleanUp, Fa. Macherey-Nagel)	34
3.4.6	Chromosomale Integration des <i>venus</i> Reportergens durch λ -Red-vermittelte Rekombination.....	34
3.4.7	DNA-Präparation, PCR und Elektrophorese zur Kontrolle der Rekombinationen	35
3.4.8	Sequenzierung der PCR-Produkte	36
3.5	Statistische Auswertung	37
4.	Ergebnisse.....	39
4.1	Biofilm-Bildung in Abhängigkeit des Nährmediums.....	39
4.2	Vergleich der Biofilm-Bildung verschiedener <i>E. coli</i> -Isolate unter Flussbedingungen 45	
4.2.1	Vergleich mit Ergebnissen eines statischen Biofilm-Assays	49
4.3	Prävalenz des <i>pga</i> -Operons in verschiedenen <i>E. coli</i> -Isolaten	54
4.4	Herstellung der Reportergenfusionen und der <i>csrA</i> -Deletion in <i>E. coli</i> Stamm UTI89 55	
5.	Diskussion.....	61
5.1	Diskussion der Studienmethodik.....	62
5.2	Analyse der biofilmbeeinflussenden Substanzen in Urin	64
5.3	Vergleich von Modellen zur Messung von Biofilm	65
5.3.1	Biofilmbildung im Flussmodell	65
5.3.2	Vergleich des statischen Modells und des Flussmodells.....	66
5.4	Bedeutung der Biofilmbildung für katheterassoziierte Harnwegsinfektionen.....	67
5.5	PGA als Teil der Biofilmmatrix	67
5.5.1	Reportergenfusionen zur Bestimmung der PGA-Expression.....	68
5.6	Fazit	69
6.	Literaturverzeichnis	71

Danksagung	79
Lebenslauf	80
Anhang	I
Deskriptive Statistiken.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte	14
Tabelle 2: Verwendete Antibiotika-Konzentrationen	18
Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme	18
Tabelle 4: Verwendete Primer	20
Tabelle 5: Verwendete Enzyme.....	22
Tabelle 6: Verwendete Plasmide	22
Tabelle 7: Biofilm-Mikrofermenter-Material	23
Tabelle 8: PCR-Programm zur Herstellung der Rekombinationssequenzen	33
Tabelle 9: Benennung der Reportergenfusionen	35
Tabelle 10: PCR-Ansätze zur Analyse der Rekombinationsprodukte	36
Tabelle 11: PCR-Bedingungen zur Kontrolle der chromosomalen Reportergenfusionen	36
Tabelle 12: PCR-Bedingungen für die Sequenzierung der PCR-Produkte.....	37
Tabelle 13: Vergleich des Einflusses des Mediums auf die Biofilmbildung des E. coli Stammes UTI89 im Post-Hoc-Test	40
Tabelle 14: Vergleich des Einflusses von Magnesiumsulfat und Magnesiumchlorid auf das Wachstum des E. coli Stammes UTI89.....	44
Tabelle 15: Biofilmbildung der verschiedenen Isolatgruppen in M63 und Artificial Urine Medium	46
Tabelle 16: Paarweiser Vergleich der Biofilmbildung der getesteten Isolatgruppen in M63-Medium und Artificial Urine Medium.....	48
Tabelle 17: Einfluss des Mediums auf die Biofilmbildung der untersuchten Isolatgruppen: Schätzung des Kontrasts an Colony Forming Units (CFU) pro mL zwischen den Medien M63 und AUM	48
Tabelle 18: Vergleich der Biofilmbildung von E. coli UTI89 in M63 Medium, Urin und Artificial Urine Medium.	I
Tabelle 19: Biofilmbildung von E. coli UTI89 in M63r Medium unter Zusatz von Urinbestandteilen.....	I
Tabelle 20: Wachstum von E. coli UTI89 in M63r Medium unter Zusatz von Urinbestandteilen.	II

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bestandteile der ableitenden Harnwege.	1
Abbildung 2: Erreger unkomplizierter und komplizierter Harnwegsinfektionen.	3
Abbildung 3: Schematische Darstellung der verschiedenen Stadien der bakteriellen Biofilmbildung.	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung der an der PGA-Synthese beteiligten Proteine bei <i>E. coli</i>	8
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Stimuli, welche die Aktivierung der PGA Expression durch das Cation-responsive proteins NhaR fördern.....	9
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Beeinflussung der PGA Expression durch das Zwei-Komponenten-System BarA/UvrY	10
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Anschluss eines Mikrofermenters an die Ver- und Entsorgung mit Luft und Medium.	26
Abbildung 8: Aufbau der Versuchsapparatur zur Biofilmcharakterisierung in Mikrofermentern. Neun Mikrofermenter werden parallel im Wasserbad betrieben, die Medienzufuhr erfolgt aus einem 10-Liter-Gefäß über eine Rollenpumpe.....	27
Abbildung 9: Karte des Plasmids pMBvenus.....	30
Abbildung 10: Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsverdau von pMBvenus durch Gelelektrophorese.	31
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Herstellung der Transkriptions- und Translationsfusionen im pga Operon.....	32
Abbildung 12: Agarosegel zur Überprüfung der zur Herstellung der Transkriptions- und Translationsfusion mit dem venus Reportergen zu verwendenden PCR-Produkte.....	33
Abbildung 13: Biofilmbildung des <i>E. coli</i> Stammes UTI89 in M63-Medium, Sammelurin und Artificial Urine Medium.....	39
Abbildung 14: Auswirkung einzelner Urinbestandteile auf die Biofilmbildung des <i>E. coli</i> Stammes UTI89 in M63r Medium.....	41
Abbildung 15: Biofilmbildung des <i>E. coli</i> Stammes UTI89 in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von Casaminosäuren.	42
Abbildung 16: Wachstum des <i>E. coli</i> Stammes UTI89 in M63r Medium in Abhängigkeit verschiedener Urinbestandteilen.	43
Abbildung 17: Einfluss von Magnesiumsulfat, Magnesiumchlorid oder Eisen(II)sulfat zu einem reduzierten M63-Medium auf das Wachstum von <i>E. coli</i> Stamm UTI89.....	45
Abbildung 18: Biofilmbildung (gemessen über Colony Forming Units) in den drei Isolatgruppen und den verwendeten Medien M63 und Artificial Urine Medium.....	47
Abbildung 19: Vergleich der Biofilmbildung von Katheterisolaten in M63-Medium unter verschiedenen Anzuchtbedingungen (Fließbedingungen vs. statische Anzucht).....	49
Abbildung 20: Vergleich der Biofilmbildung von Harnwegsinfekt-Isolaten in M63-Medium unter verschiedenen Anzuchtbedingungen (Fließbedingungen vs. statische Anzucht).....	50
Abbildung 21: Vergleich der Biofilmbildung von Fäkal-Isolaten in M63-Medium unter verschiedenen Anzuchtbedingungen (Fließbedingungen vs. statische Anzucht).....	51
Abbildung 22: Vergleich der Biofilmbildung von Katheterisolaten in Urin unter verschiedenen Anzuchtbedingungen (Fließbedingungen, Artificial Urine Medium vs. statische Anzucht, humaner Sammelurin).....	52

Abbildung 23: Vergleich der Biofilmbildung von Harnwegsinfekt-Isolaten in Urin unter verschiedenen Anzuchtbedingungen (Fließbedingungen, Artificial Urine Medium vs. statische Anzucht, humaner Sammelurin).....	53
Abbildung 24: Vergleich der Biofilmbildung von Fäkal-Isolaten in Urin unter verschiedenen Anzuchtbedingungen	53
Abbildung 25: Schematische Darstellung der Bindestellen der Primer PS8/PS9 sowie PS10/PS11 im <i>pga</i> -Operon.....	54
Abbildung 26: Nachweis des <i>pga</i> -Operons in den verschiedenen Isolatgruppen.	55
Abbildung 27: Primer-Bindungsstellen zur Kontrolle der generierten <i>venus</i> Transkriptions- oder Translationsfusionen im UTI89-Genom.....	56
Abbildung 28: Agarosegel zur Kontrolle der korrekten Integration des <i>venus</i> Gens als Transkriptions- oder Translationsfusion in des <i>pga</i> -Operon.	56
Abbildung 29: Vergleich der erwarteten Nukleotidsequenz der Reportergenfusion und dem Ergebnis der Sequenzierung, beispielhaft dargestellt mit Sequenzier-Primer PS5.....	57
Abbildung 30: Schematische Darstellung der benötigten Rekombinationsschritte zur Verkürzung des <i>csrA</i> Gens im Reporterstamm UTI89 <i>pgaA::venus</i>	58
Abbildung 31: Agarosegel zur Kontrolle der <i>csrA::csrA51</i> Rekombination mittels der Primer <i>csrA</i> -Prom-Seq und <i>csrA</i> -ctrl-as.....	59
Abbildung 32: Agarosegel zum Nachweis der erfolgreichen Verkürzung des <i>csrA</i> Gens.	60
Abbildung 33: Agarosegel zum Nachweis der Entfernung von <i>pKD46::csrA</i>	60

1. Einleitung

Katheterassoziierte Harnwegsinfektionen stellen mit 95 % aller nosokomialen Harnwegsinfektionen einen bedeutenden Anteil der Harnwegsinfektionen und damit einen großen Anteil der bakteriellen Infektionen in Industriestaaten (28,31). *E. coli* ist der häufigste Erreger von Harnwegsinfektionen (30). Die Eigenschaft von *E. coli*, sich in Biofilmen netzwerkartig zu organisieren gilt als bedeutender Pathogenitätsfaktor für katheterassoziierte Harnwegsinfektionen. Ziel dieser Arbeit ist die weitergehende Untersuchung der Rolle der Biofilmbildung von *E. coli* sowie des Polysaccharids β -1,6-N-Acetyl-D-Glucosamin (PGA) als Bestandteil der extrazellulären Matrix des Biofilms von *E. coli*.

1.1 Harnwegsinfektionen

Die Harnwegsinfektion ist die in Industriestaaten am häufigsten vorkommende bakterielle Infektion (31). Jede zweite Frau erkrankt mindestens einmal im Leben an einer solchen Infektion. Harnwegsinfektionen verursachen damit erhebliche Kosten im Gesundheitssystem, die alleine in den USA auf jährlich mehr als zwei Milliarden Dollar geschätzt werden (31).

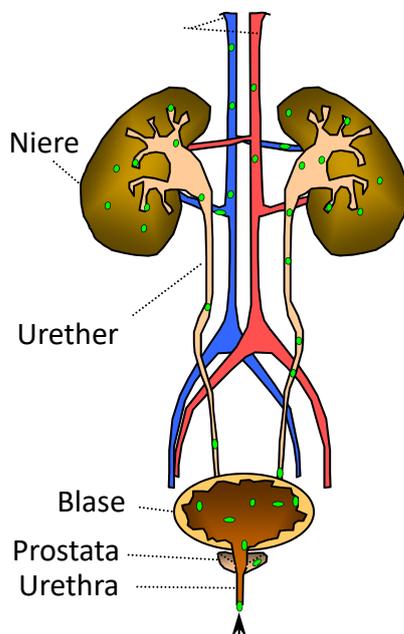


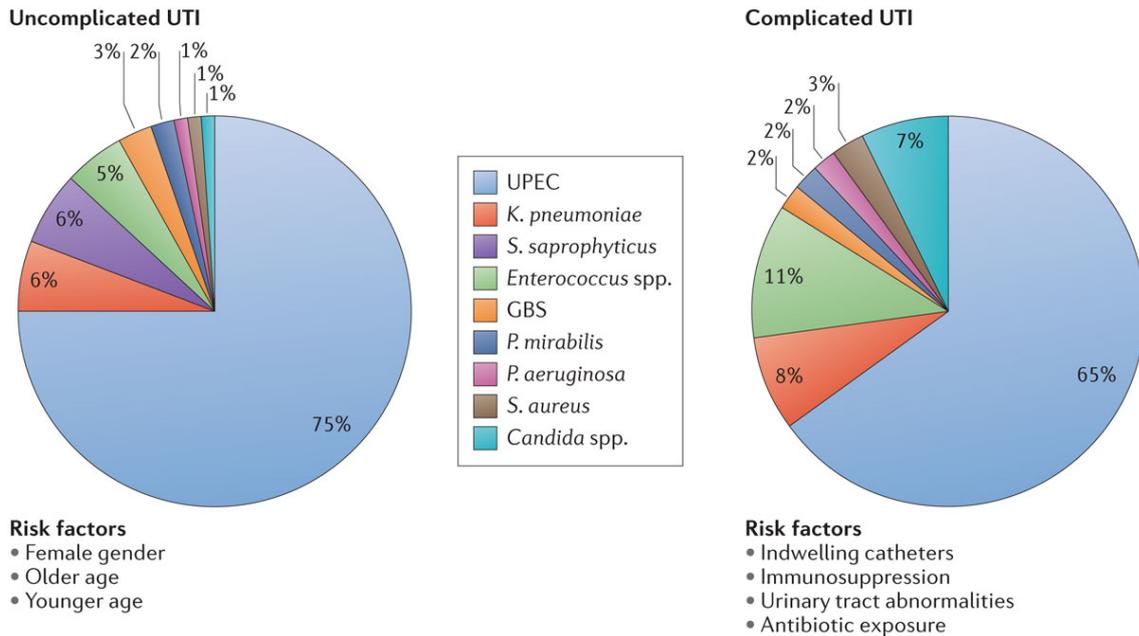
Abbildung 1: Bestandteile der ableitenden Harnwege. Bildquelle: Ulrich Dobrindt, Münster.

Unter dem Begriff „Harnwegsinfektionen“ werden verschiedene Erkrankungen zusammengefasst, die die ableitenden Harnwege betreffen (Abbildung 1). Zu den ableitenden Harnwegen zählen das Nierenbeckenkelchsystem, die Harnleiter (Ureter), die Harnblase, die Prostata sowie die Harnröhre (Urethra). Je nach Lokalisation der Infektion werden Harnwegsinfektionen in eine Pyelonephritis (Infektion des Nierenbeckenkelchsystems), Zystitis (Infektion der Harnblase) und Prostatitis (Infektion der Prostata) unterteilt. Bei komplizierten Verlaufsformen kann es zudem zu einer Streuung der auslösenden Bakterien in die Blutbahn kommen. Dies führt zu einer systemischen Entzündungsreaktion, der Urosepsis.

In der Medizin ist es üblich, Harnwegsinfektionen in unkomplizierte und komplizierte Verlaufsformen zu unterteilen. Als Kennzeichen für eine komplizierte

Verlaufsform gilt das Vorliegen von Risikofaktoren, die die Wahrscheinlichkeit eines Therapieversagens erhöhen. Zu diesen Risikofaktoren zählen u.a. Diabetes, Schwangerschaft, Bestehen der Symptome für mehr als sieben Tage bevor ärztlicher Rat eingeholt wurde, im Krankenhaus erworbene Infektionen, Nierenversagen, Obstruktionen des Harntraktes, urethrale Katheter/Stents/künstliche Harnableitung, kürzliche Eingriffe am Harntrakt, funktionelle oder anatomische Abnormität des Harntraktes, Vorgeschichte von Harnwegsinfektionen in der Kindheit, Nierentransplantation und Immunsuppression (45). Harnwegsinfektionen bei Männern werden ebenfalls zu den komplizierten Harnwegsinfektionen gezählt.

Neben Faktoren, die zu einer komplizierten Harnwegsinfektion führen, sind Risikofaktoren bekannt, die die Entstehung einer Harnwegsinfektion begünstigen. Zu diesen Risikofaktoren werden u.a. angeborene Veränderungen des Harntraktes, Urinabflussbehinderungen, Inkontinenz, Diabetes, vorausgegangene Harnwegsinfektionen, sexuelle Aktivität, der Gebrauch von Kondomen/Spermiziden/Diaphragma, Operationen im Urogenitalbereich, Harnröhrenkatheter sowie ein Östrogenmangel gezählt (31,45). Eine weitere wichtige Unterscheidung besteht im Umfeld, in dem die Harnwegsinfektion erworben wurde. Dabei wird unterschieden in „Community Acquired Urinary Tract Infections“ (ambulant erworbene Harnwegsinfektionen) und „Hospital Acquired Urinary Tract Infections“ (nosokomial erworbene Harnwegsinfektionen). Als „Hospital Acquired“ zählt eine Harnwegsinfektion definitionsgemäß, wenn sie während eines Krankenhausaufenthalts ab dem dritten Tag des Aufenthalts erworben wurde (58). Die beiden Gruppen unterscheiden sich teilweise bezüglich ihres Erregerspektrums. Daher ist die Unterscheidung auch für die kalkulierte Therapie der Infektion relevant. Häufigste Erreger der sowohl komplizierten als auch unkomplizierten Harnwegsinfektionen sind uropathogene *E. coli*-Stämme (UPEC). Weitere häufige Erreger sind Klebsiellen, Enterokokken, sowie bei unkomplizierten Harnwegsinfekten *Staphylococcus saprophyticus* (30) (Abbildung 2).



Nature Reviews | Microbiology

Abbildung 2: Erreger unkomplizierter und komplizierter Harnwegsinfektionen. Abbildung nach (30).

Von den pathogenen Erregern eines symptomatischen Harnwegsinfektes sind die bakteriellen Mikroorganismen bei einer asymptomatischen Bakteriurie zu unterscheiden. Dabei handelt es sich ebenfalls um eine bakterielle Kolonisierung der Harnblase, die jedoch keine Krankheitszeichen hervorruft. Auch dort ist *E. coli* häufigster Erreger, daneben werden jedoch auch andere Bakterien wie *P. mirabilis* oder *Enterobacter cloacae* gefunden (60).

1.1.1 Katheterassoziierte Harnwegsinfektionen

95 % aller nosokomialen Harnwegsinfektionen werden der Verwendung von Harnwegskathetern zugerechnet (28). 12 – 16 % aller erwachsenen hospitalisierten Patienten erhalten einen Harnwegskatheter. Das Risiko einer Infektion steigt pro Tag mit Harnwegskatheter um 3 – 7 % (13). Die Indikationen für den Einsatz eines Harnwegskatheters sind vielfältig. Mögliche Gründe für einen Harnwegskatheter sind ein akuter Harnverhalt oder Blasenabflussstörung, die Notwendigkeit einer genauen Flüssigkeitsbilanzierung bei kritisch kranken Patienten, perioperative Anlage bei bestimmten operativen Eingriffen, verlängerte Immobilisation oder zur Verbesserung der Lebensumstände in Palliativsituationen (33). Mögliche Alternativen – sofern keine Abflussstörung besteht – sind externe Katheter (vor allem bei männlichen Patienten), intermittierende Katheterisierung oder ein suprapubischer Katheter. Die Vorteile eines suprapubischen Katheters sind jedoch nicht hinreichend untersucht (33).

1.2 *Escherichia coli* (*E. coli*)

E. coli, als eines der häufigsten Bakterien, die Harnwegsinfekte auslösen können, wurde erstmals 1885 als ein Bakterium der menschlichen Darmflora in Form eines Gram-negativen Stäbchens beschrieben (29). Es gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae* und ist ein fakultativ anaerobes Bakterium. *E. coli* gehört zur kommensalen Flora des menschlichen Darms, jedoch können einzelne Stämme fakultativ oder obligat pathogen sein. Die drei Hauptsymptome, die von pathogenen *E. coli* verursacht werden können, sind durchfallartige Erkrankungen, Harnwegsinfektionen und Sepsis/Meningitis (43). Die Auslöser intestinaler Erkrankungen werden weiter eingeteilt in enteropathogene *E. coli* (EPEC), enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC), enterotoxische *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC) und diffus adhärente *E. coli* (DAEC) (43). Unter den extraintestinal pathogenen *E. coli* (ExPEC) sind die uropathogenen *E. coli* (UPEC) die häufigsten Vertreter, gefolgt von den häufig bei Neugeborenen auftretenden Meningitis-assoziierten *E. coli* (MNEC) (43). Virulenzfaktoren ermöglichen es *E. coli* in bestimmten Nischen, sich besser an ihre Umgebung anzupassen. Im Folgenden wird insbesondere auf die für die Biofilmbildung relevanten Virulenzfaktoren uropathogener *E. coli* eingegangen.

1.2.1 Adhäsine und Fimbrien

Von großer Bedeutung für die Virulenz von *E. coli* sind Adhäsine, die eine Anheftung von *E. coli* an Zellen und abiotische Materialien ermöglichen. Zudem beeinflussen Adhäsine die Auslösung einer körpereigenen Entzündungsreaktion. Adhäsine werden in Fimbrien- und Nicht-Fimbrien-Adhäsine unterschieden. Fimbrien-Adhäsine befinden sich an der Spitze bakterieller Fimbrien, während Nicht-Fimbrien-Adhäsine direkt auf der Oberfläche des Bakteriums sitzen.

Die beiden wichtigsten Fimbrien-Adhäsine uropathogener *E. coli* sind PapG und SfaS. PapG sitzt an der Spitze von P-Fimbrien. PapG bindet an alpha-D-Gal-(1-4)-beta-D-Gal-Reste, welches dem Blutgruppenmerkmal P und Glykolipiden der Globoserie zugeordnet sind. Dadurch vermitteln sie die Bindung u.a. an menschliche Erythrozyten (3). Auch die Globoserie-vermittelte Bindung an Urothel durch PapG ist beschrieben (47), wo PapG zur Entstehung der Pyelonephritis beiträgt (26). SfaS ist ein weiteres Adhäsine, welches an der Spitze von S-Fimbrien sitzt. Dieses wiederum trägt seinen Namen auf Grund der Bindung an Sialyl-Galaktoside (42). Es bindet an alpha-Sialyl-(2-3)-beta-Gal-haltige Strukturen. Dieses findet sich ebenfalls an menschlichen Erythrozyten (3), aber auch in Membranen von Uroepithelzellen. Beim Menschen sind

die S-Fimbrien jedoch eher mit einer Meningitis und Sepsis assoziiert, als mit einem Harnwegsinfekt (42). Die ähnlichen F1C-Fimbrien binden mit ihren Adhäsinen nicht an Blutzellen oder Urothel, vermitteln jedoch eine Bindung an Nierengewebe (42). Des Weiteren existieren nicht an Fimbrien gebundene Adhäsine (AFA = afimbrial adhesins). Durch Interaktion mit Zellen des menschlichen Organismus verursachen die aufgeführten Adhäsine eine Entzündungsreaktion, die sich beispielsweise in einer Harnwegsinfektion äußert. *E. coli* Stämme, die bestimmte Adhäsine nicht aufweisen, verursachen entsprechend auch keine Infektionen, sondern eine sogenannte asymptomatische Bakteriurie (7).

Weitere Fimbrien tragen zur Pathogenität von *E. coli* bei: Typ 1-Fimbrien werden von über 90 % der kommensalen und uropathogenen *E. coli* exprimiert. Damit sind sie kein Indikator für einen pathogenen Stamm (78). Dennoch können sie pathogene Eigenschaften vermitteln. Sie vermitteln ebenfalls eine Adhäsion von Bakterien an Erythrozyten, Epithelzellen, Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen. Ein Beitrag zur Entwicklung schwerer Harnwegsinfekte wurde nachgewiesen (17). Ebenso konnte gezeigt werden, dass Typ 1-Fimbrien im Gegensatz beispielsweise zu P-Fimbrien zur Internalisation und damit intrazellulären Persistenz von *E. coli* beitragen (52). Curli gehören ebenfalls zu den Fimbrien und sind neben Cellulose und weiteren Proteinen größter Bestandteil der extrazellulären Matrix vieler *Enterobacteriaceae*. Die Proteinfasern sind an vielfältigen Prozessen beteiligt, u.a. an der Oberflächenadhäsion, Zellaggregation und Biofilmbildung (6). Amyloide wurden als Bestandteil der Curli nachgewiesen (18).

Flagellen sind im Gegensatz zu Fimbrien dicker, länger und für die Beweglichkeit von Bakterien verantwortlich. Die Rolle bei der Entwicklung von Harnwegsinfektionen ist noch nicht vollständig geklärt. Es konnte gezeigt werden, dass sie für die Entwicklung eines Harnwegsinfektes nicht nötig sind, jedoch bei der Competition mit anderen Bakterien einen Überlebensvorteil darstellen (69). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Flagellen bei der Wanderung von Bakterien über Harnröhre und Harnleiter zu den Nieren besonders stark exprimiert werden und somit eine bedeutende Rolle bei aufsteigenden Harnwegsinfektionen spielen (46).

1.2.2 Autotransporter

Der Autotransporter Ag43 ist ein Membranprotein der äußeren Zellmembran von *E. coli*. Er trägt zur Anheftung von *E. coli* sowohl an Oberflächen, als auch zur Autoaggregation bakterieller Zellen bei (22) und ist damit ein wichtiger Bestandteil der Biofilmbildung.

1.2.3 Lipopolysaccharide

Lipopolysaccharide sind Verbindungen aus Zucker und fettähnlichen Bestandteilen. Sie finden sich an den Außenmembranen von Bakterien und sind im menschlichen Körper Auslöser einer Entzündungsreaktion. Es konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von Lipopolysacchariden zu einer verstärkten Biofilmbildung und Zellanheftung von *E. coli* führt (57), was Nakao et al. zu der Vermutung führte, dass weniger virulente Stämme stattdessen vermehrt in der Lage sein könnten, Biofilme – beispielsweise an Urinkathetern – zu bilden (57).

1.2.4 Biofilmbildung

Unter einem Biofilm versteht man eine komplexe, aus mehreren Zellen bestehende bakterielle Gemeinschaft aus einer oder mehreren Spezies. Biofilm zeichnet sich dabei besonders durch eine extrazelluläre Matrix aus Proteinen und Polysacchariden aus (70). Wichtige Faktoren für die Biofilmbildung bei *E. coli* sind u.a. Flagellen, Fimbrien, Curli, Autotransporter, und oberflächenassoziierte Polysaccharide (25). Biofilm führt zu einer höheren Resistenz gegen pH-Schwankungen, Sauerstoffradikale, Nährstoffveränderungen und antimikrobielle Substanzen (19). Zudem scheint der horizontale Gentransfer, u.a. zur Übertragung von Resistenzen, im Biofilm verstärkt im Vergleich zum planktonischen Wachstum stattzufinden (36,64). Grundsätzlich erfolgt die Biofilmbildung in drei Stadien (Abbildung 3): Anheftung, Reifung und Auflösung (64). Zunächst findet mit Hilfe von Flagellen und Fimbrien die reversible Anheftung an eine Oberfläche statt. Durch Bildung einer extrazellulären Matrix wird die Bakterienansammlung irreversibel an die Oberfläche angeheftet. Anschließend setzen sich weitere Bakterienzellen auf dieser ersten Schicht ab und führen zu einem Wachstum des Biofilms. Kanäle zwischen den Zellen ermöglichen die Versorgung mit Nährstoffen. Grund für eine anschließende Auflösung des Biofilms kann beispielsweise ein Mangel an Nährstoffen sein, wobei die Auflösung ganz oder in Teilen stattfinden kann.

