

**Die Bedeutung der "High-Pathogenicity Island" (HPI) für kommensale und uropathogene *Escherichia coli***

**Kristin Natalie Kahl**



Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,  
Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. Oskar-Rüger Kaaden

Angefertigt am Max von Pettenkofer-Institut  
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie  
der LMU München  
(Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann)

**Die Bedeutung der "High-Pathogenicity Island" (HPI)  
für kommensale und uropathogene *Escherichia coli***

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Kristin Natalie Kahl, geb. Joschko  
aus  
Heidelberg

München 2004

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle

Referent: Univ.-Prof. Dr. O.-R. Kaaden

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. J. Hirschberger

Tag der Promotion: 23. Juli 2004

den Mäusen, die ihr Leben ließen...

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Schrifttum .....</b>	<b>2</b>
2.1	Taxonomie und Vorkommen der Spezies <i>Escherichia coli</i> .....	2
2.1.1	Die human- und veterinärmedizinische Bedeutung der Spezies <i>E. coli</i> .....	3
2.2	Mutaflor <sup>®</sup> , <i>E. coli</i> Stamm Nissle 1917 .....	5
2.2.1	Herkunft .....	5
2.2.2	Stammcharakterisierung und biologische Eigenschaften .....	5
2.2.3	Therapeutischer Einsatz von Mutaflor <sup>®</sup> , <i>E. coli</i> Stamm Nissle 1917 .....	6
2.2.4	Zusammenfassung Mutaflor <sup>®</sup> .....	7
2.3	Pathogenitätsinsel .....	8
2.4	Eisentransportsysteme von <i>E. coli</i> : Bedeutung für Ökologie und Pathogenität .....	11
2.5	<i>Yersinia</i> "High-Pathogenicity Island" .....	13
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>16</b>
3.1	Bakterienstämme, Plasmide, Primer .....	16
3.1.1	Bakterienstämme, Plasmide.....	16
3.1.2	Primer.....	18
3.2	Methoden zur DNA-Klonierung .....	20
3.2.1	"Suizid-Vektoren" zur Mutagenese durch reziproken Genaustausch: pJul1.A und pKAS32 .....	20
3.2.2	Sucrose-Selektion nach Integration des "Suizid-Vektors" pJul1.A .....	21
3.2.3	Plasmid-DNA-Gewinnung.....	21
3.2.4	DNA-Konzentrationsbestimmung .....	22
3.2.5	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonucleasen .....	22
3.2.6	Agarosegel-Aufreinigung geschnittener DNA .....	22
3.2.7	Ligation der Insert- und Vektor-DNA und Transformation des Ligationsansatzes in elektrokompente Zellen.....	23
3.2.8	Konjugation .....	24
3.2.9	DNA-Amplifizierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	25
3.2.10	Einbau eines Trimethoprim-Kassette tragenden Transposons in einen Vektor.....	25
3.3	Methoden des <i>in vivo</i> Tiermodells der Maus .....	26
3.3.1	Vorbereitung der Bakterienstämme .....	26
3.3.2	Mauspassage und Peritoneallavage .....	27
3.3.3	<i>In vivo</i> Darmkolonisierung im Tiermodell der Maus .....	27
3.3.4	Harnwegsinfektionsmodell .....	30
3.4	Spezielle Methoden.....	34
3.4.1	Untersuchung der HPI-Genexpression unter Urinexposition .....	34

<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>39</b>
4.1	Darmkolonisierung mit <i>E. coli</i> Stamm Nissle 1917, Mutaflor® .....	39
4.1.1	Strategie zur Rekomentierung der Mutaflor® <i>fyuA</i> Mutante .....	39
4.1.2	<i>in vivo</i> Darmkolonisierung im Mausmodell .....	46
4.1.3	Strukturelle Überprüfung der <i>E. coli</i> Mutaflor®-Stämme.....	46
4.1.4	Untersuchung auf HPI-positive <i>E. coli</i> der natürlichen Darmflora .....	47
4.1.5	Vorversuch, Kokolonisierungsmodell .....	48
4.1.6	Hauptversuch, Einzelkolonisierungsversuch .....	52
4.2	Harnwegsinfektionsmodell mit UPEC Stamm U3366 .....	57
4.2.1	Vorversuch zur Auswahl geeigneter UPEC-Teststämme .....	57
4.2.2	Virulenzgentypisierung mittels Multiplex-PCR .....	59
4.2.3	Generierung der <i>irpI</i> -Mutante des UPEC-Stammes U3366.....	60
4.2.4	Herstellung der Rekomentante UPEC Stamm U3366 <i>irpI</i> rec.....	65
4.2.5	Werden die HPI-Gene bei Urinkontakt <i>in vitro</i> exprimiert? .....	71
4.2.6	Werden die HPI-Genen bei Urinkontakt <i>in vivo</i> exprimiert .....	74
4.2.7	<i>In vivo</i> Harntraktinfektion im Mausinfektionsmodell .....	76
4.2.8	Einzelinfektionsversuch.....	76
4.2.9	Koinfektionsversuch .....	80
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>85</b>
5.1	Darmkolonisierung mit <i>E. coli</i> Stamm Nissle 1917, Mutaflor® .....	85
5.2	Harnwegsinfektionsmodell mit UPEC Stamm U3366 .....	90
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung / Summary .....</b>	<b>97</b>
<b>7</b>	<b>Materialliste .....</b>	<b>99</b>
7.1	Geräte .....	99
7.2	Chemikalien und Reagenzien .....	100
7.3	Enzyme .....	101
7.4	Kommerzielle Kits .....	101
7.5	Puffer und Lösungen.....	102
7.6	Mäuse .....	104
7.7	Tierversuchsantrag .....	104
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>105</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>117</b>
<b>10</b>	<b>Appendix.....</b>	<b>121</b>
10.1	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen .....	121
10.2	Lebenslauf.....	124
10.3	Danksagung .....	125

## 1 Einleitung

Die *Yersinia*-HPI (High-Pathogenicity Island) stellt eine klassische Pathogenitätsinsel dar (Hacker *et al.*, 1990, Rakin *et al.*, 1995). Sie umfasst einen genetisch instabilen, 45-100 kb großen genomischen DNA-Bereich, der ein siderophorvermitteltes Eisenaufnahmesystem kodiert (Heesemann, 1987, Pelludat *et al.*, 1998). Über die funktionelle Kernregion der Insel werden Synthese, Transport und Aufnahme des Siderophors Yersiniabaktin vermittelt. Die Expression der *Yersinia*-HPI trägt maßgeblich zur Virulenzausprägung hochpathogener *Yersinia* sp. (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*) bei (Almeida *et al.*, 1993, Heesemann, 1987). Mutationen des Genbereiches führen zu einer deutlichen Virulenzabschwächung der Yersinien und machen die Bedeutung der HPI für das Infektionsverhalten deutlich (Rakin *et al.*, 1994). Eine orthologe HPI konnte bei humanpathogenen *Escherichia coli* mit einer Sequenzhomologie von 99,7 % sowie bei anderen Vertretern der Familie *Enterobacteriaceae*, wie *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Citrobacter koseri* und *Enterobacter* sp. identifiziert werden (Schubert *et al.*, 2000). Schubert *et al.* (1998) wiesen die HPI bei 93 % enteroaggregativer *E. coli* (EAEC), bei 27 % enteroinvasiver *E. coli* (EIEC), bei 5 % enteropathogener (EPEC) und enterotoxischer (ETEC) *E. coli* sowie bei 80 % klinischer Blut- und Urinisolate nach. Von diesen klinischen Isolaten zeigten 70 % eine funktionell aktive HPI. Extraintestinale *E. coli* stellen die wichtigsten Verursacher akuter Harnwegserkrankungen bei Mensch und Tier dar. Über 7 Mio. Krankheitsfälle werden jährlich in den USA in der Humanmedizin gemeldet (Hooton & Stamm, 1997). Human- und veterinärmedizinisch relevante extraintestinale *E. coli* (ExPEC) zeigen häufig ähnliche Pathogenitätsmerkmale (Gophna *et al.*, 2001, Johnson *et al.*, 2000). Interessanterweise konnte die *Yersinia*-HPI auch bei dem kommensalen *E. coli* Stamm Nissle 1917 (Mutaflor®) nachgewiesen werden, der erfolgreich v.a. in der humanmedizinischen Praxis zur Behandlung gastrointestinaler Störungen eingesetzt wird. Dieser apathogene Stamm zeichnet sich dadurch aus, dass er keinerlei bekannte Virulenzfaktoren aufweist.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung der HPI für uropathogene und kommensale (Mutaflor®) *E. coli* im Tiermodell der Maus untersucht werden. Neben der Expression relevanter Genbereiche sollte der Einfluss von Insertionsmutanten dieser Gene auf die Kolonisierungsfähigkeit des Darmes und die Uropathogenität bestimmt werden.

Die Kenntnis über molekulare Mechanismen von Pathogenitätsfaktoren kann zu einer gezielten Behandlung der Erkrankung und zur Entwicklung spezifischer Impfstoffe führen.



## 2 Schrifttum

### 2.1 Taxonomie und Vorkommen der Spezies *Escherichia coli*

Die Spezies *Escherichia coli* gehört zur Gattung *Escherichia* und wird der Familie *Enterobacteriaceae* (enteron, griech.: der Darm) zugeordnet. *E. coli* kommt bei Mensch und Tier sowohl als Kommensale in der Normalflora des Intestinaltraktes als auch als wichtiger Krankheitserreger intestinaler und extraintestinaler Infektionen vor. Es handelt sich um ein gramnegatives, peritrich begeißeltes gerades Stäbchen, das zwischen 2,0 und 6,0 µm lang und 1,1-1,5 µm breit ist. Der Nachweis biochemischer Eigenschaften, wie etwa die Lactosespaltung durch das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase bei 99 % aller *E. coli* Stämme (Le Minor *et al.*, 1962), bildet die Grundlage der Differenzierung der *Enterobacteriaceae*. Die serologische Einteilung der unterschiedlichen *E. coli* Stämme wird durch eine Serotypisierung (Kauffmann, 1947) über O-, K- und H-Antigene möglich. O-Antigene stellen dabei hitzestabile Bestandteile des LPS-Komplexes der Zellwand, K-Antigene Polysaccharide der Kapsel und H-Antigene Geißelantigene dar. Die Vielzahl der Antigene unterschiedlicher Serovare ergibt insgesamt über tausend Kombinationsmöglichkeiten. Die Bestimmung der Serotypen ist ein wichtiges Orientierungsmittel für die Einordnung der *E. coli* Stämme in Hauptgruppen.

Während sich die zur Begleitflora zählenden kommensalen *E. coli* durch Apathogenität auszeichnen, sind darmpathogene *E. coli* durch Pathogenitätsfaktoren wie Entero- und Cytotoxine, sowie Adhäsions- und Invasionsfaktoren charakterisiert. Extraintestinale Infektionen entstehen durch das Vordringen von Colibakterien der eigenen Flora in sterile Bereiche des Organismus, in denen eine Vermehrung begünstigt wird. Eine Adaption an die neue Umgebung wird meist durch zusätzliche spezielle Virulenzfaktoren, wie Adhäsine, Siderophore, Toxine, Invasine und Polysaccharid-Kapseln (Johnson, 1991) ermöglicht.

### 2.1.1 Die human- und veterinärmedizinische Bedeutung der Spezies *E. coli*

Die Spezies *E. coli* ist als Verursacher intestinaler und extraintestinaler Infektionen weit verbreitet.

Eine Bedeutung als Zoonoseerreger kommt den enterohämorrhagischen *E. coli* (**EHEC**) zu. Diese stellen eine häufige Ursache übertragbarer Infektionen über Lebensmittel, Trinkwasser und Oberflächenwasser dar. So werden in Deutschland pro Jahr auf 100.000 Einwohner 13 Fälle einer enterohämorrhagischen Infektion diagnostiziert. Der Erreger konnte in über 50 % aller untersuchten Fäzes-Isolate des Rindes festgestellt und das Rind als Erregerreservoir identifiziert werden (Baljer & Wieler, 1999). Charakteristisch für enterohämorrhagische *E. coli* (**EHEC**) bzw. Shiga-Toxin-bildende *E. coli* (**STEC**) ist die Bildung des Shiga-Toxins (Stx) (Mainil, 1993) und die durch Fimbrien vermittelte Adhärenz an Enterozyten (Wieler *et al.*, 1997), durch die *attaching and effacing* (AE-) Läsionen verursacht werden (Moon *et al.*, 1983, Goffaux *et al.*, 2001). Humanpathogene STEC exprimieren häufig das Enterohämolysin oder EHEC-Hämolysin und das als Adhäsionsfaktor wirkende Membranprotein Intimin. EHEC können beim Menschen eine hämorrhagischen Kolitis sowie das hämolytisch urämische Syndrom (HUS) verursachen, das mit Nierenversagen, Thrombozytopenie und Anämie einhergeht (Kayser *et al.*, 2001), während EHEC-Infektionen beim Tier eher inapparent verlaufen. Wichtige Bedeutung kommt ihnen jedoch als Erreger der Colenterotoxämie (Ödemkrankheit) abgesetzter Schweine zu, die häufig tödlich verläuft. Das Verotoxin STX2e sowie F18ab-Fimbrien sind hierbei relevante Virulenzfaktoren, die zur Ödembildung und hypoxischer Nervenschädigung führen.

Weitere bedeutende intestinale *E. coli* sind die enterotoxischen *E. coli* (**ETEC**), deren Pathogenität zum einen auf der fimbrienvermittelten Anheftung an Enterozyten, zum anderen auf der Bildung der Enterotoxine LT (hitze-labil) und ST (hitze-stabil) beruht, die zusammen oder einzeln produziert werden. LT ist ein dem Choleratoxin ähnliches Toxin, das die Aktivität der Adenylatzyklase stimuliert. Durch eine Störung des Elektrolythaushaltes kommt es zu einer sekretorischen Diarrhö mit starker Flüssigkeitsansammlung im Dünndarm. ST stimuliert die Aktivität der Guanylatzyklase und induziert ebenfalls eine sekretorische Diarrhö. ETEC lösen zu über 50 % Reisediarrhö aus, hierbei charakterisieren wässrige Durchfälle das klinische Bild. Eine große wirtschaftliche Bedeutung kommt ihnen als Erreger der Neugeborenen- und Jungtier-Diarrhö bei Rind und Schwein zu. Ohne therapeutische Behandlung können hierbei hohe Mortalitätsraten auftreten.

Enteropathogene *E. coli* (**EPEC**) heften sich mithilfe des sog. "EPEC-adhesion-factors" an Epithelzellen des Dünndarms, zerstören die Mikrovilli und Mucosazellen und führen so zu

*attaching and effacing* (AE-) Läsionen der Darmwand (Moon *et al.*, 1983, Goffaux *et al.*, 2001). Sie sind vor allem in Entwicklungsländern Verursacher tödlich verlaufender Säuglingsdiarrhöen. Auch in der Veterinärmedizin spielen sie insbesondere bei der Dysenterie 5-10 Wochen alter Kaninchen eine Rolle. Enteroinvasive *E. coli* (**EIEC**) adhärieren und invadieren die Schleimhaut des Kolons, wobei sie geschwürige Entzündungen verursachen können. Die Pathogenese und das klinische Bild ähnelt in der Humanmedizin den Shigellosen, bei denen es zu wässrigen Durchfällen, späterer Beimengung von Schleim, Eiter und Blut sowie Darmkrämpfen und Fieber kommen kann. Eine Tierpathogenität besteht nicht. Nekrotoxische *E. coli* (**NTEC**) bilden Cytonekrosefaktoren (CNF1). CNF1 kommt als Virulenzfaktor extraintestinaler Coliinfektionen bei Menschen, CNF2 bei Isolaten aus Kälbern mit Durchfällen und Septikämien vor. Enteroaggregative *E. coli* (**EaggEC**) lösen chronische Durchfallerkrankungen bei Menschen aus. Fimbrien und Cytotoxine bestimmen die Pathogenese. Diffus adhärente *E. coli* (DAEC) werden durch zwei spezifische Fimbrien bestimmt (u.a. AIDA= *adhesin involved in diffuse adherence*) und in humanen Durchfallisolaten nachgewiesen.

Bei extraintestinalen Infektionen spielt *E. coli* vor allem als Erreger von Harnwegsinfekten (uropathogene *E. coli*= **UPEC**) bei Mensch und Tier eine wichtige Rolle (Beutin, 1999, Johnson & Stamm, 1989, Ling, 1995, Wooley & Blue, 1976). Man geht davon aus, dass beim Menschen weltweit jährlich 150 Mio. Harnwegsinfekte vorkommen, was einen medizinischen Kostenaufwand von über 6 Mrd. Dollar verursacht (Harding & Ronald, 1994). Mit 70-95 % stellt *E. coli* den Hauptverursacher akuter humaner Harnwegsinfekte dar (Hooton & Stamm, 1997). Die jährliche Inzidenz akuter Harnwegsinfekte bei jungen Frauen beträgt 0,5-0,7 (Hooton *et al.*, 1996), wobei zu 25-30 % rezurrente Infektionen auftreten (Neu, 1992). *E. coli*-Infektionen der Harnwege zählen damit zu der häufigsten bakteriellen Infektion bei Frauen. Die Erreger manifestieren sich entweder im unteren Bereich der Harnwege und verursachen Urethritis, Zystitis oder Urethrozystitis, oder sie etablieren sich ergänzend in Nierenbecken und Niere, so dass eine Zystopyelitis oder Pyelonephritis entstehen kann. Spezifische Virulenzfaktoren der UPEC, wie Adhäsine, Invasine, LPS, Eisenaufnahmesysteme und Toxine (Hämolysin, CNF1-Faktor), sind hierbei für die Infektionsentwicklung von Bedeutung (Mühldorfer *et al.*, 2001, Mulvey, 2002).

Als Verursacher von Septikämien führen *E. coli*-Infektionen zu bedeutenden Mortalitäts- und Morbiditätsraten (Russo & Johnson, 2003). Neben der Coliseptikämie der Kälber und Lämmer ist die Coliseptikämie des Geflügels eine wichtige Erkrankung. *Avian E. coli* (**APEC**) (Dozois *et al.*, 2003, Brown & Curtiss, 1996) führen hierbei zu extraintestinalen Infektionen (Aerosacculitis, Pneumonie, Septikämie, Perikarditis, Perihepatitis), die

wirtschaftlich bedeutsame Verluste erbringen. Zu weiteren extraintestinalen *E. coli*-Infektionen zählen Früh- und Neugeborenen-Meningitis, Peritonitis, Cholezystitis, Appendizitis, Wundinfektion, Pneumonie, Pyometra (Chen *et al.*, 2003) sowie Mastitis. Das Mastitis-Metritis-Agalaktie-Syndrom der Sauen (MMA) gehört hierbei weltweit zu den wirtschaftlich bedeutsamsten Schweinekrankheiten und wird vorrangig von *E. coli* Stämmen und anderen *Enterobacteriaceae* verursacht (Bertschinger *et al.*, 1997).

Unterschiedliche Arbeitsgruppen konnten beim Vergleich der Virulenzfaktoren extraintestinaler *E. coli* bei Mensch und Tier Gemeinsamkeiten feststellen (Johnson *et al.*, 2000, Johnson *et al.*, 2001, Low *et al.*, 1988, Westerlund *et al.*, 1987). Das weite Spektrum der *E. coli*-Infektionen sowie das Vorkommen gemeinsamer Virulenzfaktoren bei human- und veterinärmedizinisch relevanten ExPEC-Stämmen unterstreicht die Bedeutung der Erforschung von Virulenzfaktoren sowohl für die Human- als auch für die Tiermedizin.

## **2.2 Mutaflor<sup>®</sup>, *E. coli* Stamm Nissle 1917**

### **2.2.1 Herkunft**

Der *E. coli* Stamm Nissle 1917 wurde während des 1. Weltkrieges im Jahr 1917 durch den Freiburger Hygieniker und Bakteriologen A. Nissle aus den Fäzes eines Pionieroffiziers isoliert, der im Balkankrieg im Gegensatz zu all seinen Kameraden vollkommen darmgesund blieb (Nissle, 1918, Nissle, 1925). Die Herstellung und den Vertrieb der *E. coli* Stamm Nissle 1917 haltigen Kapseln unter dem Namen Mutaflor<sup>®</sup> wurde 1917 von der Fa. G. Pohl, Danzig, begonnen und seit 1970 von der Ardeypharm GmbH in Herdecke weitergeführt. Der vom lateinischen Wort *mutare* (= verändern) abgeleitete Begriff sollte die Fähigkeit des *E. coli* Stammes zur Beeinflussung der Darmflora zum Ausdruck bringen.

### **2.2.2 Stammcharakterisierung und biologische Eigenschaften**

Der *E. coli* Stamm Nissle 1917 ist in der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen als *E. coli* DSM 6601 registriert und vom WHO-Referenzzentrum für *Escherichia coli* in Kopenhagen als Serovar O6:K5:H1 typisiert. Eine heterogene Gruppe von Bakterien lässt sich dieser Serogruppe zuordnen, wie z. B. Mitverursacher von Harnwegsinfektionen bei Tier und Mensch. Der *E. coli* Stamm Nissle 1917 weist dabei keines der für harnwegspathogene *E. coli* Stämme typischen Uropathogenitätsmerkmale auf und stellt einen apathogenen Vertreter der O6-Gruppe dar (Blum *et al.*, 1995). Virulenzmerkmale wie Invasivität, Serumresistenz, Produktion von Toxinen (H-LT, H-ST, CNF1, Hly, SLT I, SLT II), Typ III

Sekretionssystem, Mannose-resistente Hämagglutination, Expression virulenzassoziiierter Fimbrien (CFA I/II, P-, M-, S-Fimbrien) sowie Resistenz gegenüber gängigen, gegen gramnegative Enterobakterien wirksame Antibiotika, sind bei ihm nicht nachweisbar. Das Genom des *E. coli* Stamm Nissle 1917, Mutaflor<sup>®</sup> weist zwei kleine genetisch stabile Plasmide auf (pMUT1 und pMUT2), die weder Pathogenitätsfaktoren noch Antibiotikaresistenzen besitzen (Blum-Oehler *et al.*, 2003) und nicht auf andere *E. coli* Stämme transferierbar sind. Fremd-DNA in Form von Plasmiden wird kaum akzeptiert.

*E. coli* Stamm Nissle 1917, Mutaflor<sup>®</sup> hat sich als effektiver Kolonist des menschlichen und tierischen Darmes erwiesen und verfügt offenbar über verschiedene Faktoren, die die Etablierung und das Überleben im Wirtsorganismus ermöglichen. Dazu gehören drei verschiedene Fimbrientypen (F1A, F1C und Curli-Fimbrien), Mikrozyme und für die Mortalität verantwortliche Geißeln des Serotyps H1. Der Stamm produziert mehrere für die Eisenaufnahme wichtige Siderophore (Aerobaktin, Enterobaktin, Salmochelin, Colibaktin, ein Hämin- und ein Citrat-abhängiges Eisenaquisitionssystem und das Yersiniabaktin) sowie kurzkettige Karbonsäuren (vorrangig Formiat und Acetat), die Darmmortalität und Durchblutung der Darmschleimhaut fördern (Hacker *et al.*, 2001). Mutaflor<sup>®</sup> zeigt *in vitro* Effekte gegen einige enteropathogene *E. coli* Stämme, wie z.B. *Salmonella enteritidis*, *Shigella dysenterica*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *Proteus vulgaris* und *Candida albicans*. Die Ursachen für dieses antagonistische Verhalten sind bislang nicht bekannt. Bisherige Untersuchungen zeigten hierbei, dass es sich bei dem entscheidenden Faktor weder um den direkten Kontakt zwischen den Spezies noch um die produzierten Mikrozyme handelt (Ölschläger *et al.*, 2001). Eine weitere Besonderheit zeigt seine modifizierte LPS-Struktur (Zähringer *et al.*, 2001), die dem Stamm offenbar immunmodulatorische Eigenschaften (sowohl spezifische als auch unspezifische) verleiht, ohne immunotoxisch zu wirken. Somit ist dem *E. coli* Stamm Nissle 1917, Mutaflor<sup>®</sup> eine Zwischenstellung zwischen physiologischen und klassisch pathogenen Keimen eigen.

### 2.2.3 Therapeutischer Einsatz von Mutaflor<sup>®</sup>, *E. coli* Stamm Nissle 1917

Neben gängigen antiinflammatorischen Medikamenten gewinnen Probiotika als weiteren therapeutischen Ansatz bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen mehr und mehr an Bedeutung. Während durch die gegenwärtig eingesetzten Medikamente überwiegend auf die Beeinflussung der Immun- bzw. Entzündungsreaktion gezielt wird, versucht man mit Gabe von Probiotika die enterische Mikroflora zu beeinflussen (Hoffmann & Kruis, 2002).

*E. coli* Stamm Nissle, Mutaflor<sup>®</sup> wird bei einem großen Spektrum von Darmerkrankungen eingesetzt: Behandlungserfolge erzielte man sowohl bei akuten infektiösen

Darmerkrankungen, wie Salmonellosen und Shigellosen, als auch bei chronisch rezidivierenden Diarrhöen, chronischen Obstipationen, Meteorismus, Colitis ulcerosa und Morbus Crohn (Kruis *et al.*, 2001, Rembacken *et al.*, 1999, Malchow, 1997, Möllenbrink & Bruckschen, 1994). Auch Fernwirkungen auf Erkrankungen außerhalb des Darmes, die aber mit einer veränderten Darmflora in Zusammenhang stehen, wurden beobachtet (Harnwegsinfektionen, Arthritis, Allergien, Ekzeme, Stomatitis) (Sonnenborn & Greinwald, 1991). Studien an Neugeborenen ergaben eine Verhinderung der Besiedlung mit Hospitalkeimen bei Gabe von Mutaflor<sup>®</sup> in der ersten Lebenswoche und eine Steigerung lokaler und systemischer Immunglobuline (Lodanova-Žádníková *et al.*, 1994). Der Einsatz von *E. coli* Stamm Nissle, Mutaflor<sup>®</sup> wird nicht nur in der Humanmedizin sondern ebenfalls in der Veterinärmedizin beobachtet. So konnten schon Enteritis-Epidemien bei Saugkälbern durch Gabe von Mutaflor<sup>®</sup> bei neugeborenen Kälbern verhindert werden.

#### **2.2.4 Zusammenfassung Mutaflor<sup>®</sup>**

Für *E. coli* Stamm Mutaflor<sup>®</sup> liegt durch serologische, biochemische und molekulargenetische Typisierungen eine klare Stammcharakterisierung vor. Dennoch sind wichtige Wirkungsweisen, wie der beobachtete Antagonismus zu anderen Keimen, bislang ungeklärt. Interessanterweise konnte die *Yersinia*-HPI, die maßgeblichen Einfluss auf die Virulenz von *Yersinia sp.* hat, bei dem apathogenen *E. coli* Stamm Mutaflor<sup>®</sup> nachgewiesen werden. Zur Verwendung von Mikroorganismen als Probiotikum müssen bestimmte Anforderungen erfüllt werden. Hierzu gehört das Fehlen von transferierbaren genetischen Elementen, die Pathogenitätsfaktoren oder Antibiotikaresistenzen übertragen. Somit wird im ersten Abschnitt der Arbeit die genaue Bedeutung der *Yersinia*-HPI des Mutaflor<sup>®</sup>-*E. coli* für die probiotische Wirkung untersucht. Grundlage der Untersuchungen sind Vorversuche, die ein funktionsfähiges Yersiniabaktin-Siderophor-System der *Yersinia*-HPI bei *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> zeigen.

## 2.3 Pathogenitätsinsel

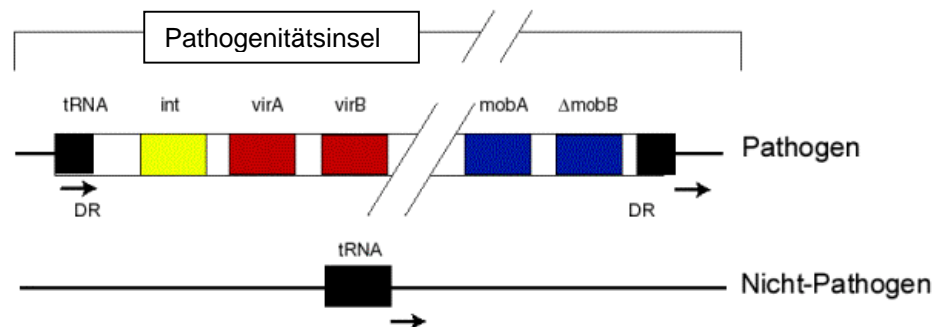
Die Pathogenität von Bakterien ist ein multifaktorieller Prozess (Griffiths, 1983). Neben pathogenen Fähigkeiten des Mikroorganismus spielen Interaktionen zwischen Wirt und Erreger, wie Abwehrlage des Wirtes, anatomische Besonderheiten, physiologische Gegebenheiten der Wirtsflora, Temperatur, pH-Wert, Luftfeuchte und das Vorhandensein bestimmter Nährstoffe, eine entscheidende Rolle. Für die Eigenschaften eines Erregers sind zwei Genklassen relevant. Zum einen sind dies Gene, die für das Überleben im Wirt und in der wirtsunabhängigen Umwelt wichtig sind. Sie kommen sowohl bei pathogenen als auch bei apathogenen Keimen vor. Zum anderen spielen für die Pathogenität einer Spezies spezielle Gene eine Rolle, die bei apathogenen Vertretern derselben Spezies nicht vorhanden sind. Diese Virulenzfaktoren können sowohl extrachromosomal als auch chromosomal kodiert sein (Groisman & Ochman, 1996).

Ein horizontaler Transfer virulenzassoziierter Gene zwischen verschiedenen Spezies wird durch Virulenzplasmide, Bakteriophagen, Transposons und sogenannte Pathogenitätsinseln (PAI) möglich. Bei den Pathogenitätsinseln handelt es sich um chromosomale, virulenzassoziierte Gencluster, die gemeinsame, auf einen horizontalen Transfer hinweisende Charakteristika zeigen (Abb. 1) (Hacker *et al.*, 1997):

1. PAIs kodieren einen oder meist mehrere Virulenzfaktoren (Adhäsine, Invasine, Eisenaufnahmesysteme, Toxine, Typ III und Typ IV Sekretionssystem)
2. PAIs kommen im Genom pathogener Stämme vor, nicht aber bei apathogenen Stämmen derselben oder nahe verwandter Spezies
3. es handelt sich um relativ große Genabschnitte (10-200 kb)
4. PAIs unterscheiden sich oft in ihrem G+C mol% Gehalt und in der Kodierung von Aminosäuren durch bevorzugte spezifische Basentriplets vom Wirtsgenom
5. PAIs werden oft von zwei identischen DNA-Sequenzen begrenzt, die als *direct repeats* (DR) bezeichnet werden. DR haben meist eine Größe von 16-20 bp (Hacker & Kaper, 1999) und stellen den DNA-Bereich homologer Rekombination dar
6. PAIs sind oft mit tRNA-Genen assoziiert. In vielen Prokaryoten und einigen Eukaryoten sind konserviert vorliegende tRNA-Gene oft Ansatzstelle für die Integration fremder DNA. Die 3'-Region der tRNA ist meist identisch zu der Anheftungsstelle von Bakteriophagen (Cheetham & Katz, 1995). Zusätzlich findet

sich oft das Phagen-Integrase-Gen in unmittelbarer Nähe zu der tRNA, was auf eine ursprüngliche Bakteriophagen-Einheit der PAI oder Teile von ihr schließen lässt

7. PAIs tragen oft Mobilitätsfaktoren, wie Integrasen, Transposasen oder Teile von Insertionselementen (IS), die der PAI einen instabilen Charakter verleihen
8. PAIs zeigen anstelle einer homogenen eher eine Mosaikstruktur, die u.a. durch schrittweise Umstrukturierung über IS-Elemente entstanden sein kann.



**Abbildung 1: Genetische Struktur einer pathogenen Insel (PAI).** Die PAI umfasst repräsentative charakteristische genetische Elemente, wie *direct repeats* (DR), ein tRNA-Gen in der Nähe eines Integrase-Gens (int), Mobilitäts-gene (mob A, B) und Virulenz-Gencluster (vir A, B).

Pathogenitätsinseln wurden zuerst bei *Escherichia coli* entdeckt (Blum *et al.*, 1994) und mittlerweile bei einer Vielzahl pathogener Bakterien nachgewiesen (Strauss & Falkow, 1997, Hacker & Kaper, 2000). Sie werden überwiegend bei gramnegativen Bakterien gefunden (*Salmonella*, *E. coli*, *Yersinia*, *Vibrio cholera*, *Helicobacter pylori*), kommen aber auch bei grampositiven Bakterien, wie z.B. *Listeria ivanovii* und *Staphylococcus aureus*, vor. Bei grampositiven Keimen wurden im Gegensatz zu den dargestellten Charakteristika bislang weder *direct repeats* noch Mobilitäts-gene nachgewiesen, was auf eine stabile Integration der Insel in das Wirtsgenom deutet (Hacker *et al.*, 1997).

PAIs können neben den gemeinsamen Charakteristika unterschiedliche Genstrukturen aufweisen. Während einige PAIs, wie z.B. bei *Salmonella enterica* (Hensel *et al.*, 1997), kompakte funktionale Gencluster umfassen, gibt es andere, wie z.B. bei UPEC, die zusätzliche offene Leseraster mit unbekannten Funktionen besitzen (Hacker & Kaper, 1999). PAIs von *Salmonella enterica* und intestinalen *E. coli* sind stabil integriert, wohingegen PAIs von UPEC, *Helicobacter pylori* und *Yersinia sp.* eine hohe Tendenz zu Deletion zeigen. Die unterschiedliche Struktur und Stabilität korreliert mit dem entsprechenden Evolutionsstadium der integrierten PAI (Hacker & Kaper, 1999): PAIs entstehen durch Integration von Phagen, Plasmiden oder konjugativen Transposons. Stellt die integrierte DNA einen Selektionsvorteil



für den Wirt dar, werden im Laufe der Zeit durch Deletion bzw. Inaktivierung von Genen, aufgrund von Punktmutationen, Gene, wie z. B. Integrasen, ausgeschaltet und die Insel somit im Genom stabilisiert. Dieser Adaptionsprozess wird auch als "homing" bezeichnet (Lee, 1996). Im weiteren Evolutionsgeschehen werden G+C mol% Gehalt sowie Aminosäure-Kodierung durch Punktmutationen nach und nach adaptiert bis die PAI letztendlich nicht mehr vom ursprünglichen Wirtsgenom abzugrenzen ist.

Jeder lebende eukaryotische und prokaryotische Organismus ist im Sinne der darwinistischen Lehre das Resultat evolutionärer Entwicklungsprozesse (Arber, 2000). Punktmutationen, genetische Umstrukturierungen ("rearrangements") und horizontaler Transfer (Ziebuhr *et al.*, 1999) führen zu neuen genetischen Strukturen und helfen dem Organismus sich an die immer wechselnde Umgebung anzupassen und der natürlichen Selektion standzuhalten. Durch die Übertragung genetischer Inseln wird im Gegensatz zu dem langsamen Evolutionsprozess durch Punktmutationen eine Evolution "in großen Sprüngen" ermöglicht (Groisman & Ochman, 1996, Finlay & Falkow, 1997). So werden drastische Veränderungen im Wirtsgenom innerhalb kürzester Zeit erreicht (Ochman *et al.*, 2000), was einen deutlichen Selektionsvorteil durch schnellere Anpassungsfähigkeit für die Bakterien in einer neuen Umgebung darstellt.

Da auch bei nichtpathogenen Keimen Fremd-DNA nachweisbar ist, die Ähnlichkeiten zu PAIs zeigen, werden alle DNA-Bereiche, welche die typische Struktur aufweisen, als genomische Inseln bezeichnet. Einige Inseln, die zur Pathogenität der entsprechenden Bakterienspezies beitragen, sind bei anderen Spezies lediglich für eine bessere Adaptionsfähigkeit des Mikroorganismus an den Wirt verantwortlich. Hierzu gehört möglicherweise die "High-Pathogenicity Island" (Schubert *et al.*, 1998, Bach *et al.*, 2000), die in 30 % nichtpathogener *E. coli* nachgewiesen werden kann sowie P-, S-, und F1C-Fimbrien (Finlay & Falkow, 1997). Eine Unterteilung der genomischen Insel in Pathogenitätsinsel und Fitnessinsel ist daher sinnvoll. Stellt die Insel einen deutlichen Vorteil für Replikation und Überleben in bestimmten ökologischen Nischen dar, wird sie als Fitnessinsel bezeichnet (Preston *et al.*, 1998). Fitnessinseln kodieren meist Antibiotika-Resistenzen oder metabolische Funktionen wie z. B. Sucroseaufnahme (Hochhut *et al.*, 1997), Eisenaufnahme und Enzyme (Ravatn *et al.*, 1998). Kodiert die Insel für Faktoren, die Gewebs-Schädigungen und Infektionen auslösen, gilt sie als Pathogenitätsinsel.

## 2.4 Eisentransportsysteme von *E. coli*: Bedeutung für Ökologie und Pathogenität

Als wichtiger Darmbesiedler und Erreger extraintestinaler Infektionen verfügt *E. coli* über unterschiedliche Faktoren, um sich gegenüber anderen Mikroorganismen durchzusetzen und im Wirt zu etablieren. Diese Faktoren, die chromosomal- sowie plasmidkodiert sind (Griffiths *et al.*, 1980), befähigen das Bakterium in den Wirt einzudringen, an bestimmte Gewebe zu adhären, in Wirtszellen zu invadieren und Toxine sowie antagonistisch wirksame Moleküle, wie Bakteriozine und Mikroazine, zu produzieren. Einen wichtigen Faktor für die Durchsetzungsfähigkeit des Keimes stellt die Eisenaufnahmefähigkeit des Bakteriums dar. Sowohl bei Prokaryoten als auch Eukaryoten spielt Eisen eine zentrale Rolle bei elementaren biochemischen Reaktionen, wie z.B. beim Elektronentransfer der Atmungskette (Neilands, 1981). Aufgrund seines großen Redoxpotentials ist Eisen wichtiger Kofaktor vieler Enzyme, wie Nitrogenasen, Peroxidasen, Katalasen und Ribotidreduktasen. Bei Vertebraten ist Eisen außerdem Bestandteil der biologischen Makromoleküle Hämoglobin und Myoglobin und damit am Transport und der Bereitstellung von Sauerstoff beteiligt. Bei Prokaryoten sind Eisenionen besonders für Enzyme des Reduktions- und Oxidationsstoffwechsels essentiell, ein Mangel führt zu Wachstumshemmung. Lediglich Laktobakterien (Archibald & Duong, 1984) und *Borrelia burgdorferi* (Posey & Gherardini, 2000) sind nicht eisen- sondern manganabhängig.

Pathogene Bakterien haben unterschiedliche Strategien entwickelt, um ihren Eisenbedarf in der Umwelt und während der Infektion im Wirt zu sichern. Eisen liegt unter aeroben Bedingungen und neutralem pH-Wert in Form schwerlöslicher dreiwertiger  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Komplexe vor. Der Großteil des Eisenreservoirs des Wirtes liegt intrazellulär vor (Hämoglobin der Erythrozyten). Extrazelluläre Eisenbindungsproteine wie Laktoferrin in den Schleimhäuten, sowie Transferrin im Blut und intrazelluläres Ferritin verursachen eine zusätzliche Reduzierung freier Eisenionen auf  $10^{-18}$  mol/l (Bullen & Griffiths, 1987), was deutlich unter der von Bakterien benötigten Konzentration liegt. Im Falle einer Infektion führen eingewanderte Leukozyten zu einer Sezernierung von Laktoferrin und halten so die Eisenkonzentration zusätzlich gering (Leffel & Spitznagel, 1975). Pathogene Bakterien sind somit auf die Synthese eigener hochaffiner Eisentransport- und Aufnahmesysteme angewiesen.

Stämme der Spezies *E. coli* besitzen mehrere Möglichkeiten ihren Eisenbedarf zu sichern. Hierzu gehört die Aufnahme von Hämin und Hämprodukten durch Lyse der Erythrozyten (Coulton *et al.*, 1983), von Eisenionen im Kotransport mit Citrat (Woodrow *et al.*, 1978, Hussain *et al.*, 1981, Zimmermann *et al.*, 1984) und die direkte Verwertung von Eisen aus Transferrin und Lactoferrin (Mickelsen & Sparlin, 1981, Cowart & Foster, 1985). Einige Stämme sind zusätzlich in der Lage niedermolekulare (0,5-1 kDa), hochaffine Eisenchelatoren (Siderophore) in das umgebene Medium zu sezernieren. Neben der Aufnahme minimaler Mengen freien Eisens (Neilands, 1981) konkurrieren Siderophore mit wirtseigenen eisenbindenden Proteinen. Das komplexierte  $\text{Fe}^{\text{III}}$  wird über spezifische Membranrezeptoren (Nikaido, 1979, Braun *et al.*, 1991) und Transportsysteme aufgenommen (Braun *et al.*, 1976, Bagg & Neilands 1987a, Guerinot, 1994, Mietzner & Morse, 1994, Braun *et al.*, 1998, Byers & Arceneaux, 1998) und ins Cytoplasma transportiert. Stämme der Gattung *E. coli* besitzen meist mehrere endogene Siderophore, wie das Katecholartyp-Siderophor Enterocholin (syn. Enterobaktin) (Rogers, 1973, O'Brian & Gibson, 1970, Pollack & Neilands, 1970) und das aus Hydroxamat-Vorstufen hervorgehende Siderophor Aerobactin (Williams, 1979, Valvano & Crosa, 1984, Lafont *et al.*, 1987, Jacobson *et al.*, 1988).

Auch exogene Siderophore anderer Bakterien und Pilze können genutzt werden, wie Ferrichrom,  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Coprogen, Ferrioxamine (Leong & Neilands, 1976, Raymond & Carrano, 1979, Neilands, 1981, Hantke, 1983). Hierfür werden unter Eisenmangel verschiedene Siderophorrezeptoren in der äußeren Bakterienmembran gebildet, welche eine spezifische Aufnahme des jeweiligen Siderophors ermöglichen. Voraussetzung ist die Anwesenheit und der unmittelbare Kontakt zu siderophorproduzierenden Bakterien.

Eisenmangel stellt ein wichtiges Umweltsignal dar, da er dem Bakterium den Kontakt zum Wirtsorganismus signalisiert. Neben der Induktion von Eisenaufnahmesystemen wird auch die Produktion von Virulenzfaktoren reguliert (Griffiths, 1991), die in keinem direkten Bezug zu dem Eisenmetabolismus stehen. Hierzu gehören z.B. das Shiga-like toxin-1 (SLT-1) (Calderwood & Mekalanos, 1987), Enterotoxin von EIEC (Fasano *et al.*, 1990), Superoxiddismutase (Niederhoffer *et al.*, 1990), Hämolysin (Grünig *et al.*, 1987), Diphtherietoxin (Pappenheimer, 1977) und das Exotoxin A von *Pseudomonas aeruginosa* (Bjorn *et al.*, 1978). Die meisten dieser Gene werden wie die Gene des Siderophoraufnahmesystems über das Fur (*ferric uptake regulation*)-Repressorprotein reguliert. Das Regulatorprotein bildet nach Aufnahme von  $\text{Fe}^{\text{II}}$  in die Zelle mit diesen einen Komplex, der als Repressor die Transkription Fur-regulierter Gene unterdrückt (Bagg & Neilands, 1987b, O'Halloran, 1993). Das Zusammenspiel von Eisenaufnahme und Expression von Virulenzfaktoren unterstreicht die Bedeutung von Eisenaufnahmesystemen.

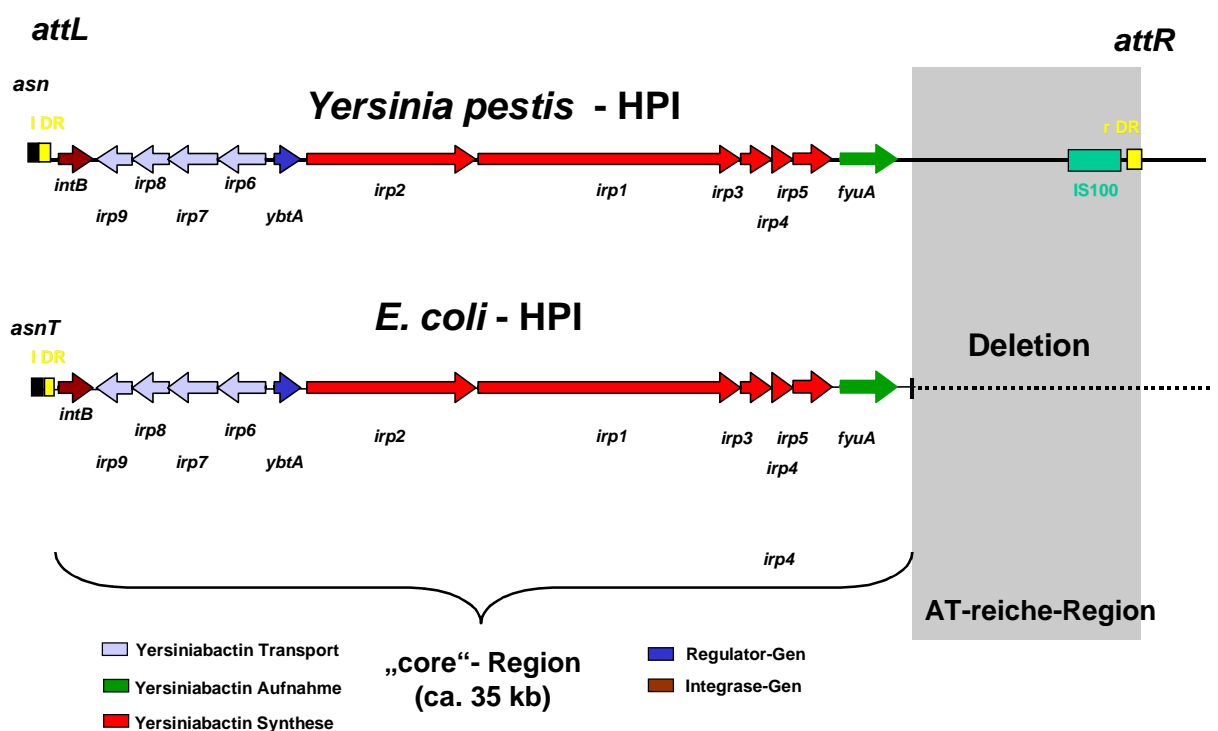
Die Tatsache, dass Eisen einen wichtigen Beitrag zur Infektionsentstehung leistet, lässt vermuten, dass bakterielle Eisenaufnahmesysteme als Pathogenitätsfaktoren betrachtet werden können. So zeigte sich bei Tieren, die mit unterschiedlichen Formen von Eisen gefüttert wurden, eine höhere Infektanfälligkeit als bei der jeweiligen Kontrollgruppe (Bullen & Griffiths, 1987, Bullen *et al.*, 1991). Weitere Versuche (Bullen *et al.*, 1968) konnten durch Zugabe von Eisen eine starke Reduzierung der lethalen Dosis erreichen.

## 2.5 *Yersinia* "High-Pathogenicity Island"

Das Genus *Yersinia* wird der Familie *Enterobacteriaceae* zugeordnet und kann in 11 Spezies unterteilt werden, wovon lediglich die drei Spezies *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis* und *Y. enterocolitica* von humanpathogener Bedeutung sind (Salyers & Whitt, 1994). Die Pathogenität dieser Spezies wird durch ein 70 kb großes Virulenzplasmid (pYV) kodiert, das in hoch- und schwachpathogenen Stämmen vorkommt (Cornelius, 1998). Zusätzlich konnte man in den hochpathogenen Stämmen der Spezies *Y. pestis* (55 %), *Y. pseudotuberculosis* Serotyp O:I (80 %) und *Y. enterocolitica* Biotyp 1B (100 %) ein 36 kb großes chromosomales Gencluster (HPI) nachweisen (Carniel *et al.*, 1992, Almeida *et al.*, 1993). Diese "High-Pathogenicity Island" kodiert für ein bakterielles Eisenaufnahmesystem, das das 483 Da große Siderophor Yersiniabaktin (Ybt) (Heesemann, 1997, Pelludat *et al.*, 1998) und den spezifischen Eisenaufnahmerezeptor FyuA (Haag *et al.*, 1993, Heesemann *et al.*, 1993) umfasst. Mutationen der HPI-Gene *irp2*, *fyuA/psn*, *ybtA* machen den Einfluss dieser Gene für die Expression eines hochpathogenen Phänotyps (Rakin *et al.*, 1994) deutlich und zeigen die Bedeutung der HPI bzw. ihrer Produkte für die Infektiosität von *Yersinia sp.* (Almeida *et al.*, 1993, Heesemann, 1987).

Nach der Entdeckung der HPI in *Yersinia sp.* konnte sie später bei weiteren Vertretern der Familie *Enterobacteriaceae*, wie *Citrobacter diversus*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Salmonella enterica* non-I Serotyp und *E. coli* nachgewiesen werden (Schubert *et al.*, 2000, Bach *et al.*, 2000, Ölschläger *et al.*, 2003). Eine orthologe HPI wurde bei *E. coli* vor allem bei septikämischen Human- (80 %) und Geflügelisolaten (Gophna *et al.*, 2001), Isolaten aus Urinproben (Schubert *et al.*, 2000) sowie enteroaggregativen (93 %) *E. coli* festgestellt. Mit einer geringeren Häufigkeit wurde sie bei Stuhlproben gesunder Individuen (30 %) sowie bei enteroinvasinen (27 %), enteropathogenen und enterotoxischen (5 %) *E. coli* (Schubert *et al.*, 1998) nachgewiesen, wogegen sie bei hochpathogenen enterohämorrhagischen *E. coli*, *Shigella sp.*, *Salmonella enterica* Serotyp Enteritidis und Typhimurium nicht festgestellt werden konnte.

