

Aus dem
Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Untersuchungen zur geno- und phänotypischen Charakterisierung der aviär
pathogenen *E. coli* (APEC)-Mutante M12A09, die eine Transposoninsertion im Gen
pyrD trägt**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Katja Pamela Luarca de Alt
Tierärztin aus Guatemala

Berlin 2008

Journal Nr. 3258

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.- Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Lothar H. Wieler
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Klaus Osterrieder
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Heribert Hofer

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Escherichia Coli, pathogenicity, pathogenesis, microbial flora, virulence,
diagnosis, disease control, disease prevention, epidemiology, fowls, poultry,
phenotypes, mutagenesis, dna transposable elements (MeSH)

Tag der Promotion: 16.02.09

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-660-5

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2008

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written
authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© **mensch und buch** verlag 2009

choriner str. 85 - 10119 berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Para mi familia

Inhalt

1	Einleitung	1
2	Schrifttum	3
2.1	Allgemeines zu Infektionen mit aviär pathogenen <i>E. coli</i> (APEC)	3
2.1.1	Symptome, Übertragung und Prophylaxe.....	3
2.1.2	Virulenzmerkmale und Verwandtschaft mit anderen extraintestinal pathogenen <i>E. coli</i> (ExPEC)	4
2.2	Erreger-Wirt-Interaktion und Relevanz von sog. „Housekeeping“-Genen für die Pathogenität von Mikroorganismen	6
2.2.1	Einleitung	6
2.2.2	Molekulare Techniken für den Nachweis von essentiellen Genen für Virulenz, Vitalität und Fitness von Mikroorganismen	8
2.2.2.1	IVET/RIVET und DFI.....	8
2.2.2.2	STM	11
2.2.2.3	GAMBIT	13
2.2.2.4	IVIAT	14
2.2.2.5	SCOTS	16
2.2.3	Rolle von „Housekeeping“-Genen für die Ausprägung der APEC-Infektion beim Geflügel	17
2.3	<i>De novo</i> Biosynthese der Pyrimidine und die essentielle Rolle der daran beteiligten Gene in der Virulenz von Mikroorganismen	18
2.3.1	Allgemeines	18
2.3.2	Essentielle Rolle der einzelnen Gene der <i>de novo</i> Biosynthese der Pyrimidine 20	
3	Versuchstiere und embryonierte Hühnereier	24
3.1	SPF-Hühner und embryonierte SPF-Hühnereier	24
4	Material	25
4.1	Verwendete Bakterienstämme und Plasmide	25
4.2	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	27
4.3	Kits, Enzyme, Marker, Nährmedien und Lösungen	27
4.3.1	Verwendete Kits	27
4.3.2	Enzyme und Marker	28
4.3.3	Nährmedien	28

4.3.4	Lösungen	30
4.3.4.1	Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese	30
4.3.4.2	Lösungen für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	30
4.3.4.3	Lösungen für die DNS-DNS-Hybridisierung.....	31
4.3.4.4	Sonstige Lösungen	32
4.4	Oligonukleotid-Primer und DNS-Sonden	33
4.4.1	Oligonukleotid-Primer für die PCR-Amplifikation	33
4.4.2	Oligonukleotidsonden für die DNS-DNS-Hybridisierung	36
4.5	Verwendete Computerprogramme	36
5	Methoden	37
5.1	Anzucht und Stammhaltung der Bakterien.....	37
5.2	Erstellung einer Cosmidbank des APEC-Stammes IMT5155.....	37
5.3	Isolierung von Nukleinsäuren.....	39
5.3.1	DNS-Isolierung.....	39
5.3.1.1	Phenol:Chloroform-Extraktion für Gram-negative Bakterien	39
5.3.1.2	Hitzelyse	39
5.3.2	RNS-Isolierung.....	40
5.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	41
5.4.1	Diagnostische Multiplex-PCR für APEC-Stämme	43
5.4.2	Arbitrary PCR.....	44
5.5	Reverse Transkription von Gesamt-RNS und Amplifizierung von cDNS.....	46
5.6	Pulsfeld-Gelelektrophorese	47
5.7	DNS-DNS-Hybridisierung	48
5.7.1	Herstellung von DNS-Sonden mittels PCR.....	48
5.7.2	Southern Blot	49
5.7.3	Dot Blot	50
5.7.4	DNS-DNS-Hybridisierungsvorgang und Visualisierung.....	50
5.8	Agarose-Gelelektrophorese	50
5.9	Klonierung.....	51
5.10	Wachstumsanalysen	52
5.10.1	Wachstumskurven und Keimzahlbestimmungen	52
5.10.2	Supplementierungstests.....	53
5.10.3	<i>In vitro</i> Konkurrenztest („ <i>In vitro</i> Competition Assay“)	53

5.11	Komplementierung <i>in trans</i>	54
5.12	Infektionsversuche	57
5.12.1	Hühnerembryonen-Letalitätstest [“Chicken Embryo Lethality Assay” (ELA)].....	57
5.12.2	Infektionsversuch im Hühnerinfektionsmodell.....	58
6	Ergebnisse	60
6.1	Genotypische Charakterisierung der Mutante M12A09	60
6.1.1	Nachweis relevanter, virulenzassoziierter Gene	60
6.1.1.1	Diagnostische Multiplex-PCR.....	60
6.1.1.2	DNS-DNS-Hybridisierungsergebnisse.....	60
6.1.2	Detektion des mutierten Genlocus in M12A09.....	61
6.1.2.1	Lokalisation des Transposons in M12A09 und Klonierung der flankierenden Bereiche in den Vektor pUC18	61
6.1.2.2	Arbitrary PCR.....	63
6.1.2.3	Computergestützte Sequenzanalyse.....	63
6.1.2.3.1	Sequenzdatenabgleich	63
6.1.2.3.2	Primerdesign.....	65
6.1.2.4	Screening der Cosmidbank des Stammes IMT5155 und PCR zur Ermittlung der Insertionsstelle des Transposons	65
6.1.3	Transkriptionsstudien	66
6.1.3.1	Transkriptionsstudien <i>in vitro</i>	66
6.1.3.2	Transkriptionsstudien <i>in vivo</i>	68
6.2	Phänotypische Charakterisierung der Mutante M12A09	68
6.2.1	Wachstumsanalysen in LB-Medium	68
6.2.1.1	Wachstumskurven und Keimzahlbestimmung in LB-Medium	68
6.2.1.2	<i>In vitro</i> Konkurrenztest („ <i>In vitro</i> Competition Assay“)	70
6.2.2	Wachstumsverhalten in M9+-Medium und Hühnerserum	70
6.2.3	Supplementierung von M9+-Medium mit Orotat	73
6.2.4	Komplementierung <i>in trans</i>	74
6.2.4.1	Klonierung des Gens <i>pyrD</i> und seines Promotors in verschiedene Vektoren	74
6.2.4.2	Wachstumsverhalten in M9+-Medium	75
6.2.5	Charakterisierung der Mutante M12A09 <i>in vivo</i>	77
6.2.5.1	Hühnerembryonen-Letalitätstest [“Chicken Embryo Lethality Assay” (ELA)].....	77
6.2.5.2	Charakterisierung der Virulenz von M12A09 im Hühnerinfektionsmodell.....	78
7	Diskussion	81
7.1	Die Mutante M12A09 besitzt eine durch die Insertion des Transposons hervorgerufene Unterbrechung im Gen <i>pyrD</i>	82
7.1.1	Klonierung und arbitrary PCR	82
7.1.2	Sequenzdatenabgleich.....	83
7.1.3	Reverse Transkriptase-PCR	85

7.2	Charakterisierung der Mutante M12A09 <i>in vitro</i>	88
7.2.1	M12A09 ist auxotroph und die Supplementierung des Minimalmediums mit Orotat führt zu einer Normalisierung des Wachstums	88
7.2.2	Die Transkomplementierung auf einem low-copy Plasmid gleicht das Wachstum der Mutante dem des Wildtypstammes weitgehend an	89
7.3	Charakterisierung der Mutante M12A09 <i>in vivo</i>	89
7.3.1	Die Mutante M12A09 ist nach der Klassifizierung im Hühnerembryonen-Letalitätstest [„Embryo Lethality Assay“(ELA)] hoch pathogen	89
7.3.2	<i>PyrD</i> ist essentiell für das Auslösen der APEC-Infektionskrankheit im systemischen Hühnerinfektionsmodell	93
7.3.3	Vorschlag für die Ermittlung der protektiven Eigenschaften der APEC Mutante M12A09	97
8	Zusammenfassung	99
9	Summary	100
10	Literaturverzeichnis	101
	Danksagung.....	120
	Selbständigkeitserklärung.....	121

1 Einleitung

Aviäre pathogene *E. coli* (APEC) verursachen unterschiedliche Krankheitsbilder, wovon alle Wirtschaftsgeflügelarten betroffen sind (Huhn, Pute, Ente und Gans) (179). Bei einer Infektion erkranken die Tiere je nach Alter an Entzündungen von Luftsack, Herzbeutel, Bauchfell, Eileiter, Bindegewebe, Auge, Hirnhäuten, Gelenken, Knochenmark, Dottersack, und nach einer Primärinfektion mit dem Turkey-Rhinotracheitis-Virus auch am sog. „Swollen Head Syndrome“ (12, 58). Am bedeutendsten ist jedoch die Infektion des Respirationstraktes bei 2 bis 12 Wochen alten Tieren, häufig gefolgt von einer perakut oder akut verlaufenden Septikämie, die sich durch eine hohe Morbidität und Letalität auszeichnet. Die Infektionskrankheit ist für starke wirtschaftliche Verluste in der Geflügelindustrie verantwortlich, da die Bekämpfung des Erregers durch unterschiedliche Faktoren nach wie vor erschwert ist. Eine erfolgreiche serotypenübergreifende Impfung ist bisher nicht gelungen, da der Erreger keine Kreuzimmunität hervorruft, sodass heutzutage stallspezifische Vakzinen fast ausschließlich zum Einsatz kommen. Andererseits hat der unsachgemäße Einsatz von Antibiotika vermehrt zu Multiresistenzen geführt und die Therapie bei APEC-Ausbrüchen erschwert.

Zahlreiche Untersuchungen konnten bisher viele Mechanismen über die Entstehung dieser facettenreichen Infektionskrankheit erklären, die unter Feldbedingungen üblicherweise mit hoher Morbidität und geringer Mortalität verläuft (139). Einige Schritte in der Pathogenese bleiben jedoch ungeklärt und der Erklärungsbedarf ist enorm gestiegen, da Studien zur Verwandtschaft zwischen extraintestinal pathogenen *E. coli* (ExPEC) keine eindeutige Differenzierung der APEC zu anderen humanen pathogenen *E. coli* ergaben und somit der potenzielle Zoonosecharakter des Erregers feststeht (124, 131).

Die Studie von Li *et al.* (2005) (102) trug dazu bei, Näheres über die Faktoren, die an der Pathogenese der APEC-Infektionskrankheit beteiligt sind, zu erfahren. Hierfür wurden über 2000 Mutanten eines hoch pathogenen Feldisolates, des Stammes IMT5155 durch „Signature-tagged Transposon Mutagenesis“ (STM) kreiert und im Hühnerinfektionsmodell geprüft. Die Ergebnisse der Sequenzdatenanalyse der Transposoninsertionsstelle von über 20 attenuierten Mutanten mit Defekten in Genen aus unterschiedlichen Bereichen und mit unbekanntem Funktionen sind bereits dokumentiert (102).

Um die Sequenzanalyse der durch die STM zahlreich entstandenen Mutanten zu erleichtern, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Genbibliothek des Stammes IMT5155 konstruiert. Weiterhin sollte eine weitere attenuierte STM-Mutante, M12A09, charakterisiert werden. Bei dieser wurde, wie bei den bereits beschriebenen Mutanten angenommen, dass die zufällige Insertion eines Transposons einen für die Ausprägung der APEC-Infektionskrankheit essentiellen Genlocus inaktiviert hat. In dieser Arbeit sollte beschrieben werden, wie die

Transposoninsertionsstelle bei M12A09 identifiziert und die Mutante geno- und phänotypisch mit unterschiedlichen Methoden näher charakterisiert wurde. Die Grundlage dafür sollten sowohl konventionelle als auch moderne molekular biologische Techniken bilden, die eine Charakterisierung des Erregers *in* sowie *ex vivo* erlauben, um eventuelle Zusammenhänge zwischen diesen Bereichen aufzudecken. Die Arbeit soll zum besseren Verständnis der Pathogenese der APEC-Infektionskrankheit beitragen und mögliche Angriffspunkte bei der Bekämpfung der Erkrankung liefern.

2 Schrifttum

2.1 Allgemeines zu Infektionen mit aviär pathogenen *E. coli* (APEC)

2.1.1 Symptome, Übertragung und Prophylaxe

Infektionen mit aviär pathogenen *E. coli* (APEC) rufen einen Krankheitskomplex hervor, der überwiegend bei Hühnern und Puten, aber auch bei anderem Geflügel beschrieben wird. Damit assoziiert werden zahlreiche Erscheinungsbilder, wie Aerosacculitis, Pericarditis, Perihepatitis, Peritonitis, Omphalitis, „Swollen Head Syndrom“ (SHS), Granulomatose, Salpingitis, Synovitis, Cellulitis oder Septikämie u.a. (12). Am schwerwiegendsten verläuft die Septikämie, die sich dann entwickeln kann, wenn die Erreger nach Infektion des Luftsackes, vermutlich in den Gasaustauschregionen der Lunge, in die Blutbahn gelangen (143) und eine systemische Infektion mit übergreifenden Entzündungen in den inneren Organen hervorrufen.

Die Erregerübertragung geschieht überwiegend aerogen über die Einatmung von mit Fäzes kontaminierten Staubpartikeln (32, 58) sowie nach dem Eindringen des Erregers durch die verschmutzte Schale von Eiern (12). Primärinfektionen mit Viren (Newcastle Disease Virus, Infektiöse Bronchitis Virus, Turkey Rhinotracheitis Virus) oder Mykoplasmen und schlechte Haltungsbedingungen (hohe Ammoniakkonzentrationen in der Stallluft, Staub, ungeeignete Luftfeuchtigkeit, schlechte Ventilation, hohe Haltungsdichte) begünstigen den Ausbruch und die Verbreitung der Infektionskrankheit (32, 196).

In der Wirtschaft verursachen Infektionen mit APEC hohe Verluste durch die mit der Krankheit einhergehenden Produktions- und Leistungsabfälle, Tierkörperbeanstandungen sowie hohe Morbiditäts- und Mortalitätsraten (12, 58, 122). Am stärksten betroffen sind Hühner, Puten und Enten im Alter zwischen 4 und 12 Wochen (93). Die Erkrankung des Respirationstraktes führt bei 4-9 Wochen alten Tieren zu verminderten Wachstumszunahmen und gestörter Fütterungseffizienz mit Mortalitätsraten von bis zu 20% (32).

Mit APEC-Ausbrüchen werden hauptsächlich die Serogruppen O1, O2 und O78 (14, 24, 152, 179) assoziiert, jedoch variieren diese Zuordnungen je nach Lokalisation, und viele der isolierten Erreger lassen sich nur schwer oder gar nicht serotypisieren (12, 152, 153). Weder Virulenz noch Schutz gegen diese Erkrankung korrelieren mit O- und K-Serum-Agglutininen (71). Somit sind es hauptsächlich die klinischen sowie pathologischen Symptome einerseits, sowie phäno- und genotypische Merkmale des extraintestinal isolierten Erregers andererseits, die zu einer Identifizierung eines APEC führen (12, 29, 40).

Zahlreiche Vakzinierungsversuche gegen aviär pathogene *E. coli* sind dokumentiert worden. Allerdings wird Kreuzimmunität üblicherweise nicht unter *E. coli* Serotypen des Geflügels beobachtet, ein Zustand, der die Entwicklung von effektiven Protektiva gegen die APEC-Infektion deutlich erschwert (7, 28). Unter anderem wurden Impfstoffe mit *E. coli*-Bakterien als Grundlage (28) oder multivalente Pilusvakzinen (59) für die subkutane Applikation getestet. Diese gewährleisteten einen Schutz gegen homologe Stämme. In Puten konnte eine Lebendvakzine nach intratrachealer oder intramuskulärer Applikation im Gegensatz zu hitze- oder formalinaktivierten Impfstoffen eine protektive Immunität hervorrufen (7). Eine patentierte Temperatur-sensitive Mutante von *E. coli* wurde genutzt, um Hühner erfolgreich zu impfen, allerdings ist ihre Sicherheit unter Feldbedingungen wegen der hohen Reversionsraten zweifelhaft (126). Derzeit kommen fast ausschließlich bestandsspezifische Vakzinen zum Einsatz, da es kaum gute Alternativen auf dem Markt gibt.

In einer Studie von Kariyawasam *et al.* (2004) wurden drei isogene Deletionsmutanten des hoch virulenten APEC-Stammes EC99 (O78) mit Defekten in Genen des zentralen Stoffwechsels (*galE*, *purA*, und *aroA*) und auf ihre Protektivität hin untersucht (84). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass $\Delta galE$ -, $\Delta purA$ - und $\Delta aroA$ -Mutanten sicher sind und eine moderate Immunität gegen APEC-Infektionen hervorrufen, allerdings ist der Schutz serovarspezifisch. Immunisierungsversuche mit den zuckerbindenden Domänen der Adhäsine von Typ 1-Fimbrien, FimH156 und PapGII, riefen nach intramuskulärer Injektion eine starke IgG-Immunität in Hühnern hervor. Allerdings konnten nach einem Challenge mit dem Wildtyp keine protektiven Eigenschaften registriert werden (190, 191). Fusionsproteine des Serumresistenz-Proteins Iss werden derzeit nach ihrem Potenzial als Vakzine untersucht, nachdem vorläufige Studien darauf hindeuten, dass deren subkutane Applikation die durch APEC hervorgerufenen Läsionen vermindert (106). Ein effektiver Serotypen-übergreifender Schutz gegen APEC-Infektionen ist bisher jedoch nicht identifiziert worden.