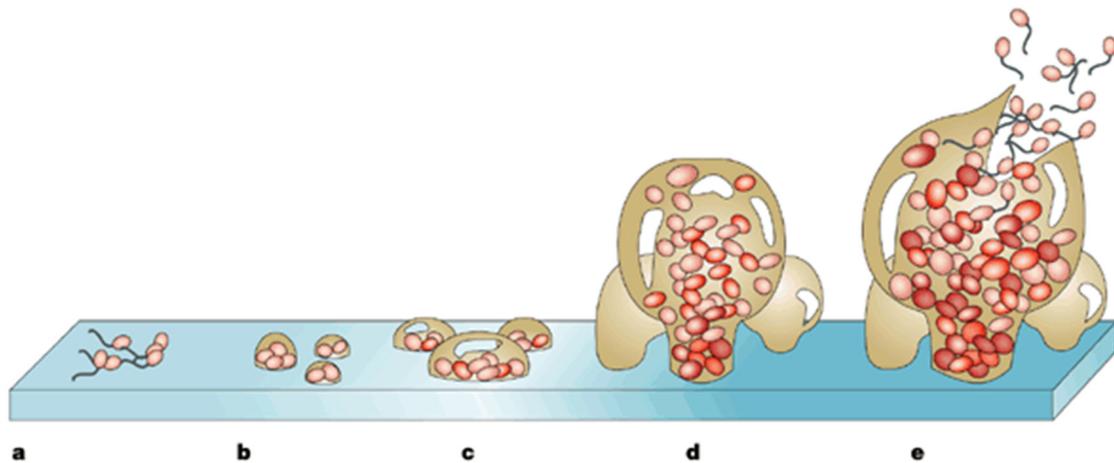


Abbildung 3: Schematische Darstellung der verschiedenen Stadien der bakteriellen Biofilmbildung. Nach der reversiblen Anheftung planktonischer Zellen an eine Oberfläche (a) erfolgt die Produktion extrazellulärer Matrix (b), die zu einer irreversiblen Anheftung führt (c). Nach dem weiteren Wachstum (d) kann eine Auflösung (e) des Biofilms stehen. Abbildung aus (24).

Eine besondere Bedeutung findet die Biofilmbildung beim längerfristigen Einsatz von Medizinprodukten, beispielsweise Kathetern und Implantaten (62). An Urinkathetern können sich Biofilme sowohl an der Innen- als auch Außenseite des Katheters bilden (27). Mit jedem Tag Verweildauer eines Harnwegskatheters erhöht sich außerdem die Wahrscheinlichkeit einer Harnwegsinfektion um 3-7 % (62).

Eine Unterform des Biofilms sind intrazelluläre bakterielle Gemeinschaften, die im englischen Sprachraum als Intracellular Bacterial Communities (IBC) bezeichnet werden (2). Durch Internalisierung von *E. coli* in Blasenepithelzellen scheinen diese der angeborenen Immunabwehr zu entkommen (56) und sich anschließend in den Epithelzellen zu organisieren (1). Auch eine Entdeckung des Erregers in Urinkulturen ist damit unwahrscheinlicher (68).

1.2.5 Extrazelluläre Polysaccharide

Polysaccharide sind Bestandteil der extrazellulären Biofilmmatrix. Beispielsweise bildet Cellulose zusammen mit Curli ein hydrophobes Netzwerk, welches eine enge Verbindung der Zellen innerhalb des Biofilms ermöglicht (79). Das Polysaccharid β -1,6-N-Acetyl-D-Glucosamin (PGA) wird in Kapitel 1.3 näher beschrieben.

1.3 β -1,6-N-Acetyl-D-Glucosamin (PGA)

Für *S. aureus* und *S. epidermidis* wurde im letzten Jahrhundert ein Polysaccharid zur interzellulären Adhäsion beschrieben (20,37,51), welches als β -1,6-verbundenes Glucosaminoglykan zur Biofilmbildung von Bakterienstämmen beiträgt. Dieses Polysaccharid β -1,6-N-Acetyl-D-Glucosamin wurde, kodiert vom Genlokus *pgaABCD*, bei *E. coli* als ein Bestandteil der Biofilmmatrix entdeckt (77). Es konnte gezeigt werden, dass alle vier kodierten Genprodukte für die Funktion von PGA erforderlich sind (Abbildung 4). PgaA und PgaB sind für den Export von PGA aus der Zelle heraus nötig, während PgaC und PgaD als zytoplasmatische Membranproteine zur Synthese von PGA beschrieben wurden (40).

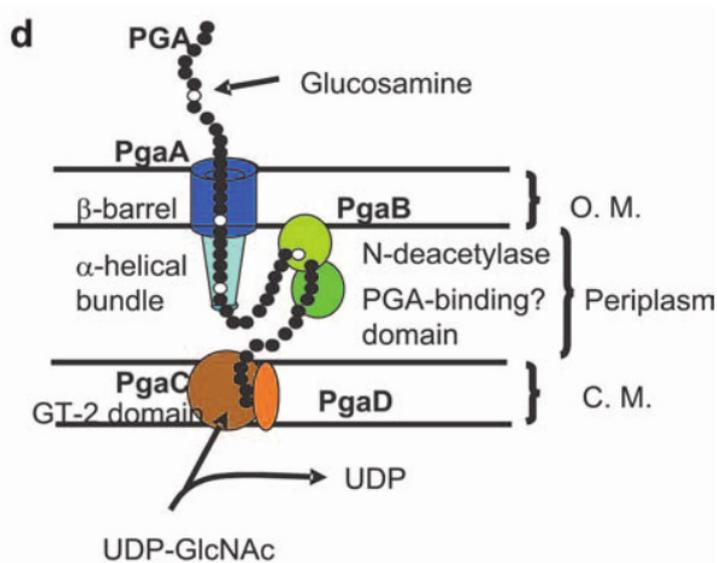


Abbildung 4: Schematische Darstellung der an der PGA-Synthese beteiligten Proteine bei *E. coli*. O.M. = äußere Zellmembran, C.M. = zytoplasmatische Zellmembran; PgaA und PgaB tragen zum Export des Polysaccharids PGA bei, während PgaC und PgaD an dessen Synthese beteiligt sind. Abbildung aus (40).

1.3.1 PGA-Regulation

Das Polysaccharid β -1,6-N-Acetyl-D-Glucosamin wird durch das Operon *pgaABCD*, bestehend aus einem gemeinsamen Promotor und den Genabschnitten *pgaA*, *pgaB*, *pgaC* und *pgaD* im Genom von *E. coli* kodiert. Dieses Operon unterliegt einer Regulation durch verschiedene Signalwege. Daraus lassen sich bereits Einflussgrößen auf die Transkription und Translation von PGA ableiten. Eine Übersicht über die verschiedenen Einflussgrößen ist in Abbildung 5 dargestellt. Diese sollen im Folgenden näher erläutert werden.

Eine wichtige Rolle für die Regulation der PGA-Expression durch Veränderung von Kationenkonzentrationen spielt das Cation-Responsive Protein *NhaR*. Dieses Protein fördert die

Transkription des *pgaABCD*-Operons (32). Goller et al. konnten einen fördernden Effekt von Natriumchlorid (NaCl) und Lithiumchlorid (LiCl) auf die PGA-Synthese nachweisen. Auch ein alkalischer pH-Wert wirkte sich positiv auf die PGA-Synthese aus. Kaliumchlorid und Magnesiumchlorid führten ebenfalls zu einer gesteigerten PGA-Synthese. Kein Effekt konnte durch Kalziumchlorid (CaCl₂) und Glukose gezeigt werden. Auch Effekte der Kationen Natrium (N⁺), Kalium (K⁺) und Lithium (Li⁺) konnten nur *in vivo*, nicht aber *in vitro* nachgewiesen werden (32). Festzuhalten bleibt, dass die erhöhte PGA-Produktion unter erhöhten Kationen-Konzentrationen zu einer vermehrten Biofilmbildung und damit zum Schutz von *E. coli* unter diesen Bedingungen beiträgt.

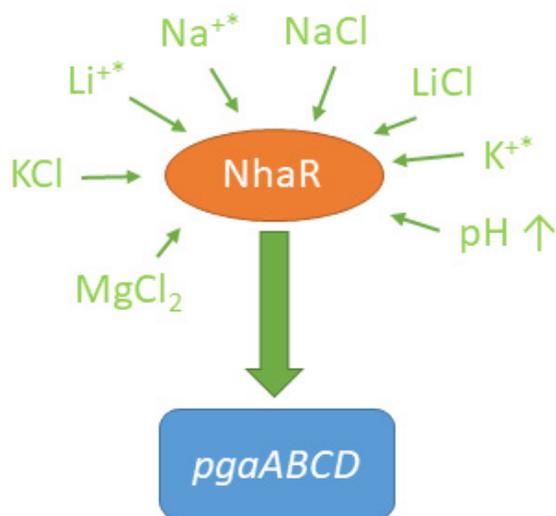


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Stimuli, welche die Aktivierung der PGA Expression durch das Cation-responsive proteins NhaR fördern. Einwertige Kationen fördern über NhaR die Expression von PGA. Bei mit (*) gekennzeichnete Kationen konnte ein Effekt lediglich *in vivo*, nicht jedoch *in vitro* nachgewiesen werden.

Ein weiterer Einflussfaktor auf die PGA-Expression ist die Diguanylatzyklase (DGC) YddV. Die Aktivierung dieses Enzyms führt zu einer verstärkten Produktion von PGA (72). In anderen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass YddV einen positiven Einfluss auf die Biofilmbildung von *E. coli* durch vermehrte Curli-Bildung ausübt. Dabei wurde ebenfalls festgestellt, dass verringerte Umgebungstemperaturen und das Eintreten von *E. coli* in die stationäre Phase zu einer vermehrten YddV-Expression führen (73). Somit kann angenommen werden, dass diese Bedingungen über die Aktivierung von YddV ebenfalls zu einer vermehrten Expression von PGA führen.

1.3.2 Der Carbon Storage Regulator A (CsrA) als Einflussfaktor der PGA-Translation

Eine wichtige Rolle bei der Anpassung an Umgebungsbedingungen spielt der sogenannte Carbon Storage Regulator (Csr). Das Csr System vermittelt vielfältige Effekte auf den Bakterienstoffwechsel bei veränderten Nährstoffumgebungen. Ein Effekt von CsrA, einem Bestandteil des Csr Systems, besteht in einer Bindung der mRNA von *pgaA*. CsrA konkurriert mit der 30S-Ribosomen-Untereinheit, dadurch wird die Translation des *pgaA* Transkriptes gehemmt. Auf diese Weise kann über CsrA die Biofilmbildung von *E. coli* beeinflusst werden (76). Des Weiteren passt CsrA die Energiegewinnung der Bakterien an: Bei Aktivierung von CsrA kommt es zu einer Aktivierung der Glykolyse sowie einer Repression der Gluconeogenese (66). CsrA selbst wird durch die kleine regulatorische RNA CsrB in seiner Funktion gehemmt. Im Sinne einer Autoregulation fördert CsrA wiederum die Produktion von CsrB. Hauptregulator von CsrB ist das BarA/UvrY Zwei-Komponenten-System. Dieses Zwei-Komponenten-System kontrolliert die Expression von CsrB. Die Induktion von CsrB führt zu einer Hemmung von CsrA (71) und somit zu einer verminderten Hemmung der *pgaABCD*-Expression. Dabei aktiviert BarA die zweite Komponente UvrY durch Phosphorylierung. Zusammengefasst fördert eine Aktivierung des BarA/UvrY-Systems also die Expression von PGA. Diese Zusammenhänge werden in Abbildung 6 grafisch dargestellt.

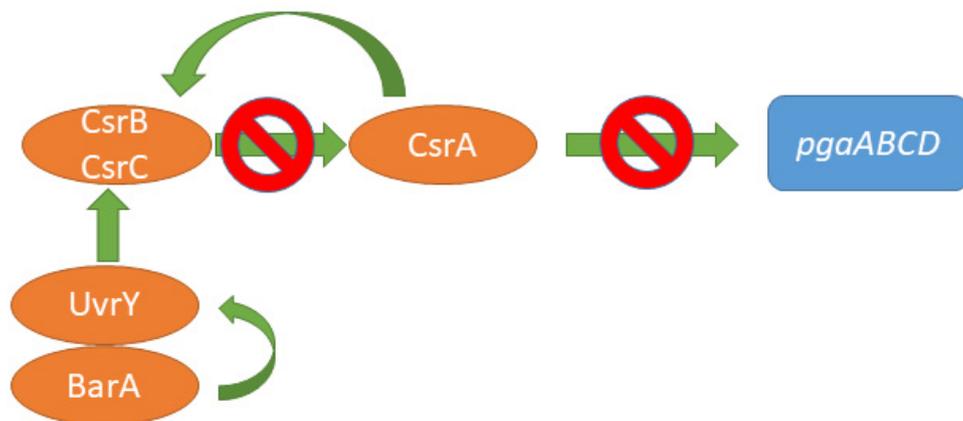


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Beeinflussung der PGA Expression durch das Zwei-Komponenten-System BarA/UvrY.

Auf das Zwei-Komponenten-System BarA/UvrY nehmen verschiedene Umweltbedingungen Einfluss. Es ist bekannt, dass ein pH-Wert kleiner 5,5 zu einer Inaktivierung des Systems führt (55) und somit die PGA-Expression vermindert. Beim Nährstoffangebot konnte gezeigt werden, dass ein Überschuss an Aminosäuren zu einem Wachstumsvorteil einer *uvrY*-Mutante führte, während ein Glukose-Überschuss zum Wachstumsvorteil des Wildtyps führte (63).

Dieser Zusammenhang konnte in der gleichen Arbeit ebenfalls auf eine Verbindung zum Csr-System zurückgeführt werden, so dass darüber auch eine Beeinflussung der Biofilmbildung in Abhängigkeit des Nährmediums anzunehmen ist.

McaS ist eine small regulatory RNA (sRNA). McaS wird bei Glukosemangel vermehrt gebildet und führt zu einer vermehrten Expression von PGA (75). Es trägt somit zur Biofilmbildung in Energiemangelzuständen bei. Ob McaS direkt an das PGA-Operon bindet oder indirekt über CsrA wirkt, konnte bisher nicht gezeigt werden. Das Signalmolekül Guanosin-3',5'-bispyrophosphat (ppGpp) unterdrückt ebenfalls die Expression von PGA. Durch ribosomalen Stress, wie er von translationsinhibitorisch wirksamen Antibiotika erzeugt wird, führen subinhibitorische Antibiotikakonzentrationen zu einer durch *SpoT* vermittelten Repression von ppGpp, wodurch die PGA-Synthese gesteigert wird. Eine erhöhte PGA-Bildung konnte bereits unter Einsatz subinhibitorischer Konzentrationen von Erythromycin, Chloramphenicol, Tetracyclin und Streptomycin gezeigt werden (10).

1.4 Fragestellung und Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von Einflussfaktoren auf die Biofilmbildung von *E. coli* in Bezug auf katheterassoziierte Harnwegsinfektionen. Dazu sollten zunächst Einflussfaktoren auf die Biofilmbildung ausfindig gemacht werden, die in der besonderen Umgebung Harntrakt eine Rolle spielen. Dazu wurden verschiedene Urinbestandteile auf ihren Einfluss auf die Biofilmbildung getestet.

Als weiterer Einfluss auf die Biofilmbildung wurde das Modell zur Biofilmmessung betrachtet. Ziel dabei war es, die Biofilmbildung drei verschiedener Gruppen von *E. coli*-Stämmen unter Flussbedingungen zu untersuchen. Bei den Gruppen handelt es sich um klinische Isolate von Patienten mit katheterassoziierten Harnwegsinfekten (CAUTI), nicht-katheterassoziierten Harnwegsinfekten (UTI) sowie um Fäkalisolate gesunder Probanden (FI). Dabei wurde ein Vergleich zwischen den Medien M63 (Minimalmedium) und Sammelurin gezogen. Ähnliche Versuche wurden bereits unter statischen Bedingungen in einem Mikrotiterplatten-Modell für Biofilmbildung durchgeführt (48). In dieser Arbeit sollen allerdings zusätzlich die Scherbedingungen sowie der kontinuierliche Tausch des Mediums unter Ausschwemmung nicht biofilmbundener Bakterien simuliert werden, wie sie im menschlichen Harntrakt vermutlich vorkommen. Damit soll die Frage weiter geklärt werden, inwiefern die Biofilmbildung von *E. coli*

tatsächlich einen Selektionsvorteil uropathogener *E. coli*-Stämme (UPEC) bei katheterassoziierten Harnwegsinfektionen darstellt.

In einem weiteren Schritt wurde ein Modell zur Messung der Expression von poly- β -1,6-N-Acetylglucosamin, einem wichtigen Bestandteil der extrazellulären Matrix des *E. coli*-Biofilms, unter verschiedenen Wachstumsbedingungen konstruiert. Dazu wurde eine Plasmid-basierte Transkriptionsfusion aus einem promotorlosen Reporter gen und dem Promotor des *pgaABCD*-Operons im *E. coli*-Stamm UTI89 durchgeführt.

1.4.1 Modelle zur Biofilmmessung

Zur Messung von Biofilm existieren verschiedene Modelle. Bisher sind vor allem statische Modelle im Einsatz. Im Folgenden werden einige häufige Modelle (54) skizziert. Am weitesten verbreitet ist der Einsatz der Kristallviolett färbung von in Mikrotiterplatten angezogenem Biofilm. Nicht am Biofilm gebundener Farbstoff wird anschließend wieder ausgewaschen und die Biofilmmenge mittels Messung der optischen Dichte quantifiziert. Sie gilt als die am besten etablierte Variante der Biofilmmessung (21). Eine weitere Methode ist die Untersuchung von Biofilm mittels Phasen-Kontrast-Mikroskopie an einer Luft-Flüssigkeits-Grenze, alternativ die Abnahme des Biofilms an der Luft-Flüssigkeitsgrenze mittels Glasplatte und ebenfalls eine Einfärbung mit Kristallviolett (54). Die Anzucht von Biofilmen auf einer semipermeablen Membran, die auf eine Agarplatte aufgebracht ist, erlaubt einerseits die Verwendung wechselnder Medien durch Transfer der Membran auf andere Nährmedien. Andererseits herrscht eine Sondersituation, da der Biofilm dort weiter regelmäßig mit Nährstoffen versorgt wird und Stoffwechselprodukte entsorgen kann. Die Messung erfolgt beispielsweise durch Übertragung des Biofilms in PBS-Lösung und anschließendem Auszählen ausplattierter Verdünnungsreihen. Auch verschiedene Flussmodelle zur Biofilmmessung existieren. Die einfachste Variante ist ein Kadouri-System (54), bei dem durch an eine Pumpe angeschlossene feine Nadeln das Medium in einem Well ausgetauscht wird. Menzel et al. (53) beschrieben ein System, bei dem in waagrecht gelagerten Flusskammern verschiedene Materialien auf ihre Biofilmanheftung unter Austausch des Mediums getestet werden können. Die Materialien werden anschließend mit 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) gefärbt und unter einem Epifluoreszenzmikroskop ausgewertet. Das in dieser Arbeit verwendete System nach Ghigo ist in Kapitel 3.3 ausführlich beschrieben.

1.4.2 Prinzip von Reporterfusionen

Reporterfusionen basieren auf dem Prinzip, einen Genabschnitt mit einem Reportergen zu verbinden. Bei dem Genabschnitt kann es sich um einen Promotor oder ein Gen selbst handeln. Als Reportergene kommen beispielsweise Gene in Betracht, deren Genprodukte Fluoreszenz oder Lumineszenz vermitteln. Durch Rekombination (23) lassen sich Genfusionen leicht herstellen: Zunächst wird mittels Elektroporation ein Plasmid in das Bakterium eingebracht. Dieses Plasmid enthält Rekombinationsenzyme. Das einzubringende Gen wird mittels PCR vervielfältigt. Die dabei verwendeten Primer enthalten eine Homologie-Region mit angrenzenden Sequenzen des Genlokus, an dem das Reportergen in das Bakterium eingebracht werden soll. Die PCR-Produkte werden ebenfalls durch Elektroporation in das Bakterium eingebracht. Durch Aktivierung der Rekombinationsenzyme erfolgt der Einbau des Reportergens über orts-spezifische Rekombination ins Genom. Eine über die PCR-Primer eingebrachte Verbindungsregion (linker sequence) verbindet das zu fusionierende Gen des Bakteriums und das Reportergen.

2. Material

2.1 Chemikalien, Geräte & Verbrauchsmaterial

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (München), Merck (Darmstadt) und AppliChem (Darmstadt) bezogen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller, Ort
Alpha-Photo-Imager	Alpha Innotech, Biozym, Oldendorf
Autoklav	Systemec, Wetzlar
Brutschrank	Thermo Scientific Heratherm, Waltham
Gelelektrophoreseeinheit	Comphor Midi, Biozym, Hessisch Oldendorf
Heizplatte	Heidolph, Schwabach
Kühlschrank	Liebherr profiline, Liebherr, Bulle, Schweiz
Magnetrührer	MR 3001, Heidolph Instruments, Schwabach
Mikrowaage	Explorer, OHAUS, Nänikon, Schweiz
Photoimager	ChemiDoc XRS, Biorad, München
Pipetten	Research plus, Eppendorf, Hamburg
ProtoCOL 2	Synbiosis, Cambridge
Schüttler	Mixing Block MB-102, Biozym, Oldendorf
Schüttelinkubator	Multitron, Infors AG, Bottmingen

Spannungsgerät	Consort E 143, Biozym, Oldendorf
Spektrometer, Ultraspec 2100	GE Healthcare Life Science, Freiburg
Sterilisator UV-Licht	U-1000 Ultraviolett, Crosslinker UVP, Upland, Kanada
Tecan-Reader Infinite 200 PRO	Tecan Männedorf, Schweiz
Thermocycler	Whatman, Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge	Zentrifuge 5424 R, Eppendorf, Hamburg
Vakuumpumpe	Vakuubrand, Wertheim
Vortex	Scientific Industries, New York
Waage	Kern 440, Kern & Sohn GmbH, Balingen
Sterile Werkbank	Steril Gard, Baker Company, Class II, Typ A/B3, Sanford
Zentrifuge	Hettich Lab Technology, Tuttlingen

2.2 Nähr- und Selektivmedien

M63 Flüssigmedium

5 x M63-Salze: 10 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 68 g KH_2PO_4
 ad 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$

Für das einfache M63-Flüssigmedium (Gesamtvolumen 1 l) werden folgende Komponenten zusammengegeben:

200 ml 5 x M63-Salze
 1000 µl FeSO_4 (1 ‰)
 1000 µl $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ (10 ‰)
 250 µl Thiamin (2 ‰)
 20 ml Glucose (20 ‰)
 100 ml Casaminosäuren (10 ‰)

6,5 ml 10 M KOH

Ggf. weitere Zugabe von KOH, um pH = 7 zu titrieren.

Bei Experimenten mit *E. coli* UTI89 wurde dem Medium teilweise 10 µg/ml Niacin zugegeben, da für diesen Stamm eine Auxotrophie beschrieben ist (49).

Reduziertes M63 Flüssigmedium (M63r)

200 ml 5x M63-Salze

250 µl Thiamin (2 %)

20 ml Glucose (20 %)

100 ml Casaminosäuren (10 %)

Bei Experimenten mit *E. coli* UTI89 wurde dem Medium teilweise 10 µg/ml Niacin zugegeben, da für diesen Stamm eine Auxotrophie beschrieben ist (49).

LB-Medium

5 g NaCl

5 g Hefeextrakt

10 g Trypton

H₂O ad 1.000 ml

LB-Agarplatten

5 g NaCl

5 g Hefeextrakt

10 g Trypton

15 g Agar

H₂O ad 1.000 ml

dYT-Medium

16 g Trypton

10 g Hefeextrakt

5 g NaCl

H₂O ad 1.000 ml

Artificial Urine Medium (Brooks & Kevil, 1996)

1 g	Peptone L37
0,005 g	Hefeextrakt
0,1 g	Milchsäure
0,4 g	Zitronensäure
2,1 g	Natriumbikarbonat
10 g	Harnstoff
0,07 g	Harnsäure
0,8 g	Kreatinin
0,37 g	CaCl ₂ x 2 H ₂ O
5,2 g	NaCl
0,0012 g	Eisen(II)sulfat x H ₂ O
0,49 g	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
3,2 g	Natriumsulfat x 10 H ₂ O
0,95 g	Kaliumdihydrogenphosphat
1,2 g	Dikaliumhydrogenphosphat
1,3 g	Ammoniumchlorid
ad 1 l	H ₂ O _{dest.}

pH mit HCl auf 6,5 einstellen. Steril filtrieren.

5x M9-Salze

60 g	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
15 g	KH ₂ PO ₄
2,3 g	NaCl
5 g	NH ₄ Cl

M9-Medium mit Pyruvat

730 ml	steriles, bidest. H ₂ O
200 ml	5x M9 Salze
30 ml	10 % Casaminosäuren
40 ml	5 % Natriumpyruvat (Stammlösung bei 4°C aufbewahren, nicht länger als 3 Tage verwenden)
2 ml	1 M MgSO ₄
1 ml	0,1 M CaCl ₂

10 µl 2 % Thiamin

Die Komponenten werden in der oben angegebenen Reihenfolge steril zusammengegeben. Unmittelbar nach der Zugabe von CaCl₂ wird das Medium gut geschüttelt.

20 g Difco-Agar und 770 ml bidest. H₂O werden autoklaviert. Währenddessen werden 2,1 g Natriumpyruvat abgewogen, in 210 ml 5 x M9-Salze gelöst, und sterilfiltriert. Nach dem Autoklavieren und Abkühlung auf ca. 65°C werden die verschiedenen Zusätze in der oben beschriebenen Reihenfolge zugegeben und die Agarplatten gegossen.

Verwendete Antibiotika-Konzentrationen

Die Konzentrationen der Stammlösungen folgen den Angaben der Hersteller und sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Abweichungen von den Arbeitskonzentrationen sind bei den einzelnen Methoden angegeben.

Tabelle 2: Verwendete Antibiotika-Konzentrationen

Name	Konzentration Stammlösung	Arbeitskonzentration Agar	Arbeitskonzentration Flüssigmedium
Chloramphenicol	25 mg/ml	25 µg/ml	25 µg/ml
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml
Tetracyclin		10 µg/ml	5 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml	12,5 µg/ml 25 µg/ml	

2.3 Verwendete Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme wurden in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Isolat	Referenz
UTI89	UPEC, O18:K1:H7	Chen et al., 2006 (15)
UTI89ΔpgaABCD	pgaABCD Deletionsmutante des UPEC Isolates UTI89	Stammsammlung des Instituts für Hygiene, Münster

K-12 Stamm MG1655	Laborsicherheitsstamm	Blattner et al., 1997 (9)
DH5α	<i>F-</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , $\Delta(\textit{argF-lac})$ U169, λ -, $\phi 80\textit{lacZ}\Delta\textit{M15}$	Bethesda Research Laboratories, 1986 (8)
F01-F11	Fäkalisolate gesunder Pro- banden	C. Svanborg (Lund, Schweden)
U01-U11	UPEC-Isolate von Harn- wegsinfektionen bei Pati- enten ohne Harnwegska- theter	Stammsammlung des Instituts für Hygiene, Münster
C01-C11	UPEC-Isolate von Harn- wegsinfektionen bei Pati- enten mit Harnwegskathe- ter (CAUTI)	Stammsammlung des Instituts für Hygiene, Münster

2.4 Puffer und Lösungen

10 x PBS

80 g	NaCl
14,4 g	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
2 g	KCl
2g	KH ₂ PO ₄
ad 800 ml	H ₂ O _{dest.} , Einstellung des pH auf 7,4 mit HCl
ad 1 l	H ₂ O _{dest.}

50 x TAE-Puffer

242 g	Tris base
57,1 ml	Eisessig
100 ml	0,5 M EDTA (pH 8,0)

Ethanol/Na-Acetat-Lösung

1,5 µl	3M Na-Acetat, pH 4,6
31,25 µl	96 % Ethanol
7,25 µl	HPLC-Wasser

Agarose-Gel 1 %

0,5 g	Agarose
50 ml	1 x TAE-Puffer

In der Mikrowelle kurz aufkochen, abkühlen lassen und in Gelkammer gießen.