Die HPI liegt in *Yersinia* und *E. coli* hochkonserviert mit einer Sequenzhomologie von 97-100 % vor (Rakin *et al.*, 1995, Schubert *et al.*, 1998). Dabei kann das HPI-Gencluster in zwei verschiedene evolutionäre Gruppen geteilt werden; die erste umfasst *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis* und *E. coli*, die zweite *Y. enterocolitica* Stämme (Almeida *et al.*, 1993, Rakin *et al.*, 1995). Generell zeigt sie typische Charakteristika einer Pathogenitätsinsel: so umfasst sie ein 36 kb großes, instabiles chromosomales DNA-Fragment (Almeida *et al.*, 1993), weist Insertionselemente (IS) (Fetherston & Perry, 1994) und Mobilitätsgene auf (P4-Integrase Gen), ist mit *asn tRNA*-Genen assoziiert (Carniel *et al.*, 1996), wird von einer 17-20 bp großen, analogen Basenpaarwiederholung (*direct repeats*) flankiert, die eine Verdopplung des 3'-Endes der *asn tRNA* darstellt, und zeigt einen signifikant höheren G+C mol% Gehalt als das ursprüngliche *Yersinia*- oder *E. coli*-Genom (Rakin *et al.*, 1995). Die HPI kann somit als typische Pathogenitätsinsel bezeichnet werden, die offenbar über horizontalen Transfer von anderen Mikroorganismen übertragen worden ist.



**Abbildung 2:** Darstellung der *Yersinia*-HPI Struktur bei *Y. pestis* und *E. coli* im Vergleich.

Neben einer funktionellen Kernregion, die alle wichtigen Gene für die Synthese, den Transport und die Aufnahme des Yersiniabactin-Siderophors sowie dessen Regulation umfasst, besitzt die HPI bei *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* am 3'-Ende (Abb. 2 *attR*) eine 5-13 kb große AT-reiche Region unbekannter Funktion (Schubert *et al.*, 1999). Im

Gegensatz zu der *Yersinia*-HPI hat bei der *E. coli*-HPI am 3'-Ende durch Deletion eine Verankerung der Insel in das Chromosom stattgefunden, hingegen sind am 5'-Ende beide mit der *asn* tRNA assoziiert (Vergleich Abb. 2). Die Yersiniabaktin-Biosynthese-Gene *irp2*, *irp1*, *irp3*, *irp4*, *irp5* und *irp9* (*iron repressible proteins*) werden von dem Promotor des *irp2*-Gens reguliert, während das *fyuA*-Gen einen eigenen Promotor besitzt. Insgesamt sind 11 Gene in 4 Operons organisiert. Die Gene *irp1* und *irp2* kodieren für die hochmolekularen, nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen HMWP1 und HMWP2 (*high molecular weight proteins 1, 2*) (Carniel *et al.*, 1987, Almeida *et al.*, 1993). Die Gene *fyuA/psn*, *irp6* und *irp7* vermitteln den Transport und die Aufnahme des Yersiniabaktins in das Cytosol des Bakteriums. Während *irp6* und *irp7* Innermembran-Permeasen kodieren, stellt das 71 kDA große FyuA (*Ferric yersiniabactin uptake*) den äußeren Membranrezeptor für Yersiniabaktin und Pestizin dar.

Die Gene für die Yersiniabaktin-Synthese und den Eisenaufnahmerezeptor FyuA erfahren eine gegenseitige Koregulation. Einerseits unterbricht die Inaktivierung von *irp1* oder *irp2* die gesamte Biosynthese und reduziert die FyuA-Expression. Andererseits verursachen auch Mutationen bei *fyuA* und *irp1* eine verminderte Expression der *irp2*-Gene. Überdies ist Yersiniabaktin selbst ein wichtiger positiver Regulator seiner eigenen Biosynthese (Bearden *et al.*, 1997, Pelludat *et al.*, 1998). Die Expression der Proteine ist hierbei vom extrazellulären Yersiniabaktin abhängig (Perry, 1999). Nach Aufnahme in die Bakterienzelle bildet das Yersiniabaktin einen Komplex mit dem YbtA-Protein, der die Promotoren der *fyuA*- und *irp*-Biosynthesegene aktiviert (Fetherston *et al.*, 1996). Alle vier Promotorregionen besitzen eine Fur- (*Ferric uptake regulator*) Bindungsstelle und werden von dem Fur-Repressor bei Anwesenheit von Eisen negativ reguliert (Gehring *et al.*, 1998, Rakin *et al.*, 1994).

Die Verbreitung der HPI und ihr Einfluss auf die Pathogenität zeigt eine wichtige, vielleicht über die Eisenversorgung hinausgehende Rolle des Ybt-Systems (Pelludat *et al.*, 1998). Die Bedeutung der HPI für die Virulenzausprägung bei *Yersinia sp.* konnte wie oben aufgeführt bereits gezeigt werden und sollte in der vorliegenden Arbeit insbesondere für uropathogene und kommensale *E. coli* untersucht werden.

### 3 Material und Methoden

Verwendete kommerzielle Kitsysteme sowie Herstellerverzeichnis mit Kontaktadressen sind in Kapitel 7 "Materialliste" aufgeführt.

#### 3.1 Bakterienstämme, Plasmide, Primer

##### 3.1.1 Bakterienstämme, Plasmide

Stämme und Plasmide sind in Tabelle 1 aufgelistet. Alle Bakterien wurden unter Standardbedingungen in Luria-Bertani-Medium (LB) mit den entsprechend erforderlichen Antibiotika bei einer Temperatur von 37°C kultiviert. Die Antibiotika wurden in folgenden Konzentrationen verwendet: Ampicillin 100 µg/ml, Chloramphenicol 30 µg/ml, Kanamycin 50 µg/ml, Rifampicin 150 µg/ml, Streptomycin 30 µg/ml, Tetracyclin 12 µg/ml, Trimethoprim 75 µg/ml. Alle Stämme wurden unter aeroben Bedingungen inkubiert.

**Tabelle 1 Bakterienstämme und Plasmide**

Stamm	Genotyp, relevante Charakteristika	Quelle
<i>Escherichia coli</i>		
S17-1 $\lambda$ pir	Tp <sup>r</sup> Str <sup>r</sup> <i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> <sup>-</sup> M <sup>+</sup> RP4:2-Tc:Mu:Kan <sup>r</sup> Tn7 <i>λ</i> pir Donor für Konjugationen, trägt den Vektor pKAS32	De Lorenzo & Timmis, 1994
DH5α	Klonierungsrezipient, hier als HPI-Negativkontrolle F <sup>-</sup> φ80 <i>dlac</i> ZΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> <i>phoA</i> <i>supE44</i> λ <sup>-</sup> <i>thi</i> - <i>gyrA96</i> <i>relA1</i>	GibcoBRL
SCS 110	<i>rpsL</i> (Str <sup>r</sup> ) <i>thr</i> <i>leu</i> <i>endA</i> <i>thi-1</i> <i>lacY</i> <i>galK</i> <i>galT</i> <i>ara</i> <i>tonA</i> <i>tsx</i> <i>dam</i> <i>dcm</i> <i>supE44</i> Δ( <i>lac-proAB</i> ) [F' <i>traD36</i> <i>proAB</i> <i>lacI</i> ZΔM15] In dieser Arbeit als Negativkontrolle	Stratagene

SM10 $\lambda_{pir}$	<i>thi-1, thr, leu, tonA, lacY, supE, recA::RP4-2-Tc::Mu, Cm<sup>r</sup>, <math>\lambda_{pir}</math></i>	Miller & Mekalanos, 1988
Mutaflor <sup>®</sup> Nissle 1917 (DSM 6601)	Originalisolat, HPI-positiv	Fa. Ardeypharm
Mutaflor <sup>®</sup> 1259	Str <sup>r</sup> Rif <sup>r</sup> Ausgangsstamm Mutaflor <sup>®</sup> , Rifampicin- und Streptomycin-Resistenz durch spontane Mutation verursacht	Schubert <sup>1)</sup>
Mutaflor <sup>®</sup> <i>irpI</i> 480	Str <sup>r</sup> Rif <sup>r</sup> Kan <sup>r</sup> , <i>irpI::kan</i> Mutaflor <sup>®</sup> Stamm 1259 mit Insertion einer Kanamycin-Kassette in die <i>Sall</i> -Schnittstelle des <i>irpI</i> -Gens	Schubert <sup>1)</sup>
Mutaflor <sup>®</sup> <i>fyuA</i> 481	Str <sup>r</sup> Rif <sup>r</sup> Kan <sup>r</sup> , <i>fyuA::kan</i> Mutaflor <sup>®</sup> Stamm 1259 mit Insertion einer Kanamycin-Kassette in die <i>SphI</i> -Schnittstelle des <i>fyuA</i> -Gens	Schubert <sup>1)</sup>
Mutaflor <sup>®</sup> <i>fyuA</i> rec	Str <sup>r</sup> Rif <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> Mutaflor <sup>®</sup> <i>fyuA</i> mit rekonstituiertem <i>fyuA</i> -Gen	diese Arbeit (Kapitel 4.1.1)
UPEC Stamm U3366	Ap <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , Str <sup>r</sup> $\beta$ -hämolyisierendes <i>E. coli</i> -Isolat, aus Pyelonephritis-Nierenpunktat	<sup>1)</sup>
UPEC Stamm U3366 <i>irpI</i>	Ap <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , Str <sup>r</sup> U3366 mit <i>irpI::kan</i>	diese Arbeit (Kapitel 4.2.3)
UPEC Stamm U3366 <i>irpI</i> rec	Ap <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , Str <sup>r</sup> U3366 <i>irpI</i> mit rekonstituiertem <i>irpI</i> -Gen	diese Arbeit (Kapitel 4.2.4)
S17-1<pKAS32 <i>irpI::kan</i> >	Kan <sup>r</sup> , <i>pir</i> <sup>+</sup> , <i>tra</i> <sup>+</sup> Donor für Konjugation, pKAS32 Plasmid trägt <i>irpI</i> -Gen mit integrierter Kanamycin-Kassette aus pUK-4K	Schubert <sup>1)</sup>
SM10 $\lambda_{pir}$ <pJul1.A-Trim>	Tp <sup>r</sup> , Cm <sup>s</sup> , <i>pir</i> <sup>+</sup> Donorstamm SM10 $\lambda_{pir}$ mit Vektor pJul1.A, der EZ::TN<DHFR-1> Transposon im Cm-Resistenzgen trägt	diese Arbeit (Kapitel 4.2.4)
<i>Salmonella enterica</i> Serotyp Typhimurium		
WR 1330	Tc <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> <i>fepA::Tn10dTc, iroN::pGP704, cir::MudJ</i>	Rabsch, RKI



WR 1542	Tc <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> <i>fepA</i> ::Tn10dTc, <i>iroN</i> ::pGP704, <i>cir</i> ::MudJ pACYC5.3L (trägt <i>fyuA</i> -, <i>ybtA</i> -, <i>fyuA-luc</i> -, <i>irp6-8</i> , Cm <sup>r</sup> )	Rabsch, RKI
Plasmid		
pKAS32	Amp <sup>r</sup> pGP704, <i>rpsL</i> , <i>ori</i> R6K, <i>mob</i> RP4	Skorupski & Taylor, 1996
pJul1.A	Cm <sup>r</sup> <i>mob</i> RP4, <i>sacB</i> , <i>ori</i> R6K	Hornef <sup>1)</sup>
pJul1.A <i>fyuA</i>	Cm <sup>r</sup> <i>mob</i> RP4, <i>sacB</i> , <i>ori</i> R6K <i>fyuA</i> aus pKAS32 <i>fyuA</i> über <i>Sst</i> I und <i>Sal</i> I in den pJul1.A ligiert	diese Arbeit (Kapitel 4.1.1)
pJul 1.A Trim	Cm <sup>s</sup> Tp <sup>r</sup> <i>mob</i> RP4, <i>sacB</i> , <i>ori</i> R6K EZ::TN <DHFR-1> Transposon in Cm-Resistenzgen des pJul1.A integriert	diese Arbeit (Kapitel 4.2.4.1)
pKAS32 <i>fyuA</i>	Ap <sup>r</sup> <i>mob</i> RP4, <i>rpsL</i> , <i>ori</i> R6K <i>fyuA</i> mit <i>Bam</i> HI und <i>Kpn</i> I aus pBluescript II KS/SK in die <i>Bgl</i> II und <i>Kpn</i> I-Schnittstelle des pKAS32	<sup>1)</sup>

1) Max von Pettenkofer-Institut, München, Deutschland

### 3.1.2 Primer

Für die PCR wurden folgende synthetische Oligonucleotide (Primer) eingesetzt. Alle Primer wurden von der Fa. *metabion* (Martinsried, Deutschland) bezogen.

Tabelle 2 Primer

Primer	Herkunft der DNA-Sequenz	DNA-Sequenz (5' - 3')	TM (°C)	Produkt-grösse
<i>fyuA</i> -start.for.seq <i>fyuA</i> -stop.rev.seq	<i>fyuA</i>	5'-ATGAAAATGACACGGCTTTATCC-3' 5'-TCAGAAGAAATCAATTCGCGTAT-3'	55,5°C	2022 bp
Muta 7 Muta 8	Mutaflor <sup>®</sup> Plasmid pMUT2	5'-GACCAAGCGATAACCGGATG-3' 5'-GTGAGATGATGGCCACGATT-3'	60°C	427 bp
<i>fyuA</i> 162-HPI 29688.for <i>fyuA</i> 1319-HPI 30233.rev	Mutaflor <sup>®</sup> HPI	5'-GCGACGGGAAGCGATGATTTA-3' 5'-TAAATGCCAGGTCAGGTCAC-3'	58°C	545 bp
<i>irp1</i> .8676.for <i>irp1</i> .9293.rev	Mutaflor <sup>®</sup> HPI	5'-CCATCTACAGGCGGCTACGTC-3' 5'-GTCTCCCGGCGGCATACACCA-3'	62°C	617 bp
<i>hly</i> -for. <i>hly</i> -rev.	<i>hly</i>	5'-AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGC-3' 5'-ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA-3'	61.3°C 63.0°C	1177 bp
RPAI-for. RPAI-rev.	PAI	5'-GGACATCCTGTTACAGCGCGCA-3' 5'-TCGCCACCAATCACAGCCGAAC-3'	64.0°C 63.7°C	930 bp
<i>fimH</i> -for. <i>fimH</i> -rev.	<i>fim H</i>	5'-TGCAGAACGGATAAGCCGTGG-3' 5'-GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA-3'	61.8°C 65.7°C	508 bp
<i>sfa1</i> <i>sfa2</i>	<i>sfa</i>	5'-CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC-3' 5'-CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA-3'	66.3°C 63.0°C	410 bp
<i>aerJ</i> -for. <i>aerJ</i> -rev.	<i>iutA</i>	5'-GGCTGGACATCATGGGAAGTGG-3' 5'-CGTCGGGAACGGGTAGAATCG-3'	64.0°C 63.7°C	300 bp
<i>ibe</i> 10-for. <i>ibe</i> 10-rev.	<i>ibeA</i>	5'-AGGCAGGTGTGCGCCGCTAC-3' 5'-TGGTGCTCCGGCAAACCATGC-3'	67.6°C 63.7°C	170 bp
<i>afa</i> -for. <i>afa</i> -rev.	<i>Afa/dra BC</i>	5'-GGCAGAGGGCCGGCAACAGGC-3' 5'-CCCGTAACGCGCCAGCATCTC-3'	69.6°C 65.7°C	559 bp
<i>cnf</i> -1 <i>cnf</i> -2	<i>cnf 1</i>	5'-AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG-3' 5'-CATTGAGATCCTGCCCTCATTATT-3'	61.0°C 61.3°C	498 bp
<i>focG</i> -for. <i>focG</i> -rev.	<i>focG</i>	5'-CAGCACAGGCAGTGGATACGA-3' 5'-GAATGTCGCCTGCCCATGCT-3'	61.8°C 61.8°C	360 bp
<i>sfaS</i> -for. <i>sfaS</i> -rev.	<i>sfaS</i>	5'-GTGGATACGACGATTACTGTG-3' 5'-CCGCCAGCATTCCTGTATTC-3'	57.9°C 61.8°C	240 bp
Kan 4052 Kan 3802	<i>irp 1</i>	5'-GCCAGTTGGGTAAGTTCGTG-3' 5'-CATCCTGCAAGCCGTCATCG-3'	60.0°C	250 bp

## 3.2 Methoden zur DNA-Klonierung

### 3.2.1 "Suizid-Vektoren" zur Mutagenese durch reziproken Genaustausch: pJul1.A und pKAS32

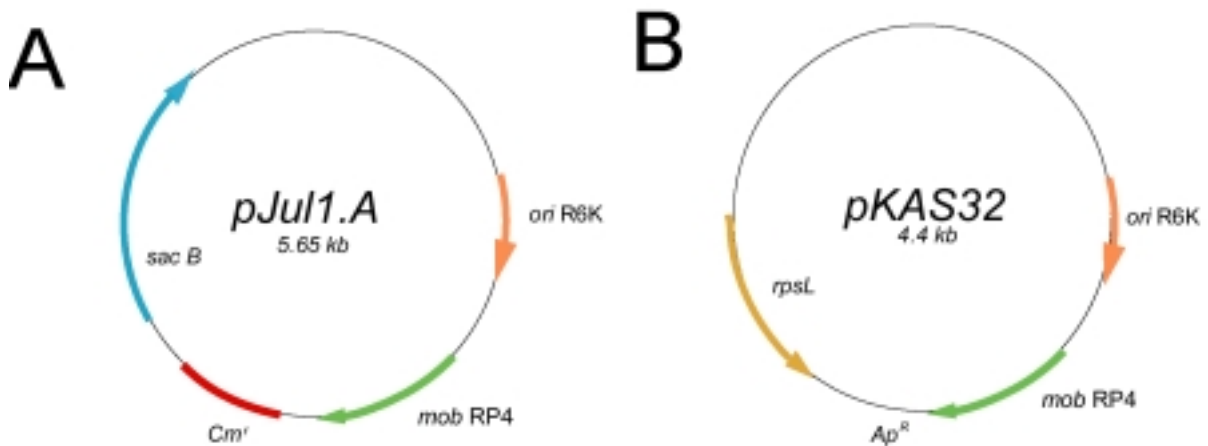


Abbildung 3: Darstellung des Vektors A) pJul1.A, B) pKAS32.

Sowohl der Vektor pJul1.A als auch der Vektor pKAS32 (Abb. 3) entstammen dem Ursprungsvektor pGP 704 (Miller & Mekalanos, 1988). Dieser 3,7 kb große Vektor zeichnet sich sowohl durch den Besitz des *mob* RP4 Gens, als auch durch den  $\pi$ -abhängigen Replikationsstartpunkt *ori* R6K aus. Das *mob* RP4-Gen trägt für den Transfer des Plasmides essentielle Sequenzen, was eine Konjugation zwischen unterschiedlichen Stämmen ermöglicht. Für die Replikation des Plasmides spielt das *ori* R6K eine entscheidende Rolle: das *ori* R6K tragende Plasmid ist abhängig von dem  $\pi$ -Protein und kann sich nur in Anwesenheit des Proteins selbstständig im Zytosol replizieren. Fehlt einem Bakterium das  $\pi$ -Protein, führt dies zu einer spezifischen Integration des Plasmides durch Rekombination homologer DNA-Bereiche in das Wirtschromosom (Skorupski & Taylor, 1996).  $\pi$ -abhängige Vektoren bezeichnet man auch als "Suizid-Vektoren".

Der Vektor pKAS32 (4,4 kb) entstand durch Klonierung des 715 bp *SalI* Fragmentes *rpsL* mit Anhang aus der "multiple cloning site" des Vektors pSL1180 in den Vektor pGP704 (*BglII*, *SacI*), (Skorupski & Taylor, 1996). Das *rpsL*-Gen (Dean, 1981) kodiert das ribosomale Protein S12, welches einen Streptomycin-sensiblen Phänotyp in Streptomycin-resistenten Stämmen verursacht. Eine anschließende Selektion auf Streptomycin-Resistenz ergibt eine Identifikation von Transkonjuganden, deren Plasmid aus der chromosomalen DNA verloren ging. Das *rpsL*-Gen dient somit der Positivselektion von Bakterien, bei denen Plasmid-DNA

mit entsprechend homologen chromosomalen Sequenzen ausgetauscht wurde. Als weiteren Selektionsmarker besitzt der Vektor pKAS32 wie der pGP704 ein Ampicillinresistenzgen. Eine "multiple cloning site" ermöglicht eine leichte Klonierung gewünschter DNA-Fragmente.

Der Vektor pJul1.A entstand durch Austausch des *rpsL*-Gens mit dem ebenfalls als Selektionsmarker dienenden *sacB*-Gen, das über die Restriktionsenzyme *SalI* und *BglII* in den pKAS32 ligiert wurde. Das *sacB*-Gen, ursprünglich aus *Bacillus subtilis* isoliert (Donnenberg & Kaper, 1991), produziert das Enzym Levansucrase, das in Anwesenheit von Sucrose für gramnegative Bakterien toxische Produkte (Levane) synthetisiert (Gay *et al.*, 1985). Dieser Selektionsdruck bewirkt den Verlust des Plasmides aus dem Zielgenom und kann somit Deletionen und Insertionen homologer DNA-Bereiche in dem gewünschten Genom erzielen. Anstelle eines Ampicillinresistenzgens wurde eine Chloramphenicolkassette als Selektionsmarker in den Vektor ligiert. Der 5,65 kb große pJul1.A-Vektor besitzt wie seine Vorgänger eine "multiple cloning site".

### 3.2.2 Sucrose-Selektion nach Integration des "Suizid-Vektors" pJul1.A

Mithilfe des als Selektionsmarker dienenden *sacB*-Gens des Vektors pJul1.A (s. 3.2.1) kann nach Single-Rekombination homologer DNA-Bereiche des Vektors und des Wirtschromosoms eine Sucroseselektion durchgeführt werden. Ziel ist es, durch den entstandenen Selektionsdruck eine spezifische Integration und / oder Deletion bestimmter DNA-Fragmente in das bakterielle Genom zu erreichen.

Durchführung der Sucroseselektion: 1 Einzelkolonie des durch Rekombination entstandenen Klones wird in 5 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika bei 37°C angereichert. Aus der Kultur werden Verdünnungsreihen von  $10^{-2}$  bis  $10^{-5}$  hergestellt, von denen je 100 µl auf 5 %ige Sucrose-Platten (5 g Sucrose gelöst in 100 ml LB-Agar) ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert werden. Am folgenden Tag werden Kolonien entnommen und parallel auf Antibiotikaselektivagarplatten (richtet sich nach Resistenzlage des Stammes vor der Sucroseselektion) und MH-Platten (Mueller-Hinton) ausgestrichen. Selektiert wird auf entstandene Antibiotikaempfindlichkeiten und -resistenzen, die durch die Sucroseselektion und die damit verbundene Deletion und Insertion von DNA-Fragmenten entstanden sind.

### 3.2.3 Plasmid-DNA-Gewinnung

Die Plasmid-DNA-Gewinnung wurde mithilfe des QIAprep® Spin Miniprep Kit Protocol (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Die Isolierung der Plasmid-DNA basiert hierbei auf folgenden Schritten: eine Kolonie des plasmidtragenden Stammes wird in 50 ml LB-Medium mit

entsprechendem Antibiotikum ÜN angereichert. Bakterienkulturen werden abzentrifugiert und das Pellet anschließend in EDTA- und RNase-haltigen Puffer (P1) resuspendiert, was zu einer Destabilisierung der Bakterienzellwand führt. Durch die anschließende Zugabe eines SDS und NaOH-haltigen Puffers (P2) erfolgt eine alkalische Lyse der Bakterien: das Detergenz SDS löst Phospholipide und Proteinkomponenten der Zellwände; Natriumhydroxid denaturiert Proteine, chromosomale- und Plasmid-DNA. Das Lysat wird mit saurem Kaliumacetatpuffer neutralisiert (N3). Während die Plasmidmoleküle in Lösung bleiben und renaturieren, bilden denaturierte Proteine, denaturierte chromosomale DNA, sowie RNA und bakterieller Zelldebris aufgrund des hohen Salzgehaltes unlösliche Komplexe, werden präzipitiert und nach Zentrifugation entfernt. Anschließend wird der plasmidhaltige Überstand auf eine Silikatgel-Matrix des Aufreinigungsröhrchens gebracht, wo es aufgrund des hohen Salzgehaltes zu einer Bindung der Plasmid-DNA kommt. Es folgen Waschgänge zur Entfernung von Zellresten und Salz (Puffer PB, PE) bis letztendlich die Plasmid-DNA in salzarmen Puffer (pH 7,0-8,5) gelöst wird (Puffer EB: 10 mM Tris-HCl, pH 8,5).

### **3.2.4 DNA-Konzentrationsbestimmung**

Die Konzentration der gelösten Plasmid-DNA erfolgt durch Elektrophorese in 0,8-1%igem Agarosegel bei einer Gleichspannung von 80-100 V. Zusätzlich kann die Konzentrationsbestimmung von in Aqua dest. gelöster DNA durch photometrische Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt werden (UV-Visible Spectrophometer, Pharmacia, Tennenlohe). Zur Größen- bzw. Mengenbestimmung wird je nach Größe des DNA-Fragmentes ein 100 bp- bzw. ein 1 kb-Marker mit definierter DNA-Menge mitgeführt.

### **3.2.5 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonucleasen**

Die DNA-Spaltung von Plasmiden erfolgt mit Restriktionsendonukleasen, die Phosphodiesterbindungen eines DNA-Moleküls schneiden. Dabei erkennt jedes Enzym eine bestimmte Sequenz, an der es die DNA spaltet. Der Verdau wird in einem Endvolumen von 50 µl durchgeführt. In jedem Ansatz werden pro 1 µg Plasmid-DNA 10 U Enzym und 5 µl des vom Hersteller (Invitrogen, Niederlande) empfohlenen 10x Puffers zugeführt. Der Restriktionsansatz wird unter leichtem Schütteln bei 37°C, 3 h inkubiert und anschließend bei 80°C hitzeinaktiviert.

### **3.2.6 Agarosegel-Aufreinigung geschnittener DNA**

Nach Verdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen werden die DNA-Fragmente durch Gelelektrophorese getrennt. Hierfür wird der gesamte Ansatz des Verdaus (50 µl)

gemeinsam mit je 5 µl des ungeschnittenen Vektors ("Negativkontrolle") auf das Agarosegel aufgetragen. Je nach erwarteter Fragmentgröße wird ein 0,6 bis 2 %iges Agarosegel gewählt und als Größenmarker ein 100 bp- bzw. ein 1 kb-Marker eingesetzt. Dem Gel wird eine Gleichspannung von 80-100 V angelegt. Um die DNA sichtbar zu machen, wird dem Agarosegel Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,0025 % zugegeben. Die gewünschten Fragmente können so unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit dem Skalpell ausgeschnitten werden. Die Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgt mit dem GelSpin DNA Purification Kit (Mo Bio Laboratories, Hamburg). Das Prinzip der DNA-Isolierung beruht wie bei dem QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) (s.o.) auf der Bindung der DNA an eine Silikatgel-Matrix unter hohen Salzkonzentrationen und einem pH-Wert von < 7,5. Nach Lösen des DNA-haltigen Agarosestückes in 3 Vol. GelBind Puffer (NaClO<sub>4</sub>) bei 55-65°C, wird die Probe auf den silikatmatrixhaltigen Spin Filter aufgetragen, so dass es zu der gewünschten Bindung der DNA kommt; gewaschene Salze, Enzyme, Agarose, Ethidiumbromid und Dyes hingegen passieren die Matrix. Nach Zentrifugation (14.000 UpM, 30 s) und erneutem Durchlauf der Probe wird der Filter mit 300 µl ethanolhaltigem Gel Wash Puffer gewaschen. Restliche Salze werden hiermit entfernt. Nach zweimaliger Zentrifugation (14.000 UpM, 30 s) wird die DNA schließlich mit 30-50 µl EB-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) eluiert.

### **3.2.7 Ligation der Insert- und Vektor-DNA und Transformation des Ligationsansatzes in elektrokompetente Zellen**

Nach Konzentrationsbestimmung der gelösten DNA durch Agarose-Gelelektrophorese (s. 3.2.4) werden Vektor und Insert in einem 1:3 molarem Verhältnis ligiert. Dafür wird eine 1 Unit T4-DNA Ligase mit 1 µl Ligationspuffer (Invitrogen, Niederlande) und Aqua dest. ad. 10 µl eingesetzt. Die Reaktion erfolgt über Nacht bei 16°C im Thermocycler.

Der Ansatz kann direkt für die folgende Transformation eingesetzt werden. Als Methode wurde die Elektroporation gewählt, bei der suspendierte gewaschene Bakterienzellen in dem Elektroporationsgerät (Gene Pulser<sup>®</sup> II Electroporation System, BIO-RAD, München) in ein elektrisches Feld gebracht und einem kurzen elektrischen Puls hoher Feldstärke ausgesetzt werden. Dabei entstehen kurzzeitig Poren in der Zellmembran, durch die Makromoleküle, wie DNA, in die Zelle gelangen können. Zur nachfolgenden Selektion plasmidtragender Bakterien muss der eingesetzte Vektor ein Resistenzgen besitzen, das in der transformierten Bakterienzelle exprimiert wird.

Durchführung der Elektroporation: Elektrokompente Zellen (= Zellen, deren Fähigkeit DNA aufzunehmen durch eine vorangegangene chemische und/oder physikalische Behandlung verstärkt ist), werden bei Raumtemperatur auf Eis gelagert vorsichtig aufgetaut. 50 µl der Zellsuspension werden mit 5 µl DNA (Ligationsansatz) gemischt und 5 min auf Eis gelagert. Der Ansatz wird in eine sterile, gut vorgekühlte Elektroporations-Küvette von 0,2 cm Durchmesser pipettiert und in den Gene Pulser Apparat gebracht. Eine empfohlene Spannung von 1,8 kV bei *E. coli* wird angelegt, bei einem Widerstand von 200 Ohm und einer Kapazität von 25 µF. Die optimale Zeitkonstante liegt bei 3,5-5 msec. Anschließend werden die elektroporierten Zellen mit 1 ml sterilem SOC-Medium ausgewaschen, in ein frisches Eppendorf-Cup gebracht und bei 37°C 1 h unter starkem Schütteln inkubiert. 100 µl des jeweiligen Ansatzes werden je nach Resistenzgen des Plasmides auf entsprechende Antibiotikaplatten ausplattiert und bei 37°C ÜN bebrütet.

Bakterienklone der gewünschten Resistenz werden in 50 ml LB-Medium mit Antibiotika ÜN bei 37°C angereichert. Anschließend wird eine Plasmid-DNA-Gewinnung mithilfe des QIAprep® Spin Miniprep Kit Protocol (Qiagen, Hilden) (s. 3.2.3) durchgeführt. Die Plasmid-DNA wird nun durch Verdau mit Restriktionsenzymen (Ansatz s. 3.2.5) auf Existenz von ursprünglichem Vektor und Insert überprüft. Die geschnittenen Ansätze werden zusammen mit ihrer ungeschnittenen Kontrolle auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen (s.o.) und die Größen der Banden mithilfe des 1 kb- bzw. 100 bp-Markers zugeordnet.

### 3.2.8 Konjugation

Die Fähigkeit zum "sexuellen" DNA-Austausch zwischen Bakterienzellen (Konjugation), d.h. ein Plasmid von einer Zelle auf andere Zellen zu übertragen, basiert auf dem Vorhandensein sogenannter Transfer- (*tra*) und Mobilitäts- (*mob*) Gene konjugativer Plasmide. Die Transfergene kodieren u. a. für einen Sexpilus, der die Verbindung zwischen Bakterien herstellt, während die Mobilitätsgene die Plasmidübertragung ("rolling circle replication") steuern. Diese Gene fehlen den nichtkonjugativen Plasmiden.

Durchführung der Konjugation: Die zu konjugierenden Stämme werden in 50 ml LB-Medium mit geeignetem Antibiotikum ÜN bei 37°C angereichert. 20 ml jeder Kultur werden entnommen, gut miteinander vermischt und in einem 50 ml-Tube bei 4300 UpM, 20 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet auf eine Blutagar-Platte gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wird die Platte abgeschabt und die Bakterien in 1,5 ml Aqua dest. suspendiert. In einer Verdünnung von  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  werden je 100 µl der Suspension auf Selektivagarplatten ausplattiert (ÜN, 37°C) und am folgenden Tag gewachsene Kolonien auf Blutagar-Platten mit Antibiotikablättchen ausgestrichen.

### 3.2.9 DNA-Amplifizierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifizierung des gewünschten DNA-Abschnittes werden Oligonukleotide (Primer) gewählt, deren Sequenz komplementär zu einer Sequenz am 3'-Ende von Strang und Gegenstrang des gewünschten Amplifikates ist. Nach Trennen des Doppelstranges bei 94°C legen sich die Primer bei der sequenzabhängigen Schmelztemperatur (s. Tabelle 2) an ihre komplementären DNA-Abschnitte an und dienen einer thermostabilen DNA-Polymerase als Startpunkte für die Synthese eines neuen Gegenstranges in 5'→3' Richtung. Die so entstandenen neuen Doppelstränge werden geschmolzen und dienen als Matrize für eine weitere Gegenstrangsynthese. Durch Wiederholung dieser Schritte (je nach Polymerase 25-30 Wiederholungen) wird eine exponentielle Vermehrung des gewünschten DNA-Abschnittes erreicht. Die Standard-PCR (Saiki *et al.*, 1988) erfolgt in drei Schritten: Nach Denaturierung der DNA-Doppelstränge bei 94°C folgt die Primer-Annealingphase, bei der die Anlagerung der Primer stattfindet. Dies geschieht bei einer Temperatur, die sich nach der Schmelztemperatur der Primer richtet. Anschließend erfolgt eine Erhöhung der Temperatur auf die für die Aktivität der DNA-Polymerase optimale Temperatur, so dass die Gegenstrangsynthese stattfinden kann.

#### Durchgeführtes PCR-Protokoll:

Ein 25 µl-Reaktionsansatz enthält 6,8 µl Aqua dest., 2,5 µl 10x Puffer (Ampli<sup>®</sup>Taq PCR Puffer), 4 µl Mg<sup>2+</sup>-Lösung (2 mM MgCl<sub>2</sub>), 5 µl dNTPs (je 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), je 0,6 µl Primer (12 pmol) (Tabelle 2), 5 µl Template-DNA (gekochte Zellen: 1 Kolonie wird in 50 µl Aqua dest. 10 min bei 100°C erhitzt) und 0,5 µl (5 U/µl) Ampli<sup>®</sup>Taq-Gold-Polymerase. Die Amplifikation der DNA-Segmente wird in 25 Zyklen der folgenden 3 Inkubationsschritte in dem Gene Amp<sup>®</sup> 9700 Cyclex (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA) durchgeführt: 1) Denaturierung der DNA bei 94°C für 30 s, 2) Bindung der Primer bei der entsprechenden Schmelztemperatur für 30 s, 3) DNA-Polymerisierung bei 68°C für 4 min. Den Zyklen geht ein einmaliger Denaturierungsschritt bei 95°C für 12 min voraus. Die PCR-Produkte werden anschließend elektrophoretisch in einem 0,6 bis 2 %igem Agarosegel analysiert.

### 3.2.10 Einbau eines Trimethoprim-Kassette tragenden Transposons in einen Vektor

Die Integration eines Transposons, das eine Trimethoprim-Resistenzkassette trägt, in einen Vektor ermöglicht die Identifizierung des Vektors durch einen zusätzlichen Selektionsmarker. Ein Transposon ist ein mobiler, übertragbarer DNA-Abschnitt, der neben Genen für die Transposition auch andere den Phänotyp der Bakterienzelle verändernde Determinanten



aufweisen kann. Bei der Transposition, die auch als illegitime Rekombination bezeichnet wird, werden DNA-Sequenzen ohne bestehende Homologien zwischen der Donor- und Empfänger-DNA in das gleiche oder in ein anderes DNA-Molekül integriert. Diesen Vorgang macht sich der EZ::TN<sup>TM</sup> <DHFR-1> Insertion Kit (Epicentre, Hess. Oldendorf) zunutze, mit dem die Klonierung eines Trimethoprim-Resistengen-tragenden Transposons (887 bp) in einen beliebigen Vektor ermöglicht wird. Folgendes Reaktionsgemisch wird auf ein Endvolumen von 5 µl angesetzt:

0,5 µl 10x Reaktionspuffer (vom Hersteller geliefert)

0,1 µg DNA

x µl EZ::TN <DHFR-1>Transposon (0,1 pmol/µl)

x µl Aqua dest. ad 5 µl

0,5 µl EZ::TN Transposase (1 U/µl)

Die Menge des einzusetzenden Transposons richtet sich nach der Größe der Ziel-DNA in bp und der eingesetzten Masse der Ziel-DNA in µg und berechnet sich aus folgender Formel:

$$\frac{0,1 \mu\text{g DNA}}{\text{bp DNA} \times 660} = \mu\text{mol DNA} = \text{einzusetzende Transposonmenge in } \mu\text{mol}$$

Das Reaktionsgemisch wird 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend nach Zugabe von 1 µl EZ::TN 10 x Stop Solution (1% SDS) 10 min bei 70°C deaktiviert.

### 3.3 Methoden des *in vivo* Tiermodells der Maus

#### 3.3.1 Vorbereitung der Bakterienstämme

Die einzusetzenden Bakterienstämme werden auf Agarplatten mit geeignetem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Jeweils 1 Kolonie wird diesen Kulturen entnommen und in 50 ml LB-Medium (Luria-Bertani) bei 37°C ÜN angereichert, so dass die OD<sub>600</sub>=1-2 (was einer Konzentration von 10<sup>9</sup> KBE/ml entspricht) beträgt. Die Bakterienkulturen werden bei 4°C, 30 min, 4300 UpM zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 20 ml PBS (*phosphate-buffered-saline*) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Waschvorgang wird 2x wiederholt und das Pellet letztendlich in 3 ml sterilem 25 % Glycerol aufgenommen und in -80°C eingefroren. Zur Keimzahlbestimmung der eingefrorenen Bakterienstämme wird ein Aliquot aufgetaut, bei 14.000 UpM 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird 2 x mit PBS gewaschen und

zuletzt in einem dem Aliquot entsprechendem Volumen PBS resuspendiert und eine Verdünnungsreihe durchgeführt. Von den Verdünnungsstufen  $10^6$  bis  $10^{10}$  werden jeweils 100  $\mu$ l auf MH-Platten (Mueller-Hinton) ausplattiert, bei 37° ÜN bebrütet und am folgenden Tag die Keimzahl (KBE) des entsprechenden Stammes bestimmt. Vor dem Einsatz in der Mauspassage werden aus dem eingefrorenem Aliquot 0,5 ml des Bakterienstammes entnommen, in gleicher Weise wie für die Verdünnungsreihe gewaschen und das Pellet zuletzt in 0,5 ml PBS aufgenommen.

### 3.3.2 Mauspassage und Peritoneallavage

Um nur lebensfähige Bakterien in den Versuch einzusetzen, wird einer BALB/c-Maus (KGW= 20-25 g) 0,2 ml ( $10^7$  KBE) des jeweiligen Bakterienstammes intraperitoneal appliziert. Die Applikation erfolgt seitlich der Mittellinie nahe des Nabels im unteren Quadranten des Abdomens, da hier bei einem Einstich von 45° weder die Gefahr einer Verletzung des Darmes noch der Niere erfolgt. Es wird eine 1 ml Spritze mit einer Kanüle der Größe 20G verwendet. Maximales Volumen der Applikationsmenge beträgt 1 ml, wobei in den hier durchgeführten Versuchen nie mehr als 0,2 ml eingesetzt wurden. Nach der Applikation wird anhand einer Verdünnungsreihe die Konzentration der applizierten Menge überprüft. Nach 24 h wird die Maus getötet (5 min in CO<sub>2</sub>) und eine Peritoneallavage durchgeführt. Hierbei wird ein 1 cm langer Schnitt in der zuvor mit 100 % Isopropanol desinfizierten Medianen der Bauchdecke vollzogen, das Abdomen eröffnet und mit einer 5 ml Spritze 3 ml steriles PBS in die Bauchhöhle appliziert. Der Peritonealraum wird gewaschen und anschließend die Flüssigkeit mit einer 1 ml Spritze vorsichtig abgezogen, ohne den Darm zu verletzen. Der Lavageinhalt wird auf geeignete antibiotikahaltige LB-Platten ausplattiert. Es werden zweimal 100  $\mu$ l des Lavageproduktes als auch das abzentrifugierte (14.000 UpM, 5 min) konzentrierte Pellet ausplattiert und ÜN bei 37° bebrütet. Von den Platten wird pro Bakterienstamm 1 Kolonie in 500 ml LB-Medium mit Antibiotikum ÜN bei 37°C angereichert. Am nächsten Tag wird die Kultur wie oben beschrieben abzentrifugiert, mit PBS zweimal gewaschen und letztendlich in 15 ml 25 % Glycerol aufgenommen und bei – 80°C eingefroren. Die Keimzahl, der für den Tierversuch einsetzbaren Stämme, wird wie beschrieben mithilfe einer Verdünnungsreihe durchgeführt.

### 3.3.3 *In vivo* Darmkolonisierung im Tiermodell der Maus

Für das Darmkolonisierungsmodell werden weibliche, 7-8 Wochen alte C57Bl/6-Mäuse der Firma *Harlan-Winkelmann* (Borchen) eingesetzt. Die Mäuse werden in gängigen Versuchsräumen in IVC-Käfigen (*individual ventilated cages*) gehalten.

### 3.3.3.1 Nachweis von *E. coli*

Das zu untersuchende Material, wie z.B. Kot, wird auf McConkey-Platten, die der Selektion gramnegativer Keime dienen, ausplattiert. Nach ÜN-Bebrütung bei 37°C wird eine genaue Keimbestimmung der Kolonien vorgenommen. Hierfür wird die biochemische Eigenschaft von *E. coli*, weder Citrat noch Harnstoff zu spalten, genutzt und ein Citrat- bzw. Harnstoffröhrchentest durchgeführt. Die Röhrchen werden mit je einer Kolonie beimpft und nach 24 h (37°C) das Ergebnis beurteilt: würden die Bakterien Citrat und Harnstoff umsetzen, käme es durch die entsprechende chemische Reaktion des Teströhrchenagars zu einem Farbumschlag (Citrat: von grün nach blau; Harnstoff: von gelb nach rosa). Ein weiterer Nachweis für *E. coli* kann mit der kommerziellen "Bunten Reihe" (Api 20E) erbracht werden. Sie dient der Untersuchung unterschiedlicher biochemischer Eigenschaften eines Bakterienstammes.

### 3.3.3.2 Kokolonisierungsmodell

In dem Kokolonisierungsmodell wird den Mäusen ein Keimgemisch des jeweiligen Bakterienstammes und dessen Mutanten im Verhältnis 1:1 oral appliziert. Der Vorteil einer gemeinsamen Applikation liegt zum einen in der direkten Vergleichsmöglichkeit der Keimzahlwerte beider Stämme in einem Individuum (Maus), zum anderen kann eine gegenseitige Beeinflussung von Ausgangsstamm und Mutante untersucht werden.

Versuchsdurchführung: 1 ml der einzusetzenden Stämme ( $2 \times 10^8$  KBE) wird dem eingefrorenen Aliquot entnommen, die Stämme werden 5 min bei 14.000 UpM zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit 1 ml sterilem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Waschvorgang wird 2 x wiederholt. Zuletzt wird das Pellet in 1 ml sterilem PBS resuspendiert. Je 500 µl der einzusetzenden Stämme werden gut miteinander vermischt und bis Einsatz im Tierversuch auf Eis gelagert.

In jedem Kokolonisierungsversuch werden 15 C57Bl/6 Mäuse mit einer Gruppengröße von 5 Mäusen infiziert. Um die Flüssigkeitsaufnahme zu erleichtern, werden die Mäuse 3-4 h vor Applikation nüchtern gesetzt. Die Applikation des Keimgemisches erfolgt oral mithilfe einer 10-100 µl Eppendorf-Research-Pipette. Hierbei wird ein Volumen von 50 µl appliziert, was einer Keimzahl von  $10^7$  KBE entspricht. Nach Applikation erfolgt eine Konzentrationsbestimmung mithilfe einer Verdünnungsreihe, um die oral verabreichte Menge zu bestimmen bzw. zu bestätigen. Hierbei wird das Keimgemisch auf antibiotikahaltige LB-Agarplatten ausplattiert. Die erste Mäusegruppe wird am Tag 3, die zweite am Tag 7 und die dritte Mäusegruppe am Tag 14 unter CO<sub>2</sub> (5 min) getötet. Zur Bestimmung der Keimzahl/ml Darminhalt wird eine Darmlavage durchgeführt. Hierfür wird der zu öffnende Bereich mit

100 % Isopropanol desinfiziert, das Abdomen durch einen Schnitt in der Medianen eröffnet, der Darm hinter dem Pylorus von dem Magen getrennt und das Gekröse entfernt. Anschließend erfolgt die Darmspülung mit 5 ml sterilem PBS. Unterschiedliche Konzentrationen (konzentriert,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) des suspendierten Darminhaltes werden nun auf die oben genannten Antibiotikaplatten ausplattiert, bei 37°C ÜN bebrütet und am folgenden Tag die Keimzahl (KBE) der eingesetzten Stämme pro ml Darminhalt bestimmt.

### 3.3.3.3 Einzel-Kolonisierungsversuch

Der Versuch wurde als Hauptversuch des Darmkolonisierungsmodells gewählt, da hier die einzelnen Stämme unabhängig voneinander bzw. ohne gegenseitige Beeinflussung in ihrem Kolonisierungsverhalten beurteilt werden können. Pro Stamm werden für einen Infektionsversuch 24 C57Bl/6 Mäuse eingesetzt, wobei die Gruppengröße 8 Mäuse beträgt. Die Tiere werden an den Tagen 2, 8 und 15 getötet. Für eine differenzierte Bewertung der Lokalisation der Bakterienstämme wurde das folgende Material untersucht: 1. Dünndarminhalt, 2. Dünndarmwand, 3. adhäre Zellen aus dem Dünndarm, 4. Dickdarminhalt, 5. Dickdarmwand, 6. adhäre Zellen aus dem Dickdarm.

Versuchsdurchführung: Je 1 ml der einzusetzenden Stämme werden dem eingefrorenen Aliquot entnommen, die Stämme werden 5 min bei 14.000 UpM zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit 1 ml sterilem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Waschvorgang wird 2 x wiederholt. Zuletzt wird das Pellet in 1 ml sterilem PBS resuspendiert und bis Einsatz im Tierversuch auf Eis gelagert. Die Applikation erfolgt wie in 3.3.3.2 beschrieben, wobei 50 µl ( $10^7$  KBE) eines Stammes oral appliziert werden, und die gleiche Applikation an drei aufeinanderfolgenden Tagen erfolgt. So ist eine hohe und stabile Keimzahl innerhalb einer Versuchsgruppe gewährleistet. Die Keimzahlbestimmung der oral applizierten Bakterien wird, wie unter 3.3.3.2 dargestellt, durchgeführt.

Vorgehensweise der Organentnahme: Der Darm wird, wie in 3.3.3.2 beschrieben, entnommen. Dünndarm und Dickdarm werden getrennt voneinander behandelt. Hierbei wird ein ca. 1-2 cm großer Abschnitt des entsprechenden Darmes mit einem Skalpell herausgetrennt, das Gewicht mit Darminhalt bestimmt, anschließend mit 3 ml sterilem PBS + 0,5 % Tergitol gespült und der Inhalt darin aufgenommen. Die Darmwand wird erneut, diesmal ohne Inhalt, gewogen und in 3 ml PBS + 0,5 % Tergitol gebracht. Zur Bestimmung der adhären Zellen wird ein neben dem ersten Abschnitt gelegener Darmabschnitt derselben Größenordnung abgetrennt, mit sterilem PBS gespült, gewogen, mit einem Skalpell der Länge nach aufgeschnitten und mit einem sterilen Objektträger die Schleimhautoberfläche

vorsichtig abgekratzt. Die abgeschabten Zellen werden in 2 ml PBS + 0,5 % Tergitol aufgenommen. Die Auswertung der adhärennten Zellen erfolgt in KBE/g Darmwand.

Anschließend werden Dün- und Dickdarmwand homogenisiert, Darminhalt und adhärennte Zellen gut suspendiert und von allen Proben 100 µl unterschiedlicher Verdünnung (konzentriert,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ) auf entsprechende Antibiotikaplatten ausplattiert und ÜN bei 37°C bebrütet. Am folgenden Tag wird durch Auszählen der Kolonien die Keimzahl pro Gramm Probenmaterial (KBE/g) bestimmt.

### **3.3.4 Harnwegsinfektionsmodell**

Im Harnwegsinfektionsmodell wird das Infektionsverhalten eines HPI-tragenden UPEC-Stammes und dessen HPI-Mutanten untersucht. Hierbei erfolgt eine Keimzahlbestimmung in Urin, Blase und Niere und eine Bestimmung des Infektionsgrades anhand der Auszählung neutrophiler Granulozyten im Urin.