2.1.2 Virulenzmerkmale und Verwandtschaft mit anderen extraintestinal pathogenen *E. coli* (ExPEC)

Seit den ersten Studien über Pathomechanismen von APEC in den 60er und 70er Jahren (175, 177) haben viele Autoren mit neuen Erkenntnissen dazu beigetragen, das Verständnis über die Entstehung und Verbreitung dieser Krankheit zu erweitern. Moderne Molekulare Techniken ermöglichten die Identifizierung von ganzen Genbereichen, die eine Differenzierung zwischen dem Genom eines APEC und dem eines apathogenen kommensalen *E. coli* ermöglichten. So führten Brown und Curtiss bereits 1996 eine genomische Subtraktion zwischen dem APEC $\lambda 7122$ (O78:K80:H9) und dem *E. coli* K-12 Stamm $\lambda 289$ durch und identifizierten im pathogenen Stamm 12 virulenzassoziierte Regionen (17). Stocki *et al.* (2002) verwendeten die Methode der „Suppression Subtractive

Hybridization“ (SSH) und subtrahierten das Genom des apathogenen *E. coli* K12-Stammes MG1655 von zwei APEC-Stämmen (181). Sie fanden 62 Fragmente, die typisch für die aviären Stämme waren und konnten in einem Vergleich mit einer Stammsammlung 9 dieser Fragmente den aviär pathogenen *E. coli* zuordnen. Zahlreiche Virulenzfaktoren, die zum Auslösen der Krankheit beitragen, sind bisher erkannt und sowohl *in* als auch *ex vivo* untersucht worden. Dazu zählen Adhäsine, wie F- und P-Fimbrien, Curli und das Temperatur-sensitive Hämagglutinin (Tsh); Eisen-akquirierende Systeme, wie das Enterobactin, das Aerobactin und das Yersiniabactin; Hämolytine, wie das HlyE und das Tsh; Anti-Wirtsabwehrsysteme, wie das Iss-Protein; Lipopolysaccharide (LPS), die K1-Kapsel und die Produktion von Colicin V; invasive Determinanten, wie das IbeA, sowie mehrere Toxine (Hitze-stabiles Toxin, Zytotoxin/Verotoxin, Flagellatoxin und vakuolisierendes-autotransporter Toxin) (9, 15, 35, 37, 38, 56, 70, 112, 124, 129, 130, 144, 152, 185, 195, 199). Die Präsenz großer Konjugationsplasmide und der Gene (*iss*, *tsh*, *cvaA/B*, *iutA*, *iroN*, und *sitA*, u.a.), die sie beherbergen, wird viel stärker mit *E. coli*-Isolaten, die aus krankem Geflügel stammen, als mit solchen aus Fäzes gesunder Tiere assoziiert (80, 81, 129, 130, 141, 152, 153, 158, 171). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass ColV-Plasmide aviären und kommensalen *E. coli* Virulenz verleihen und in Fällen extraintestinaler, menschlicher Krankheiten involviert sind (1, 37, 170, 171). Aktuell wird über Faktoren, die möglicherweise zur Virulenz der APEC beitragen, berichtet. Solche sind beispielsweise afimbriale Plasmid-kodierte Adhäsine; putative Regulatoren und Transporter, involviert in der Akquirierung von unterschiedlichen Metallionen, wie *yjiQ*, *sitABCD*, *mntH* und *feoB*; *bor*, welches in der Serumresistenz involviert sein könnte (101, 107, 152, 157, 159, 180). Die Rolle dieser und länger bekannter Virulenzfaktoren in der Pathogenese der APEC-Infektionen ist jedoch in manchen Fällen immer noch unklar und umstritten, und wiederum nicht alle Schritte der Erkrankung lassen sich mit den bisher identifizierten Faktoren erklären (12, 32, 34, 40, 136). Ein definierter, eindeutiger Pathotyp, also ein bestimmter Satz von Virulenzfaktoren, der eine Gruppe von Erregern mit der Eigenschaft der APEC Krankheit auszulösen assoziiert, konnte bis heute für die aviär pathogenen *E. coli* nicht etabliert werden (153).

Viele Serotypen unter den APEC kommen bei anderen extraintestinal pathogenen *E. coli* (ExPEC) in Zusammenhang mit menschlichen Krankheiten vor, wie Neugeborenen-Meningitis und Harnwegsinfektionen (77, 78, 152). Die Genome eines repräsentativen APEC-Stammes APEC_O1 (O1:K1:H7, Acc. No. CP000468) und dreier humaner uropathogener *E. coli* (UPEC) Stämme wurden in einer Studie miteinander verglichen, bei der nur 4,5% des APEC-Genoms nicht in anderen ExPEC Stämmen identifiziert werden konnten. Die Anwendung des „Multilocus Sequence Typing“ (MLST) zur phylogenetischen Typisierung zeigte, dass manche humane ExPEC Genome mehr Ähnlichkeiten mit dem APEC_O1-Stamm (O1:K1:H7) als mit anderen menschlichen ExPEC und apathogenen

E. coli besaßen (79). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine genetische Grundlage für die Einteilung in wirts- oder syndromspezifische Pathotypen innerhalb der ExPEC-Gruppe nicht vorhanden ist.

Die Verteilung bestimmter virulenzassoziierter Gene auf APEC, UPEC und Neugeborenenmeningitis verursachende *E. coli* (NMEC) wurde analysiert, mit dem Ergebnis, dass die meisten chromosomal lokalisierten Gene in allen Stämmen weit verbreitet sind (41). Gene, die auf dem ColV-Plasmid lokalisiert sind (*tsh*, *iucD*, *iroN*, *cvi/cva*, *iss* und *traT*) zeigten bei APEC eine höhere Prävalenz, wodurch eine Funktion als Donor von ColV-virulenzassozierten Faktoren für andere ExPEC in Betracht kommt. Analysen über die Zugehörigkeit von ExPEC-Stämmen zu O-Gruppen oder ihre Zuordnung zu den Gruppen der *E. coli* Referenzstammsammlung (ECOR) für die Einteilung in die als klonale Populationsgruppen bezeichneten Gruppen A, B1, B2 und D, erlaubten keine klare Unterscheidung zwischen diesen Pathotypen (124, 131). In diesen Studien, die die Verwandtschaft von extraintestinalen pathogenen *E. coli* (ExPEC) untersuchen, wird postuliert, dass Geflügel möglicherweise als Überträger oder sogar als Reservoir für *E. coli* dient, die in der Lage sind, Neugeborenenmeningitis und Harnwegsinfekte beim Menschen hervorzurufen, wodurch der potenzielle Charakter eines Zoonoseerregers für APEC in Frage kommt.

2.2 Erreger-Wirt-Interaktion und Relevanz von sog. „Housekeeping“-Genen für die Pathogenität von Mikroorganismen

2.2.1 Einleitung

Krankheit ist nur ein Ergebnis der vielen möglichen, wenn ein Mikro- und ein Wirtsorganismus zusammengebracht werden. Erreger-Wirt-Interaktionen können von Eliminierung des Erregers, Kolonisierung, Kommensalismus über den Zustand der Latenz bis hin zum Tode des Wirtes reichen (21). Die Begriffe „Virulenz“ und „Pathogenität“ sind nicht eindeutig definiert. Früher sah man diese als intrinsische Eigenschaften an, obwohl sie schon immer weder als unvariabel noch als absolut erkannt wurden. Bail und Rosenow (1907) haben Anfang des 20. Jahrhunderts unabhängig voneinander die Theorie der Aggressine und Viruline als mikrobielle Produkte aufgestellt, die dem Erreger die Besiedlung des Wirtes erlauben. Rosenows Virulin war eine aus virulenten Pneumokokken extrahierte Substanz, die avirulenten Pneumokokken virulente Eigenschaften verlieh, wenn sie mit diesen vermischt wurde (156). Smith (1913) postulierte, dass Pathogene mit „defensiven“ und „offensiven“ Funktionen ausgestattet sind, die sie von nicht-Pathogenen unterscheiden. So sah er den Diphtherie-Erreger als offensiv an, weil er die Mucosa des Wirtes schädigen und sich so ausbreiten kann, während Tuberkulose-Erreger primär defensiv sind und im Wirtsgewebe persistieren (178). Zinsser (1914) klassifizierte Mikroorganismen etwas

differenzierter in drei Gruppen: (i) pure Saprophyten, die sich nicht in lebenden Geweben ansiedeln können; (ii) pure Parasiten, die sich leicht in normalen Wirten ansiedeln können und (iii) Halb-Parasiten mit geringer Invasivität, die nur unter gewissen Bedingungen eine Infektion hervorrufen können (203). Ford (1927) definierte Virulenz als Infektiösität oder die Fähigkeit eines Mikroorganismus sich innerhalb des Körpers zu vermehren und unterschied sie von Toxizität, die von toxischen Organismen hervorgeht (50). Die Terminologie wurde noch komplexer, als man annahm, dass Virulenz abhängig von untereinander unabhängigen Variablen ist, wie Aggressivität, Invasivität, Infektivität, Toxigenität und Kommunikabilität (193). Mitte des 20. Jahrhunderts war die Idee, dass Virulenz alleine vom Erreger ausgeht, weitestgehend veraltet und man definierte Virulenz im Kontext zur Erreger-Wirt-Interaktion neu (193). Hoeprich führte 1983 den Begriff der Hypersensitivität ein, die vom Wirt ausgeht und ihn für manche Mikroorganismen empfänglich macht, womit er Virulenz mit der Wirtsantwort in Verbindung brachte (68). Mit dem Fortschritt der Technologie konnten molekulare Unterschiede zwischen pathogenen Mikroorganismen und Kommensalen aufgedeckt werden, die ersteren die Ansiedlung im Wirt erlauben (47). 1988 erklärte Falkow mit seinen „molekularen Koch’schen Postulaten“, dass bakterielle Pathogenität auf der Existenz von Genen basiert, die für das Auslösen einer Krankheit verantwortlich sind (42).

Die Stabilität des mikrobiellen Genoms befindet sich ständig unter dem Einfluss von horizontalem Gentransfer, Rekombination und DNS-Schädigungen. Mechanismen für eine schnelle Variation des Genoms und dessen Adaptation sind Voraussetzungen für die mikrobielle Fitness und das Überleben in sich rasch verändernden Kompartimenten. Das Verständnis der mikrobiellen Pathogenität, des horizontalen Gentransfers und der DNS-Reparatur-Mechanismen erfordert daher eine interdisziplinäre Herangehensweise von Molekularbiologie, Genomik und bakterieller Physiologie, um die Balance zwischen zellulärer Fitness zum Überleben und zur Krankheitsentstehung zu begreifen (186).

Unter Laborbedingungen lässt sich die komplexe Interaktion zwischen Mikroorganismen und ihren Wirten nur begrenzt untersuchen. Es ist möglich das Verhalten von Bakterien in verschiedenen aus Lebewesen gewonnenen Medien wie Blut, Serum oder Zellen zu analysieren, wie sie auf die Zufuhr von bestimmten Zusätzen oder auf Reize (Temperatur-, pH-, Osmolaritätsänderungen, etc.) reagieren und wie sie zum Beispiel in Makrophagen eindringen und überleben (18, 52, 116, 119, 120, 133). Solche Untersuchungen haben in großem Maße dazu beigetragen, das Verständnis der Virulenz von Mikroorganismen zu erweitern. Einen genaueren Blick in die Prozesse, die während einer Infektion stattfinden und die Dynamik einer Krankheit determinieren, unter Berücksichtigung der Erreger-Wirt Interaktion, erlaubt jedoch nur das Tiermodell als selektives Medium oder als Surrogat dafür die Zellkultur (26, 43). Vor einigen Jahren wurden diese Medien dazu benutzt, die Interaktion zwischen Wirt und Krankheitserreger durch makro- und mikroskopische Veränderungen zu

untersuchen. Mittlerweile ist es möglich, die Genexpression von Mikroorganismen während der Infektion von Tieren oder Zellen qualitativ und quantitativ zu analysieren. Damit sind ganz neue Ebenen in der Analyse der Pathogenität eines Erregers einsehbar geworden.

Die Fähigkeit eines Pathogens, eine Krankheit in einem Wirt hervorzurufen, also seine Pathogenität, hängt von der Fitness und Virulenz desselben ab, wobei mit Fitness der Grad der Anpassung an einen von außen gegebenen Zustand gemeint ist. Mikrobielle Pathogenität lässt sich als Eigenschaft definieren, die die Ausbreitung und Persistenz in Nischen des Wirtsorganismus ermöglicht, die für Kommensale unzugänglich sind (43). Nach dem Eindringen in einen Wirtsorganismus müssen durch Fitness zahlreiche Barrieren, in erster Linie das Immunsystem, überschritten werden, und der mikrobielle Stoffwechsel an unterschiedliche Kompartimente angepasst werden, damit ein Erreger seine Virulenz, also sein Potenzial Morbidität oder gar Mortalität auszulösen, ausüben kann. Fitness und Virulenz interagieren in einer komplexen Weise miteinander, sind aber nicht unbedingt miteinander verknüpft. Virulenzfaktoren, die dem Bakterium die Adhäsion an Zellen und deren Invasion ermöglichen, können zu dessen Fitness beitragen; auf der anderen Seite muss ein Bakterium seinen Stoffwechselbedarf decken können, damit die Ausprägung von Virulenz zustande kommt.

Seit der Entwicklung von Techniken, die das Verhalten von pathogenen Mikroorganismen *in vivo* charakterisieren, wird deutlich, dass nicht nur Virulenzfaktoren *per se*, sondern auch solche, die den Erreger-Stoffwechsel (sog. „Housekeeping“-Gene) koordinieren, für die Ausprägung ihrer Pathogenität erforderlich sind. Somit ist Pathogenität multifaktorieller Natur und dadurch komplexer als lange Zeit angenommen.

2.2.2 Molekulare Techniken für den Nachweis von essentiellen Genen für Virulenz, Vitalität und Fitness von Mikroorganismen

2.2.2.1 IVET/RIVET und DFI

Die „*In Vivo* Expression Technology“ (IVET) basiert auf dem Prinzip einer Promotorfalle und dient dazu, Gene zu detektieren, die *in vivo* im Gegensatz zu *in vitro*-Labormedien eine erhöhte Expression zeigen. Das System besteht aus zwei Komponenten: (i) einerseits aus dem Erreger von Interesse, der einen Defekt in einem für das Wachstum in einem bestimmten Medium essentiellen Gen [essential growth factor (*egf*)] trägt, und andererseits (ii) aus einem Plasmid, welches die Promotorfalle beherbergt, die aus dem an ein Reportergen gekoppelten *egf*-Gen besteht (147). Bakterielle DNS wird nach dem Zufallsprinzip in diese Promotorfalle kloniert und in das Chromosom des *egf*-mutierten Stammes integriert. Promotoren, die dann speziell während eines Infektionsversuches aktiviert werden, können durch die Expression des *egf*-Gens identifiziert werden, was zu einer Komplementierung der Mutante und somit zu deren Vermehrung im untersuchten

Medium führt. Durch Vermehrung ausgezeichnete Mikroorganismen werden anschließend reisoliert und auf die Expression des Reportergens unter Laborbedingungen überprüft. Die ersten IVET-Ansätze benutzten zu diesem Zweck auxotrophe und antibiotische Selektionsmarkergene (109, 134) (Abb. 1).

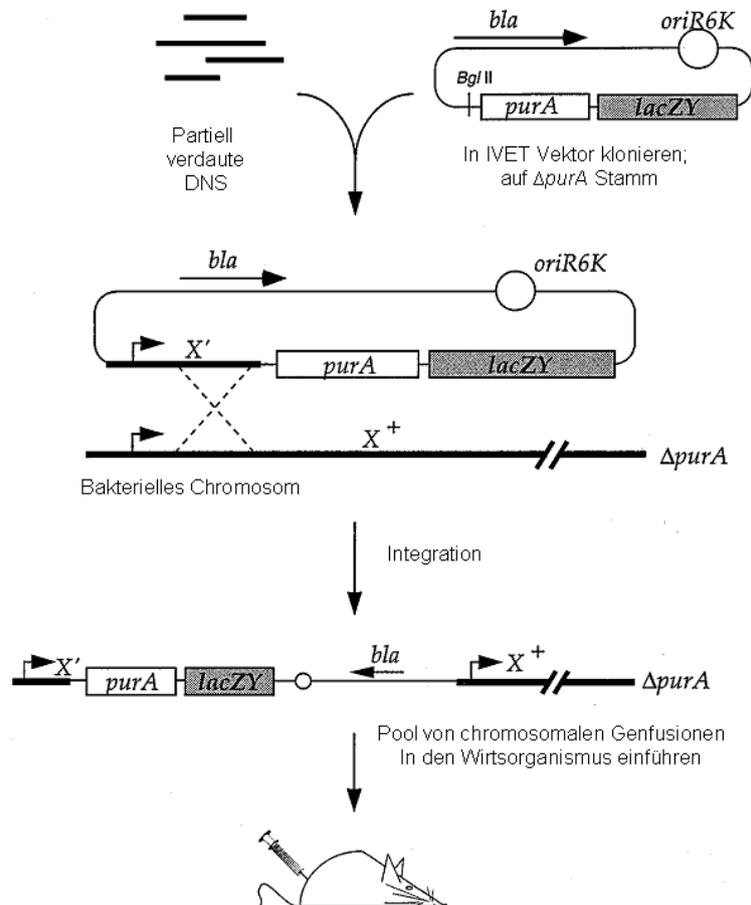


Abb. 1. Schematische Darstellung der IVET Methode mit auxotropher (Purin-) Selektion unter Benutzung des *lacZ* als Reportergen, modifiziert (109).

Eine andere Methode, die auch nach dem Prinzip der Promotorfalle funktioniert, ist die „Differential Fluorescence Induction“ (DFI). DFI dient zur schnellen Identifizierung von bakteriellen Genen mit unterschiedlicher Genexpression in unterschiedlichen Gewebekompartimenten des Wirtes. Das grüne Fluoreszenz-Protein (GFP) der Quallenart *Aequoria victoria* wird als Selektionsmarker im „Fluorescence Activated Cell Sorter“ (FACS), einem Zellsortiergerät verwendet. Das *gfp*-Gen wird in eine Promotor-Genbank eines Pathogens stromabwärts (downstream) des Promotors platziert. So können Klone, die eine aktive Genfusion beherbergen, von solchen, die kein GFP exprimieren, in Tiermodellen oder nach der Infektion von Zellen getrennt werden. Durch sequentielles Aussortieren von Zellen in *in vivo*- und *in vitro*-Ansätzen erhält man jene Bakterien, die ausschließlich *in vivo*

fluoreszieren. Ursprünglich wurde DFI für die Isolierung von säureinduzierbaren Genen in *S. enterica* Serovar Typhimurium benutzt (187).

Resolvase-IVET (RIVET) benutzt genetische Rekombination als Marker-Aktivität und benötigt die Überprüfung von im Wirt induzierten Promotoren, nachdem Bakterien aus dem Gewebe des Wirtes reisoliert worden sind. Der Vorteil liegt hier darin, dass im Gegensatz zu IVET auch vorübergehend oder schwach aktivierte Promotoren detektiert werden können (20).

Ziel dieser Techniken ist es, sowohl Virulenzgene, als auch Gene, die für das Wachstum in Wirtsgeweben nötig sind, zu identifizieren. Solche Gene können z. B. als Ziele bei der Entwicklung von Antiinfektiva hilfreich sein (109, 172, 173).