2.5 Primer

Alle Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich, Taufkirchen, bezogen und gemäß Herstellerangaben mit destilliertem Wasser in einer Konzentration von 100 µM gelöst (Tabelle 4). Zur Verwendung wurden 10 µM Stocks angelegt und bei -20 °C aufbewahrt.

Tabelle 4: Verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz	Amplikon [bp]_mit Primer
PS1	CTGTAATTAGATATAGAGAGAGATTTTGGCAATAC ATGGAGTAATACAGGATGGTGAGCAAGGGCGAGG	2512_PS2
PS2	ACTCACCAGCATCAGGATATATTTATTTCCATTACG TAACATATTTATCCAGGAAACAGCTATGACCATG	2512_PS1
PS3	CCCACAAACAATACCGATGA	590_PST7
PS4	CGTCTTCAACGTTATGCCATG	379_MBP5
PS5	GTGACAGAGAACACAACCTTATACGTTGAATTGAT ATGACATTCAGATTTCTAGAAATAGTGAGCAAGGG CGAGGAGC	2518_PS2
PS7	CTATGAAAATAGCTGGGAGC	310_PST7
PS8	AGGGGCATTCGTTTCTCTCA	504_PS9
PS9	CGCTAAATTGTCCATCGGCA	504_PS8
PS10	GCCAGTAATAACCCGTCAGC	486_PS11
PS11	CCTGACGACAATATGGGCCT	486_PS10

PST7	GCTGAACTTGTGGCCGTTTA	
MBP5	GGATGAATGGCAGAAATTCG	
csrA51-Del-M15-up	CGTAAATGCCCCGAAGGAAGTTTCTGTTCAC- CGTGAAGAGATCTACCAGCGTATCTAAGTG- TAGGCTGGAGCTGCTTC	2186_ csrA-Del-M15-rev
csrA-Del-M15-rev	AGAGAAATTTTGAGGGTTCGTCTCACCGATAAA- GATGAGACGCGGAAAGATTACATATGAA- TATCCTCCTTAGTTC	
csrA-Prom-Seq	ACCTGCAGCGTTAGCCAGT	737_ NR134csrA-ctrl-as (WT); 2187_ csrA-ctrl-as (csrA51)
csrA-ctrl-as	TGCGTGGCGCACATATTAC	737_ csrA-Prom-Seq (WT); 2187_ csrA-Prom-Seq (csrA51)
pKD4-ctrl-up	CCCTTGTCAGATAGCCCAG	643_ csrA-Prom-Seq
5' csrA-ctrl	AACGGTAGCCGAAGGTAAGG	Sequenzierprimer
csrA-Seq-rev	GCCGATATACACAACCTTCAACCTG	Sequenzierprimer
pKD4-ctrl-down	GCTTCGGAATCGTTTTCCG	Sequenzierprimer
3' csrA-ctrl	GGATGCAAATGGCGGTGAGG	Sequenzierprimer
pKD46-Seq1	ACGAGTATCGAGATGGCACA	Sequenzierprimer
pKD46-Seq2	ATGGCTCTTGATCTATC	Sequenzierprimer

Die Linker-Sequenz in PS5 (CTAGAAATA) wurde von Cabrera & Jin (12) für eine *rpoC-gfp*-Fusion beschrieben.

2.6 Verwendete Enzyme

Tabelle 5: Verwendete Enzyme

Bezeichnung	Hersteller	Funktion	Puffer
NcoI-HF	NEB	Restriktionsendo-nuklease	CutSmart
PvuI-HF	NEB	Restriktionsendo-nuklease	CutSmart
Phusion-Polymerase	NEB	Proof-reading-DNA-Polymerase	HF-Puffer
GoTaq	NEB	DNA-Polymerase	Im PCR Mastermix enthalten

2.7 Verwendete Plasmide

Tabelle 6: Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Funktion	Quelle
pKD46	Rekombinations-Plasmid, enthält Ampicillin-Resistenz-Kassette	Datsenko & Wanner, 2000 (23)
pRedET(tet)	Rekombinations-Plasmid, enthält Tetracyclin-Resistenz-Kassette	GeneBridges, Heidelberg
pMBMvenus	Yellow-Fluorescent-Protein (<i>yfp</i>) Venus, enthält Chloramphenicol-Resistenz-Kassette	Institut für Hygiene, Münster
pKD46::<i>csrA</i>	Rekombinations-Plasmid, enthält Ampicillin-Resistenz-Kassette und <i>csrA</i> -Gen	Institut für Hygiene, Münster

2.9 Biofilm-Mikrofermenter-Material

Tabelle 7: Biofilm-Mikrofermenter-Material

Bezeichnung	Funktion	Hersteller
Glasfermenter	Bebrütung von Bakterien zur Biofilm-Messung unter Flussbedingungen	Schmidt, Ilmenau
Glasspatel	Pyrex-Stab mit Glasplättchen (Fläche 18 cm ²) als Anheftungsfläche für Biofilm	Schmidt, Ilmenau
Tygon Pumpenschlauch mit drei Stoppfern	Medienzufuhr über Peristaltikpumpe	Saint-Gobain, Paris
BOLA Silikonring mit Stulpe, Einseitige Dichtung, PTFE	Abdichtung von Schraubverschlüssen	Bohlender GmbH, Grünsfeld
Ballonflasche mit Schraubverschluss	Vorratsbehälter für Medium bzw. Auffangbehälter für verbrauchtes Medium	Schott AG, Mitterteich
Schraubverbindungs-Kappen		
Belüftungsfiler Acro 50	Luftausgleich Medienflasche und Flüssigmüllflasche	Pall GmbH, Dreieich
Silikonschlauch 5mm Innendurchmesser		
Millipore Express® (PTFE) Membran, unsteril	Luftfilter für Luftzufuhr, Filter für verschlossenen Luftabfluss der Mikrofermenter	Merck Millipore, Darmstadt

2.10 Software

Daten wurden in Microsoft Excel gesammelt. Einfache graphische Auswertungen erfolgten mit Microsoft Excel. Statistische Testungen erfolgten mit IBM SPSS 24. Genomkarten und -vergleiche wurden mit CLC Workbench 6 bearbeitet.

3. Methoden

3.1 Stammhaltung und Bakterienanzucht

Die Anzucht der für die Versuche verwendeten Bakterien erfolgte durch Beimpfen einer LB-Agarplatte mittels Drei-Ösen-Ausstrich. Anschließend wurde die Agarplatte über Nacht bei 37 °C bebrütet. Die Lagerung der angezüchteten Bakterien erfolgte anschließend im Kühlschrank bei 5-7 °C. Für die Kultivierung der Bakterien in Flüssigmedien wurde zunächst eine Vorkultur angezogen. Dazu wurde eine Bakterienkolonie in 3 ml Nährmedium (i.d.R. LB-Medium) für 7 – 8 Stunden bei 37 °C und 180 Upm bebrütet. 20 µl der Vorkultur wurden anschließend in 3 ml frisches Medium überführt und als Übernachtskultur (ÜN-Kultur) ca. 16 Stunden bei 37 °C und 180 Upm bebrütet.

3.2 Sammelurin

Material:

- Plastiktrichter
- Autoklavierte/nicht-autoklavierte Flaschen
- Whatman 595 ½ Faltenfilter (Ø240 mm) *Ref.No.: 10311651*
- Stericup GP, Ø0,22 µm (Millipore Cat.No.: SCGPU05RE)

Von Männern und Frauen des Instituts für Hygiene wurde über 24 Stunden Mittelstrahlurin im Verhältnis Männer : Frauen etwa 1:1 gesammelt. Probanden, die aktuell oder vor der Spende Antibiotika einnahmen, wurden von der Sammlung ausgeschlossen. Der gesammelte Urin wurde mittels eines Faltenfilters vorfiltriert. Anschließend wurde der Urin mittels Millipore Stericup Filter sterilfiltriert. Die Aufbewahrung erfolgte für bis zu einer Woche bei 4 °C. Wurde der Urin nicht direkt benötigt, erfolgte die Aufbewahrung bei -80 °C.

3.3 Statische Biofilmmessung

Die zu testenden Stämme wurden über Nacht auf LB-Agar bei 37 °C angezüchtet. Je 3 ml LB-Medium wurden mit den zu testenden Stämmen beimpft und 7-8 h bei 37 °C und 180 Upm im Schüttler inkubiert. Je 20 µl dieser Vorkultur wurden anschließend in 3 ml des zu verwendenden Mediums (M63 oder Sammelurin) überimpft und 16 h über Nacht bei 37 °C und 180 Upm im Schüttler inkubiert. In eine PVC-Mikrotiterplatte wurden je Vertiefung 178 µl Medium (M63 oder Sammelurin) vorgelegt und mit je 2 µl der entsprechenden Übernachtskultur beimpft. Die

Mikrotiterplatte wurde dann für 48 h im Brutschrank bei 37 °C bebrütet. Nach der Inkubation wurde die Mikrotiterplatte dreimal mit je 200 µl PBS pro Vertiefung gewaschen und bei 80 °C für eine Stunde auf dem Heizblock getrocknet. Es folgte die Färbung des Biofilms mit 180 µl 0,1 % Kristallviolett. Nach einer Stunde wurde die Färbelösung verworfen, die Mikrotiterplatte dreimal mit H₂O_{dest} gewaschen und für eine Stunde bei 80 °C getrocknet. Anschließend wurde für 30 min je 200 µl Entfärbelösung (80 % Ethanol, 20 % Aceton) in jede Vertiefung gegeben. 100 µl der Entfärbelösung wurden dann in eine neue Mikrotiterplatte überführt und mittels ELISA-Reader die OD_{595 nm} gegen die reine Entfärbelösung als Referenz bestimmt.

3.4 Analyse der Biofilmbildung in Mikrofermentern

Das Prinzip der Mikrofermenter zu Messung von Biofilm unter Flussbedingungen wurde am Institut Pasteur (Paris) entwickelt. Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Glasteile wurden individuell durch die Glasbläserei Schmidt (Ilmenau) gefertigt.

3.4.1 Vorbereitung und Sterilisation der benötigten Komponenten

Verbindungsstücke, Adapter und Dichtungsringe wurden in einer Glasflasche mit dem Instrumenten-Programm des Autoklavs sterilisiert. Die Fermenter-Deckel, Medienzufuhr-Schläuche und Luftzufuhr-Schläuche wurden in Alufolie verpackt ebenfalls mit dem Instrumenten-Programm autoklaviert. 10 l-Medienflaschen, Glasspatel und Mikrofermenter wurden ebenfalls mit Alufolie verschlossen und mit dem Glasprogramm des Sterilofens für 2 Stunden bei 180 °C sterilisiert.

3.4.2 Aufbau der Mikrofermenter

In 10-Liter-Flaschen wurde M63-Medium oder Artificial Urine Medium (AUM) hergestellt. Die Inhaltsstoffe wurden entweder zuvor autoklaviert oder durch einen Stericup-Filter in die Flasche gefüllt. Je nach Anzahl der angeschlossenen Fermenter wurden vier Liter (für sechs Fermenter) oder sechs Liter (für neun Fermenter) hergestellt. Unter der sterilen Werkbank wurden die Medienzufuhr-Schläuche an die Mikrofermenter angeschlossen. Dabei wurden drei Fermenter mittels eines Kreuzstücks an einen Pumpenschlauch angeschlossen. Über Adapter und Y-Verbindungsstücke wurde der Schlauchdurchmesser auf 5 mm erweitert und die Medienzufuhr an die 10-Liter Medienflaschen angeschlossen. Die Sterilität des Mediums in den Medienflaschen wurde durch Filtrierung der nachströmenden Luft gesichert.

Die Beimpfung der Fermenter erfolgte mit einer Übernachtskultur. Für jeden Stamm und jedes verwendete Medium wurden drei biologische Replikate beimpft. Die Triplikate befanden sich in durch den gleichen Medienschlauch versorgten Fermentern. Bei Verwendung von M63 Medium wurden 250 µl Übernachtskultur, bei AUM wurden 500 µl Übernachtskultur zum Beimpfen verwendet. Nach dem Beimpfen wurden die Glasspatel (mit einer für die Biofilmbildung verfügbaren Oberfläche von 18 cm²) eingebracht, der Fermenter mit Dichtungsring und Deckel verschlossen und in ein auf 37 °C geheiztes Wasserbad verbracht. Dort wurden die Fermenter wie in Abbildung 7 dargestellt angeschlossen. Der vierte Ausgang wurde mit einem Luftfilter versehen und mit einer Klemme verschlossen, um das Austreten von Luft zu verhindern.

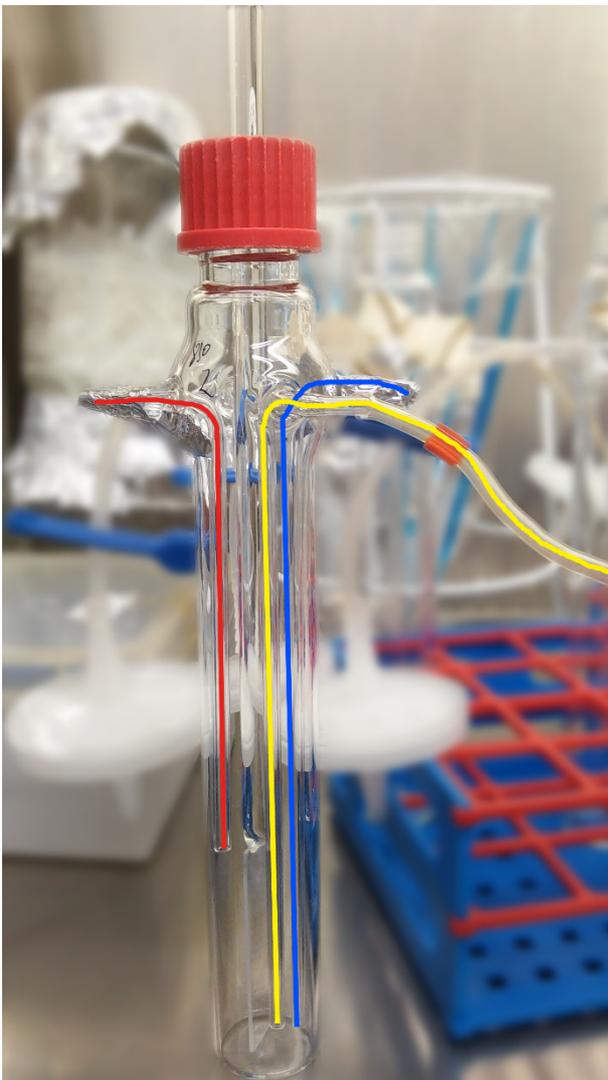


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Anschluss eines Mikrofermenters an die Ver- und Entsorgung mit Luft und Medium.

Gelb = Medienzufuhr, Blau = Luftzufuhr, Rot = Luft-/Medienabfluss

Die Luftzufuhr erfolgte mittels handelsüblicher Aquariumpumpen über einen Luftfilter und 6-Fachverteiler mit Verschlusshähnen, so dass ein gleichmäßiger Luftzufluss zu allen Fermentern eingestellt werden konnte. Der Medienabfluss erfolgte in einen 20-Liter-Behälter, dessen Deckel ebenfalls mit einem Luftfilter zur Reinigung der Abluft versehen war. Nach Anschluss wurden die Fermenter bis zur Höhe des Medienausflusses einzeln mit Medium befüllt. Für den Füllvorgang wurde die Luftzufuhr geschlossen. Anschließend wurden die Fermenter für zwei Stunden (M63) bzw. drei Stunden (AUM) ruhen gelassen, um ein Anwachsen der Kulturen zu ermöglichen. Zum Start der Flusskultur wurde zunächst ohne Medienzufuhr die Luftzufuhr gestartet und gleichmäßig eingestellt. Anschließend wurde der Medienzufuss mit einer Pumpenlauftrate von 40 ml/h gestartet, also 13,3 ml/h je Fermenter. Verbrauchtes Medium wurde durch die eingebrachte Luft in den Medienabfluss gedrückt. In diesem Zustand wurden die Fermenter für 48 Stunden belassen. Der generelle Versuchsaufbau ist in Abbildung 8 dargestellt.

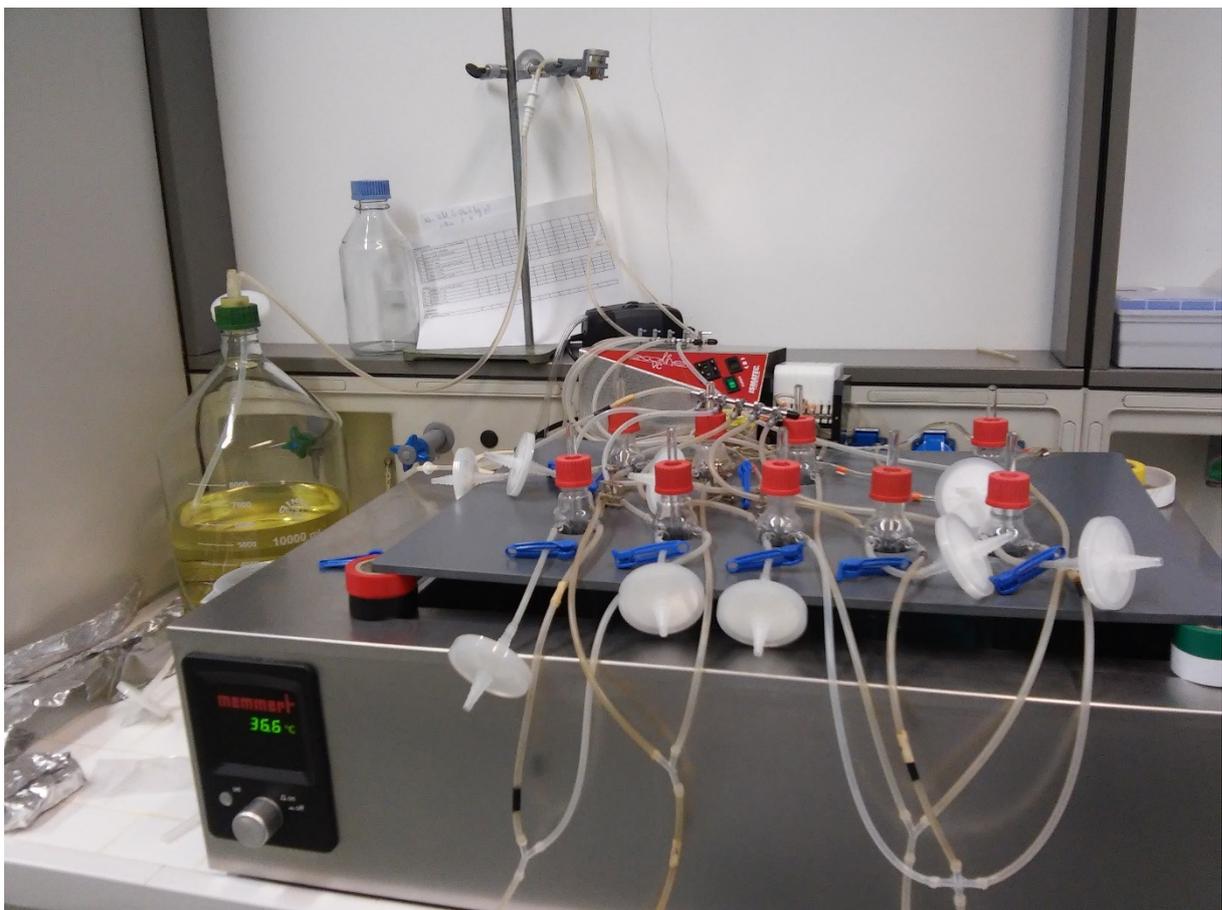


Abbildung 8: Aufbau der Versuchsapparatur zur Biofilmcharakterisierung in Mikrofermentern. Neun Mikrofermenter werden parallel im Wasserbad betrieben, die Medienzufuhr erfolgt aus einem 10-Liter-Gefäß über eine Rollenpumpe.

3.4.3 Abbau, Messung und Reinigung der Mikrofermenter

Nach 48 Stunden wurden Luft- und Medienzufuhr zu den Fermentern gestoppt. Die Medienzufuhr-Schläuche wurden mit Klemmen verschlossen, um einen Kulturfluss zwischen den Fermentern zu verhindern. Alle Anschlüsse der Fermenter wurden gelöst und die Fermenter unter eine sterile Werkbank verbracht. Dort wurden die Glasspatel für die Biofilmbildung entnommen und im Falcon-Röhrchen für zehn Sekunden in 15 ml PBS gevortext. Der gelöste Biofilm wurde anschließend in einer 1:10-Verdünnungsreihe bis auf zur Verdünnungsstufe von 10^{-5} verdünnt. Die Verdünnungsstufen 10^{-4} und 10^{-5} wurden auf LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Zur Auswertung wurden die gewachsenen Kolonien mittels eines ColonyCounters gezählt. Alle Teile der Mikrofermenter wurden über Nacht in eine 2 %ige GigeSept-Lösung eingelegt. Glasteile, die mit AUM in Kontakt waren, hatten häufig einen weißen Belag und wurden daher zuvor für einige Stunden in 5 %ige Essigsäure eingelegt. Am Folgetag wurden alle Bestandteile entweder von Hand oder in der Spülmaschine gereinigt.

3.5 Transformation und Klonierung

Zur Bestimmung der Expression des *pga*-Operons wurde in den *E. coli*-Stamm UT189 das Reporter-gen „venus“ (eine Variante des *yfp* = Yellow Fluorescent Protein) jeweils in Form einer Transkriptionsfusion und einer Translationsfusion (gekoppelt an *pgaA*) eingebracht. Die Integration des entsprechenden Genabschnitts wurde nach Datsenko & Wanner (23) vorgenommen.

3.5.1 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation (nach Sambrook (67), modifiziert)

Ein Milliliter einer *E. coli* UT189-Übernachtskultur in LB-Medium wird in 200 ml dYT-Medium gegeben und bis zu einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,35 – 0,4 gegen reines dYT-Medium als Referenz bei 37 °C/180 Upm im 1.000 ml Erlenmeyer-Kolben bebrütet. Bei Erreichen dieser optischen Dichte wird die Kultur unter gelegentlichem Schütteln für 20 Minuten auf Eis gekühlt. Anschließend erfolgt die Aliquotierung in vier 50 ml Falcon-Röhrchen. Diese werden mittels einer auf 4 °C gekühlten Zentrifuge 15 Minuten bei 2.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird abgossen und das Pellet in 20 ml eiskaltem $H_2O_{\text{dest.}}$ resuspendiert. Je zwei Falcon-Röhrchen werden zusammengeführt und erneut gekühlt 15 Minuten bei 2.000 x g zentrifugiert. Erneut wird der Überstand abgossen und die beiden Pellets je in 40 ml eiskaltem $H_2O_{\text{dest.}}$ resuspendiert und gekühlt 15 Minuten bei 2.000 x g zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes

werden die Pellets in je 40 ml eisgekühlten 10 %igem Glycerin resuspendiert und gekühlt 15 Minuten bei 2.000 x g zentrifugiert. Vorsichtig wird der Überstand erneut abgegossen (Pellet kann lose sein) und die Pellets je in 0,5 ml 10 %igem Glycerin resuspendiert, die Inhalte der beiden Falcon-Röhrchen werden zu 1 ml Gesamtvolumen gemischt. In einer 1 : 100 Verdünnung erfolgt die Bestimmung der OD_{600 nm} zu 10 %igem Glycerin als Referenz. Sofern abweichend, wird auf eine OD_{600 nm} von 0,4 – 0,6 verdünnt bzw. erneut zentrifugiert, um diese Konzentration zu erreichen. 80 µl werden testweise elektroporiert, der Rest kann als 80 µl-Aliquots in Stickstoff bzw. Ethanol-Trockeneis-Gemisch gefroren und anschließend bei -80 °C aufbewahrt werden.

80 µl elektrokompetenter Zellen wurden mit ca. 300 ng des eisgekühlten pRedET(tet)-Plasmids in eine in Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben und mit einem Puls elektroporiert. Anschließend erfolgte die Suspension in 1 ml dYT-Medium und Regeneration für eine Stunde bei 30 °C/180 Upm. Nach der Regenerationszeit wurde für fünf Minuten bei 3.000 Upm zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Pellet im noch verbleibenden Medium (ca. 100 µl) resuspendiert und auf LB-Agar mit 2,5 µl/ml Tetracyclin ausplattiert. Die Anzucht erfolgte über Nacht im 30 °C Brutschrank. Weitere 80 µl der elektrokompetenten *E. coli* UT189-Zellen wurden mit dem Plasmid pKD46 transformiert. Diese Zellen wurden auf LB-Agar mit Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert und ebenfalls über Nacht bei 30 °C im Brutschrank angezogen.

3.5.2 Plasmid-Präparation (NucleoSpin® Plasmid, Fa. Macherey-Nagel)

Die Präparation des *venus*-Plasmids erfolgte laut Anleitung des Herstellers (50) aus dem *E. coli* Stamm DH5α, der das Plasmid pMBMvenus trägt. Zwei Milliliter einer LB-Übernachtskultur von *E. coli* DH5α/pMBMvenus wurden für 30 s bei 11.000 x g in einem Eppendorf-Gefäß zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 250 µl Puffer A1 durch mehrfaches Mischen mit der Pipette resuspendiert. Anschließend wurden 250 µl Puffer A2 (SDS/alkaline Lyse) zugegeben. Das Eppendorf-Gefäß wurde 6 – 8 x zum Durchmischen gewendet (nicht Vortexen, um DNA-Brüche des Genoms zu vermeiden). Es folgte eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur, anschließend Zugabe von 300 µl Puffer A3 und vorsichtiges Mischen durch 6 – 8maliges Wenden der Eppendorf-Gefäße. Anschließend wurde fünf Minuten bei 11.000 x g zentrifugiert. Die Zentrifugation musste gegebenenfalls wiederholt werden, falls der Überstand nicht aufklarte. Die NucleoSpin Plasmid-Säule wurde in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß gesetzt und der Zentrifugationsüberstand darauf gegeben (max. 750 µl). Das Gefäß mit dem Säulchen wurde

anschließend für eine Minute bei 11.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss der Zentrifugation wurde verworfen und 600 µl Puffer A4 auf die NucleoSpin Plasmid Säule gegeben. Anschließend wurde wieder für eine Minute bei 11.000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Zum Trocknen wurde abschließend erneut für zwei Minuten bei 11.000 x g zentrifugiert. Abweichend von den Herstellerangaben wurde die Säule zudem für etwa fünf Minuten bei 70 °C auf dem Heizblock getrocknet. Die NucleoSpin Plasmid Säule wurde dann auf ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gesetzt, 50 µl Elutionspuffer dazugegeben und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde eine Minute bei 11.000 x g zentrifugiert. Die DNA-Konzentration des Durchflusses wurde mittels NanoDrop 2.000 bestimmt und auf eine DNA-Konzentration von 20 ng/µl eingestellt. Die Aufbewahrung des Plasmids erfolgte bei -20 °C. Die Restriktionskarte des Plasmides pMBvenus ist in Abbildung 9 dargestellt.