#### **3.3.4.1 Mausstamm**

Aus der Literatur (Hopkins *et al.*, 1998) ist die Bedeutung des genetischen Hintergrundes des einzelnen Individuums für die Empfänglichkeit eines Harntraktinfektes, dessen Entwicklung und den Grad der verursachten Entzündung bekannt. Der Inzucht-Stamm C3H/HeN wird für den Einsatz unseres Harnwegsinfektionsmodells gewählt, da dieser "Endotoxin-high-responder" Stamm keinerlei Defekte in der Immunantwort auf Lipopolysaccharide u.a. Antigene besitzt. Somit stehen Infektions- und Entzündungsgrad in einem natürlichen Verhältnis zueinander, wobei Harnwegsinfektionen meist innerhalb von 14 Tagen überwunden werden (Hopkins *et al.*, 1998).

Für das Harntraktinfektionsmodell werden weibliche 8-9 Wochen alte C3H/HeN Mäuse der Firma Charles River (Sulzfeld) eingesetzt.

#### **3.3.4.2 Applikationsart und Menge**

Die Applikation der uropathogenen Keime erfolgt gemäß ihres natürlichen Infektionsweges transurethral. Nach anfänglichen Vorversuchen mit einer 0,5-10 µl Eppendorf-Research Pipette und aufgesetzter GELoader Spitze (Eppendorf, Hamburg) (das nachgebende vordere Spitzenende wurde mit einer sterilen Schere entfernt), erfolgten die Hauptversuche mit einer elektronischen Pipette (Rainin, Gießen). Diese ermöglicht eine manuell steuerbare Flüssigkeitsabgabe in 0,2 µl-Abständen und Applikation des Gesamtvolumens über 30 s. Hierdurch wird eine Applikation mit minimaler Druckausübung auf die Blase gewährleistet, so dass die Gefahr eines künstlich erzeugten vesicoureteralen Refluxes verringert wird. Nicht

nur die zu große Druckausübung spielt hierfür eine Rolle, ebenso ist das applizierte Volumen von Bedeutung. Bei einem maximalen Blasenvolumen von ca. 50-100  $\mu$ l bei einer 7-8 Wochen alten Maus, sollte das Applikationsvolumen nicht mehr als 20  $\mu$ l betragen (Johnson & Brown, 1996, Hopkins *et al.*, 1995). Vor der Applikation ist durch sanften Druck auf das untere Abdomen die Blase zu entleeren, wodurch die Gefahr einer allzu raschen Urinabgabe nach Erwachen minimiert und der Widerstand bei Applikation verhindert wird.

### 3.3.4.3 Anästhesie

Als Narkoseform wurde die etablierte Ketamin- (Ketavet<sup>®</sup>) Xylazin (Rompun<sup>®</sup>) Narkose gewählt (Paddleford & Erhardt, 1998). Ketamin stellt hierbei das Analgetikum mit hypnotischen Eigenschaften, Xylazin ein Muskelrelaxans mit sedativen und initial kurz analgetischen Eigenschaften dar. Ein Gemisch aus 2 ml Ketavet<sup>®</sup> (Pharmacia, Erlangen), 1 ml Rompun<sup>®</sup> (Bayer, Leverkusen) und 9 ml Aqua dest. wurde hergestellt, dies entspricht einer Konzentration von 1,7 mg Ketamin und 0,17 mg Xylacin/100  $\mu$ l. Die von Erhardt empfohlene Konzentration beträgt für Ketamin 100 mg/kg KGW, für Xylazin 5 mg/kg KGW. Einer 8-Wochen alten Maus mit einem KGW von 20-25 g werden 0,08-0,1 ml des Anästhetikums intraperitoneal, neben der Medianen im unteren Quadranten des Abdomens appliziert. Die Einleitungsphase der Narkose dauert ca. 5 min, die chirurgische Toleranz ca. 30 min, wobei die Nachschlafzeit bis zu 60 min andauern kann. Da die Wirkung durch äußere Reize beeinträchtigt werden kann, sind Lärm und Berührung zu vermeiden. Eine Nachinjektion zur Verlängerung der Anästhesie ist möglich. Da die Gefahr einer Hypothermie besteht (Muir *et al.*, 1996), sollten die Tiere nach dem Eingriff unter einer Rotlichtlampe warmgehalten werden. Ein präanästhetischer Futterentzug ist bei Tieren < 1 kg nicht angebracht, da es zu Verschiebungen im Säure-Basen-Haushalt und zu einer Hypoglykämie kommen kann (Paddleford & Erhardt, 1998). Unter Ketamin-Wirkung sind die Augen geöffnet, so dass mit einer Salbe (Bepanthen<sup>®</sup>, Roche) Vorsorge gegen Austrocknung getroffen werden muss. Während und nach dem Eingriff ist die Atemfrequenz zu beobachten. Im Falle der Gefahr eines Atemstillstandes ist durch Fingertippen auf die Thoraxwand sowie durch Schwingen der Maus in ihrer Längsachse die Atmung anzuregen.

### 3.3.4.4 Versuchsdauer

Vorherige Studien belegen, dass sich Harnwegsinfektionen in C3H/HeN-Mäusen innerhalb von 14 Tagen (Hopkins *et al.*, 1998) ausheilen. So wurde ein Versuchszeitraum von 7 Tagen gewählt, um das Infektionsverhalten und Entzündungsreaktionen der UPEC-Stämme zu

beobachten. Die Tiere wurden am Tag 1, 3 und 7 getötet und die Organentnahme durchgeführt.

#### **3.3.4.5 Überprüfung der Versuchsmäuse auf existierenden Harnwegsinfekt und Infektsanierung**

Vor Versuchsbeginn sind alle Mäuse auf bestehende Harnwegsinfekte zu überprüfen. Hierfür wird jede Maus auf eine sterile Petrischale gesetzt und der abgelassene Urin anschließend auf einer Mueller-Hinton Platten ausplattiert und ÜN bei 37°C bebrütet. Bei einer Keimzahl von  $> 100.000$  Keimen/ml besteht ein hochgradiger Verdacht auf eine bereits bestehende Harnwegsinfektion, die Tiere sind somit von dem Versuch auszuschließen. Bei verbreiteten Auftreten sollte eine Antibiotikabehandlung der gesamten Gruppe durchgeführt werden. Das durch Erstellung eines Antibiotogramms gewählte Antibiotikum wird durch Zugabe in das Trinkwasser appliziert, wobei die Behandlung über 5 Tage erfolgen soll. Nach einer Regenerationszeit von 5-7 Tagen ist erneut die Keimzahl zu bestimmen, bevor die Tiere in den Versuch eingesetzt werden können.

#### **3.3.4.6 Durchführung des Harnwegsinfektionsmodelles**

Das Harnwegsinfektionsmodell wird in Form von Einzelinfektionsversuchen durchgeführt, so dass unabhängig von gegenseitiger Beeinflussung das Infektionsverhalten des UPEC-Stammes und seiner Mutante beurteilt werden kann. Aufgrund der höheren Schwankungen der applizierten Keimzahl bei transurethraler Applikation im Vergleich zu i.v.-Gaben, werden für einen Infektionsversuch pro Stamm 30 C3H/HeN-Mäuse eingesetzt, wobei die Gruppengröße 10 Mäuse beträgt. Die Tiere werden am Tag 1, 3 und 7 getötet. Neben der Organentnahme von Niere und Blase zur Bestimmung der Keimzahl wird der Urin desselben Tages auf Anzahl der Bakterien (KBE/ml) und Granulozyten überprüft.

Versuchsdurchführung: 1 ml der Bakteriensuspension des entsprechenden UPEC-Stammes wird dem eingefrorenem Aliquot entnommen und 5 min bei 14.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit 1 ml sterilem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Waschvorgang wird 2 x wiederholt. Zuletzt wird das Pellet in 1 ml sterilem PBS resuspendiert und bis Einsatz im Tierversuch auf Eis gelagert. Die Mäuse werden wie unter 3.3.4.3 beschrieben anästhesiert, nach Eintritt der Narkose auf den Rücken gelagert und durch sanften Druck auf das untere Abdomen die Blase entleert. Die Applikation erfolgt transurethral mithilfe der Rainin®-Pipette und aufgesetzten GELoadertip (3.3.4.2), wobei ein Volumen von 20 µl gewählt wird, was einer applizierten Keimzahl von  $10^7$  KBE entspricht. Nach Applikation werden die Tiere ca. 30 min unter einer Rotlichtlampe erwärmt, um eine

Hypothermie zu vermeiden. An den Tagen 1, 3 und 7 werden die Tiere getötet (CO<sub>2</sub>). Zuvor wird der Urin auf einer sterilen Petrischale gewonnen und bis zur weiteren Untersuchung in einem Eppendorf-Cup auf Eis gelagert. Zur Bestimmung der Keimzahl im Urin werden 10 µl des Urins sowie eine 10-fache Verdünnung auf Mueller-Hinton Platten ausplattiert, bei 37° ÜN bebrütet und am folgenden Tag als KBE/ml Urin abgelesen. Die Granulozytenzahl im Urin wird aus 9 µl des Urins mithilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Anzahl der Granulozyten pro µl Urin lässt sich mittels folgender Formel bestimmen:

$$\frac{\text{Anzahl der Granulozyten}}{\text{ausgezählte Fläche (mm}^2\text{) x Kammertiefe (mm) x Verdünnung}} = \text{Granulozyten/}\mu\text{l Urin}$$

Die Organe Niere und Harnblase werden nach Eröffnen der Bauchhöhle mit sterilem Besteck entnommen, mit einem Skalpell halbiert und je eine Hälfte in ein Einbettgefäß mit Einbettmedium (Tissue-TEK<sup>®</sup>, Vogel) gebracht und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kryokonservierten Gewebe können später einer histologischen Untersuchung des Nieren- und Blasengewebes dienen. Die zweite Hälfte der Organe wird gewogen, in 1 ml 0,5 % Tergitol-haltigen PBS aufgenommen und 1-2 Stunden auf Eis gelagert. Die Organe werden anschließend in 2 ml-Homogenisatoren homogenisiert, je 100 µl der Suspension werden in unterschiedlichen Konzentrationen (konzentriert, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>) auf Mueller-Hinton-Platten ausplattiert (ÜN, 37°C) und am folgenden Tag die Keimzahl pro g Gewebe bestimmt.

#### 3.3.4.7 Koinfektionsmodell

Das Koinfektionsmodell entspricht in seiner Durchführung dem Einzelinfektionsmodell, nur werden in diesem Fall zwei Stämme (z.B. Ausgangsstamm und Mutante) im Verhältnis 1:1 miteinander vermischt und die Suspension anschließend, wie unter 3.3.4.2 beschrieben, transurethral appliziert. Das Modell dient der Untersuchung der gegenseitigen Beeinflussung der Stämme in ihrem Infektionsverhalten und gibt gleichzeitig einen Hinweis über Expression der zu untersuchenden Proteine. Bei diesem Modell wird auf eine Untersuchung von Entzündungszellen (neutrophile Granulozyten) verzichtet. Die Keimzahlbestimmung von Niere, Blase und Urin erfolgt wie beschrieben (3.3.4.6), wobei die Homogenisate zur Differenzierung der Bakterienstämme entsprechend des jeweiligen Resistenzverhaltens auf unterschiedliche Antibiotikaselektivplatten ausplattiert werden.



### 3.4 Spezielle Methoden

#### 3.4.1 Untersuchung der HPI-Genexpression unter Urinexposition

Neben der Keimzahlbestimmung im Harnwegsinfektionsmodell soll die Expression der HPI-Gene des UPEC-Stammes *in vitro* und *in vivo* untersucht werden. Der Nachweis einer Yersiniabaktinproduktion kann zum einen durch den Luciferase-Bioassay, zum anderen durch den Cross-feeding-Assay erbracht werden.

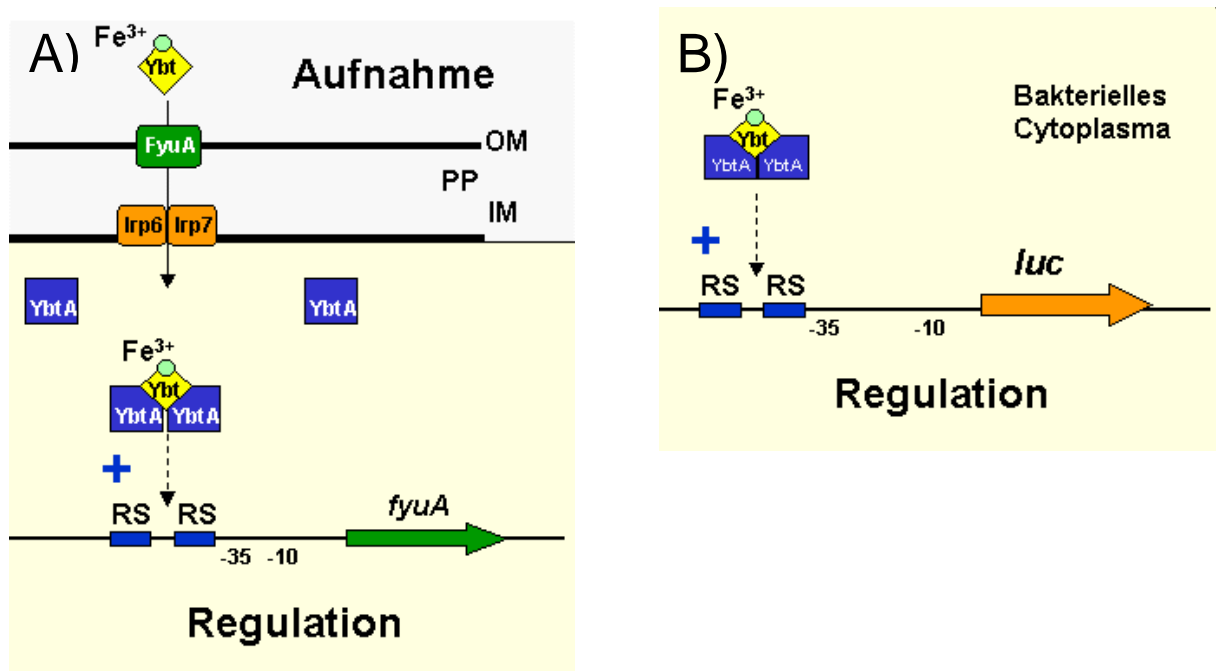
##### 3.4.1.1 Luciferase-Bioassay

Der Luciferase-Bioassay dient dem Nachweis der Yersiniabaktinproduktion eines zu untersuchenden Stammes *in vitro*. Aufgrund der geringen Urinmenge, die von Mäusen gewonnen werden kann, wird zum Nachweis der *in vivo* Ybt-Produktion nach transurethraler Infektion auf die Nachweismethode über den Luciferase-Bioassay verzichtet und der unter 3.4.1.2 beschriebene Cross-feeding-Assay durchgeführt.

Die Grundlage des Luciferase-Assays stellt das Reportergen *luc* dar, welches die Synthese des Enzyms Luciferase kodiert und dessen Aktivität in einer Biolumineszenzreaktion nachgewiesen werden kann. Luciferase kommt in der Natur bei Glühwürmchen, Leuchtkäfern (*firefly*) oder Leuchtbakterien vor. Wird Luciferase in transfizierten Zellen als Reportergenprodukt hergestellt, kann die Aktivität des Enzyms *in vitro* durch eine Biolumineszenzreaktion in den Zelllysaten gemessen werden. Firefly-Luciferase wandelt Luciferin in Gegenwart von molekularem Sauerstoff, ATP und  $Mg^{2+}$  in Oxyluciferin und  $CO_2$  um. Bei dieser Reaktion wird Licht der Wellenlänge 562 nm emittiert, welches in einem Luminometer (MicroLumat *Plus* LB 96 V, Berthold Technologies, Bad-Wildbach) gemessen werden kann. Da die gemessene Lichtemission proportional zur Menge Luciferase ist, kann indirekt auf die Transkriptionsrate des Luciferase-Reportergens geschlossen werden. Eine Quantifizierung der Syntheserate ermöglicht den direkten Vergleich unterschiedlicher Teststämme.

Um die Produktion des Siderophors Yersiniabaktin bei HPI-tragenden UPEC-Stämmen und damit eine funktionell aktive HPI nachweisen zu können, wurde das folgende Konstrukt erstellt. Der *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium Stamm WR 1542 dient als Indikatorstamm zum Nachweis von Ybt und zeichnet sich dadurch aus, dass sämtliche Eisenaufnahmesysteme durch Mutationen deletiert wurden (Rabsch, RKI, unveröffentlicht). Der Stamm trägt das Plasmid pACYC5.3L auf dem das *luc*-Gen unter Kontrolle des *fyuA*-Promotors liegt. Zudem trägt das Plasmid das Regulatorgen *ybtA*, das *fyuA*-Gen für den Ybt-

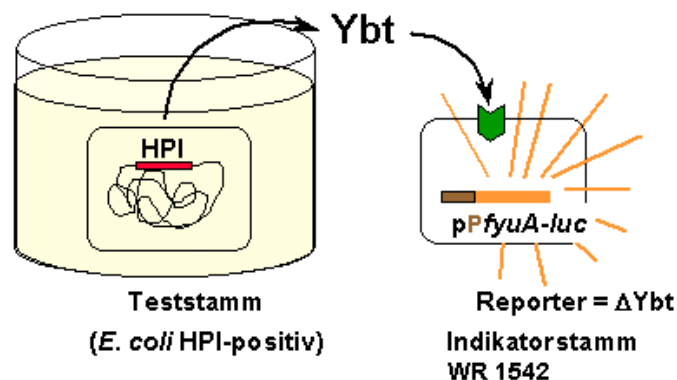
Rezeptor und die für den Siderophortransport wichtigen Gene *irp 6, 7* und *8*. Somit kann der Stamm WR 1542 Eisen ausschließlich in Form von Eisen-beladenen Yersiniabaktin über den FyuA-Rezeptor beziehen. Nach Aufnahme des Yersiniabaktins bindet das Siderophor an das Regulatorprotein YbtA, das in dieser Form als Positivregulator des *fyuA*-Promotors dient (Fetherston *et al.*, 1996). Die Ybt-Menge eines HPI-positiven Stammes im Kulturüberstand (z.B. Urinkultur) kann durch Zugabe des Überstandes zu dem Indikatorstamm bestimmt werden. Das im Kulturüberstand befindliche Ybt kann vom Indikatorstamm über den FyuA-Rezeptor aufgenommen werden und bindet über das YbtA-Protein an den *fyuA*-Promotor des pACYC5.3L Plasmides, wobei es die Expression des nachgeschalteten Luciferase-Gens erhöht. Die Produktion der Luciferase lässt sich mittels Chemilumineszenzreaktion nachweisen und quantifizieren, so dass unterschiedliche Teststämme in Bezug auf ihre Yersiniabaktinproduktion miteinander verglichen werden können.



**Abbildung 4: Darstellung der Yersiniabaktin-Aufnahme und Regulation in der Bakterienzelle. A) Ybt bindet im Zytoplasma an das Regulatorprotein YbtA, das in gebundener Form als Positivregulator des *fyuA*-Promotors dient. B) In *Salmonella enterica* Typhimurium WR 1542 ist dem *fyuA*-Promotor ein Luciferase-Gen (*luc*) nachgeschaltet.**

Protokoll zur Untersuchung der Yersiniabaktinproduktion verschiedener Teststämme in unterschiedlichen Nährmedien: Die Teststämme werden zunächst zwei Tage in nährstoffreichem LB-Medium angereicht (8 ml LB mit entsprechendem Antibiotikum bei  $37^{\circ}\text{C}$ ), so dass eine hohe Ausgangskeimzahl für den folgenden Versuch gewährleistet werden kann. Hierbei wird das Anreicherungsmedium nach 24 h abzentrifugiert (4300 UpM, 15 min)

und das Pellet in frischem Nährmedium aufgenommen (8 ml LB mit entsprechendem Antibiotikum bei 37°C). Nach erneuter Anzüchtung der Bakterien über 24 h wird das abzentrifugierte Pellet parallel in NBD-, Urin und LB-Medium über 5 Tage angereichert. Hierfür werden 3 x 2 ml der ÜN-Kultur aufgeteilt, bei 4300 UpM 15 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets in den Medien NBD, Urin und LB aufgenommen. Die übrigen 2 ml der Kultur werden bei 14.000 UpM 5 min zentrifugiert und der Überstand als Nullwert eingefroren. Die eisenreichhaltige LB-Kultur, sowie die sehr eisenarme NBD-Kultur (2,2'-Dipyridyl-Eisen-Komplex) dienen als Kontroll- und Vergleichsmedien.



**Abbildung 5:** Die Yersiniabaktinproduktion des HPI-positiven Teststammes kann durch Zugabe des Überstandes zum Indikatorstamm *Salmonella enterica* Typhimurium WR 1542 bestimmt werden. Ybt bindet im Zytoplasma über das YbtA-Protein an den *fyuA*-Promotor, wodurch die Expression des nachgeschalteten Luciferase-Gens erhöht wird. Die Luciferase-Produktion lässt sich mittels Chemilumineszenzreaktion nachweisen.

Am Tag 6 der Versuchsreihe wird der Indikatorstamm *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium WR 1542 mit entsprechenden Antibiotika (Kanamycin, Tetracyclin, Chloramphenicol, Ampicillin) in CDHM-Medium bei 37°C ÜN angereichert. Nach 24 h (Tag 7) werden 2 ml der Proben bei 14.000 UpM 5 min zentrifugiert und je 666 µl des Überstandes mit 100 µl der Indikatorstamm-Kultur in 333 µl NBD-Medium aufgenommen. Die NBD-Kultur erhält hierbei die dreifache Konzentration an Antibiotikum. Der Ansatz wird 24 h bei 37°C im Schüttler inkubiert, so dass im Überstand enthaltenes Yersiniabaktin von dem Indikatorstamm aufgenommen werden kann. Anschließend werden die Proben 15 min bei 14.000 UpM und 4°C pelletiert, der Überstand sofort vollständig abpipettiert und die Pellets in 1 ml Luc-Lysispuffer resuspendiert. Die Inkubation erfolgt 15 min bei RT, wobei die Proben alle 3 min durch starkes Schütteln resuspendiert werden sollten. Das Lysat wird 10 min bei 14.000 UpM zentrifugiert, das Pellet verworfen und der Überstand für die Luciferase-

Messung verwendet. Hierfür werden je 75 µl pro Probe in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte gefüllt, wobei zur Mehrfachbestimmung jeweils 2-3 Ansätze der Probe eingesetzt werden sollten. Die Luciferaseaktivität wird in einem Chemiluminometer (s.o.) gemessen. Das Gerät führt jeder Probe 50 µl des luciferinhaltigen Luc-Reagenzes zu und misst anschließend die entstandene Biolumineszenz, anhand derer auf die Yersiniabaktinproduktion der Teststämme in den unterschiedlichen Medien geschlossen werden kann.

#### Induktionsschema:

<u>Tag 0</u>	<u>Tag 1</u>	<u>Tag 2</u>	<u>Tag 7</u>
		→ A) 2 ml für Luciferase-Bioassay (Nullwert)	
Anreicherung in 8 ml LB	→ Pellet in 8 ml LB		→ Luciferase-messung
		→ B) 3x 2 ml Pellet in 5 ml NBD, Urin, LB	

Protokoll zur Untersuchung der Yersiniabaktinproduktion verschiedener Teststämme in eisenarmen NBD-Medium: Die Teststämme werden mit den entsprechenden Positiv- und Negativkontrollstämmen in je 5 ml eisenarmen NBD-Medium bei 37°C 5 Tage unter leichtem Schütteln inkubiert. Am Tag 6 erfolgt die Luciferasemessung mit dem Indikatorstamm *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium WR 1542. (s.o.). Je nach Höhe der Luciferaseaktivität kann auf die Yersiniabaktinproduktion verschiedener Teststämme im eisenarmen Medium geschlossen werden.

#### Induktionsschema:

<u>Tag 0</u>	<u>Tag 6</u>
Anreicherung in 5 ml NBD	→ Luciferasemessung

#### **3.4.1.2 Cross-feeding-Assay mit dem *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium Stamm WR 1542**

Einen weiteren Nachweis über Produktion von Yersiniabaktin wird durch den sogenannten Cross-feeding-Assay erbracht. Dieser Test nutzt die Tatsache, dass der *S. enterica* Typhimurium Stamm WR 1542 (Indikatorstamm) unter Eisenmangelbedingungen nur bei gleichzeitigem Vorhandensein von Yersiniabaktin wachsen kann. Aufgrund der Mutation

sämtlicher Eisenaufnahmesysteme kann er Eisen lediglich über den plasmidkodierte FyuA-Rezeptor (s. 3.4.1.1) in Form von eisen gebundenen Yersiniabaktin aufnehmen. Der Indikatorstamm wird in einen Weichagar (0,5 %ig) eingegossen (CDHM-Agar s. Anhang), in dem durch Zusatz des Chelators EDDA (0,06 %) (Ethyldiamindi(o-hydroxyphenyl-essigsäure) die Konzentration von Eisenionen ( $\text{Fe}^{\text{II}}$ ) stark erniedrigt ist. Durch Auftragen eines definierten Volumens (8  $\mu\text{l}$ ) des zu testenden Mediums auf ein Filterblättchen und Auflegen des so beschickten Testblättchens auf die Agarplatte, kann nach  $\bar{\text{U}}$ N Bebrütung bei 37°C das Yersiniabaktin-Siderophor im Testmedium als Wachstumshof des Indikatorstammes um das Filterblättchen nachgewiesen werden. Um das Bakterienwachstum besser darzustellen, ist durch Zugabe von 1 %iger Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung und einer Einwirkzeit von 5-10 min ein rotes Anfärben des Bakterienhofes möglich.

## 4 Ergebnisse

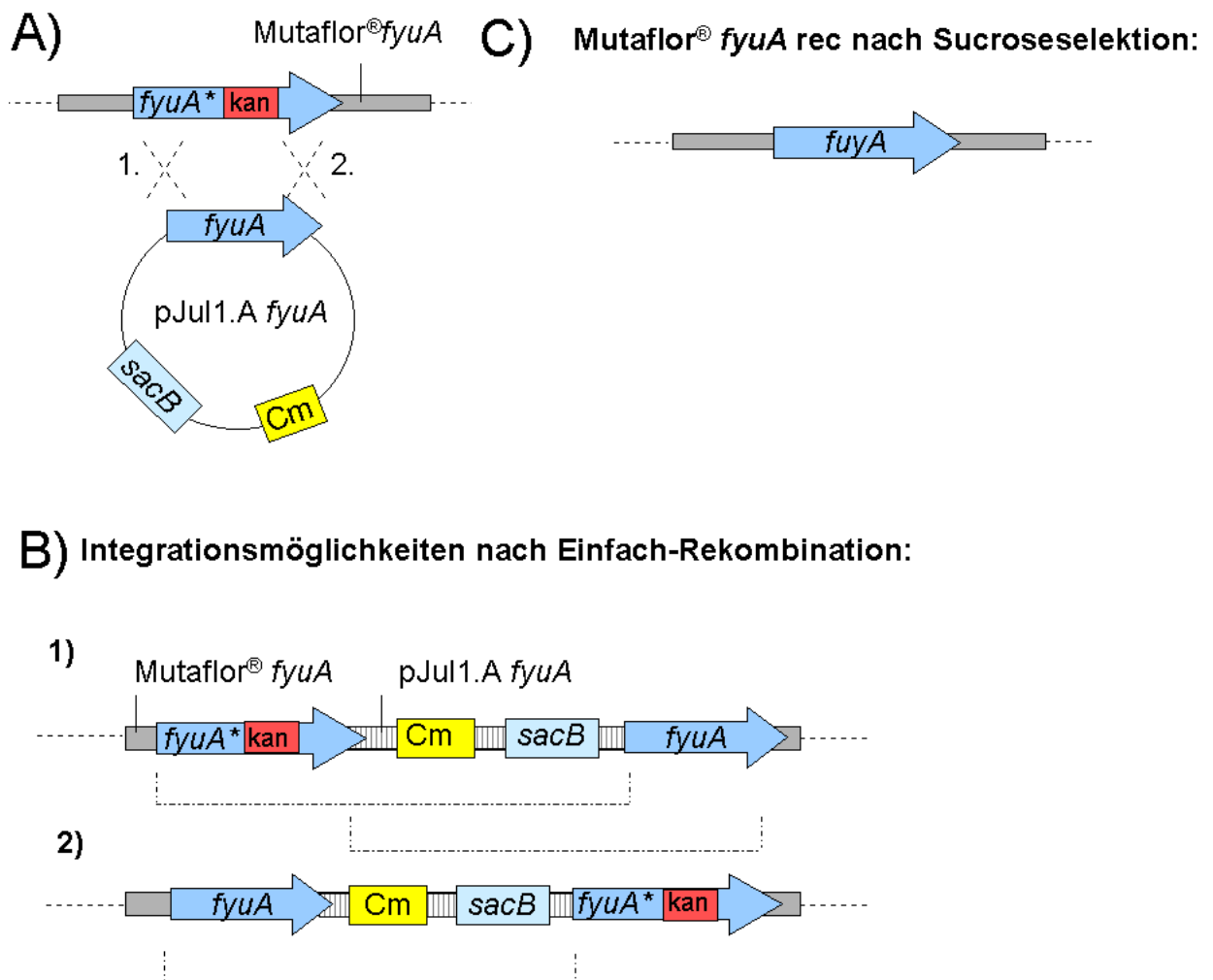
### 4.1 Darmkolonisierung mit *E. coli* Stamm Nissle 1917, Mutaflor<sup>®</sup>

In diesem Abschnitt der Arbeit wird die Bedeutung der *Yersinia*-HPI für die Kolonisierungsfähigkeit des darmkommensalen *E. coli* Stamm Nissle 1917 (Mutaflor<sup>®</sup>) dargestellt. Hierzu wurde das Darmkolonisierungsmodell in der Maus gewählt und die Fähigkeit der Darmkolonisierung des Mutaflor<sup>®</sup>-Stammes im Vergleich zu den isogenen Mutanten Mutaflor<sup>®</sup> *irp1* und Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA in vivo* untersucht. Um die Bedeutung der HPI für die Darmkolonisierung darzustellen, wurde sowohl der Einfluss der *irp1*-Mutation (defekte Yersiniabaktinproduktion) als auch der *fyuA*-Mutation (fehlende Expression des Siderophorrezeptors) auf die Persistenz des Mutaflor<sup>®</sup>-Stammes im Darm betrachtet. Die Untersuchung erfolgte durch Keimzahlbestimmung des entsprechenden Stammes im Darm an unterschiedlichen Zeitpunkten nach oraler Applikation. Um unvorhergesehene Mutationen am Genom bei der Mutantenherstellung und damit verfälschte Ergebnisse auszuschließen, wurden die Versuche abschließend mit einer rekomplementierten Mutante durchgeführt. Die Mutanten *irp1* und *fyuA* wurden in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe S. Schubert, Max von Pettenkofer-Institut, München hergestellt, die *fyuA*-Rekomplementante wurde in dieser Arbeit erstellt.

#### 4.1.1 Strategie zur Rekomentierung der Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* Mutante

Die Herstellung der Rekomplementante erfolgte über den rekombinatorischen Austausch homologer DNA-Bereiche des *fyuA*-Gens der Mutanten *fyuA::kan* (Mutante *fyuA* wurde durch Insertion einer Kanamycinkassette in das *fyuA*-Gen erstellt) mit dem intakten *fyuA*-Gen des Suizidvektors pJul1.A *fyuA* (Abb. 6). Um einen kompletten Austausch zu gewährleisten, wurde der Vektor pJul1.A eingesetzt, der das Sucroseempfindlichkeitsgen *sacB* als Negativ-

Selektionsmarker trägt. Nach Zugabe von Sucrose übt das *sacB* kodierte Enzym Levansucrase toxische Wirkung auf gramnegative Bakterien aus.

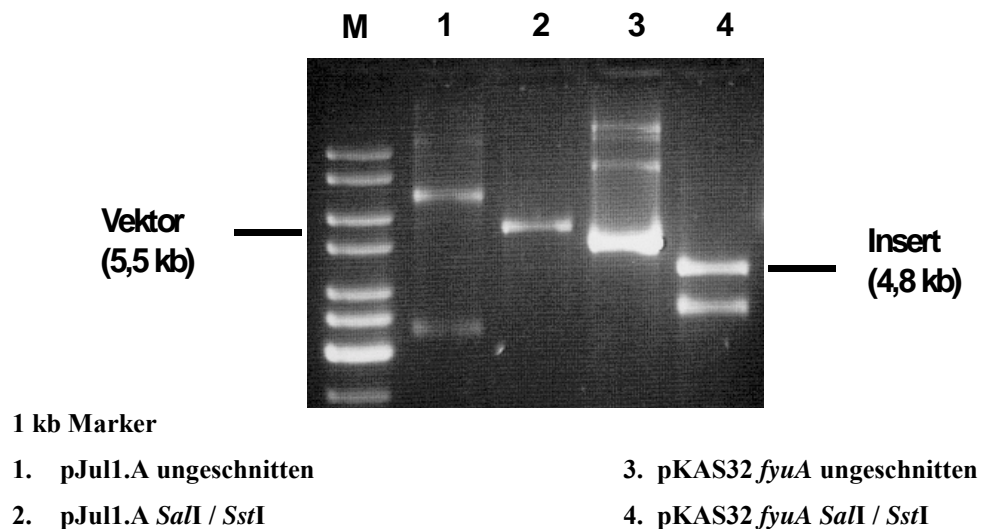


**Abbildung 6:** Nach Konjugation der Mutanten Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* mit dem *E. coli* Stamm S17-1  $\lambda$ pir <pJul1.A *fyuA*> kommt es zu einer Einfach-Rekombination homologer DNA-Bereiche (A). Daraus ergeben sich zwei mögliche Integrationsschemata (B). Durch anschließende Zugabe von Sucrose wird auf Verlust des *sacB*-Gens selektiert. Hierbei kann es durch eine 2. Rekombination entweder zu einem Verlust des Vektors oder zu einem Verlust des mutierten *fyuA*-Gens mit Resten des Vektors kommen (gestrichelte Linie). In letzterem Fall verbleibt das intakte *fyuA*-Gen des Vektors im Genom des Mutaflor<sup>®</sup>-Stammes (C).

Nach Konjugation der Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA*-Mutanten mit einem pJul1.A *fyuA* tragenden Stamm kommt es zu einer Einfach-Rekombination homologer DNA-Bereiche (Abb. 6 A). Bei der Integration des Vektors in die chromosomale DNA der Mutanten ergeben sich zwei Möglichkeiten der Rekombination, die in Abbildung 6 B dargestellt werden. Durch Zugabe von Sucrose wird anschließend auf Verlust des *sacB*-Gens selektiert. Hierbei kann durch eine

2. Rekombination entweder der gesamte Vektor oder das mutierte *fyuA*-Gen mit Resten des Vektors aus dem Genom deletiert werden (Abb. 6 B). In letzterem Fall bleibt das intakte *fyuA*-Gen, das aus dem Plasmid pJul1.A *fyuA* stammt, im Genom des Mutaflor<sup>®</sup>-Stammes integriert (Abb. 6 C). Für die Erstellung der Rekomentanten Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* wurde auf diesem Weg das mutierte chromosomale *fyuA*-Gen mit dem intakten *fyuA*-Gen des Vektors ausgetauscht.

#### 4.1.1.1 Klonierung des Vektors pJul1.A *fyuA* und Transformation des Ligationsansatzes in den *E. coli* Stamm S17-1 $\lambda$ pir

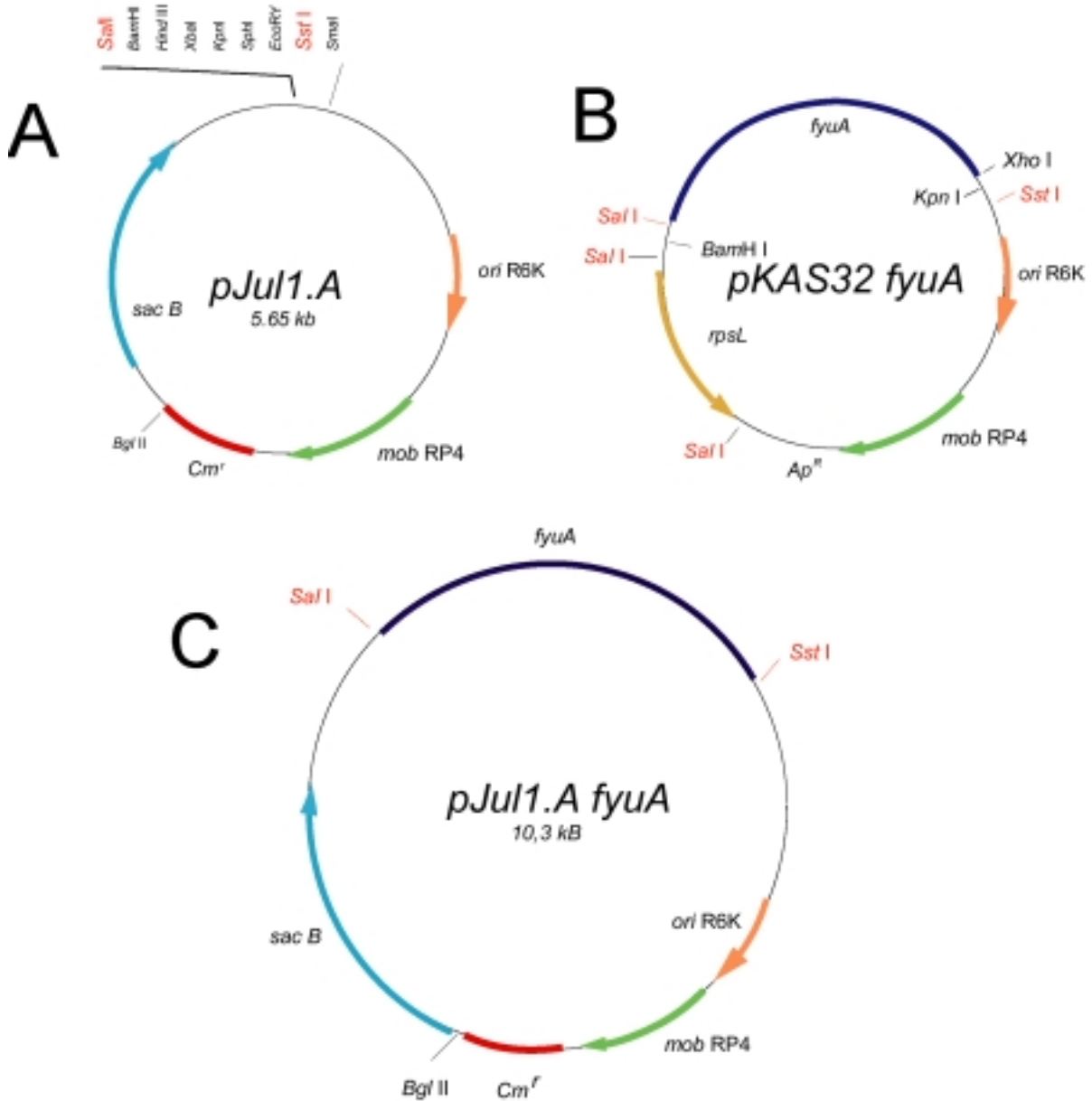


**Abbildung 7:** Nach Doppelrestriktion der Vektoren pJul1.A und pKAS32 *fyuA* mit den Enzymen *SalI* / *SstI* wurden die Produkte neben der ungeschnittenen Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen und das *fyuA*-tragende Insert (4,8 kb) sowie der geschnittene Vektor pJul1.A (5,5 kb) extrahiert.

Für die Herstellung der Rekomentanten wurde der Suizid-Vektor pJul1.A eingesetzt, der durch den Negativ-Selektionsmarker *sacB* charakterisiert wird (s. 3.2.1). In den Vektor wurde zunächst ein intaktes *fyuA*-Gen integriert, dessen Quelle der in früheren Arbeiten erstellte Vektor pKAS32 *fyuA* war. Zunächst wurde eine Plasmid-DNA-Gewinnung der Vektoren pJul1.A und pKAS32 *fyuA* mithilfe des QIAprepSpin<sup>®</sup> Miniprep Kit Protocols (Qiagen, Hilden) durchgeführt (s. 3.2.3). Die Plasmid tragenden Stämme wurden hierfür anfänglich in entsprechenden antibiotikahaltigen Nährmedien angereichert, die Isolierung der Plasmid-DNA durchgeführt und anschließend eine Konzentrationsbestimmung der gelösten DNA mithilfe der Gelelektrophorese vorgenommen. Die Restriktionsschnitte der Plasmide pKAS32 *fyuA* und pJul1.A erfolgten mit den Enzymen *SstI* und *SalI* (Invitrogen) (Abb. 8). Für den Verdau wurden 4,5 µg DNA, 5 µl des vom Hersteller empfohlenen Puffers 2 (Invitrogen) und 40 U beider Enzymen eingesetzt und nach dreistündiger Inkubation und Hitzeinaktivierung



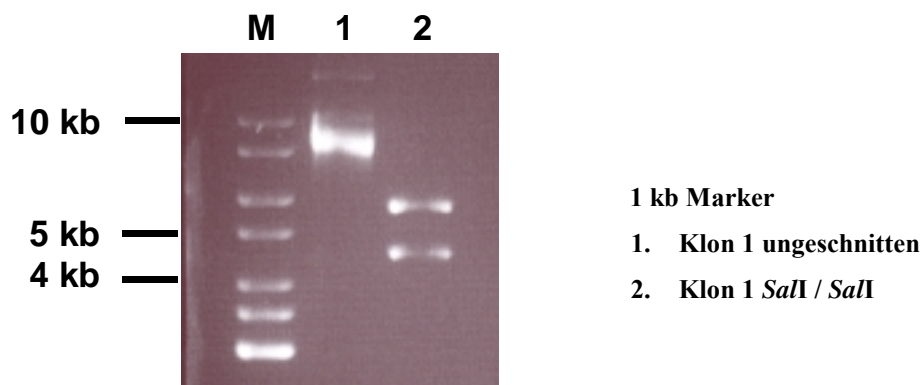
die DNA-Fragmente durch Gelelektrophorese getrennt (s. 3.2.5). Hierbei wurde der gesamte Ansatz des Verdaus neben einem Aliquot des jeweiligen ungeschnittenen Vektors aufgetragen und später mithilfe des GelSpin DNA Purification Kits (Mo Bio Laboratories, Hamburg) der *SstI* und *SalI* geschnittene Vektor pJul1.A (Produkt 5,5 kb) und das 4,8 kb große, *fyuA*-tragende DNA-Fragment aus pKAS32 *fyuA* extrahiert (s. 3.2.6) (Abb. 7).



**Abbildung 8:** Die Vektoren pJul1.A (A) und pKAS32 *fyuA* (B) wurden mit den Restriktionsenzymen *SalI* und *SstI* geschnitten. Das *SalI* / *SstI* *fyuA*-Fragment des pKAS32 *fyuA* wurde anschließend mit dem geschnittenen Vektor pJul1.A ligiert (C).

Der mit den Restriktionsenzymen *SstI* und *SalI* geschnittene Vektor pJul1.A und das *fyuA*-Gen tragende Insert wurden nach Konzentrationsbestimmung der gelösten DNA durch

Gelelektrophorese in einem 1:3 molarem Verhältnis ligiert (3.2.7). Der Ansatz wurde anschließend direkt für die Transformation in dem Gene Pulser®II Electroporation System (BIO-RAD, München) eingesetzt. Als Empfängerstamm wurden elektrokompente Zellen des *E. coli* Stammes S17-1  $\lambda$ pir gewählt, da dieser als Donorstamm (*tra*-Gen) in Konjugationen eingesetzt werden kann und durch Produktion des  $\pi$ -Proteins eine eigenständige Vermehrung  $\pi$ -abhängiger Vektoren im Zytosol ermöglicht. Für die Elektroporation wurden 50  $\mu$ l der elektrokompenten Zellen mit 5  $\mu$ l des Ligationsansatzes unter 5 min Kühlung auf Eis vermischt und anschließend transformiert (s. 3.2.7). Nach einer 1-stündigen Inkubation bei 37°C in sterilem SOC-Medium, wurden je 100  $\mu$ l der Ansätze auf Chloramphenicol-Platten ausplattiert und bei 37°C bebrütet. Chloramphenicol-resistente Klone wurden anschließend in 50 ml Cm-haltigem LB-Medium angereichert, eine Plasmid-DNA-Isolierung (QIAprep®Spin Miniprep Kit Protokoll, Qiagen, Hilden) (s. 3.2.3) durchgeführt und der Verdau mit den Restriktionsenzymen *Sst*I und *Sal*I wiederholt. Die Plasmide konnten somit auf Existenz von ursprünglichem Vektor und Insert überprüft werden. Der geschnittene Ansatz wurde zusammen mit der ungeschnittenen Kontrolle auf ein 1 %iges Agarosegel (s.o.) aufgetragen und die Größen der Banden mithilfe des 1 kb-Markers zugeordnet. Die Überprüfung des Vektors pJul1.A *fyuA* über den Verdau ergab folgendes Ergebnis (Abb. 9): Klon 1 zeigte geschnitten sowohl das Insert *fyuA* (4,8 kb) als auch den Ligationsvektor pJul1.A (5,5 kb) und konnte somit für die weitere Arbeit eingesetzt werden.



**Abbildung 9:** Der Ligationsansatz des Vektors pJul1.A und des *fyuA*-Inserts wurde nach Elektroporation in den Stamm S17-1  $\lambda$ pir und anschließendem Plasmidpräp mit den Endonukleasen *Sal*I und *Sst*I geschnitten und das Produkt neben der ungeschnittenen Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen.

#### 4.1.1.2 Konjugation der Mutaflor® *fyuA*-Mutante mit S17-1 $\lambda$ pir <pJul1.A *fyuA*>

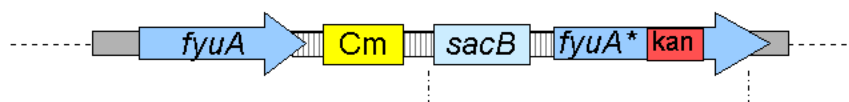
Um das Plasmid pJul1.A *fyuA* in die *fyuA*-Mutante des *E. coli* Stammes Mutaflor® zu übertragen, erfolgte eine Konjugation der Mutanten mit dem Stamm S17-1  $\lambda$ pir <pJul1.A

*fyuA*>. Der pJul1.A-Vektor verfügt über das *mobRP4*-Gen und konnte so aus dem Donor-Stamm S17-1  $\lambda$ *pir* <pJul1.A *fyuA*> auf den Rezipienten Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* übertragen werden. Die Konjugation wurde wie unter 3.2.8 beschrieben durchgeführt und die Konjuganden auf Chloramphenicol- und Kanamycin-haltigen Platten selektiert. Bei einem Stamm mit beiden Resistenzen handelte es sich um einen Kanamycin-resistenten Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* Stamm, der die Chloramphenicol-Resistenz von dem pJul1.A *fyuA*-Plasmid vermittelt bekommen hat.

#### 4.1.1.3 Sucrose-Selektion Kanamycin-empfindlicher Klone

Die Integration des Plasmides pJul1.A *fyuA* in den Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* Stamm wurde bereits in Kapitel 4.1.1 beschrieben. Nach Konjugation der *fyuA*-Mutanten mit dem Stamm S17-1  $\lambda$ *pir* <pJul1.A *fyuA*> wurde auf die einfach-rekombinierte 'Rekomplementante' (da Kanamycin- und Chloramphenicol-resistent!) ein Selektionsdruck durch Zugabe von Sucrose ausgeübt (3.2.2). Eine anschließende Resistenzprüfung ergab Kanamycin-sensible, Chloramphenicol-resistente Stämme. Durch die 2. Rekombination wurde offenbar der Verlust des mutierten *fyuA*-Gens (*fyuA*::*kan*) und Teilen des pJul1.A *fyuA*-Vektors erbracht. Dabei verblieb das intakte *fyuA*-Gen und unerwarteterweise (s. Abb. 6) das Chloramphenicol-Resistenzgen des Vektors pJul1.A im Mutaflor<sup>®</sup>-Genom (Abb. 10). Um die Feinstruktur der Rekomplementanten Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* rec zu überprüfen, wurde im folgenden ein *fyuA*-Nachweis mittels PCR durchgeführt.

##### A) Integration nach Einfach-Rekombination:



##### B) Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* rec nach Sucroseselektion:

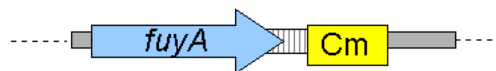


Abbildung 10: Darstellung der Integration des pJul1.A *fyuA*-Vektors in das Mutaflor<sup>®</sup>-Genom nach Einfach-Rekombination durch Konjugation (A). Durch eine zweite Rekombination nach Sucroseseexposition erfolgte ein Verlust des *fyuA*::*kan*-Fragmentes sowie von Resten des pJul1.A-Vektors mit dem *sacB*-Gen (gestrichelte Linie). Das intakte *fyuA*-Gen und das Chloramphenicol-Resistenzgen verblieben im Mutaflor<sup>®</sup>-Genom (B).