Heithoff *et al.* (1997) führten eine Studie mit dieser Technik bei *Salmonella* Typhimurium durch (65). Sie fanden über 100 Gene, die eine Rolle in der Ausprägung der Virulenz dieses Bakteriums *in vivo* spielen, wie im Mäusemodell untersucht. Bei Betrachtung der *in vivo*-Induktionsprofile konnten folgende Schlussfolgerungen gezogen werden: (i) viele *in vivo*-induzierte Gene dienen als Regulatoren, die die Sensitivität und Stärke der *in vivo*-Antwort verstärken; (ii) viele metabolische Gene sind direkt an der Virulenz beteiligt; (iii) einige *in vivo* induzierte Gene kodieren Funktionen, die denen von weit evolvierten pro- und eukaryontischen Pathogenen ähneln; und schließlich (iv) stellt die Umgebung im Wirt ein kompliziertes Medium dar, in dem ein Pathogen mit einer koordinierten Expression von Genen mit metabolischer und virulenter Funktion reagiert. In einer Studie mit *Klebsiella pneumoniae* fand man 20 *in vivo* induzierte (*ivi*) Gene, von denen 5 bereits als Virulenzfaktoren bekannt sind, während weitere 5 mit charakterisierten Funktionen in der Regulation und dem Transport von Nährstoffen, Biosynthese von Isoprenoiden und Proteinfaltung involviert sind. Weiteren 10 Sequenzen konnte keine bekannte Funktion zugeordnet werden (95).

Smith *et al.* (2001) applizierten IVET bei *S. suis*, dem Erreger von Meningitis, Septikämie, Arthritis und plötzlichem Tod in jungen Schweinen. Ihr Ziel war herauszufinden, welche Gene unter Eisen-limitierenden Konditionen *in vitro* und nach experimenteller Infektion von Ferkeln exprimiert werden. Zu diesem Zweck haben sie chromosomale DNS-Fragmente von *S. suis* in Plasmide vor ein promotorloses Erythromycin-Gen kloniert. Anschließend benutzten sie diese Genbank für die Selektion von Bakterien, bei denen die Erythromycin-Resistenz unter Eisen-limitierenden Bedingungen aktiviert wurde. Zusätzlich wurden Bakterien selektiert, die nach der Infektion von Ferkeln unter Erythromycin-Behandlung reisoliert werden konnten (174). Interessanterweise waren 4 der *in vitro* isolierten Gene identisch mit 4 Genen der aus den Ferkeln gewonnenen Bakterien, die in die Produktion von Kapsel, oxidativer Stressantwort und putativen Transportern involviert sind. Auch hier konnte bestätigt werden,

dass die Expression von manchen Genen *in vivo* von Eisen reguliert wird, da die meisten Bakterien Eisen für ihr Wachstum benötigen und dieses Metallion nicht in hohen Konzentrationen im Wirt frei zur Verfügung steht (137). Es ist bereits bekannt, dass Mikroorganismen, insbesondere Pathogene, eine Vielzahl von Eisen-akquirierenden Mechanismen besitzen, um Eisen aus ihrer Umgebung zu erhalten, da die durchschnittliche Eisenkonzentration im Wirt 10^8 -fach geringer als für das bakterielle Wachstum nötig ist (194).

2.2.2.2 STM

Die von Hensel *et al.* 1995 konzipierte „Signature Tagged Mutagenese“ ist ein System, welches nach dem Prinzip der negativen Selektion attenuierte Mutanten nach deren Passagierung im Wirt detektiert (66). Ein virulenter Wildtypstamm wird durch zufällige Insertionen eines Transposons mutagenisiert und eine Vielzahl von Mutanten wird dabei generiert. Diese tragen eine Antibiotikumresistenz und einen „tag“ (kurze Nukleotidsequenz) an das Transposon gekoppelt und lassen sich somit eindeutig voneinander differenzieren und identifizieren. Durch gleichzeitige Inokulation von Mutantenpools und Wildtyp werden deutlich weniger Tiere gebraucht als im eine-Mutante-ein-Tier-Modell. Mittels DNS-DNS-Hybridisierung wird abschließend ein Vergleich zwischen inokulierter und aus den Organen der Versuchstiere reisolierter DNS der Mutanten gezogen. Ein fehlendes Signal im Output-Pool dient als Hinweis auf eine Insertion des Transposons in einem Gen, welches für die Ausprägung der Virulenz des Mikroorganismus direkt oder indirekt essentiell ist (Abb. 2).

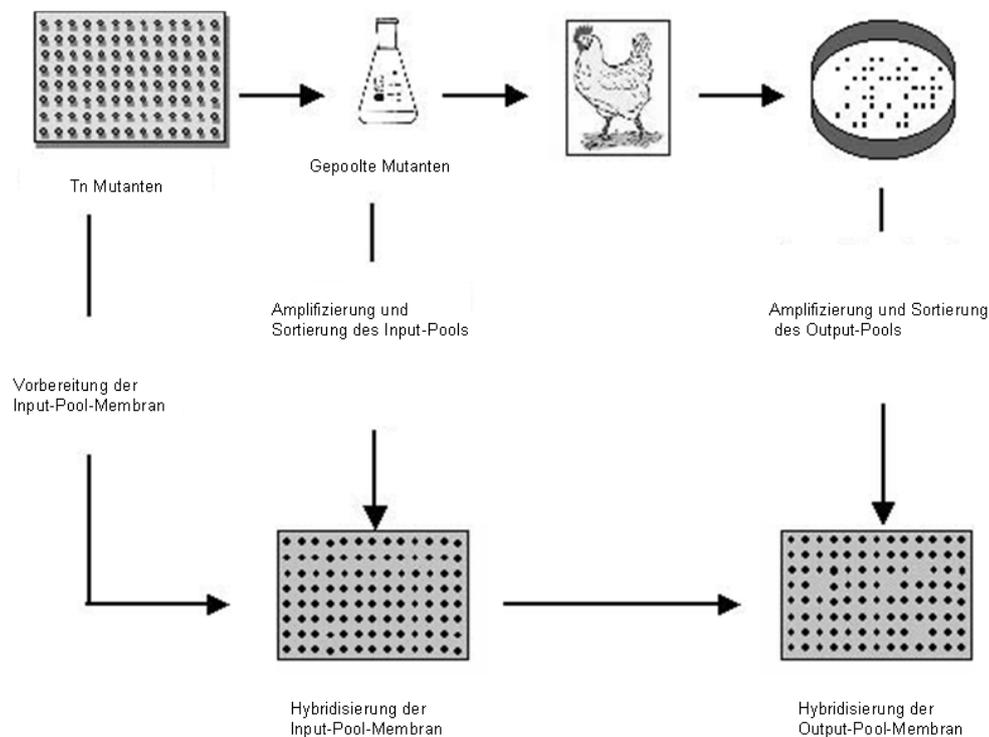


Abb. 2. Schematische Darstellung der STM, modifiziert (100).

Ein Nachteil dieser Technik ist, dass *in vitro* essentielle Gene von vornherein aussortiert werden, da solche Mutationen in der Regel zu einem Wachstumsdefekt führen. Solche Gene werden von IVET/RIVET und DFI detektiert.

Seit Mitte der 90er Jahre sind eine Vielzahl an pathogenen Mikroorganismen, darunter Bakterien, Viren und Pilze mit der STM analysiert worden. Polissi *et al.* (1998) untersuchten einen der wichtigsten Erreger von Pneumonien beim Menschen, *S. pneumoniae*, in Mäuseinfektionsmodellen für Pneumonie und Septikämie und fanden 126 Gene, die virulenzassoziiert sind (142). Diese wurden nach ihrer Funktion klassifiziert, wobei unter den Genen mit bekannter Funktion solche mit einer Rolle im Stoffwechsel des Bakteriums die größte Gruppe bildeten. Die Mehrheit der Mutanten mit defekten Genen des Stoffwechsels, Transport und der DNS-Modifizierung zeigten in beiden Infektionsmodellen eine Attenuierung. Ihre Ergebnisse zeigen die multifaktorielle Natur der Virulenz dieses Erregers und, dass zusätzlich zu den für bestimmte Schritte in der Pathogenese nötigen Genen, auch solche erforderlich sind, die es dem Bakterium ermöglichen, sich an die unterschiedlichen Kompartimente des Wirtsorganismus zu adaptieren, darin zu wachsen und sich zu vermehren.

Eine vergleichende Studie mit *Pasteurella multocida* im Mäuse- und Hühnerinfektionsmodell ergab, dass 5 von 15 STM-Mutanten in beiden Infektionsmodellen attenuiert waren (63). Darunter befand sich zum Beispiel eine Mutante mit einem Defekt in der Purin-Biosynthese. Erstaunlicherweise handelte es sich bei den restlichen 10 Genen nicht nur um Virulenzgene, von denen man vermuten könnte, dass sie wirtsspezifisch seien, sondern auch um strikte „Housekeeping“-Gene, wie das *pyrF*, welches in der Biosynthese der Pyrimidine involviert ist. Diese *pyrF*-Mutante war nur im Hühnerinfektionsmodell attenuiert, vermutlich weil im Mäuseorganismus ausreichende Substrate für die Pyrimidinsynthese zur Verfügung stehen. Dieses Beispiel verdeutlicht, dass die Essentialität eines Gens, hier des *pyrF* Gens, in Zusammenhang mit der Verfügbarkeit von Substraten, in diesem Fall Orotidin-5'-Phosphat, im Wirtsorganismus steht.

Eine an *Proteus mirabilis* durchgeführte STM ergab eine Reihe von Mutanten mit Defekten in Genen des bakteriellen Stoffwechsels mit Attenuierungen unterschiedlichen Grades (19). All diese Mutanten wurden unter nährstoffarmen Wachstumsbedingungen kultiviert, um zu untersuchen, ob diese Gene möglicherweise eine über ihre metabolische Funktion hinausreichende Rolle in der Virulenz spielen oder deshalb essentiell sind, weil der Erreger auf nährstofflimitierende Wachstumsbedingungen im Wirt trifft. Eine Mutante mit einem Defekt in der Serin-Biosynthese (*serC*-Gen) zeigte keinerlei Beeinträchtigung des Wachstums in Minimalmedium A, war aber im Tierversuch attenuiert. Eine zusätzliche Funktion während der Zellteilung wird vermutet, da dies bereits für *Salmonella enterica serC*-Mutanten beschrieben worden ist (125). Eine weitere Mutante in dieser Studie wies eine

Transposon-Insertion in *aroG* auf, ein Gen, welches die 3-Deoxy-d-Arabinoseheptulosonat-7-Phosphat (DAHP)-Synthase kodiert, ein Enzym der Aminosäurebiosynthese. Es gibt drei Isoenzyme für DAHP-Synthasen, AroF, AroG, und AroH, die auf niedrige Konzentrationen an Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan entsprechend reagieren, wobei sie in unterschiedlichem Maße zur Gesamtaktivität an DAHP beitragen. 80% dieser Aktivität werden von AroG erfüllt, während AroF und AroH 20, bzw. 1% übernehmen. Bei der Wachstumsanalyse der *aroG*-Mutante in Minimalmedium zeigte diese ein normales Wachstum, was darauf hindeutet, dass die anderen Isoenzyme ihre Aktivität erhöhen und den Mangel an AroG vollkommen kompensieren können. Dies war allerdings *in vivo* nicht der Fall, wo die Mutante durch eine signifikante Attenuierung im Wettbewerbstest gegen den Wildtypstamm Wachstums auffiel. Die Anpassung der Genexpression an das Wachstumsmedium scheint *in vivo* von Mechanismen beeinflusst zu sein, die *in vitro* nicht imitierbar sind.

2.2.2.3 GAMBIT

Genomische Sequenzierprojekte sind bereits an einer Vielzahl von Mikroorganismen durchgeführt worden und deren Ergebnisse stehen in öffentlichen Datenbanken zur Verfügung. Diese Informationen bieten die Möglichkeit der funktionellen Analyse des Genoms und eine Vergleichsbasis für Organismen, die noch nicht sequenziert worden sind.

Akerley *et al.* konzipierten 1998 die Methode GAMBIT, die diese Vorteile zur gezielten Mutagenese von bestimmten genomischen Regionen ausnutzt und beschrieben sie anhand des Beispiels an *Haemophilus influenzae* und *S. pneumoniae*. Mit GAMBIT (Genomic Analysis and Mapping By *In vitro* Transposition) ist es möglich mittels PCR, *in vitro* Transposon Mutagenese, Transformation und Ermittlung des genetischen Fingerabdrucks an der Transposoninsertionsstelle essentielle Gene zu identifizieren bzw. deren Essentialität *in vivo* zu überprüfen (4).

Im Wesentlichen lässt sich die Methode in drei Hauptschritte teilen. Zunächst werden chromosomale DNS oder große PCR Produkte eines Pathogens mit einem Transposon *in vitro* mutagenisiert und anschließend durch Transformation und Rekombination in das Genom reintegriert. Abschließend erfolgen die Selektion von Rekombinanten mit einer Antibiotikumsresistenz in Selektivmedien (definiertes Medium oder Tiermodell) und die Analyse der mutierten Genbereiche (Abb. 3).

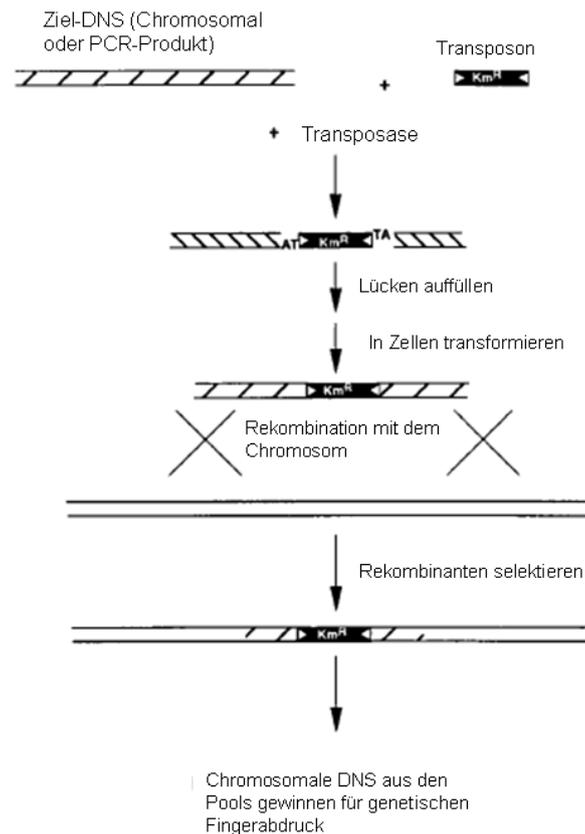


Abb. 3. Schematische Darstellung von GAMBIT modifiziert nach Akerley *et al.* (4).

Mit dieser Methode analysierten Akerley *et al.* (1998) 5 genomische Bereiche von *H. influenzae* und zwei von *S. pneumoniae*. Sie identifizierten Gene, die für bereits als essentiell geltende Enzyme für die Vitalität anderer Mikroorganismen kodieren, wie die Thymidilat-Kinase (150) und Phosphatidylglycerol:Prolipoprotein-Diacylglyceryl-Transferase von *E. coli*, und bestätigten somit ihre Essentialität auch für *S. pneumoniae* (53). In einer anderen Studie konnte mit dieser Methode die Relevanz von Prolyl-, Isoleucyl- und Aspartyl-tRNS-Synthetase, Enzyme des Aminosäurehaushalts, für die Vitalität von *Vibrio cholerae* bestätigt werden (83). Wong *et al.* (2000) verglichen drei putativ essentielle Gene von *H. influenzae* mit den Homologen in *Pseudomonas aeruginosa* und konnten bestätigen, dass eines dieser Gene auch für die Vitalität von *P. aeruginosa* unentbehrlich ist, aber nicht für *E. coli* (197). Die Essentialität mancher Gene und deren Produkte variiert von Spezies zu Spezies, vermutlich auch weil sie unterschiedliche Funktionen erfüllen.

2.2.2.4 IVIAT

Die *in vivo* induzierte Antigen Technologie (IVIAT) wurde erstmals von Handfield *et al.* (1999) beschrieben. Ursprünglich wurde diese Methode in der Humanmedizin bei dem Erreger der juvenilen Periodontitis *Actinobacillus actinomycetemcomitans* angewandt. Nach Anzucht des Pathogens in Labormedien werden ganze Zellen und Proteinextrakte mit Seren von rekonvaleszenten Patienten inkubiert und die entstandenen Antigen-Antikörperkomplexe

eliminiert. Die im Serum verbleibenden Antikörper werden im darauf folgenden Schritt mit einer genomischen Expressions-Genbank hybridisiert, um speziell *in vivo* exprimierte Antigene zu detektieren (61) (Abb. 4).

Hang *et al.* (2003) adsorbierten die gepoolten Seren von 10 an Cholera erkrankten Patienten mit einer Labor-Kultur von El Tor *Vibrio cholerae* O1. Anschließend wurden die aufgereinigten Seren mit einer induzierbaren Expressions-Genbank dieses Stammes hybridisiert (62). Sie isolierten 38 positive Klone, die Gene enthielten, die u. a. Pili, Zellmembran Proteine, Chemotaxis- und Motilitäts-Proteine, ein Quorum sensing-Protein und vier hypothetische Proteine kodieren. RIVET und STM wurden bereits an diesem Erreger durchgeführt, mit dem Nachteil, dass sie Tiermodelle benutzten, welche möglicherweise die Identifizierung von Genen, die einzig im natürlichen Wirt Mensch exprimiert werden, nicht erlauben.

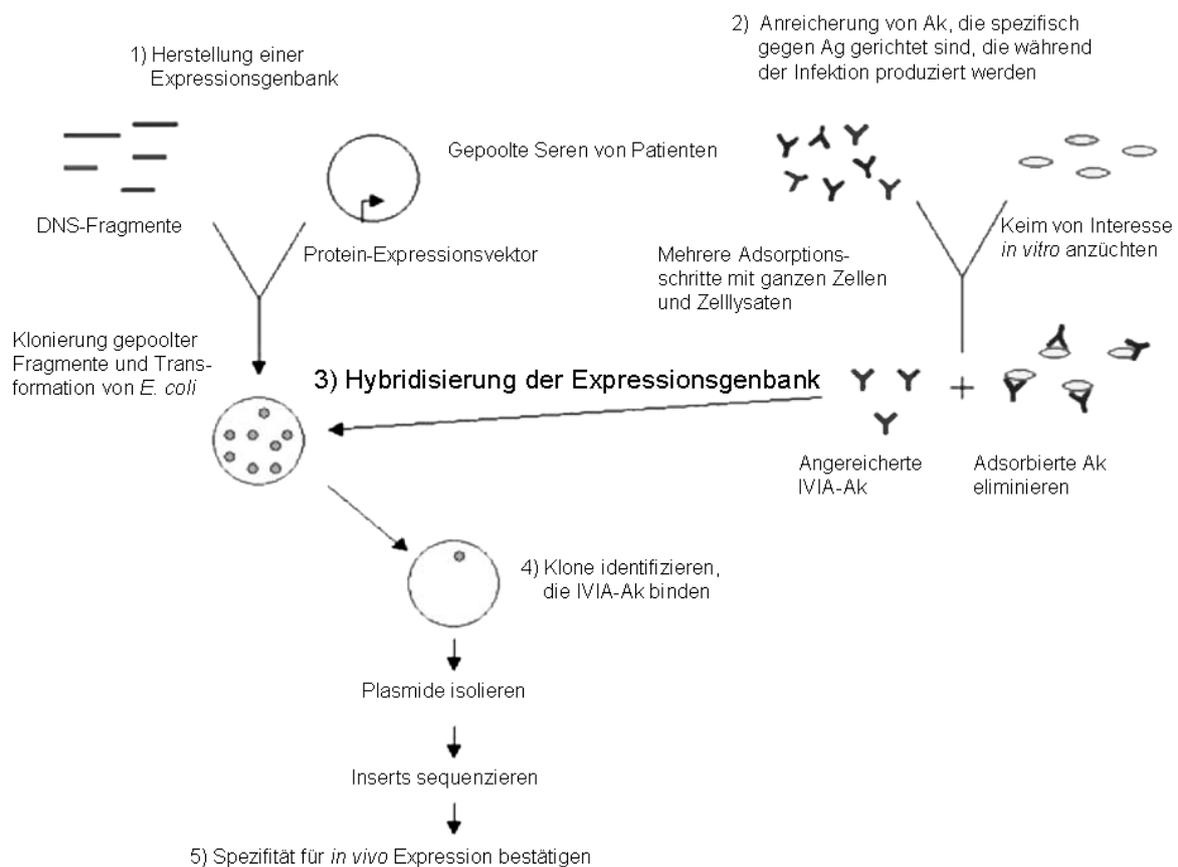


Abb. 4. Schematische Darstellung von IVIAT, modifiziert (154). Die fünf Hauptschritte des Systems werden hervorgehoben.