3.5.3 Restriktionsverdau und Kontroll-PCR

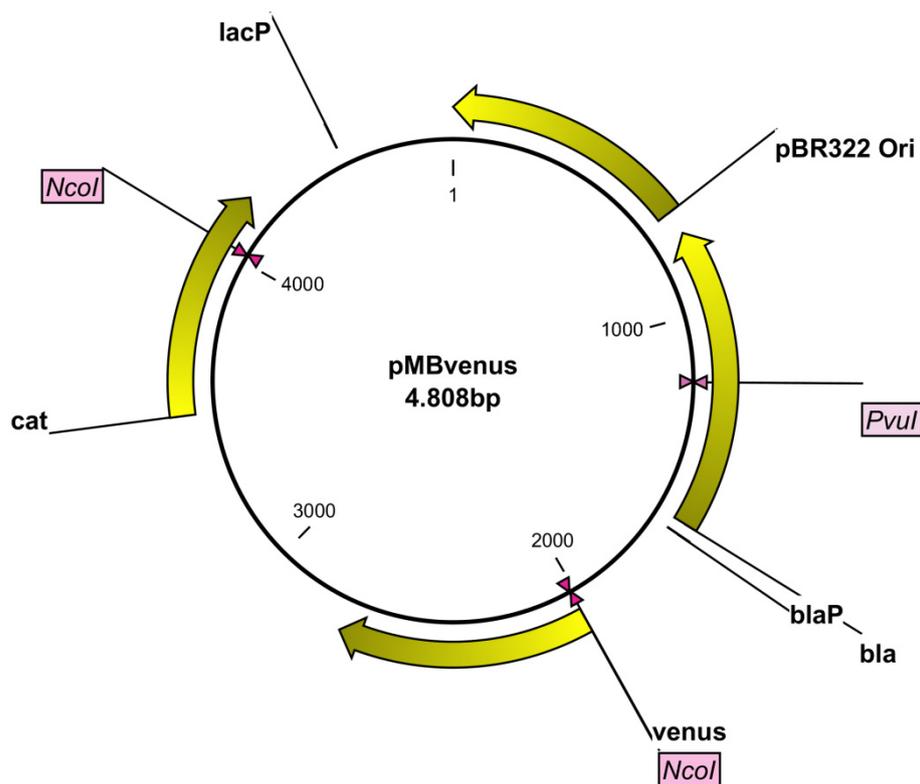


Abbildung 9: Karte des Plasmids pMBvenus.

Die kodierenden Regionen des venus-Gens und der Chloramphenicol-Resistenz-Kassette (cat) sind dargestellt ebenso wie die Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme.

Zur Überprüfung des Plasmids wurde pMBvenus mit dem Restriktionsenzym *NcoI*-HF geschnitten. Da zur weiteren Verwendung das linearisierte Plasmid benötigt wurde, erfolgte ein

DNA-Verdau mit dem Restriktionsenzym *PvuI*-HF. In einem Eppendorf-Gefäß wurden dazu ca. 1 µg Plasmid-DNA (hier: pMBvenus), 2 µg enzymespezifischer Puffer sowie H₂O_{dest.} bis zu einem Volumen von 20 µl durch Vortexen gemischt. Anschließend wurde 1 µl des Restriktionsenzym (hier: ein Ansatz mit *NcoI*-HF und ein Ansatz mit *PvuI*-HF) zugegeben. Der Ansatz wurde eine Stunde bei der Arbeitstemperatur des Enzyms inkubiert. Je 2 µl jedes Restriktionsverdau wurden mit 0,5 µl einer Mischung aus Glycerin und Bromphenolblau auf ein 1 %iges Agarose-Gel aufgetragen. Es erfolgte eine Gelelektrophorese für 45 Minuten bei einer Spannung von 90 V. Als Kontrolle wurden 5 µl des DNA Ladder Mix (peqGOLD von peqlab) mit auf das Gel aufgetragen (Abbildung 10).

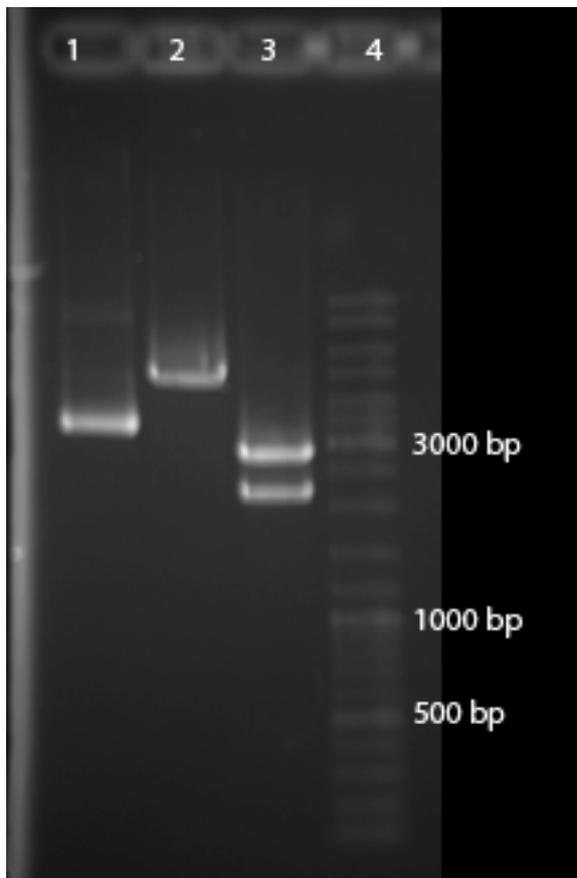


Abbildung 10: Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsverdau von pMBvenus durch Gelelektrophorese.

Spur 1 enthält das unverdaute Plasmid. Spur 2 enthält den Restriktionsverdau mit *PvuI*-HF. Spur 3 enthält den Restriktionsverdau mit *NcoI*-HF. Spur 4 enthält den Größenmarker DNA Ladder Mix (peqGold).

3.5.4 Erstellung des Rekombinations-Templates

Wie von Datsenko & Wanner beschrieben (23), wurde per PCR an beiden Enden des linearen DNA-Templates eine 50-bp DNA Sequenz angefügt, die homolog zum chromosomalen Integrationsort ist. Dazu wurde ein PCR-Ansatz mit folgendem Inhalt vorbereitet:

0,5 µl Primer A, 10 µM
 0,5 µl Primer B, 10 µM
 1 µl dNTP-Mix
 10 µl 5xHF-Puffer
 100 ng Template (hier: 5 µl pMBMvenus-Plasmid bei 20 ng/µl nach Restriktionsverdau durch *PvuI*-HF)
 0,5 µl Phusion-Polymerase
 H₂O ad 50 µl

Für das Plasmid pMBvenus wurden folgende Primer-Kombinationen gewählt: PS1 und PS2 als Ansatz 1, sowie PS2 und PS5 als Ansatz 2. Das Primerpaar PS2 und PS5 ermöglicht die Integration des *venus*-Fragmentes zwischen *pgaA* und *pgaB*, so dass das *venus*-Gen bei Translation des *pga*-Operons exprimiert wird (*E. coli* UT189*pgaA::pgaA**venus*) (Abbildung 11). Die Kombination der Primer mit dem pMBvenus-Plasmid wird im Folgenden als pMBvenus/PS2_PS5 bezeichnet. Das Primerpaar PS1 und PS2 ermöglicht, dass das Gen *pgaA* durch das *venus*-Gen ersetzt wird, wobei die Promotorregion von *pgaA* erhalten bleibt. Damit wird das *venus*-Gen unter der Kontrolle des *pgaA* Promotors transkribiert (transkriptionelle Fusion, *E. coli* UT189*pgaA::venus*). Die Kombination der Primer mit pMBvenus wird im Folgenden als pMBvenus/PS1_PS2 bezeichnet.

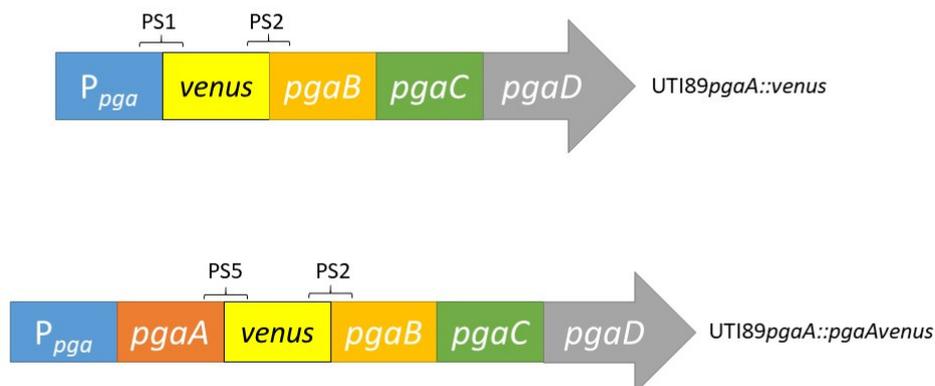


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Herstellung der Transkriptions- und Translationsfusionen im *pga* Operon. Die Gene des *pgaA*-Operon sowie die Lokalisation der über die Primer eingebrachten Bereiche für die Integration des *venus* Gens mittels λ -Red Recombineering sind dargestellt.

Die Polymerase wurde als letztes in den Deckel des Reaktionsgefäßes gegeben und per kurzer Zentrifugation mit dem Ansatz vermischt. Die anschließende PCR wurde nach folgendem Programm (s. Tabelle 8) durchgeführt:

Tabelle 8: PCR-Programm zur Herstellung der Rekombinationssequenzen

Schritt	Dauer [min]	Temperatur [°C]
1	3:00	98
2	0:30	98
3	0:30	60
4	1:30	72
29 x zu Schritt 2		
5	5:00	72

Das PCR-Produkt wurde anschließend auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Als Referenz wurde erneut der DNA Ladder Mix (peqGOLD von peqlab) verwendet (Abbildung 12).

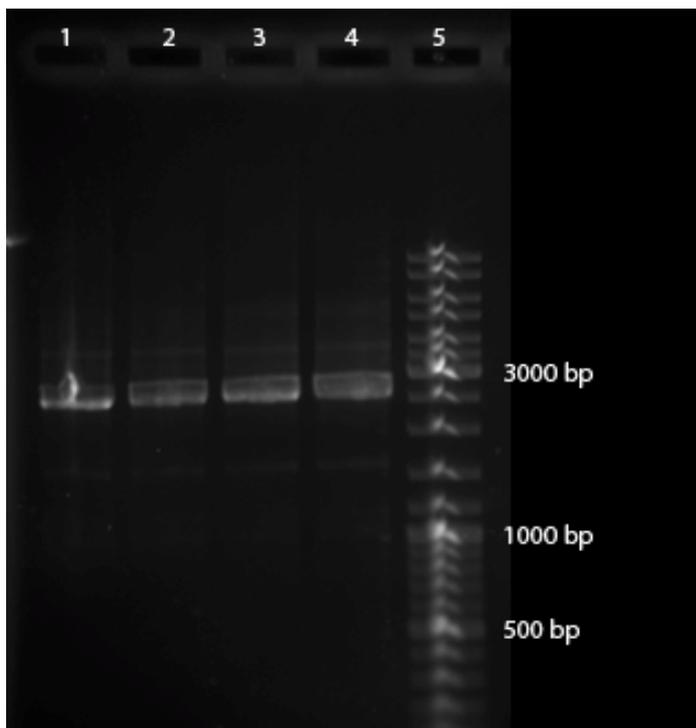


Abbildung 12: Agarosegel zur Überprüfung der zur Herstellung der Transkriptions- und Translationsfusion mit dem venus Reporter gen zu verwendenden PCR-Produkte. Spur 1/2: PCR-Produkt pMBvenus/PS1_PS2, Spur 3/4: PCR-Produkt pMBvenus/PS2_PS5, Spur 5: DNA Ladder Mix (peqGOLD von peqlab)

In den Spuren 1 und 2 wurde das PCR-Produkt, das mit den Primern PS1 und PS2 erhalten wurde, aufgetragen. Die erwartete Bande hat eine Länge von 2512 bp. In den Spuren 3 und 4 wurde das PCR-Produkt aufgetragen, das mit den Primern PS2 und PS5 generiert wurde. Die erwartete Bande hat eine Länge von 2518 bp.

3.5.5 Aufreinigung des PCR-Produkts (NucleoSpin® Gel and PCR CleanUp, Fa. Macherey-Nagel)

Nach der Elektrophorese der PCR-Produkte wurden die relevanten Banden unter möglichst kurzer UV-Exposition aus dem Gel ausgeschnitten. Das Gewicht der ausgeschnittenen Gelstücke wurde bestimmt (hier: je ca. 200 mg). Anschließend wurden die ausgeschnittenen Gelstücke jeweils in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben. Pro 100 mg Agarose-Gel wurden 200 µl Puffer NTI zugegeben (hier: je ca. 400 µl). Im Thermoblock wurde die Mischung bei 50 °C unter Schütteln inkubiert. Das verflüssigte Gel Stück wurde auf ein NucleoSpin Gel and PCR CleanUp Säulchen (max. 700 µl Probe) gefüllt und für 30 Sekunden bei 11.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Zur Trocknung wurde das Reaktionsgefäß eine Minute bei 11.000 x g zentrifugiert und anschließend für 2-3 Minuten bei 70 °C im Heizblock getrocknet. Gleichzeitig wurde der Elutionspuffer (NE) in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß bei gleicher Temperatur erwärmt. Die NucleoSpin Gel and PCR CleanUp Säule wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gesetzt. 35 µl des Puffers NE wurden auf die Säule gegeben und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert, bevor das Gefäß eine Minute bei 11.000 x g zentrifugiert wurde. Mittels des NanoDrop2000 Spektrophotometers wurde die DNA-Konzentration bestimmt. Diese betrug 68,3 ng/µl bei Verwendung des Templates pMBvenus/PS1_PS2 sowie 66,1 ng/µl beim Einsatz des Templates pMBvenus/PS2_PS5.

3.5.6 Chromosomale Integration des *venus* Reportergens durch λ -Red-vermittelte Rekombination

Mit dem mit den Plasmiden pRedET(tet) bzw. pKD46 transformierten *E. coli* Stamm UTI89 (s. 3.5.1) wurden wie unter Punkt 3.5.1 beschrieben elektrokompente Zellen hergestellt. Zur Anzucht der ÜN-Kultur wurden hierbei Selektivmedien (dYT supplementiert mit geeigneten Antibiotika, s. Tabelle 2, Seite 18) verwendet. Aufgrund der enthaltenen Plasmide wurde die Anzucht der Bakterien bei 30 °C durchgeführt. Bei Erreichen einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0,35 wurde zur Induktion der Rekombinasen der Plasmide pRedET(tet)bzw. pKD46 sechs Milliliter 10 %ige Arabinose-Lösung zugegeben und die Kultur hiermit für eine Stunde weiter inkubiert, bevor mit den Kühl- und Konzentrationsschritten begonnen wurde. Die hergestellten elektrokompenten Zellen wurden jeweils mit ca. 300 ng (entspricht bei gemessenen Konzentrationen 5 µl) der für Rekombination einzusetzenden PCR-Produkte pMBvenus/PS1_PS2 sowie pMBvenus/PS2_PS5 elektroporiert. Danach wurden die Zellen jeweils in

1 ml dYT-Medium resuspendiert und für eine Stunde bei 37 °C und 180 Upm im Schüttler regeneriert. Anschließend wurden die Suspensionen 5 Minuten bei 3.000 Upm zentrifugiert, der Überstand abgegossen und die Zellen im verbleibenden Medium (ca. 100 µl) resuspendiert und auf LB-Agar mit 12,5 µg/ml Chloramphenicol ausplattiert. Zur Kontrolle wurde die Elektroporation zudem mit dem *E. coli* K-12 Stamm MG1655/pKD46 durchgeführt. Die Rekombination führte im UTI89/pKD46-Stammhintergrund leider zu keinem Erfolg (kein Wachstum der Bakterien auf Selektivagar). Bei dem transformierten Stamm MG1655/pKD46 wuchsen nur wenige Kolonien. Die UTI89-Stämme, die das pRedET(tet)-Plasmid trugen, zeigten ein gutes Wachstum auf Selektivagar, so dass dieser Stamm für die weiteren Arbeiten verwendet wurde. Die Bezeichnung der generierten Reporterstämme ist in Tabelle 9 dargestellt:

Tabelle 9: Benennung der Reporterfusionen

Ursprungstamm	Primer 1	Primer 2	Neuer Stammname	Funktion
UTI89	PS1	PS2	UTI89 <i>pgaA::venus</i>	Transkriptionsfusion mit dem <i>pgaA</i> Promotor
UTI89	PS2	PS5	UTI89 <i>pgaA::pgaAvenus</i>	Translationsfusion mit der kodierenden Sequenz des <i>pgaA</i> Gens

3.5.7 DNA-Präparation, PCR und Elektrophorese zur Kontrolle der Rekombinationen
Die korrekte chromosomale Integration des Reportergens wurde mittels PCR überprüft. Dazu wurden 200 µl einer ÜN-Kultur eine Minute bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 100 µl destilliertem Wasser resuspendiert und im auf 95 °C vorgeheizten Heizblock für 10 Minuten unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Suspension erneut für eine Minute bei 10.000 x g zentrifugiert und auf Eis gelagert.

Für die PCR wurde ein Mastermix aus folgenden Substanzen vorbereitet:

2 µl Primer A (10 µM)

2 µl Primer B (10 µM)

5 µl Hitzeextrakt

25 µl GoTaq-Mastermix (enthält Polymerase, dNTPs, Puffer für PCR, Puffer für Elektrophorese)

H₂O_{dest.} ad 50 µl

Folgende Ansätze (s. Tabelle 10) wurden zur Verifikation der Rekombinationsprodukte gewählt und in drei biologischen sowie zwei technischen Replikaten untersucht:

Tabelle 10: PCR-Ansätze zur Analyse der Rekombinationsprodukte

Stamm	Primer A	Primer B	Erwartete Bande
UTI89p<i>gaA</i>::p<i>gaA</i>Avenus	PS7	PST7	310 bp
UTI89p<i>gaA</i>::p<i>gaA</i>Avenus	PS4	MBP5	379 bp
UTI89p<i>gaA</i>::p<i>gaA</i>venus	PS3	PST7	590 bp
UTI89p<i>gaA</i>::p<i>gaA</i>venus	PS4	MPB5	379 bp

Die Primer ermöglichen die Amplifikation der linken und rechten Rekombinationsstellen, wie in Abbildung 27 dargestellt. Die anschließende PCR-Amplifikation wurde nach folgendem Protokoll (s. Tabelle 11) vollzogen:

Tabelle 11: PCR-Bedingungen zur Kontrolle der chromosomalen Reporterfusionen

Schritt	Dauer [min]	Temperatur [°C]
1	3:00	95
2	0:30	95
3	0:30	55
4	0:45	72
29 x zu Schritt 2		
5	5:00	72

7 µl der jeweiligen PCR-Produkte wurden auf ein 1 %iges Agarose-Gel aufgetragen und das Gel eine Stunde lang einer Spannung von 90V ausgesetzt. Insgesamt wurden von jedem der beiden erstellten Stämme drei Kolonien mittels PCR kontrolliert und für die weiteren Experimente verwendet. Als Negativkontrolle der PCRs diente der Ausgangsstamm *E. coli* UTI89.

3.5.8 Sequenzierung der PCR-Produkte

Die Sequenzierung von PCR-Produkten erfolgte am Institut für Hygiene, Münster. Zur Vorbereitung wurden die PCR-Produkte zunächst nach ExoSAP-Protokoll aufgereinigt. Hierzu wurden 0,1 µl Exonuclease 1 (20.000 U/ml), 1 µl Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), 0,9 µl H₂O in

ein gekühltes PCR-Gefäß gegeben und anschließend 5 µl PCR-Produkt zugefügt. Dieser Ansatz wurde im PCR-Gerät 60 Minuten bei 37 °C inkubiert, anschließend für 20 Minuten auf 80 °C erhitzt und auf 4 °C abgekühlt. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden anschließend für die Sequenzierung vorbereitet. Hierzu wurden 0,5 µl Premix, 1,8 µl ABI-Seq-Puffer 5x, 2 µl eines passenden Primers, 2 µl aufgereinigtes PCR-Produkt sowie 3,7 µl HPLC-Wasser in einem Eppendorf-Gefäß gemischt. Für diesen Ansatz wurde jeweils das folgende PCR-Programm (s. Tabelle 12) angewendet:

Tabelle 12: PCR-Bedingungen für die Sequenzierung der PCR-Produkte

Schritt	Dauer [min]	Temperatur [°C]
1	0:10	95
2	0:05	Annealing-Temperatur des Primers, verwendet: 55
3	4:00	60
24 x zu Schritt 2		
4		4

Die Produkte der Sequenzierungs-PCR wurden anschließend nach Angaben des ABI User Bulletins P/N4333020 präzipitiert. Hierzu wurden 10 µl Sequenzierungsprodukt in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Dazu wurden 40 µl Ethanol/Na-Acetat-Lösung gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend 30 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen (Pellet muss nicht sichtbar sein), 250 µl 70% Ethanol zugegeben und durch Vortexen resuspendiert. Der Ansatz wurde anschließend erneut für fünf Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und danach der Überstand abgenommen. Es erfolgte die Trocknung für fünf Minuten bei 45 °C in der Vakuumzentrifuge. Hiernach wurden 20 µl Formamid zugegeben und der Ansatz bis zur Sequenzierung bei 4 °C aufbewahrt.

3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte mit SPSS 24 (IBM). Je nach Beschaffenheit und Verteilung der Daten wurde ein Mann-Whitney U-Test, eine ANOVA oder ein t-Test verwendet. Die Auswertung des Flussmodells wird in Kapitel 4.2 beschrieben. Als

Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ gewählt. Bei multiplen Testungen wurde das Signifikanzniveau mittels Bonferroni-Korrektur angepasst. Dieses ist bei den einzelnen Auswertungen vermerkt.

4. Ergebnisse

4.1 Biofilm-Bildung in Abhängigkeit des Nährmediums

Die Biofilmbildung des uropathogenen *E. coli* Stammes UT189 wurde zunächst in einem Mikrotiter-Assay unter Verwendung verschiedener Medien (M63, humaner Sammelurin und Artificial Urine Medium) verglichen. Eine graphische Darstellung der 24 Messpunkte je Medium ist in Abbildung 13 gezeigt. Die gemessene OD_{600nm} lag bei M63 im Mittel bei 0,253 (SD 0,078), im Sammelurin bei 0,056 (SD 0,014) und im Artificial Urine Medium bei 0,038 (SD 0,016).

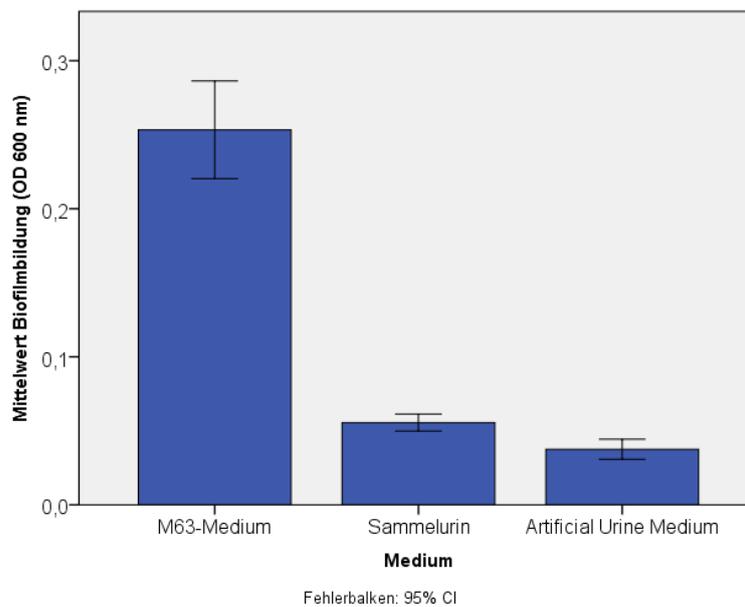


Abbildung 13: Biofilmbildung des *E. coli* Stammes UT189 in M63-Medium, Sammelurin und Artificial Urine Medium.

Eine ANOVA-Auswertung zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den drei Gruppen ($p < 0,001$). Die Post-Hoc-Tests zeigten eine signifikant geringere Biofilmbildung des *E. coli* Isolates in Urin im Vergleich zu M63 ($p < 0,001$). Auch die Biofilmbildung im Artificial Urine Medium fiel signifikant geringer aus als in M63 ($p < 0,001$). Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der Biofilmbildung des *E. coli* Stammes UT189 in Sammelurin und in Artificial Urine Medium ($p = 0,559$). Im Vergleich der Mittelwerte wurde also in M63 um den Faktor 4,56 mehr Biofilm gemessen als in Sammelurin und um den Faktor 6,75 mehr als in Artificial Urine Medium. Die gemessene Biofilmbildung in Sammelurin lag um den Faktor 1,48 höher als in Artificial Urine, wobei dieser Unterschied nicht signifikant war (Tabelle 13).

Tabelle 13: Vergleich des Einflusses des Mediums auf die Biofilmbildung des *E. coli* Stammes UT189 im Post-Hoc-Test

Mehrfachvergleiche

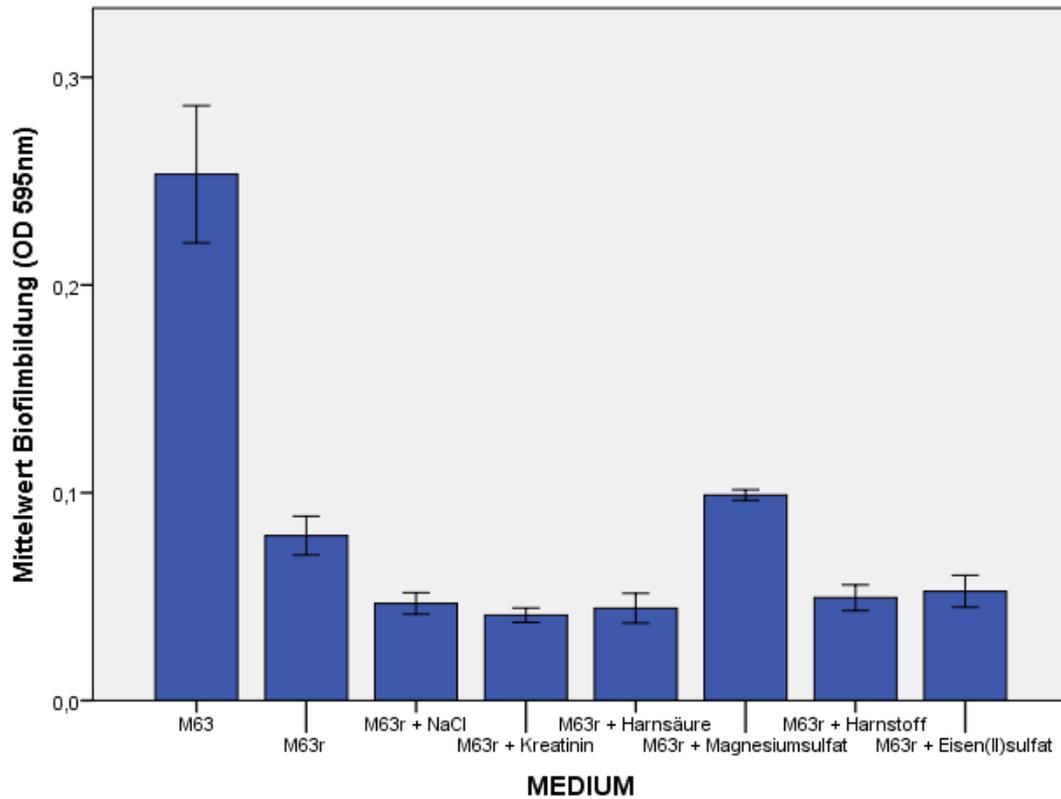
Abhängige Variable: Biofilmbildung (OD 600 nm)

Bonferroni

(I) Medium	(J) Medium	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95 %-Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
M63-Medium	Sammelurin	0,198*	0,013	0,000	0,165	0,231
	Artificial Urine Medium	0,216*	0,013	0,000	0,183	0,249
Sammelurin	M63-Medium	-0,198*	0,013	0,000	-0,231	-0,165
	Artificial Urine Medium	0,018	0,013	0,559	-0,015	0,051
Artificial Urine Medium	M63-Medium	-0,216*	0,013	0,000	-0,249	-0,183
	Sammelurin	-0,018	0,013	0,559	-0,051	0,015

*. Die Differenz der Mittelwerte ist auf dem Niveau 0,05 signifikant.