#### 4.1.1.4 Durchführung eines *fyuA*-Nachweises mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

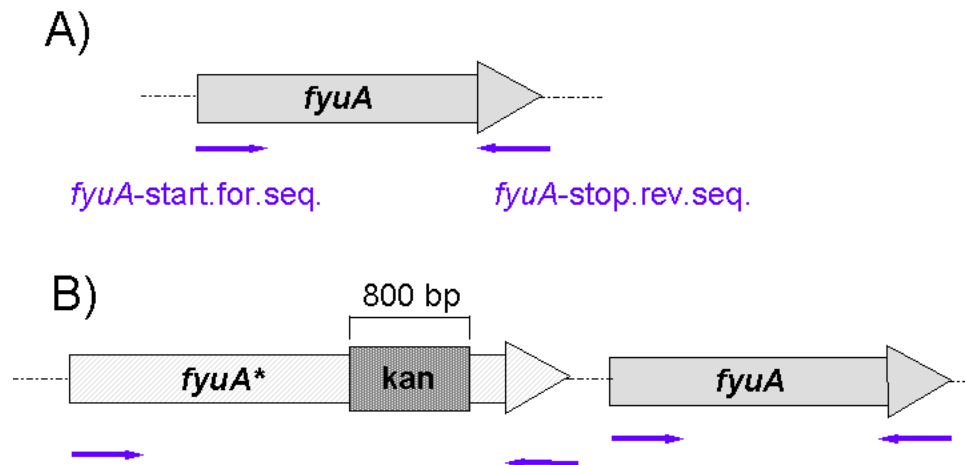
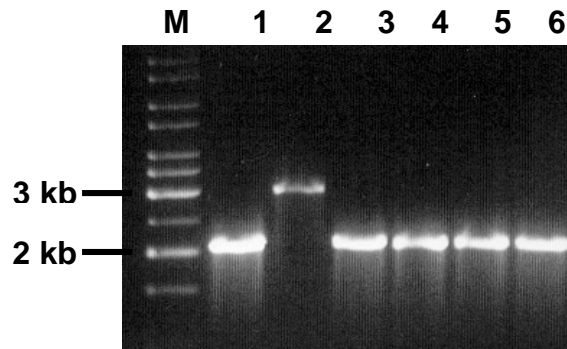


Abbildung 11: Anlagerung der Primer *fyuA*-start. for. seq und *fyuA*-stop. rev. seq. an das *fyuA*-Gen. Die Pfeile zeigen die Lage der Primer an. A) PCR amplifiziert das 2 kb-große *fyuA*-Fragment bei Mutaflor<sup>®</sup> und bei gelungener Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* Rekomplementante. B) Bei Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* wird das 2,8 kb große *fyuA::kan*-Fragment amplifiziert. Nach Einfach-Rekombination mit dem intakten *fyuA*-Gen des pJul1.A *fyuA* werden beide Fragmente nachgewiesen.

Um die Rekomplementante strukturell auf Existenz eines intakten *fyuA*-Gens zu überprüfen, wurde eine PCR-Reaktion mit den Primern *fyuA*-start.for.seq.und *fyuA*-stop.rev.seq. (s. Tab. 2) durchgeführt. Es handelt sich um Primer, die an Sequenzen des *fyuA* hybridisieren, welche Anfang und Ende des Gens darstellen (Abb. 11) Somit kann je nach Größe der amplifizierten DNA auf Existenz oder Fehlen einer Kanamycinkassette geschlossen werden. Als Matrizen-DNA wurde die Positivkontrolle *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup>, die Negativkontrolle *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* und 4 Klone der Rekomplementanten nach der Sucroseselektion eingesetzt. Die PCR wurde gemäß des aufgeführten Protokolls in Kapitel 3.2.9. durchgeführt und die *fyuA*-PCR Produkte anschließend elektrophoretisch in einem 1 %igem Agarosegel analysiert (Abb. 12). Bei dem Positivkontrollstamm *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup>, sowie bei allen 4 Klonen der Rekomplementanten wurde eine 2 kb-Bande amplifiziert. Im Gegensatz hierzu zeigte die PCR-Reaktion bei der *fyuA::kan* Mutanten ein ca. 3 kb-großes Amplifikat, dessen Größe durch die zusätzliche Kanamycin-Resistenzkassette bedingt ist.



1 kb Marker

1. Mutaflor®

2. Mutaflor® *fyuA*

3.-4. Klon 1-4

**Abbildung 12:** Einsatz von 4 Klonen der Rekomentanten nach Sucroseselektion, sowie den Kontrollstämmen Mutaflor® und Mutaflor® *fyuA* in die PCR mit den Primern *fyuA*-stop.rev.seq. und *fyuA*-start.for.seq.

#### 4.1.2 *in vivo* Darmkolonisierung im Mausmodell

Das Darmkolonisierungsmodell *in vivo* diente der Untersuchung des Kolonisierungsverhaltens des darmkommensalen *E. coli* Stamm Nissle 1917 (Mutaflor®) im Vergleich zu der isogenen *fyuA*- und *irp1*-Mutanten. Folgende Bakterienstämme wurden in dem Darmkolonisierungsmodell eingesetzt und zuvor, wie in Kapitel 3.3.1-3.3.2 beschrieben, für den Tierversuch vorbereitet: *E. coli* Mutaflor®, Mutaflor® *irp1*, Mutaflor® *fyuA* und Mutaflor® *fyuA* rec. Nach Resistenzüberprüfung und Selektion überlebensfähiger Bakterien durch die Peritoneallavage in der Maus, wurden die Stämme in antibiotikahaltigen LB-Medium angereichert und anschließend bis Einsatz in den Mausversuch bei -80°C eingefroren.

#### 4.1.3 Strukturelle Überprüfung der *E. coli* Mutaflor®-Stämme

Um die im Versuch eingesetzten Mutaflor®-Stämme von der übrigen Darmflora unterscheiden und isolieren zu können, wurden nach vorheriger Kontrolle der Darmflora die stammtypischen Antibiotikaresistenzen als Selektionsmarker genutzt (Mutaflor® Strep<sup>r</sup>, Rif<sup>r</sup>; Mutaflor® *fyuA* und *irp1* Kan<sup>r</sup>, Mutaflor® *fyuA* rec Cm<sup>r</sup>). Um spontane Resistenzbildungen in der normalen Darmflora auszuschließen und sicherzustellen, dass es sich bei den jeweiligen resistenten Isolaten um *E. coli* Mutaflor®-Abkömmlinge handelt, wurden aus dem Darm gewonnene Bakterien weiter untersucht. So wurden die Isolate durch eine Mutaflor®-

spezifische PCR (Blum-Oehler *et al.*, 2003) mit den Primern Muta 7 und 8 als *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> identifiziert. Die PCR weist das stammeigene Plasmid pMUT2 nach, das stabil vorliegt und somit für den Nachweis des *E. coli* Stammes Mutaflor<sup>®</sup> gut geeignet ist. Als Matrizen-DNA wurde der jeweils oral applizierte *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> Stamm als Positivkontrolle (Mutaflor<sup>®</sup>, Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA*, Mutaflor<sup>®</sup> *irp1*, Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* rec), die Negativkontrolle *E. coli* DH5 $\alpha$  und je 10 aus dem Darm isolierte resistente Keime eingesetzt. Die PCR wurde wie in Kapitel 3.2.9 beschrieben durchgeführt und die PCR-Produkte anschließend elektrophoretisch in einem 1 %igem Agarosegel analysiert.

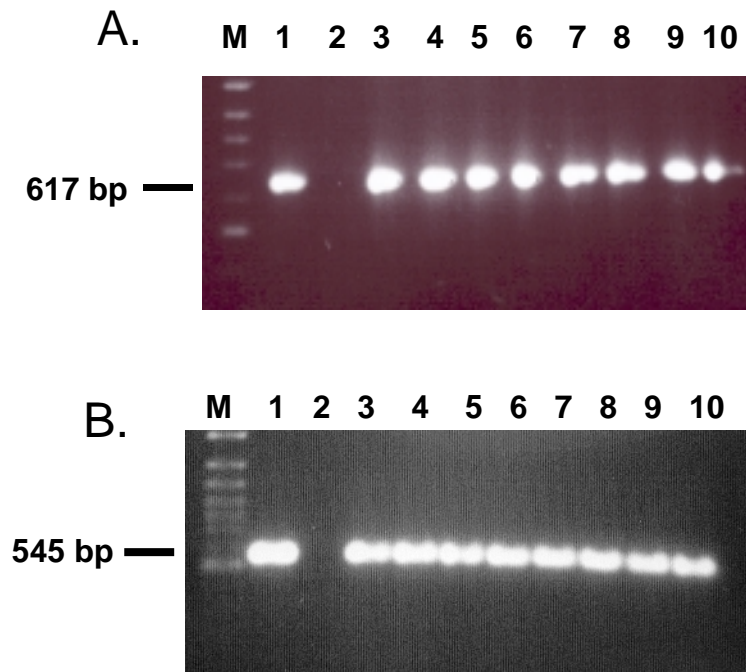
**Ergebnis:** Bei allen aus dem Darm isolierten Keimen konnte, wie bei der jeweiligen Positivkontrolle, das Mutaflor<sup>®</sup> Plasmid pMUT2 nachgewiesen werden. Die Negativkontrolle *E. coli* DH5 $\alpha$  zeigte dagegen keinen Plasmid-Nachweis. Es ist also davon auszugehen, dass es sich bei den aus dem Darm isolierten Keimen um den jeweiligen Mutaflor<sup>®</sup>-Stamm (Mutaflor<sup>®</sup>, Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA*, *irp1* und Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* rec) handelte, und dass Spontanresistenzen der Darmflora ausgeschlossen werden konnten. Die Selektion des jeweiligen Mutaflor<sup>®</sup>-Stammes von der übrigen Darmflora konnte demnach im Tierversuch über sein Resistenzverhalten erfolgen.

#### 4.1.4 Untersuchung auf HPI-positive *E. coli* der natürlichen Darmflora

Kot von 5 Mäusen wurde in einer für die Suspension nötigen Menge Aqua dest. aufgenommen und je 100  $\mu$ l auf McConkey-Platten, die der Selektion gramnegativer Keime dienen, ausplattiert. Nach ÜN-Bebrütung bei 37°C wurde eine Keimdiffenzierung von 10 gramnegativen, lactosepositiven Kolonien vorgenommen. Hierfür wurde die biochemische Eigenschaft von *E. coli*, weder Citrat noch Harnstoff zu spalten, genutzt und ein Citrat- bzw. Harnstoffröhrchentest durchgeführt. Die Röhrchen wurden beimpft und nach 24 h (37°C) das Ergebnis beurteilt: Bakterienisolate, die keine chemische Reaktion in Citrat- und Harnstoffröhrchen zeigten (s. 3.3.3.1), wurden als *E. coli* betrachtet und weiteren PCR-Untersuchungen zugeführt. Mithilfe der PCR wurden sie auf Besitz des *irp1*- und *fyuA*-Gens untersucht. Hierfür wurden 2 getrennte Screening-PCRs mit den Primerpaaren *fyuA*162-HPI 29688. for, *fyuA*1319-HPI 30233. rev und *irp1*. 8676. for, *irp1*. 9293. rev (Tab. 2) durchgeführt (3.2.9). Als Matrizen-DNA wurden die Positivkontrolle *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup>, die Negativkontrolle *E. coli* DH5 $\alpha$  und gekochte Zellen von 8 identifizierten *E. coli* eingesetzt. Die *fyuA*-PCR-Produkte wurden anschließend elektrophoretisch in einem 1,2 %igem, die *irp1*-PCR-Produkte in einem 1,6 %igem Agarosegel analysiert.

Das Ergebnis beider Screening-PCRs zeigte in allen 8 *E. coli*-Isolaten der Normalflora unbehandelter Mäuse den Nachweis des *fyuA*- und des *irp1*-Gens (Abb. 13). Somit sind

wichtige HPI-Gene offenbar auch in der natürlichen Darmflora nachweisbar. Hiermit ist lediglich ein struktureller Nachweis einzelner Gene, nicht aber der gesamten HPI gegeben. Auch ist und keine Aussage über die Aktivität der HPI möglich.



100 bp Marker

1. Mutaflor®

2. DH5α

3.–10. *E. coli* Isolat 1-8

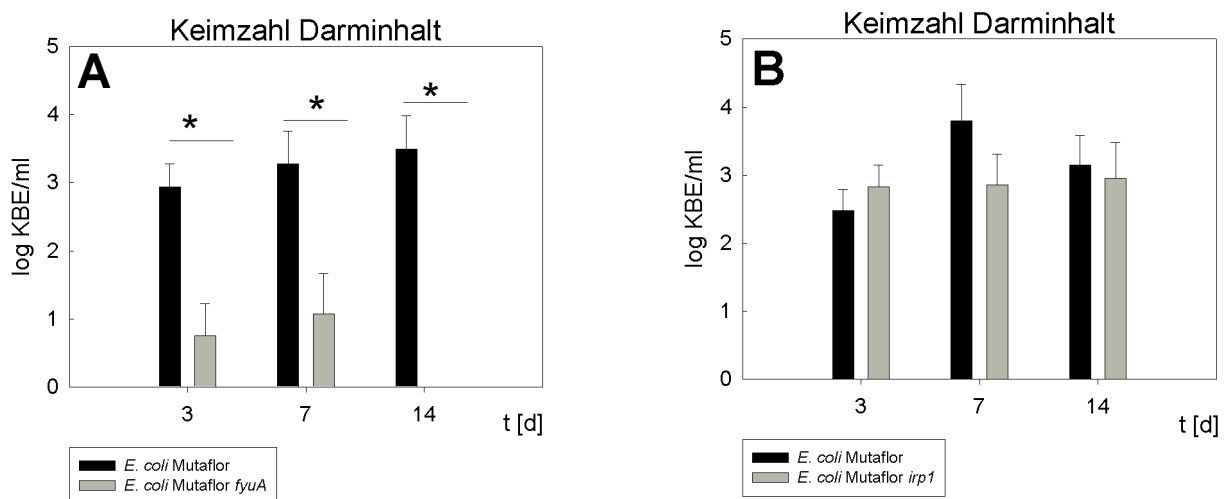
**Abbildung 13:** Nachweis des *irpI*- (A) und *fyuA*-Gens (B) in 8 *E. coli* Isolaten der natürlichen Darmflora mittels PCR. Als Kontrollstämme dienten *E. coli* Mutaflor® und *E. coli* DH5α.

#### 4.1.5 Vorversuch, Kokolonisierungsmodell

Durch Koapplikation des Stammes *E. coli* Stamm Nissle (Mutaflor®) und der entsprechenden isogenen Mutanten konnte ein direkter Vergleich der Keimzahl der jeweiligen Stämme in ein und demselben Organismus, sowie ein evtl. unterschiedliches Kolonisierungsverhalten der *irpI*- und *fyuA*-Mutanten untersucht werden. Die Mutante Mutaflor® *irpI* kann im Gegensatz zu der *fyuA*-Mutanten kein Yersiniabaktin produzieren, sie ist jedoch in der Lage, Yersiniabaktin anderer Bakterien über den FyuA-Rezeptor aufzunehmen. Die Mutaflor® *fyuA* Mutante hingegen exprimiert über die *irp*-Gene Yersiniabaktin, eine Aufnahme von Yersiniabaktin-Siderophoren ist allerdings aufgrund des fehlenden FyuA-Rezeptors nicht möglich.

In dem Kokolonisierungsversuch wurde den Mäusen ein Keimgemisch (1:1) von Mutaflor<sup>®</sup>/Mutaflor<sup>®</sup> *irp1* bzw. Mutaflor<sup>®</sup>/Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* oral appliziert, wobei die Applikation wie in Kapitel 3.3.3.2 beschrieben durchgeführt wurde.

In jedem Versuch wurden 15 C57Bl/6 Mäusen in einer Gruppengröße von je 5 Mäusen die Mutaflor<sup>®</sup>-Isolate oral appliziert. Bei der Keimzahlbestimmung der oral applizierten Menge sowie der Bestimmung der Keimzahl im Darm, wurde das Keimgemisch auf Rifampicin- bzw. Rifampicin-/Kanamycin-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert. Mutaflor<sup>®</sup> zeigt Rifampicin-Resistenz, die jeweilige *irp1*- und *fyuA*-Mutante eine zusätzliche Resistenz gegenüber Kanamycin. Die Keimzahl der Rifampicin-resistenten Bakterien stellte somit die Summe aus Mutaflor<sup>®</sup> und jeweiliger Mutante dar, die Rifampicin-/Kanamycin-resistenten Isolate waren die jeweilige Mutante. Demnach musste zur Ermittlung des Mutaflor<sup>®</sup>-Stammes die Anzahl der Rifampicin-/Kanamycin-resistenten Isolate von der Gesamtzahl der Rifampicin-resistenten Bakterien subtrahiert werden.



**Abbildung 14: Rückisolierung von *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup>, *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* (A), *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup>, *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> *irp1* (B) nach oraler Koapplikation (10<sup>7</sup> KBE) von C57/Bl6 Mäusen (n=10/d) und anschließender Darmlavage am Tag 3, 7, 14. Dargestellt sind die berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen der Keimzahl pro ml Gesamtdarminhalt am jeweiligen Versuchstag. \*P<0.05.**

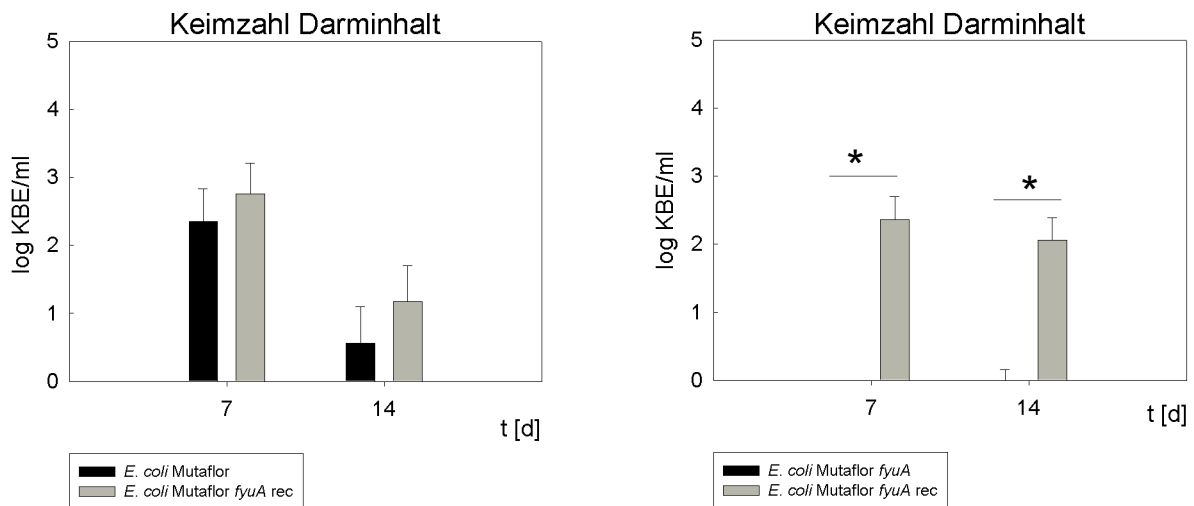
Am Tag 3, 7 und 14 wurde die Bestimmung der Keimzahl pro ml Darminhalt mittels Darmlavage durchgeführt (s. 3.3.3.2). Der Darminhalt wurde auf die oben genannten Antibiotikaplatten ausplattiert, bei 37°C ÜN inkubiert, und am folgenden Tag die Keimzahl (KBE) des Mutaflor<sup>®</sup>-Stammes und der koapplizierten Mutante pro ml Darminhalt bestimmt. Die Kokolonisierungsversuche Mutaflor<sup>®</sup>/Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* sowie Mutaflor<sup>®</sup>/Mutaflor<sup>®</sup> *irp1* wurden insgesamt 3 x nach dem oben beschriebenen Protokoll durchgeführt (Abb. 14).



**Ergebnis des Vorversuches, Kokolonisierungsversuches:** Die Abb. 14 A zeigt einen signifikanten Unterschied im Kolonisierungsverhalten zwischen Mutaflor<sup>®</sup> und der isogenen Mutante *fyuA*. Während sich die Keimzahl des Stammes Mutaflor<sup>®</sup> über den Beobachtungszeitraum nahezu konstant bis leicht zunehmend ( $10^3$ - $10^4$  KBE/ml) verhielt, erreichte die Mutante *fyuA* innerhalb der ersten beiden Beobachtungszeiträume den Höchstwert von  $10^1$  Keime/ml und lag am Tag 14 der Versuchsreihe unterhalb der Nachweisgrenze. Im Gegensatz zu der *fyuA*-Mutanten wies die *irp1*-Mutante eine nahezu gleiche Persistenz im Darm wie der *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup>-Stamm auf ( $10^2$ - $10^4$  KBE/ml) (Abb. 14 B). Die Kokolonisierungsversuche zeigten, dass Mutaflor<sup>®</sup> eine deutlich bessere Kolonisierungsbereitschaft insbesondere gegenüber der *fyuA*-Mutanten bewies.

#### 4.1.5.1 Kokolonisierungsversuche mit Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* rec

Nachdem ein Kolonisierungsunterschied zwischen dem Ausgangsstamm *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> und der *fyuA*-Mutanten festgestellt werden konnte, sollte die Mutante genauer untersucht werden. Um die Frage zu beantworten, ob die beobachteten Kolonisierungsunterschiede Folge des mutierten *fyuA*-Gens waren, wurde mit einer rekomplementierten *fyuA*-Mutante (Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* rec) der Kokolonisierungsversuch wiederholt. Es wurde das Kolonisierungsverhalten der Rekomentanten im Vergleich zu der Mutanten *fyuA* und *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> untersucht und folgende Koapplikationen durchgeführt: 1. Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* rec/Mutaflor<sup>®</sup>, 2. Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* rec/Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA*. Hierfür wurde der Darminhalt von je 6 Mäusen an den Tagen 7 und 14 untersucht (Abb. 15). Die Versuchsauswertung erfolgte bei dem Versuch Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* rec/Mutaflor<sup>®</sup> auf den Antibiotikaplatten Streptomycin/Chloramphenicol und Streptomycin. Auf den Streptomycin/Chloramphenicol-Platten wächst nur die Rekomentante, auf den Streptomycin-Platten wachsen beide Keime, so dass die Keimzahl der unterschiedlichen Platten entsprechend voneinander substrahiert werden musste, um die Keimzahl des *E. coli* Stammes Mutaflor<sup>®</sup> bestimmen zu können. Bei dem Kokolonisierungsversuch *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* rec/Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* konnten beide Stämme getrennt voneinander auf Chloramphenicol- und Kanamycin-Platten selektioniert werden.



**Abbildung 15:** Rückisolierung von *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup>, *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* rec (A), *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* rec, *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* (B) nach oraler Koapplikation ( $10^7$  KBE) von C57/Bl6 Mäusen (n=6/d) und anschließender Darmlavage am Tag 7, 14. Dargestellt sind die berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen der Keimzahl pro ml Gesamtdarm am jeweiligen Versuchstag. \*P<0.05.

**Ergebnisse der Kokolonisierungsversuche mit Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* rec (Abb. 15):** Die Kokolonisierungsversuche des *E. coli* Stammes Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* rec mit 1. *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> und 2. *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* dienten der Überprüfung beobachteter Kolonisierungsunterschiede zwischen *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> und der Mutanten *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* *in vivo*. Wie in Abb. 15 A dargestellt, zeigten *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> und *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* rec nahezu identisches Kolonisierungsverhalten. Dagegen ist ein signifikanter Unterschied zwischen der Rekombinantanten und der Mutanten *fyuA*, die am Tag 7 und 14 praktisch nicht mehr nachgewiesen werden konnte, festzustellen (Abb. 15 B). Das Kolonisierungsverhalten der Rekombinantanten zeigt eine gelungene Rekomblementierung der *fyuA*-Mutanten und schließt gleichzeitig andere unerwünschte Genomveränderungen bei der Mutantenherstellung aus, die zur mangelnden Kolonisierungsfähigkeit der Mutanten *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* beigetragen haben könnten.

**Fazit beider Vorversuche:** Der Darmkommensale *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> weist im Vergleich zu den HPI-Mutanten Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* eine erhöhte Kolonisierungsbereitschaft auf. Die Tatsache der stark reduzierten Kolonisierungsfähigkeit der Mutante *fyuA* und der ausgeprägteren Kolonisierung der *irp1*-Mutanten, lässt auf eine essentielle Rolle des intakten *fyuA*-Gens bzw. des FyuA-Reporterproteins für die Etablierung des *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup>-Stammes im Darm schließen. Zudem bestätigen die Experimente indirekt eine *in vivo*-Expression der HPI-Gene. Aufgrund des nahezu identischen Kolonisierungsverhaltens der Rekombinantanten *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* rec und des Ausgangsstammes *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup>, konnten unerwünschte

Veränderungen des Genoms der *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA*-Mutanten bei der Mutantenherstellung ausgeschlossen werde. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Mutation des *fyuA*-Gens für die beobachteten Kolonisierungsunterschiede ausschlaggebend war.

#### 4.1.6 Hauptversuch, Einzelkolonisierungsversuch

Die Vorversuche zeigten Unterschiede im Kolonisierungsverhalten des *E. coli* Stammes Mutaflor<sup>®</sup> und der *fyuA*-Mutanten. Zusätzlich konnte durch Einsatz der Rekomentanten gezeigt werden, dass das *fyuA*-Gen für den beobachteten Effekt tatsächlich ausschlaggebend war. Um eine genaue Lokalisation der Stämme im Darm feststellen zu können, wurde im Hauptversuch nicht der gesamte Darminhalt betrachtet, sondern eine differenzierte Untersuchung von Darminhalt, Darmwand und adhären Zellen in Dünn- und Dickdarm vorgenommen. Eine direkte Beeinflussung der Stämme untereinander sollte vermieden werden, so dass im Hauptversuch orale Einzelapplikationen mit den *E. coli* Stämmen Mutaflor<sup>®</sup>, Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA*, Mutaflor<sup>®</sup> *irp1* und Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* rec durchgeführt wurden.

Die Gruppengröße wurde aufgrund der bei Tier zu Tier auftretenden individuellen Schwankungen bei der oralen Aufnahme der Bakteriensuspension auf 8 Mäuse pro Versuchstag erhöht. So wurden 24 C57Bl/6 Mäuse je Bakterienstamm eingesetzt und die Tiere an den Tagen 2, 8 und 15 untersucht. Durch Applikation von 50 µl Bakteriensuspension ( $10^7$  KBE) an drei aufeinanderfolgenden Tagen, wurde die Aufnahme einer Keimzahl von  $10^7$  KBE gewährleistet und somit eine hohe und stabile Keimzahl pro Versuchsgruppe erreicht. Die Keimzahlbestimmung der oral applizierten Bakterien wurde, wie unter 4.1.5 beschrieben, durchgeführt, wobei sich die Gesamtmenge der Bakterien aus der Summe der applizierten Teilmengen ergab. Die Keime wurden aufgrund der Resistenzlage der Darmflora auf Streptomycin-Agarplatten (*E. coli* Mutaflor<sup>®</sup>), Streptomycin/Kanamycin-Platten (*E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA*, Mutaflor<sup>®</sup> *irp1*) und auf Chloramphenicol-Platten (*E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* rec) selektiert.

**Statistische Analyse:** Zur Prüfung, ob sich die arithmetischen Mittel der jeweiligen Gruppen signifikant unterscheiden, wurde der Student's *t* test durchgeführt, der die Mittelwerte der Keimzahl (KBE) unterschiedlicher Bakterienstämme pro g Gewebe oder Darminhalt miteinander verglich. Entsprechend der Verteilung der Versuchswerte nicht der Gauß'schen Normalverteilung wurde der verteilungsunabhängige Mann-Whitney *U* Test durchgeführt.

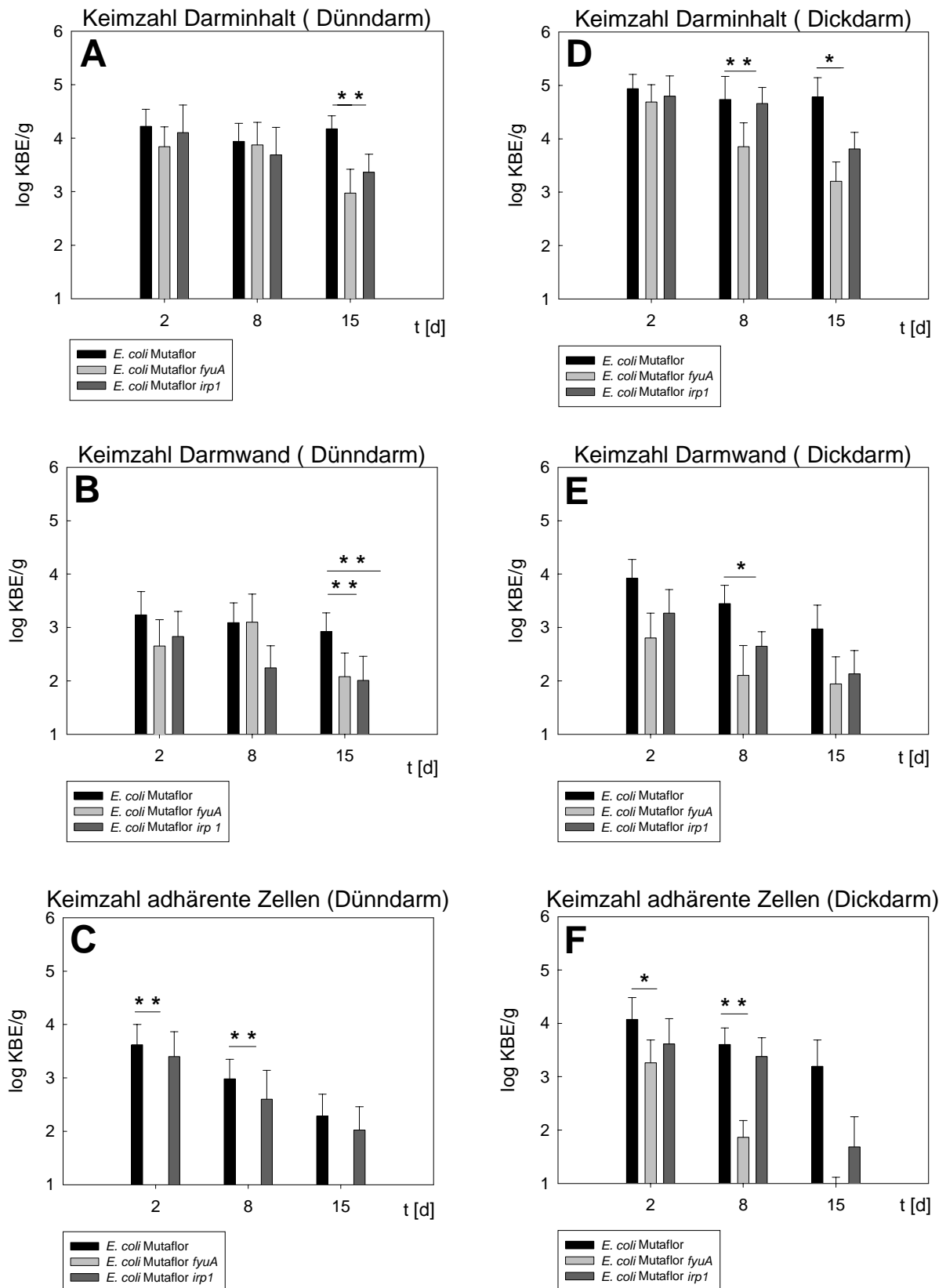


Abbildung 16: Darstellung der mittleren Keimzahlwerte sowie Standardabweichungen rückisolierter *E. coli* Mutaflor®, *E. coli* Mutaflor® *fyuA*, *E. coli* Mutaflor® *irp1* pro g Darminhalt, Darmwand und adhärente Zellen aus Dünndarm (A-C) und Dickdarm (D-F) am Tag 2, 8, 15 nach oraler Applikation ( $10^7$  KBE) bei C57/Bl6 Mäusen (n=8/Tag und Bakterienstamm). \*\*P<0,05. \*0,05<P<0,06.

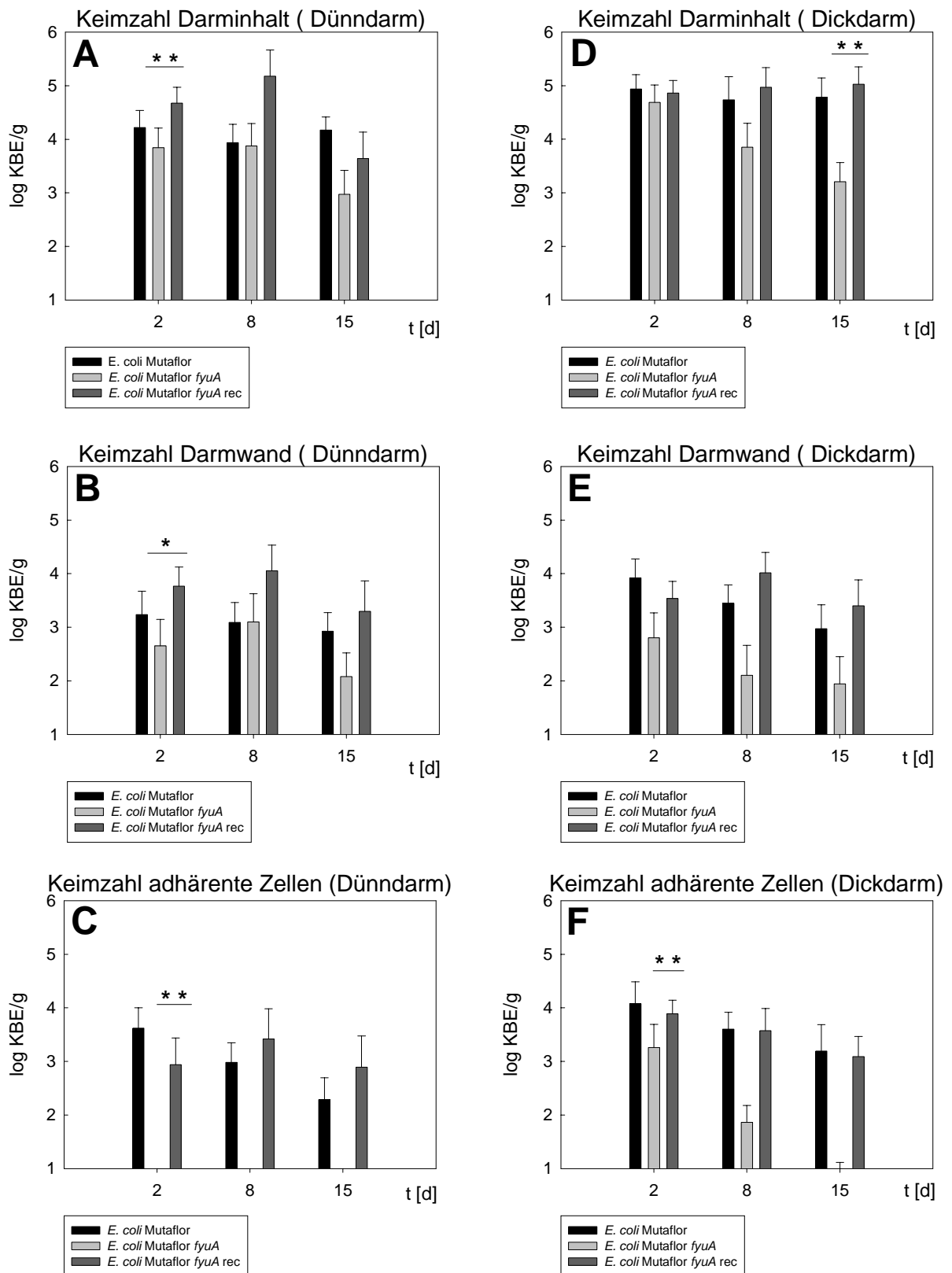


Abbildung 17: Darstellung der mittleren Keimzahlwerte sowie Standardabweichungen rückisolierter *E. coli* Mutaflor®, *E. coli* Mutaflor® *fyuA*, *E. coli* Mutaflor® *rec* pro g Darminhalt, Darmwand und adhärenente Zellen aus Dünndarm (A-C) und Dickdarm (D-F) am Tag 2, 8, 15 nach oraler Applikation ( $10^7$  KBE) bei C57/Bl6 Mäusen (n=8/Tag und Bakterienstamm). \*\*P<0,05. \*0,05<P<0,06.

**Ergebnisse des Hauptversuches:** Die Einzelkolonisierungsversuche mit den *E. coli*-Stämmen Mutaflor<sup>®</sup>, Mutaflor<sup>®</sup> *irp1* und Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* (Abb. 16) zeigten signifikante Unterschiede im Kolonisierungsverhalten und bestätigten die Ergebnisse der Vorversuche. Wie bereits in den Vorversuchen beobachtet, wurden besonders ausgeprägte Differenzen zwischen der Mutanten *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* und dem *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup>-Stamm nachgewiesen.

Während eine hohe und nahezu konstante Keimzahl des *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup>-Stammes in Darminhalt von Dünn- und Dickdarm sichtbar war ( $10^4$  KBE/g Dünndarminhalt;  $10^5$  KBE/g Dickdarminhalt), zeigte sich ein Keimzahlabfall beider *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup>-Mutanten während des Beobachtungszeitraumes. Signifikante Unterschiede konnten hier bei der *fyuA*-Mutanten am Tag 15 im Dünndarminhalt ( $10^3$  KBE/g Dünndarminhalt) und am Tag 8 und 15 im Dickdarminhalt ( $10^3$  -  $10^4$  KBE/g Dickdarminhalt) nachgewiesen werden. Die *irp1*-Mutante zeigte ebenfalls einen Keimzahlabfall am Tag 15 in Dünn- und Dickdarm, dieser wies im Gegensatz zu der *fyuA*-Mutanten jedoch keinen signifikanten Unterschied zum *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup>-Stamm auf. Die Keimzahlwerte der Darmwand von Dünn- und Dickdarm waren verglichen mit den hohen Werten der Bakterienzahl des Darminhaltes bei allen eingesetzten Stämmen wesentlich niedriger (1-2 Logstufen). Jedoch waren auch hier signifikante Unterschiede im Kolonisierungsverhalten zwischen *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> und den isogenen Mutanten nachweisbar. So zeigten sich am Tag 15 sowohl bei der *fyuA*- als auch bei der *irp1*-Mutanten signifikante Kolonisierungsunterschiede zum *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup>-Stamm in der Dünndarmwand, sowie in der Dickdarmwand am Tag 8 zwischen *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> und der *fyuA*-Mutanten. Die Keimzahlwerte der adhärennten Zellen von Dünn- und Dickdarm waren nicht direkt mit den Werten von Darminhalt und Darmwand vergleichbar, da sie durch unterschiedliche Isolierungsweise gewonnen wurden (s. 3.3.3.3). Sie waren jedoch innerhalb ihrer eigenen Versuchsreihe bewertbar. Besonders ausgeprägt war die signifikant stark herabgesetzte mukosale Adhärenz der *fyuA*-Mutanten in Dünn- und Dickdarm. Der Unterschied war hierbei im Dünndarm stärker ausgeprägt, wobei die Keimzahlwerte der *fyuA*-Mutanten hier unterhalb der Nachweisgrenze lagen (Abb. 16 C). Signifikante Kolonisierungsunterschiede zwischen *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> und der *fyuA*-Mutanten waren hier sowohl in Dünn- als auch im Dickdarm am Tag 2 und 8 zu verzeichnen. Am Tag 15 waren im Dickdarm keine Keime der *fyuA*-Mutanten mehr nachweisbar.

Die Ergebnisse deuten auf einen Einfluss des FyuA-Rezeptors auf die adhäsiven Eigenschaften des *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup>-Stammes hin. Die bessere Persistenz der *irp1*-Mutanten lässt sich durch eventuelle Yersiniabaktin-Fütterung anderer Darmkommensalen erklären, wobei jedoch die Kolonisierungsunterschiede zwischen der *irp1*-Mutanten und dem *E. coli*

Mutaflor<sup>®</sup>-Stamm im Hauptversuch deutlicher als bei den Kokolonisierungsversuchen (Abb. 14) waren.

Die Rekomentante *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* rec, in Abb. 17 vergleichend zu Keimzahlwerten von *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> und der *fyuA*-Mutanten dargestellt, war in ihrem Kolonisierungsverhalten dem Mutaflor<sup>®</sup>-Stamm gleichzusetzen. Sie zeigte, wie auch der *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup>-Stamm, gegenüber der *fyuA*-Mutanten eine ausgeprägte Kolonisierungsfähigkeit in Darminhalt, Darmwand und in der Fraktion der adhären Zellen in Dünn- und Dickdarm. So wurden signifikante Kolonisierungsunterschiede zwischen der Rekomentanten Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* rec und der *fyuA*-Mutanten im Dünndarminhalt am Tag 2, im Dickdarminhalt am Tag 15 und in der Dünndarmwand ebenfalls am Tag 2 des Beobachtungszeitraumes festgestellt. Der Keimzahlachweis bei adhären Zellen in Dünn- und Dickdarm ergab signifikante Unterschiede am Tag 2. Wie im Vorversuch bewies das Kolonisierungsverhalten der Rekomentante den Einfluss des *fyuA*-Gens auf die Kolonisierungsfähigkeit des *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup>-Stammes im Darm.

**Fazit des Hauptversuches:** Der Hauptversuch bestätigte die in den Vorversuchen erbrachten Ergebnisse. Die differenzierte Lokalisation der Stämme im Darm deutet auf einen Einfluss des *fyuA*-Gens bzw. des FyuA-Proteins auf die Darmadhärenz des *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup>-Stammes hin und zeigt erstmals die Bedeutung eines intakten HPI-Genclusters für die Kolonisierungsfähigkeit des Darms bei einem *E. coli*-Isolat.

## 4.2 Harnwegsinfektionsmodell mit UPEC Stamm U3366

In diesem Abschnitt der Arbeit sollte die Bedeutung der *Yersinia*-HPI für das Infektionsverhalten von uropathogenen *E. coli* (UPEC) untersucht werden. Hierzu wurde das Harnwegsinfektionsmodell an der Maus ausgewählt und das Infektionsverhalten des HPI-positiven UPEC-Stammes im Vergleich zu der isogenen *irp1*-Mutanten betrachtet. Zur Etablierung des Harnwegsinfektionsmodells mussten im Vorfeld entsprechende Vorversuche zur Bestimmung verschiedener Parameter, wie Art des UPEC-Stammes, Art des Mäusestammes, Applikationsart und -menge, Narkoseform und Versuchsdauer durchgeführt werden. Der ausgewählte UPEC-Stamm, der von der Routinediagnostik des Max von Pettenkofer-Institutes, München, zur Verfügung gestellt wurde, sowie die in dieser Arbeit erstellte isogene *irp1*-Mutante und *irp1*-Rekomplementante, wurden anfänglich in *in vitro* Versuchen getestet. Durch Kokultivierung der entsprechenden Bakterien im Urin, sollte die Produktion des HPI-vermittelten Siderophors Yersiniabaktin und damit die Expression der HPI-kodierten Gene *in vitro* untersucht werden. Nach Bestätigung der Yersiniabaktinproduktion *in vitro* wurde der Urin infizierter Mäuse betrachtet und so eine Siderophorexpression *in vivo* untersucht. Um die Auswirkung der HPI auf das Virulenzverhalten des HPI-positiven UPEC-Stammes zu untersuchen, wurde anschließend der uropathogene Stamm und die isogene *irp1*-Mutante im Tiermodell eingesetzt. Hierfür wurden die entsprechenden Stämme Mäusen in Einzelinfektionsversuchen transurethral appliziert und die Keimzahl in Niere und Harnblase zu den Zeitpunkten Tag 1, 3 und 7 nach Applikation bestimmt und miteinander verglichen. Neben der Bestimmung der Keimlast wurde die zelluläre Infektionsantwort des Wirtes anhand der Anzahl von Entzündungszellen (neutrophile Granulozyten) betrachtet. Um unvorhergesehene Mutationen im Genom des UPEC-Stammes bei der Mutantenherstellung auszuschließen, wurde eine Rekomplementante der *irp1*-Mutanten eingesetzt und die Versuche wiederholt.

### 4.2.1 Vorversuch zur Auswahl geeigneter UPEC-Teststämme

Der für den Versuch geeignete UPEC-Stamm sollte die "High-Pathogenicity Island"(HPI) tragen, wobei die Insel strukturell und funktionell intakt sein musste. Der Stamm sollte ferner Verursacher einer Monoinfektion des Harntraktes sein und über möglichst wenige Antibiotikaresistenzen verfügen, um eine Mutagenese zu vereinfachen. Die Routinediagnostik des Max von Pettenkofer-Institutes, München, stellte einen entsprechenden Stamm aus dem Nierenpunktat eines Pyelonephritispatienten zur Verfügung, der auf Blutagar  $\beta$ -Hämolyse



zeigte (U3366). Neben dem Pyelonephritisstamm U3366 wurde der Prototyp-Stamm UPEC 536 (Dobrindt *et al.*, 2002) und als Negativkontrolle der apathogene *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  in einem Vorversuch des Harnwegsinfektionsmodells getestet. Der Versuch wurde wie unter 3.3.4.6 beschrieben durchgeführt, wobei je Versuchtag und Gruppe 5 Mäuse am Tag 1 und 7 getötet wurden und anschließend die Keimzahl von Niere und Blase bestimmt wurde (Abb. 18). Als Mäusestamm wurde der C3H/HeN-Stamm eingesetzt (Hopkins *et al.*, 1998). Nach einer applizierten Menge von 10  $\mu$ l ( $10^7$  KBE) war am Tag 1 nach Applikation ein deutlicher Abfall der Keimzahlwerte aller Stämme in Blase und Niere zu beobachten, was auf Verluste durch den Urinfluss der Mäuse beruht. Eine Woche nach intraurethraler Applikation (Tag 7) waren Keimzahlunterschiede von 1-2 Logstufen zwischen dem apathogenen *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  und dem UPEC-Stamm U3366 zu erkennen. Auffallend waren die deutlich niedrigen Keimzahlwerte des UPEC Stammes 536 in Blase und Niere, die etwa denen des apathogenen Stammes gleichzusetzen waren. Dieser Verlust der Pathogenität des UPEC 536 ist offenbar durch Genomumlagerungen und Deletionen verursacht, die insbesondere zu Verlust der PAI führen (Hacker *et al.*, 1990). Daher wurde für die weiteren Harnwegsinfektionsversuche der UPEC Stamm U3366 gewählt. Dieses frische Isolat zeigte ein hohes Virulenzpotential und hat im Gegensatz zum UPEC-Stamm 536 keine Attenuierung durch Laborkultivierung erfahren.

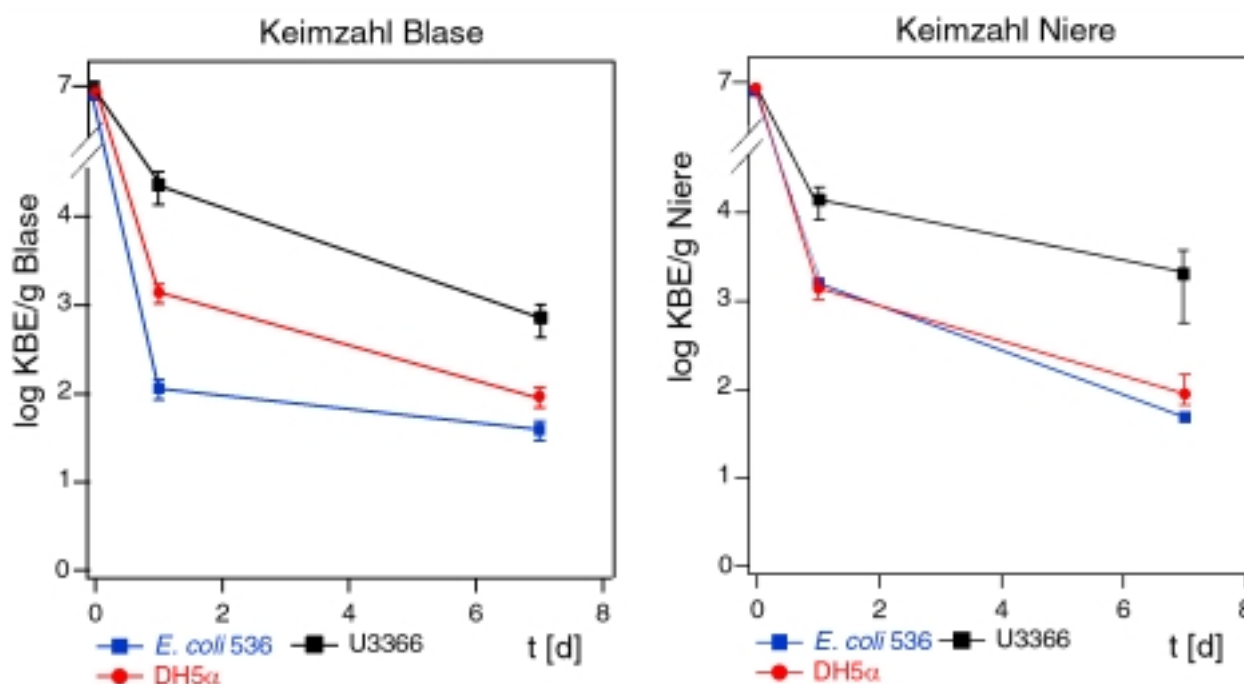


Abbildung 18: Harnwegsinfektion von C3H/HeN-Mäusen mit den UPEC-Stämmen U3366, *E. coli* 536 und dem apathogenen *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$ . 10 weiblichen C3H/HeN-Mäusen wurden transurethral je 10  $\mu$ l ( $10^7$  KBE) des jeweiligen Stammes appliziert, Niere und Blase am Tag 1 und 7 entfernt und die Keimzahl

(KBE) pro g Gewebe bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen am jeweiligen Versuchstag.