Eine an *Vibrio vulnificus*, dem opportunistischen Erreger von Septikämie bei immunsupprimierten Menschen durchgeführte Studie identifizierte 12 *in vivo* exprimierte Gene, von denen zwei in der Synthese von Purinen (*purH*) und Pyrimidinen (*pyrH*) involviert sind (89). Die Konstruktion von *purH*- und *pyrH*-Deletionsmutanten und deren Überprüfung in

HeLa Zellen und Mäuseinfektionsmodellen bestätigte, dass diese Gene stark virulenzassoziiert sind. In einem IVIAT-Versuch mit dem humanpathogenen Erreger von Diarrhoe und Hämolytisch Urämischem Syndrom (HUS) *E. coli* O157:H7 konnten 223 *in vivo* exprimierte Gene isoliert werden, von denen über die Hälfte (53%) in der Biosynthese und im Stoffwechsel des Erregers involviert sind (76).

2.2.2.5 SCOTS

Diese Technik fängt transkribierte Sequenzen auf, indem denaturierte und biotinylierte chromosomale DNS aus Laborkulturen mit der aus einem Infektionsversuch gewonnenen cDNS (umgesetzte mRNS in DNS) eines Erregers hybridisiert wird. Anschließend werden die Hybride an Streptavidin-beschichtete magnetische Beads gekoppelt und somit die *in vivo* erzeugten Transkripte des Pathogens aufgefangen. Die mittels SCOTS erhaltene cDNS kann anschließend auch quantitativ mittels Microarray oder qPCR analysiert werden. Die Methode detektiert im Gegensatz zur STM Gene, die *in vivo* überexprimiert werden, woraus aber der Rückschluss nicht resultiert, dass sie unbedingt essentiell für das Überleben des Erregers sind. Somit ergänzen sich beide Methoden in dieser Hinsicht.

Ursprünglich wurde die Methode von Clark-Curtiss (1997) für die Anwendung an *Mycobacterium tuberculosis* beschrieben (57). In einer Studie am opportunistischen Erreger von Lungenentzündung in immunsupprimierten Menschen, *Mycobacterium avium*, wurden 54 cDNS-Moleküle isoliert, die 46 Gene repräsentieren, die während der Infektion von humanen Makrophagen zu verschiedenen Zeitpunkten exprimiert werden (69). Diese stellen Enzyme vieler biosynthetischer Pfade (Pyrimidine, Mycobactin und Polyketide) des intermediären Stoffwechsels, Energiestoffwechsels (Tricarbonsäurezyklus) und Stickstoff-Stoffwechsels, und Gene, die Regulator- und hypothetische Proteine kodieren, dar.

Eine an *Actinobacillus pleuropneumoniae* durchgeführte SCOTS-Studie identifizierte 46 *in vivo* überexprimierte Gene, von denen 22 den bakteriellen Stoffwechsel koordinieren (11). *Streptococcus suis* ruft bei Schweinen unter anderem Meningitiden hervor und ist bereits als Zoonoseerreger anerkannt (105). Mit SCOTS erhielt man für diesen Erreger 28 Gene, die speziell während der Interaktion mit porzinen mikrovaskulären Gehirnendothelzellen exprimiert werden (48). Die Mehrheit dieser Gene sind „Housekeeping“-Gene und keine Virulenzgene im engeren Sinne. Faucher *et al.* (2006) untersuchten das Transkriptom von *Salmonella* Typhi, dem Erreger des Typhus, innerhalb von menschlichen Makrophagen mit SCOTS und anschließender quantitativer Analyse zu drei verschiedenen Zeitpunkten der Infektion (45). Sie fanden ca. 300 Gene, die zu jedem Zeitpunkt hochreguliert waren, von denen aber nur 117 gleichbleibend überexprimiert wurden. Diese Ergebnisse signalisieren, dass die Überexpression mancher Gene nur zu definierten Zeitpunkten der Internalisierung

stattfindet und spiegeln die Relevanz der Koordination von Neukombinationen in der Genexpression während der Erreger-Wirt Interaktion wider.

2.2.3 Rolle von „Housekeeping“-Genen für die Ausprägung der APEC-Infektion beim Geflügel

Im Jahr 2003 applizierten Dozois *et al.* (36) die Technik SCOTS (Selective Capture of Transcribed Sequences) auf den APEC-Stamm χ 7122 (O78:K80:H9), um pathogenspezifische (nicht-*E. coli*-spezifische) cDNS aufzufangen und machten so einen wichtigen Schritt in der Charakterisierung der Erreger-Wirt-Interaktion. Nach der Infektion von Hühnern wurde aus den Geweben des Pericards und der Luftsäcke RNS isoliert. Pathogenspezifische Transkripte beinhalteten Gene involviert in Adhäsion, Eisentransport, Lipopolysaccharid (LPS)-Synthese, Plasmidreplikation und Konjugation, und schließlich Genprodukte mit unbekannter Funktion. Nach der Anreicherung und trotz dreifacher Blockierung für die Isolierung pathogenspezifischer Sequenzen stellte sich heraus, dass ein Drittel der Transkripte sowohl im APEC- als auch im *E. coli* K12-Genom präsent sind. Diese stellen konservierte Gene des Stoffwechsels (Folsäure-, Aminosäure-, Nukleinsäure-, LPS-Synthese), Zellwachstums, der Stressantwort oder Regulation und Gene von unbekannter Funktion dar. Da sich mit Hilfe von SCOTS pathogenspezifische von nicht pathogenspezifischen Transkripten trennen lassen, dies aber in diesem Fall nicht möglich war, liegt die Vermutung nahe, dass solche konservierten Gene *in vivo* während der Infektion in hohen Mengen exprimiert werden und von großer Relevanz für die bakterielle Fitness und/oder deren volle Virulenz sind.

Li *et al.* konnten im Jahr 2005 mit Hilfe der „Signature tagged Mutagenese“ (STM) in einem eigens für diese Studie etablierten Hühnerinfektionsmodell 28 Gene identifizieren, die für die Entstehung der APEC-Infektion in Hühnern nötig sind (102). Für diesen Versuch wurde der hoch pathogene APEC-Stamm IMT5155 (O2:K1:H5) durch zufällige Insertionen des Minitransposons mini-Tn5km2 (Tn) mutagenisiert. Diese Mutanten wurden in Pools in 5 Wochen alte Hühner intratracheal inokuliert und nach 48 und 72 h aus den Milzen der Tiere reisoliert. Mittels DNS-DNS-Hybridisierung wurden die DNS der inokulierten (input) Mutanten und die der reisolierten (output) miteinander verglichen. Mutanten mit schwachem oder gar keinem Output-Signal wurden anschließend einem *in vivo*-Kompetitionstest unterzogen. Hierfür sind jeweils 1×10^8 CFU aus Kulturen der einzelnen Mutanten und des Wildtyps zusammen in Hühner inokuliert worden, um die Kompetitionsfähigkeit um Nährstoffe der Stämme zu überprüfen. Mutanten, die, nach diesem ersten Filtern zu urteilen, eine Attenuierung erfahren hatten, wurden für weitere Analysen ausgesucht. Mittels arbitrary PCR und anschließender Sequenzdatenanalyse der PCR-Produkte fand man 28 Gene, die in der Produktion von Lipopolysacchariden (LPS, *waaW* und *waaL*) und extrazellulären Polysacchariden (*wcaE*, *kpsM* und *kpsS*) involviert sind, zwei Gene, die am Eisentransport

beteiligt sind (*sitB* und *chuA*), einige membranassoziierte und periplasmatische Proteine (*sbmA*, *mppA*, *nark*) sowie metabolische Enzyme [*tktA*, *carP* und *pyrD* (Daten hier erstmals publiziert)], die im Vitaminstoffwechsel eine indirekte Rolle spielen, und putative Proteine mit unbekannter Funktion.

Diese Studien weisen auf die Vielfältigkeit von virulenzassoziierten Genen und die starke Präsenz von „Housekeeping“-Genen innerhalb dieser Gruppe von Faktoren hin, die für das Auslösen der APEC-Infektion beim Geflügel erforderlich sind.

2.3 De novo Biosynthese der Pyrimidine und die essentielle Rolle der daran beteiligten Gene in der Virulenz von Mikroorganismen

2.3.1 Allgemeines

Purine und Pyrimidine sind Bestandteile der Ribonukleotide, die wiederum an fast allen biochemischen Reaktionen beteiligt sind. Nukleotide sind Vorläufer von DNS und RNS und dienen sowohl als Stoffwechsel-Regulatoren (cAMP) als auch als Teil aktivierter Zwischenstufen in anabolischen Prozessen, wie in der Glykogen-Biosynthese (123). Adenin-Nukleotide, insbesondere ATP, spielen im mikrobiellen Stoffwechsel eine herausragende Rolle. Außerdem sind sie Bestandteil von Coenzymen, wie NAD(H), FAD und CoA.

Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) kommt als Zwischenprodukt in mindestens 10 enzymatischen Reaktionen in *E. coli* vor, darunter auch die Purin- und Pyrimidin-Nukleotidbiosynthese. Während der exponentiellen Wachstumsphase von *E. coli* in Glucose-Minimalmedium werden 80% des vorhandenen PRPP in die Nukleotidbiosynthese investiert. Die Synthese von PRPP wird von der PRPP-Synthase katalysiert und von ADP allosterisch inhibiert (182).

Pyrimidine können neu oder aus der Wiederverwertung von Nukleotiden, Nukleosiden und Nukleobasen über den sog. „salvage“ Pathway synthetisiert werden. Die *de novo* Synthese der Pyrimidine umfasst sechs Schritte zur Synthese von Uridin-Monophosphat (UMP), dem Vorläufermolekül aller Pyrimidine, und ist in nahezu allen untersuchten Spezies vorhanden, mit Ausnahme von einigen Parasiten, wie *Giardia lamblia* (104) und *Trichomonas vaginalis* (67). In *E. coli* und *Salmonella Typhimurium* sind die Gene der Pyrimidin-Biosynthese ubiquitär auf dem Chromosom verteilt und werden einzeln über unterschiedliche Mechanismen reguliert, während in *Bacillus subtilis* die *pyr*-Gene in einer 12 kb großen chromosomalen Region als einziges Operon gruppiert sind und als polycystronische mRNS transkribiert werden (22, 60, 88, 145). Die Organisation der *pyr* Gene von *Bacillus subtilis* ähnelt dadurch eher der von Tieren oder Hefen, bei denen zwar weniger Gene an der

Pyrimidin-Biosynthese beteiligt sind, dafür deren enzymatische Komplexität viel höher ist. Hier bilden sich sog. Cluster-Gene, die multifunktionelle Enzyme kodieren (30).

Die Vorläufer der *de novo* Biosynthese der Pyrimidine sind Carbamoylphosphat, Aspartat und PRPP. Glutamin und HCO^{3-} bilden die Ausgangsstoffe, aus denen Carbamoylphosphat von dem Enzym Carbamoylphosphat-Synthetase (CPSase EC 6.3.5.5) synthetisiert wird. Danach geschieht die Verschmelzung von Aspartat und Carbamoylphosphat, katalysiert durch das Enzym Aspartat-Transcarbamoylase (ATCase EC 2.1.3.2). Das resultierende Carbamoylaspartat wird vom Enzym Dihydroorotase (DHOase EC 3.5.2.3) zyklisiert, wodurch 4,5 Dihydroorotat entsteht. Die Oxidation durch die Dihydroorotat-Dehydrogenase (DHODH EC 1.3.3.1) führt zu Orotat, welches von der Orotat-Phosphoribosyltransferase (OPRTase EC 2.4.2.10) an PRPP gebunden wird. Das entstandene Orotidinmonophosphat wird von Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase (EC 4.1.1.23) decarboxyliert und daraus resultiert Urididin-Monophosphat (UMP). UMP dient als Ausgangsmolekül für weitere Pyrimidin-Nukleotide, wie UDP, UDP-Glucose, UTP, CTP und deren Derivate (Abb. 5).

Die allosterische Regulation der Pyrimidin-Biosynthese von *E. coli* und *Salmonella Typhimurium* geschieht an drei Stellen: (i) die CPSase wird von UMP inhibiert und von Ornithin stimuliert; (ii) die ACTase wird vom Endprodukt der Biosynthese, CTP, inhibiert; und (iii) die CTP- Synthetase wird *in vivo* von UTP stimuliert und von hohen Konzentrationen an CTP inhibiert (127).

Dieser Pfad ist universell in allen bisher untersuchten Eu- und Prokaryonten, jedoch sind die Herkunft des Carbamoylphosphats für die Pyrimidinsynthese, die Regulation und die Zusammensetzung der Gene, die die Enzyme für die Biosynthese kodieren, unterschiedlich (123). In Bakterien kodieren acht unterschiedliche Gene (*carAB*, *pyrBI*, *pyrC-pyrF*) sechs unabhängige Enzyme. Dabei kommt der Carbamoylphosphat-Synthetase (von *carAB* kodiert) eine besondere Bedeutung zu, da ab dem Schritt zwei unterschiedliche Biosynthesepfade eingeschlagen werden können: die Arginin- oder die Pyrimidinbiosynthese. Das Expressionsprofil von *carAB* reflektiert die Schlüsselrolle und doppelte Funktion der CPSase, da ihre Transkription von Arginin-, Pyrimidin- und Purin-abhängigen Mechanismen inhibiert wird (31). Makoff und Radford (1978) klassifizierten Mikroorganismen nach deren enzymatischer Organisation in drei Klassen: (i) Mikroorganismen, die eine Carbamoylphosphat-Synthetase (CPSase) besitzen, die den gesamten Pool an Pyrimidinen und Arginin liefert, wie *E. coli* und *Salmonella Typhimurium*; (ii) solche, die getrennte Enzyme für die Synthese von Pyrimidinen und Arginin besitzen, wie *Bacillus subtilis*; und (iii) schließlich gibt es gram positive Bakterien, wie *Lactobacillus* und *Enterococcus spp.*, die gar kein Enzym besitzen, einen essentiellen Bedarf an Arginin haben und Carbamoylphosphat aus dem Abbau von Arginin oder Citrullin beziehen (111).

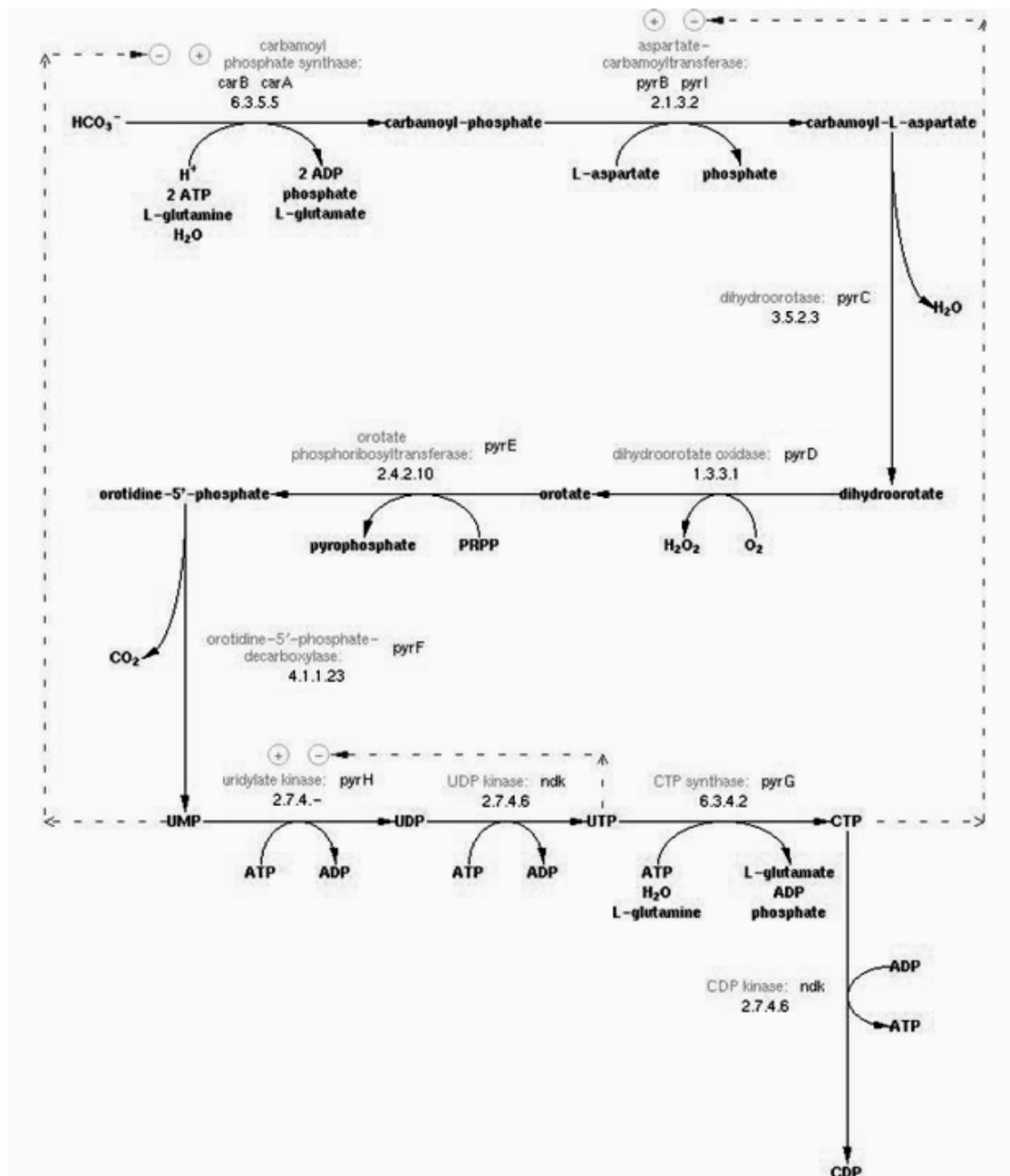


Abb. 5. Enzymatischer Ablauf der de novo Biosynthese der Pyrimidine. Der universelle Weg umfasst sechs Schritte bis zur Synthese von UMP, dem Vorläufer aller Pyrimidine, aus <http://metacyc.org>.