Zur Untersuchung der Ursache für die unterschiedliche Biofilmbildung in den verschiedenen Medien wurden einem reduzierten M63-Medium, M63r, bestehend aus M63-Salzen, Casaminosäuren, Glucose und Thiamin in Konzentrationen des M63-Mediums unter Zusatz von 10 µg/ml Nicotinamid, einzelne Bestandteile des Artificial Urine Mediums in Konzentration des Artificial Urine Mediums zugesetzt. Eine Darstellung der je 24 Messpunkte pro Medium ist in Abbildung 14 gezeigt. Zur Vervollständigung des Bildes sind ebenfalls Messungen mit M63 Medium dargestellt. Diese flossen in die folgenden statistischen Betrachtungen jedoch nicht ein. Es erfolgte eine paarweise statistische Testung mittels unverbundenem t-Test der Kombination von M63r mit einem Zusatzstoff gegen M63r. Weil bei multipler Testung die Gefahr der Alpha-Fehler-Kumulierung besteht, wurde das Signifikanzniveau bei den folgenden Vergleichen auf 0,006 erhöht. Bei den Berechnungen zeigte sich eine signifikante Verringerung der Biofilm-Bildung durch den Zusatz von Harnstoff ($p < 0,001$), Harnsäure ($p < 0,001$), Natriumchlorid ($p < 0,001$), Kreatinin ($p < 0,001$), und Eisen(II)sulfat ($p < 0,001$) im Vergleich zum Grundmedium. Lediglich durch den Zusatz von Magnesiumsulfat wurde die Biofilmbildung signifikant erhöht ($p < 0,001$).



Fehlerbalken: 95% CI

Abbildung 14: Auswirkung einzelner Urinbestandteile auf die Biofilmbildung des E. coli Stammes UT189 in M63r Medium.

Zudem wurde der Anteil von Casaminoäuren im Grundmedium von 1 % auf 0,5 % und 0,1 % reduziert, um Wachstumsbedingungen bei geringerer Konzentration von Substraten zu simulieren. Wachstum in Anwesenheit von 0,1 % Casaminoäuren führte zu einer signifikant verringerten Biofilmbildung ($p < 0,001$ bei 0,1 %), wohingegen sich die Biofilmbildung bei Anwesenheit von 0,5 % Casaminoäuren nicht signifikant ($p = 0,021$) gegenüber der in M63r verändert war. Die Biofilmbildung bei reduzierter Konzentration der Casaminoäuren ist in Abbildung 15 dargestellt.

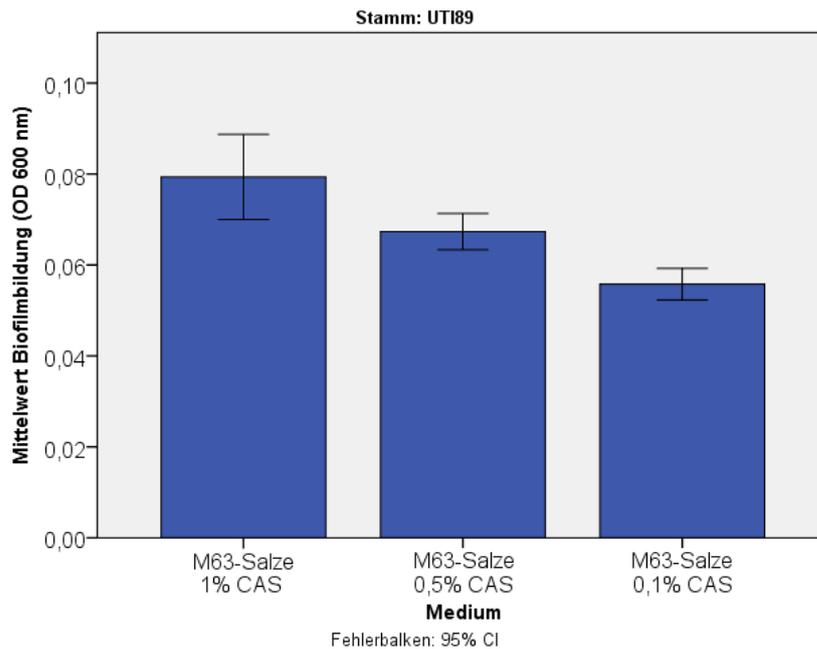


Abbildung 15: Biofilmbildung des *E. coli* Stammes UT189 in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von Casamino säuren.

Zur Untersuchung einer Beeinflussung der Biofilmbildung durch unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten wurde ein Vergleich des Wachstums mittels Messung der optischen Dichte bei 600 nm Wellenlänge von Übernachtskulturen vorgenommen. Die Verteilung der je 24 Messpunkte ist in Abbildung 16 dargestellt. Auf Grund multipler Testungen wurde auch hier ein Signifikanzniveau von 0,006 gewählt. Die Tests erfolgten mit unverbundenem t-Test der Medien mit Zusatz gegen das M63r-Medium. Der Zusatz von Kochsalz ($p = 0,024$), Kreatinin ($p = 0,145$), Harnsäure ($p = 0,321$) und Eisen(II)sulfat ($p = 0,329$) führte zu keiner signifikanten Veränderung des Wachstumsverhaltens. Der Zusatz von Harnstoff ($p = 0,001$) sowie die Verringerung der Casamino säuren auf 0,5 % ($p < 0,001$) und 0,1 % ($p < 0,001$) führte zu einer signifikanten Verringerung des Bakterienwachstums. Der Zusatz von Magnesiumsulfat zeigte eine signifikante Steigerung des Bakterienwachstums ($p < 0,001$).

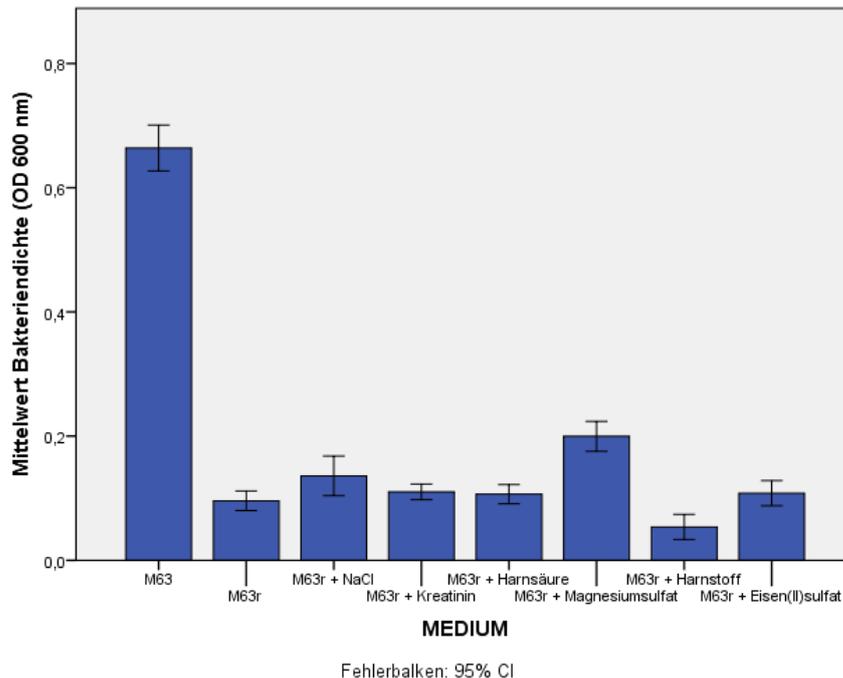


Abbildung 16: Wachstum des *E. coli* Stammes UT189 in M63r Medium in Abhängigkeit verschiedener Urinbestandteilen.

Eine Veränderung der Biofilmbildung durch veränderte pH-Werte konnte ausgeschlossen werden, da der pH-Wert der verschiedenen Medien auch nach Zusatz der einzelnen Artificial Urine Medium-Bestandteile auf Lackmus-Streifen konstant bei einem Wert von 5,5 lag.

Zur Klärung der Zunahme des bakteriellen Wachstums und der Biofilmbildung unter dem Einfluss von Magnesiumsulfat wurden weitere Versuche durchgeführt. Zur Verifizierung, ob dieser Einfluss durch die Magnesium- oder Sulfat-Komponente zustande kommt, wurde das Bakterienwachstum in Anwesenheit von Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) Eisen(II)sulfat gemessen. Dabei bestätigte sich das erhöhte bakterielle Wachstum bei Zugabe von Magnesiumchlorid. Dieses ist nicht im Artificial Urine Medium enthalten. Das verstärkte bakterielle Wachstum (und damit annehmbar auch die Biofilmbildung) ist höchstwahrscheinlich auf die erhöhte Verfügbarkeit von Magnesium (II)-Ionen zurückzuführen. Ein einfaktorieller ANOVA-Test über die drei Messpunkte pro Medium ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($p < 0,001$). In den Post-Hoc-Tests zeigte sich unter Zusatz von Magnesiumsulfat ($p < 0,001$) und Magnesiumchlorid ($p < 0,001$) ein signifikant höheres Bakterienwachstum als im Ursprungsmedium M63r. Der Zusatz von Eisen(II)sulfat führte dagegen zu einem signifikant geringeren Bakterienwachstum ($p < 0,001$). Zwischen dem Zusatz von Magnesiumsulfat und Magnesiumchlorid bestand kein Unterschied ($p = 1,000$) (Tabelle 14).

Tabelle 14: Vergleich des Einflusses von Magnesiumsulfat und Magnesiumchlorid auf das Wachstum des *E. coli* Stammes UT189

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: Bakteriendichte (OD 600 nm)

Bonferroni

(I) Medium	(J) Medium	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95 %-Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
M63r	M63r + MgSO4	-0,526*	0,060	0,000	-0,735	-0,317
	M63r + MgCl2	-0,468*	0,060	0,000	-0,677	-0,259
	M63r + FeSO4	0,693*	0,060	0,000	0,484	0,902
M63r + MgSO4	M63r	0,526*	0,060	0,000	0,317	0,735
	M63r + MgCl2	0,058	0,060	1,000	-0,151	0,267
	M63r + FeSO4	1,219*	0,060	0,000	1,010	1,428
M63r + MgCl2	M63r	0,468*	0,060	0,000	0,259	0,677
	M63r + MgSO4	-0,058	0,060	1,000	-0,267	0,151
	M63r + FeSO4	1,161*	0,060	0,000	0,952	1,370
M63r + FeSO4	M63r	-0,693*	0,060	0,000	-0,902	-0,484
	M63r + MgSO4	-1,219*	0,060	0,000	-1,428	-1,010
	M63r + MgCl2	-1,161*	0,060	0,000	-1,370	-0,952

*. Die Differenz der Mittelwerte ist auf dem Niveau 0,05 signifikant.

Die gemessenen Werte sind in Abbildung 17 dargestellt.

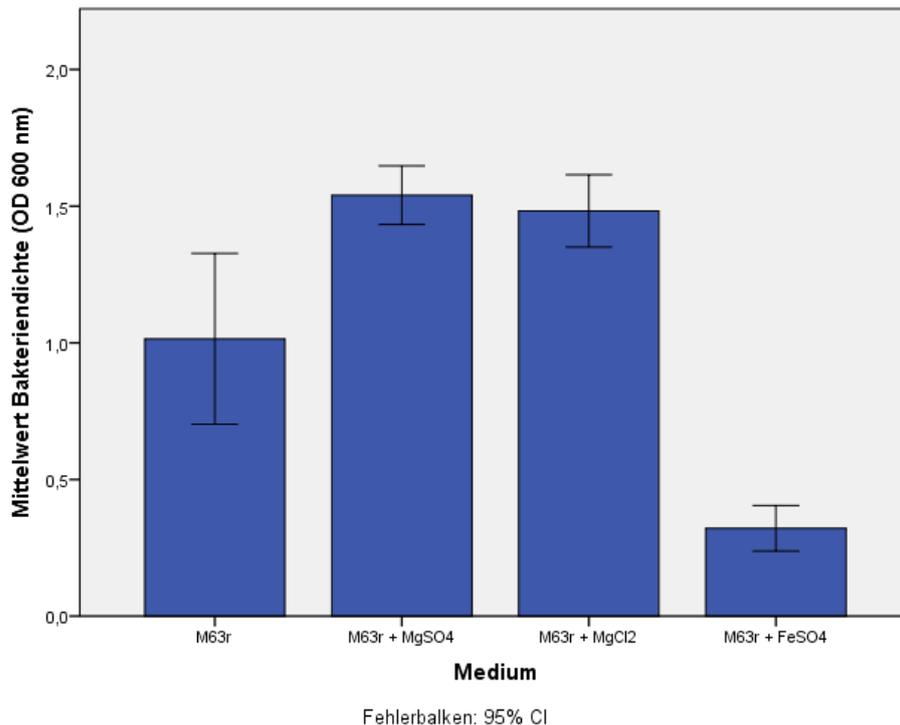


Abbildung 17: Einfluss von Magnesiumsulfat, Magnesiumchlorid oder Eisen(II)sulfat zu einem reduzierten M63-Medium auf das Wachstum von *E. coli* Stamm UT189.

4.2 Vergleich der Biofilm-Bildung verschiedener *E. coli*-Isolate unter Flussbedingungen

Außer dem Medium wurde auch ein Einfluss der Wachstumsbedingungen und des experimentellen Aufbaus auf die Biofilmbildung postuliert. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Biofilmbildung verschiedener Isolatgruppen unter Flussbedingungen gemessen. Zunächst mussten Versuchsbedingungen für eine hinreichende Biofilmbildung im jeweiligen Nährmedium ermittelt werden. Im M63-Medium wurde zunächst der Laborstamm UT189 verwendet. Variiert wurden die Größen Inkubationsdauer, Medienzufuhr und Größe des Inokulums. Als geeignete Inokulummenge stellte sich die Verwendung von 250 µl einer Übernachtskultur heraus. Nach 48 Stunden Inkubationsdauer war eine hinreichende Biofilmbildung detektierbar. Die Medienzufuhr zeigte bei 13 ml pro Stunde, der langsamsten Einstellung der verwendeten Schlauchpumpen, beste Ergebnisse. Jeder schnellere Medienfluss verringerte die Biofilmbildung. Die verwendete Flussgeschwindigkeit führte zu einem Austausch des gesamten Kulturvolumens im Fermenter etwa alle zwei Stunden. Im Artificial Urine Medium zeigte sich ein langsames Bakterienwachstum. Daher wurde hier bei gleicher Flussgeschwindigkeit mit einem Inokulum von 500 µl Übernachtskultur gearbeitet.

Im Flussmodell wurden 30 Bakterienstämme untersucht: Zehn Harnwegsinfekt-Isolate (UTI, Urinary Tract Infection), zehn Katheter-Isolate (CAUTI, Catheter Associated Urinary Tract Infection) sowie zehn Fäkal-Isolate (FI, Fecal Isolate). Für alle Stämme wurde im Flussmodell die Biofilmbildung in M63-Medium und Artificial Urine Medium gemessen. Die Experimente wurden je dreimal pro Stamm durchgeführt. Ausplattiert wurden je zwei Verdünnungen des gelösten Biofilms. Aus den Messungen wurden die koloniebildenden Einheiten (Colony Forming Units, CFU) pro mL berechnet. Dabei zeigten sich bei einzelnen Stämmen Abweichungen in den biologischen Replikaten, die jedoch bei erneuter Wiederholung nicht reproduziert werden konnten. Die vereinzelt abweichenden Werte wurden als Messfehler interpretiert und eliminiert. Die Werte der Kontrollmessungen flossen in die Auswertung ein. Auf Grund der hohen Varianz der ermittelten Daten erfolgte die Auswertung mittels eines hierarchischen Modells unter Berücksichtigung der mehrfachen Ausplattierung in Verdünnungsstufen. Getestet wurde in negativ binominaler Verteilung unter Einbeziehung von Zufallseffekten. Als fester Effekt wurde die jeweilige Isolatgruppe festgelegt. Hierzu erfolgte eine statistische Beratung durch Dr. Dennis Görlich am Institut für klinische Studien und Biometrie des Universitätsklinikums Münster.

In der Analyse der Daten zeigte sich, dass die Messwerte der Biofilmmessungen einer großen Schwankungsbreite mit großen Konfidenzintervallen unterliegen (vgl. Tabelle 15).

Tabelle 15: Biofilmbildung der verschiedenen Isolatgruppen in M63 und Artificial Urine Medium

Schätzungen: Colony Forming Units (CFU) pro mL

Isolatgruppe	Medium	Mittelwert	Standardfehler	95 %-Konfidenzintervall	
				Untergrenze	Obergrenze
CAUTI	M63	21.889.500	6.380.300	12.333.400	38.849.600
	AUM	22.469.300	7.802.400	11.344.100	44.505.000
UTI	M63	51.000.000	15.143.2000	28.429.100	91.490.700
	AUM	25.648.500	7.648.600	14.261.300	46.128.000
FI	M63	23.377.100	7.084.500	12.875.000	42.445.900
	AUM	42.952.500	13.289.600	23.362.300	78.969.700

Die Quantifizierung des Biofilms erfolgte über die Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten. Diese variierte auch innerhalb der Isolatgruppen in den Medien M63 und AUM sehr stark.

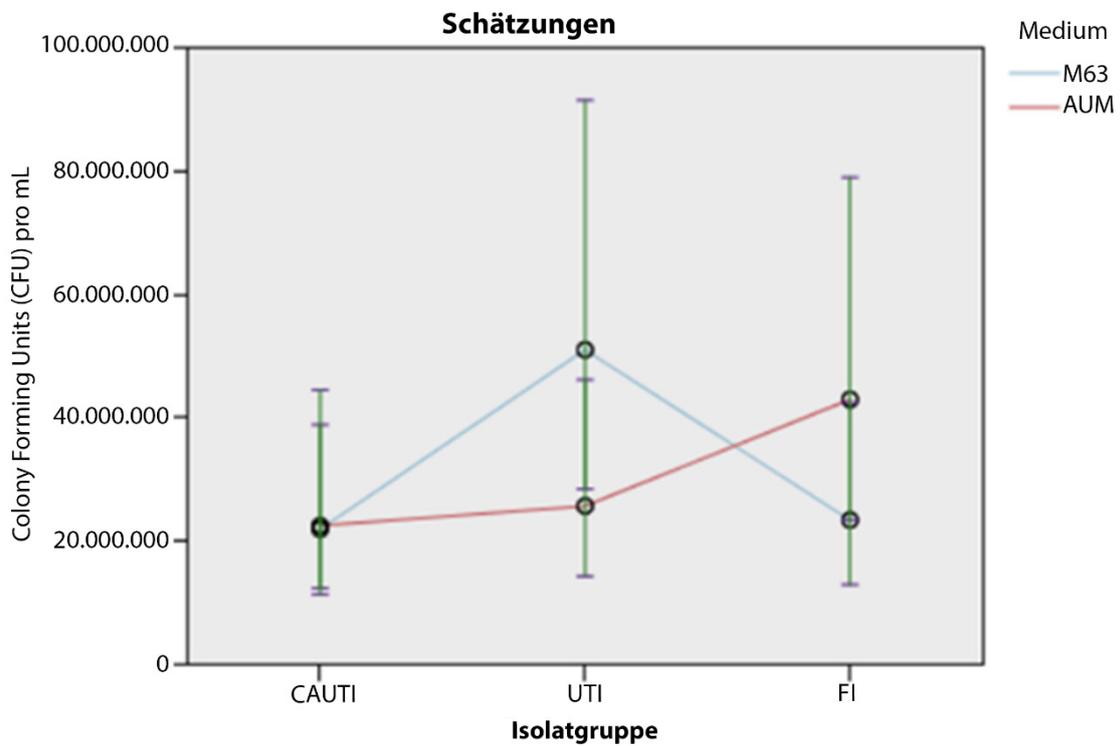


Abbildung 18: Biofilmbildung (gemessen über Colony Forming Units) in den drei Isolatgruppen und den verwendeten Medien M63 und Artificial Urine Medium.

Sowohl im Artificial Urine Medium als auch in M63 waren keine signifikanten Unterschiede in der Biofilmbildung zwischen den einzelnen Isolatgruppen zu beobachten. Die entsprechenden Signifikanztests sind in Tabelle 16 aufgeführt. Bei Betrachtung von Abbildung 18 zeigt jedoch, dass es tendenzielle Unterschiede gibt: Die Biofilmbildung der Harnwegsinfektisolat in M63 Medium erscheint höher als die der anderen beiden Isolatgruppen. Im Artificial Urine Medium scheinen die Fäkalisolat tendenziell mehr Biofilm zu bilden als die anderen beiden Isolatgruppen.

Tabelle 16: Paarweiser Vergleich der Biofilmbildung der getesteten Isolatgruppen in M63-Medium und Artificial Urine Medium

Paarweise Kontraste

Medium	Isolatgruppen	Kontrastschätzung	Korr. Signifikanz
M63	CAUTI – UTI	-29.110.500	0,078
	CAUTI – FI	-1.487.700	0,876
	UTI – CAUTI	29.110.500	0,078
	UTI – FI	27.622.800	0,100
	FI – CAUTI	1.487.700	0,876
	FI - UTI	-27.622.800	0,100
AUM	CAUTI – UTI	-3.179.100	0,771
	CAUTI – FI	-20.483.100	0,185
	UTI – CAUTI	3.179.100	0,771
	UTI – FI	-17.304.000	0,260
	FI – CAUTI	20.483.100	0,185
	FI – UTI	17.304.000	0,260

Außerdem wurde die Auswirkung des Mediums auf die Biofilmbildung im Flussmodell untersucht (Tabelle 17). Dabei zeigte sich, dass Harnwegsinfektisolate im Labormedium M63 signifikant ($p = 0,021$) mehr Biofilm bildeten als im Artificial Urine Medium. Fäkalisolate dagegen bildeten im Artificial Urine Medium signifikant ($p = 0,049$) mehr Biofilm als im M63-Medium. Bei den Katheterisolaten konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0,925$).

Tabelle 17: Einfluss des Mediums auf die Biofilmbildung der untersuchten Isolatgruppen: Schätzung des Kontrasts an Colony Forming Units (CFU) pro mL zwischen den Medien M63 und AUM

Isolatgruppe	Medium	Kontrastschätzung	Korr. Signifikanz
CAUTI	M63 – AUM	-579.900	0,925
	AUM – M63	579.900	0,925
UTI	M63 – AUM	25.351.500	0,021
	AUM – M63	-25.351.500	0,021
FI	M63 – AUM	-19.575.300	0,049
	AUM – M63	19.575.300	0,049

4.2.1 Vergleich mit Ergebnissen eines statischen Biofilm-Assays

Anna Laumen verglich in ihrer am Institut für Hygiene durchgeführten Dissertation die Biofilmbildung verschiedener *E. coli*-Isolate in M63 und Urin unter statischen Bedingungen (48). Teilweise konnten ihre Ergebnisse mit den Ergebnissen der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Messungen unter Flussbedingungen korreliert werden, da die gleichen Stämme verwendet wurden. Auf Grund unterschiedlicher gemessener Parameter (optische Dichte einer aus dem Biofilm ausgewaschenen Kristallviolettlösung vs. Kolonie-bildende Einheiten) ist ein direkter Vergleich nicht möglich. Behelfsmäßig wurde in den folgenden Abbildungen der höchste gemessene Wert je Gruppe als Grundlage für die jeweilige Skala der y-Achse gewählt. Somit können Vermutungen über mögliche Zusammenhänge angestellt werden. Dargestellt sind in den folgenden Abbildungen jeweils die Mittelwerte der in beiden Biofilmsystemen getesteten individuellen *E. coli* Isolate.

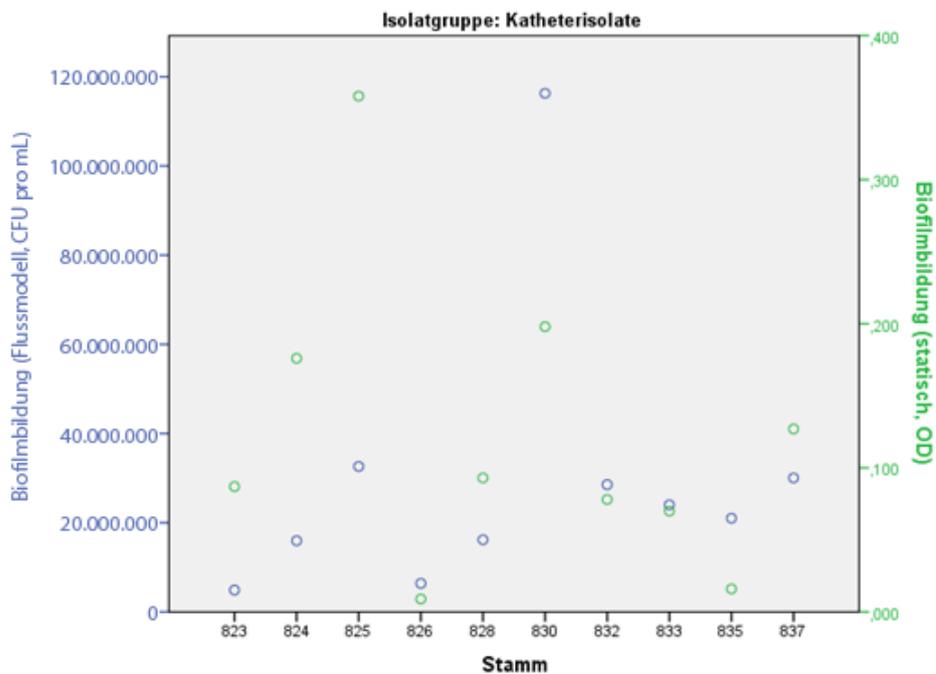


Abbildung 19: Vergleich der Biofilmbildung von Katheterisolaten in M63-Medium unter verschiedenen Anzuchtbedingungen (Fließbedingungen vs. statische Anzucht).

Der Vergleich der Biofilmbildung der Katheterisolate in beiden Biofilmmodellen in M63 Medium ist in Abbildung 19 dargestellt. Über alle gemessenen Katheterisolate in M63-Medium betrachtet, erscheint die Biofilmbildung im statischen Modell generell stärker zu sein als im Flussmodell. Ausnahmen bildeten die Isolate 826, 830 und 835, bei denen eine stärkere Biofilmbildung im Flussmodell als im statischen Modell gemessen wurde. Allgemein war das

Verhältnis der Biofilmbildung zwischen den Isolaten untereinander in beiden Modellen ähnlich: Stämme, die unter statischen Bedingungen stärkere Biofilm aufwiesen, zeigten diese Fähigkeit in ähnlichem Ausmaß auch unter Fließbedingungen. Ausnahmen bildeten die Isolate 830 und 835, bei denen die Biofilmbildung im Flussmodell deutlich höher war als unter statischen Bedingungen.

Der in Abbildung 20 dargestellte Vergleich der Biofilmbildung von Harnwegsinfekt-Isolaten zeigt, dass die Mehrzahl der Isolate im M63-Medium im statischen Modell eine durchschnittlich höhere Biofilmbildung als im Flussmodell aufwiesen. Ausnahmen waren die Isolate 1336, 1337 und 1339. Viele Isolate (368, 516, 587, 960, 1338, 1341) zeigten ähnliche Relationen der Stärke der Biofilmbildung in den beiden Modellen. Bei den Stämmen 1336 und 1340 kam es zu komplett unterschiedlichen Ergebnissen in Abhängigkeit vom verwendeten Biofilmmodell. Diese Isolate zeigten unter statischen Bedingungen entweder nur eine sehr schwache (Isolat 1336) oder aber eine sehr starke (Isolat 1340) Biofilmbildung. Das Isolat 1337 und in gewissem Ausmaß auch Isolat 1339 zeichneten sich durch eine vergleichsweise starke Biofilmbildung in beiden Biofilmsystemen aus.