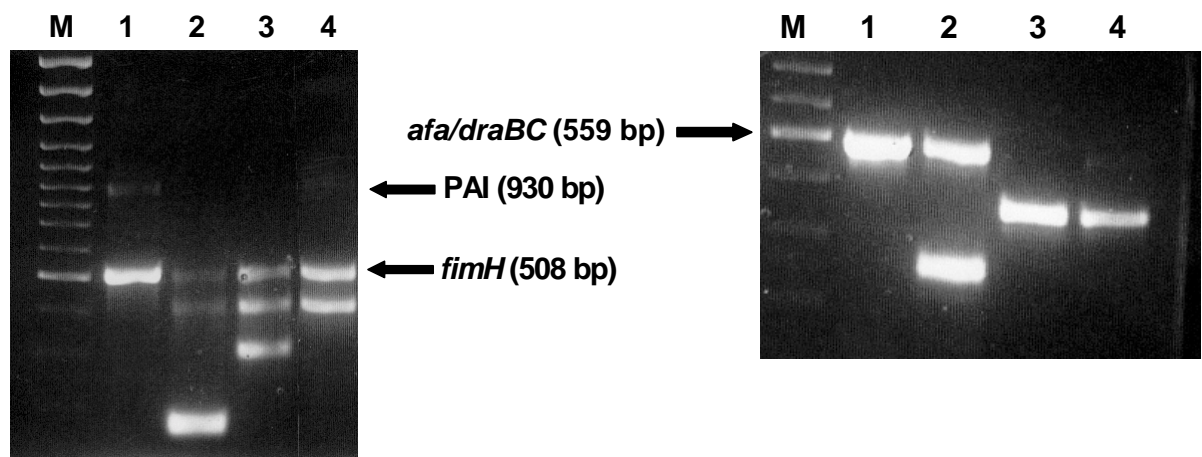
#### 4.2.2 Virulenzgentypisierung mittels Multiplex-PCR

Um eine genauere Charakterisierung des Pyelonephritisstammes U3366 vorzunehmen und das Spektrum weiterer Virulenzfaktoren dieses Stammes zu erfassen, wurde die UPEC-Virulenzfaktor-Multiplex-PCR nach J. R. Johnson durchgeführt (Johnson & Stell, 2000). Durch den Einsatz mehrerer Primerpaare in getrennten PCR-Ansätzen (Tab. 2), kann der Nachweis bekannter Virulenzfaktoren uropathogener *E. coli* erbracht werden. Hierzu gehören das Toxin Hämolyisin (*hlyA*) (Cavalieri & Snyder, 1982), ein Pathogenitätsinsel assoziierter DNA-Bereich (PAI-Marker) (Kao *et al.*, 1997), Adhäsine Typ 1 Pili (*fimH*) (Jones *et al.*, 1995), Sialosyl-spezifisches Adhäsine (*sfa/focDE*) (Marre & Hacker, 1987, Siitonen, 1994), das Siderophor Aerobactin (*iutA*) (Johnson, 1991), das die Blut-Hirn-Schranke überwinden helfende Invasine (*ibeA*) (Huang *et al.*, 1995), Adhäsine der Afa/Dr-Familie (*afa/draBC*) (Blanc-Potard *et al.*, 2002), das Toxin Cytotoxic Necrotising Factor (*cnfI*) (Ripperle-Lampe *et al.*, 2001), F1C Fimbrien (*focG*) (Marre & Hacker, 1987) und S-Fimbrien-Adhäsine (*sfaS*) (Morschhauser *et al.*, 1990).

Die eingesetzten Primerpaare sind Tabelle 2 zu entnehmen. Neben dem Stamm U3366 wurden die UPEC-Kontrollstämme *E. coli* J724 RS 218, *E. coli* J 632 UPEC 76 und *E. coli* J584 CP9 eingesetzt, die PCR wie in Kapitel 3.2.9 durchgeführt und die PCR-Produkte anschließend in einem 2 % Agarosegel elektrophoretisch analysiert (Abb. 19). Auf diese Weise konnten bei dem UPEC-Stamm U3366 die Gene *fimH*, *afa/dra BC* und die PAI-assoziierte DNA-Sequenz dargestellt werden. Adhäsine der Familie Afa/Dr werden sowohl bei Diarrhö verursachenden als auch bei Erregern von Harnwegsinfektionen beobachtet. Über das Afa/Dr Operon werden Invasine (AfaD, DraD) exprimiert, die es dem Stamm ermöglichen in Epithelzellen einzudringen (Blanc-Potard *et al.*, 2002). Die Adhäsine Typ 1 Fimbrien werden in nahezu allen *E. coli*, v.a. bei uroseptischen Erregern nachgewiesen (Johnson & Stell, 2000). Ebenso ist die Verbreitung von Pathogenitätsinseln, die Pathogenitätsfaktoren über horizontalen Transfer innerhalb verschiedener Spezies übertragen, innerhalb der uropathogenen *E. coli* sehr häufig.

**Tabelle 3 Virulenzfaktoren bei UPEC Stamm U3366**

Hämolysin ( <i>hly</i> )	-
Marker für uropathogene Pathogenitätsinsel (PAI)	+
Adhäsın Typ 1 Pili ( <i>fimH</i> )	+
Sialosyl-spezifisches Adhäsın ( <i>sfa/foc DE</i> )	-
Aerobactin ( <i>iutA</i> )	-
Invasin ( <i>ibe</i> )	-
Adhäsine der Afa/Dra-Familie ( <i>afa/draBC</i> )	+
Cytotoxic Necrotising Factor ( <i>cnfI</i> )	-
F1C Fimbrien ( <i>foc G</i> )	-
S-Fimbrien-Adhäsın ( <i>sfaS</i> )	-



**100 bp Marker**

**1. U3366**

**2. *E. coli* J724 RS218**

**3. *E. coli* J632 UPEC 76**

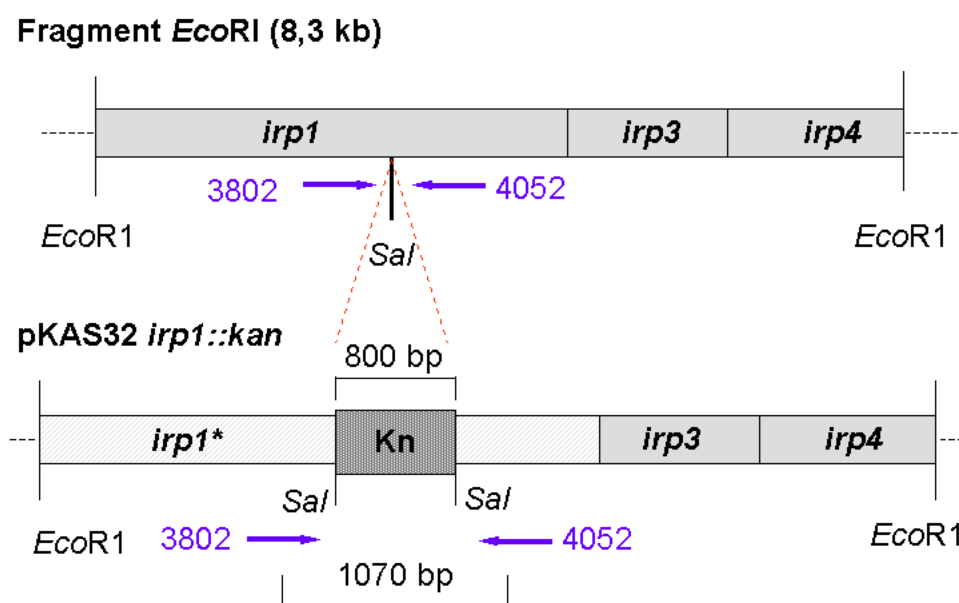
**4. *E. coli* J584 CP9**

**Abbildung 19: Einsatz des UPEC-Stammes U3366 und der Kontrollstämme *E. coli* J724 RS218, *E. coli* J632 UPEC 76, *E. coli* J584 CP9 in die UPEC-VF-Multiplex-PCR nach Johnson & Stell, 2000.**

#### 4.2.3 Generierung der *irp1*-Mutante des UPEC-Stammes U3366

Der Stamm U3366 *irp1* entstand über Konjugation (s. 3.2.8) des Stammes U3366 mit dem *E. coli* Stamm S17-1<pKAS32 *irp1::kan*>, wobei über Rekombination homologer DNA-

Bereiche die Übertragung des mutierten *irp1*-Gens in die chromosomale DNA des U3366 erzielt wurde. Die gezielte Integration einer Resistenzkassette (Kanamycin) in das *irp1*-Gen führt zu einer Unterbrechung des Leserasters und damit zu einer gestörten Transkriptionsrate des HMWP1-Proteins. Das Konstrukt *irp1::kan* wurde durch Einbau der mit der Endonuclease *SalI* geschnittenen Kanamycinkassette aus pUK-4K in die *SalI* Restriktionsstelle (nt-site 14032) des HPI-Genclusters erstellt. Über *EcoRI*-Restriktionsstellen wurde *irp1::kan* anschließend in den Vektor pKAS32 ligiert und dieser in den als Donorstamm fungierende Stamm S17-1  $\lambda$ pir transformiert (Abb. 20). Der Stamm wurde von S. Schubert, Max von Pettenkofer-Institut, München bereitgestellt.

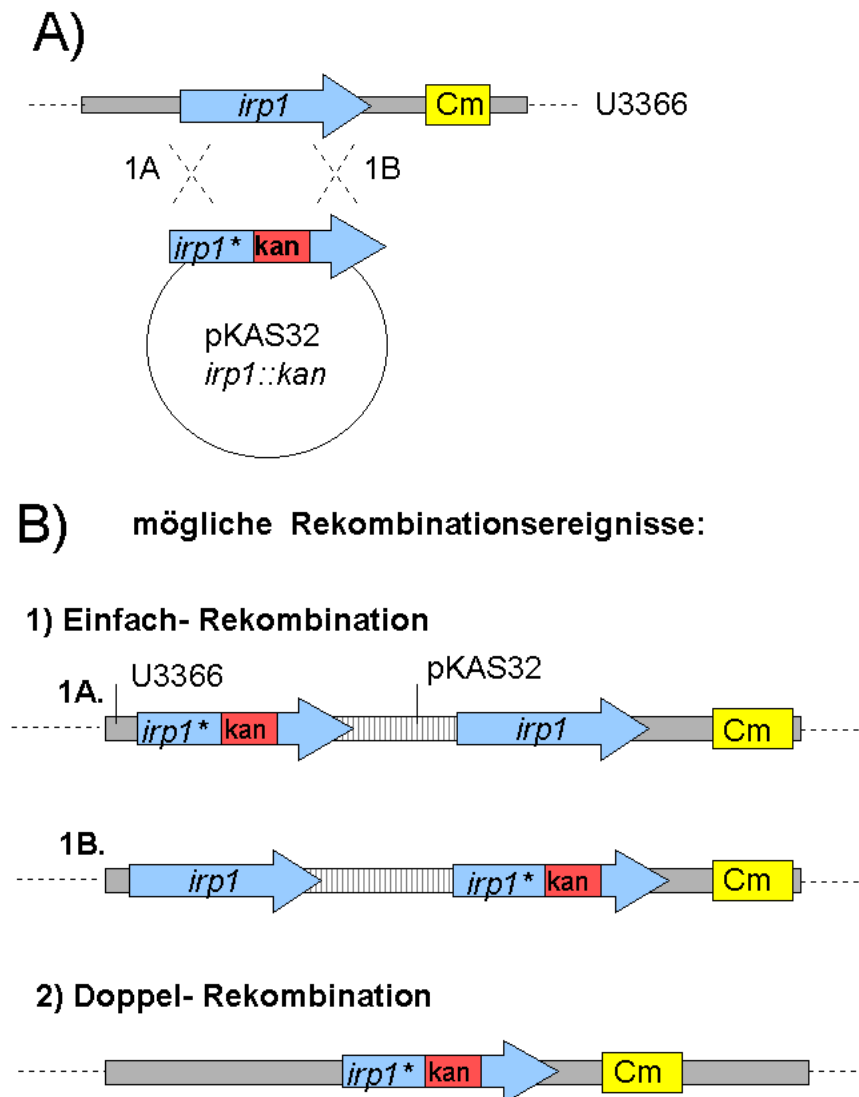


**Abbildung 20: Konstruktion des Suizidvektors pKAS32 *irp1::kan*.** Die Pfeile zeigen die Lage der Primer an.

#### 4.2.3.1 Konjugation des Stammes U3366 mit dem *E. coli*-Stamm S17-1<pKAS32 *irp1::kan*>

Die Konjugation des Stammes U3366 mit dem Stamm S17-1<pKAS32 *irp1::kan*> wurde wie in Kapitel 3.2.8 beschrieben durchgeführt (Abb. 21 A). Da beide Stämme über unterschiedliche Antibiotikaresistenzen verfügen, wurden die Konjuganden über Antibiotikaplatten (Kanamycin und Chloramphenicol) selektioniert und Einzelkolonien zur Kontrolle auf Blutagar-Platten mit den Antibiotikablättchen Kanamycin, Chloramphenicol und Tetracyclin ausgestrichen. Während der Rezipient U3366 eine Chloramphenicol- und Tetracyclinresistenz und der Donorstamm S17-1<pKAS32 *irp1::kan*> eine

Kanamycinresistenz aufweist, zeigten die Konjuganden nach Rekombination alle drei Antibiotikaresistenzen sowie die Hämolysefähigkeit des Stammes U3366 auf Blutagar. Die Selektierung auf Antibiotikaresistenzen zeigt die Integration des Kanamycinkassette-tragenden Gens (*irp1::kan*) in die chromosomale DNA des U3366, erlaubt jedoch keine Aussage darüber, ob das Gen durch Einfach- oder Doppel-Rekombination integriert wurde (Abb. 21 B). Um dies zu untersuchen, wurde im folgenden eine PCR durchgeführt .

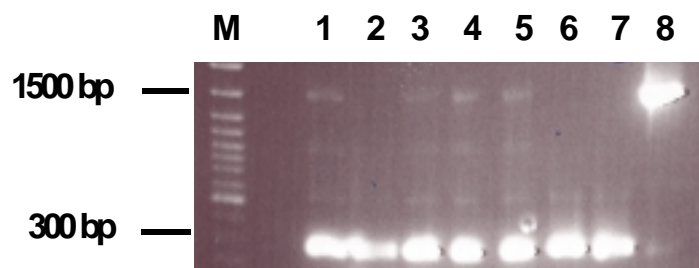


**Abbildung 21:** A) Konjugation des UPEC-Stammes U3366 mit dem *E. coli* Stamm S17-1<pKAS32 *irp1::kan*>. Hierbei ergibt sich die Möglichkeit einer Einfach- oder einer Doppel-Rekombination (B). Bei der Einfach-Rekombination sind 2 mögliche Integrationsschemata des Vektors dargestellt (1 A ,B), während bei der Doppel-Rekombination das intakte *irp1*-Gen gegen das mutierte *irp1::kan*-Gen ausgetauscht wird.

#### 4.2.3.2 Nachweis der *irp1*-Mutation mittels PCR

Der Nachweis der Rekombination des *irp1::kan*-Fragmentes in die chromosomale DNA des Stammes U3366 wurde mittels PCR erbracht, wobei die Primer (Kan 4052, Kan 3802) nahe der *SalI* Restriktionsstelle des *irp1*-Gens und damit an der Insertionsstelle der Kanamycinkassette hybridisieren (Abb. 20). Im Falle einer Einfach-Rekombination wurden 2 amplifizierte DNA-Fragmente, nämlich ein kleines und ein um 800 bp (Kanamycinkassette = 800 bp) größeres Fragment, erwartet. Der kleinere DNA-Bereich (269 bp) sollte das intakte *irp1*-Gen, das größere Fragment das mutierte *irp1::kan*-Gen darstellen. Bei der Doppel-Rekombination hingegen wurde nur ein großes DNA-Fragment, das *irp1::kan*-Amplifikat, erwartet.

Als Matrizen-DNA wurden gekochte Zellen des UPEC-Stammes U3366, des Stammes S17-1<pKAS32 *irp1::kan*> und von 6 U3366 *irp1*-Klonen eingesetzt. Die Amplifizierung der DNA-Segmente erfolgte wie in 3.2.9 beschrieben, wobei die *irp1*-PCR-Produkte anschließend in einem 1,2 %igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert wurden (Abb. 22).



100 bp Marker

1.-6. U3366 *irp1* Klon 1-6

7. U3366

8. S17-1<pKAS32 *irp1::kan*>

**Abbildung 22:** PCR-Nachweis der *irp1*-Mutation: PCR-Amplifikate von 6 U3366 *irp1* Klonen (1-6) wurden durch Gelelektrophorese getrennt und auf Existenz einer *irp1::kan*-Bande überprüft. Als Kontrollen dienten der Stamm U3366 (7) und S17-1<pKAS 32 *irp1::kan*> (8).

**Ergebnis:** Die PCR ergab bei allen 6 U3366 *irp1* Klonen einen deutlichen Nachweis des intakten *irp1*-Gens (269 bp). Bei den Klonen 1, 3, 4 und 5 konnte außerdem eine schwache große Bande dargestellt werden, die das *irp1::kan*-Fragment repräsentiert. Das kurze PCR-Amplifikat wurde in der PCR-Reaktion mit den eingesetzten Primern offenbar bevorzugt synthetisiert. Die Kanamycinresistenz der eingesetzten Klone (s.o.) und das Ergebnis der PCR

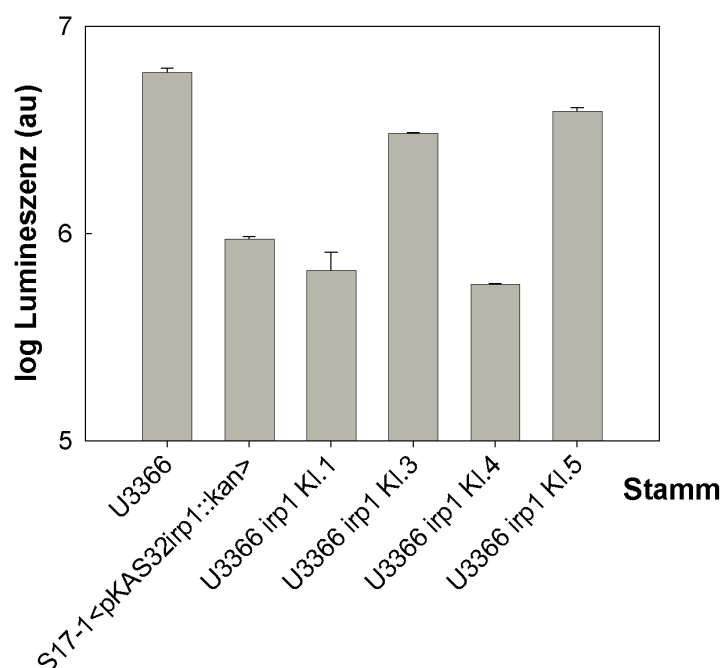
deuten auf ein Einfach-Crossing-over bei der Konjugation im Falle der Klone 1, 3, 4 und 5. Jedoch blieb unklar, ob die Einfach-Insertion an der richtigen Stelle des Genoms oder in illegitimer Weise an einem anderen Genombereich stattgefunden hat. In erstem Fall sollte die Yersiniabaktin-Produktion der Mutante unterbunden sein, da durch Insertion des Suizidvektors das Operon für die Siderophor-Synthese unterbrochen wird. Um dies zu klären und eine Aussage über die Yersiniabaktin-Synthese der U3366 *irp1*-Klone machen zu können, wurden die Mutanten mithilfe des Luciferase-Bioassays auf Funktionalität der HPI hin untersucht.

#### **4.2.3.3 Durchführung des Luciferase-Bioassays zur funktionellen Bestätigung der Mutante U3366 *irp1***

Der Nachweis über die richtige Insertion des *irp1::kan*-Fragments in die chromosomale DNA des Stammes U3366 und damit über die Funktionalität der HPI der entsprechenden U3366 *irp1*-Klone, wurde mithilfe des Luciferase-Bioassays erbracht, der im Kapitel Material und Methoden beschrieben wurde. Bei einer korrekten Insertion in das *irp*-Gencluster kann kein Yersiniabaktin produziert werden, wodurch eine verminderte Aktivität im Luciferase-Bioassay zu erwarten ist. Mithilfe der im Bioassay bestimmten Luciferaseaktivität des Indikatorstammes *Salmonella enterica* Typhimurium WR 1542 konnte auf die Yersiniabaktinproduktion der zu untersuchenden Stämme geschlossen werden. Das vom Versuchsstamm produzierte Yersiniabaktin kann vom Indikatorstamm über den FyuA-Rezeptor aufgenommen werden und bindet an das Regulatorprotein YbtA, was zu einer Steigerung der FyuA-Expression und damit zu einer gesteigerten Expression des nachgeschalteten Luciferase-Gens führt. Die Luciferaseproduktion kann mittels Chemilumineszenzreaktion quantifiziert werden, wodurch ein Vergleich unterschiedlicher Teststämme in Bezug auf ihre Yersiniabaktinproduktion möglich ist.

In den Versuch wurden die oben aufgeführten U3366 *irp1*-Klone 1, 3, 4 und 5, der *E. coli* S17-1 <pKAS32 *irp1::kan*> und der UPEC Stamm U3366 eingesetzt und der Bioassay, wie in Kapitel 3.4.1.1 beschrieben, durchgeführt.

### Luciferase-Assay zur Analyse der Yersiniabaktin-Produktion



**Abbildung 23:** Bestimmung der Yersiniabaktinproduktion der Stämme UPEC U3366 *irp1*-Klon 1, 3, 4 und 5 im Vergleich zu den Kontrollen S17-1<pKAS32 *irp1::kan*> und UPEC Stamm U3366 nach 5 tägiger Inkubation in NBD-Medium mithilfe des Luciferase-Bioassays. Die Enzymaktivität der Luciferase wurde als emittiertes Licht der Wellenlänge 562 nm in einem Luminometer gemessen. Als Indikatorstamm diente der *S. enterica* Typhimurium Stamm WR 1542. Dargestellt sind die Mittelwerte einer durchgeführten Zweifachbestimmung und die Standardabweichungen.

**Ergebnis:** (Abb. 23) Der Luciferase-Biossay zeigte einen Unterschied in der Luciferaseaktivität zwischen den Stämmen U3366 (Positivkontrolle) und S17-1<pKAS32 *irp1::kan*> (Negativkontrolle) auf. Die Luciferaseaktivität der U3366 *irp1*-Klone wurde mit den Messwerten der Kontrollstäme verglichen, wobei die Klone 1 und 4 eine Luciferaseaktivität im Bereich der Negativkontrolle aufwiesen und die Klone 3 und 5 in ihrer Produktion eher dem Stamm U3366 glichen. Die Ergebnisse wurden durch dreimalige Versuchswiederholung bestätigt. Der Klon 4 des Stammes U3366 *irp1* wurde für den Einsatz in den Tierversuch ausgewählt. Durch die im Bioassay dargestellte Unterbrechung der Siderophorsynthese der *irp1*-Mutante (Klon 4) konnte eine korrekte Insertion des *irp1::kan*-Gens in das *irp*-Gencluster des U3366 gezeigt werden.

#### 4.2.4 Herstellung der Rekomentante UPEC Stamm U3366 *irp1* rec

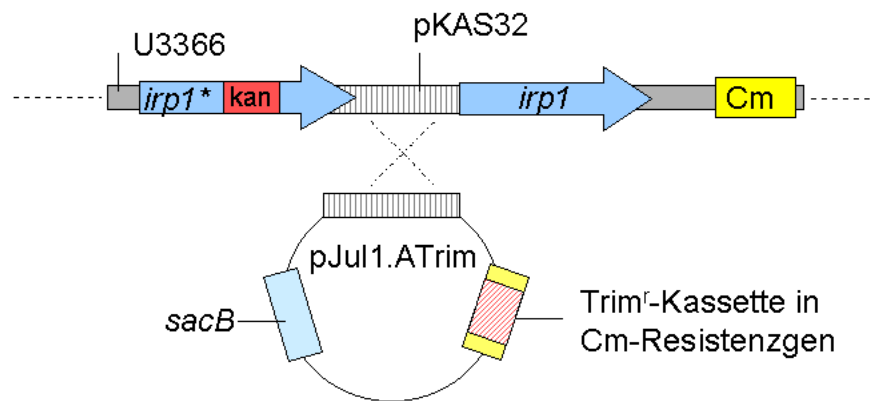
Neben dem UPEC Stamm U3366 und der *irp1*-Mutanten wurde in den Versuchen eine rekomentierte *irp1*-Mutante eingesetzt. Durch den Einsatz der Rekomentante sollten unvorhergesehene Mutationen im Genom bei der Mutantenherstellung und dadurch



entstandene verfälschte Ergebnisse ausgeschlossen werden. Die Klonierung der Rekomentante erfolgte analog der Erstellung der Rekomentante *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* rec (s. 4.1.1). Über Konjugation mit dem Suizid-Vektor pJul1.A integrierte dieser durch Einfach-Rekombination in das Wirtschromosom der *irp1*-Mutanten. Da der U3366-Stamm bereits eine Resistenz gegenüber Chloramphenicol aufweist, konnte der Suizid-Vektor pJul1.A nicht direkt eingesetzt werden. Durch die Integration eines Trimethoprim-Resistenzmarkers in die Chloramphenicol-Kassette des Vektors pJul1.A wurde der Suizid-Vektor pJul1.A Trim hergestellt. So konnte nach der Konjugation auf den ins Genom inserierten Suizidvektor durch Inkubation auf Trimethoprim-haltigen Agarplatten selektiert werden. Die Übertragung des Resistenzmarkers Trimethoprim in den Vektor pJul1.A erfolgte über Insertion des EZ::TN<sup>TM</sup><DHFR-1> Transposons (3.2.10). Nach der Einfach-Rekombination (Abb. 24 A, B) sollte mithilfe eines Sucrose-Selektionsdruckes sowohl der Vektor pJul1.A Trim (trägt das Sucroseempfindlichkeitsgen *sacB*) als auch der integrierte Vektor pKAS32 *irp1::kan* aus dem chromosomalen Genom des Stammes U3366 *irp1* entfernt werden. Durch den Selektionsdruck ergaben sich 2 Möglichkeiten einer zweiten Rekombination (Abb. 24 B): Entweder sollte der integrierte Vektor pJul1.A Trim mit Teilen des pKAS32 *irp1::kan* und dem intakten *irp1*-Gen oder aber der Vektor pJul1.A Trim mit dem gesamten Vektor pKAS32 *irp1::kan* deletieren. In letzterem Fall hätte die gewünschte Wiederherstellung des ursprünglichen Stammes U3366 stattgefunden (Abb. 24 C).

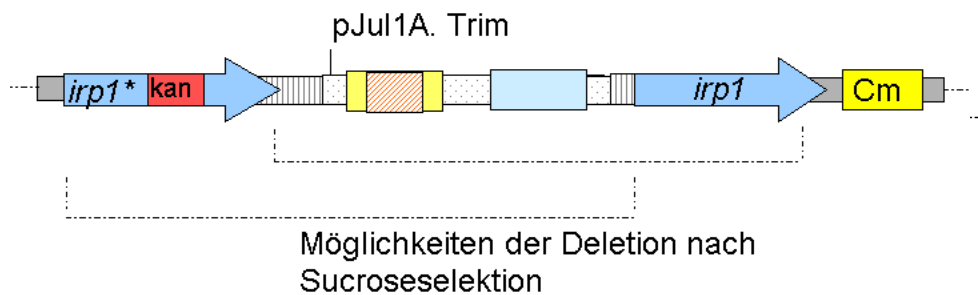
Die Selektion über das *sacB*-Gen des Suizid-Vektors pJul1.A wurde gewählt, da der UPEC Stamm U3366 eine dominante Form der Streptomycin-Resistenz zeigt. Somit konnte das Streptomycin-Empfindlichkeitsphänotyp-Gen (*rpsL*) des Suizid-Vektor pKAS32 zur Entfernung des *irp1::kan* Fragmentes aus dem Genom der U3366 *irp1*-Mutanten nicht ausgenutzt werden.

**A) Integration des Vektors pJul1.A Trim in U3366 *irp1***



**B)**

**U3366 *irp1* nach Einfach-Rekombination mit pJul1.A Trim**



**C) U3366 *irp1* rec nach Sucroeselektion**

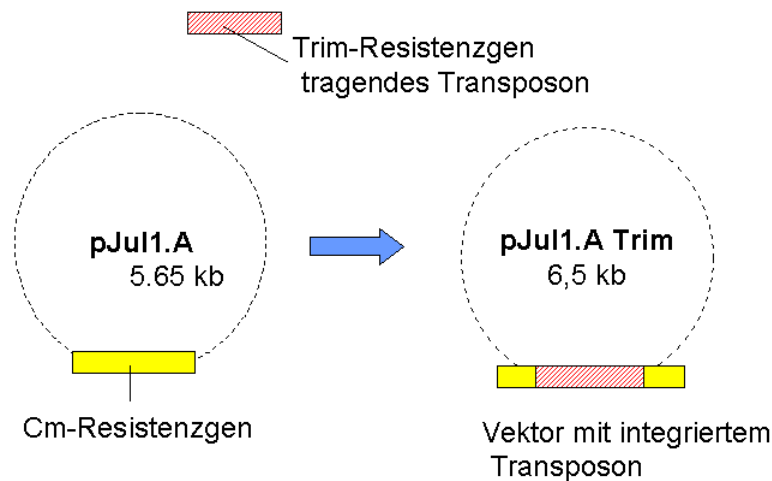


Abbildung 24: A) Rekombination des Stammes U3366 *irp1* mit dem Suizid-Vektor pJul1.A Trim. B) U3366 *irp1* nach Einfach-Rekombination mit pJul1.A Trim. Gestrichelte Linien zeigen mögliche Deletionen nach 2. Rekombination durch Sucroeselektion. C) Verlust des Vektors pJul1.A Trim und pKAS32 *irp1::kan* durch Sucroeselektion und Entstehung der Rekomentante U3366 *irp1* rec.

**4.2.4.1 Erstellung des Vektors pJul1.A Trim und Transformation in den *E. coli* Stamm SM10  $\lambda$ pir**

Da der Vektor pJul1.A eine Chloramphenicolkassette als Selektionsmarker besitzt, die UPEC-Stämme U3366, U3366 *irp1*, U3366 *irp1* rec jedoch ebenfalls eine Chloramphenicol-Resistenz aufweisen, wurde eine Trimethoprim-Resistenzkassette als Marker in den Vektor

pJul1.A inseriert (Abb. 25). Die Integration des Transposons erfolgte wie unter 3.2.10 beschrieben. Die Menge des einzusetzenden EZ::TN<sup>TM</sup><DHFR-1> Transposons richtete sich nach der Größe des Vektors (5600 bp) sowie nach der eingesetzten Masse der Ziel-DNA (0,1 µg) und wurde mithilfe der aufgeführten Formel (s. 3.2.10) berechnet.



**Abbildung 25:** Integration eines Trimethoprim-Resistenzgen tragenden Transposons in das Chloramphenicol-Resistenzgen des Vektors pJul1.A.

Nach erfolgter Transposition wurde 1 µl des Transposonansatzes in 50 µl elektrokompenter Zellen des Stammes *E. coli* SM10  $\lambda$ pir transformiert, der sich durch Trimethoprim-Empfindlichkeit und Konjugationsbereitschaft als Donorstamm auszeichnet. Die Durchführung der Elektroporation erfolgte wie unter 3.2.7 beschrieben. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurden je 100 µl der Elektroporationsansätze auf Trimethoprim-haltige MH-Platten ausplattiert und bei 37°C ÜN bebrütet. Die am nächsten Tag gewachsenen Kolonien wurden entnommen, auf MH-Platten ausgestrichen und diese mit Trimethoprim- und Chloramphenicol-Antibiotikablättchen belegt (ÜN, 37°C). Selektioniert wurde auf einen Trimethoprim-resistenten und Chloramphenicol-sensiblen Klon, da in diesem Fall das Trimethoprim-tragende Transposon exakt in die Chloramphenicol-Kassette des Vektors pJul1.A integriert ist (Abb. 25).

#### 4.2.4.2 Konjugation der Mutante U3366 *irp1* mit SM10 $\lambda$ pir <pJul1.A-Trim>

Bei der Konjugation (s. 3.2.8) wurde der *E. coli* Stamm SM10  $\lambda$ pir <pJul1.A-Trim> als Donor, der Stamm U3366 *irp1* als Rezipient des übertragenden Plasmides eingesetzt. Nach Anreicherung, Zusammenführung und Inkubation der Konjuganden, wurden je 100 µl der Suspension in den Verdünnungsstufen  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  auf Chloramphenicol- und Trimethoprim-

Selektivagarplatten ausplattiert und ÜN bei 37°C bebrütet. Gewachsene Kolonien wurden anschließend zur Kontrolle mit den entsprechenden Antibiotikablättchen auf MH-Platten ausgestrichen (ÜN, 37°C). Aufgrund des  $\pi$ -Protein-Defizites des UPEC-Stammes U3366 fand bei der Konjugation durch Einfach-Rekombination homologer DNA-Bereiche eine Integration des Plasmides pJul1.A-Trim in das Wirtschromosom statt. Ein solch entstandenes Konstrukt konnte durch die dazugewonnene Trimethoprim-Resistenz in dem Chloramphenicol-resistenten Stamm U3366 *irp1* nachgewiesen werden.

#### 4.2.4.3 Sucrose-Selektion Kanamycin empfindlicher Klone

Die Mutante U3366 *irp1* ist offenbar durch eine Einfach-Rekombination entstanden (s. 4.2.3.2) und verfügt damit sowohl über ein intaktes als auch über ein mutiertes *irp1*-Gen (Abb. 24 A). Um für die Herstellung der Rekomentanten den einfach integrierten Vektor pKAS32 *irp1::kan* zu entfernen und den ursprünglichen Stamm U3366 wiederherzustellen, wurde mithilfe des integrierten Vektors pJul1.A-Trim eine Sucrose-Selektion durchgeführt. Basierend auf dem Sucroseempfindlichkeitsgen *sacB* des Vektors pJul1.A-Trim (s. 3.2.2) konnte über die Zugabe von Sucrose ein Verlust des Vektors pJul1.A-Trim und durch eine 2. Rekombination innerhalb des Genoms der Verlust des Vektors pKAS32 *irp1::kan* erreicht werden (Abb. 24 C). Aufgrund eines damit verbundenen Verlustes der Kanamycin-Resistenz, konnte die Deletion des mutierten *irp1*-Gens über den Nachweis eines Kanamycin-sensiblen Stammes nach der Sucrose-Selektion überprüft werden. Die auf 5 %igen Sucrose-Platten gewachsenen Kolonien wurden parallel auf Kanamycin-haltige LB- und antibiotikafreie MH-Platten ausgestrichen und nach Inkubation Kanamycin-empfindliche Klone selektiert. Der integrierte Vektor pJul1.A-Trim (Abb. 24 B) wurde in diesem Fall durch den ausgeübten Selektionsdruck samt pKAS32 *irp1::kan* aus dem Chromosom entfernt (Abb. 24 C). Die Mutante U3366 *irp1* wurde somit vollständig rekomentiert und im folgenden funktionell bestätigt.

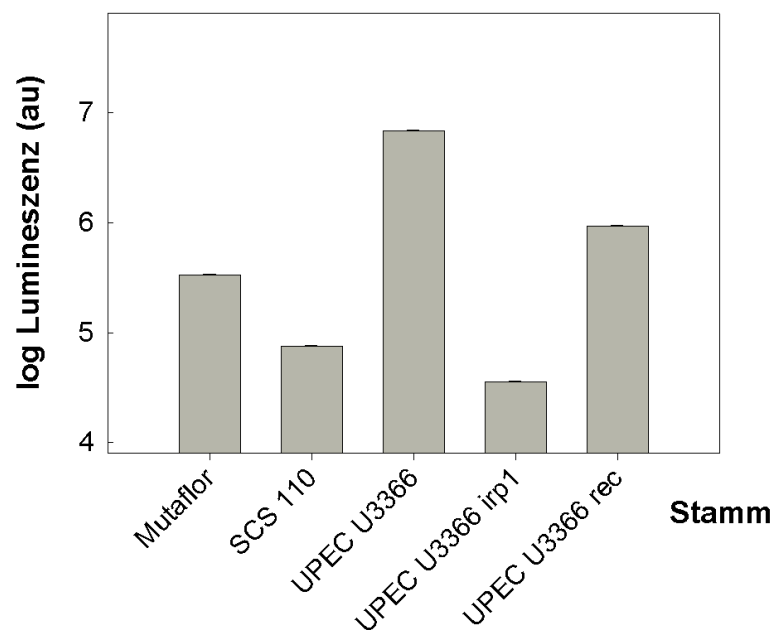
#### 4.2.4.4 Durchführung des Luciferase-Bioassays zur funktionellen Bestätigung der Rekomentante U3366 *irp1* rec

Nach Rekomentierung der *irp1*-Mutanten sollte die Wiederherstellung des intakten HPI-Gencluster funktionell bestätigt werden. Aufgrund eines wieder intakten Leserasters der Siderophorsynthesegene war eine Yersiniabaktinproduktion vergleichbar zum Ursprungstamm U3366 zu erwarten. Mithilfe des Luciferase-Bioassays (s. 3.4.1.1) wurde die Yersiniabaktin-Produktion der Rekomentante im Vergleich zu dem Stamm U3366 und der Mutante U3366 *irp1* *in vitro* untersucht. Anhand der Luciferase-Aktivität, die über

Chemilumineszenz-Messung quantifiziert wurde, konnten, wie in Kapitel 4.2.3.3 ausführlich beschrieben, Rückschlüsse auf die Yersiniabaktinproduktion der unterschiedlichen Stämme geschlossen werden.

Neben dem Stamm U3366, U3366 *irp1* rec und U3366 *irp1* wurden als Positivkontrolle der *E. coli* Stamm Mutaflor<sup>®</sup>, als Negativkontrolle der *E. coli* Stamm SCS 110 eingesetzt und die Luciferase-Messung am Tag 6 nach Inkubationsbeginn durchgeführt (3.4.1.1).

### Luciferase-Assay zur Analyse der Yersiniabaktin-Produktion



**Abbildung 26:** Bestimmung der Yersiniabaktinproduktion der UPEC Stämme U3366 *irp1*, U3366, U3366 *irp1* rec im Vergleich zur Positivkontrolle *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> und der Negativkontrolle *E. coli* Stamm SCS 110 nach 6 tägiger Inkubation in NBD-Medium mithilfe des Luciferase-Bioassays. Die Enzymaktivität der Luciferase wurde als emittiertes Licht der Wellenlänge 562 nm in einem Luminometer gemessen. Als Indikatorstamm diente der *Salmonella enterica* Typhimurium Stamm WR 1542. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Doppelbestimmung und die Standardabweichungen.

**Ergebnis:** Abbildung 26 zeigt eine niedrigere Luciferaseaktivität der Negativkontrolle *E. coli* SCS 110 und der Mutanten U3366 *irp1* (au= 10<sup>4</sup>) gegenüber den HPI-intakten Stämmen, was auf die fehlende Yersiniabaktinproduktion hinweist. Die Siderophorsynthese der Rekomentantante U3366 *irp1* rec (au= 933.313) nimmt gemessen an der Luciferaseaktivität eine Zwischenstellung zwischen dem Stamm U3366 (au= 6.802.117) und der Positivkontrolle *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> (au= 332.880) ein und zeigt eine *in vitro* intakte HPI-Aktivität.

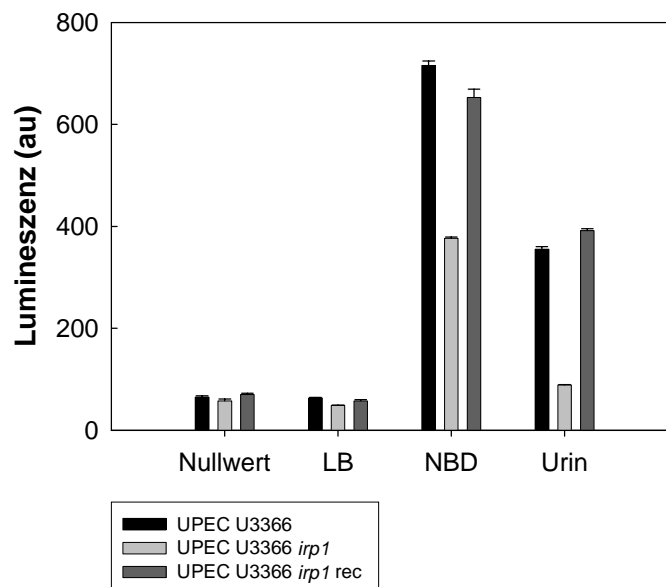
## 4.2.5 Werden die HPI-Gene bei Urinkontakt *in vitro* exprimiert?

Bevor die entsprechenden Bakterienstämme im Mausmodell eingesetzt wurden, sollten *in vitro*-Untersuchungen die Möglichkeit eines Einflusses der HPI auf das Infektionsverhalten des jeweiligen Stammes bekräftigen. Es sollte im folgenden untersucht werden, ob der UPEC Stamm U3366 gegenüber der *irp1*-Mutante Yersiniabaktin bei Inkubation in Urin *in vitro* und bei Kontakt zu Urin *in vivo* exprimiert. Der Nachweis einer Siderophorproduktion sollte den Beweis einer funktionell aktiven HPI bei *E. coli* U3366 erbringen und damit den Einsatz im Tierversuch rechtfertigen. Für den *in vitro* Versuch wurden zwei unterschiedliche Nachweisverfahren gewählt: der Yersiniabaktin-Luciferase-Bioassay (s. 3.4.1.1) und der Cross-feeding-Assay (s. 3.4.1.2).

### 4.2.5.1 Yersiniabaktin-Luciferase-Bioassay

Die Grundlagen des Luciferase-Bioassays wurden in Kapitel 3.4.1.1 ausführlich beschrieben. Mit dem Einsatz in den Bioassay sollten die UPEC-Stämme U3366, U3366 *irp1* und die Rekomentante U3366 *irp1* rec in unterschiedlich eisenreichen Medien auf Exprimierung von Yersiniabaktin *in vitro* untersucht werden. Es sollte hiermit eine von der Umgebung eisenabhängige Produktion des Siderophors bewiesen werden. Um eine hohe Ausgangskonzentration der Bakterien zu erreichen, wurden die Stämme zunächst ÜN bei 37°C in LB-Medium angereichert. Die Kulturen wurden am nächsten Morgen abzentrifugiert und das erste Anreicherungsmedium ausgetauscht, so dass eine mögliche Ybt-Produktion in der logarithmischen Wachstumsphase der LB-Kultur unterbunden werden konnte. Nach erneuter Inkubation über Nacht wurden die Stämme in das entsprechende endgültige Medium überführt. Neben Urin wurden Medien unterschiedlicher Eisensättigung, wie LB (eisenreich) und NBD (durch den Zusatz des Eisenchelators 2,2'-Dipyridyl sehr eisenarm) eingesetzt. Vor der Überimpfung des jeweiligen Stammes in LB, NBD und Urin wurde ein Aliquot des Anreicherungsmediums (LB) entnommen, der Überstand nach Zentrifugation als Nullwertprobe eingefroren und später mit den Versuchsproben gemeinsam weiterverarbeitet und beurteilt (s. Protokoll 3.4.1.1). Die Stämme U3366, U3366 *irp1* und U3366 *irp1* rec wurden anschließend in den aufgeführten Medien 5 Tage bei 37°C inkubiert und die Luciferase-Messung durchgeführt. Aufgrund der zur gemessenen Lichtemission proportionalen Menge Luciferase, konnte auf die aufgenommene Menge Yersiniabaktin und damit auf die Expression des Siderophors des jeweiligen Teststammes geschlossen werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 27 dargestellt. Der Versuch wurde zur Bestätigung insgesamt 4 x wiederholt.

### Luciferase-Assay zur Analyse der Yersiniabaktin-Produktion



**Abbildung 27:** *in vitro*-Bestimmung der Yersiniabaktinproduktion der UPEC Stämme U3366, U3366 *irp1* und U3366 *irp1* rec am Tag 0 und nach 5-tägiger Inkubation in den Medien LB, NBD, Urin bei 37°C mithilfe des Luciferase-Bioassays. Die Enzymaktivität der Luciferase wurde als emittiertes Licht bei der Wellenlänge 562 nm in einem Luminometer gemessen. Als Indikatorstamm diente der *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium Stamm WR 1542. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung und die Standardabweichungen.

**Tabelle 4** Luciferase-Quotient

Quotient	Nullwert	Grenzwert	LB	NBD	Urin
U3366/U3366 <i>irp1</i>	1,12	1,568	1,28	1,89	3,98
U3366 <i>irp1</i> rec/U3366 <i>irp1</i>	1,2	1,68	1,18	1,73	4,4

**Ergebnis:** Während die Luciferase-Messung nach Anreicherung in dem eisenreichen LB-Medium bei allen Stämmen Werte zeigte, die den Nullwert (ca. 60 au) nicht überstiegen, war ein Anstieg der Luciferaseproduktion bei dem Stamm U3366 und der Rekomentante in den Medien Urin und NBD zu erkennen. Hierbei wurden bei den NBD inkubierten Stämmen Werte von ca. 700 au, bei den in Urin angereicherten Stämmen Werte von ca. 400 au erreicht. Dagegen zeigte die *irp1*-Mutante im eisenarmen NBD-Medium eine Lichtemission von 377 au und im Urin von 89 au. Wie in Abbildung 27 dargestellt, unterscheiden sich die arithmetischen Mittelwerte der Messwerte in Abhängigkeit der eingesetzten Kulturmedien erheblich. So sind die Chemilumineszenzwerte der *irp1*-Mutante im NBD-Kulturmedium

deutlich höher als im Urin oder im LB-Medium. Daraus folgt, dass für den Vergleich der Chemilumineszenz der Stämme bei unterschiedlichen Anzuchtbedingungen nicht die Absolutwerte herangezogen werden können. Um eine Vergleichbarkeit zu erbringen, sind vielmehr Quotienten zwischen den Werten von Ausgangsstamm bzw. Rekomentante und der *irp1*-Mutante zu bilden. Der Quotient aus der Nullwertbestimmung U3366/U3366 *irp1* bzw. U3366 *irp1* rec/U3366 *irp1* zuzüglich eines 40 %igen Sicherheitszuschlages wird als Grenzwertquotient für die Beurteilung positiver Yersiniabaktinproduktion definiert. Wie aus Tabelle 4 ersichtlich, zeigen der Ausgangsstamm U3366 und die *irp1*-Rekomentante erwartungsgemäß im eisenreichen LB-Medium keine Ybt-Produktion. Deutliche Hinweise für eine Yersiniabaktin-Synthese ergeben sich dagegen aus den hohen Quotienten beim NBD-Medium und interessanterweise auch bei der Urinkultivierung.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse eine Abhängigkeit der Yersiniabaktinproduktion von der Eisenkonzentration des Anreicherungsmediums *in vitro*. Je eisenärmer das Medium, desto größer war die Siderophorproduktion. Außerdem wurden eindeutige Unterschiede in der Expression des Siderophors zwischen den HPI-intakten Stämmen und der *irp1*-Mutanten deutlich.

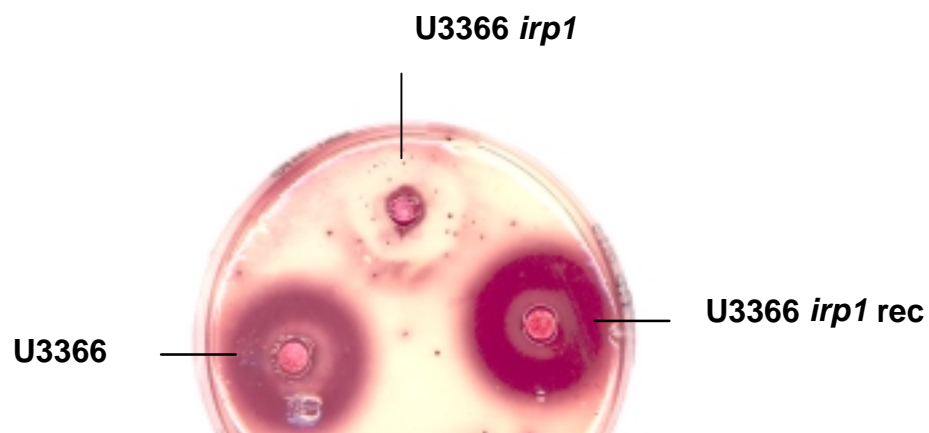
#### **4.2.5.2 Cross-Feeding-Assay mit dem *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium Stamm WR 1542**

Da der im Max von Pettenkofer-Institut entwickelte Luciferase-Assay neben der Eisenkonzentration im Anreicherungsmedium andere Einflüsse auf den Luciferase-Promotor nicht ausschließen kann, wurde zur Bestätigung der Yersiniabaktinproduktion im Urin als ergänzender Test der Cross-feeding-Assay (s. 3.4.1.2) durchgeführt. Als Indikatorstamm wurde der *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium WR1542 eingesetzt, der in den eisenarmen CDHM-Agar eingegossen wurde. Aufgrund der Mutation sämtlicher Eisenaufnahmesysteme kann der *Salmonella*-Stamm Eisen lediglich über den plasmid-kodierten FyuA-Rezeptor in Form von Ferro-Yersiniabaktin aufnehmen. Trägt man dem in eisenarmen CDHM-Agar eingegossenen *Salmonella*-Stamm über Filterblättchen Testmedien auf, kann je nach Anwesenheit von Ybt im Testmedium ein Wachstumshof des *Salmonella*-Indikatorstammes um das Filterblättchen nachgewiesen werden. Der Wachstumshof demonstriert die Yersiniabaktinproduktion des Teststammes. Das Protokoll wurde wie unter 3.4.1.2 beschrieben durchgeführt und als Teststämme der UPEC Stamm U3366, U3366 *irp1* und U3366 *irp1* rec eingesetzt. Die Stämme wurden 5 Tage in Urin angereichert und ein Aliquot von 8 µl über ein Filterblättchen auf den Agar aufgetragen und bei 37°C ÜN bebrütet.