2.3.2 Essentielle Rolle der einzelnen Gene der de novo Biosynthese der Pyrimidine

Durch Mutation des *carAB*-Operons in *Salmonella Typhimurium* erhielt man bereits attenuierte Mutanten mit einer protektiven Wirkung in Mäusen, wobei der Attenuierungsgrad und die Überexpression des intakten Operons *in vivo*, anhand von IVET ermittelt, als Folge der niedrigen Verfügbarkeit an Pyrimidinen im Wirt interpretiert wird (46, 109). Kwaga *et al.* (1994) konstruierten eine *carAB* Transposon-Deletionsmutante EC751 vom virulenten APEC-Stamm EC317 (O1) und verifizierten ihren Attenuierungsgrad und ihre Stabilität im Eintagsküken-Modell von Lafont *et al.* (94) und in sieben Wochen alten Puten (92). Sie

verabreichten Suspensionen mit 5×10^8 CFU an vier Wochen alte Puten über den oralen Applikationsweg. Zwei Wochen nach der Immunisierung sensibilisierten sie die Puten mit dem hämorrhagischen Enteritis-Virus A (HEV-A) und eine Woche darauf führten sie einen Challenge über den intratrachealen Applikationsweg mit dem Wildtypstamm durch. Sie konnten nachweisen, dass die Tiere durch Immunisierung mit den lebenden auxotrophen *carAB* Mutanten vor einer Infektion mit dem Wildtyp-Stamm geschützt wurden.

Toxoplasma gondii, ein ubiquitärer Parasit, der angeborene Missbildungen und die tödliche Toxoplasma-Enzephalitis verursacht, besitzt einen intakten Enzymsatz für die *de novo* Biosynthese von Pyrimidinen, kann aber nur begrenzt über den „salvage“ Pathway Pyrimidine synthetisieren. Eine weitere Besonderheit ist, dass dieser Parasit zu den Organismen mit zwei Carbamoylphosphat-Synthetasen (CPSI und CPSII) gehört. In einem Versuch haben Wissenschaftler die CPSII von *T. gondii* mutagenisiert und auxotrophe Mutanten erhalten, die in Abwesenheit von Uracil Zellen zwar penetrieren, sich aber darin nicht mehr vermehren können (51). Die Mutanten wurden im letalen Toxoplasma-Mäusemodell getestet. Tiere, die 10^3 - 10^7 Trachyzoiten intraperitoneal appliziert bekamen, lebten nach 12 Monaten ohne Anzeichen einer persistierenden Infektion, während 10 Parasiten des Wildtypstammes im selben Modell zum Tod der Mäuse bereits in ca. 9 Tagen führten. Weiterhin konnte mit den auxotrophen Mutanten eine belastbare Langzeit-Immunität in Mäusen induziert werden.

Listeria monocytogenes ist ein Pathogen, welches sich im Zytosol von eukaryontischen Zellen vermehrt (108) und Meningitis, Meningoenzephalitis oder Septikämie in immunsupprimierten Menschen und Tieren hervorruft. In einer Studie von Klarsfeld *et al.* (1994) wurde eine Genbank von Tn917-*lac* Mutanten eines *L. monocytogenes* Stammes nach *lacZ*-Genfusionen mit einer höheren Expression in einer Makrophagen-ähnlichen Zelllinie im Vergleich zu nährstoffreichem Medium untersucht (91). Von den fünf Genen mit einer 100-fachen Induktion in Zellen waren drei (*purH*, *purD* und *pyrE*) in der Nukleotid-Biosynthese involviert, entsprechend der hohen Ähnlichkeiten der Ergebnisse der Sequenzdatenanalyse mit den Datenbanken anderer sequenzierter Bakterien und Wachstumsanalysen in supplementiertem Minimalmedium. Die entsprechenden Mutanten waren nicht in ihrem intrazellulären Wachstum, ihrer Ausbreitung von Zelle zu Zelle oder in ihrer Virulenz in Mäusen beeinträchtigt. Dies könnte darin begründet sein, dass die zytosolische Konzentration an Nukleotiden in der makrophagenähnlichen Zelllinie und im Wirt ausreichend für die Vermehrung von diesem Erreger ist oder dass *L. monocytogenes* über andere Mechanismen verfügt, um ihren Nukleotidbedarf zu decken.

Thymin-auxotrophe Mutanten von *Legionella pneumophila* vermehren sich nicht innerhalb der Vakuolen in menschlichen Monozyten (121), und *S. Typhimurium carAB*-Mutanten sind stark attenuiert, wobei das *carAB*-Operon *in vivo* stark überexprimiert wird (109).

Shigella flexnerii Thymin-auxotrophe Mutanten wiederum sind stark attenuiert und in ihrem intrazellulären Wachstum inhibiert (132), während Transposon-Mutanten von *Francisella tularensis* mit Insertionen in *carA* oder *pyrD* keine phänotypischen Veränderungen bezüglich Internalisierung und Replikation in Makrophagen aufweisen (110), sodass unterschiedliche Pathogene scheinbar verschiedene Wachstumsanforderungen sogar im selben Kompartiment zeigen.

In einem IVIAT-Ansatz an *Vibrio vulnificus* konnte eine *pyrH*-Insertionsmutante isoliert werden, die im Mäuseinfektionsmodell attenuiert war (89). *pyrH* kodiert die UMP-Kinase, die die Phosphorylierung von UMP zu UDP katalysiert (127). Das Gen gehört zu den konserviertesten in allen bisher untersuchten bakteriellen Genomen und besitzt keinen Gegenpart im eukaryontischen Genom (16), eine gute Voraussetzung für die Entwicklung von antimikrobiellen Therapeutika. Die UMP-Kinase dient als Sensor für den vorhandenen Pyrimidin-Spiegel im Wachstumsmedium und reguliert direkt den Pyrimidin-spezifischen CarP1 Promotor der Carbamoylphosphat-Synthetase (kodiert vom *carAB*-Operon) in den ersten Stufen der *de novo* Pyrimidin-Synthese (88). In einer Folgestudie wurde die Funktion von *pyrH* während infektiöser Prozesse weiter charakterisiert (97). Da die Mutation des *pyrH* sich als letal für *V. vulnificus* erwies, wurden gezielt Aminosäurereste des Gens mutagenisiert. Arg-62 and Asp-77, beide in die Substratbindung von UMP involviert, wurden auf Grund vergleichender Analysen mit dem *pyrH* von *E. coli* dafür ausgewählt. Die zytotoxische Wirkung auf HeLa-Zellen und die LD₅₀ in Mäusen der entstandenen Mutante wurden überprüft mit dem Ergebnis, dass, verglichen mit dem Wildtyp, die Zytotoxizität auf unter 40% herabgesetzt und die LD₅₀ 26-fach erhöht war, obwohl verifiziert werden konnte, dass der Stamm trotz Mutation in der Lage war, in den Blutkreislauf der Versuchstiere zu gelangen. Der Wildtyp-Stamm scheint eine unempfindlichere Replikation in Mäusen zu haben. Die Ergebnisse zeigen, dass diese Mutante für die Herstellung einer Lebendvaccine geeignet ist, da sie invasiv genug ist, eine protektive Immunität hervorzurufen, und eine kontrollierte Replikation im Wirt besitzt.

Der attenuierende Effekt von Mutationen in Genen des Purin- und Pyrimidin-Haushalts wurde bereits auch für pathogene Pilze, wie *Cryptococcus neoformans* (140, 151) und *Candida albicans* (44, 90, 167) beschrieben. Der Pilz *Histoplasma capsulatum* ist der Erreger der Histoplasmose, einer Infektionskrankheit von Menschen, Hunden und Katzen, bei der vorwiegend die Lunge befallen wird. In einer Studie wurden UV- und gezielte Mutagenese des URA5-Gens von *H. capsulatum* durchgeführt, welches bei niederen Eukaryonten analog zum *pyrE*-Gen in Prokaryonten, die Orotat-Phosphoribosyltransferase (OPRTase) kodiert (149). Die Fähigkeit der entstandenen Mutanten murine Makrophagen-ähnliche, humane monozytäre Zelllinien und Mäuse zu infizieren, wurde analysiert. Es zeigte sich, dass das URA5-Gen essentiell für die Virulenz von *H. capsulatum* sowohl in beiden Zelllinien als auch

im Mäuseinfektionsmodell ist, und, dass entweder die Wiedereinführung des URA5 per Transformation oder die exogene Zufuhr von Uracil während des Zellversuches nötig sind, um die volle Virulenz wiederherzustellen.

3 Versuchstiere und embryonierte Hühnereier

3.1 SPF-Hühner und embryonierte SPF-Hühnereier

Für die Tierversuche wurden 5 Wochen alte SPF-Hühner der Rasse White Leghorn von der Firma Lohmann Tierzucht GmbH aus Cuxhaven, Deutschland bezogen.

Alle Experimente wurden an weiblichen Tieren unter der Genehmigung für Versuche an lebenden Wirbeltieren mit dem Aktenzeichen G 0212/01 durchgeführt.

Für den Hühnerembryonen-Letalitätstest („Chicken Embryo Lethality Assay“) wurden embryonierte SPF-Hühnereier ebenfalls von der Fa. Lohmann Tierzucht GmbH bezogen. Es handelte sich hierbei um höchstens eine Woche alte, befruchtete, in der Form und Schalenbeschaffenheit homogene Eier aus einer einzigen Charge.

4 Material

4.1 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

Die verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in Tab. 1 aufgelistet. Der untersuchte Stamm M12A09 ist eine mittels „Signature Tagged Transposon Mutagenesis“ (STM) generierte Mutante des aviär pathogenen *E. coli* Wildtyp-Stammes IMT5155 (100). Dieses APEC-Feldisolat wurde im Jahr 2001 aus den inneren Organen einer 4 Wochen alten Legehennen in Cuxhaven, Deutschland gewonnen, die klinische Symptome und typische Organläsionen der APEC-Infektionskrankheit zeigte. Es ist beweglich, gehört dem Serotyp O2:K1:H5 an und trägt nach Ergebnissen von DNS-DNS-Hybridisierung und PCR die Virulenzgene *fyuA*, *irp2*, *tsh*, *fimC*, *iss*, *iucD*, *vat*, *traT*, *cvi/cva*, *ompA*, *chuA*, *ibeA*, *sitD*, *gimB* und *iroN*. Weiterhin zählt dieser Stamm zu den repräsentativsten klonalen Linien in Deutschland (38). Mit der STM, bei der speziell gekennzeichnete DNS-Sequenzen an einen Mutagenese-Vektor (mini-Tn5Km2) gekoppelt werden, ist der zuvor im Infektionsversuch ausgewählte, hoch virulente APEC-Stamm IMT5155 durch zufällige Transposoninsertionen mutagenisiert worden (102). Die auf diese Weise in großen Mengen hergestellten Zufallsmutanten tragen einen einzigartigen „signature-tag“ (kurze Nukleotidsequenz), gekoppelt an das Minitransposon-Tn5Km2 als Erkennungsmerkmal an der Mutationsstelle. Dadurch sind sie eindeutig identifizierbar und von anderen Mutanten differenzierbar.

Stamm/Plasmid	Relevante Eigenschaften
APEC IMT5155NaI ^r (102)	O2 :K1:H5; <i>fyuA</i> , <i>irp2</i> , <i>tsh</i> , <i>iucD</i> , <i>fimC</i> , <i>iss</i> , <i>ompA</i> , <i>vat</i> , <i>traT</i> , <i>cvi/cva</i> , <i>chuA</i> , <i>ibeA</i> , <i>sitD</i> , <i>gimB</i> , <i>iroN</i>
APEC IMT5155::pACYC184	APEC IMT5155NaI ^r transformiert mit dem Plasmid pACYC184; Tc ^r ; Cm ^r
APEC IMT5155::pCR2.1-TOPO [®]	APEC IMT5155NaI ^r transformiert mit pCR2.1-TOPO [®]
APEC IMT 5104	O8:H-; <i>crIA</i> , <i>mat</i> , <i>ompA</i>
M12A09 ¹	STM-generierte Mutante vom Stamm IMT5155NaI ^r mit Tn-Insertion im Gen <i>pyrD</i>
M12A09::pCR2.1-TOPO [®]	M12A09 transformiert mit pCR2.1-TOPO [®]
M12A09::pCR2.1-TOPO [®] (<i>pyrDKlon1</i>)	M12A09 transformiert mit pCR2.1-TOPO [®] : <i>pyrDKlon1</i>
M12A09::pCR2.1-TOPO [®] (<i>pyrDKlon2</i>)	M12A09 transformiert mit pCR2.1-TOPO [®] : <i>pyrDKlon2</i>
M12A09::pACYC184	M12A09 transformiert mit pACYC184
M12A09::pACYC184(<i>pyrDKlon2</i>)	M12A09 transformiert mit pACYC184: <i>pyrDKlon2</i>
<i>E. coli</i> DH5α ²	F ⁻ Φ80 <i>lacZ</i> Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1endA1</i> <i>hsdR17</i> (<i>r_Km_K</i>) <i>supE44</i> λ- <i>thi-1</i> <i>gyrA</i> <i>relA1</i>
<i>E. coli</i> K12 MG1655 ³	OR:H48:K-; F- lambda- <i>ilvG</i> - <i>rfb-50</i> <i>rph-1</i>

Stamm/Plasmid	Relevante Eigenschaften
UPEC CFT073 ⁴	O6:K2:H1; menschlicher Erreger von Pyelonephritis, Cystitis und UTIs (urinary tract infections)
pUC18 ⁵	High-copy Klonierungsvektor (Amp ^r , ColE1-ori)
pCR2.1-TOPO ^{®6}	High-copy Klonierungsvektor mit Polylinker im <i>lacZ</i> , pUC und f1 Ori (Amp ^r , Kan ^r)
pCR2.1-TOPO [®] (<i>pyrDKlon1</i>)	pCR2.1-TOPO [®] mit <i>pyrDKlon1</i> -Insert
pCR2.1-TOPO [®] (<i>pyrDKlon2</i>)	pCR2.1-TOPO [®] mit <i>pyrDKlon2</i> -Insert
pACYC184 ⁷	Low-copy Klonierungsvektor (Tc ^r , Cm ^r , rep:p15A)
pACYC184:(<i>pyrDKlon2</i>)	pACYC184 mit <i>pyrDKlon2</i> Insert

Tab. 1. Verwendete Bakterienstämme und Plasmide und deren relevanten Eigenschaften, Bezugsquellen und GenBank Accession numbers:

¹ von G. Li generierte STM-Mutante (102), Untersuchungsdaten hier erstmals publiziert;

² Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) Nr. 6897;

³ Acc. No. U00096;

⁴ Acc. No. AE014075;

⁵ DSMZ Nr. 3424;

⁶ Invitrogen GmbH, Karlsruhe;

⁷ DSMZ Nr. 4439.

Nach Etablierung eines geeigneten Hühner-Infektionsmodells für den Stamm IMT5155 wurde jeweils ein Tier mit einem Pool von 96 verschiedenen Mutanten infiziert, um *in vivo* zu prüfen, ob eine Mutante eine vitalitätsmindernde Veränderung durch die Tn-Insertion erfahren hatte (100, 102). Hat eine solche Attenuierung stattgefunden, ist die entsprechende Mutante im Tier nicht mehr lebensfähig und konnte somit nach Abschluss des Infektionsversuches nicht mehr aus den Organen des Huhns isoliert werden. Dieser Effekt wurde mittels vergleichender DNS-DNS-Hybridisierung mit „signature tag“-DNS-Sonden für die einzelnen Mutanten zwischen dem Input- und dem Output-Pool überprüft (100, 102). Nach dieser ersten Überprüfung wurde mit potenziell attenuierten Kandidaten ein *in vivo*-Kompetitionstest durchgeführt. Vier Hühner im Alter von 5 Wochen wurden mit ca. 1×10^8 CFU einer Bakteriensuspension aus Wildtyp und Mutante im Verhältnis 1:1 intratracheal infiziert und 48 h später euthanasiert. Die Milz, Nieren, Herz, Leber und Lungen wurden entnommen, gewogen, homogenisiert und auf Selektivmedien ausgestrichen, um die Keimzahl der einzelnen Stämme zu bestimmen. Abschließend wurde ein Kompetitionsindex durch Division des Output-Verhältnisses (Mutante/Wildtyp) durch das Input-Verhältnis (Mutante/Wildtyp) kalkuliert (100, 102). Eine Verdrängung der Mutante durch den Wildtyp um das 10-fache galt dabei als leichte, eine um das 100-fache als moderate und eine um mehr als das 100-fache als starke Attenuierung. Auf Grund dieser Ergebnisse wurden Mutanten für weitere Untersuchungen ausgesucht, die eine Schwäche gegenüber dem Wildtyp besitzen (100, 102).

Nach diesem Prinzip wurde die attenuierte Mutante M12A09 als Untersuchungsgegenstand für die vorliegende Arbeit ausgewählt.

4.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Brutschränke	Heraeus, Typ B6060
Elektrophoresekammern	AGS, Hybaid, MWG
Film	Polaroid Polapan 665PN ISO 80/20°
Filmkassetten	Kodak BioMax Cassette
Fluorometer	Hoefler DyNA Quant™ 200
Rotor-Stator-Homogenisator	Ultra Turrax® T25
Hybridisierungsöfen	Hybaid
Kühlzentrifuge	Sigma 3K30
Objektträger	Roth 76 x 26 mm
pH-Meter	Knick 766 Calimatic
Photo-Kamera	Polaroid MP4+ Instant Camera System
Photospektrometer	Amersham Pharmacia Biotech Ultraspec R 3000 pro
Pipetten	Eppendorf Research
Röntgenfilme	Kodak X-OMAT AR
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific, C 24 Incubator Shaker
Spannungsgerät	Hybaid PS 250
Sterilwerkbank	Steag Laminarflow-Prozess-technik
Thermocycler	Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400
Tischzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415D
Transilluminator	Herolab, E. A. S. Y. 429K, ICU-1, Video-Graphik Printer UP 890 CE
Ultrazentrifuge	Beckman L8-60M Ultracentrifuge, Class H
UV-Tisch	Biometra TI 1
Vortexer	IKA MS2 Minishaker
Waage	Sartorius LA 235S und BP 2100
Wärmeschrank	WTC Binder
Wasserbäder	Julabo, Th. Karow GmbH

4.3 Kits, Enzyme, Marker, Nährmedien und Lösungen

4.3.1 Verwendete Kits

Folgende Kits wurden von den nachstehenden Firmen bezogen:

Agarose Gel DNA Extraction Kit	Roche Applied Science GmbH, Mannheim
--------------------------------	--------------------------------------

Material

Gigapack III XL Packaging Extract	Stratagene, Heidelberg
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Applied Science GmbH, Mannheim
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche Applied Science GmbH, Mannheim
MasterPure™ Genomic DNA Purification Kit	Epicentre, Biozym, Hessisch Oldendorf
PCR Probe Synthesis Kit	Roche Applied Science GmbH, Mannheim
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Restriktionsenzyme	New England BioLabs GmbH
RNeasy Midi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
SuperCos 1 Cosmid Vector Kit	Stratagene, Heidelberg
SV Total RNA Isolation	Promega GmbH, Mannheim
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Weitere organische und anorganische Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Invitrogen GmbH, Karlsruhe; Promega GmbH, Mannheim; Rapidozym GmbH, Berlin; Roth GmbH & Co., Karlsruhe; Sigma, Deisenhofen sowie Stratagene, Heidelberg.