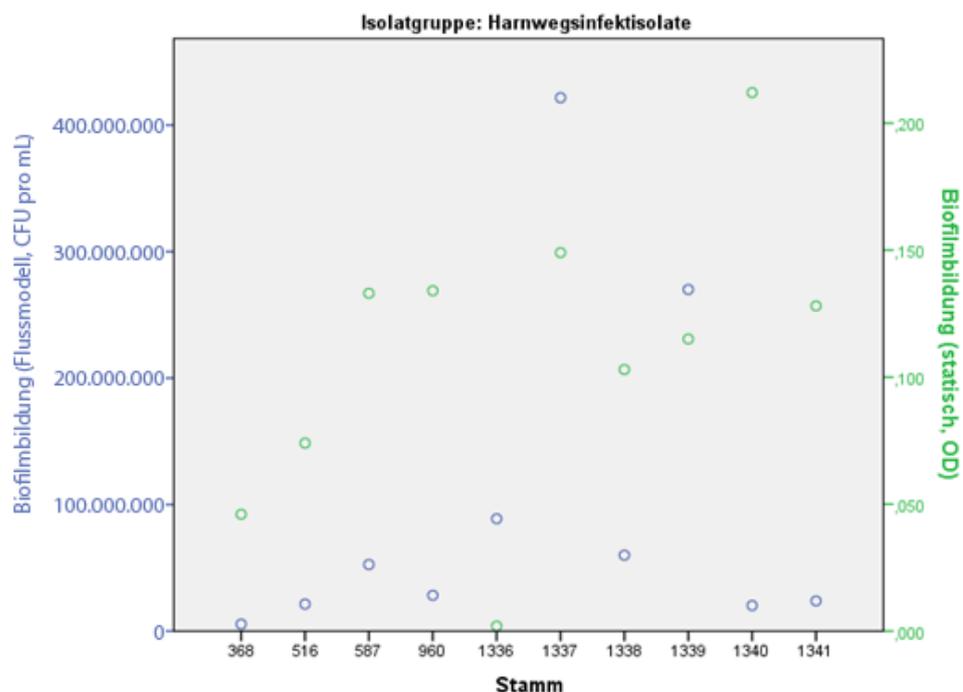


Abbildung 20: Vergleich der Biofilmbildung von Harnwegsinfekt-Isolaten in M63-Medium unter verschiedenen Anzuchtbedingungen (Fließbedingungen vs. statische Anzucht).

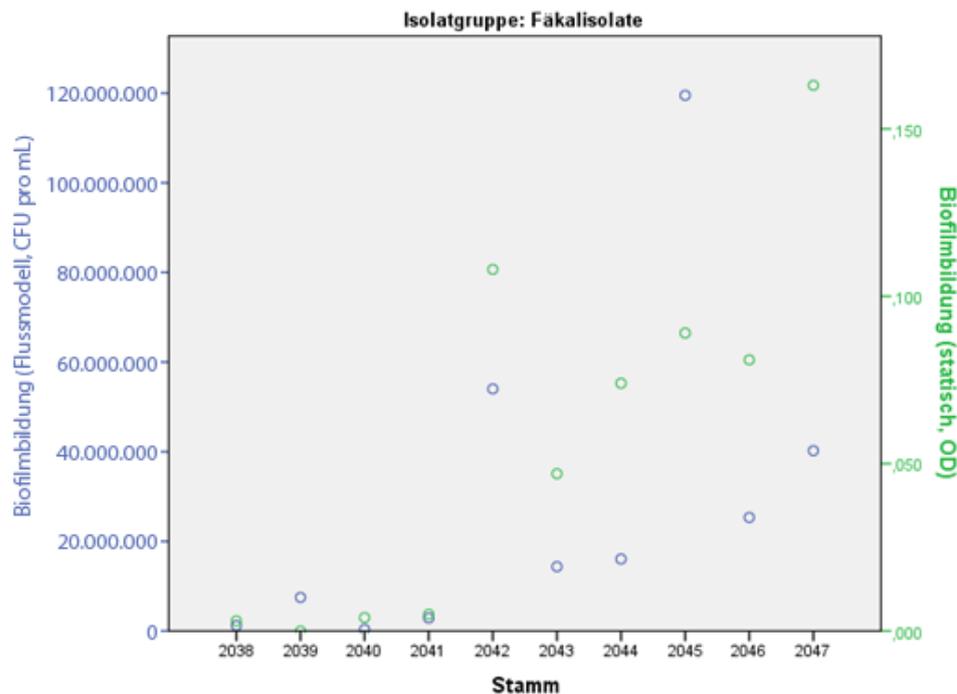


Abbildung 21: Vergleich der Biofilmbildung von Fäkal-Isolaten in M63-Medium unter verschiedenen Anzuchtbedingungen (Fließbedingungen vs. statische Anzucht).

Bei den Fäkalisolaten zeigte sich im M63-Medium ein gemischtes Bild. Bei den Isolaten 2038, 2039, 2040 und 2041 unterschieden sich die abgebildeten Werte zwischen statischer Messung und Flussmodell kaum und waren insgesamt sehr niedrig (Abbildung 21). Bei den übrigen Isolaten konnten wieder gleiche Tendenzen beobachtet werden, d. h. eine stärkere Biofilmbildung im statischen Modell als unter Fließbedingungen (Abbildung 19).

Ähnliche Ergebnisse ergab der Vergleich der Ergebnisse der Biofilmmessungen im Urinmedium. Zu beachten ist, dass hier unterschiedliche Medien verwendet wurden: Im statischen Modell wurden die Versuche mit humanem Sammelurin durchgeführt. Im Flussmodell wurden die Versuche mit Artificial Urine Medium durchgeführt.

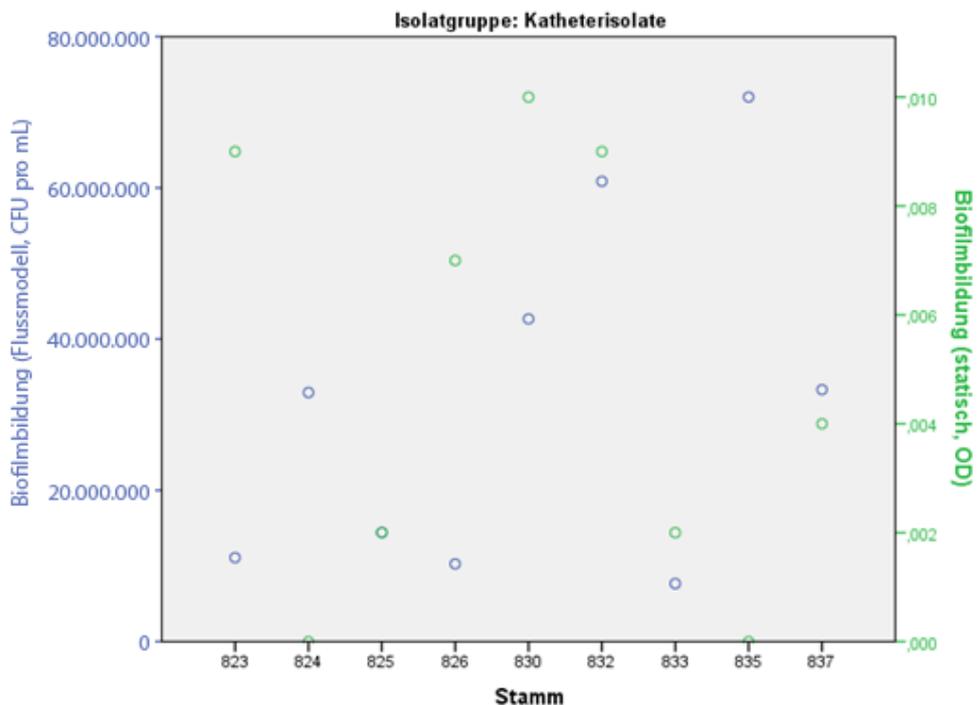


Abbildung 22: Vergleich der Biofilmbildung von Katheterisolaten in Urin unter verschiedenen Anzuchtbedingungen (Fließbedingungen, Artificial Urine Medium vs. statische Anzucht, humaner Sammelurin).

Katheterisolate zeigten hinsichtlich ihrer Biofilmbildung in Urin bzw. Artificial Urine Medium ein gemischtes Bild (Abbildung 22). Viele der getesteten Isolate zeigten wieder eine stärkere Biofilmbildung unter statischen als unter Fließbedingungen. Nur die Stämme 824, 835, 837 bildeten im Flussmodell mehr Biofilm als in der Mikrotiterplatte. Insgesamt war das Ausmaß der Biofilmbildung der Stämme untereinander im jeweiligen Modell häufig vergleichbar, mit einer leichten Tendenz zu vermehrter Biofilmbildung im statischen Modell.

Bei den Isolaten von Harnwegsinfekten wiesen die Stämme 516, 960, 1340 und 1341 eine deutlich stärkere Biofilmbildung im statischen Modell als im Flussmodell auf (Abbildung 23). Andererseits fiel die Biofilmbildung im Flussmodell bei anderen Stämmen (Isolate 587, 1337, 1338, 1339) ähnlich oder sogar stärker aus als unter statischen Bedingungen, so dass sich für die Fähigkeit zur Biofilmgruppe dieser Gruppe der Harnwegsinfekt-Isolate keine eindeutige Aussage treffen lässt.

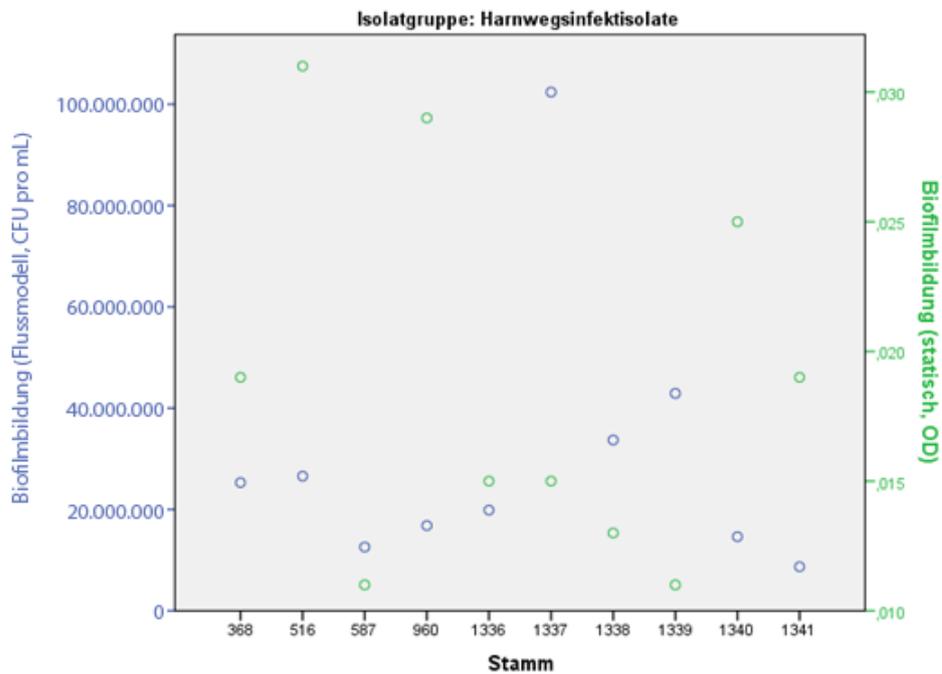


Abbildung 23: Vergleich der Biofilmbildung von Harnwegsinfekt-Isolaten in Urin unter verschiedenen Anzuchtbedingungen (Fließbedingungen, Artificial Urine Medium vs. statische Anzucht, humaner Sammelurin).

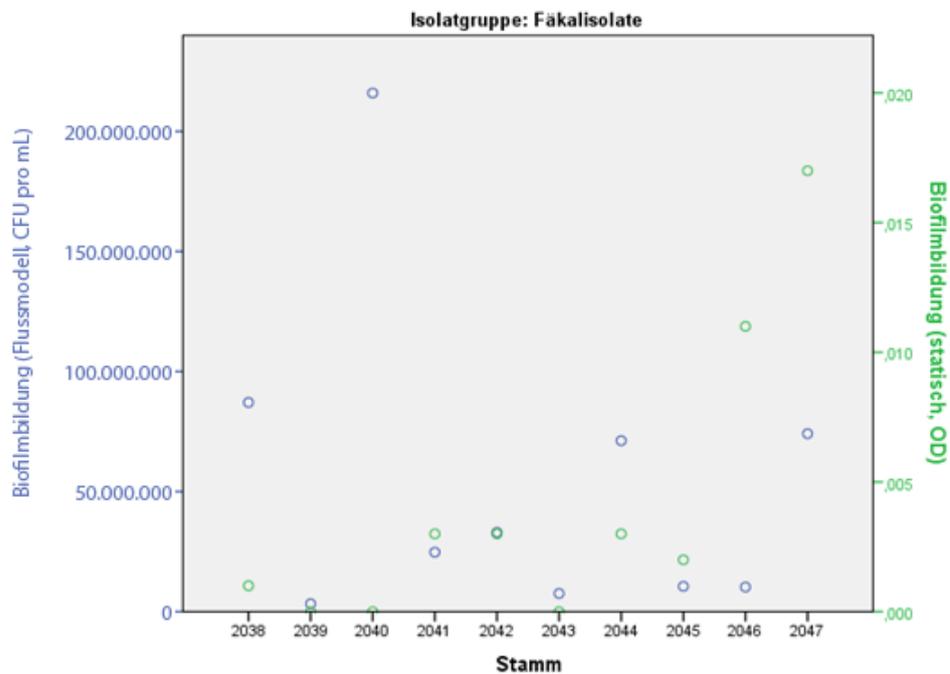


Abbildung 24: Vergleich der Biofilmbildung von Fäkal-Isolaten in Urin unter verschiedenen Anzuchtbedingungen (Fließbedingungen, Artificial Urine Medium vs. statische Anzucht, humaner Sammelurin).

Sechs der zehn getesteten Fäkalisolate zeigten im Urinmedium eine stärkere Biofilmbildung im Flussmodell als im statischen Modell (Abbildung 24). Bei Betrachtung der Absolutwerte fällt

hier unterstützend auf, dass die Biofilmbildung im statischen Modell generell schwächer ausfiel als in den anderen beiden Isolatgruppen. Die Biofilmbildung im Flussmodell ist hier im Vergleich zu den anderen Isolatgruppen tendenziell leicht erhöht.

Insgesamt scheint sich die Fähigkeit zur Biofilmbildung von *E. coli* Isolaten zwischen dem statischen Modell und dem Flussmodell durchaus zu unterscheiden, wobei bei den meisten Vergleichen eine höhere Biofilmmenge im statischen Modell gemessen wurde. Eine Ausnahme bildeten die Fäkalisolate bei Anzucht in Urin-Medium, in welchem die Biofilmbildung im Flussmodell leicht verstärkt erfolgte.

4.3 Prävalenz des *pga*-Operons in verschiedenen *E. coli*-Isolaten

Zur Verifizierung der Relevanz des *pga*-Operons wurden Primer zum Nachweis dieses Operon in *E. coli*-Stämmen entworfen. Dazu wurden aus der Ecocyc-Datenbank die Nukleotidsequenzen des *pga*-Operons der *E. coli* Stämme UTI89, ABU83972 sowie des *E. coli* K-12 Isolates MG1655 verglichen und Primerpaare zum Nachweis der *pgaCD*-Gene und des *pgaA*-Gens entworfen (Abbildung 25). Die Sequenzen dieser Primer sind in Tabelle 4 unter den Bezeichnungen PS8 und PS9 (Nachweis *pgaA*) sowie PS10 und PS11 (Nachweis *pgaD*) aufgeführt. Als Positivkontrolle diente der *E. coli* Stamm UTI89, als Negativkontrolle der Stamm UTI89 Δ *pgaABCD*.



Abbildung 25: Schematische Darstellung der Bindestellen der Primer PS8/PS9 sowie PS10/PS11 im *pga*-Operon.

Die PCR-Experimente wurden dankenswerterweise von Frau Olena Mantel (IFH, Münster) durchgeführt. Es wurden 39 Fäkalisolate, 50 Harnwegsinfekt-Isolate sowie 59 Dauerkatheter-Isolate getestet. Waren beide PCR-Tests (*pgaA* und *pgaD*) negativ, wurde der Stamm als *PGA*-negativ gewertet. Waren beide PCR-Tests positiv, wurde der Stamm als *PGA*-positiv gewertet. War ein PCR-Test positiv und damit nur eine der beiden Regionen des *pga*-Operons nachgewiesen, wurde der Test ebenfalls als *PGA*-positiv gewertet, da hier von einer geringfügigen Sequenzänderung im Genom und damit einer verschlechterten Primerbindung ausgegangen

wurde, welche dazu führte, dass keine Amplifikation des gewünschten Bereiches des *pga*-Operons erfolgte.

Von den 39 getesteten Fäkalisolaten wurden 27 (69 %) positiv auf die Anwesenheit des *pga*-Operons getestet. Von 50 getesteten Harnwegsinfekt-Isolaten besaßen 43 (86 %) das *pga*-Operon. Von 59 Dauerkatheter-Isolaten wurde in 41 Stämmen (67 %) das *pga*-Operon nachgewiesen (Abbildung 26). Zwischen Fäkal- und Harnwegsinfekt-Isolaten konnte kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Anwesenheit des *pga*-Operons nachgewiesen werden ($p = 0,066$), ebenso wenig zwischen Fäkalisolaten und Dauerkatheterisolaten ($p = 0,978$). Jedoch wurde in der getesteten Stichprobe das *pga*-Operon in Harnwegsinfektisolaten signifikant häufiger als in Dauerkatheterisolaten nachgewiesen ($p = 0,037$).

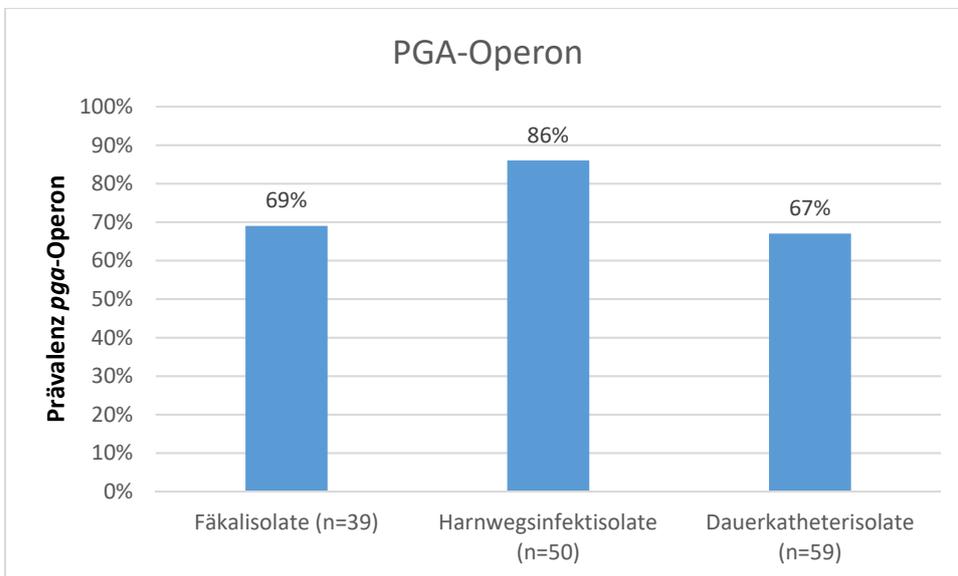


Abbildung 26: Nachweis des *pga*-Operons in den verschiedenen Isolatgruppen.

4.4 Herstellung der Reporterfusionen und der *csrA*-Deletion in *E. coli* Stamm UTI89

Wie im Methodenteil (3.5) beschrieben, wurden zunächst Varianten des *E. coli* Stammes UTI89 hergestellt, in denen das Gen, das für ein gelb fluoreszierendes Protein (*venus*) kodiert, direkt mit der Promotorregion von *pgaABCD* fusioniert wurde (UTI89*pgaA::venus*). Eine zweite Variante wurde hergestellt, in der das *venus* Gen im richtigen Leserahmen mit der kodierenden Sequenz von *pgaA* fusioniert wurde (UTI89*pgaA::pgaAvenus*). Die rekombinanten Stämme wurden per PCR kontrolliert (siehe 3.5.7). Dazu wurden Primer verwendet, die die

Genomregion, in der die Fusionen stattgefunden haben, amplifizieren sollten. Dieses ist in Abbildung 27 dargestellt.

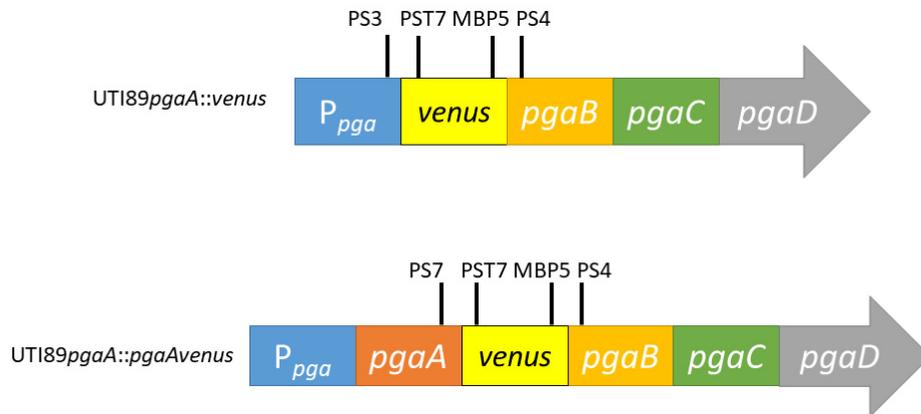


Abbildung 27: Primer-Bindungsstellen zur Kontrolle der generierten venus Transkriptions- oder Translationsfusionen im UTI89-Genom.

Nach der Kontroll-PCR und anschließender Gelelektrophorese zeigten sich PCR-Produkte, die die Größe aufwiesen (PS7/PST7 mit 310 bp, PS4/MBP5 mit 379 bp, PS3/PST7 mit 590 bp, PS4/MBP5 mit 379 bp). Ein beispielhafter Ausschnitt eines Agarosegels ist in Abbildung 28 dargestellt.

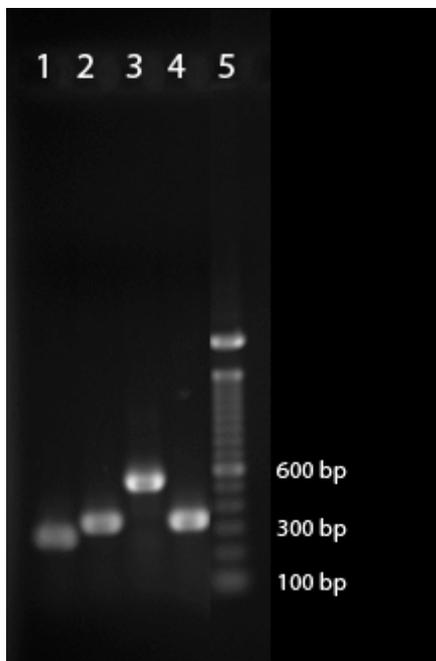


Abbildung 28: Agarosegel zur Kontrolle der korrekten Integration des venus Gens als Transkriptions- oder Translationsfusion in des pga-Operon. Relevante Bereiche von venus und dem pga-Operon wurden durch PCR amplifiziert durch Gelelektrophorese aufgetrennt.

Spur 1: UTI89pgaA::pgaAvenus mit PS7/PST7, Spur 2: UTI89pgaA::pgaAvenus mit PS4/MBP5, Spur 3: UTI89pgaA::venus mit PS3/PST7, Spur 4: UTI89pgaA::venus mit PS4/MBP5. Spur 5: 100 bp-Leiter.

Die Kontroll-PCR-Produkte wurden zudem sequenziert. Auch hier zeigte sich eine Übereinstimmung der amplifizierten Sequenz mit der erwarteten Sequenz. Ein beispielhafter Ausschnitt ist in Abbildung 29 dargestellt.

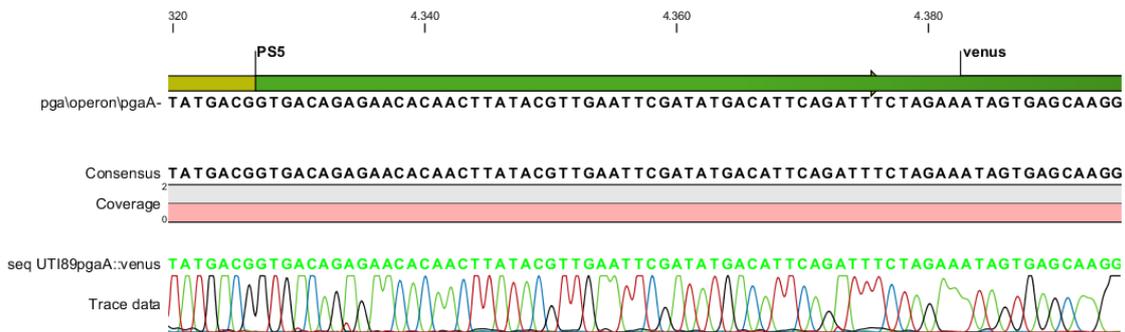


Abbildung 29: Vergleich der erwarteten Nukleotidsequenz der Reporterfusion und dem Ergebnis der Sequenzierung, beispielhaft dargestellt mit Sequenzier-Primer PSS.

Zusätzlich wurde in den beiden Reporterstämmen UTI89pgaA::venus und UTI89pgaA::pgaA-venus eine Teildeletion des *csrA* Gens vorgenommen. Dazu wurde zunächst das Plasmid pKD46::csrA per Elektroporation in die Stämme eingebracht und auf LB-Agar mit 100 µg/ml Ampicillin bei 30 °C ausplattiert (Schritt 1 in Abbildung 30). Eine Übernachtskultur dieser Stämme wurde anschließend mit 600 ng eines freundlicherweise von Dr. Nadine Rehm (IFH, Münster) zur Verfügung gestellten PCR-Produkts (hergestellt mit chromosomaler DNA des *E. coli* Stammes M1/5csrA51* als Template und den Primern *csrA51-Del-M15-up/csrA51-Del-M15-rev*) transformiert. Durch anschließende ortsspezifische Rekombination zwischen dem transformierten PCR-Produkt und dem bakteriellen Chromosom wurde die chromosomale Kopie von *csrA* des *E. coli* Stammes UTI89 am 3'-Ende verkürzt (Schritt 2 in Abbildung 30).