Am nächsten Tag wurde die Bildung von Wachstumshöfen des Indikatorstammes um die jeweiligen Testblättchen bewertet. Die Ergebnisse sind in Abb. 28 dargestellt.

**Ergebnis:** Ein Wachstumshof des *Salmonella enterica* Typhimurium-Stammes WR 1542 wurde bei den *Yersinia*-HPI-intakten Stämmen U3366 und U3366 *irp1* rec nachgewiesen, während um die Testblättchen der *irp1*-Mutanten kein Wachstum des Indikatorstammes zu erkennen war. Damit wurde neben dem Luciferase-Bioassay ein weiterer unabhängiger Nachweis einer Yersiniabaktinproduktion im Urin HPI-positiver Stämme *in vitro* erbracht. Die Ergebnisse wurde durch Versuchswiederholung bestätigt.



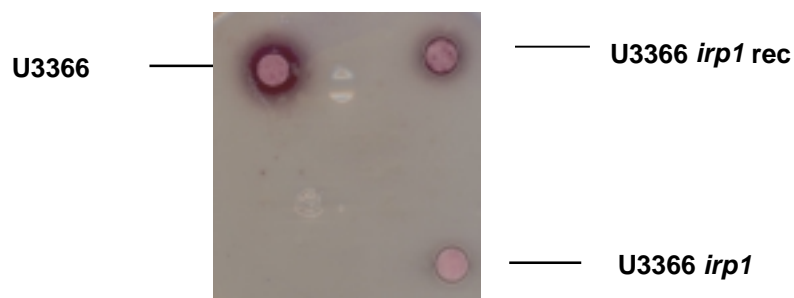
**Abbildung 28:** *in vitro* Nachweis der Yersiniabaktinproduktion der UPEC Stämme U3366, U3366 *irp1* und U3366 *irp1* rec mithilfe des in CDHM-Agar eingegossenen Indikatorstammes *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium Stamm WR 1542 nach 5-tägiger Inkubation. 8 µl der jeweiligen Urinkultur wurden auf Filterblättchen übertragen und bei 37°C inkubiert. Anfärbung (rot) des Bakterienwachstums erfolgte, wie in Material und Methoden beschrieben, durch Zusatz von Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung.

#### 4.2.6 Werden die HPI-Genen bei Urinkontakt *in vivo* exprimiert

Nach der Bestätigung der *in vitro* Expression von HPI-Genen sollte der Nachweis einer Ybt-Produktion nach transurethraler Infektion *in vivo* erbracht werden. Aufgrund der geringen Urinmenge, die von Mäusen gewonnen werden konnte, wurde hier auf die Nachweismethode des Luciferase-Bioassays verzichtet und ausschließlich der Cross-feeding-Assay durchgeführt. Zuvor wurde C3H/HeN-Mäusen der jeweilige Stamm (UPEC U3366, U3366 *irp1*, U3366 *irp1* rec) unter Narkose (s. 3.3.4.3) appliziert (s. 3.3.4.2) und der Urin am Tag 1 bis 7 auf sterilen Petrischalen gewonnen. 8 µl des gewonnenen Urins wurde auf die Filterblättchen des Assays gebracht, bei 37°C ÜN inkubiert und die Ergebnisse am nächsten

Tag ausgewertet (s. Abb. 29). Um eine Yersiniabaktinproduktion der Bakterien nach Gewinnung des Urins zu vermeiden, wurde in einer zweiten Versuchsreihe dem CDHM-Agar das Antibiotikum Kanamycin zugegeben. Das Antibiotikum, das seinerseits keine Auswirkungen auf den Stamm WR1542 hat, wirkt abtötend auf die U3366-Stämme, so dass eine Untersuchung auf *in vivo* Produktion des Siderophors gewährleistet wurde.

**Ergebnis:** Der Urin der Mäuse wurde an 7 aufeinanderfolgenden Tagen gewonnen und auf die Testblättchen des CDHM-Agars gebracht. Bereits am ersten Versuchstag wurde der Nachweis einer Yersiniabaktinproduktion des Stammes U3366 und U3366 *irp1* rec erbracht, während die Mutante *irp1* den *Salmonella*-Stamm nicht mit dem Siderophor versorgen konnte. Das gleiche Ergebnis erhielt man an den darauffolgenden Versuchstagen. Repräsentativ wurde hier die Siderophorproduktion am Tag 3 dargestellt (Abb. 29). Offenbar wurden unmittelbar bei Kontakt zum Wirtsorganismus, bzw. bei Urinkontakt *in vivo*, die HPI-kodierten Gene exprimiert und Siderophore in die Umgebung abgegeben. Durch die Herstellung kanamycinhaltiger CDHM-Platten in einer zweiten Versuchsreihe wurde das Wachstum des jeweiligen UPEC-Stammes gehemmt und nur der *in vivo* produzierte Proteinüberstand gemessen. Eine Yersiniabaktin-Produktion des Stammes U3366 und der Rekomentanten konnte auch hier im Gegensatz zu der *irp1*-Mutanten nachgewiesen werden.



**Abbildung 29:** Nachweis der *in vivo* Yersiniabaktinproduktion der UPEC Stämme U3366, U3366 *irp1* und U3366 *irp1* rec mithilfe des in CDHM-Agar eingegossenen Indikatorstammes *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium Stamm WR 1542. 8 µl des von infizierten Mäusen gewonnenen Urins (Tag 3) wurde auf Filterblättchen, die auf CDHM-Platten aufgelegt wurden, übertragen und bei 37°C ÜN inkubiert.

#### 4.2.7 *In vivo* Harntraktinfektion im Mausinfektionsmodell

Nachdem in Vorversuchen neben Parametern wie Applikationsart, Narkoseform und Mausstamm der geeignete UPEC-Stamm gewählt und die entsprechende Mutante und Rekomentante hergestellt und getestet wurde, wurden die uropathogenen *E. coli*-Stämme U3366, U3366 *irp1* und die Rekomentante U3366 *irp1* rec im Harntraktinfektionsmodell untersucht. Zuvor wurde die Expression der HPI-kodierten Proteine im Urin durch *in vitro* Untersuchungen bestätigt. Im Mausinfektionsmodell, das sich für Untersuchungen von *E. coli*-Infektionen im Harntrakt etabliert hat, sollte der Einfluss der HPI auf das Infektionsverhalten des UPEC-Stammes untersucht werden. Die Stämme wurden, wie in Kapitel 3.3.1-3.3.2 beschrieben, für den Einsatz im Tierversuch vorbereitet und alle Mäuse auf bereits bestehenden Harnwegsinfekt überprüft und im Falle einer Infektion saniert (s. 3.3.4.5).

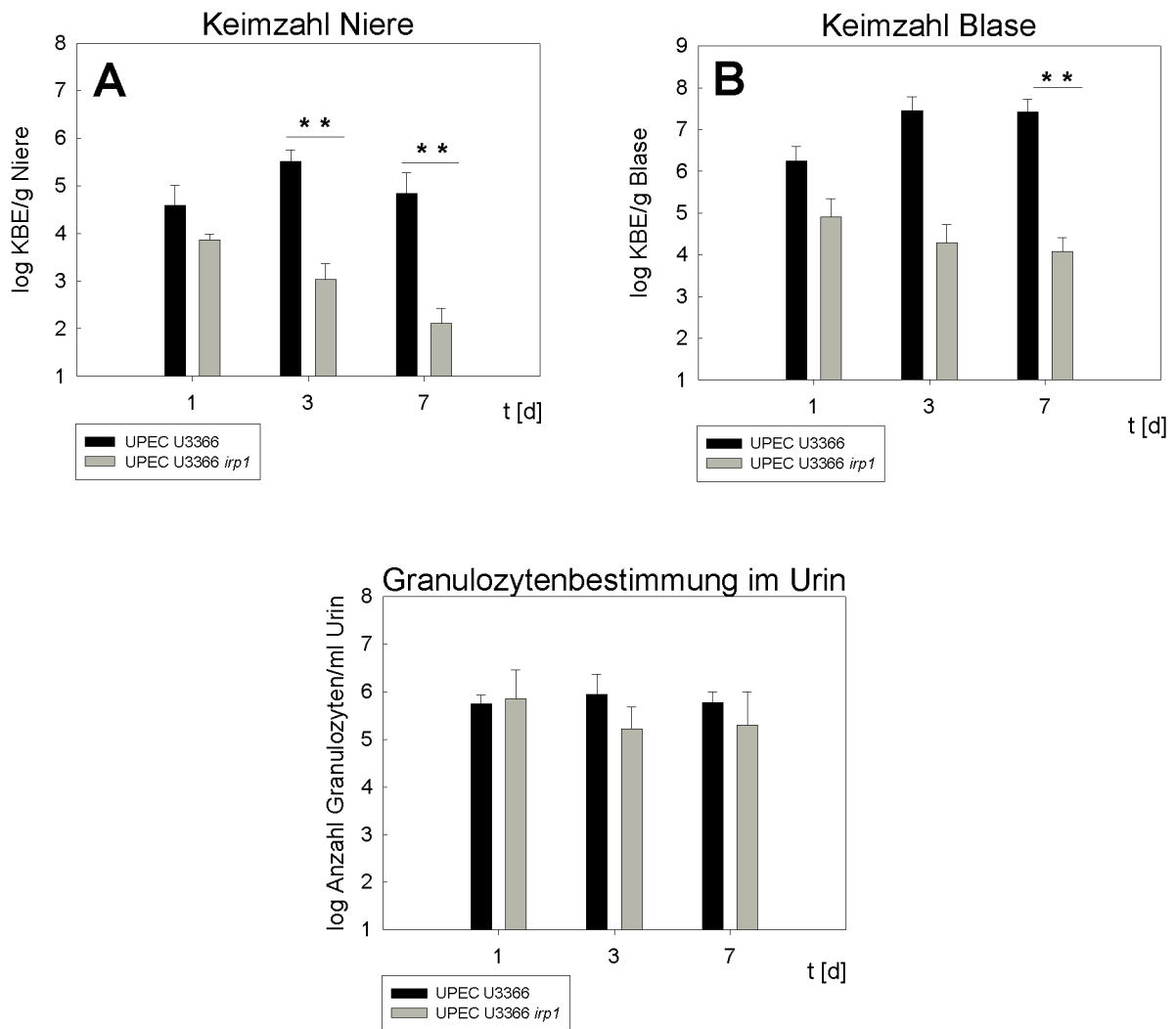
#### 4.2.8 Einzelinfektionsversuch

Der Einzelinfektionsversuch wurde gewählt, um die Bakterienstämme getrennt voneinander bezüglich ihres Infektionsverhaltens zu untersuchen. Da die Harnwege primär steril sind, wurde die Isolierung der eingesetzten Keime und ihre Quantifizierung erleichtert. Pro Bakterienstamm wurden für einen Infektionsversuch 30 C3H/HeN-Mäuse eingesetzt, wobei die Gruppengröße pro Tag 10 Mäuse betrug. Die Bakteriensuspension wurde den Mäusen unter Ketamin-Xylazin-Narkose (s. 3.3.4.3) intraurethral appliziert (s. 3.3.4.2). Nach der Infektion, die den natürlichen Infektionsweg simuliert, wurde die Keimzahl aus Blase, Niere und Urin an den Tagen 1, 3 und 7 bestimmt. Der Urin der infizierten Mäuse wurde zu den genannten Zeitpunkten gesammelt, eine Keimzahlbestimmung und Granulozytenzählung pro ml Urin durchgeführt und anschließend Blase und Niere der Tiere entfernt, gewogen und für die Bestimmung der Keimzahl homogenisiert. Die Homogenisate wurden in verschiedenen Verdünnungsstufen ausplattiert und nach ÜN-Inkubation bei 37°C die Keimlast (KBE) für Niere, Blase und Urin pro g Gewebe bestimmt. Die Versuchsdurchführung ist Kapitel 3.3.4.6 zu entnehmen.

**Statistische Analyse:** Das arithmetische Mittel der Keimzahl (KBE) pro g Gewebe bzw. pro ml Urin der Bakterienstämme wurde mithilfe des Student's *t* test verglichen. Entsprach die Verteilung der Versuchswerte nicht der Gauß'schen Normalverteilung, wurde der verteilungsunabhängige Mann-Whitney *U* Test durchgeführt.

**Ergebnis des Vorversuches:** Im Vorversuch des Harnwegsinfektionsmodells wurden der Stamm U3366 und dessen Mutante U3366 *irp1* eingesetzt. Es sollte das Virulenzverhalten beider Stämme verglichen und im Falle signifikanter Unterschiede anschließend der Hauptversuch unter Einsatz der Rekomentanten U3366 *irp1* rec durchgeführt werden. Aufgrund der geringen Urinmenge wurde hier auf eine Darstellung der Keimzahl pro ml Urin verzichtet. In Abb. 30 ist die Keimzahl (KBE) pro g Gewebe und die Anzahl neutrophiler Granulozyten pro ml Urin beider Stämme dargestellt. Ein deutlicher Unterschied war bei der Keimlast in Niere und Blase zu erkennen. Während beim Ausgangsstamm U3366 in der Blase die Keimzahl (KBE) von  $10^6$ - $10^7$  (Tag 1) auf  $10^7$ - $10^8$  am Tag 3 und 7 anstieg, sankt die Keimlast der Mutanten U3366 *irp1* von  $10^5$  am Tag 1 auf den Wert von  $10^4$  pro g Blasengewebe. Am Tag 7 war in der Blase ein statistisch signifikanter Unterschied der Keimzahl beider Stämme von ca. 3 Logstufen nachweisbar. In der Niere war die Keimlast insgesamt etwas geringer, jedoch waren die Ergebnisse analog zu denen in der Blase. Der Ausgangs-Stamm U3366 ließ sich mit einer Keimzahl von  $10^4$ - $10^5$  am Tag 1 und mit einem Wert von  $10^5$ - $10^6$  am Tag 3 und 7 rückisolieren, während die Keimzahl der Mutanten *irp1* von  $10^4$  KBE/g Niere auf  $10^2$ - $10^3$  am Tag 7 kontinuierlich sank. Statistisch signifikante Unterschiede ( $P < 0,05$ ) waren am Tag 3 und 7 bei einer Differenz von 2-3 Logstufen nachweisbar. Der Stamm U3366 zeigte durch seine intakte HPI insbesondere im längeren Infektionsverlauf einen Infektionsvorteil in Niere und Blase und etablierte sich mit einer wesentlich höheren Keimzahl über einen längeren Zeitraum im Harntrakt. Betrachtet man die Granulozytenverteilung pro ml Urin waren keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. Die Anzahl der Granulozyten betrug über den gesamten Beobachtungszeitraum  $10^5$ - $10^6$  Zellen pro ml.

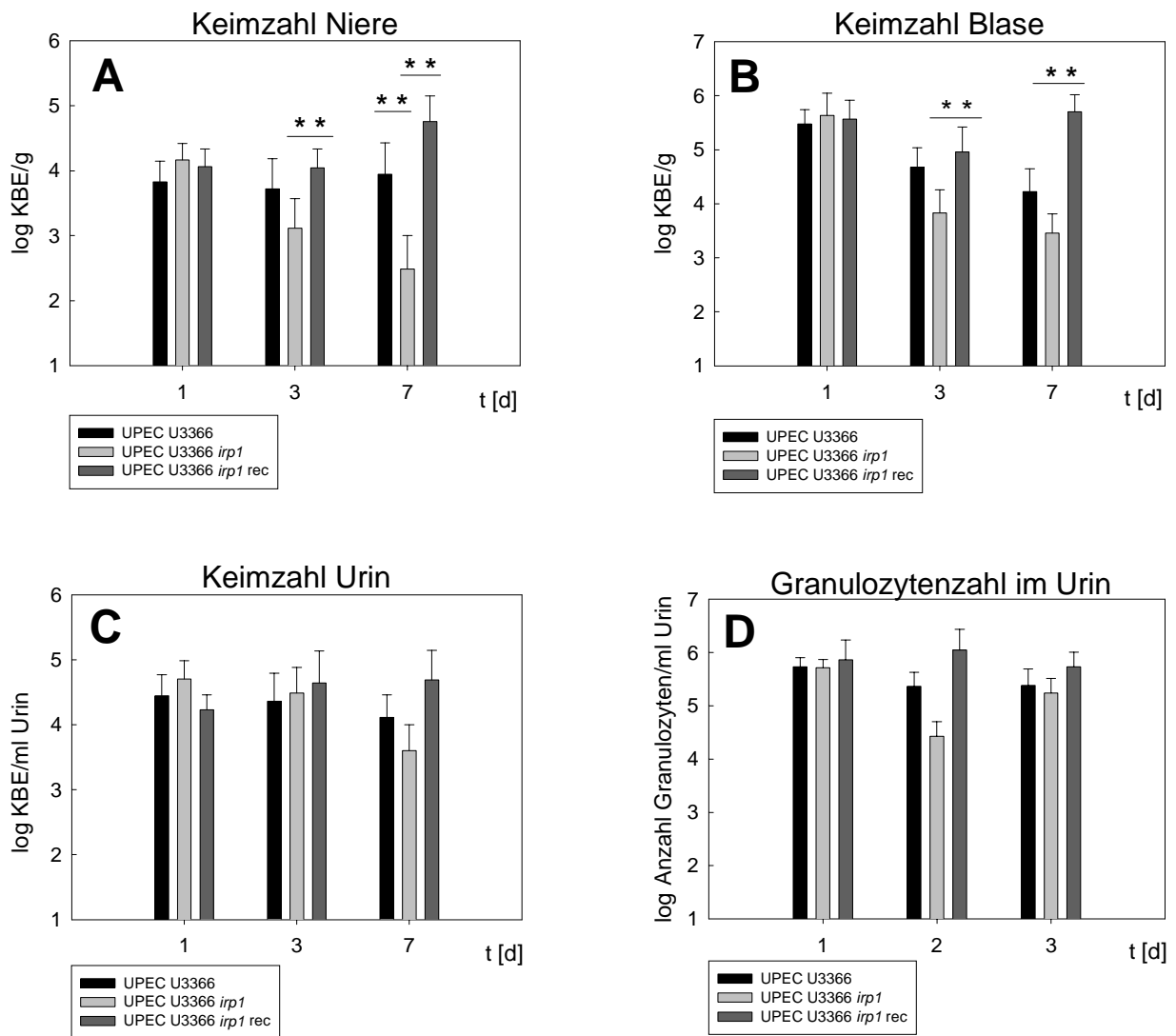
Der Vorversuch diente zunächst der Etablierung der Methodik und zeigte bereits signifikante Effekte im Virulenzverhalten zwischen dem Ausgangsstamm U3366 und der *irp1*-Mutanten. Im folgenden Hauptversuch wurden zum einen zusätzliche Keimzahluntersuchungen im Urin durchgeführt, zum anderen sollte ergänzend die Rekomentante U3366 *irp1* rec eingesetzt werden. Da die im Vorversuch nachgewiesenen Effekte auf klonierungsbedingten Mutationen anderer relevanter Genomloci beruhen könnten, sollte die Rekomentante den Einfluss der HPI-kodierten Proteine auf das Infektionsgeschehen bestätigen.



**Abbildung 30: Keimlast infizierter C3H/HeN-Mäuse mit UPEC Stamm U3366 und der isogenen Mutanten U3366 *irp1*.** 30 weiblichen C3H/HeN Mäusen wurden transurethral 10 µl U3366 oder U3366 *irp1* ( $10^7$  KBE) appliziert und am Tag 1, 3 und 7 Blase und Niere entnommen, homogenisiert und die Keimzahl pro g Gewebe bestimmt (A, B). Gleichzeitig wurde der Urin gewonnen und mit Hilfe der Neubauer Zählkammer der Gehalt neutrophiler Granulozyten pro ml Urin bestimmt (C). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen am jeweiligen Versuchstag. \*\* $P < 0,05$

**Ergebnis des Hauptversuches:** Der Hauptversuch wurde analog zum oben beschriebenen Vorversuch durchgeführt, jedoch wurde ergänzend die Rekomentante U3366 *irp1* rec eingesetzt und eine Keimzahlbestimmung im Urin durchgeführt. Die in Abb. 31 dargestellten Ergebnisse des Hauptversuches bestätigten die im Vorversuch festgestellten Effekte: In der Niere etablierten sich die Stämme U3366 und die Rekomentante im Versuchsverlauf in einer Keimzahl von  $10^4$ - $10^5$  KBE pro Gramm Gewebe, während die Keimzahl der Mutanten *irp1* von einem Ausgangswert von  $10^4$  KBE/g am Tag 1 auf den Wert von  $10^2$ - $10^3$  am Tag 7 absank. Es ergaben sich dabei in der Niere am Tag 7 signifikante Unterschiede zwischen dem Ausgangsstamm U3366 und der Mutante *irp1*, sowie zwischen der Mutante *irp1* und der

Rekomplementante am Tag 3 und 7. Auch in der Blase nahm die Keimlast der *irp1*-Mutante von  $10^5$ - $10^6$  am Tag 1 auf  $10^3$ - $10^4$  KBE/g am Tag 7 kontinuierlich ab. Die Keimzahl des Stammes U3366 sank ebenfalls innerhalb des Beobachtungszeitraumes, allerdings zeigte sie am Tag 3 und 7 höhere Werte (1 Logstufe) als die isogene *irp1*-Mutante. Die Rekomplementante etablierte sich hingegen in der Blase mit einer Keimzahl von  $10^5$ - $10^6$  KBE/g Blase. So sind an den Tagen 3 und 7 signifikante Unterschiede der Keimzahl zwischen Rekomplementante und *irp1*-Mutante in der Blase nachweisbar. Eine deutlichere Etablierung des Stammes U3366 in der Niere als in der Blase ist möglicherweise auf die Herkunft des U3366-Stammes (Nierenbeckenisolat) zurückzuführen. Interessanterweise sind innerhalb der drei Stämme keine Unterschiede hinsichtlich der Keimzahl im Urin (KBE/ml Urin) sowie der Granulozytenzahl pro ml Urin zu beobachten. Die Keimlast im Urin betrug über den gesamten Beobachtungszeitraum  $10^4$ - $10^5$  KBE/ml, wobei die Keimzahl der *irp1*-Mutante am Tag 7 geringfügig absank. Die Anzahl der Granulozyten zeigte wie in dem Vorversuch einen konstanten Wert von  $10^5$ - $10^6$  Zellen pro ml Urin. Der Hauptversuch wurde zur Bestätigung der Ergebnisse analog wiederholt. Bei den Wiederholungsversuchen konnten signifikante Unterschiede in der Keimzahl der Blase zwischen U3366 und der Mutante U3366 *irp1* am Tag 1 und 3 nachgewiesen werden. Die Rekomplementante zeigte in beiden Hauptversuchen analoge Keimzahlen zu dem Ausgangs-Stamm U3366 und damit signifikante Unterschiede zu der *irp1*-Mutanten. Die Ergebnisse stellten die Bedeutung der HPI für das Virulenzverhalten des UPEC-Stammes dar und konnten den Einfluss möglicher Genomveränderungen durch klonierungsbedingte Mutationen anderer Genomloci auf die Urovirulenz ausschließen.

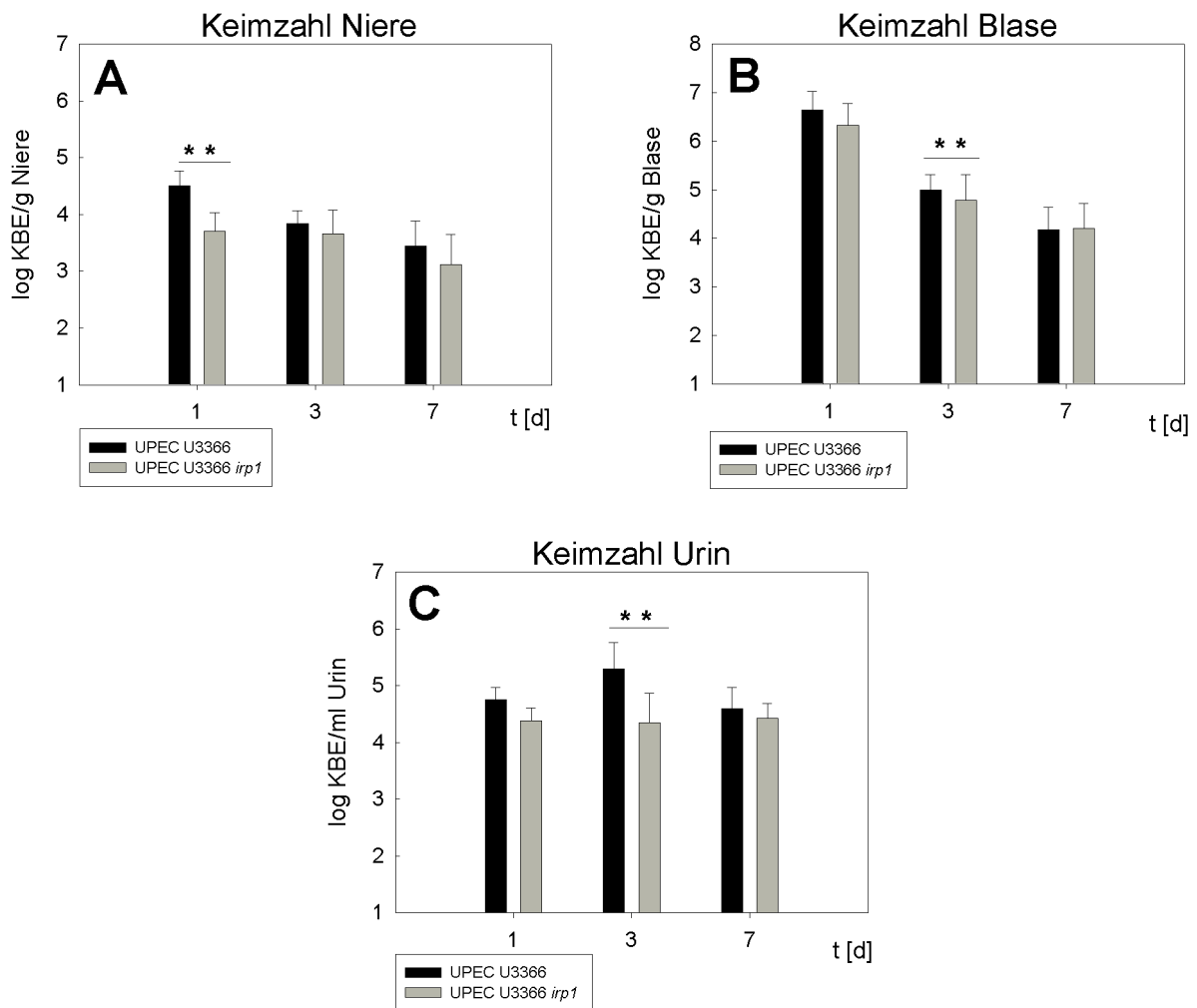


**Abbildung 31: Keimlast nach Infektion von C3H/HeN Mäusen mit UPEC Stamm U3366, dessen Mutante U3366 *irp1* und der Rekomentante U3366 *irp1* rec.** 30 weiblichen C3H/HeN Mäusen wurden transurethral 20 µl U3366, U3366 *irp1* oder U3366 *irp1* rec ( $10^7$  KBE) appliziert und am Tag 1, 3 und 7 Blase und Niere entnommen, homogenisiert und die Keimzahl pro g Gewebe bestimmt (A, B). Gleichzeitig wurde der Urin gewonnen, die Keimzahl pro ml Urin bestimmt (C) und mithilfe der Neubauer Zählkammer der Gehalt neutrophiler Granulozyten pro ml Urin festgestellt (D). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen am jeweiligen Versuchstag. \*\*P<0,05

#### 4.2.9 Koinfektionsversuch

Ergänzend zu den Einzelinfektionsversuchen wurden im Folgenden Koinfektionen durchgeführt, um eine gegenseitige Beeinflussung von Ausgangsstamm und Mutante *in vivo* zu untersuchen. Hierzu wurden der UPEC Stamm U3366 mit der Mutante U3366 *irp1* sowie die Rekomentante U3366 *irp1* rec mit U3366 *irp1* simultan appliziert und der Versuch wie unter 3.3.4.7 beschrieben durchgeführt. Das Keimgemisch wurde im Verhältnis 1:1 hergestellt und 30 C3H/HeN-Mäusen intraurethral appliziert. An den Tagen 1, 3 und 7

wurden Blase und Niere entnommen und wie unter 3.3.4.6 aufgeführt die Keimzahl pro g Gewebe bzw. pro ml Urin bestimmt (Abb. 32). Die Identifizierung einzelner Stämme erfolgte über Selektion entsprechender Antibiotikaplatten. Es wurden hierfür Chloramphenicol- und Kanamycin-Agarplatten eingesetzt, wobei alle drei Stämme eine Chloramphenicol-Resistenz aufweisen, jedoch nur die Mutante auf Kanamycinplatten wächst. Die Differenz der Keimzahl (KBE) der Chloramphenicolplatten und der Keimzahl der Kanamycinplatten ergab die Keimzahl des Stammes U3366 bzw. der Rekomentante U3366 *irp1* rec.

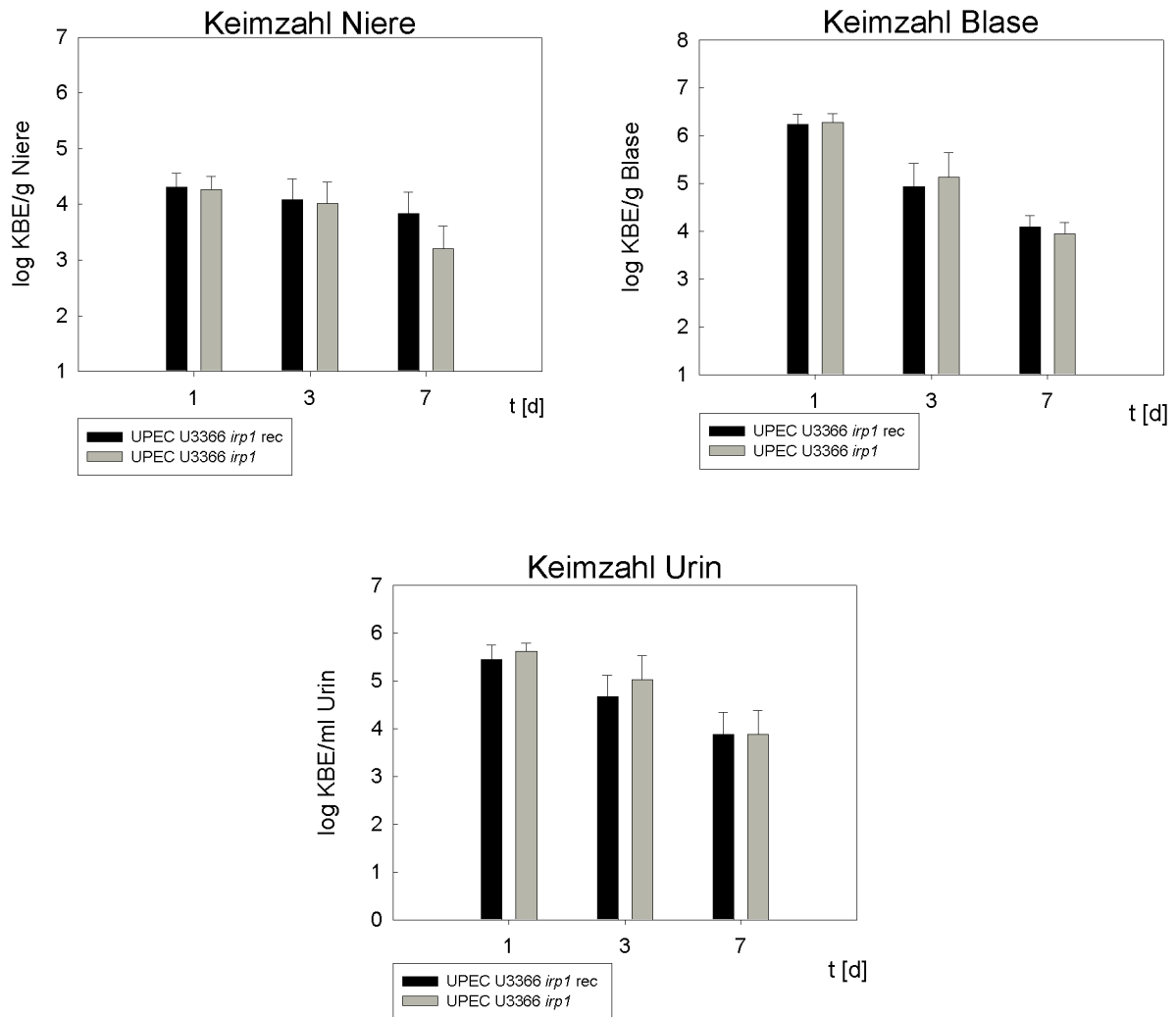


**Abbildung 32: Koinfektionsversuch U3366/U3366 *irp1*.** Keimlast nach Infektion mit UPEC Stamm U3366 und der Mutante U3366 *irp1*. 30 weiblichen C<sub>3</sub>H/HeN-Mäusen wurden transurethral je 10 µl U3366 und U3366 *irp1* (10<sup>7</sup> KBE) appliziert, am Tag 1, 3 und 7 Blase und Niere entnommen, homogenisiert und die Keimzahl KBE pro g Gewebe bestimmt (A, B). Gleichzeitig wurde der Urin gewonnen und die Keimzahl pro ml Urin bestimmt (C). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen am jeweiligen Versuchstag. \*\*P<0,05

**Ergebnis des Koinfektionsversuches:** Innerhalb des Beobachtungszeitraumes sank die Keimzahl der Stämme U3366 und der *irp1*-Mutante in Niere und Blase in gleicher Weise.



Während ein signifikanter Unterschied in der Niere am Tag 1 berechnet wurde, ist ein entsprechend signifikanter Unterschied bei der Keimzahl am Tag 3 und 7 nicht zu beobachten. Auch in der Harnblase sind vergleichbare Keimzahlwerte an den Versuchstagen nachgewiesen worden. So sank die Keimzahl/g Blase bei beiden Stämmen von  $10^6$  KBE am Tag 1 auf  $10^4$  KBE am Tag 7. Am Tag 3 zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied in der Keimlast. Die Keimzahl beider Stämme im Urin lag während des Beobachtungszeitraums bei einem Wert von  $10^4$ - $10^5$  KBE/ml Urin, wobei am Tag 3 auch hier ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden konnte. Die Ergebnisse zeigten im Gegensatz zu den Einzelinfektionsversuchen keinen signifikanten Vorteil im Infektionsverhalten des Stammes U3366 gegenüber der *irp1*-Mutanten am Ende des Infektionsversuches auf. Unterschiede waren in der Frühphase der Koinfektion sichtbar, so dass eine gegenseitige Beeinflussung der Stämme in Form einer Yersiniabaktin-Fütterung erst zu einem späteren Zeitpunkt möglich zu sein scheint. Der Koinfektionsversuch wurde zur Bestätigung mit der Rekomplementanten U3366 *irp1* rec und der Mutanten *irp1* wiederholt. Die Ergebnisse sind in Abb. 33 dargestellt und zeigten durch eine gleichmäßige Abnahme der Keimzahl in Niere und Blase über den Beobachtungszeitraum ein ähnliches Infektionsverhalten beider Stämme. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.



**Abbildung 33: Koinfektionsversuch U3366 *irp1* rec/U3366 *irp1*.** Keimlast nach Infektion mit UPEC Stamm U3366 *irp1* rec und der Mutante U3366 *irp1*. 30 weiblichen C3H/HeN-Mäusen wurden transurethral je 10  $\mu$ l U3366 *irp1* rec und U3366 *irp1* ( $10^7$  KBE) appliziert, am Tag 1, 3 und 7 Blase und Niere entnommen, homogenisiert und die Keimzahl pro g Gewebe bestimmt (A, B). Gleichzeitig wurde der Urin gewonnen und die Keimzahl pro ml Urin bestimmt (C). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen am jeweiligen Versuchstag. \*\*P<0,05

**Zusammenfassung der Ergebnisse des Harntraktinfektionsversuches:** Der Vorversuch und die Hauptversuche des Einzelinfektionsmodells ergaben einen signifikanten Infektionsvorteil des UPEC Stammes U3366 gegenüber der Mutanten U3366 *irp1*. Die Versuche wurden durch den Einsatz der Rekomentanten U3366 *irp1* rec bestätigt. Aufgrund des analogen Infektionsverlaufes des Ausgangsstammes U3366 und der Rekomentanten, konnte der Einfluss einer intakten HPI auf das Infektionsverhalten gezeigt und klonierungsbedingte Mutationen anderer Genloci bei der *irp1*-Mutantenherstellung ausgeschlossen werden. Der UPEC Stamm U3366 sowie die Rekomentante U3366 *irp1* rec konnten sich über einen längeren Zeitraum im Harntrakt

etablieren, während die Keimzahl der *irp1*-Mutante in Blase und Niere innerhalb des Beobachtungszeitraumes kontinuierlich sank und somit Unterschiede im späteren Infektionsverlauf festzustellen waren. Die Aufnahme von Yersiniabaktin ist offenbar für eine längere Überlebensdauer des uropathogenen Stammes *in vivo* essentiell. Interessanterweise war bei beiden Stämmen ein gleicher Granulozytenstatus nachweisbar.

Die Koinfektionsversuche mit dem Stamm U3366 und der isogenen *irp1*-Mutante gaben neben signifikanten Keimzahlunterschieden in Niere und Blase zu Beginn der Infektion Hinweise auf eine gegenseitige Beeinflussung der entsprechenden Stämme im späteren Infektionsverlauf. Denkbar ist hier eine Yersiniabaktinfütterung zwischen beiden Stämmen, was auf eine *in vivo*-Expression HPI-kodierter Proteine deutet.

## 5 Diskussion

### 5.1 Darmkolonisierung mit *E. coli* Stamm Nissle 1917, Mutaflor®

Der *E. coli* Stamm Nissle 1917 (Mutaflor®) stellt einen apathogenen Vertreter der Darmflora dar und wird bei unterschiedlichen akuten und chronischen Darmerkrankungen therapeutisch eingesetzt (Kruis *et al.*, 2001, Rembacken *et al.*, 1999, Malchow, 1997, Möllenbrink & Bruckschen, 1994). Trotz einer genauen Stammtypisierung konnte bisher die Wirkungsweise sowie die Ursache für seine besondere Konkurrenzfähigkeit gegenüber der übrigen Flora nicht geklärt werden (Ölschläger *et al.*, 2001). Der Stamm verfügt über keinerlei typische Pathogenitätsfaktoren, was eine Grundvoraussetzung für den Einsatz als Therapeutikum darstellt. Interessanterweise konnte die bei *Yersinien* maßgeblich für die Virulenzausprägung verantwortliche HPI ("High-Pathogenicity Island") (Almeida *et al.*, 1993, Heesemann, 1987) bei *E. coli* Stamm Mutaflor® nachgewiesen werden (Schubert *et al.*, 1999). Die weite Verbreitung der HPI bei unterschiedlichen Spezies der Familie *Enterobacteriaceae* lässt auf eine Übertragung via horizontalen Transfer schließen (Schubert *et al.*, 2000). Während Mutationen der HPI bei *Yersinien* zu einem deutlichen Virulenzabfall des entsprechenden Stammes führen, ist die Bedeutung der Pathogenitätsinsel für den apathogenen *E. coli* Stamm Mutaflor® ungeklärt.

Die essentielle Bedeutung von Eisen für unterschiedliche biochemische Reaktionen bei Prokaryoten erklärt die Notwendigkeit für Bakterien, Eisenaufnahmesysteme zu besitzen (Neilands, 1981). Eisen ist unter anaeroben Bedingungen im Darm in Form freier  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Ionen für Bakterien gut verfügbar. In sauerstoffreicher und pH-neutraler Umgebung liegt Eisen dagegen in Form schwerlöslicher dreiwertiger  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Komplexe vor. Die gut durchblutete Darmwand bewirkt einen Sauerstoffgradienten zwischen Darmlumen und Darmwand, so dass die Verfügbarkeit freier Eisenionen vermutlich zur Darmwand hin abnimmt. *E. coli* Stamm Mutaflor® besitzt neben dem HPI-kodierten Yersiniabaktin-Aufnahmesystem weitere Eisenaufnahmesysteme: Aerobaktin, Enterobaktin, Salmochelin, Colibaktin, ein Hämin- und

ein Citrat-abhängiges Eisenaquisitionssystem (Heesemann, 2001, Hantke *et al.*, 2003). Die Existenz des zusätzlichen HPI-kodierten Siderophors lässt unterschiedliche Affinitäten der Eisenaufnahmesysteme bei verschiedenen Eisenmangelbedingungen vermuten. Somit könnten im Darmlumen andere Eisenaufnahmesysteme aktiviert sein als in der Mukosa oder in der Darmwand.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung der *Yersinia*-HPI für die Kolonisierungsfähigkeit des darmkommensalen *E. coli* Stamm Mutaflor<sup>®</sup> darzustellen. Hierzu wurde im Mausmodell die Fähigkeit der Darmkolonisierung des *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> Stammes im Vergleich zu isogenen Mutanten der Yersiniabaktin-Synthese (Mutaflor<sup>®</sup> *irp1*) und der Yersiniabaktin-Aufnahme (Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA*) untersucht.

Da die Selektion der Stämme über ihr Resistenzverhalten durchgeführt werden sollte, wurde vor Einsatz im Tierversuch eine spontane Resistenzbildung der natürlichen Darmflora nach oraler Zugabe der *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup>-Stämme untersucht und ausgeschlossen. Eine weitere Voraussetzung für den Einsatz im Tierversuch war die Erstellung stabiler Mutanten, die in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe Schubert hergestellt werden konnten. Um eine Yersiniabaktinproduktion von *E. coli* der natürlichen Darmflora ausschließen zu können, wurden 8 gramnegative, lactosepositive Keime aus dem Mäusedarm isoliert und mithilfe entsprechender PCRs auf Existenz der HPI-Gene *fyuA* und *irp1* untersucht. Bei allen untersuchten Keimen konnte der Nachweis beider HPI-Gene erbracht werden. Allerdings ist damit lediglich der Nachweis einzelner Gene, nicht aber der gesamten HPI gegeben, auch kann mit der PCR keine Aussage über die Aktivität der Gene getroffen werden. Es ist jedoch bekannt, dass 80 % darmkommensaler *E. coli* eine HPI-Aktivität zeigen (Schubert, unveröffentlicht). Die Möglichkeit einer HPI-Expression der natürlichen Darmflora muß daher bei der Bewertung der Versuche berücksichtigt werden.

Die Vorversuche des Darmkolonisierungsmodells wurden als Kokolonisierungsversuche durchgeführt. Durch orale Koapplikation einer äquivalenten Konzentration des *E. coli* Stammes Mutaflor<sup>®</sup> und der entsprechenden isogenen Mutante konnte zum einen ein direkter Vergleich der Keimzahl der jeweiligen Stämme in ein und demselben Organismus, zum anderen ein evtl. unterschiedliches Kolonisierungsverhalten der *irp1*- und *fyuA*-Mutanten untersucht werden. Die *irp1*-Mutante kann im Gegensatz zu der *fyuA*- Mutanten kein Yersiniabaktin produzieren, ist jedoch unter Umständen in der Lage Yersiniabaktin anderer Bakterien über den Eisenaufnahmerezeptor aufzunehmen. Die *fyuA*-Mutante hingegen kann aufgrund des mutierten Eisenaufnahmerezeptors keine Yersiniabaktin-Siderophore aufnehmen (Rakin *et al.*, 1994, Pelludat *et al.*, 1998). Eine eventuelle Yersiniabaktinfütterung der *irp1*-Mutante von Seiten des HPI-intakten Mutaflor<sup>®</sup>-Stammes ist also denkbar. Wie von

mehreren Arbeitsgruppen bereits beschrieben, können Bakterien auch exogene Siderophore anderer Bakterien nutzen, wenn sie über die entsprechenden Rezeptoren verfügen (Leong & Neilands, 1976, Raymond & Carrano, 1979, Neilands, 1981, Hantke, 1983). Die Bestimmung der Keimzahl pro ml Darminhalt wurde an den Tagen 3, 7 und 14 durchgeführt, wobei die Versuche zur Bestätigung 3 x wiederholt wurden und ein eindeutiges Ergebnis erbrachten: Während die *irp1*-Mutante über den Beobachtungszeitraum eine nahezu gleiche Persistenz im Darm wie der Ausgangsstamm *E. coli* Stamm Mutaflor<sup>®</sup> zeigte, konnte eine signifikant höhere Kolonisierungsbereitschaft von *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> gegenüber der *fyuA*-Mutanten nachgewiesen werden. Aufgrund der höheren Keimzahl der *irp1*-Mutanten gegenüber der *fyuA*-Mutanten ist eine Yersiniabaktinfütterung zwischen Mutaflor<sup>®</sup> und Mutaflor<sup>®</sup> *irp1* denkbar. So könnte die *irp1*-Mutante im Gegensatz zu der *fyuA*-Mutante in der Lage sein, Yersiniabaktin von *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> über den intakten FyuA-Eisenaufnahmerezeptor aufzunehmen. Dies setzt voraus, dass Mutaflor<sup>®</sup> *in vivo* tatsächlich HPI-kodierte Proteine exprimiert. Auch eine Fütterung der *irp1*-Mutante durch HPI-positive Keime der natürlichen Darmflora ist dabei nicht ausgeschlossen. Nachdem ein Kolonisierungsunterschied zwischen dem Ausgangsstamm *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> und der *fyuA*-Mutanten festgestellt wurde, sollte anschließend durch Einsatz einer rekomplementierten *fyuA*-Mutante die Frage geklärt werden, ob die Kolonisierungsunterschiede Folge des mutierten *fyuA*-Gens oder "Klonierungsprobleme" hierfür ausschlaggebend waren. So sind bei der Erstellung der Mutanten klonierungsbedingte Veränderungen anderer Genloci nicht auszuschließen, die einen eventuellen Einfluss auf die Kolonisierungsfähigkeit ausüben können. Die in dieser Arbeit erstellte Rekomentante wurde im Kokolonisierungsversuch mit der *fyuA*-Mutante und zur Kontrolle mit dem Ausgangsstamm *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> eingesetzt und das Kolonisierungsverhalten beobachtet. Es stellte sich heraus, dass die Rekomentante *fyuA* rec und *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> nahezu identisches Kolonisierungsverhalten zeigten, während ein signifikanter Unterschied zwischen Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* rec und der *fyuA*-Mutanten nachweisbar war. Damit konnte eine gelungenen Rekomentierungen des Stammes *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* gezeigt und unerwünschte Genomveränderungen bei der Mutantenherstellung ausgeschlossen werden. Die Mutation des *fyuA*-Gens ist somit alleinig für die beobachteten Kolonisierungsunterschiede ausschlaggebend. FyuA spielt offenbar eine essentielle Rolle für die Etablierung des Stammes im Darm. Um die Ergebnisse zu bestätigen und eine genaue Lokalisation der *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup>-Stämme im Darm festzustellen, wurde im Hauptversuch nicht nur der Darminhalt beurteilt, sondern eine differenzierte Untersuchung von Darminhalt, -wand und adhärennten Zellen in Dün- und Dickdarm vorgenommen. Hiermit sollte ein eventueller Zusammenhang zwischen der lokalen Wirkungsweise von Mutaflor<sup>®</sup> und der

Eisenversorgung im Darm untersucht werden. Es wurden orale Einzelkolonisierungsversuche durchgeführt, um eine gegenseitige Beeinflussung der Stämme zu vermeiden. Um die von Tier zu Tier auftretenden individuellen Schwankungen der oral aufgenommenen Bakterienmenge zu minimieren, wurde die Gruppengröße erhöht und die Applikation an drei aufeinanderfolgenden Tagen vorgenommen, so dass eine Aufnahme von mindestens  $10^7$  KBE gewährleistet war. Die Einzelkolonisierungsversuche mit den *E. coli* Stämmen Mutaflor<sup>®</sup>, Mutaflor<sup>®</sup> *irp1*, Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* und Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA rec* zeigten signifikante Unterschiede im Kolonisierungsverhalten und bestätigten die Vorversuche. Signifikante Differenzen konnten auch hier zwischen der *fyuA*-Mutante und *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> sowie der Rekomentante *fyuA rec* nachgewiesen werden. Besonders ausgeprägt zeigten sich die Unterschiede im Bereich der adhärennten Zellen in Dünn- und Dickdarm. Die Ergebnisse gaben den Hinweis auf einen eventuellen Einfluss des FyuA-Rezeptors auf die adhäsiven Eigenschaften des *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup>-Stammes. Offen blieb allerdings die Frage, ob der Rezeptor direkt Adhärenzeigenschaften vermittelt, oder eher ein indirekter Mechanismus über Regulation anderer Adhärenzfaktoren, z.B. über das YbtA-Regulatorprotein, eine Rolle spielt. YbtA, ein Positivregulator der *fyuA*- und *irp1*-Biosynthese, bildet nach Aufnahme von Yersiniabaktin ins Cytosol mit diesem ein Komplex und aktiviert so die entsprechenden Promotoren (Fetherston *et al.*, 1996). Denkbar wäre eine gleichzeitige Aktivierung bisher unbekannter Promotoren oder Repressoren, die Einfluss auf die Adhärenzfähigkeit des Mutaflor<sup>®</sup>-Stammes haben. Die Bedeutung der HPI für die Adhärenzfähigkeit von Mutaflor<sup>®</sup> steht im Einklang mit der Verfügbarkeit freier Eisenionen im Darm. So wird aufgrund des Sauerstoffgradienten zwischen Darmlumen und Darmwand die Eisenversorgung der Bakterien im aeroben Bereich schwieriger, was die Produktion eines zusätzlichen hochaffinen Eisenaufnahmesystems notwendig macht (Braun *et al.*, 1998, Byers & Arceneaux, 1998, Guerinot, 1994, Mietzner & Morse, 1994). Das eisenärmere Milieu der mukosalen Bereiche könnte als Indikator die Produktion des Siderophors und des Rezeptors FyuA bewirken, der wiederum Einfluss auf die Adhärenzfähigkeit ausübt und dem Stamm eine bessere Kolonisierung ermöglicht.