4.3.2 Enzyme und Marker

Restriktionsendonukleasen, T4 Ligase, CIAP alkalische Phosphatase aus Kälberdarm, RNase-freie DNase I, wurden, soweit nicht anders vermerkt, von der Firma New England Biolabs in Frankfurt a. M. bezogen. Die verwendeten 100bp-, 1kb- und λ HindIII-Marker und der Lambda Ladder PFG-Marker für die Agarose-Gelelektrophorese stammen von Invitrogen GmbH, Karlsruhe. Ihr Einsatz erfolgte nach Angaben des Herstellers.

4.3.3 Nährmedien

Folgende Medien wurden nach dieser Beschreibung angefertigt:

-LB-Medium (Luria Broth)	NaCl	5,00 g/l
	Pankreatisches Pepton (Casein)	10,00 g/l
	Hefeextrakt	5,00 g/l
		pH 7,0±0,2
		autoklaviert bei 121°C, 15 min
-LB-Agar (Luria Bertani)	NaCl	5,00 g/l
	Pankreatisches Pepton (Casein)	10,00 g/l
	Hefeextrakt	5,00 g/l
	1 N NaOH	1,00 ml

	Agar	15,00 g/l pH 7,0±0,2 autoklaviert bei 121°C, 15 min
-Blutagar (Nähragar I)	Pankreatisches Pepton (Fleisch)	5,00 g/l
	Pankreatisches Pepton (Gelatine)	5,00 g/l
	Pankreatisches Pepton (Casein)	5,00 g/l
	Eiweißhydrolysat	3,50 g/l
	Hefeextrakt	3,50 g/l
	NaCl	5,00 g/l
	Agar	10,00 g/l pH 7,0±0,2 autoklaviert bei 121°C, 15 min abkühlen auf 45-50°C, anschließend Zugabe von 5% defibriertem Schafblut
-Minimal Medium 9 mit Glucose als Kohlenstoffquelle (M9+)	5 x M9 Salze	200 ml auf 980 ml A. bidest
	1 M MgSO ₄	2 ml
	steril filtrierte 20%ige Glucose	20 ml
	1 M CaCl ₂	0,10 ml
-5 x M9 Salze	Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	64,00 g/l
	KH ₂ PO ₄	15,00 g/l
	NaCl	2,50 g/l
	NH ₄ Cl	5,00 g/l autoklaviert bei 121°C, 15 min
-Hühner-Serum	Wurde von der Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe, bezogen.	Wurde zur Inaktivierung des Komplements 30 min bei 56°C erhitzt.

4.3.4 Lösungen

4.3.4.1 Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

Folgende Lösungen wurden nach dieser Beschreibung angefertigt:

-TBE-Puffer Stammlösung (10 x konz.)	Tris	890 mM	107,82 g	
	Bosäure	890 mM	55,03 g	
	EDTA-Lsg.	500 mM	18,62 g	
	pH 8,00 eingestellt mit NaOH			
			auf 100 ml	
			davon 40 ml	
			auf 1000 ml	
			A. bidest	
-Stop-Lösung	Formamid		9,50 ml	
	EDTA-Lsg.	500 mM	0,40 ml	
	pH 8,00			
	Bromphenolblau		5,00 mg	
	Xylencyanol FF		5,00 mg	
	A. bidest		0,100 ml	
-Agarose	Agarose		1,00-1,50 g	
			auf 100 ml	
			1 x TBE	

-Ethidiumbromidlösung 1%

4.3.4.2 Lösungen für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Folgende Reagenzien wurden in den entsprechenden Konzentrationen von der Firma Rapidozym GmbH, Berlin bezogen:

-10 x PCR buffer	Tris-HCl, pH 8,4	200 mM
	KCl	500 mM
-Taq DNA Polymerase		5 U/μl
-MgCl₂		50 mM
-dNTP	Nukleotid Mix: dATP, dCTP, dGTP, dTTP	jedes dNTP 10 mM

4.3.4.3 Lösungen für die DNS-DNS-Hybridisierung

Die Zusammensetzung der folgenden Reagenzien wurde nach Anweisungen des „DIG Application Manual for Filter Hybridization“ von der Firma Roche Applied Science GmbH aus Mannheim durchgeführt:

-Maleinsäure-Puffer	Maleinsäure (100 mM)	1 M	100 ml
	NaCl (150 mM)	1 M	150 ml
	pH 7,50 eingestellt mit NaOH		
			auf 1000 ml A. bidest
-Blocking Reagenz Stock Solution (BRSS), 10 x konz.	Blocking Reagenz	10%	10,00 g
			auf 100 ml
			Maleinsäurepuffer Erhitzen auf 56°C, autoklavieren Lagerung bei 4°C
-SDS (10%ig)	SDS	10%	20,00 g auf 200 ml A. bidest
-SSC (20 x)	Na-Citrat	300 mM	88,23 g/l
	NaCl	3 M	175,23 g/l
			pH 7,0
-Hybridisierungspuffer	SSC (5 x)	20 x	12,50 ml
	BRSS (1%)	10 x	5,00 ml
	N-Laurylsarcosine (0,1%)	10%	1,00 ml
	SDS (0,02%)	10%	0,10 ml
			auf 50 ml A. bidest
-Stringenz I	SSC (2 x)	20 x	40,00 ml
	SDS (0,1%)	10%	4,00 ml
			auf 400 ml A. bidest

Material

-Stringenz II	SSC (0,1 x)	20 x	2,00 ml
	SDS (0,1%)	10%	4,00 ml
			auf 400 ml
			A. bidest
-Waschpuffer I	Maleinsäurepuffer		100 ml
	TweenR 20	0,3%	0,30 ml
-Blocking Solution (1 x)	BRSS	10 x	10,00 ml
			auf 100 ml
			Maleinsäurepuffer
-Detektionspuffer	Tris (100 mM)	1 M	10,00 ml
	NaCl (100 mM)	1 M	10,00 ml
	pH 9,5 eingestellt mit HCl		
			auf 100 ml
			A. bidest
-Stripping-Puffer	NaOH (0,2 M)	3 M	33,3 ml
	SDS (0,1%)	10%	5,00 ml
			auf 500 ml
			A. bidest

Das Anti Dig-AP-Konjugat sowie die CSPD[®]-Lösung wurden ebenfalls nach den Angaben des „DIG Application Manual for Filter Hybridization“ entsprechend verdünnt und eingesetzt.

4.3.4.4 Sonstige Lösungen

Weitere Lösungen wurden nach folgenden Angaben zusammengesetzt:

-1 x TE	Tris	10 mM	1,21 g
	EDTA	0,5 mM	0,372 g
			auf 500 ml
			A. bidest
			mit HCl (2 M) auf pH 8,0 titrieren
			auf 1000 ml
			A. bidest
			autoklaviert bei 121°C, 15 min
-1 x PBS	NaCl	140 mM	

	KCl	10 mM	
	NaPO x 2 H ₂ O	6,4 mM	
	KHPO	2 mM	
			auf 1000 ml
			A. bidest
			autoklaviert bei 121°C, 15 min
-CTAB/NaCl-Lösung	CTAB	10%	10 g
	NaCl	0,7 M	100 ml
			autoklaviert bei 121°C, 15min
-ESP-Puffer	EDTA	500 mM	18,62 g
	Sarcosyl	3,4 mM	1,00 g
	pH 9,5		auf 100 ml
			A. bidest
	Proteinase K		1,80 mg/ml
-Denaturierungslösung	NaOH	0,5 N	20 g/l
	NaCl	1,5 M	87,66 g/l
			autoklaviert bei 121°C, 15 min
-Neutralisationslösung	Tris-HCl	0,5 M	60,57 g/l
	NaCl	3 M	175,32 g/l
			pH 7,5
			autoklaviert bei 121°C, 15 min

4.4 Oligonukleotid-Primer und DNS-Sonden

4.4.1 Oligonukleotid-Primer für die PCR-Amplifikation

Die in Tab. 2 aufgelisteten Oligonukleotid-Primer wurden von den Firmen Eurogentec Köln, Deutschland und MWG Biotech, Ebersberg synthetisiert.

Material

Primer	Primersequenz (5' – 3')	Genvorlage/ Ziel	Position im Gen (bezogen auf Start- sequenz)	Referenz
M12A09 s	ACTACGCCGTGTTACAGGA	Produkt der Arbi-PCR (<i>pyrD</i> von APEC_O1 ¹)	76 - 93	diese Arbeit
M12A09 as	CGTCATAAGGGGCTTTTTTT	s. M12A09 s	380 - 400	diese Arbeit
AERA s	CCTGATCCAGATGATGATGCTC	<i>iucD</i>	961 - 977	(73)
AERA as	ACAAAAAGTTCTATCGCTTCC	<i>iucD</i>	1039 - 1059	(73)
Arbi-1	GGCCACGCGTCGACTAGTAC(N)10GATAT	Flankierende Sequenz des mini-Tn5Km2		(100)
Arbi-2	GGCCACGCGTCGACTAGTAC(N)10GATAT	s. Arbi 1		(100)
Arbi-3	GGCCACGCGTCGACTAGTAC(N)10GATAT	s. Arbi 1		(100)
Arbi-4	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	s. Arbi 1		(100)
Arbi-5	GGCCACGCGTCGACTAGTAC(N)10GATAT	s. Arbi 1		(100)
<i>carPRT</i> s	TCCGATTGCAGAACAGCTC	<i>carP</i> von APEC_O1 ¹	86 - 104	diese Arbeit
<i>carPRT</i> as	GCCAGACCATGCTGGATC	<i>carP</i> von APEC_O1 ¹	518 - 535	diese Arbeit
<i>cvi/cva</i> ² s	TCCAGGCGGACCCCTTATAG	<i>cva/cvi</i>		(41)
<i>cvi/cva</i> ² as	CGCAGCATAGTTCCATGCT	<i>cva/cvi</i>		(41)
<i>EAST-1</i> s	TGCCATCAACACAGTATATCC	<i>astA</i>	135 - 145	(200)
<i>EAST-1</i> as	TAGGATCCTCAGGTCGCGAGTGCGGC	<i>astA</i>	219 - 245	(200)
HMWP-2 s	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC	<i>irp2</i>	241 - 261	(164)
HMWP-2 as	TCGTCCGGCAGGCGTTTCTTCT	<i>irp2</i>	508 - 528	(164)
ISS s	TCTGGCAATGCTTATTACAGG	<i>iss</i>	333 - 353	(74)
ISS as	AGTGATAAAAACCGAGCAATCC	<i>iss</i>	532 - 552	(74)
MiniTn10Km s	ATTCAACGGGAAACGTCTTG	Kanamycin Resistenzgen des mini- Tn5Km2		(100)
MiniTn10Km as	ACTGAATCCGGTGAGAAATGG	s. MiniTn10Km s		(100)
P6	CCTAGGCGGCCAGATCTGAT	Flankierende Sequenz des mini-Tn5Km2		(100)
P7	GCACTTGTGTATAAGAGTCAG	s. P6		(96)
P9	CGCAGGGCTTTATTGATT	s. P6		(100)
PAPC s	TGATATCACGCAGTCAGTAGC	<i>papC</i>	1284 - 1304	(73)
PAPC as	CCGGCCATATTCACATAA	<i>papC</i>	1749 - 1766	(73)

Primer	Primersequenz (5' – 3')	Genvorlage/ Ziel	Position im Gen (bezogen auf Start- sequenz)	Referenz
<i>pyrD</i> RT s	AACCTGTAACTGCATGGGC	<i>pyrD</i> von APEC_O1 ¹	161 - 180	diese Arbeit
<i>pyrD</i> RT as	ATATTGATGGCGATATATCCCG	<i>pyrD</i> von APEC_O1 ¹	524 - 545	diese Arbeit
<i>pyrDKlon1</i> s	ACGAGCATAAAGCAGATCTTCC	<i>pyrD</i> von APEC_O1 ¹	-389 - -368	diese Arbeit
<i>pyrDKlon1</i> as	AACCAGGGCTGAAAATAAAGC	<i>pyrD</i> von APEC_O1 ¹	1067 - 1086	diese Arbeit
<i>pyrDKlon2</i> -s	GATTTGGCGTGAAGTGGG	<i>pyrD</i> von APEC_O1 ¹	-705 - - 687	diese Arbeit
<i>pyrDKlon2</i> as	AACCAGGGCTGAAAATAAAGC	<i>pyrD</i> von APEC_O1 ¹	1067 - 1086	diese Arbeit
TSH s	GTGATAAACAAAGTCGGCAACA	<i>vat</i> ³ von APEC_O1 ¹	2992 - 3012	(73)
TSH as	GCATTGAGACATCCATTCC	<i>vat</i> ³ von APEC_O1 ¹	3778 - 3796	(73)
U ⁴ s	TCCTACGGGAGGCAGCAGT			
U ⁴ as	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTCTT			
<i>yjgP</i> s	ATAAGATATCTGGTGCGGGA	<i>yjgP</i> von APEC_O1 ¹	10 - 29	diese Arbeit
<i>yjgP</i> as	TCACACCGCTCCTTACG	<i>yjgP</i> von APEC_O1 ¹	1084 - 1101	diese Arbeit
<i>yjgPRT</i> s	CGGTTGACGGCGATATTC	<i>yjgP</i> von APEC_O1 ¹	113 - 130	diese Arbeit
<i>yjgPRT</i> as	TCAACGCTTTTCGATGAACAG	<i>yjgP</i> von APEC_O1 ¹	475 - 494	diese Arbeit

Tab. 2. Oligonukleotid-Primer und deren Herkunft.

¹ Acc. No. CP000468

² Operon, welches mit großen Plasmiden in APEC assoziiert wird, wie pAPEC-O2-ColIV (NC_007675), pTJ100 (AY553855) und pAPEC-O1-ColBM (DQ381420).

³ Die Primer, die in dieser Arbeit für die Amplifizierung von *tsh* verwendet wurden, sind überarbeitet worden, da sie unspezifische Signale lieferten (38).

⁴ Universalprimer für den Nachweis prokaryotischer 16s-rRNS Gene.

4.4.2 Oligonukleotidsonden für die DNS-DNS-Hybridisierung

Alle in dieser Arbeit eingesetzten DNS-Sonden wurden mit dem „PCR DIG Probe Synthesis Kit“¹ nach Angaben des Herstellers synthetisiert. Als Template diente mittels des „MasterPure Genomic DNA Purification Kit“² isolierte DNS der Stämme UPEC CFT073, *E. coli* K12 MG1655, IMT5155 und M12A09.

¹ Roche Applied Science GmbH, Mannheim

² Epicentre, Biozym, Hessisch Oldendorf

4.5 Verwendete Computerprogramme

Diagramme und Tabellen wurden mit Microsoft Office Excel 2003 erstellt. Primersequenzen wurden mit Hilfe des Programms HUSAR/GCG³ (Biocomputing Unit des DKFZ-Heidelberg) definiert.

Sequenzanalysen wurden von der Firma AGOWA GmbH, Berlin durchgeführt. Die ermittelten DNS-Sequenzen wurden mit dem Programm Lasergene^{®3} der Firma DNASTAR analysiert. Der Vergleich der Sequenzen mit nichtredundanten Gen-Datenbanken mit HUSAR⁴- und NCBI⁵-Software erfolgte auf der Grundlage des BLAST (Basic local alignment search tool)-Algorithmus (5). Dabei wurde auf die Datenbanken der „International Nucleotide Sequence Databases“ (INSD)-Kollaboration (GenBank[®], DDJB und EMBL), Chicken ENSEMBL⁶, Nucleotide collection (nr/nt) und SWISSPROT⁷ zurückgegriffen.

³ Vertrieb in Deutschland über GATC Biotech, Konstanz.

⁴ <http://genome.dkfz-heidelberg.de>

⁵ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>

⁶ http://www.ensembl.org/Gallus_gallus

⁷ <http://www.expasy.ch/spot/spot-top.html>

5 Methoden

5.1 Anzucht und Stammhaltung der Bakterien

Die Stämme CFT073, IMT5155 und seine Derivate, IMT5104, M12A09 und seine Derivate, und *E. coli* K12 MG1655 wurden auf Blut- und LB-Agarplatten bei 37°C angezüchtet. Die Anzucht der Mutante M12A09 erfolgte, falls nicht anders beschrieben, unter Zusatz von 50 µg/ml Kanamycin. Nährmedien für mit den Plasmiden pCR2.1-TOPO^{®1} und pACYC184 transformierte Stämme wurden mit 100 µg/ml Ampicillin und 20 µg/ml Tetracyclin entsprechend supplementiert.

Für die Lagerung der Stämme wurde jeweils eine Kolonie einer über Nacht (ü. N.) bebrüteten Platte in 5 ml LB-Medium in Reagenzröhrchen geimpft und ü. N. bei 37°C in einem Schüttelinkubator bei 200 1/min inkubiert. 800 µl dieser Kultur wurden dann mit 200 µl Glycerol² vermischt und in einem 2 ml Kryoröhrchen² bei -20 und -70°C aufbewahrt.

¹ Invitrogen GmbH, Karlsruhe.

² Carl Roth GmbH, Karlsruhe.

5.2 Erstellung einer Cosmidbank des APEC-Stammes IMT5155

Eine genomische Bibliothek ist eine Sammlung willkürlich klonierter DNS-Fragmente, die zusammengenommen das vollständige Genom eines Organismus repräsentieren (Abb. 6). In dieser Sammlung ist es möglich, gezielt nach bestimmten Bereichen des Genoms zu suchen, um diese für die weitere Charakterisierung des Organismus durch molekularbiologische Techniken zu nutzen.

Zunächst wird die DNS des Organismus möglichst schonend extrahiert (s. Punkt 5.3.1.1) und mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease in Fragmente geschnitten. Diese werden in einen Vektor kloniert und die entstandenen Konstrukte in Wirtszellen verbracht.

Bei einer Cosmidbank wird ein Plasmid als Vektor benutzt, das Abschnitte eines Lambda-Phagen trägt, die so genannten *cos*-Sequenzen. Diese ermöglichen es, die Konstrukte *in vitro* in ein Viruspartikel zu verpacken. Das Plasmid erhält dadurch einen Viruscharakter und kann Bakterienzellen transfizieren. Dieser Vorgang ist effizienter als die Transformation von Bakterien. Von Vorteil ist ebenfalls die Kapazität zur Klonierung größerer DNS-Fragmente in den Cosmiden.