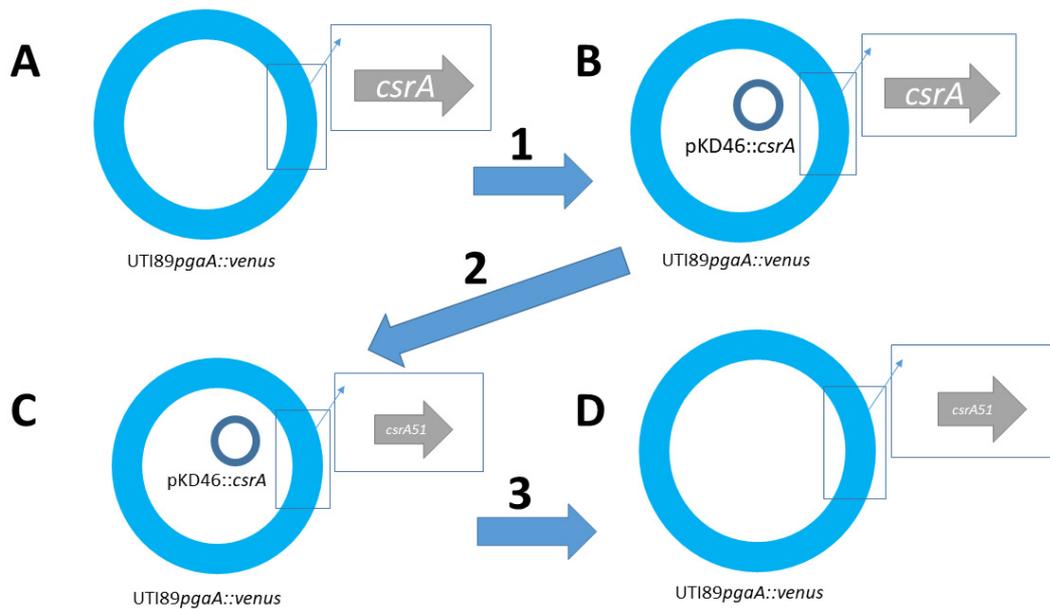


Abbildung 30: Schematische Darstellung der benötigten Rekombinationsschritte zur Verkürzung des *csrA* Gens im Reporterstamm *UTI89pgaA::venus*.

Das resultierende C-terminal um 11 Aminosäuren verkürzte *CsrA51* Protein hat eine verringerte Funktionalität. Durch *pKD46::csrA* lag in dem Stamm zusätzlich noch ein wildtypisches *csrA*-Gen vor. Die erzeugten Stämme mit dem C-terminal verkürzten *csrA* Gen wurden zunächst in 50 μ l H_2O bei 95 $^{\circ}C$ über 10 Minuten lysiert. Anschließend erfolgte eine Kontroll-PCR mit den Primern *csrA*-Prom-Seq und *csrA*-ctrl-as. Dabei zeigte sich eine erfolgreiche Verkürzung von *csrA* zu *csrA51* (erwartete Bandenlänge 737 bp im *csrA*-Wildtyp, 2.187 bp in der *csrA51*-Variante) (Abbildung 31).

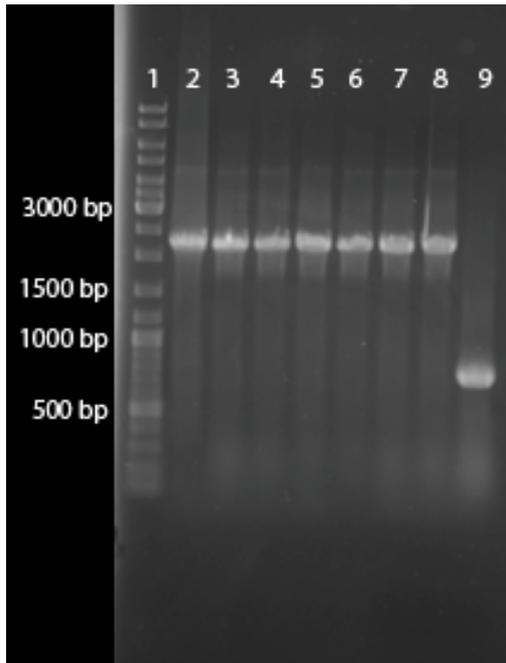


Abbildung 31: Agarosegel zur Kontrolle der *csrA::csrA51* Rekombination mittels der Primer *csrA-Prom-Seq* und *csrA-ctrl-as*.

Spur 1: 100 bp-10 kb-Kontrollleiter, Spur 2-4: *UT189pgaA::pgaA* *venus csrA::csrA51*, Spur 5: Positivkontrolle, Spur 6-8: *UT189pgaA::venus csrA::csrA51*, Spur 9: Negativkontrolle (Wildtyp)

Die PCR-kontrollierten Stämme wurden auf M9-Pyruvat-Agar bei 42 °C bebrütet, um das *pKD46::csrA*-Plasmid zu entfernen, so dass nur noch die verkürzte *csrA51* Version im Chromosom des *E. coli* Stammes UT189 übrig blieb (Schritt 3 in Abbildung 30). Anschließend wurde eine Kontroll-PCR mit den Primern *csrA-Prom-Seq* und *pKD4-ctrl-up* durchgeführt, dabei zeigte sich nur die mit 643 bp erwartete Bande für den Bereich um das verkürzte Gen *csrA51* (Abbildung 32). Die erfolgreiche Modifikation des *csrA* Gens wurde zusätzlich durch DNA-Sequenzierung überprüft. Zu diesem Zweck wurde der stromaufwärts liegende chromosomale Bereich zunächst mit den Primern 5' *csrA-ctrl* und *pKD4-ctrl-up* amplifiziert (Größe des PCR-Produktes: 807 bp) und das PCR-Produkt anschließend mit den Primern 5' *csrA-ctrl*, *csrA-Prom-Seq*, *csrA-Seq-rev* und *pKD4-ctrl-up* sequenziert. Analog erfolgte eine Amplifikation des stromabwärts von *csrA* liegenden chromosomalen Bereiches mit den Primern *pKD4-ctrl-down* und 3' *csrA-ctrl* (Größe des PCR-Produktes: 581 bp). Das entstandene PCR-Produkt wurde mit den Primern *pKD4-ctrl-down* und 3' *csrA-ctrl* sequenziert.



Abbildung 32: Agarosegel zum Nachweis der erfolgreichen Verkürzung des *csrA* Gens. Spur 1: 100 bp-10 kb-Kontrollleiter, Spur 2-4: *UT189pgaA::pgaAvenus csrA::csrA51*, Spur 5-7: *UT189pgaA::venus csrA::csrA51*

Zudem wurden die bei 42 °C inkubierten Mutanten auf LB-Agar mit Ampicillin ausgestrichen. Dabei zeigte sich erwartungsgemäß kein Wachstum nach Entfernung des Plasmids *pKD46::csrA*. Zusätzlich wurde eine Kontroll-PCR mit den Primern *pKD46-Seq1/pKD46-Seq2* zum Nachweis des Plasmid-Verlusts durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde der Stamm *UT189pgaA::pgaAvenus csrA::csrA51 pKD46::csrA* gewählt. Auch auf diese Weise konnte ein Verlust von *pKD46::csrA* nachgewiesen werden (Abbildung 33).

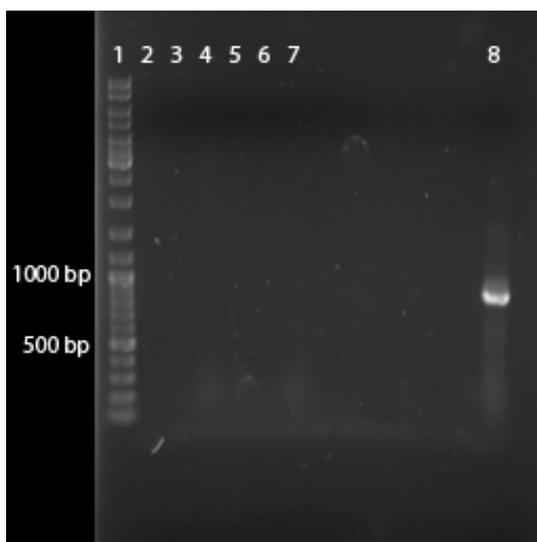


Abbildung 33: Agarosegel zum Nachweis der Entfernung von *pKD46::csrA*.

Spur 1: 100 bp-10 kb-Kontrollleiter, Spur 2-4: *UT189pgaA::pgaAvenus csrA::csrA51*, Spur 5-7: *UT189pgaA::venus csrA::csrA51*, Spur 8: Positivkontrolle *UT189pgaA::pgaAvenus csrA::csrA51 pKD46::csrA*.

5. Diskussion

Harnwegsinfektionen sind die häufigsten in Industriestaaten vorkommenden Infektionen mit sehr hohen direkten und indirekten Kosten für Gesundheitswesen und Gesellschaft. Eine besondere Rolle dabei spielen katheterassoziierte Harnwegsinfektionen: Etwa 95 % aller Harnwegsinfektionen sind mit der Verwendung eines Harnwegskatheters in Verbindung zu bringen (28), die Wahrscheinlichkeit einer Harnwegsinfektion steigt mit jedem Tag unter Verwendung eines Harnwegskatheters um 3 – 7 % (13). Ein Risikofaktor für Harnwegsinfektionen im Zusammenhang mit Harnwegskathetern ist die Möglichkeit von Bakterien, sich an das abiotische Material des Harnwegskatheters anzuheften und einen Biofilm zu bilden. Dadurch können sich Bakterien auch einer antibiotischen Therapie unzugänglich machen (19). Häufigster Erreger von Harnwegsinfektionen ist *E. coli* (30). Diese kommen physiologisch als Teil der menschlichen Darmflora vor. Als uropathogene *E. coli* (UPEC) können sie Auslöser von Harnwegsinfekten sein. Viele Virulenzfaktoren tragen zur Pathogenität von *E. coli* bei. Für die Biofilmbildung ist das Polysaccharid β -1,6-N-Acetyl-D-Glucosamin (PGA) von großer Bedeutung. Dieses ist Teil der extrazellulären Biofilmmatrix und sorgt damit für eine enge Verbindung zwischen den Bakterienzellen sowie zwischen den Bakterien und dem Substrat, hier z. B. dem Kathetermaterial.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Einflussfaktoren auf die Biofilmbildung von *E. coli* untersucht. Dazu wurden zunächst Bestandteile eines Urinmediums hinsichtlich der Beeinflussung der Biofilmbildung verglichen. Neben Einflüssen des Nährmediums wurde die Auswirkung eines Flussmodells auf die Biofilmbildung untersucht. Dabei wurden Isolate katheterassoziiierter Harnwegsinfektionen mit Isolaten von nicht-katheterassoziierten Harnwegsinfekten und Fäkalisolaten verglichen. Durch PCR-Untersuchung erfolgte die Erfassung der Prävalenz des *pgaABCD*-Operons in diesen drei Isolatgruppen.

Mittels Rekombination wurde das für ein gelb fluoreszierendes Protein kodierende Reportergen *venus* in den Laborstamm UTI89 eingebracht. Dies sollte die Untersuchung von Einflüssen auf die Aktivierung der Transkription und Translation von *pga* ermöglichen. Da das Carbon Storage Regulator-System (Csr) einen großen Einfluss auf die Regulation der Expression von *pga* besitzt, wurde in den Reportergenfusions-Stämmen auch eine *csrA*-Mutante hergestellt. Dadurch lässt sich der Einfluss des Csr Systems bei unterschiedlichen Aktivierungsstufen von *pga* unter verschiedenen Bedingungen untersuchen.

5.1 Diskussion der Studienmethodik

Viele Faktoren haben Einfluss auf die Biofilmbildung in Laborversuchen. Am Stamm *Pseudomonas aeruginosa* konnte gezeigt werden, dass bereits die Inokulationsmethode Einfluss auf Menge und Größe der gebildeten Biofilmkolonien hat: Die Inokulation einer Flüssigkultur von einer Agarplatte führte zu signifikant größeren Biofilmkolonien und Biofilmmengen als beispielsweise die Inokulation aus einer Übernachtskultur (44). Die Verwendung einer optimalen Methode zur Messung von Biofilm ist ein kontroverses Thema. Azeredo et al. verglichen verschiedene Methoden zur Messung von Biofilm (4). Im Vergleich des klassischen Mikrotiter-Assays mit neueren Methoden, die z. B. Scherstress durch Medienfluss erzeugen, sahen sie bedeutende Unterschiede und schlossen daraus, dass es wichtig sei die richtige Auswahl des zur Fragestellung passenden Biofilm-Modells zu treffen. Das in dieser Arbeit verwendete Modell wird nicht explizit diskutiert. Ein kontinuierlicher Mediennachschub erscheint für die Fragestellung dieser Studie sinnvoll. Eine Erzeugung eines Scherstresses durch Luftblasen erscheint zunächst nachteilig, da in der menschlichen Blase keine Luft vorkommen sollte, ließ sich im gewählten Aufbau allerdings nicht anders umsetzen. Menzel et al. (53) entwickelten ein Flussmodell, welches dem in dieser Arbeit verwendeten Modell ähnelt. In ihrem Versuchsaufbau verglichen sie die Biofilmbildung auf Glas und Stahl in einem Flussmodell. Hierbei fand ein in festen zeitlichen Abständen getakteter Medienaustausch statt. Verwendet wurde der Laborstamm *E. coli* W3310. Die Quantifizierung der Biofilmbildung erfolgte anschließend durch Färbung mit DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol) und Messung mittels Epifluoreszenzmikroskop. Als Nährmedium wurde ein 1:25 verdünntes M63-Medium verwendet. Dieser Studienaufbau ist für die vorliegende Arbeit insofern interessant, als dass er eine alternative Methode zum Medienaustausch anbietet. In der vorliegenden Arbeit wurde ein kontinuierlicher Austausch des Nährmediums vorgenommen. Keine der beiden Methoden entspricht jedoch den tatsächlichen Bedingungen in Form eines regelmäßigen Zuflusses durch die Urinproduktion der Nieren sowie einem intermittierenden Abfluss analog zur Miktion. Bezogen auf die Fragestellung nach katheterassoziierten Harnwegsinfektionen ist die in dieser Arbeit angewandte Methodik jedoch als die realistischste anzusehen: Ein kontinuierlicher Zufluss, ähnlich der Produktion durch die Nieren, ist verbunden mit einem kontinuierlichen Medienabfluss, wie er auch bei einem katheterisierten Patienten vorliegt. Auch bietet die in dieser Arbeit angewendete Methodik einen kontinuierlichen Scherstress.

Neben der Methodik zum Wachstum des Biofilms ist auch die Messung des gebildeten Biofilms von Relevanz. Auch dazu existieren verschiedene Methoden, die von Azeredo et al. hinterfragt wurden (4): bei der in diesem Aufbau verwendeten Quantifizierung von kolonieformenden Einheiten (CFU) sei nicht auszuschließen, dass nicht alle Biofilmzellen vom Messgerät abgeschert wurden. Auch könne man nicht voraussetzen, dass alle abgescherten Zellen auf dem gewählten Kulturmedium wachsen. Das Argument eines nicht vollständigen Abscherens des gebildeten Biofilms ist in dem im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchsaufbau nicht auszuschließen. Durch gleiche Bedingungen bei allen Messungen wurde eine Vergleichbarkeit zwar angestrebt, unterschiedliche Adhäsionskräfte des gebildeten Biofilms an den Messspatel können jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Da die Ausplattierung der Vorkulturen auf dem gleichen LB-Agar stattfand wie die anschließende Ausplattierung zur Zählung der kolonieformenden Einheiten nach der Messung, ist davon auszugehen dass die Kulturen auf diesem Nährmedium wachsen konnten. Unbenommen davon wären natürlich im Verlauf der Fermenter-Bebrütung entstandene Mutationen, die auf LB-Agar eventuell nicht wachstumsfähig sein könnten. Dennoch erscheint die in dieser Studie gewählte Methodik im Vergleich zu anderen aufwändigeren Methoden eine sinnvolle Variante.

Für zukünftige Untersuchungen wäre ein noch langsamerer Austausch des Mediums wünschenswert. Dies war durch den experimentellen Aufbau bedingt (minimale Einstellung der Pumpen) nicht möglich. Der Austausch des Mediums erfolgte bereits ca. alle zwei Stunden, während die durchschnittliche Miktionsfrequenz Erwachsener bei vier bis sieben Blasenentleerungen pro Tag, also 3,5 – 6 Stunden liegt. Allerdings steigt die Miktionsfrequenz bei einer Blasenentzündung häufig an (Pollakisurie), so dass dies in Kauf genommen werden konnte. Eine Limitation dieser Studie sind die fehlenden Informationen zu den Ursprüngen der Isolate. Es liegen keinerlei Informationen über Begleiterkrankungen vor, die weiteren Einfluss auf die Entwicklung der Stämme gehabt haben könnten. Beispielsweise sei ein Diabetes mellitus genannt, der bei schlechter Einstellung erhöhte Konzentrationen von Glukose im Urin verursachen kann und somit andere Wachstumsbedingungen schafft. Auch über die Dauer der Lage von Dauerkathetern vor Gewinnung der Isolate sind keine Informationen vorhanden. Ebenfalls wäre interessant zu wissen, ob es sich um Erstinfektionen oder rekurrende Infektionen handelte. Gerade eine erneute Harnwegsinfektion könnte Hinweise auf Anpassungsmechanismen und Persistenz von biofilmbildenden Bakterien geben.

5.2 Analyse der biofilmbeeinflussenden Substanzen in Urin

Viele Studien verwenden zur Analyse der Biofilmbildung von *E. coli* im Zusammenhang mit Harnwegsinfekten herkömmliche Labormedien wie LB oder M63. Bereits Naves et al. belegten, dass die Auswahl des Mediums einen großen Einfluss auf die Messergebnisse von Biofilm-Assays zeigen – verwendet wurden hier die Medien LB, M9 und M63 (59). Zum gleichen Schluss kamen auch Reisner et al. beim Vergleich von LB, einem Minimalmedium unter Zusatz von Glucose oder Casaminosäuren, Urin und Mukus (65). Anna Laumen konnte zeigen, dass sich die Biofilmbildung zwischen dem Labormedium M63 und Sammelurin insofern unterscheidet, als dass die Biofilmbildung unter statischen Bedingungen in M63 signifikant höher ausfällt als in Sammelurin (48). Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit Bestandteile eines künstlichen Urinmediums (11) auf ihre Auswirkungen auf die Biofilmbildung untersucht. Dabei zeigte sich, dass in einem statischen Modell die Urin-Bestandteile Harnstoff, Kreatinin, Harnsäure, Eisen(II)Sulfat und Kochsalz zu einer signifikant geringeren Biofilmbildung führen. Die verringerte Biofilmbildung unter Einfluss von Eisen(II)sulfat deckt sich mit Ergebnissen von Hancock et al., die eine signifikante Verringerung der Biofilmbildung von *E. coli* UT183972 für Zink und Cobalt zeigen konnten (34). Im Gegensatz zu dem Ergebnis der verringerten Biofilmbildung unter Einfluss von Eisen(II)sulfat konnten Hancock et al. zeigen, dass die Zuführung von freiem Eisen die Biofilmbildung der *E. coli* Stämme 83972, VR50 und VR89 steigerte (35). Es bleibt die Frage zu klären, warum freies Eisen zu einer Steigerung der Biofilmbildung führte, während das im Urinmedium enthaltene Eisen(II)sulfat die Biofilmbildung verringerte. Dazu wäre zunächst interessant, beide Zusätze mit dem gleichen Bakterienstamm zu vergleichen. Magnesiumsulfat führt in der vorliegenden Arbeit sowohl zu einem vermehrten Bakterienwachstum als auch zu einer vermehrten Biofilmbildung. Dabei ist die vermehrte Biofilmbildung wohl auf ein stärkeres Bakterienwachstum zurück zu führen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die meisten Bestandteile des Urins zu einer Verringerung der Biofilmbildung von *E. coli* beitragen und somit einen protektiven Effekt bezüglich einer Biofilmbildung besitzen. Es hinterfragt die Methodik, Biofilmmessungen von harnwegsinfektassoziierten *E. coli* in Labormedien wie LB oder M63 durchzuführen, da hier offenbar zu hohe Werte gemessen werden. Die Verwendung von Sammelurin ergibt einerseits Ergebnisse unter realistischeren Bedingungen. Andererseits handelt es sich hierbei um ein Medium mit schlecht reproduzierbarer Zusammensetzung. Daher erscheint die Verwendung des Artificial Urine Mediums (11) ein adäquater Weg zur Untersuchung von harnwegsinfektassoziierten *E. coli*-Stämmen. Eine Vergleichbar-

keit von Sammelurin und Artificial Urine Medium nach Brooks und Keevil wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt.

In den letzten Jahren wurden zusätzlich intrazelluläre biofilmähnliche Ansiedlungen von *E. coli* in Epithelzellen der Harnblase beschrieben (38). Diese wurden als **Intracellular bacterial communities (IBC)** benannt. Dies ist interessant, da im Intrazellulärraum andere Nährsubstrate für Bakterien zur Verfügung stehen. Eine Untersuchung der Auswirkung von Bestandteilen des Zytoplasmas von Epithelzellen der Blase auf die Biofilmbildung uropathogener *E. coli* könnte weitere Hinweise auf den Einfluss von Umgebungsbedingungen auf die Biofilmbildung liefern.

5.3 Vergleich von Modellen zur Messung von Biofilm

Die Messung von Biofilm in Mikrotiterplatten ist ein etabliertes Verfahren. Es ermöglicht die unkomplizierte und verhältnismäßig unaufwändige Messung von Biofilmbildung eines Bakterienstammes an einer künstlichen Oberfläche. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von Unterschieden zwischen dem etablierten Mikrotiterplatten-Test und einem neuen, komplexeren Verfahren. Gewählt wurde hierfür ein Flussmodell mit kontinuierlichem Austausch des Mediums und der zusätzlichen Erzeugung eines Scherstressses.

5.3.1 Biofilmbildung im Flussmodell

Unter Flussbedingungen zeigten sich bezüglich der Biofilmbildung sowohl in M63-Medium als auch im Artificial Urine Medium keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen Fäkalisolate, Harnwegsinfektisolat und katheterassoziierte Harnwegsinfektisolat. Unter Flussbedingungen scheint also der Ursprung eines Isolats beziehungsweise die ausgelöste Krankheitsentität nicht durch die Fähigkeit zur Biofilmbildung eines Stammes beeinflusst zu sein. Andererseits konnte auch im Flussmodell nachgewiesen werden, dass in den Isolatgruppen Harnwegsinfektisolat und Fäkalisolat ein signifikanter Unterschied zwischen der Biofilmbildung im Labormedium M63 und dem Artificial Urine Medium bestand. Interessant hierbei ist, dass die Biofilmbildung bei Harnwegsinfektisolaten in M63 stärker ausgeprägt war, während bei den Fäkalisolaten das Artificial Urine Medium zu einer vermehrten Biofilmbildung führte. Daraus lässt sich allerdings am ehesten ablesen, dass ein Urinmedium auf Harnwegsinfektisolat eher einen negativen Effekt in Bezug auf die Biofilmbildung ausübt. Bei Fäkalisolaten scheint hingegen die Biofilmbildung durch Artificial Urine Medium gefördert zu werden.

Eine häufige Eintrittspforte für unkomplizierte Harnwegsinfektionen ist eine unzureichende Hygiene im Intimbereich, so dass Fäkalkeime in den Harnweg verschleppt werden. Auf diesem Weg scheint nun jedoch eine Veränderung der Biofilmmfitness von *E. coli* stattzufinden, so dass das Urinmedium von einer ursprünglich Biofilm-begünstigenden Umgebung zu einer Biofilm-unterdrückenden Umgebung wird. Insofern wäre es interessant, eine Verlaufsstudie durchzuführen, während derer die Entwicklung von Biofilmmfitnessfaktoren von Fäkalisolaten im Laufe einer Harnwegsinfektion untersucht wird. Auffällig sind die hohen Schwankungsbreiten der Messergebnisse im Flussmodell. Sie zeigen eindrucksvoll, dass sich Isolate aus natürlichen Reservoiren nicht komplett ähnlich sind, sondern deutliche Unterschiede aufweisen. Hieraus kann geschlossen werden, dass Ergebnisse aus Untersuchungen mit Laborstämmen nicht zwingend die Realität abbilden. Vielmehr sind Untersuchungen mit repräsentativen Gruppen von Isolaten nötig, um ein realistisches Bild bei Untersuchungen zu erhalten. Dies deckt sich mit Ergebnissen von Reisner et al., die im Vergleich von fäkalen Stämmen, Stämmen aus Diarrhöen und Blutisolaten ebenfalls eine große Variabilität der Biofilmbildung von Nicht-Laborstämmen feststellen konnten (65).

5.3.2 Vergleich des statischen Modells und des Flussmodells

Das herkömmliche Modell einer 96-Well-Platte verwendet Platten aus Vinyl (16). Herkömmliche Urinkatheter sind aus Latex oder Silikon gefertigt (61). In der vorliegenden Arbeit wurde Glas als Grundlage für die Biofilmbildung verwendet. Allen genannten Materialien ist gemein, dass es sich um abiotische Oberflächen handelt. Nichts desto trotz handelt es sich um unterschiedliche Materialien, die andere Oberflächeneigenschaften aufweisen. Damit könnten auch verschiedene Bedingungen für die Anheftung von bakteriellen Biofilmen gegeben sein. Interessant wäre also in weiteren Untersuchungen eine Methode zu entwickeln, die die Biofilmbildung von *E. coli* auf unterschiedlichen Oberflächen vergleicht. Dadurch könnten weitere Hinweise auf die Relevanz der etablierten Biofilmtests gefunden werden. Ein Vergleich der verschiedenen Messmethoden ist allerdings schwierig bis gar nicht möglich. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Versuch unternommen, das statische Modell und Flussmodell an bekannten Isolaten zu vergleichen. Dieser Vergleich ist jedoch sehr vorsichtig zu interpretieren. Im Vergleich der Absolutwerte beider Verfahren fiel besonders auf, dass im statischen Modell die Biofilmbildung von Fäkalisolaten geringer als die der Vergleichsgruppen ausfiel, während die Biofilmbildung im Flussmodell höhere Werte widerspiegelte. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Modelle unter bestimmten Bedingungen unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Biofilmbildung liefern. Daher ist die Wahl des für die Fragestellung richtigen Modells als sehr

wichtig anzusehen. Dies belegen auch andere Studien. Itoh et al. (39) beschrieben, dass der Biofilmmatrix-Bestandteil PGA im Gegensatz zu anderen Spezies wie Pseudomonaden unter Scherbedingungen schnell im Medium gelöst wird und nicht stark an der Bakterienoberfläche verankert ist.

5.4 Bedeutung der Biofilmbildung für katheterassoziierte Harnwegsinfektionen

Die Untersuchungen im Flussmodell konnten weder in M63 noch im Artificial Urine Medium eine vermehrte Biofilmbildung von *E. coli*-Isolaten katheterassoziierter Harnwegsinfektionen zeigen. Dies steht im Gegensatz zu Untersuchungen von Anna Laumen im statischen Biofilmmodell (48), die eine vermehrte Biofilmbildung im Sammelurin von Harnwegsinfektisolaten gegenüber von katheterassozierten Harnwegsinfektisolaten und Fäkalisolaten feststellen konnte. Unter Flussbedingungen scheint die Biofilmbildung der untersuchten *E. coli* Stämme kein Fitnessfaktor für die Verursachung katheterassoziierter Harnwegsinfektionen zu sein. Erst kürzlich konnten Bardoloi & Babu ebenfalls zeigen, dass Isolate katheterassoziierter Harnwegsinfektionen signifikant weniger Biofilm bildeten als Harnwegsinfektisolate (5). Dies unterstützt die These, dass Erreger katheterassoziierter Harnwegsinfektionen keine besonderen Fähigkeiten zur Biofilmbildung besitzen. Vielmehr ist von einem akzidentellen Eintrag von Erregern durch ungenügende Hygienemaßnahmen auszugehen, da sich die Fäkalisolate von den restlichen Untersuchungsgruppen in Bezug auf die Biofilmbildung nicht unterscheiden. Fäkale *E. coli* gelten als häufigste Erreger von Harnwegsinfektionen (41). Interessant wäre hingegen herauszufinden, inwiefern sich katheterassoziierte Harnwegsinfekterreger im Laufe der Zeit an ihre neue Nische anpassen. Dazu wären Biofilmuntersuchungen in einem Langzeitmodell hilfreich. Dabei sollten auch möglichst in Harnwegskathetern verwendete Materialien zum Einsatz kommen. Allerdings stellt European Association of Urology in einem Review fest, dass das Material des Katheters und mögliche antimikrobielle Beschichtungen bezüglich der Entstehung von katheterassozierten Harnwegsinfektionen bei einer Katheterisierungsdauer länger als eine Woche keine Vorteile bieten (74).