Während signifikante Keimzahlunterschiede bei den adhärennten Zellen beobachtet wurden, zeigten sich weniger große Unterschiede in der Darmwand. Dies erscheint zunächst widersprüchlich, hier muß jedoch die unterschiedliche Präparationsweise der Proben beachtet werden. Für die Keimzahlbestimmung der Darmwand wurde ein inhaltsreicher Darmabschnitt gespült und Inhalt sowie Darmwand zur Auszählung der Keimzahl verwendet. Adhärennte Zellen wurden dagegen aus einem inhaltsarmen bzw. -freien Darmabschnitt nach zusätzlicher PBS-Spülung mit einem Objektträger von der Darmwand geschabt. Die Keimzahl in der

Darmwand sollte somit nicht mit der Keimzahl der adhärenenten Zellen verglichen, sondern jeweils innerhalb der eigenen Versuchsreihe betrachtet werden.

Die bessere Persistenz der *irp1*-Mutante im Vergleich zur *fyuA*-Mutante kann durch eine eventuelle Yersiniabaktinfütterung anderer Darmkommensalen erklärt werden. Die Kolonisierungsunterschiede waren im Hauptversuch deutlicher als bei den Kokolonisierungsversuchen. Dies liegt offenbar daran, dass im Gegensatz zum Kokolonisierungsversuch der Donorstamm für Yersiniabaktin (*E. coli* Stamm Mutaflor®) nicht in unmittelbarer Nähe und in hoher Konzentration vorliegt.

Die im Vergleich zum *E. coli* Mutaflor® niedrigere Kolonisierungsfähigkeit der *irp1*-Mutanten ist durch eine reduzierte FyuA-Expression durch Inaktivierung von *irp*-Genen zu erklären. Die Reduktion der FyuA-Produktion infolge der *irp1*-Inaktivierung zeigt die Autoregulation des Yersiniabaktin-Operons über das YbtA-gebundene Siderophor (Pelludat, 1998).

Zusammenfassend wird durch die Mono- und Kokolonisierung des Mäusedarms die Bedeutung eines intakten HPI-Genclusters für die Kolonisierungsfähigkeit des *E. coli* Stammes Mutaflor® deutlich. Die Yersinia-HPI nimmt aufgrund der kolonisierungsfördernden Eigenschaften und dem damit verbundenen Vorteil für Replikation und Überleben bei *E. coli* Mutaflor® die Rolle einer Fitnessinsel ein (Hacker & Carniel, 2001).

Um den Einfluss des *fyuA*-Gens auf die Adhärenzfähigkeit genauer zu überprüfen, sind weiterführende Untersuchungen der direkten oder indirekten Wirkung des FyuA-Rezeptors interessant. Folgender *in vitro* Versuch wäre hier denkbar: In einen apathogenen Stamm (*E. coli* DH5α) wird ein *fyuA*-tragendes Plasmid transformiert, dessen Gen nachweislich exprimiert wird. Der Bakterienstamm wird anschließend in den Gentamycin-Kill-Assay gebracht, mit Hilfe dessen adhärenente Zellen qualitativ und quantitativ bestimmt werden können (Mulvey *et al.*, 2001). Somit könnte der Nachweis des direkten Einflusses des FyuA-Rezeptors erbracht oder widerlegt werden. Um die Lokalisation von *E. coli* Stamm Mutaflor® im Darm neben der schon erbrachten differenzierten Keimzahlbestimmung optisch darzustellen und gleichzeitig die Expression HPI-kodierter Gene *in vivo* zu untersuchen, könnte eine histologische Darstellung von Gfp- oder DsRed-markiertem *E. coli* Mutaflor® im Darm erfolgen (Hui Zhao *et al.*, 1998). Die Reportergene könnten in Verbindung mit konstitutiven (*plac*) oder induzierbaren (*pfyuA*) Promotoren gebracht werden. Voraussetzung hierbei wären stabile, vom *E. coli* Mutaflor® Stamm akzeptierte, Plasmide. Ein weiterer Hinweis exprimierter Proteine könnte über den Nachweis einer Antikörperantwort auf HPI-kodierte Proteine mittels Immunoblot erbracht werden.



## 5.2 Harnwegsinfektionsmodell mit UPEC Stamm U3366

Extraintestinale pathogene *E. coli* (ExPEC) spielen als Erreger von Harnwegsinfekten bei Mensch und Tier eine entscheidende Rolle (Beutin, 1999, Johnson & Stamm, 1989, Ling, 1995, Wooley & Blue, 1976). Uropathogene *E. coli* stellen mit 70-95 % den Hauptverursacher aller Harnwegserkrankungen dar (Mulvey, 2002) und sind zudem Erreger in 40 % aller katheterassoziierten nosokomialen Infektionen (Stamm, 1999). In der Humanmedizin geht man von weltweit 150 Mio. Harnwegsinfekten jährlich aus, was einen Kostenaufwand von über 6 Mrd. Dollar verursacht (Harding & Ronald, 1994). Die wirtschaftlichen Verluste extraintestinaler *E. coli*-Infektionen beim Tier sind bekannt (Dozois *et al.*, 2003, Brown & Curtiss, 1996, Bertschinger *et al.*, 1997, Rolle & Mayr, 2002). Vergleicht man die Virulenzfaktoren extraintestinaler *E. coli* bei Mensch und Tier konnten bereits von mehreren Arbeitsgruppen Gemeinsamkeiten festgestellt werden (Johnson *et al.*, 2000, Johnson *et al.*, 2001, Low *et al.*, 1988, Westerlund *et al.*, 1987). Das *fyuA*-Gen der *Yersinia*-"High-Pathogenicity Island" konnte hierbei bei unterschiedlichen extraintestinalen Erregern nachgewiesen werden (Johnson *et al.*, 2000, Bingen-Bidois *et al.*, 2002, Janben *et al.*, 2001). Unter 29 Virulenzfaktoren, die von Johnson & Stell (2000) bei 75 UPEC-Isolaten differenziert wurden, konnte interessanterweise das *fyuA*-Gen als häufigster Virulenzfaktor (93 %) charakterisiert werden. Bekanntere klassische Virulenzfaktoren wie *sfaS*, *focG*, *afa/dra*, *cnf1*, *ibeA* waren dagegen mit einer Häufigkeit von unter 20 % deutlich seltener vertreten.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung der *Yersinia*-HPI für das Infektionsverhalten uropathogener *E. coli* untersucht werden. Die weite Verbreitung des *fyuA-irp* Genclusters bei human- und tiermedizinisch relevanten uropathogenen und extraintestinalen *E. coli* (Bingen-Bidois *et al.*, 2002, Janben *et al.*, 2001, Johnson *et al.*, 2000, Mulvey, 2002) deutet auf einen virulenzprägenden Einfluss der *Yersinia*-HPI hin (Almeida *et al.*, 1993, Heesemann, 1987). Um die Bedeutung des HPI-Genclusters zu untersuchen, wurde im Harnwegsinfektionsmodell der Maus das Infektionsverhalten des HPI-positiven UPEC Stammes U3366 im Vergleich zu der isogenen *irp1*-Mutanten betrachtet. Zur Etablierung des Harnwegsinfektionsmodells mussten im Vorfeld bestimmte Parameter, wie der geeignete Bakterienstamm, Applikationsart und -menge, Art des Mäusestammes, Narkose und Versuchsdauer optimiert werden. Als Mäusestamm wurde der C3H/HeN-Stamm eingesetzt, bei dem Infektionsgrad und Entzündungsantwort miteinander korrelieren, so dass Infektionen innerhalb von 14 Tagen überwunden werden können (Hopkins *et al.*, 1998). Die im Rahmen der Vorversuche erstellten Applikationsbedingungen sollten den natürlichen Infektionsweg simulieren, so

wurde beispielsweise eine transurethrale Applikation der Keime mithilfe einer elektronischen Pipette durchgeführt. Die Pipette ergab den Vorteil einer langsamen Applikation, was aufgrund der geringen Druckausübung einen vesicoureteralen Reflux vermeiden sollte. Dabei wurden in Anbetracht der 50-100 µl großen Blase einer 8 Wochen alten Maus nicht mehr als 20 µl Keimsuspension eingesetzt (Johnson & Brown, 1996, Hopkins *et al.*, 1995). Die Applikation wurde im Vorfeld mithilfe applizierter Tinte an toten Mäusen getestet. Ein weiterer wichtiger Parameter war der einzusetzende UPEC-Stamm, der eine intakte HPI besitzen sollte. Da sich Cystitis- und Pyelonephritisstämme durch unterschiedliche Virulenzfaktoren auszeichnen und sie demnach ein unterschiedliches Infektionsverhalten in Niere und Blase zeigen (Johnson *et al.*, 1998), war ein Stamm bekannter Herkunft auszuwählen. Der in dieser Arbeit eingesetzte UPEC-Stamm U3366, der aus einem Nierenpunktat eines Pyelonephritispatienten isoliert wurde, zeigte  $\beta$ -Hämolyse und bewies in Vorversuchen im Vergleich zu dem Referenzstamm DH5 $\alpha$  hohes Virulenzpotential im Harntraktinfektionsversuch. Eine Stammtypisierung mittels Multiplex-PCR (Johnson & Stell, 2000) ergab den Nachweis der Virulenzfaktoren *fimH*, *afa/dra Bc* und einer PAI assoziierten DNA-Sequenz (Welch *et al.*, 2002). Viele kommensale und pathogene *E. coli* sowie andere Spezies der Familie *Enterobacteriaceae* besitzen Typ-1-Pili (*fimH*) (Mulvey *et al.*, 2001), die für Anheftung und Adhäsion verantwortlich sind und besonders bei Cystitis-Erregern eine Rolle für die Invasion des Blasenepithels spielen. In der Niere führen Typ-1-Pili allerdings nicht zu einer bakteriellen Adhärenz, die stattdessen durch P-Pili und Dr Adhäsine erreicht wird. Afa/Dr Adhäsine, die ein Invasin kodieren, kommen sowohl bei intestinalen als auch bei uropathogenen *E. coli* vor. 50 % aller *afa/dr* tragenden *E. coli* sind mit dem *irp2*-Gen assoziiert (Blanc-Potard *et al.*, 2002). Die nachgewiesene PAI-assozierte Gensequenz ist unbekannter Funktion, die Häufigkeit ihres Auftretens lässt allerdings virulenzassoziierte Eigenschaften vermuten (Johnson & Stell, 2000).

Der Hämolysin-Gen Nachweis per PCR verlief negativ, obgleich der Stamm auf Blutagar  $\beta$ -Hämolyse zeigte. Deletionen des entsprechenden Genbereiches oder aber die polymorphe Natur der Gene können hierbei zu einer falsch negativen PCR-Reaktion führen (Johnson & Stell, 2000).

Vor Einsatz in den Tierversuch wurden der UPEC Stamm U3366 sowie die in dieser Arbeit erstellte isogene Mutante U3366 *irp1* und die Rekomentante U3366 *irp1* rec hinsichtlich einer funktionalen HPI *in vitro* getestet. In zwei unterschiedlichen Testverfahren (Luciferase-Bioassay, Cross-feeding-Assay) sollte durch Kultivierung der Stämme in Urin die Produktion des HPI-vermittelten Siderophors Yersiniabaktin untersucht werden. Im Luciferase-Bioassay wurden neben Urin das eisenreiche LB-Medium sowie das eisenarme NBD-Medium

eingesetzt und nach 5-tägiger Inkubation der UPEC-Stämme die Luciferase-Messung durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eine Yersiniabaktinproduktion der HPI intakten Stämme U3366 und der Rekomentanten U3366 *irp1* rec im Unterschied zu der *irp1*-Mutanten. Dabei war eine Abhängigkeit der Yersiniabaktinproduktion von der Eisenkonzentration des Anreicherungsmediums *in vitro* festzustellen. So zeigte die Luciferase-Messung nach Anreicherung in dem eisenreichen LB-Medium bei allen Stämmen mit dem Nullwert vergleichbare Werte. In den eisenärmeren Medien NBD und Urin dagegen waren hohe Luciferaseaktivitäten, besonders im NBD-Medium nachzuweisen. Durch die eisenarme Umgebung wird die Repressortätigkeit des Fur-Regulatorproteins aufgehoben und die Synthese HPI-regulierter Gene induziert (Crosa, 1997). Erstaunlicherweise wies die *irp1*-Mutante im sehr eisenarmen NBD-Medium erhöhte Werte auf. Möglich ist hier eine gemessene Restaktivität des *fyuA*-Promotors, der vor dem *luc*-Gen lokalisiert ist. Der Promotor reagiert nicht nur positiv auf Yersiniabaktin, sondern wird offenbar auch von anderen Regulatoren durch das umgebene Medium beeinflusst (Gehring *et al.*, 1998, Rakin *et al.*, 1994). Um dennoch das Verhältnis der Luciferaseaktivität der HPI-positiven Stämme gegenüber der *irp1*-Mutante in unterschiedlichen Inkubationsmedien beurteilen zu können, wurde der Quotient der Luciferaseaktivität der Stämme U3366/U3366 *irp1* und U3366 *irp1* rec/U3366 *irp1* innerhalb der einzelnen Medien bestimmt und die Werte miteinander verglichen. Die HPI intakten Stämme bewiesen hierbei eine erhöhte Luciferaseaktivität in den eisenarmen Medien Urin und NBD gegenüber der *irp1*-Mutante. Insgesamt konnte eine von der Umgebung eisenabhängige Produktion des Siderophors gezeigt werden, was der Feststellung von Torres *et al.* widerspricht, Urin stelle *in vitro* kein eisenlimitierendes Milieu dar (Torres *et al.*, 2001). Die in dieser Arbeit erstellten Ergebnisse stehen in Einklang mit Inkubationsversuchen von Sharma *et al.*, bei denen Enterobactin- und Aerobactin-produzierende, uropathogene *E. coli*-Isolate über mehrere Tage in humanem Urin *in vitro* inkubiert wurden und die ebenfalls eine gesteigerte Siderophorproduktion in eisenarmer Umgebung zeigten (Sharma *et al.*, 1991). Einen weiteren Nachweis der Yersiniabaktinproduktion *in vitro* konnte durch den Cross-feeding-Assay erbracht werden. Mithilfe des Indikatorstammes *Salmonella enterica* Typhimurium WR 1542, der sich nur in Anwesenheit von Yersiniabaktin vermehren kann, konnte bei den HPI-positiven Stämmen U3366 und U3366 *irp1* rec im Gegensatz zu der *irp1*-Mutante eine Siderophorproduktion nachgewiesen werden. Die Ergebnisse des Bioassays sowie des Cross-feeding-Assays wurden durch mehrfache Wiederholung der Versuche bestätigt. Nach der Darstellung der *in vitro* Expression von HPI-Genen sollte der Nachweis der Yersiniabaktin-Produktion nach transurethraler Infektion *in vivo* untersucht werden. Hierfür wurden C3H/HeN-Mäusen die

Stämme U3366, die *irp1*-Mutante und die Rekomentante transurethral appliziert, über einen Zeitraum von 1-7 Tagen der Urin gewonnen und der Cross-feeding-Assay durchgeführt. Bereits am ersten Tag war eine Yersiniabaktinproduktion der HPI-positiven Stämme im Gegensatz zu der *irp1*-Mutante nachzuweisen. Entweder wurde unmittelbar bei Kontakt zum Wirt bzw. bei Urinkontakt die Siderophorproduktion aktiviert, oder die Yersiniabaktinproduktion ist zu Beginn auf eine Restaktivität der HPI des *in vitro* angezüchteten Keimes zurückzuführen. Um eine Ybt-Produktion der Bakterien auf der CDHM-Platte *in vitro* zu vermeiden, wurde in einer zweiten Versuchsreihe den Agarplatten ein die UPEC-Stämme abtötendes Antibiotikum (Kanamycin) zugeführt. Allerdings war hiermit nicht ausgeschlossen, dass die Yersiniabaktinproduktion in der Zeit zwischen Urinabgabe und Auftragen auf die Platten stattgefunden hat.

Nachdem die Expression der HPI-kodierten Proteine im Urin durch *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen bestätigt wurde, wurden die uropathogenen *E. coli* Stämme U3366, U3366 *irp1* und U3366 *irp1* rec im Harntraktfektionsmodell untersucht. Im Mausmodell sollte der Einfluss der HPI auf das Infektionsverhalten des jeweiligen UPEC-Stammes betrachtet werden. Es wurden Einzelinfektionsversuche durchgeführt, um das Virulenzverhalten der entsprechenden Stämme im Vergleich beurteilen zu können. Aufgrund der Schwankungen der transurethral verabreichten Applikationsmenge wurde eine Gruppengröße von 10 Mäusen gewählt. An den Tagen 1, 3 und 7 nach Applikation wurde die Keimzahl in Niere und Blase bestimmt, sowie eine Granulozytenzählung pro ml Urin durchgeführt. Der Vorversuch, bei dem zunächst der Stamm U3366 und die isogene *irp1*-Mutante eingesetzt wurde, zeigte in der Niere am Tag 3 und 7 und in der Blase am Tag 7 statistisch signifikante Unterschiede im Infektionsverhalten beider Stämme. Der HPI-intakte UPEC Stamm U3366 wies insbesondere im längeren Infektionsverlauf einen Infektionsvorteil in Niere und Blase auf und etablierte sich in einer wesentlich höheren Keimzahl im Harntrakt, was auf eine erhöhte Infektiosität hinweist. Die Granulozytenanzahl pro ml Urin ließ keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Ausgangsstamm U3366 und der *irp1*-Mutante erkennen. Im anschließenden Hauptversuch, in dem eine zusätzliche Untersuchung der Keimzahl im Urin und der Einsatz der Rekomentanten U3366 *irp1* rec erfolgte, sollte der Einfluss der HPI auf das Infektionsgeschehen bestätigt und Unterschiede aufgrund von klonierungsbedingten Mutationen ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse des Hauptversuches bestätigten die Effekte des Vorversuches. So konnten in der Niere signifikante Keimzahl-Unterschiede am Tag 7 zwischen U3366 und U3366 *irp1*, sowie am Tag 3 und 7 zwischen U3366 und U3366 *irp1* rec nachgewiesen werden. Hierbei etablierten sich die HPI-positiven Stämme mit nahezu konstanter Keimzahl in der Niere, was unter Umständen durch die Herkunft des Stammes

(Pyelonephritisisolat) erklärbar ist. In der Blase wurden signifikante Unterschiede zwischen der Rekomentante U3366 *irp1* rec und der *irp1*-Mutante an den Tagen 3 und 7 festgestellt. Während die Keimzahl für den Stamm U3366 innerhalb des Beobachtungszeitraumes sank, zeigte er jedoch an den Tagen 3 und 7 jeweils höhere Werte als die *irp1*-Mutante. Die hohe Keimzahl der Rekomentante zeigt den Einfluss der HPI auf das Virulenzverhalten des UPEC-Stammes, so dass unerwünschte Genomveränderungen durch klonierungsbedingte Mutationen bei der Herstellung der *irp1*-Mutante ausgeschlossen werden konnten. Interessanterweise zeigte die Keimzahl und die Granulozytenzahl im Urin keinerlei signifikante Unterschiede während des Beobachtungszeitraumes. Die Keimzahl im Urin bestätigt die Beobachtung mehrere Autoren (Hagberg *et al.*, 1983, Hultgren *et al.*, 1985), dass bei Pyelonephritisstämmen keine Korrelation zwischen der Keimzahl im Urin und der Blasen- sowie Nierenkeimzahl bestehe. Die hohe Granulozytenzahl im Urin zeigt eine Entzündungsantwort innerhalb der ersten 24 h auf die Infektion (Mulvey, 2002) durch den UPEC-Stamm U3366. Da auch der HPI-negative Stamm U3366 *irp1* über eine nahezu konstante Granulozytenzahl verfügt, ist davon auszugehen, dass andere Pathogenitätsfaktoren des Stammes die Entzündungsantwort hervorrufen. So sind Bakterienstämme wie der UPEC Stamm U3366 in der Lage durch das bakterielle LPS (Lipopolysaccharide) über die TL-Rezeptoren der Urothelzellen (*toll like rezeptor*) eine epheliale Cytokinin-Antwort zu vermitteln. Die Ausschüttung von MIP-2 (*macrophage inflammatory protein*), das dem humanen Interleukin-8 analog ist, verursacht die transepitheliale Migration neutrophiler Granulozyten zum Entzündungsherd (Svanborg *et al.*, 2001).

Bei der Wiederholung des Hauptversuches konnten zusätzlich signifikante Unterschiede zwischen U3366 und der *irp1*-Mutante in der Blase am Tag 1 und 3 nachgewiesen werden. Um eine gegenseitige Beeinflussung des Ausgangsstammes U3366 und der *irp1*-Mutante zu untersuchen und damit Erkenntnisse über eine *in vivo* Expression von Yersiniabaktin zu erhalten, wurden Koinfektionsversuche durchgeführt und die Keimzahl der eingesetzten Stämme in Niere und Blase bestimmt. Die Koinfektionsversuche U3366/U3366 *irp1* sowie U3366 *irp1* rec/U3366 *irp1* ergaben keinen signifikanten Vorteil der HPI-positiven Stämme im Infektionsverhalten gegenüber der *irp1*-Mutante. Die vergleichbare Keimzahl in dem untersuchten Material über den gesamten Beobachtungszeitraum lässt auf eine Yersiniabaktinfütterung schließen. Aufgrund des unmittelbaren Kontakts beider Stämme im Harntrakt, bedingt durch die gemeinsame Applikation und das kleine Volumen der betroffenen Organe, ist eine Yersiniabaktinaufnahme der Mutante *irp1* von dem HPI-positiven Stamm denkbar. Unterschiede waren lediglich in der Anfangsphase des Infektionsverlaufes nachweisbar, was darauf hinweist, dass am Ende des Infektionsverlaufes

der Eisenmangel, der im Koinfektionsversuch durch Ybt-Übertragung kompensiert werden konnte, für die signifikanten Unterschiede im Einzelinfektionsversuch verantwortlich war. Ferner zeigen die Kolonisierungsunterschiede in der Frühphase der Koinfektion, dass sie entweder nicht durch die Ybt-Eisenversorgung kompensiert werden können oder aber dass die Eisenversorgung zu Beginn noch nicht aktiv genug ist. Zusammenfassend konnten die Koinfektionsversuche den Hinweis auf eine Yersiniabaktinfütterung zwischen den HPI-positiven und negativen Stämmen geben, was für eine *in vivo* Siderophorsynthese sprechen würde. Ähnliche Beobachtungen konnten von Torres *et al.* bei Koinfektionsversuchen Aerobactin- und Enterobactin-tragender UPEC-Stämme und deren Mutanten gemacht werden. Die UPEC Mutante CFT073 *iuc ent*, die weder das Siderophor Enterobactin noch Aerobactin synthetisieren kann, zeigte im Mausmodell im Gegensatz zum Wildtyp-Stamm CFT073 eine signifikant niedrigere Infektion der Blase und Niere. In einem anschließenden Koinfektionsversuch der Mutante und des Wildtyps konnten beide Stämme mit einer vergleichbaren Keimzahl in Blase und Niere nachgewiesen werden (Torres *et al.*, 2001).

Die Ergebnisse der Infektionsversuche im Tiermodell der Maus deuten eine Expression der HPI-Gene des UPEC Stammes U3366 *in vivo* an. Offenbar ist das HPI-Gencluster für die Etablierung des UPEC-Stammes im Harntrakt von Bedeutung. Dabei konnten die Experimente dieser Arbeit nicht die Frage klären, ob die Eisenversorgung alleine oder aber andere Funktionen des Eisenaufnahmesystems für die Etablierung der Isolate im Harntrakt eine Rolle spielen. Neben dem Siderophor Yersiniabaktin besitzen UPEC weitere Eisenaufnahmesysteme. Es ist denkbar, dass die einzelnen Systeme in unterschiedlichen Stadien der Infektion (Schubert *et al.*, 1998) und in Abhängigkeit von der Eisenbindungskonstante in bestimmter Umgebung effektiver sind als andere (Russo *et al.*, 2001, Bearden & Perry, 1999). Auch könnte die niedrige Eisenkonzentration im Urin als Indikator für das Wirtsmilieu dienen und über das Eisenaufnahmesystem direkte oder indirekte Effekte induzieren. Der Eisenaufnahmerezeptor FyuA könnte dabei entweder direkt adhäsive Eigenschaften aufweisen, oder aber indirekt weitere Reaktionen innerhalb des Genoms, wie die Bildung von Toxinen (Griffiths, 1991) oder Adhäsinen, auslösen. Auch Russo *et al.* vermuteten, dass die Eisenaufnahmesysteme *iroN* und *ireA* als Adhäsine fungieren könnten (Russo *et al.*, 2001). Die Bedeutung von Adhäsinen als wichtigste Virulenzfaktoren uropathogener *E. coli* wurde von Mulvey, 2002 dargestellt.

Um die Frage einer adhärenenten Eigenschaft des FyuA-Proteins zu klären, wäre, wie in der Diskussion über Mutaflor<sup>®</sup> vorgeschlagen, die Durchführung eines Gentamycin-Kill-Assays mit Uroepithel-Zellkulturen interessant (Mulvey *et al.*, 2001). Ergänzend ist die genaue

Lokalisation des UPEC-Stammes U3366 im Harntrakt anhand histologischer Untersuchungen zu bestimmen.

Charakteristika für einen typischen Impfstoffkandidaten (Russo *et al.*, 2001), wie die Repräsentation an der Bakterienoberfläche, die weite Verbreitung bei extraintestinalen *E. coli*-Isolaten und die gesteigerte Expression bei Infektion, werden von dem FyuA-Protein erfüllt. Eine Bestimmung der immunologischen Antwort auf HPI-kodierte Proteine müsste allerdings in weiteren Versuchen bestimmt werden. Nach ergänzenden Untersuchungen ist FyuA als aussichtsreicher Kandidat eines virulenzassoziierten Kombinations-Impfstoffes gegen extraintestinale *E. coli* in Betracht zu ziehen.

## 6 Zusammenfassung / Summary

In der vorliegenden Arbeit konnte die Bedeutung der genomischen *Yersinia*- "High-Pathogenicity Island" (HPI) für kommensale und uropathogene *Escherichia coli* dargestellt werden. Im Infektionsmodell der Maus wurde der Einfluss der HPI auf die Kolonisierungsfähigkeit des darmkommensalen *E. coli* Stamm Nissle Mutaflor® im Vergleich zu den isogenen Mutanten Mutaflor® *irp1* (Mutante der Siderophorsynthese) und Mutaflor® *fyuA* (Mutante des Siderophorrezeptors) *in vivo* untersucht. Dabei ergab sich eine signifikant höhere Kolonisierungsfähigkeit des Ausgangsstammes *E. coli* Mutaflor® gegenüber der *fyuA*-Mutanten. Durch eine gezielte Untersuchung verschiedener Darmbereiche konnte die Lokalisation der eingesetzten Mutaflor®-Stämme bestimmt werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen deuten auf einen Einfluss des FyuA-Rezeptors auf die adhäsiven Eigenschaften des *E. coli* Mutaflor®-Stammes. Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit die Bedeutung eines intakten HPI-Genclusters für die Kolonisierungsfähigkeit des kommensalen *E. coli* Stamm Mutaflor® gezeigt werden.

Die weite Verbreitung der HPI bei human- und tiermedizinisch relevanten extraintestinalen *E. coli* sowie die pathogenetische Bedeutung bei verschiedenen *Yersinia sp.* lässt eine virulenzfördernde Eigenschaft der HPI bei uropathogenen *E. coli* vermuten. Die Siderophorproduktion der UPEC-Stämme U3366 und der U3366 *irp1*-Rekomplementanten konnte *in vitro* unter Eisenmangelbedingungen gezeigt werden, wohingegen die Mutante des Syntheseapparates (U3366 *irp1*) keine Yersiniabaktinproduktion aufwies. Im Harntraktinfektionsmodell der Maus zeigten Ausgangsstamm und Rekomplementante im Vergleich zu der *irp1*-Mutante einen signifikanten Infektionsvorteil in Blase und Niere. Während Ausgangsstamm U3366 und Rekomplementante U3366 *irp1* rec in hoher Keimzahl über einen längeren Zeitraum nachgewiesen werden konnten, sank die Keimzahl der *irp1*-Mutante in Blase und Niere kontinuierlich. Somit waren signifikante Unterschiede insbesondere im späteren Infektionsverlauf festzustellen. In den Koinfektionsversuchen U3366/U3366 *irp1* und U3366 *irp1* rec/U3366 *irp1* wurde eine Yersiniabaktin-Produktion *in vivo* durch eine gegenseitige Fütterung der entsprechenden Stämme nachgewiesen. Zusammenfassend konnte die HPI nicht nur als essentieller Faktor für die Kolonisierung des Darms, sondern auch als neuer Virulenzfaktor bei Harnwegsinfekten beschrieben werden. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sollen in naher Zukunft in die Entwicklung einer virulenzassoziierten Vakzine einfließen, die sowohl für die Human- als auch für die Tiermedizin eine Bedeutung hat.



**The impact of the High-Pathogenicity Island on colonization and extraintestinal virulence of *Escherichia coli***

In this study the impact of the genomic *Yersinia*-"High-Pathogenicity Island" (HPI) for colonizing and uropathogenic *Escherichia coli* was examined.

Using an *in vivo* mouse model, the influence of the HPI for commensal *E. coli* strain Mutaflor<sup>®</sup> in comparison to isogenic mutant strains *E. coli* Mutaflor<sup>®</sup> *irp1* (siderophore-synthesis mutant) and Mutaflor<sup>®</sup> *fyuA* (siderophore-receptor mutant) was investigated. It could be shown that colonisation of the mouse intestine with *E. coli* strain Mutaflor<sup>®</sup> was significantly higher than the colonisation with the *fyuA* mutant strain, which is unable to deliver the HPI-encoded siderophore Fe-yersiniabactin. By examining different parts of the intestine, Mutaflor<sup>®</sup> strains could be localized and quantified. Analysing the results, the influence of the FyuA receptor for the adhesion ability of the Mutaflor<sup>®</sup> strain is obvious. In conclusion, the study provides evidence for the impact of a functional HPI-genecluster on colonisation of the commensal *E. coli* strain Mutaflor<sup>®</sup>.

The HPI is widely spread among relevant human and animal extraintestinal *E. coli* and shows an important pathogenic relevance in different *Yersinia sp.* This assumes virulence supporting characteristics for uropathogenic *E. coli* strains. *In vitro* assays revealed a medium-dependant siderophore production for both the wildtyp UPEC strain U3366 and the recomplementant strain U3366 *irp1* rec. In contrast, the *irp1* mutant strain was not able to produce the HPI-encoded siderophore yersiniabactin. In the urinary tract infection mouse model, significantly higher infection levels in bladder and kidneys of the wildtyp strain U3366 and U3366 *irp1* rec in contrast to the *irp1* mutant could be demonstrated. A high bacterial count of wildtyp and recomplementant strain could be shown for the entire period, whereas a decreasing number of *irp1* mutant CFU was determined. Thus, significant differences could be proved, especially at a later stage of infection. Having conducted coinfection experiments with strain U3366/U3366 *irp1* and U3366 *irp1* rec/U3366 *irp1*, a mutual yersiniabactin-feeding could be detected, which indicates an *in vivo* yersiniabactin production.

In this study, the HPI could be recognized as both an essential factor for colonizing the intestine as well as a new virulence factor for urinary tract infections. All this considered, FyuA can be regarded as a potential protein for a polyvalent virulence-factor-based vaccine. Widely spread *E. coli* infections in humans and animals, which cause enormous medical expenditures and economic losses, account for the necessity to develop extraintestinal *E. coli* vaccines.

## 7 Materialliste

### 7.1 Geräte

Brutschrank (WTB Binder, Tuttlingen)

Citrat- und Harnstoffröhrchen (Max von Pettenkofer-Institut, München)

Drehrad, Typ CMV-ROM (Fröbel Labortechnik, Lindau)

Einbettmedium: Tissue TeK (Vogel Wilhelm, Giessen)

Elektronische Pipette EDP<sup>TM</sup> (Rainin, Gießen)

Elektroporationsapparat: Gene Pulser<sup>®</sup> II Elektroporation System (Bio-Rad, München)

Elektroporationsküvetten: Gene Pulser<sup>®</sup> Cuvette (Bio-Rad, München)

Eppendorf Pipetten (Eppendorf, Hamburg)

Eppendorf Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg)

Eppendorf Zentrifuge 5417 R (Eppendorf, Hamburg)

Eppendorf Zentrifuge 5417 C (Eppendorf, Hamburg)

Gelelektrophoresekammer (PEQLAB, Erlangen)

GelLoader Tips (Eppendorf, Hamburg)

Heizblock Unitek HB-130 (SEL Laboratory Products, England)

Homogenisatoren (Glasgerätebau Ochs, Bovenden)

Inkubationsschüttelschrank Certomat<sup>®</sup>H (B. Braun Biotech, Melsungen)

Kanülen (Braun, Melsungen)

Kryoröhrchen für Organeinbettung (Roth, Karlsruhe)

Chemiluminometer: MicroLumat *Plus* LB 96 V (Berthold Technologies, Bad-Wildbach)

Mikroskop (Leitz, Wetzlar)

Mikrotiterplatten 96 Well (Sarstedt, Nümbrecht)

Petrischale (Greiner, Österreich)

Pipettierhelfer accu-jet<sup>®</sup> (Brand, Wertheim/Main)

Pipettenspitzen (Brand, Wertheim/Main)

Reaktionsgefäße: 50 ml Polypropylen Conical Tubes (Becton Dickinson, Heidelberg)  
Skalpell (Braun, Melsungen)  
Software Sigma Plot (SPSS, Erkrath)  
Software Sigma Stat (SPSS, Erkrath)  
Software Win Glow Windows für MicroLumat *Plus* LB 96 V (Berthold Technologies, Bad Wildbach)  
Spritzen (Braun, Melsungen)  
Thermocycler Gene Amp 9700 (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA)  
Thermoschüttler: Thermomixer comfort (Eppendorf Hamburg)  
Tischzentrifuge gekühlt, Sorvall<sup>®</sup> Super 21 (DuPont de Nemours, Bad Homburg)  
UV-Transilluminator (Biotec-Fischer, Reiskirchen)  
UV-Visible Spectrophometer (Pharmacia, Tennenlohe)  
Vakuumbzentrifuge DNA Speed Vac (Savant, NY, USA)  
Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, USA)  
Waage PE 3600 (Mettler, Schweiz)

## 7.2 Chemikalien und Reagenzien

Agarose (Invitrogen, NV Leek, Niederlande)  
Ampicillin (Roth, Karlsruhe)  
Ampli<sup>®</sup>Taq PCR Puffer (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA)  
Antibiotikaplättchen: Antimicrobial Susceptibility Test Discs (Oxoid, Wesel)  
Bepanthen<sup>®</sup> (Roche, Mannheim)  
Blutagarplatten (Becton-Dickinson, Heidelberg)  
Chloramphenicol (Roth, Karlsruhe)  
DNA-Marker 1 kb-ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)  
DNA-Marker 100 bp-ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)  
dNTP (PEQLAB, Erlangen)  
DTT (Dithiothreitol; Sigma-Aldrich, Taufkirchen)  
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure; Serva, Heidelberg)  
Ethanol (Biesterfeld Graen, München)  
Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)  
Glycerol, ICN Biomedicals (Ohio, USA)  
Isopropanol (Roth, Karlsruhe)  
Kanamycin (Serva, Heidelberg)

Ketavet<sup>®</sup> (Pharmacia & Upjohn, Erlangen)  
Ligationspuffer für T4-Ligase (Invitrogen, NV Leek, Niederlande)  
McConkey-Platten (Becton-Dickinson, Heidelberg)  
2 mM MgCl<sub>2</sub> (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA)  
Müller-Hinton-II-Agar (Becton Dickinson, Heidelberg)  
10 x Puffer für Endonucleasen (Invitrogen, NV Leek, Niederlande)  
Sucrose (Merck, Darmstadt)  
Streptomycin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)  
Tergitol (Fluka, Schweiz)  
Tetracyclin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)  
Trimethoprim (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)  
2,3,5-Triphenyltetrazoliumchloride (ICN Biomedicals, Ohio-USA)  
Rifampicin (Serva, Heidelberg)  
Rompun<sup>®</sup> 2 % (Bayer, Leverkusen )  
Xylol (Merck, Darmstadt)

### 7.3 Enzyme

Ampli<sup>Taq</sup><sup>®</sup>Gold-Polymerase (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA)  
T4-DNA Ligase (Invitrogen, NV Leek, Niederlande)  
Luciferin (Roche, Mannheim)  
*SalI* (Invitrogen, NV Leek, Niederlande)  
*SstI* (Invitrogen, NV Leek, Niederlande)  
Transposase (s. EZ::TN<sup>TM</sup><DHFR-1> Insertion Kit)

### 7.4 Kommerzielle Kits

QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit Protocol (Qiagen, Hilden)  
GelSpin DNA Purification Kit (Mo Bio Laboratories über Dianova, Hamburg)  
EZ::TN<sup>TM</sup><DHFR-1> Insertion Kit (Epicentre, Biozym Diagnostics, Hess. Oldendorf)

## 7.5 Puffer und Lösungen

Agarosegel	0,6-2 % Agarose in TAE-Elektrophorese-puffer mit 0,0025 % Ethidiumbromid
CDHM-Agar	20 ml Lösung A 30 ml Lösung B 30 ml Aqua dest. 2 ml Hefeextrakt (25 g Hefe in 100 ml Aqua dest.) 200 µl Vitaminlösung 60 µl EDDHA (1 g in 40 ml Aqua dest.) (Ethylendiamindi(o-hydroxyphenylelessigsäure) 20 ml 5 % Agar
Grundpuffer	3,5834 g 20 mM Tricine 0,5197 g 1,07 mM $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ 200 µl 0,5 M EDTA ad 1 l Aqua dest., pH 7,8
LB-Medium / LB-Agar	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1 l Aqua dest., pH 7,4-7,6 (+ 15 g Bacto-Agar für LB-Agar)
Lösung A	32,3 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ 1,36 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1,19 g NaCl 6,0 g Glucose 0,12 g L-Cystein Hydrochlorid 0,065 g L-Isoleucin 0,065 g L-Leucin 0,095 g L-Phenylalanin 0,15 g L-Glutaminsäure 0,20 g L-Arginin 0,20 g L-Serin ad 200 ml Aqua dest., pH 7,2-7,4

Lösung B	0,25 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ 1,6 g L-Asparaginsäure 0,09 g L-Tyrosin ad 300 ml Aqua dest., pH 7,2-7,4
Luc-Lysispuffer	1,4 g $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,26705 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ad 90 ml Aqua dest., pH 7,8 400 $\mu\text{l}$ 0,5 M EDTA 1 g Triton X-100 500 mg BSA ad 100 ml Aqua dest. unmittelbar vor Gebrauch Zugabe von: 1 mM DTT 5 mg/ml Lysozym
Luc-Reagenz	80 ml Grundpuffer 0,4108 g D/L-DTT 0,0166 g Li3-Coenzym A 0,0215 g Mg-ATP Luciferin
NB-Medium	8 g Nutrient broth 5 g NaCl ad 1 l Aqua dest., pH 7,4-7,6
NBD-Medium	8 g Nutrient broth 5 g NaCl 31,2 mg Bipyridin (2,2'-Dipyridyl) $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2$ ad 1 l Aqua dest., pH 7,4-7,6
PBS (Phosphat Buffer Saline)	8 g NaCl 0,2 g KCl 0,2 g $\text{KH}_2\text{HPO}_4$ 1,15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ad 1 l Aqua dest., pH 7,3
SOC-Medium	2,0 % Bacto Trypton 0,5 % Bacto Yeast Extract 10 mM NaCl

	2,5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> 20 mM Glucose
TAE-Elektrophoresepuffer 50 x	242 g Tris 57,1 ml 100 % Eisessig 37,2 g Na <sub>2</sub> EDTA·2 H <sub>2</sub> O ad 1 l Aqua dest.
Vitaminlösung	40 mg Vitamin B5 100 mg Nikotinamid 2 mg Vitamin B1 30 mg Orotsäure ad 20 ml Aqua dest.

## 7.6 Mäuse

C3H/HeN (Charles River, Sulzfeld)

C57Bl/6 (Harlan Winkelmann, Borcheln)

## 7.7 Tierversuchsantrag

Die Tierversuche dieser Arbeit sind im Rahmen der Tierversuchsvorhaben 209.1/211-2531-107/03 und 209.1/211-2531-92/02 durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

## 8 Literaturverzeichnis

**de Almeida, A., Guiyoule, A., Guilvout, I., Iteman, I., Baranton, G. and E. Carniel. 1993.** Chromosomal *irp2* gene in *Yersinia*: distribution, expression, deletion and impact on virulence. *Microbiol. Pathog.*, **14**, 9-21.

**Arber, W. 2000.** Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution. *FEMS Microbiol. Rev.*, **24**, 1-7.

**Archibald, F. and M.-N. Duong. 1984.** Manganese acquisition by *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.*, **158**, 1-9.

**Bach, S., de Almeida, A. and E. Carniel. 2000.** The *Yersinia* High-Pathogenicity Island is present in different members of the family *Enterobacteriaceae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **183**, 289-294.

**Bagg, A. and J. B. Neilands. 1987a.** Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. *Microbiol. Rev.*, **51**, 509-518.

**Bagg, A. and J. B. Neilands. 1987b.** Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a co-factor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *J. Biochemistry*, **26**, 5471-5477.

**Baljer, G. and L. H. Wieler. 1999.** Animals as a source of infections for humans-diseases caused by EHEC. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.*, **8**, 339-343.

**Bearden, S. W., J. D., Fetherston and R. D. Perry. 1997.** Genetic organization of the yersiniabactin biosynthetic region and construction of avirulent mutants in *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.*, **65**, 1659-1668.

**Bearden, S. and R. Perry. 1999.** The Yfe system of *Yersinia pestis* transports iron and manganese and is required for full virulence of plague. *Mol. Microbiol.*, **32**, 403-414.

**Bertschinger, H. U., Pohlenz, J. and I. Hemler. 1997.** Untersuchungen über Mastitis-Metritis. Agalaktie-Syndrom (Milchfieber) der Sau. *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, **119**, 223-233.

**Beutin, L. 1999.** *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. *Vet. Res.*, **30**, 285-298.

**Bingen-Bidois, M., Clermont, O., Bonacorsi, S., Terki, M., Brahimi, N., Loukil, C., Barraud, D. and E. Bingen. 2002.** Phylogenetic analysis and prevalence of urosepsis strains of *Escherichia coli* bearing pathogenicity island-like domains. *Infect. Immun.*, **70**, 3216-3226.



- Bjorn, M. J., Iglewski, B. H., Ives, S. K., Sadoff, J. C. and M. L. Vasil. 1978.** Effect of iron on yields of exotoxin A in cultures of *Pseudomonas aeruginosa* PA-103. *Infect. Immun.*, **19**, 785-791.
- Blanc-Potard, A. B., Tinsley, C., Scaletsky, I., Le Bouguenec, C., Guinot, J., Servin, A. L., Nassif, X. and M. F. Bernet-Camard. 2002.** Representational difference analysis between Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* and nonathogenic *E. coli* K-12. *Infect. Immun.*, **70**, 5503-5511.
- Blum, G., Marre, R. and J. Hacker. 1995.** Properties of *Escherichia coli* strains of serotyp O6. *Infect. Immun.*, **23**, 234-236.
- Blum, G., Ott, M., Lischewski, A., Ritter, A., Imrich, H., Tschäpe, H. and J. Hacker. 1994.** Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. *Infect. Immun.*, **62**, 606-614.
- Blum-Oehler, G., Oswald, S., Eiteljörge, K., Sonnenborn, U., Schulze, J., Kruis, W. and J. Hacker. 2003.** Development of strain-specific PCR reactions for the detection of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 in fecal samples. *Res. Microbiol.*, **154**, 59-66.
- Braun, V., Günter, K. and K. Hantke. 1991.** Transport of iron across the outer membrane. *Biology of Metals*, **4**, 14-22.
- Braun, V., Hancock, R. E., Hantke, K. and A. Hartmann. 1976.** Functional organisation of the outer membrane of *Escherichia coli*: phage and colicin receptors as components of the iron uptake systems. *J. Supramol. Struct.*, **5**, 37-58.
- Braun, V., Hantke, K. and W. Köster. 1998.** Bacterial iron transport: mechanisms, genetics, and regulation, in: *Metal Ions in Biological Systems*, pp. 67-145. Eds. A. Sigel & H. Sigel. New York: Marcel Dekker.
- Brown, P. K. and R. Curtiss. 1996.** Unique chromosomal regions associated with virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *PNAC*, **93**, 11149-11154.
- Byers, B. R. and E. L. Arceneaux. 1998.** Microbial iron transport: iron aquisition by pathogenic microorganisms, in: *Metal Ions in Biological Systems*, pp. 37-66. Eds. A. Sigel & H. Sigel. New York: Marcel Dekker.
- Bullen, J. J. and E. Griffiths. 1987.** Molecular, Physiological and Clinical Aspects, in: *Iron and Infection*. Eds. J. J. Bullen & E. Griffiths. Chichester: John Wiley.
- Bullen, J. J., Leigh, L. C. and H. J. Rogers. 1968.** The effect of iron compounds on the virulence of *Escherichia coli* for guinea pigs. *Immunology*, **15**, 581-588.
- Bullen, J. J., Ward, C. G. and H. J. Rogers. 1991.** The critical role of iron in some clinical infections. *J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **10**, 613-617.
- Calderwood, S. B. and J. J. Mekalanos. 1987.** Iron regulation of Shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* is mediated by the *fur* locus. *J. Bacteriol.*, **169**, 4759-4764.
- Carniel, E., D. Mazigh and H. H. Mollaret. 1987.** Expression of iron-regulated proteins in *Yersinia* species and their relation to virulence. *Infect. Immun.*, **55**, 277-280.

- Carniel, E., Guiyoule, A., Guilvout, I. and O. Mercereau-Puijalon. 1992.** Molecular cloning, iron-regulation and mutagenesis of the *irp2* gene encoding HMWP2, a protein specific for the highly pathogenic *Yersinia*. *Mol. Microbiol.*, **6**, 379-388.
- Carniel, E., Guilvout, I. and M. Prentice. 1996.** Characterization of a large chromosomal "High-Pathogenicity Island" in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.*, **178**, 6743-6751.
- Cavalieri, S. J. and I. S. Snyder. 1982.** Cytotoxic activity of partially purified *Escherichia coli*  $\alpha$ -haemolysin. *J. Med. Microbiol.*, **15**, 11-21.
- Cheetham, B. F. and M. E. Katz. 1995.** A role for bacteriophages in the evolution and transfer of bacterial virulence determinants. *Mol. Microbiol.*, **18**, 201-208.
- Chen, Y. M. M., Wright, P. J., Chee-Seong Lee and G. F. Browning. 2003.** Uropathogenic virulence factors in isolates of *Escherichia coli* from clinical cases of canine pyometra and feces of healthy bitches. *Vet. Microb.*, **94**, 57-69.
- Crosa, J. H. 1997.** Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 319-336.
- Cornelius, G. R. 1998.** The *Yersinia* deadly kiss. *J. Bacteriol.*, **21**, 5495-5504.
- Coulton, J. W., Mason, P. and M. S. DuBow. 1983.** Molecular cloning of the ferrichrome-iron receptor of *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.*, **156**, 1315-1321.
- Cowart, R. E. and B. G. Foster. 1985.** Differential effects of iron on the growth of *Listeria monocytogenes*: minimum requirements and mechanism of acquisition. *J. Infect. Dis.*, **151**, 721-730.
- Dean, D. 1981.** A plasmid cloning vector for the direct selection of strains carrying recombinant plasmids. *Gene*, **15**, 99-102.
- De Lorenzo, V. and K. N. Timmis. 1994.** Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol.*, **235**, 386-405.
- Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Nagy, G., Schneider, G., Johann, A., Gottschalk, G. and J. Hacker. 2002.** Genetic structure and distribution of four pathogenicity islands (PAI I<sub>536</sub> to PAI IV<sub>536</sub>) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect. Immun.*, **70**, 6365-6372.
- Donnenberg, M. S. and J. B. Kaper. 1991.** Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect. Immun.*, **59**, 4310-4317.
- Dozois, C. M., Daigle, F. and R. Curtiss. 2003.** Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed *in vivo* by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *PNAS*, **1**, 247-252.
- Fasano, A., Kay, B. A., Russell, R. G., Maneval, D. R. Jr. and M. M. Levine. 1990.** Enterotoxin and cytotoxin production by enteroinvasive *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **58**, 3717-3723.