Die Genbank vom APEC-Stamm IMT5155 wurde unter Berücksichtigung der Angaben des „SuperCos 1 Cosmid Vector Kit“¹ und des „Gigapack III XL Packaging Extract“³ erstellt.

³ Stratagene, Heidelberg.

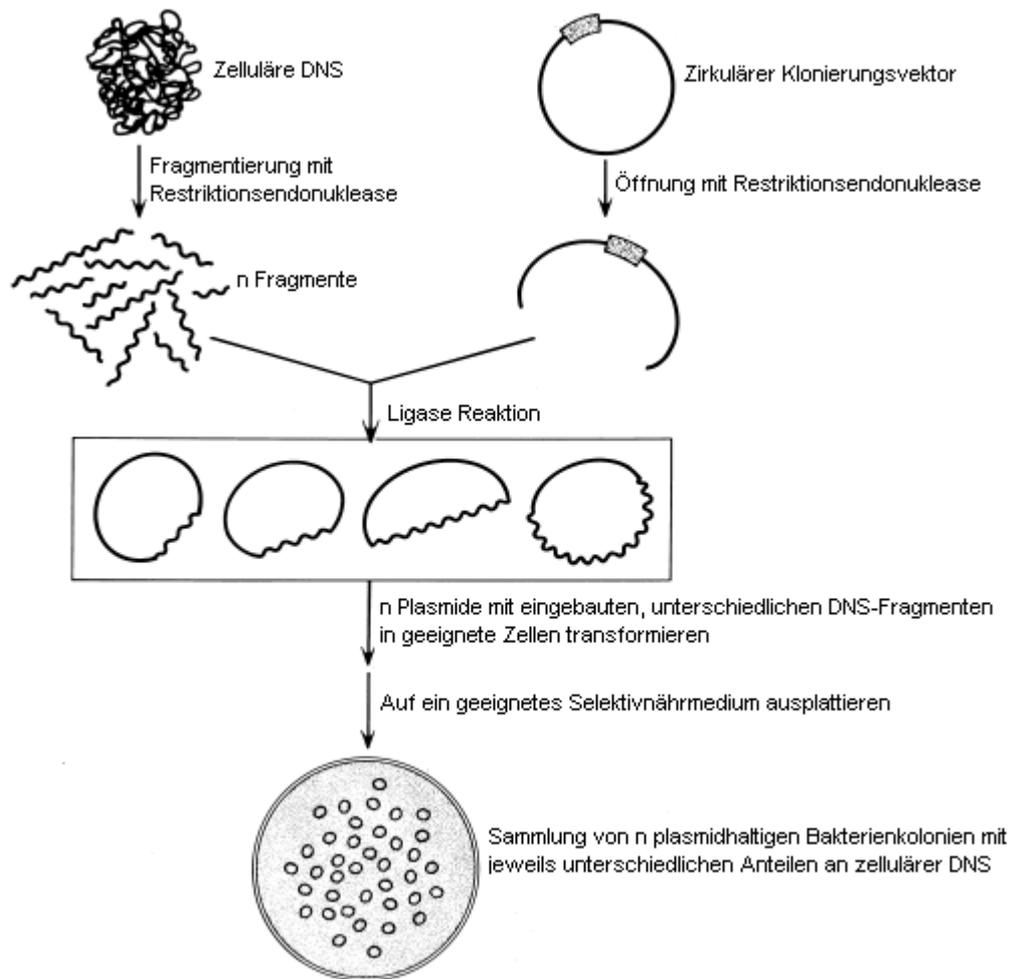


Abb. 6. Schematische Darstellung der Herstellung einer genomischen Bibliothek, modifiziert aus www.gene-quantification.com/mrna.html.

Zunächst wurde genomische DNS aus 400 ml einer frühlogarithmischen (OD_{600} 1,2) LB-Kultur des APEC-Stammes IMT5155 mittels Phenol:Chloroform-Extraktion gewonnen.

100 μ g der DNS wurden 30 min einem Partialverdau mit der Restriktionsendonuklease *Sau3AI* (0,2 U/ μ g DNS) bei 25°C im Wasserbad unterzogen und in einem Sucrosegradienten (10-40% Sucrose) 24 h bei 30.000 1/min in einem „swing out“ Rotor (SW 28) zentrifugiert. Unterschiedliche Fraktionen des Gradienten wurden elektrophoretisch mit einem 0,4%-igen Agarose-Gel bei 20 V 16 h aufgetrennt, um diejenige zu bestimmen, die DNS-Fragmente mit der Größe von 30 kb enthält, da nur solche für die Erstellung einer Genbank nach dieser Methode nützlich sind.

Der Vektor Supercos 1 (7,9 kb; Amp^r) wurde ebenfalls nach Angaben des „SuperCos 1 Cosmid Vektor Kit“ Protokolls mit den Restriktionsenzymen *XbaI* und *BamHI* in der Polylinkerregion geschnitten und mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (calf intestine alkaline phosphatase, CIAP) dephosphoryliert. In 20 μ l Ligationsansatz wurden Vektor und DNS-Fragmente mit T4-Ligase miteinander ligiert.

Die dabei entstandenen Konstrukte wurden anschließend nach den Angaben des „Gigapack III XL Packaging Extract“¹ in Viruspartikel verpackt. Als Wirtszellen für die Transfektion der Cosmide wurden XL1-Blue MR¹-Zellen verwendet. Die Cosmid-enthaltenden Wirtszellen wurden auf LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Ampicillin ausgestrichen und ca. 900 Klone separat in Gefrierkulturen bei -70°C aufbewahrt.

¹ Stratagene, Heidelberg.

5.3 Isolierung von Nukleinsäuren

5.3.1 DNS-Isolierung

5.3.1.1 Phenol:Chloroform-Extraktion für Gram-negative Bakterien

Dieses Verfahren dient dazu, große Mengen DNS in gering fragmentierter Form aus Gram-negativen Bakterien zu extrahieren.

10 ml einer ü. N. LB-Kultur wurden in einem 15 ml Greiner Reaktionsgefäß 10 min bei 5000 x g zentrifugiert und das Bakterienpellet in 5 ml 1 x TE-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl 10% SDS und 4 µl Proteinase K-Lösung (15 mg/ml) wurde die Suspension gemischt und 1 h im 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 1 ml 1 M NaCl und 800 µl CTAB/NaCl-Lösung zur Ausfällung von Proteinen und Polysacchariden dazugegeben und nach Durchmischung 10 min im Wasserbad bei 65°C inkubiert.

Die Trennung der organischen und anorganischen Bestandteile erfolgte durch Zugabe von 5 ml Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) und anschließender Zentrifugation (8 min bei 10.000 x g). Der die DNS enthaltende Überstand wurde in ein sauberes 15 ml Greiner Reaktionsgefäß übertragen und der Extraktionsschritt mit 5 ml Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) wiederholt. Die wässrige Phase wurde erneut in ein sauberes Reaktionsgefäß übertragen und dieser Vorgang so lange wiederholt, bis die Interphase frei von anorganischen Rückständen war.

Die DNS wurde nun durch Zugabe von 0,6 Vol. Isopropanol präzipitiert, auf einen sterilen Glasstab durch eine drehende Bewegung gerollt und in 70% Ethanol getaucht. Abschließend wurde die DNS in 300 µl 1 x TE gelöst und bei 4°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte fluorometrisch nach Angaben des Geräteherstellers Hoefer DyNA QuantTM 200.

5.3.1.2 Hitzelyse

Mit dieser Methode lässt sich DNS aus Bakterien besonders schnell für den Einsatz in der PCR oder zur Fixierung auf einem Nylonfilter für Dot Blots isolieren.

5 ml LB-Medium wurden mit einer Kolonie eines gewünschten Stammes beimpft und ü. N. bei 37°C in einem Schüttelinkubator bei 200 1/min bebrütet. 50 µl dieser Kultur wurden dann mit 150 µl A. bidest verdünnt und in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß Typ „sure-lock“¹, 10 min in kochendes Wasser gestellt. Anschließend wurden die Bakteriensuspensionen 30 sek bei Raumtemperatur (RT) und 16.000 x g zentrifugiert. 5 µl des Überstandes wurden als Template für einen 50 µl PCR-Ansatz und 2 µl zum Auftropfen auf einen Nitrocellulosefilter für das Dot-Blot Verfahren (s. Punkt 5.7.3) verwendet.

¹ Eppendorf AG, Hamburg.

5.3.2 RNS-Isolierung

Für die Gewinnung von Gesamt-RNS für Transkriptionsstudien aus LB- und Hühnerserumkulturen wurde der „SV Total RNA Isolation“² verwendet.

Es wurde stets mit Einweghandschuhen, gestopften Pipettenspitzen, Glasware sowie immer auf Eis unter der Abzugshaube gearbeitet. Die RNS wurde nach ihrer Gewinnung photometrisch analysiert und anschließend bis zur weiteren Verarbeitung unverzüglich bei minus 70°C eingefroren. Menge und Reinheit der isolierten RNS wurden anhand einer photometrischen Spektralanalyse überprüft. Die Extinktionswerte bei den definierten Wellenlängen 260 und 280 nm wurden für jede Probe in einem Spektralphotometer ermittelt. Die Konzentrationsbestimmung beruht darauf, dass aromatische Purin- und Pyrimidinringe in den Nukleobasen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm aufweisen. Bei dieser Wellenlänge entspricht ein OD-Wert von 1 einer RNS-Konzentration von 40 µg/ml. Proteine, genomische DNS und andere aromatische Substanzen (z. B. Phenol) haben ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Der Quotient zwischen den Extinktionswerten bei 260 und 280 nm sollte bei einer reinen RNS-Lösung zwischen 1,8 und 2,0 liegen. War dies in der vorliegenden Arbeit nicht der Fall, wurde der gesamte RNS-Extraktionsprozess wiederholt.

Mit einer Bakterienkolonie wurden 5 ml ü. N. Kulturen in LB-Medium angelegt und am darauffolgenden Tag in einem Verhältnis von 1:50 mit vorgewärmtem LB-Medium oder Hühnerserum verdünnt. Diese Kulturen wurden bis zu einer optischen Dichte von 0,7 bei λ 600 nm (OD₆₀₀) bei 37°C und 200 1/min inkubiert. 1 ml der jeweiligen Kulturen wurde dann mit dem Kit nach Angaben des Herstellers² weiterbehandelt.

² Promega GmbH, Mannheim.

Für die Gewinnung von bakterieller Gesamt-RNS aus Organgewebe von infizierten Hühnern zur *in vivo* Detektion von transkribierten Genen wurde der „RNeasy Midi Kit“¹ benutzt.

Zunächst erfolgte die intratracheale Applikation von jeweils 5×10^8 „colony forming units“ (CFU) in 0,5 ml 1 x PBS des Wildtyps IMT5155 und der Mutante M12A09 an fünf Hühnern pro Stamm. 24 h p. inf. wurden die Tiere euthanasiert und Proben der Lunge, Milz, Niere Leber und des Herzens entnommen. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da aus Vorversuchen bei der Etablierung des Hühnerinfektionsmodells bekannt ist, dass die höchsten Keimkonzentrationen in den Organen 24 h p. inf. Vorzufinden sind (102).

Jeweils 250 mg Organprobe wurden mit 4 ml „RNeasy Lysis“¹-Puffer (RLT) mit einem Ultra Turrax T25[®] homogenisiert und bis zu ihrer weiteren Verarbeitung bei -70°C eingefroren. Die weitere Verarbeitung der Proben erfolgte nach Angaben des Herstellers. Da dieser Kit bei der Isolierung von RNS aus Geweben die bakterielle Zellwand nicht berücksichtigt, wurde dem eigentlichen Isoliervorgang eine 5-minütige Behandlung mit 1 g Lysozym pro 4 ml Homogenisat bei RT vorgezogen.

¹ QIAGEN GmbH, Hilden.

5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Reaktion, in der mittels des Enzyms DNS-Polymerase ein definierter Genbereich exponentiell vervielfältigt wird (160).

Nach thermischer Auftrennung der Matrizen-DNS erfolgt die Anlagerung von Oligo-(n) Nukleotid-Primern (17-35 n) bei einer niedrigeren, primerabhängigen Temperatur und die Vervielfältigung des Zielabschnittes durch eine thermostabile DNS-Polymerase. Dieser Zyklus wird 25-35 Mal wiederholt und so entsteht in sehr hoher Kopienzahl ein PCR-Produkt, das der Größe des Abstandes zwischen beiden Primerbindungsstellen entspricht und somit identifiziert werden kann.

Als Template wurde DNS verwendet, die durch Phenol:Chloroform Extraktion, Hitzelyse oder mit dem „MasterPure™ Genomic DNA Purification Kit“² gewonnen wurde.

² Epicentre, Vertrieb in Deutschland durch Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf.

In der Regel wurde ein 50 µl PCR-Reaktionsansatz wie folgt in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß pipettiert:

10 x PCR Puffer	5 µl
50 mM MgCl ₂	2 µl
dNTP Mix, 10 mM each	1 µl
Primer, 10 pM	je 1 µl
Taq DNS-Polymerase, 5 U/µl (1U)	0,2 µl
Template DNS	5-10 ng
A. bidest	ad 50 µl

Anschließend wurden die Ansätze kurz zentrifugiert und in den vorgeheizten Thermocycler gestellt. Die Reaktionsbedingungen der durchgeführten PCRs sind in Tab. 3 aufgelistet. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tab. 2 aufgeführt.

		Reaktionsbedingungen			
Ziel/Gen	Primer	Denaturierung	Anlagerung	Verlängerung	Zyklen
<i>carP</i>	<i>carPRT</i> s/as	94°C, 30 sec	50°C, 30 sec	72°C, 60 sec	25
Produkt der arbi-PCR (<i>pyrD</i> -Fragment)	M12A09 s/as	94°C, 30 sec	50°C, 30 sec	72°C, 30 sec	25
Kanamycin-Resistenzgen des Tn	Mini-Tn10Km s/as	94°C, 30 sec	55°C, 30 sec	72°C, 30 sec	25
<i>pyrD</i> für die Komplementierung <i>in trans</i>	<i>pyrDKlon1</i> s/as	94°C, 30 sec	50°C, 30 sec	72°C, 60 sec	25
<i>pyrD</i> für die Komplementierung <i>in trans</i>	<i>pyrDKlon2</i> s/as	94°C, 30 sec	58°C, 30 sec	72°C, 105 sec	30
<i>pyrD</i>	<i>pyrDRT</i> s/as	94°C, 30 sec	56°C, 30 sec	72°C, 30 sec	25
<i>yjgP</i>	<i>yjgPRT</i> s/as	94°C, 30 sec	50°C, 30 sec	72°C, 30 sec	25
16s rRNS-Nachweis	U s/as	94°C, 30 sec	56°C, 30 sec	72°C, 30 sec	30
Bereich upstream der Tn-Insertion	<i>pyrDKlon2</i> s/P6	94°C, 30 sec	56°C, 30 sec	72°C, 60 sec	25
Bereich downstream der Tn-Insertion	P7/ <i>pyrDKlon2</i> as	94°C, 30 sec	55°C, 30 sec	72°C, 60 sec	25

Tab. 3. Bedingungen der in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen.

Die Überprüfung der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese auf 1%-igen Gelen bei 90 V.

5.4.1 Diagnostische Multiplex-PCR für APEC-Stämme

Mit dieser PCR werden in einem Ansatz die relevantesten virulenzassoziierten Gene in aviär pathogenen *E. coli*-Stämmen nachgewiesen (183). Folgende Primerpaare (sense und antisense) zum Nachweis der entsprechenden Gene wurden in der Multiplex-PCR eingesetzt:

AERA

EAST-1

HMWP-2

ISS

PAPC

TSH

Ein Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

10 x PCR Puffer	2,5 µl
50 mM MgCl ₂	2 µl
dNTP Mix, 10 mM each	0,8 µl
Primer, 10 pM	je 1 µl
Taq DNS-Polymerase, 5 U/µl (1U)	0,2 µl
Template DNS	5-10 ng
A. bidest	ad 25 µl

Als Template wurde mittels des "MasterPure™ Genomic DNA Purification Kit"¹ gewonnene DNS der Stämme IMT5155 und M12A09 eingesetzt.

Die Reaktionsbedingungen der Multiplex-PCR sind folgend aufgelistet:

Reaktionsbedingungen			
Denaturierung	Anlagerung	Verlängerung	Zyklen
94°C, 30 sec	58°C, 30 sec	68°C, 3 min	25

Die elektroforetische Darstellung der PCR-Produkte erfolgte auf 1,5%-igem Agarose-Gel bei 90 V.

¹ Epicentre, Vertrieb in Deutschland durch Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf.

5.4.2 Arbitrary PCR

Mit dieser Methode, die nach dem Prinzip der nested PCR arbeitet, ist es möglich, die flankierenden Sequenzen der Insertionsstelle des mini-Tn5Km2 zu amplifizieren.

In einer ersten PCR-Reaktion mit niedriger Anlagerungs-Temperatur werden Primer benutzt, von denen einer Tn-spezifisch ist (P6 oder P9) und der zweite aus einer willkürlichen Sequenz mit einem Überhang besteht (arbi 1, 2, 3 oder 5). In dieser PCR-Reaktion binden sie an das Tn und eine andere beliebige Stelle jenseits davon. Aus diesem Reaktionsansatz werden dann 5 µl in eine zweite PCR mit stringenteren Bedingungen (Anlagerung bei 55°C) eingesetzt. Hierbei wird erneut ein Tn-spezifischer Primer (P6 oder P9) wie in der ersten Reaktion verwendet und ein zweiter, der der Sequenz des oben genannten Überhangs entspricht (arbi 4) (Abb. 7) (100, 102). Die Reaktionsbedingungen der arbitrary PCR sind in Tab. 4 und 5 aufgelistet.

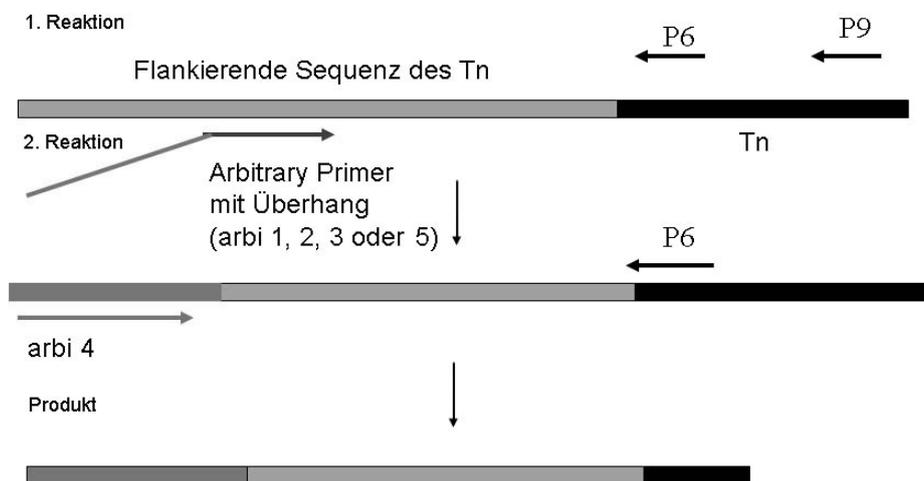


Abb. 7. Schema der Arbi-PCR (100).