5.5 PGA als Teil der Biofilmmatrix

PGA gilt als ein bedeutender Faktor für die Biofilmbildung von *E. coli*. Als Adhäsion vermittelt es die Bindung von Zellen untereinander als auch die Bindung an abiotische Oberflächen (77). Anna Laumen konnte zeigen, dass im LB + 0,5 % Glucose-Medium nur 13,6 % der untersuchten Dauerkatheterisolate, 12,8 % der Harnwegsinfektisolate und 4,0 % der Fäkalisolate in

einem Immuno-Dot Blot PGA exprimierten (48). In M63 und Sammelurin fiel der Anteil der PGA-exprimierenden Stämme noch geringer aus. In der vorliegenden Arbeit konnte durch Entwicklung von Primern zur Amplifikation des *pgaABCD*-Genlokus gezeigt werden, dass 67 % der Katheterisolate zumindest das Gencluster für PGA tragen, sogar 86 % der Harnwegsinfektisolate. Auch 69 % der Fäkalisolate besaßen das *pga* Operon. Die Tatsache, dass Fäkalisolate und Katheterisolate etwa gleich häufig das Gen tragen, aber ungleich exprimieren, lässt verschiedene Einflussfaktoren auf die Expression vermuten. Bereits gezeigt werden konnte, dass das Wachstumsmedium einen Einfluss auf die Expression von PGA hat (48). Auch scheinen unterschiedliche Reservoirs wie Harntrakt und Intestinaltrakt einen Einfluss auf die Expression zu besitzen. Fraglich ist hierbei, ob dies bereits durch unterschiedliche Ausgangseigenschaften der besiedelnden Stämme begründet ist, die sie für ein Reservoir prädestiniert, oder ob sie sich im Laufe der Besiedlung an ihre neue Nische anpassen. Welche Bestandteile von Nährmedien einen Einfluss auf die geringe Expression des *pga* Operons im Vergleich zur genetischen Verfügbarkeit haben, wäre ebenfalls eine spannende Frage. Diese Untersuchungen könnten beispielsweise mit dem im Rahmen dieser Arbeit angefertigten Reporterstamm durchgeführt werden.

5.5.1 Reporterstammfusionen zur Bestimmung der PGA-Expression

Frühere Arbeiten untersuchten, welcher Anteil von Isolatgruppen tatsächlich PGA exprimiert (48). Mit Hilfe von Antikörpern wurde im Immuno-Dot-Blot gezeigt, dass in LB-Medium einerseits nur ein geringer Prozentsatz von untersuchten *E. coli* Stämmen PGA exprimierte. Zum anderen war der Prozentsatz bei Harnwegsinfektisolaten (4,0 %) noch deutlich geringer als bei katheterassoziierten Harnwegsinfektisolaten (13,6 %) und Fäkalisolaten (12,8 %). In M63-Medium war die PGA-Produktion im Vergleich noch geringer. Ein ähnliches Verfahren zum Nachweis von PGA nutzten auch Boehm et al. (10) bei ihrer Untersuchung des Einflusses subinhibitorischer Antibiotikakonzentrationen auf die PGA-Produktion.

In dieser Arbeit wurde die Prävalenz des *pga*-Operons mittels PCR bei Erregern katheterassoziierter Harnwegsinfekte, nicht-katheterassoziierter Harnwegsinfekterreger und bei Fäkalisolaten untersucht. Die hohe Differenz zwischen Expression von *pga* (4,0 – 13,6 %) im Vergleich zum Vorhandensein des *pga*-Genclusters (67 – 86 %) wirft die interessante Frage auf, welche Einflüsse zu einer Expression von PGA führen. Erste Ansätze konnte Anna Laumen zeigen durch die Erkenntnis, dass in M63-Medium noch weniger Stämme PGA exprimierten als in LB-Medium (48). Cerca & Jefferson konnten zeigen, dass Zusatz von 1 % NaCl und 1 % Ethanol in

TSB-Medium zu einer verstärkten Promotoraktivität von *pgaABCD* führt (14). In der selben Arbeit konnten sie zeigen, dass eine höhere Expression bei 37 °C als bei 21 °C zu beobachten ist und die höchste Expression in der stationären Wachstumsphase stattfindet. Weiterhin fraglich ist, wie eventuell verschiedene Urinbestandteile Einfluss darauf nehmen. Hierzu kann die in dieser Arbeit hergestellte Reporterengenfusion beitragen: Mittels kontinuierlicher oder intermittierender Messung der Fluoreszenz der Stämme kann eine Entwicklung der *pga*-Expression unter verschiedenen Umweltbedingungen ermittelt werden. Auch die Untersuchung verschiedener Medienbestandteile ist hierdurch möglich. Durch die Schaffung einer *csrA*-Mutante der Reporterengestämme ist es zusätzlich möglich, auf dem Csr Pathway beruhende Veränderungen der *pga*-Regulation zu identifizieren.

5.6 Fazit

Im Rahmen dieser Arbeit konnten neue Erkenntnisse zur Biofilmbildung als Risikofaktor für katheterassoziierte Harnwegsinfektionen gewonnen werden. Wichtige Werkzeuge zur weiteren Untersuchung der Bedeutung von PGA als Teil der Biofilmmatrix wurden geschaffen. Es konnte gezeigt werden, dass die Auswahl des Nährmediums von entscheidender Bedeutung für die Messung von Biofilmbildung ist. Ein urinähnliches Medium führt zu geringerer Biofilmbildung als das Labormedium M63. Verschiedene Bestandteile des Urinmediums haben einen protektiven Einfluss und führen zu einer geringeren Biofilmbildung. Dies konnte für Harnstoff, Kreatinin, Harnsäure, Eisen(II)Sulfat und Kochsalz gezeigt werden. Magnesiumsulfat hingegen führt sowohl zu einem vermehrten Bakterienwachstum als auch zu einer vermehrten Biofilmbildung.

Die Verwendung eines Flussmodells zur Messung der Biofilmbildung zeigt keinen Unterschied zwischen den Isolaten katheterassoziierter Harnwegsinfektionen, nicht-katheterassozierten Harnwegsinfektionen und Fäkalisolaten in Artificial Urine Medium und M63. Zwischen den Medien M63 und Artificial Urine Medium zeigten sich im Flussmodell teilweise Unterschiede in der Biofilmbildung. Diese unterschieden sich von den Ergebnissen in einem statischen Biofilmversuch. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Messmethode Einfluss auf die Einschätzung der Biofilmbildung von Isolaten hat.

Durch die Integration des Reportergens *venus* in das Genom von *E. coli* UTI89 sowie der zusätzlichen Deletion von *csrA* in diesem Reporterstamm wurde ein Werkzeug zur Messung der

pga Expression geschaffen. Damit können zukünftig Einflüsse auf die Expression von *pga* gemessen werden. Über die *csrA* Mutante kann zudem festgestellt werden, ob diese Einflüsse auf dem *pga*-regulierenden CsrA Protein beruhen. Damit kann weiter aufgeklärt werden, warum zwar ein großer Anteil von *E. coli*-Isolaten das *pga*-Operon trägt, es jedoch nur selten exprimiert wird.

Zusammenfassend ist die Auswahl von Medium und Messmethode zur Bestimmung von Biofilmbildung bei der Untersuchung katheterassoziierter Harnwegsinfektionen von entscheidender Bedeutung. In bisherigen Untersuchungen scheint der Einfluss der Biofilmbildung katheterassoziierter Harnwegsinfektstämme im Vergleich zu anderen *E. coli*-Isolaten zu hoch bewertet zu werden. Urinbestandteile haben einen überwiegend negativen Einfluss auf die Biofilmbildung. Weitere Untersuchungen mit den hergestellten Reporterstämmen sind notwendig, um die Ursache für die niedrige Expression von *pga* als Teil Biofilmmatrix von *E. coli* im Vergleich zur hohen Prävalenz zu untersuchen.

6. Literaturverzeichnis

1. Anderson GG, Martin SM, Hultgren SJ (2004) Host subversion by formation of intracellular bacterial communities in the urinary tract. *Microbes Infect* 6: 1094–1101
2. Anderson GG, Dodson KW, Hooton TM, Hultgren SJ (2004) Intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Trends Microbiol* 12: 424–430
3. Archambaud M, Courcoux P, Labigne-Roussel A (1988) Detection by molecular hybridization of *pap*, *afa*, and *sea* adherence systems in *Escherichia coli* strains associated with urinary and enteral infections. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 139: 575–588
4. Azeredo J, Azevedo NF, Briandet R, Cerca N, Coenye T, Costa AR et al. (2017) Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol* 43: 313–351
5. Bardoloi V, Yogeesh Babu K V (2017) Comparative study of isolates from community-acquired and catheter-associated urinary tract infections with reference to biofilm-producing property, antibiotic sensitivity and multi-drug resistance. *J Med Microbiol* 66: 927–936
6. Barnhart MM, Chapman MR (2006) Curli Biogenesis and Function. *Annu Rev Microbiol* 60 : 131–147
7. Bergsten G, Wullt B, Svanborg C (2005) *Escherichia coli*, fimbriae, bacterial persistence and host response induction in the human urinary tract. *Int J Med Microbiol* 295: 487–502
8. Bethesda, Research, Laboratories (1986) BRL pUC host: *E. coli* DH5α competent cells. *Bethesda Res Lab Focus* 8: 9–12
9. Blattner FR, Plunkett III G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M et al. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277: 1453–1462
10. Boehm A, Steiner S, Zaehring F, Casanova A, Hamburger F, Ritz D et al. (2009) Second messenger signalling governs *Escherichia coli* biofilm induction upon

ribosomal stress. *Mol Microbiol* 72: 1500–1516

11. Brooks T, Keevil CW (1997) A simple artificial urine for the growth of urinary pathogens. *Lett Appl Microbiol* 24: 203–206
12. Cabrera JE, Jin DJ (2003) The distribution of RNA polymerase in *Escherichia coli* is dynamic and sensitive to environmental cues. *Mol Microbiol* 50: 1493–1505
13. Centers for Disease Control and Prevention (2018) Urinary Tract Infection (Catheter-Associated Urinary Tract Infection [CAUTI] and Non-Catheter-Associated Urinary Tract Infection [UTI]) and Other Urinary System Infection [USI] Events. NHSN Patient Safety Component Manual, chapter 7; online verfügbar unter: https://www.cdc.gov/nhsn/pdfs/pscmanual/pscmanual_current.pdf (Letzter Zugriff: 6.6.2019)
14. Cerca N, Jefferson KK (2008) Effect of growth conditions on poly-N-acetylglucosamine expression and biofilm formation in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 283: 36–41
15. Chen SL, Hung C-S, Xu J, Reigstad CS, Magrini V, Sabo A et al. (2006) Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of *Escherichia coli*: a comparative genomics approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 5977–5982
16. Coffey BM, Anderson GG (2014) Biofilm Formation in the 96-Well Microtiter Plate. In: Filloux A, Ramos J-L (Hrsg) *Pseudomonas Methods and Protocols*. Springer New York, New York, 631–641
17. Connell H, Agace W, Klemm P, Schembri M, Märild S, Svanborg C (1996) Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9827–9832
18. Cordeiro MA, Werle CH, Milanez GP, Yano T (2016) Curli fimbria: An *Escherichia coli* adhesin associated with human cystitis. *Brazilian J Microbiol* 47: 414–416
19. Costerton JW and ZL (1995) Microbial Biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49: 711–745
20. Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Götz F (1999) The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun* 67: 5427–5433

21. Crémet L, Corvec S, Batard E, Auger M, Lopez I, Pagniez F et al. (2013) Comparison of three methods to study biofilm formation by clinical strains of *Escherichia coli*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 75: 252–255
22. Danese PN, Pratt LA, Dove SL, Kolter R (2000) The outer membrane protein, Antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol* 37: 424–432
23. Datsenko K a, Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6640–6645
24. Davies D (2003) Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2: 114–122
25. Dobrindt U (2010) Virulenzfaktoren uropathogener Erreger. *Urol -Ausgabe A* 49: 598–605
26. Dodson KW, Pinkner JS, Rose T, Magnusson G, Hultgren SJ, Waksman G (2001) Structural basis of the interaction of the pyelonephritic *E. coli* adhesin to its human kidney receptor. *Cell* 105: 733–743
27. Donlan RM (2001) Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis* 7: 277–281
28. Dufour D, Leung V, Lévesque CM (2012) Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endod Top* 22: 2–16
29. Escherich T (1885) Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. *Fortschritte der Medicin* 3: 515–522
30. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ (2015) Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol* 13: 269–284
31. Foxman B (2003) Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Dis Mon* 49: 53–70
32. Goller C, Wang X, Itoh Y, Romeo T (2006) The Cation-Responsive Protein NhaR of

- Escherichia coli* Activates *pgaABCD* Transcription , Required for Production of the Biofilm Adhesin Poly- β -1,6-N-Acetyl-D-Glucosamine. J Bacteriol 188: 8022–8032
33. Gould C V., Umscheid CA, Agarwal RK, Kuntz G, Pegues DA (2010) Guideline for Prevention of Catheter Associated Urinary Tract Infections 2009. Infect Control Hosp Epidemiol 31: 319–326
 34. Hancock V, Dahl M, Klemm P (2010) Abolition of biofilm formation in urinary tract *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates by metal interference through competition for fur. Appl Environ Microbiol 76: 3836–3841
 35. Hancock V, Ferrières L, Klemm P (2008) The ferric yersiniabactin uptake receptor *FyuA* is required for efficient biofilm formation by urinary tract infectious *Escherichia coli* in human urine. Microbiology 154: 167–175
 36. Hausner M, Wuertz S (1999) High Rates of Conjugation in Bacterial Biofilms as Determined by Quantitative In Situ Analysis High Rates of Conjugation in Bacterial Biofilms as Determined by Quantitative In Situ Analysis. Appl Environ Microbiol 65: 3710–3713
 37. Heilmann C, Heilmann C, Schweitzer O, Schweitzer O, Mack D, Mack D et al. (1996) Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming. Mol Microbiol 20: 1083–1091
 38. Hunstad DA, Justice SS (2010) Intracellular lifestyles and immune evasion strategies of uropathogenic *Escherichia coli*. Annu Rev Microbiol 64: 203–221
 39. Itoh Y, Rice JD, Goller C, Pannuri A, Taylor J, Meisner J et al. (2008) Roles of *pgaABCD* Genes in Synthesis , Modification , and Export of the *Escherichia coli* Biofilm Adhesin Poly- β -1,6-N-Acetyl-D-Glucosamine. J Bacteriol 190: 3670–3680
 40. Itoh Y, Wang X, Hinnebusch BJ, Iii JFP, Romeo T (2005) Depolymerization of β -1,6-N-Acetyl-D-Glucosamine Disrupts the Integrity of Diverse Bacterial Biofilms. J Bacteriol 187: 382–387
 41. Jacobsen SM, Stickler DJ, Mobley HLT, Shirtliff ME (2008) Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. Clin

Microbiol Rev 21: 26–59

42. Johnson JR (1991) Virulence Factors in *Escherichia coli* Urinary Tract Infection. Clin Microbiol Rev 4: 80–128
43. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol 2: 123–140
44. Kragh KN, Alhede M, Rybtke M, Stavnsberg C, Jensen PØ, Tolker-Nielsen T et al. (2018) The Inoculation Method Could Impact the Outcome of Microbiological Experiments. Appl Environ Microbiol 84: 1–14
45. Kumar S, Dave A, Wolf B, Lerma E V. (2015) Urinary tract infections. Dis Mon 61: 45–59
46. Lane MC, Alteri CJ, Smith SN, Mobley HLT (2007) Expression of flagella is coincident with uropathogenic *Escherichia coli* ascension to the upper urinary tract. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 16669–16674
47. Larsson A, Ohlsson J, Dodson KW, Hultgren SJ, Nilsson U, Kihlberg J (2003) Quantitative studies of the binding of the class II PapG adhesin from uropathogenic *Escherichia coli* to oligosaccharides. Bioorganic Med Chem 11: 2255–2561
48. Laumen A (2014) Vergleichende Untersuchungen zur Biofilmbildung uropathogener *Escherichia coli*. Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
49. Li Z, Bouckaert J, Deboeck F, de Greve H, Hernalsteens JP (2012) Nicotinamide dependence of uropathogenic *Escherichia coli* UTI89 and application of *nadB* as a neutral insertion site. Microbiology 158: 736–745
50. Machery-Nagel (2012) Plasmid DNA Purification. User Manual Rev. 08; online verfügbar unter: https://www.chemie.uni-kl.de/fileadmin/agpierik/Methoden/Nucleospin_Plasmid_no_lid_DNA_purification_Machery-Nagel.pdf (Letzter Zugriff: 6.6.2019)
51. Mack D, Fischer W, Krokotsch a, Leopold K, Hartmann R, Egge H et al. (1996) The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. J Bacteriol 178: 175–183

52. Martinez JJ, Mulvey MA, Schilling JD, Pinkner JS, Hultgren SJ, Alrutz M et al. (2000) Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *EMBO J* 19: 2803–2812
53. Menzel F, Conradi B, Rodenacker K, Gorbushina AA, Schwibbert K (2016) Flow chamber system for the statistical evaluation of bacterial colonization on materials. *Materials* 9: 1–13
54. Merritt JH, Kadouri DE, O'Toole GA (2005) Growing and Analyzing Static Biofilms. *Curr Protoc Microbiol* Chapter 1:Unit 1B.1. doi: 10.1002/9780471729259.mc01b01s00.
55. Mondragón V, Franco B, Jonas K, Suzuki K, Romeo T, Melefors O et al. (2006) pH-dependent activation of the *BarA-UvrY* two-component system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 188: 8303–8306
56. Mulvey MA, Schilling JD, Hultgren SJ (2001) Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infect Immun* 69: 4572–4579
57. Nakao R, Ramstedt M, Wai SN, Uhlin BE (2012) Enhanced Biofilm Formation by *Escherichia coli* LPS Mutants Defective in Hep Biosynthesis. *PLoS One* 7: e51241
58. Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen RKI (2017) Definitionen nosokomialer Infektionen für die Surveillance im Krankenhaus-Infektions- Surveillance-System (KISS-Definitionen). Online verfügbar unter: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Krankenhaushygiene/Nosokomiale_Infektionen/Downloads/RKI_Definitionen_nosokomialer_Infektionen_E-Book.pdf;jsessionid=FA7515F4008525189E9CF6DB933A163E.2_cid298?__blob=publicationFile (Letzter Zugriff: 06.06.2019)
59. Naves P, del Prado G, Huelves L, Gracia M, Ruiz V, Blanco J et al. (2008) Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent. *J Appl Microbiol* 105: 585–590
60. Nicolle LE (2014) Asymptomatic bacteriuria. *Curr Opin Infect Dis* 27: 90–96
61. Nicolle LE (2014) Catheter associated urinary tract infections. *Antimicrob Resist Infect*

Control 3: 1–8

62. Percival SL, Suleman L, Donelli G (2015) Healthcare-Associated infections, medical devices and biofilms: Risk, tolerance and control. *J Med Microbiol* 64: 323–334
63. Pernestig A, Georgellis D, Romeo T, Suzuki K, Tomenius H, Normark S et al. (2003) The *Escherichia coli* BarA-UvrY Two-Component System Is Needed for Efficient Switching between Glycolytic and Gluconeogenic Carbon Sources. *J Bacteriol* 185: 843–853
64. Rabin N, Zheng C, Du Y, Bonsu E, Sintim H (2015) Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Futur Med Chem* 2: 493–512
65. Reisner A, Krogfelt KA, Klein BM, Zechner EL, Molin S (2006) In Vitro Biofilm Formation of Commensal and Pathogenic *Escherichia coli* Strains : Impact of Environmental and Genetic Factors. *J Bacteriol* 188: 3572–3581
66. Romeo T (1998) Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non- coding RNA molecule CsrB. *Mol Microbiol* 29: 1321–1330
67. Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 3. Aufl., S. 1.119-1.122
68. Scott VCS, Haake DA, Churchill BM, Justice SS (2015) Intracellular Bacterial Communities: A Potential Etiology for Chronic Lower Urinary Tract Symptoms. *Urology* 86: 425–431
69. Sheikh J, Hicks S, Dall’Agnol M, Phillips a D, Nataro JP (2001) Roles for *Fis* and *YafK* in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 41: 983–997
70. Subashchandrabose S, Mobley HLT (2015) Virulence and Fitness Determinant of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr* 3: 1–32
71. Suzuki K, Wang X, Weilbacher T, Pernestig A, Georgellis D, Babitzke P et al. (2002) Regulatory Circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY Systems of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184: 5130–5140
72. Tagliabue L, Antoniani D, Maciag A, Bocci P, Raffaelli N, Landini P (2010) The diguanylate cyclase *YddV* controls production of the exopolysaccharide poly-N-

- acetylglucosamine (PNAG) through regulation of the PNAG biosynthetic *pgaABCD* operon. *Microbiology* 156: 2901–2911
73. Tagliabue L, Macia A, Antoniani D, Landini P (2010) The *yddV-dos* operon controls biofilm formation through the regulation of genes encoding curlic fibers' subunits in aerobically growing *Escherichia coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 59: 477–484
 74. Tenke P, Mezei T, Bóde I, Köves B (2017) Catheter-associated Urinary Tract Infections. *Eur Urol Suppl* 16: 138–143
 75. Thomason MK, Fontaine F, De Lay N, Storz G (2012) A small RNA that regulates motility and biofilm formation in response to changes in nutrient availability in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 84: 17–35
 76. Wang X, Dubey AK, Suzuki K, Baker CS, Babitzke P, Romeo T (2005) *CsrA* post-transcriptionally represses *pgaABCD*, responsible for synthesis of a biofilm polysaccharide adhesin of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 56: 1648–1663
 77. Wang X, Iii JFP, Romeo T (2004) The *pgaABCD* Locus of *Escherichia coli* Promotes the Synthesis of a Polysaccharide Adhesin Required for Biofilm Formation. *J Bacteriol* 186: 2724–2734
 78. Yamamoto S, Tsukamoto T, Terai A, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O (1995) Distribution of Virulence Factors in *Escherichia coli* Isolated from Urine of Cystitis Patients. *Microbiol Immunol* 39: 401–404
 79. Zogaj X, Nimtz M, Rohde M, Bokranz W, Römling U (2001) The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol* 39: 1452–1463

Danksagung

Lebenslauf

Anhang

Deskriptive Statistiken

Tabelle 18: Vergleich der Biofilmbildung von *E. coli* UT189 in M63 Medium, Urin und Artificial Urine Medium.

deskriptive Statistiken

Biofilmbildung (OD 600 nm)

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler	95 %-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
M63-Medium	24	0,253	0,078	0,016	0,220	0,286	0,166	0,416
Sammelurin	24	0,056	0,014	0,003	0,050	0,061	0,033	0,084
Artificial Urine Medium	24	0,038	0,016	0,003	0,031	0,044	0,007	0,072
Gesamt	72	0,115	0,109	0,013	0,090	0,141	0,007	0,416

Tabelle 19: Biofilmbildung von *E. coli* UT189 in M63r Medium unter Zusatz von Urinbestandteilen.

deskriptive Statistiken

Biofilmbildung (OD 600 nm)

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler	95 %-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
M63	24	0,2533	0,0782	0,0160	0,2203	0,2864	0,1656	0,4163
M63r	24	0,0794	0,0222	0,0045	0,0700	0,0887	0,0355	0,1129
M63r + NaCl	24	0,0467	0,0123	0,0025	0,0415	0,0519	0,0079	0,0738
M63r + Kreatinin	24	0,0410	0,0083	0,0017	0,0375	0,0445	0,0321	0,0686
M63r + Harnsäure	24	0,0444	0,0170	0,0035	0,0372	0,0516	0,0196	0,0770
M63r + Magnesiumsulfat	24	0,0989	0,0060	0,0012	0,0963	0,1014	0,0834	0,1136
M63r + Harnstoff	24	0,0495	0,0147	0,0030	0,0433	0,0557	0,0307	0,0864
M63r + Eisen(II)sulfat	24	0,0526	0,0182	0,0037	0,0449	0,0603	0,0055	0,0876
M63r mit 0,5% CAS	24	0,0674	0,0095	0,0019	0,0634	0,0713	0,0476	0,0846
M63r mit 0,1% CAS	24	0,0543	0,0092	0,0019	0,0504	0,0582	0,0381	0,0725
Gesamt	240	0,0787	0,0667	0,0043	0,0703	0,0872	0,0055	0,4163

Tabelle 20: Wachstum von *E. coli* UT189 in M63r Medium unter Zusatz von Urinbestandteilen.

deskriptive Statistiken

Bakteriendichte (OD 600 nm)

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler	95 %-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
M63	24	0,2533	0,0782	0,0160	0,2203	0,2864	0,1656	0,4163
M63r	24	0,0794	0,0222	0,0045	0,0700	0,0887	0,0355	0,1129
M63r + NaCl	24	0,0467	0,0123	0,0025	0,0415	0,0519	0,0079	0,0738
M63r + Kreatinin	24	0,0410	0,0083	0,0017	0,0375	0,0445	0,0321	0,0686
M63r + Harnsäure	24	0,0444	0,0170	0,0035	0,0372	0,0516	0,0196	0,0770
M63r + Magnesiumsulfat	24	0,0989	0,0060	0,0012	0,0963	0,1014	0,0834	0,1136
M63r + Harnstoff	24	0,0495	0,0147	0,0030	0,0433	0,0557	0,0307	0,0864
M63r + Eisen(II)sulfat	24	0,0526	0,0182	0,0037	0,0449	0,0603	0,0055	0,0876
M63r mit 0,5% CAS	24	0,0674	0,0095	0,0019	0,0634	0,0713	0,0476	0,0846
M63r mit 0,1% CAS	24	0,0543	0,0092	0,0019	0,0504	0,0582	0,0381	0,0725
Gesamt	240	0,0787	0,0667	0,0043	0,0703	0,0872	0,0055	0,4163

Abkürzungsverzeichnis

μl	Mikroliter
95% CI	95% Konfidenzintervall
AFA	Afimbrial Adhesins
bp	Basenpaare
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CAUTI	katheterassoziierte Harnwegsinfekte
Csr	Carbon Storage Regulator
DAEC	diffus adhärenzte Escherichia coli
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAEC	enteraggregative Escherichia coli
EHEC	enterohämorrhagische Escherichia coli
EIEC	enterinvasive Escherichia coli
EPEC	enteropathogene Escherichia coli
ETEC	enterotoxische Escherichia coli
ExPEC	extraintestinal pathogene Escherichia coli
FI	Fäkalisolat
g	Erdanziehungskraft, Gramm
h	Stunde
IBC	Intracellular Bacterial Community, intracellular bacterial communities
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
M	Mol
ml	Milliliter
MNEC	Meningitis-assoziierte Escherichia coli
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
OD	optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PGA	1,4 β-1,6-N-Acetyl-D-Glucosamin
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
sRNA	small regulatory RNA
tet	Tetrazyklin-Resistenzkassette
UPEC	uropathogene Escherichia coli
UTI	urinary tract infection = Harnwegsinfektion
yfp	yellow fluorescent protein = gelb fluoreszierendes Protein