- Fetherston, J. D. and R. D. Perry. 1994.** The pigmentation locus of *Yersinia pestis* KIM6+ is flanked by an insertion sequence and includes the structural genes for pesticin sensitivity and HMWP2. *Mol. Microbiol.*, **13**, 697-708.
- Fetherston, J. D., Bearden, S. W. and R. D. Perry. 1996.** YbtA, an AraC-type regulator of the *Yersinia pestis* pesticin/yersiniabactin receptor. *Mol. Microbiol.*, **22**, 315-325.
- Finlay, B. B. and S. Falkow. 1997.** Common themes in microbial pathogenicity revised. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 136-169.
- Gay, P., Le Coq, D., Steinmetz, M., Berkelman, T. and C. I. Kado. 1985.** Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.*, **164**, 918-921.
- Gehring, A. M., Demoll, E., Fetherston J. D., Mori, I., Mayhew, G. F., Blattner, F. R., Walsh, C. T. and R. D. Perry. 1998.** Iron acquisition in plague-modular logic in enzymatic biogenesis of yersiniabactin by *Yersinia pestis*. *Chem. Biol.*, **5**, 573-586.
- Goffaux, F., China, B. and J. Mainil. 2001.** Organisation and *in vitro* expression of *esp* genes of the LEE (locus of enterocyte effacement) of bovine enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.*, **83**, 275-286.
- Gophna, U., Oelschlaeger, T. A., Hacker, J. and E. Z. Ron. 2001.** *Yersinia* HPI in septicemic *Escherichia coli* strains isolated from diverse host. *FEMS Microbiol. Lett.*, **196**, 57-60.
- Griffiths, E. 1983.** Adaption and multiplication of bacteria in host tissues. *Philosophical Transactions of the Royal Society (London) B*, **303**, 85-96.
- Griffiths, E. 1991.** Environmental regulation of bacterial virulence-implications for vaccine design and production. *Trends in Biotechnology*, **9**, 309-315.
- Griffiths, E., Rogers, H. J. and J. J. Bullen. 1980.** Iron, plasmids and infection. *Nature*, **284**, 508-509.
- Groisman, E. A. and H. Ochman. 1996.** Minireview. Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell*, **87**, 791-793.
- Grünig, H. M., Rutschi, D., Schoch, C. and G. Lebek. 1987.** The chromosomal *fur* gene regulates the extracellular haemolytic activity encoded by certain Hly plasmids. *Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene A*, **266**, 231-238.
- Guerinot, M. L. 1994.** Microbial iron transport. *Annu. Rev. Microbiol.*, **48**, 743-772.
- Haag, H., Hantke, K., Drechsel, H., Stojiljkovic, I., Jung, G. and H. Zähler. 1993.** Purification of yersiniabactin: a siderophore and possible virulence factor of *Yersinia enterocolitica*. *J. Gen. Microbiol.*, **139**, 2159-2165.
- Hacker, J., Bender, L., Ott, M., Wingender, J., Lund, B., Marre, R. and W. Goebel. 1990.** Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur *in vivo* and *in vitro* in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microb. Pathog.*, **8**, 213-225.

- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühldorfer, I. and H. Tschäpe. 1997.** MicroReview. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.*, **23**, 1089-1097.
- Hacker, J. and E. Carniel. 2001.** Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. *EMBO reports*, **5**, 376-381.
- Hacker, J., Dobrindt, U. and L. Emödy. 2001.** Wie Bakterien kommunizieren: Quorum sensing und Crosstalk in bakteriellen Lebensgemeinschaften, in: *Darmflora in Symbiose und Pathogenität*, pp.73-81. Eds. Alfred Nissle Gesellschaft e. V., Hagen, Germany.
- Hacker, J. and J. B. Kaper. 1999.** The concept of Pathogenicity Islands, in: *Pathogenicity Islands and other mobile virulence elements*. Eds. J. B. Kaper and J. Hacker. *Am. Soc. for Microbiol.*, Washington, D. C.
- Hacker, J. and J. B. Kaper. 2000.** Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.*, **54**, 641-679.
- Hagberg, L., Engberg, I., Freter, R., Lam, J., Olling, S. and C. Svanborg Eden. 1983.** Ascending, unobstructed urinary tract infection in mice caused by pyelonephritogenic *Escherichia coli* of human origin. *Infect. Immun.*, **40**, 273-283.
- Hantke, K. 1983.** Identification of an iron uptake system specific for coprogin and rhodotorulic acid in *Escherichia coli* K12. *Molecular and General Genetics*, **191**, 301-306.
- Hantke, K., Nicholson, G., Rabsch, W. and G. Winkelmann. 2003.** Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. *PNAS*, **7**, 3677-3682.
- Harding, G. K. M. and A. R. Ronald. 1994.** The management of urinary tract infections: what have we learned in the past decade. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **4**, 83-88.
- Hensel, M., Shea, J. E., Bäuml, A. J., Gleeson, C., Blattner, F. and D. W. Holden. 1997.** Analysis of the boundaries of *Salmonella* pathogenicity island 2 and the corresponding chromosomal region of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, **179**, 1105-1111.
- Heesemann, J. 1987.** Chromosomal-encoded siderophores are required for mouse virulence of enteropathogenic *Yersinia* species. *FEMS Microbiol. Lett.*, **48**, 229-233.
- Heesemann, J. and S. Schubert. 2001.** Antagonistische Prinzipien und Eisentransportsysteme von *Escherichia coli*: Bedeutung für Ökologie und Pathogenität, in: *Darmflora in Symbiose und Pathogenität*, pp.65-72. Eds. Alfred Nissle Gesellschaft e. V., Hagen, Germany.
- Heesemann, J., Hantke, K., Vocke, T., Saken, E., Rakin, A., Stojiljkovic, I. and R. Berner. 1993.** Virulence of *Yersinia enterocolitica* is closely associated with siderophore production, expression of an iron repressible outer membrane polypeptide of 65000 Da and pesticin sensitivity. *Mol. Microbiol.*, **8**, 397-408.
- Hochhut, B., Jahreis, K., Lengeler, J. W. and K. Schmid. 1997.** CTnscr94, a conjugative transposon found in enterobacteria. *J. Bacteriol.*, **179**, 2097-2101.

- Hoffmann, R. M. and W. Kruis. 2002.** Probiotika und Präbiotika- eine Renaissance? *Internist*, **43**, 1400-1406.
- Hooton, T. M., Scholes, D., Hughes, J. P., Winter, C., Roberts, P. L., Stapleton, A. E., Stergachis, A. and W. E. Stamm. 1996.** A prospective study of risk factors for symptomatic urinary tract infection in young women. *N. Engl. J. Med.*, **335**, 468-474.
- Hooton, T. M. and W. E. Stamm. 1997.** Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infection. *Infect. Dis. Clin. North. Am.*, **11**, 551.
- Hopkins, W. J., Gendron-Fitzpatrick, A., Balish, E. and D. T. Uehling. 1998.** Time course and host response to *Escherichia coli* urinary tract infection in genetically distinct mouse strains. *Infect. Immun.*, **66**, 2798-2802.
- Hopkins, W. J., Hall, J. A., Conway, B. P. and D. T. Uehling. 1995.** Induction of urinary tract infection by intraurethral inoculation with *Escherichia coli*: refining the murine model. *J. Infect. Dis.*, **171**, 462-465.
- Huang, S. H., Wass, C., Fu, Q., Prasadaraao, N. V., Stins, M. and K. S. Kim. 1995.** *Escherichia coli* invasion of brain microvascular endothelial cells *in vitro* and *in vivo*: molecular cloning and characterization of invasion gene *ibe10*. *Infect. Immun.*, **63**, 4470-4475.
- Hui Zhao, Thompson, R. B., Lockatell, V., Johnson, D. E. and H. L. T. Mobley. 1998.** Use of green fluorescent protein to assess urease gene expression by uropathogenic *Proteus mirabilis* during experimental ascending urinary tract infection. *Infect. Immun.*, **66**, 330-335.
- Hultgren, S. J., Porter, T. N., Schaeffer, A. J. and J. L. Duncan. 1985.** Role of type 1 pili and effects of phase variation on lower urinary tract infections produced by *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **50**, 370-377.
- Hussain, S., Hantke, K. and V. Braun. 1981.** Citrate-dependent iron transport system in *Escherichia coli* K12. *J. Biochemistry*, **117**, 431-437.
- Jacobson, S. H., Tullus, K., Wretling, B. and A. Brauner. 1988.** Aerobactin-mediated uptake of iron by strains of *Escherichia coli* causing pyelonephritis and bacteraemia. *J. Infect.*, **16**, 147-152.
- Janben, T., Schwarz, C., Preikschat, P., Voss, M., Philipp, H. C. and L. H. Wieler. 2001.** Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *Int. J. Med. Microbiol.*, **291**, 371-378.
- Johnson, J. R. 1991.** Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, **4**, 80-128.
- Johnson, J. R. and J. J. Brown. 1996.** Defining inoculation conditions for the mouse model of ascending urinary tract infection that avoid immediate vesicoureteral reflux yet produce renal and bladder infection. *J. Infect. Dis.*, **173**, 746-749.
- Johnson, J. R., Brown, J. J., Carlino, U. B. and T. A. Russo. 1998.** Colonization with and acquisition of uropathogenic *Escherichia coli* as revealed by polymerase chain reaction-based detection. *J. Infect. Dis.*, **177**, 1120-1124.

- Johnson, J. R., Delavari, P., Stell, A. L., Whittam, T. S., Carlino, U. and T. A. Russo. 2001.** Molecular comparison of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of the same electrophoretic lineages from humans and domestic animals. *J. Infect. Dis.*, **183**, 154-159.
- Johnson, D. E., Lockatell, C. V., Russell, R. G., Hebel, J. R., Island, M., D., Stapleton, A., Stamm, W. E. and J. W. Warren. 1998.** Comparison of *Escherichia coli* strains recovered from human cystitis and pyelonephritis infections in transurethrally challenged mice. *Infect. Immun.*, **66**, 3059-3065.
- Johnson, J. R., O'Brian, T. T., Low, D. A., Ling, G., Delavari, P., Fasching, C., Russo, T. A., Carlino, U. and A. L. Stell. 2000.** Evidence of commonality between canine and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains that express *papG* Allele II. *Infect. Immun.*, **68**, 3327-3336.
- Johnson, J. R. and W. E. Stamm. 1989.** Urinary tract infections in women: diagnosis and treatment. *Ann. Intern. Med.*, **111**, 906-917.
- Johnson, J. R. and A. L. Stell. 2000.** Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. *J. Infect. Dis.*, **181**, 261-272.
- Jones, C. H., Pinker, J. S., Roth, R., Heuser, J., Nicholes, A. V., Abraham, S. N. and S. J. Hultgren. 1995.** FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the *Enterobacteriaceae*. *PNAS*, **92**, 2081-2085.
- Kao, J. S., Stucker, D. M., Warren, J. W. and H. L. Mobley. 1997.** Pathogenicity island sequences of pyelonephritogenic *Escherichia coli* CTF073 are associated with virulent uropathogenic strains. *Infect. Immun.*, **65**, 2812-2820.
- Kauffmann, F. 1947.** The serology of the coli group. *J. Immunol.*, **57**, 71-100.
- Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J. and R. M. Zinkernagel. 1998.** Medizinische Mikrobiologie. Thieme-Verlag Stuttgart.
- Kruis, W., Fric, P. and M. Stolte. 2001.** The Mutaflor study group. Maintenance of remission in ulcerative colitis is equally effective with *Escherichia coli* Nissle 1917 and with standard mesalamine. *Gastroenterology*, **120**, A127.
- Lafont, J. P., Dho, M., D'Hanteville, H. M., Bree, A. and P. J. Sansonetti. 1987.** Presence and expression of aerobactin genes in virulent avian strains of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **55**, 193-197.
- Lee, C. A. 1996.** Pathogenicity islands and the evolution of bacterial pathogens. *Infect. Agents Dis.*, **5**, 1-7.
- Leffel, M. S. and J. K. Spitznagel. 1975.** Fate of human lactoferrin and myeloperoxidase in phagocytizing human neutrophils: effects of immunoglobulin G subclasses and immune complexes coated on latex beads. *Infect. Immun.*, **12**, 813-820.
- Le Minor, L. and F. B. Hamida. 1962.** Avantages de la recherche de la  $\beta$ -Galactosidase sur celle de la fermentation de lactose en milieu complexe dans la diagnostique bactériologique, en particulier des *Enterobacteriaceae*. *Ann. Inst. Pasteur*, **102**, 267-277.

**Leong, J. and J. B. Neilands. 1976.** Mechanisms of siderophore iron transport in enteric bacteria. *J. Bacteriol.*, **126**, 823-830.

**Ling, G. C. 1995.** Urinary tract infections, in: *Lower urinary tract diseases of dogs and cats*, pp. 116-128. Eds. G. V Ling, Mosby, St. Louis, Mo.

**Lodinová-Žádníková, R., Tlaskalová-Hogenová, H. and U. Sonnenborn. 1994.** Einfluss der gezielten Darmbesiedlung mit dem *Escherichia coli*-Stamm Nissle 1917 auf die Immunantwort bei ausgetragenen und frühgeborenen Kindern. *Der Kinderarzt*, **3**.

**Low, D. A., Braaten, B. A., Ling, G. V, Johnson, D. L. and A. L. Ruby. 1988.** Isolation and comparison of *Escherichia coli* strains from canine and human patients with urinary tract infections. *Infect. Immun.*, **56**, 2601-2609.

**Mainil, J. G., Jacquemin, E., Kaeckenbeek, A. and P. Pohl. 1993.** Association between the effacing (*eae*) gene and the Shiga-like toxin (SLT)-encoding genes in *Escherichia coli* isolates from cattle. *Am. J. Vet. Res.*, **54**, 1064-1068.

**Malchow, H. 1997.** Crohn's disease and *E. coli*: A new approach in therapy of maintain remission of colonic Crohn's disease? *J. Clin. Gastroenterol.*, **25**, 653-658.

**Marre, R. and J. Hacker. 1987.** Role of S- and common-type 1-fimbriae of *Escherichia coli* in experimental upper and lower urinary tract infection. *Microbiol. Pathog.*, **2**, 223-226.

**Mickelson, P. A. and P. F. Sparling. 1981.** Ability of *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, and commensal *Neisseria* species to obtain iron from transferrin and iron compounds. *Infect. Immun.*, **33**, 555-564.

**Mietzner, T. A. and S. A. Morse. 1994.** The role of iron-binding proteins in the survival of pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Nutr.*, **14**, 471-493.

**Miller, V. L. and J. J. Mekalanos. 1988.** A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J. Bacteriol.*, **170**, 2575-2583.

**Möllenbrink, M. and E. Bruckschen. 1994.** Mikrobiologische Behandlung der chronischen Obstipation. *Med. Klin.*, **89**, 587-593.

**Moon, H. W., Whipp, S. C., Argenzio, R. A., Levine, M. M. and R. A. Gianella. 1983.** Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect. Immunol.*, **53**, 1340-1351.

**Morschhauser, J., Hoschutzky, H., Jann, K. and J. Hacker. 1990.** Functional analysis of the sialic acid-binding adhesin SfaS of pathogenic *Escherichia coli* by site-specific mutagenesis. *Infect. Immun.*, **58**, 2133-2138.

**Mühldorfer, I., Ziehbür, W. and J. Hacker. 2001.** *Escherichia coli* in Urinary tract infections, in: *Molecular Medical Microbiology*, pp. 1739-1748. Eds. Sussman, M. London: Academic Press.

**Muir, W. W., Hubbell, J. A. E. and R. T. Skarda. 1996.** Veterinärnästhesie. Eds. Schattauer.

- Mulvey, M. A. 2002.** Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol.*, **5**, 257-271.
- Mulvey, M. A., Schilling, J. D. and S. J. Hultgren. 2001.** Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infect. Immun.*, **69**, 4572-4579.
- Neilands, J. B. 1981.** Microbial iron compounds. *Annu. Rev. Biochemistry*, **50**, 715-731.
- Neu, H. C. 1992.** Urinary tract infections. *Am. J. Med.*, **92**, 63-70.
- Niederhoffer, E. C., Naranjo, C. M., Bradley, K. L. and J. A. Fee. 1990.** Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (*sod A* and *sod B*) genes by the ferric uptake regulation (*fur*) locus. *J. Bacteriol.*, **172**, 1930-1938.
- Nikaido, H. 1979.** Non specific transport through the outer membrane, in: *Bacterial Outer Membranes: Biogenesis and Functions*, pp. 361-407. Eds. M. Inoue, New York: John Wiley.
- Nissle, A. 1918.** Die antagonistische Behandlung chronischer Darmstörungen mit Colibakterien. *Med. Klin.*, **2**, 29-30.
- Nissle, A. 1925.** Weiteres über Grundlagen und Praxis der Mutaflorbehandlung. *DMW*, **4**, 1809-1813.
- O'Brian, I. G. and F. Gibson. 1970.** The structure of enterocholin and related 2,3-dihydroxy-N-benzoylserine conjugates from *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **215**, 393-402.
- Ochman, H., Lawrence, J. G. and E. A. Groisman. 2000.** Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, **405**, 299-304.
- Ölschläger, T. A., Altenhöfer, A., Albert, C., Merkert, H. and J. Hacker. 2001.** Bakterielle Invasion in eukaryotische Zellen, in: *Darmflora in Symbiose und Pathogenität*, pp. 33-39. Eds. Alfred Nissle Gesellschaft e. V., Hagen, Germany.
- Ölschläger, T. A., Zhang, D., Schubert, S., Carniel, E., Rabsch, W., Karch, H. and J. Hacker. 2003.** The High-Pathogenicity Island is absent in human pathogens of *Salmonella enterica* subspecies I but present in isolates of subspecies III and VI. *J. Bacteriol.*, **3**, 1107-1111.
- O'Halloran, T. V. 1993.** Transition metals in control of gene expression. *Science*, **261**, 715-725.
- Paddleford, R. R. and W. Erhardt. 1998.** Anästhesie bei Kleintieren. Eds. *Schattauer*.
- Pappenheimer, A. M. Jr. 1977.** Diphteria toxin. *Annu. Rev. Biochemistry*, **46**, 69-94.
- Pelludat, C., Rakin, A., Jacobi, C. A., Schubert, S. and J. Heesemann. 1998.** The yersiniabactin biosynthetic gene cluster of *Yersiniabactin enterocolitica*: Organisation and siderophore-dependant regulation. *J. Bacteriol.*, **180**, 538-546.



- Perry, R. D., Balbo, P. B., Jones, H. A., Fetherston, J. D. and E. DeMoll. 1999.** Yersiniabactin from *Yersinia pestis*: biochemical characterization of the siderophore and its role in iron transport and regulation. *Microbiol.*, **145**, 1181-1190.
- Pollack, J. R. and J. B. Neilands. 1970.** Enterobactin, an iron transport compound from *Salmonella typhimurium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **38**, 989-992.
- Posey, J. E. and F. C. Gherardini. 2000.** Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science*, **228**, 1651-1653.
- Preston, G. M., Hauboldt, B. and P. B. Rainey. 1998.** Bacterial genomics and adaption to life on plants: implications for the evolution of pathogenicity and symbiosis. *Curr. Op. Microbiol.*, 589-597.
- Rakin, A., Saken, E., Harmsen, D. and J. Heesemann. 1994.** The pesticin receptor of *Yersinia enterocolitica*: a novel virulence factor with dual function. *Mol. Microbiol.*, **13**, 253-263.
- Rakin, A., Urbitsch, P. and J. Heesemann. 1995.** Evidence of two evolutionary lineages of highly pathogenic *Yersinia* species. *J. Bacteriol.*, **177**, 2292-2298.
- Raymond, K. N. and C. J. Carrano. 1979.** Co-ordination chemistry of microbial iron transport. *Accounts of Chemical Research*, **12**, 183-190.
- Ravatn, R., Studer, S., Springael, D., Zehnder, A. J. B. and J. R. van der Meer. 1998.** Chromosomal integration, tandem amplification, and deamplification in *Pseudomonas putida* F1 of a 105-kilobase genetic element containing the chlorocatechol degradative genes from *Pseudomonas* sp. strain B13. *J. Bacteriol.*, **180**, 4360-4369.
- Rembacken, B. J., Snelling, A. M., Hawkey, P. M., Chalmers, D. M. and A. T. R. Axon. 1999.** Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis. A randomised trial. *Lancet*, **354**, 635-639.
- Ripperle-Lampe, K. E., O'Brian, A. D., Conran, R. and H. A. Lockman. 2001.** Mutation of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor type 1 (*cnf1*) attenuates the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **69**, 3954-3964.
- Rogers, H. J. 1973.** Iron-binding catechols and virulence in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **7**, 445-456.
- Rolle, M. and A. Mayr. 2002.** Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Enke Verlag Stuttgart.
- Russo, T. A., Carlino, U. B. and J. R. Johnson. 2001.** Identification of a new iron-regulated virulence gene, *ireA*, in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **69**, 6209-6216.
- Russo, T. A. and J. R. Johnson. 2003.** Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microb. Infect.*, **5**, 449-456.

**Saiki, R. K., Gelfand, G. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and H. A. Ehrlich. 1988.** Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a thermostable DNA Polymerase. *Science*, **239**, 487-491.

**Salyers, A. A. and D. D. Whitt. 1994.** Bacterial pathogenesis, a molecular approach. *Am. Soc. of microbiol.*, 213-226.

**Schubert, S., Cuenca, S., Fischer, D. and J. Heesemann. 2000.** High-Pathogenicity Island of *Yersinia pestis* in Enterobacteriaceae isolated from blood cultures and urine samples: prevalence and functional expression. *J. Infect. Dis.*, **182**, 1268-1271.

**Schubert, S., Sorsa, J. L., Cuenca, S., Fischer, D., Jacobi, C. A. and J. Heesemann. 2000.** HPI of high-virulent *Yersinia* is found in *E. coli* strains causing urinary tract infection. Structural, functional aspects, and distribution. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **485**, 69-73.

**Schubert, S., Rakin, A., Karch, H., Carniel, E. and J. Heesemann. 1998.** Prevalence of the High-Pathogenicity Island of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infect. Immun.*, **66**, 480-485.

**Schubert, S., Rakin, A., Fischer, D., Sorsa, J. and J. Heesemann. 1999.** Characterization of the integration site of *Yersinia* high-pathogenicity island in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **179**, 409-414.

**Sharma, S., Harjai, K. and R. Mittal. 1991.** Enhanced siderophore production and mouse kidney pathogenicity in *Escherichia coli* grown in urine. *J. Med. Microbiol.*, **35**, 325-329.

**Siitonen, A. 1994.** What makes *Escherichia coli* pathogenic? *Ann. Med.*, **26**, 229-231.

**Skorupski, K. and R. K. Taylor. 1996.** Positive selection vectors for allelic exchange. *Gene*, **169**, 47-52.

**Sonnenborn, U. and R. Greinwald. 1991.** Beziehungen zwischen Wirtsorganismus und Darmflora. Schattauer, Stuttgart.

**Stamm, W. E. 1999.** Urinary tract infections, in: *Clinical infectious diseases: a practical approach*, pp. 649-656. Eds. Root, R. K., Waldvogel, F., Corey, L., Stamm, W. E. New York: Oxford University Press.

**Strauss, E. J. and S. Falkow. 1997.** Microbial pathogenesis: genomics and beyond. *Science*, **276**, 707-712.

**Svanborg, C., Frendeus, B., Godaly, G., Hang, L., Hedlund, M. and C. Wachtler. 2001.** Toll-like receptor signaling and chemokine receptor expression influence the severity of urinary tract infection. *J. Inf. Dis.*, **183**, 61-65.

**Torres, A. G., Redford, P., Welch, R. A. and S. M. Payne. 2001.** TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. *Inf. Immun.*, **69**, 6179-6185.

**Valvano, M. A. and J. H. Crosa. 1984.** Aerobactin iron transport genes commonly encoded by certain Col V plasmids occur in the chromosome of a human invasive strain of *Escherichia coli* K1. *Infect. Immun.*, **46**, 159-167.

- Welch, R. A., Burland, V., Plunkett, G., Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., Buckles, E. L., Liou, S.-R., Boutin, A., Hackett, J., Stroud, D., Mayhew, G. F., Rose, D. J., Zhou, S., Schwartz, D. C., Perna, N. T., Mobley, H. L. T., Donnenberg, M. S. and F. R. Blattner. 2002.** Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *PNAS*, **26**, 17020-17024.
- Westerlund, B., Pere, A., Korhonen, T. K., Järvinen, A. K., Siitonen, A. and P. H. Williams. 1987.** Characterization of *Escherichia coli* strains associated with canine urinary tract infections. *Res. Vet. Sci.*, **42**, 404-406.
- Wieler, L. H., McDaniel, T. K., Whittam, T. S. and J. B. Kaper. 1997.** Insertion site of the locus of enterocyte effacement in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* differs in relation to the clonal phylogeny of the strains. *FEMS Microbiol. Lett.*, **156**, 49-53.
- Williams, P. H. 1979.** Novel iron uptake systems specified by Col V plasmids: an important component in the virulence of invasive strains of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **26**, 925-932.
- Woodrow, G. C., Langmann, L., Young, I. G. and F. Gibson. 1978.** Mutations affecting the citrate-dependent iron uptake systems in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **133**, 1524-1526.
- Wooley, R. E. and J. L. Blue. 1976.** Quantitative and bacteriological studies of urine specimens from canine and feline urinary tract infections. *J. Clin. Microbiol.*, **4**, 326-329.
- Zähringer, U., Alexander, C. and E. T. Rietschel. 2001.** Struktur und pathophysiologische Wirkung des Endotoxins, in: *Darmflora in Symbiose und Pathogenität*, pp. 41-53. Eds. Alfred Nissle Gesellschaft e. V., Hagen, Germany.
- Zimmermann, L., Hantke, K. and V. Braun. 1984.** Exogenous induction of the iron dicitrate transport system of *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.*, **159**, 271-277.
- Ziebuhr, W., Ohlsen, K., Karch, H., Korhonen, T. and J. Hacker. 1999.** Evolution of bacterial pathogenesis. *CMLS Cell. Mol. Life Sci.*, **56**, 719-728.

## 9 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Genetische Struktur einer pathogenen Insel (PAI). Die PAI umfasst repräsentative charakteristische genetische Elemente, wie *direct repeats* (DR), ein tRNA-Gen in der Nähe eines Integrase-Gens (int), Mobilitätsgene (mob A, B) und Virulenz-Gencluster (vir A, B). .....9
- Abbildung 2: Darstellung der *Yersinia*-HPI Struktur bei *Y. pestis* und *E. coli* im Vergleich. ....14
- Abbildung 3: Darstellung des Vektors A) pJul1.A, B) pKAS32. ....20
- Abbildung 4: Darstellung der Yersiniabaktin-Aufnahme und Regulation in der Bakterienzelle. A) Ybt bindet im Zytoplasma an das Regulatorprotein YbtA, das in gebundener Form als Positivregulator des *fyuA*-Promotors dient. B) In *Salmonella enterica* Typhimurium WR 1542 ist dem *fyuA*-Promotor ein Luciferase-Gen (*luc*) nachgeschaltet. ....35
- Abbildung 5: Die Yersiniabaktinproduktion des HPI-positiven Teststammes kann durch Zugabe des Überstandes zum Indikatorstamm *Salmonella enterica* Typhimurium WR 1542 bestimmt werden. Ybt bindet im Zytoplasma über das YbtA-Protein an den *fyuA*-Promotor, wodurch die Expression des nachgeschalteten Luciferase-Gens erhöht wird. Die Luciferase-Produktion lässt sich mittels Chemilumineszenzreaktion nachweisen. ....36
- Abbildung 6: Nach Konjugation der Mutanten Mutaflor® *fyuA* mit dem *E. coli* Stamm S17-1  $\lambda$ pir <pJul1.A *fyuA*> kommt es zu einer Einfach-Rekombination homologer DNA-Bereiche (A). Daraus ergeben sich zwei mögliche Integrationsschemata (B). Durch anschließende Zugabe von Sucrose wird auf Verlust des *sacB*-Gens selektiert. Hierbei kann es durch eine 2. Rekombination entweder zu einem Verlust des Vektors oder zu einem Verlust des mutierten *fyuA*-Gens mit Resten des Vektors kommen (gestrichelte Linie). In letzterem Fall verbleibt das intakte *fyuA*-Gen des Vektors im Genom des Mutaflor®-Stammes (C). ....40
- Abbildung 7: Nach Doppelrestriktion der Vektoren pJul1.A und pKAS32 *fyuA* mit den Enzymen *SalI* / *SstI* wurden die Produkte neben der ungeschnittenen Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen und das *fyuA*-tragende Insert (4,8 kb) sowie der geschnittene Vektor pJul1.A (5,5 kb) extrahiert. ....41
- Abbildung 8: Die Vektoren pJul1.A (A) und pKAS32 *fyuA* (B) wurden mit den Restriktionsenzymen *SalI* und *SstI* geschnitten. Das *SalI* / *SstI* *fyuA*-Fragment des pKAS32 *fyuA* wurde anschließend mit dem geschnittenen Vektor pJul1.A ligiert (C). ....42

- Abbildung 9: Der Ligationsansatz des Vektors pJul1.A und des *fyuA*-Inserts wurde nach Elektroporation in den Stamm S17-1  $\lambda$ pir und anschließend Plasmidpräp mit den Endonukleasen *SaII* und *SstI* geschnitten und das Produkt neben der ungeschnittenen Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen.....43
- Abbildung 10: Darstellung der Integration des pJul1.A *fyuA*-Vektors in das Mutaflor®-Genom nach Einfach-Rekombination durch Konjugation (A). Durch eine zweite Rekombination nach Sucroseexposition erfolgte ein Verlust des *fyuA::kan*-Fragmentes sowie von Resten des pJul1.A-Vektors mit dem *sacB*-Gen (gestrichelte Linie). Das intakte *fyuA*-Gen und das Chloramphenicol-Resistenzgen verblieben im Mutaflor®-Genom (B). .....44
- Abbildung 11: Anlagerung der Primer *fyuA*-start. for. seq und *fyuA*-stop. rev. seq. an das *fyuA*-Gen. Die Pfeile zeigen die Lage der Primer an. A) PCR amplifiziert das 2 kb-große *fyuA*-Fragment bei Mutaflor® und bei gelungener Mutaflor® *fyuA* Rekomentante. B) Bei Mutaflor® *fyuA* wird das 2,8 kb große *fyuA::kan*-Fragment amplifiziert. Nach Einfach-Rekombination mit dem intakten *fyuA*-Gen des pJul1.A *fyuA* werden beide Fragmente nachgewiesen. ....45
- Abbildung 12: Einsatz von 4 Klonen der Rekomentanten nach Sucroseselektion, sowie den Kontrollstämmen Mutaflor® und Mutaflor® *fyuA* in die PCR mit den Primern *fyuA*-stop.rev.seq. und *fyuA*-start.for.seq. ....46
- Abbildung 13: Nachweis des *irp1*- (A) und *fyuA*-Gens (B) in 8 *E. coli* Isolaten der natürlichen Darmflora mittels PCR. Als Kontrollstämme dienten *E. coli* Mutaflor® und *E. coli* DH5 $\alpha$ . ....48
- Abbildung 14: Rückisolierung von *E. coli* Mutaflor®, *E. coli* Mutaflor® *fyuA* (A), *E. coli* Mutaflor®, *E. coli* Mutaflor® *irp1* (B) nach oraler Koapplikation ( $10^7$  KBE) von C57/Bl6 Mäusen (n=10/d) und anschließender Darmlavage am Tag 3, 7, 14. Dargestellt sind die berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen der Keimzahl pro ml Gesamtdarminhalt am jeweiligen Versuchstag. \*P<0.05. ....49
- Abbildung 15: Rückisolierung von *E. coli* Mutaflor®, *E. coli* Mutaflor® *fyuA* rec (A), *E. coli* Mutaflor® *fyuA* rec, *E. coli* Mutaflor® *fyuA* (B) nach oraler Koapplikation ( $10^7$  KBE) von C57/Bl6 Mäusen (n=6/d) und anschließender Darmlavage am Tag 7, 14. Dargestellt sind die berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen der Keimzahl pro ml Gesamtdarm am jeweiligen Versuchstag. \*P<0.05. ....51
- Abbildung 16: Darstellung der mittleren Keimzahlwerte sowie Standardabweichungen rückisolierter *E. coli* Mutaflor®, *E. coli* Mutaflor® *fyuA*, *E. coli* Mutaflor® *irp1* pro g Darminhalt, Darmwand und adhärenente Zellen aus Dünndarm (A-C) und Dickdarm (D-F) am Tag 2, 8, 15 nach oraler Applikation ( $10^7$  KBE) bei C57/Bl6 Mäusen (n=8/Tag und Bakterienstamm). \*\*P<0,05. \*0,05<P<0,06. ....53
- Abbildung 17: Darstellung der mittleren Keimzahlwerte sowie Standardabweichungen rückisolierter *E. coli* Mutaflor®, *E. coli* Mutaflor® *fyuA*, *E. coli* Mutaflor® *rec* pro g Darminhalt, Darmwand und adhärenente Zellen aus Dünndarm (A-C) und Dickdarm (D-F) am Tag 2, 8, 15 nach oraler Applikation ( $10^7$  KBE) bei C57/Bl6 Mäusen (n=8/Tag und Bakterienstamm). \*\*P<0,05. \*0,05<P<0,06. ....54
- Abbildung 18: Harnwegsinfektion von C3H/HeN-Mäusen mit den UPEC-Stämmen U3366, *E. coli* 536 und dem apathogenen *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$ . 10 weiblichen C3H/HeN-Mäusen wurden transurethral je 10  $\mu$ l ( $10^7$  KBE) des jeweiligen Stammes appliziert, Niere und Blase am Tag 1 und 7 entfernt und die Keimzahl

- (KBE) pro g Gewebe bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen am jeweiligen Versuchstag. ....58
- Abbildung 19: Einsatz des UPEC-Stammes U3366 und der Kontrollstämme *E. coli* J724 RS218, *E. coli* J632 UPEC 76, *E. coli* J584 CP9 in die UPEC-VF-Multiplex-PCR nach Johnson & Stell, 2000. ....60
- Abbildung 20: Konstruktion des Suizidvektors pKAS32 *irp1::kan*. Die Pfeile zeigen die Lage der Primer an. ....61
- Abbildung 21: A) Konjugation des UPEC-Stammes U3366 mit dem *E. coli* Stamm S17-1<pKAS32 *irp1::kan*>. Hierbei ergibt sich die Möglichkeit einer Einfach- oder einer Doppel-Rekombination (B). Bei der Einfach-Rekombination sind 2 mögliche Integrationsschemata des Vektors dargestellt (1 A ,B), während bei der Doppel-Rekombination das intakte *irp1*-Gen gegen das mutierte *irp1::kan*-Gen ausgetauscht wird. ....62
- Abbildung 22: PCR-Nachweis der *irp1*-Mutation: PCR-Amplifikate von 6 U3366 *irp1* Klonen (1-6) wurden durch Gelelektrophorese getrennt und auf Existenz einer *irp1::kan*-Bande überprüft. Als Kontrollen dienten der Stamm U3366 (7) und S17-1<pKAS 32 *irp1::kan*> (8). ....63
- Abbildung 23: Bestimmung der Yersiniabaktinproduktion der Stämme UPEC U3366 *irp1*-Klon 1, 3, 4 und 5 im Vergleich zu den Kontrollen S17-1<pKAS32 *irp1::kan*> und UPEC Stamm U3366 nach 5 tägiger Inkubation in NBD-Medium mithilfe des Luciferase-Bioassays. Die Enzymaktivität der Luciferase wurde als emittiertes Licht der Wellenlänge 562 nm in einem Luminometer gemessen. Als Indikatorstamm diente der *S. enterica* Typhimurium Stamm WR 1542. Dargestellt sind die Mittelwerte einer durchgeführten Zweifachbestimmung und die Standardabweichungen. ....65
- Abbildung 24: A) Rekombination des Stammes U3366 *irp1* mit dem Suizid-Vektor pJul1.A Trim. B) U3366 *irp1* nach Einfach-Rekombination mit pJul1.A Trim. Gestrichelte Linien zeigen mögliche Deletionen nach 2. Rekombination durch Sucroseselektion. C) Verlust des Vektors pJul1.A Trim und pKAS32 *irp1::kan* durch Sucroseselektion und Entstehung der Rekombinantante U3366 *irp1* rec. ....67
- Abbildung 25: Integration eines Trimethoprim-Resistenzgen tragenden Transposons in das Chloramphenicol-Resistenzgen des Vektors pJul1.A. ....68
- Abbildung 26: Bestimmung der Yersiniabaktinproduktion der UPEC Stämme U3366 *irp1*, U3366, U3366 *irp1* rec im Vergleich zur Positivkontrolle *E. coli* Mutaflor® und der Negativkontrolle *E. coli* Stamm SCS 110 nach 6 tägiger Inkubation in NBD-Medium mithilfe des Luciferase-Bioassays. Die Enzymaktivität der Luciferase wurde als emittiertes Licht der Wellenlänge 562 nm in einem Luminometer gemessen. Als Indikatorstamm diente der *Salmonella enterica* Typhimurium Stamm WR 1542. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Doppelbestimmung und die Standardabweichungen. ....70
- Abbildung 27: *in vitro*-Bestimmung der Yersiniabaktinproduktion der UPEC Stämme U3366, U3366 *irp1* und U3366 *irp1* rec am Tag 0 und nach 5-tägiger Inkubation in den Medien LB, NBD, Urin bei 37°C mithilfe des Luciferase-Bioassays. Die Enzymaktivität der Luciferase wurde als emittiertes Licht bei der Wellenlänge 562 nm in einem Luminometer gemessen. Als Indikatorstamm diente der *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium Stamm WR 1542. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung und die Standardabweichungen. ....72
- Abbildung 28: *in vitro* Nachweis der Yersiniabaktinproduktion der UPEC Stämme U3366, U3366 *irp1* und U3366 *irp1* rec mithilfe des in CDHM-Agar eingegossenen Indikatorstammes *Salmonella enterica* Serotyp

Typhimurium Stamm WR 1542 nach 5-tägiger Inkubation. 8 µl der jeweiligen Urinkultur wurden auf Filterblättchen übertragen und bei 37°C inkubiert. Anfärbung (rot) des Bakterienwachstums erfolgte, wie in Material und Methoden beschrieben, durch Zusatz von Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung. ....	74
Abbildung 29: Nachweis der <i>in vivo</i> Yersiniabaktinproduktion der UPEC Stämme U3366, U3366 <i>irp1</i> und U3366 <i>irp1</i> rec mithilfe des in CDHM-Agar eingegossenen Indikatorstammes <i>Salmonella enterica</i> Serotyp Typhimurium Stamm WR 1542. 8 µl des von infizierten Mäusen gewonnenen Urins (Tag 3) wurde auf Filterblättchen, die auf CDHM-Platten aufgelegt wurden, übertragen und bei 37°C ÜN inkubiert.....	75
Abbildung 30: Keimlast infizierter C3H/HeN-Mäuse mit UPEC Stamm U3366 und der isogenen Mutanten U3366 <i>irp1</i> . 30 weiblichen C3H/HeN Mäusen wurden transurethral 10 µl U3366 oder U3366 <i>irp1</i> (10 <sup>7</sup> KBE) appliziert und am Tag 1, 3 und 7 Blase und Niere entnommen, homogenisiert und die Keimzahl pro g Gewebe bestimmt (A, B). Gleichzeitig wurde der Urin gewonnen und mit Hilfe der Neubauer Zählkammer der Gehalt neutrophiler Granulozyten pro ml Urin bestimmt (C). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen am jeweiligen Versuchstag. **P<0,05.....	78
Abbildung 31: Keimlast nach Infektion von C3H/HeN Mäusen mit UPEC Stamm U3366, dessen Mutante U3366 <i>irp1</i> und der Rekomentante U3366 <i>irp1</i> rec. 30 weiblichen C3H/HeN Mäusen wurden transurethral 20 µl U3366, U3366 <i>irp1</i> oder U3366 <i>irp1</i> rec (10 <sup>7</sup> KBE) appliziert und am Tag 1, 3 und 7 Blase und Niere entnommen, homogenisiert und die Keimzahl pro g Gewebe bestimmt (A, B). Gleichzeitig wurde der Urin gewonnen, die Keimzahl pro ml Urin bestimmt (C) und mithilfe der Neubauer Zählkammer der Gehalt neutrophiler Granulozyten pro ml Urin festgestellt (D). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen am jeweiligen Versuchstag. **P<0,05.....	80
Abbildung 32: Koinfektionsversuch U3366/U3366 <i>irp1</i> . Keimlast nach Infektion mit UPEC Stamm U3366 und der Mutante U3366 <i>irp1</i> . 30 weiblichen C <sub>3</sub> H/HeN-Mäusen wurden transurethral je 10 µl U3366 und U3366 <i>irp1</i> (10 <sup>7</sup> KBE) appliziert, am Tag 1, 3 und 7 Blase und Niere entnommen, homogenisiert und die Keimzahl KBE pro g Gewebe bestimmt (A, B). Gleichzeitig wurde der Urin gewonnen und die Keimzahl pro ml Urin bestimmt (C). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen am jeweiligen Versuchstag. **P<0,05.....	81
Abbildung 33: Koinfektionsversuch U3366 <i>irp1</i> rec/U3366 <i>irp1</i> . Keimlast nach Infektion mit UPEC Stamm U3366 <i>irp1</i> rec und der Mutante U3366 <i>irp1</i> . 30 weiblichen C3H/HeN-Mäusen wurden transurethral je 10 µl U3366 <i>irp1</i> rec und U3366 <i>irp1</i> (10 <sup>7</sup> KBE) appliziert, am Tag 1, 3 und 7 Blase und Niere entnommen, homogenisiert und die Keimzahl pro g Gewebe bestimmt (A, B). Gleichzeitig wurde der Urin gewonnen und die Keimzahl pro ml Urin bestimmt (C). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen am jeweiligen Versuchstag. **P<0,05.....	83
Tabelle 1 Bakterienstämme und Plasmide.....	16
Tabelle 2 Primer .....	19
Tabelle 3 Virulenzfaktoren bei UPEC Stamm U3366 .....	60
Tabelle 4 Luciferase-Quotient .....	72

## 10 Appendix

### 10.1 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Afa/draBC	Adhäsine der Afa/Dr-Familie
Ap	Ampicillin
Aqua dest.	Aqua destillata
<i>asnT</i>	Gen für Asparagin-t-RNA
AT	Adenin, Thymin
ATP	Adenosintriphosphat
au	absolut unit
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CFU	colony forming units
Cm	Chloramphenicol
CNF 1	Cytonekrosefaktor 1
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
d	Tag
DAEC	diffus adhärente <i>E. coli</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
dNTP	3'desoxy-Ribonukleosid-5'-triphosphat
DR	Direct Repeats
DSM	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen
DsRed	discosoma red fluorescent protein
DTT	Desoxy-Thymidintriphosphat
EAEC	enteroaggregative <i>E. coli</i>
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EIEC	enteroinvasive <i>E. coli</i>
EPEC	enteropathogene <i>E. coli</i>
<i>et al.</i>	und andere Autoren
ETEC	enterotoxische <i>E. coli</i>
F	Farad
Fa.	Firma
Fe	Eisen



<i>fimH</i>	Gen für Adhäsion Typ 1 Pili
<i>focG</i>	Gen für F1C-Fimbrien
Fur	ferric uptake regulation
<i>fyuA</i>	ferric yersiniabactin uptake
g	Gramm
Gfp	green fluorescent protein
h	Stunde
HCl	Salzsäure, Chlorwasserstoff
H-LT	hitzelabile Enterotoxine
Hly	Hämolysin
HMWP	high molecular weight protein
HPI	High Pathogenicity Island
H-ST	hitze stabile Enterotoxine
IbeA	Blut-Hirn-Schranke überwindendes Invasin
<i>int</i>	Integrase-Gen
<i>irp</i>	iron repressible protein
IS	Insertionselemente
i.v.	intravenös
K	Kilo
kb	Kilobasenpaare
KBE	koloniebildende Einheit
kDa	Kilodalton
KGW	Kilogramm Körpergewicht
Kn	Kanamycin
Konz.	konzentriert
L	Liter
<i>lac</i>	Gen für $\beta$ -Galactosidase
LB	Luria Bertani broth
log	Logarithmus
LPS	Lipopolysaccharide
<i>luc</i>	Luciferase-Gen
$\mu$	Mikro
m	Milli
M	Molar (= mol pro l)
MgCl	Magnesiumchlorid
MH	Mueller-Hinton
min	Minute
Mio	Millionen
Mrd	Milliarden
<i>mob</i>	Mobilitäts-Gen
NaClO <sub>4</sub>	Natriumperchlorat
Nal	Nalidixin
NaOH	Natriumhydroxid
NBD	2,2'-Dipyridyl Nutrient broth
nm	Nanometer
NTEC	nekrotoxische <i>E. coli</i>
ori	origin of replication
PAI	Pathogenitätsinsel
PBS	Phosphat buffered saline, Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
pH	potentia Hydrogenium
pgm	Pigmentation Locus in <i>Y. pestis</i>

psn	Pesticin-Sensitivität
Rif	Rifampicin
<i>rpsL</i>	Streptomycin-Empfindlichkeits-Gen, kodiert das ribosomale Protein S12
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
<i>sacB</i>	Saccharose-Empfindlichkeits-Gen ursprünglich aus <i>Bacillus subtilis</i> isoliert
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
<i>sfa/foc DE</i>	Gen für sialosyl-spezifisches Adhäsion
<i>sfaS</i>	Gen für S-Fimbrien-Adhäsion
SLT	Shiga-like toxin
s.o.	siehe oben
<i>sp.</i>	Spezies
STEC	Shiga-Toxin-bildende <i>E. coli</i>
Str	Streptomycin
s.u.	siehe unten
Stx	Shiga Toxin
Tab.	Tabelle
t [d]	Zeit (in Tagen)
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Tc	Tetracyclin
Tm	Schmelztemperatur von Nukleinsäuren; entspricht der Temperatur, bei der 50 % Helices denaturiert sind.
Tp	Trimethoprim
<i>tra</i>	Transfer-Gen
<i>traT</i>	Gen für Serumresistenz
Trim	Trimethoprim
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Unit (Einheit)
u.a.	unter anderem
Upm	Umdrehung pro Minute
ÜN	über Nacht
UPEC	uropathogene <i>E. coli</i>
UV	ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
<i>vir</i>	Virulenz-Gen
WHO	World Health Organisation, Weltgesundheitsorganisation
Ybt	Yersiniabaktin
YbtA	Regulatorprotein
<i>ybtE</i>	<i>irp5</i> -homolog in <i>Y. pestis</i>
<i>ybtT</i>	<i>irp4</i> -homolog in <i>Y. pestis</i>

## 10.2 Lebenslauf

Name:	Kahl, geb. Joschko	
Vorname:	Kristin Natalie	
Straße:	Neustätterstr. 1	
Wohnort:	80636 München	
Geburtsdatum:	14.05.1975	
Geburtsort:	Heidelberg	
Staatsangehörigkeit:	deutsch	
Schulbildung:	1981-1984	Grundschule Neukirchen-Vluyn
	1984-1985	Grundschule Elze
	1985-1988	Christophorus-Gymnasium Elze
	1988-1994	Hermann-Billing-Gymnasium Celle
Studium:	1994-2001	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
Approbation:	16.05.2001	Approbation als Tierarzt
Dissertation:	seit 06.2001	Beginn der vorliegenden Arbeit am Max v. Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der LMU München. Bewilligung eines Stipendiums im Rahmen des Graduiertenkollegs "Infektion und Immunität".

### 10.3 Danksagung

#### Vielen Dank...

....an alle die zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ganz besonders möchte ich mich bedanken bei

**Herrn Professor Dr. Oskar-Rüger Kaaden**, der die Durchführung dieser Arbeit ermöglichte, und stets voll und ganz unterstützte,

**Herrn Professor Dr. Dr. Jürgen Heesemann** für die freundliche Aufnahme in seinem Institut und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Rahmen des Graduiertenkollegs "Infektion und Immunität",

**Herrn Dr. Sören Schubert**, der diese Arbeit betreute, für seine Ideen, sein entgegengebrachtes Vertrauen, seinen Enthusiasmus und seine stetige Unterstützung und Hilfsbereitschaft,

meiner Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit, dem tollen Arbeitsklima und sämtliche wertvollen Ratschläge und hilfreichen Tipps. Insbesondere Johanna für die Weitergabe ihrer fundierten mikrobiologischen Kenntnisse und die aufmunternden Mittagspausen, Severin für ihre immer fröhliche und hilfsbereite Art sowie sämtliche lösende Lachkrämpfe und Kirsten für ihre stetigen tapferen Hilfeleistungen und die netten Stunden beim Sport!

Jeanette und der ganzen Arbeitsgruppe Rüssmann für die Bereitstellung ihrer Laborutensilien und die freundliche Einarbeitung in neue Arbeitstechniken,

Christian, Silke und Trixi für die reibungslose Zusammenarbeit im Tierstall....und den Mäusen, die sich einen guten Zweck opfern mussten..,

allen anderen Mitarbeitern des Instituts für ihre entgegengebrachte Hilfsbereitschaft,

meiner Familie und Valentin für die Unterstützung und Ermutigungen.