100 µl der 1. Reaktion wurden wie folgt pipettiert:

10 x PCR Puffer	10 µl
50 mM MgCl ₂	2 µl
dNTP Mix, 10 mM each	2,5 µl
Primer, 10 pM	je 2 µl
Taq DNS-Polymerase, 5 U/µl (1U)	0,2 µl
Template DNS	200 ng
A. bidest	ad 100 µl

Als Template diente Phenol:Chloroform-extrahierte DNS (s. Punkt 5.3.1.1) der Stämme IMT5155 und M12A09. Für jeden Stamm wurden die Reaktionen 1-8 mit folgenden Primerkombinationen (Sequenzen in Tab. 2) eingesetzt:

- | | |
|--------------|--------------|
| a) P6/arbi 1 | d) P9/arbi 1 |
| b) P6/arbi 2 | e) P9/arbi 2 |
| c) P6/arbi 3 | f) P9/arbi 3 |
| d) P6/arbi 5 | g) P9/arbi 5 |

Arbi-PCR Reaktion I			
Denaturierung1 95°C, 30 sec	Anlagerung1 30°C, 30 sec	Verlängerung1 72°C, 90 sec	Zyklen 6
Denaturierung2 95°C, 30 sec	Anlagerung2 45°C, 30 sec	Verlängerung2 72°C, 120 sec	Zyklen 30

Tab. 4. Reaktionsbedingungen für die erste Arbi-PCR.

100 µl der 2. Reaktion wurden wie folgt pipettiert:

10 x PCR Puffer	10 µl
50 mM MgCl ₂	2 µl
dNTP Mix, 10 mM each	2,5 µl
Primer, 10 pM	je 2 µl
Taq DNS-Polymerase, 5 U/µl (1U)	0,2 µl
Template	5 µl
A. bidest	ad 100 µl

Als Template dienten 5 µl des 1. Reaktionsansatzes. In den Reaktionen 1-8 wurden diesmal die Primer arbi 1-5 durch den Primer arbi 4 ersetzt.

Arbi-PCR Reaktion II			
Denaturierung 95°C, 30 sec	Anlagerung 55°C, 30 sec	Verlängerung 72°C, 120 sec	Zyklen 35

Tab. 5. Reaktionsbedingungen der zweiten Arbi-PCR.

Die Produkte der 2. Reaktion wurden elektrophoretisch analysiert. Dabei wurde 1,5%-iges Agarose-Gel und 100 bp Marker verwendet.

Die PCR-Muster von Wildtyp und Mutante wurden miteinander verglichen und das bei der Mutante zusätzlich erscheinende Amplifikat, nach Bestätigung seiner Spezifität durch

Wiederholung der PCR mit einer „high fidelity“ Polymerase¹ und Aufreinigung aus dem Gel einer Sequenzanalyse² unterzogen.

¹ Herculase® Enhanced DNA Polymerase; Stratagene, Heidelberg

² Beauftragte Firma war AGOWA GmbH, Berlin.

5.5 Reverse Transkription von Gesamt-RNS und Amplifizierung von cDNS

Mit dieser Technik ist es möglich das Transkriptom eines Organismus zu analysieren. Zu diesem Zweck wird zunächst die Gesamt-RNS des Organismus isoliert und anschließend mit dem retroviralen Enzym reverse Transkriptase und Zufallsoligonukleotiden in komplementäre DNS (cDNS) umgewandelt. Die cDNS dient nun als Vorlage für die PCR, bei der eine thermostabile DNS-Polymerase eingesetzt wird.

Die Ergebnisse dieser Reaktion geben Auskunft darüber, ob die Expression der untersuchten Gene unterbrochen ist.

Es wurden je 500 ng, 1 sowie 1,5 µg Gesamt-RNS von den Stämmen IMT5155 und M12A09 aus LB- und Hühnerserumkulturen und aus der Leber, Milz, Lunge, Niere und dem Herzen infizierter Hühner gewonnen (s. Punkte 5.3.2 und 5.12.2), von DNS-Rückständen befreit (RNase-freie DNase I-Behandlung) und mit reverser Transkriptase-PCR in cDNS umgeschrieben. Die aus den Organen infizierter Hühner isolierte RNS wurde nach ihrer Umschreibung in cDNS auf das Vorhandensein bakterieller RNS mit einer universellen Kontroll-PCR für den Nachweis von 16s-ribosomaler RNS (rRNS) in der 30s-Untereinheit bakterieller Ribosomen überprüft. Die Bedingungen sind in Tab. 3 aufgelistet.

Die verwendeten Random-Hexanukleotide, die Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) Reverse Transkriptase und die DNase I wurden nach Angaben des Herstellers³ eingesetzt.

25 µl Reaktionsvolumina in 0,5 ml RNase-freien Reaktionsgefäßen wurden 3 h bei 37°C im Sandbad inkubiert. Nach anschließender Hitzeinaktivierung der reversen Transkriptase (15 min bei 70°C) wurden 2,5 µl cDNS in 50 µl PCR-Reaktionsansätze eingesetzt.

Die dabei verwendeten Primer (Sequenzen in Tab. 2) und PCR-Reaktionsbedingungen sind in Tab. 3 aufgelistet.

Die elektrophoretische Analyse der PCR-Produkte erfolgte auf 1,5%-igem Agarose-Gel bei 90 V.

³ Promega GmbH, Mannheim.

5.6 Pulsfeld-Gelelektrophorese

Anhand dieser Methode können *E. coli*-Stämme unterhalb der Speziesebene typisiert werden. In dieser Arbeit wurde sie dafür benutzt, ein Makrorestriktionsmuster von der DNS der Mutante M12A09 zu erstellen, um anschließend eine DNS-DNS-Hybridisierung mit DNS-Sonden für den Nachweis von *iss*, *cvi/cva* und *tsh* (s. Punkte 5.7.1-2 und 5.7.4) im virulenzassoziierten ColV-Plasmid durchzuführen.

Von einer 5 ml Übernacht-Kultur der Mutante in LB-Bouillon (37°C, 250 1/min) wurde 1 ml entnommen, bei dem unter Zugabe einer 0,9%-igen Kochsalzlösung photometrisch eine optische Dichte OD₆₀₀ von 1,0 eingestellt wurde. Von dieser Suspension wurden 1,5 ml in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und 2 min bei 14.000 1/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zwei Mal mit 1 ml Kochsalzlösung gewaschen und in 500 µl resuspendiert. Diese Bakteriensuspension wurde zu 750 µl einer 1,2%-igen, auf ca. 56°C temperierten Agarose¹ dazugegeben. Nach einer guten Durchmischung wurden ca. 100 µl zügig und ohne Bildung von Luftblasen in Gießformen für Agarose-Blöckchen pipettiert. Nachdem die Blöckchen erstarrt waren, wurden sie vorsichtig aus der Gießform entfernt und jeweils in 500 µl ESP-Lösung (s. Punkt 4.3.4.4) mit 1,8 mg/ml Proteinase K bei 56°C für 24 h im Wasserbad zum Zwecke der Freisetzung der DNS inkubiert. Die Blöckchen wurden am nächsten Tag dreimal mit jeweils 14 ml TE-Puffer bei 4°C unter vorsichtigem Schwenken in einem 100 ml Erlenmeyerkolben jeweils 90 min gewaschen. Anschließend wurden die Blöckchen halbiert und zur Durchführung des DNS-Restriktionsendonuklease-Verdau jeweils in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Bei Raumtemperatur wurden sie 30 min in 600 µl Enzympuffer für *Xba*I² inkubiert. Anschließend wurde der Enzympuffer entnommen und durch 150 µl frischen Enzympuffers ersetzt. 20 Einheiten des Enzyms *Xba*I wurden dazugegeben und über Nacht bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Abschließend wurden die Blöckchen vorsichtig mit einem Spatel in die Taschen eines 1%-igen Pulsfeld-Agarose-Gels überführt. Die Taschen wurden mit der entsprechenden Agarose versiegelt. Die elektrophoretische Auftrennung der restringierten DNS-Fragmente wurde in einer „Contour-clamped homogenous-electric field“-Kammer³ in 0,5 x TBE unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Laufzeit: 22 h; Temperatur: 14°C; Winkel: 120°; Spannung: 6 V und Pulszeit: 5–50 sec.

¹ Pulsed Field Certified Agarose, BioRad, München.

² Qbiogene, Heidelberg.

³ CHEF DR III; BioRad, München.

Es folgte eine 20-minütige Färbung in einer Ethidiumbromidlösung und das Photographieren des Gels unter UV-Licht¹.

¹ Transilluminator TI, Biometra, Wiesbaden und Photo-Kamera Polaroid MP4+ Instant Camera System.

5.7 DNS-DNS-Hybridisierung

Diese Methode beruht darauf, dass doppelsträngige DNS über Hitzeeinwirkung oder pH-Änderung aufgeschmolzen wird und nachfolgend ein Aneinanderlegen (Hybridisierung) zweier komplementärer einzelsträngiger Nukleinsäuremoleküle unter Ausbildung spezifischer Wasserstoffbrückenbindungen (Watson-Crick-Basenpaarung) erfolgt (148).

Eine einzelsträngige, in diesem Fall mit Digoxigenin-11-dUTP markierte DNS-Sonde, hybridisiert unter geeigneten Bedingungen sequenzspezifisch mit der nachzuweisenden, auf einem Nylonfilter fixierten Zielsequenz. Dabei bilden sich sog. ‚Hybrid-Moleküle‘, die nach Entfernung der nicht gebundenen DNS-Sonde mittels einer Chemilumineszenzreaktion auf dem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden können.

Mit unterschiedlichen Anwendungen dieses Verfahrens ist es möglich, plasmidassoziierte Gene, das inserierte Tn in der Mutante (s. Punkt 5.7.2) und den Klon, der den identifizierten Insertionsbereich enthält, in der genomischen Bibliothek des Stammes IMT5155 zu lokalisieren (s. Punkt 5.7.3).

5.7.1 Herstellung von DNS-Sonden mittels PCR

Alle in dieser Arbeit verwendeten DNS-Sonden wurden nach Anleitung des „PCR DIG Probe Synthesis Kit“² synthetisiert. Die PCR-Bedingungen wurden an die Eigenschaften der verwendeten Primer angepasst. Die Überprüfung der DNS-Sonden wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese im Vergleich mit unmarkiertem PCR-Produkt durchgeführt, da markierte PCR-Produkte etwas größer als unmarkierte erscheinen.

Nach durchgeführter PCR wurden die markierten DNS-Sonden zur Kontrolle auf 1%-ige Agarose-Gele aufgetragen und anschließend mit dem „Agarose Gel DNA Extraction Kit“² aufgereinigt.

² Roche Applied Science GmbH, Mannheim

Die verwendeten Primer (Sequenzen in Tab. 2) und Reaktionsbedingungen der erstellten DNS-Sonden sind in Tab. 6 aufgelistet:

Ziel/Gen	Primer	Reaktionsbedingungen			
		Denaturierung	Anlagerung	Verlängerung	Zyklen
Kanamycin-Resistenzgen des mini-Tn5Km2	MiniTn10Km s/as	94°C, 30 sec	55°C, 30 sec	72°C, 30 sec	25
Mittels arbi-PCR ermittelte Sequenz für M12A09	M12A09 s/as	94°C, 30 sec	50°C, 30 sec	72°C, 30 sec	25
<i>cvi/cva</i> *	<i>cvi/cva</i> s/as	94°C, 30 sec	56°C, 60 sec	72°C, 30 sec	30
<i>iss</i>	<i>iss</i> s/as	94°C, 30 sec	58°C, 60 sec	72°C, 30 sec	30
<i>irp2</i>	HWMP-2 s/as	94°C, 30 sec	55°C, 60 sec	72°C, 30 sec	30

Tab. 6. Bedingungen der PCR-Reaktionen für die Herstellung von DNS-Sonden. * Operon, welches mit großen Plasmiden in APEC assoziiert wird, wie pAPEC-O2-ColIV (NC_007675), pTJ100 (AY553855) und pAPEC-O1-ColBM (DQ381420).

5.7.2 Southern Blot

DNS der Mutante M12A09 wurde mit der Restriktionsendonuklease *Xba*I in große Fragmente geschnitten und mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Übertragung der DNS-Fragmente auf eine Nylonmembran nach dem unten beschriebenen Verfahren und die DNS-DNS-Hybridisierung mit DNS-Sonden für die episomal lokalisierten Gene *cvi/cva*, *irp2* und *iss*.

In einem weiteren Ansatz wurden 5 µg Phenol:Chloroform-extrahierte DNS der Stämme IMT5155 und M12A09 in 100 µl Gesamtvolumen mit je 8 verschiedenen Restriktionsenzymen, deren Erkennungssequenzen im Tn nicht vorkommen, verdaut. Dieser Ansatz diente dazu, ein geeignetes Enzym für die Klonierung eines Fragments in einen Vektor zu ermitteln, um die flankierenden Sequenzen der Transposoninsertionsstellen über inverse PCR zu amplifizieren. Gleichzeitig sollte durch die DNS-DNS-Hybridisierung mit einer DNS-Sonde des Kanamycin-Resistenzgens eine einzige Transposoninsertion nachgewiesen werden. Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma New England Biolabs mit Sitz in Frankfurt a. M. bezogen und sind nachstehend aufgelistet:

*Eco*RI, *Eco*RV, *Kpn*I, *Sac*I, *Sal*I, *Spe*I, *Sph*I und *Pst*I.

Die gesamten Reaktionsansätze wurden auf 1%-ige Agarose-Gel 16 h bei 20 V zum Auftrennen der Fragmente gebracht.

Die Agarose-Gele wurden 10 min in 250 mM HCl, 2 x 15 min in Denaturierungslösung und 2 x 15 min in Neutralisationslösung unter leichtem Schwenken gehalten. Positiv geladene Nylonmembranen in der Größe der Gele und darüber mehrere Schichten Zellstoff wurden auf die Gele gelegt und durch ein Gewicht beschwert. Die so entstandenen Türme wurden 20 h in eine Schale mit 20 x SSC zur Übertragung der DNS auf die Membran durch Einwirkung von Kapillarkräften gestellt. Die so transferierte DNS wurde 30 min bei 120°C im Ofen auf der Membran fixiert.

Hitzefixierte Membranen wurden in Whatman Papier eingewickelt und bis zu ihrer Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

5.7.3 Dot Blot

Die DNS von 600 Klonen der Genbank vom Stamm IMT5155 wurde durch Hitzelysen gewonnen. Drei Nylonmembranen wurden mit einem Raster und der Kennzeichnung der einzelnen Klone versehen. In jedes Kästchen wurden 2 µl der entsprechenden Hitzelyse aufgetropft und anschließend wurde die DNS auf den Membranen hitzefixiert (30 min, 120°C).

Mit einer DNS-Sonde des mittels Arbi-PCR identifizierten Fragments sollte der Klon ermittelt werden, der diesen Abschnitt beherbergt, um anschließend die genaue Position der Transposoninsertion näher zu charakterisieren.

5.7.4 DNS-DNS-Hybridisierungsvorgang und Visualisierung

Die DNS-DNS-Hybridisierung und Visualisierung wurden nach Angaben des „DIG Application Manual for Filter Hybridization“¹ mit Digoxigenin-11-dUTP markierten DNS-Sonden durchgeführt. Die dafür benötigten Lösungen sind unter Punkt 4.3.4.3 beschrieben.

Es wurden positiv geladene Nylonmembranen¹ verwendet. Nach der Chemilumineszenzreaktion mit CSPD^{®1} (1-16 h) auf Röntgenfilmen wurden sie mit Stripping-Lösung für ihre mehrmalige Verwendung behandelt und in Frischhaltefolie eingepackt bei 4°C aufbewahrt.

Für die DNS-DNS-Hybridisierung der im Southern- und Dot-Blot (s. Punkte 5.7.2-3) Verfahren erstellten Membranen wurden die DNS-Sonden aus Tab. 6 eingesetzt.

¹ Roche Applied Science GmbH, Mannheim

5.8 Agarose-Gelelektrophorese

Dieses Verfahren dient dazu, DNS-Fragmente nach ihrer Größe zu trennen, um diese durch Vergleich mit einem Nukleinsäure-Marker bekannter Größe zu bestimmen. Die

Gelelektrophorese funktioniert wie ein Sieb für Moleküle; ein elektrisches Feld wird verwendet, um die negativ geladenen DNS-Moleküle durch die Gelmatrix zu ziehen, wobei die kleineren DNS-Moleküle sich schneller durch das Gel bewegen können und somit eine Auftrennung der Fragmente nach ihrer Größe ermöglicht wird.

0,8-1,5 g Agarose wurden in 100 ml 1 x TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Dabei wurden niederprozentige (0,5%) Gele für größere (> 2 kb) und hochprozentige (>1%) Gele für kleine (< 500 bp) DNS-Fragmente verwendet. Nachdem die Lösung auf ca. 60°C abgekühlt war, wurde 1 µl einer 1%-igen Ethidiumbromidlösung zur Darstellung der DNS unter UV-Licht dazugegeben.

Das flüssige Gel wurde in Gelkammern unterschiedlicher Größe gegossen und mit Kämmen für die Aussparungen der Probestaschen bestückt. Nach Erstarren der Gele wurden diese in 1 x TBE-Puffer eingetaucht und die Kämmen gezogen. 200 ng eines adäquaten Markers und 10 µl der PCR-Reaktionen, vermischt mit 2 µl Stop-Lösung, wurden in die Probestaschen pipettiert. Eine Spannung von 90 V wurde für 90 min angelegt und anschließend wurden die Gele auf einem UV-Tisch fotografiert.

Die verwendeten Marker der Größen 100 bp und 1 kb und der Lambda Ladder PFG-Marker¹ wurden nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Alle in diesem Verfahren eingesetzten Lösungen sind unter Punkt 4.3.4.1 genauer beschrieben.

¹ Invitrogen GmbH, Karlsruhe.

5.9 Klonierung

Die Insertionsstelle des Tn in M12A09 wurde durch DNS-DNS-Hybridisierung mit einer DNS-Sonde für das Kanamycin-Resistenzgen lokalisiert und mittels Restriktionsendonuklease-Verdau in einem 3-4 kb großen Fragment aus dem Genom isoliert. Anschließend wurde dieses Fragment mit einem gleichermaßen verdauten Vektor ligiert und zum Zwecke seiner Vervielfältigung und anschließender Sequenzanalyse in Zellen transformiert.

5 µg DNS des Stammes M12A09 wurden mit 8 Restriktionsendonukleasen (s. Punkt 5.7.2), deren Erkennungssequenzen nicht im Tn vorkommen, fragmentiert, und nach ihrer elektrophoretischen Auftrennung mittels Southern Blot auf Nylonmembranen transferiert. Die fixierte DNS der Mutante wurde anschließend mit einer Digoxigenin-11-dUTP markierten DNS-Sonde für das Kanamycin-Resistenzgen des Transposons hybridisiert (s. Punkt 5.7.4).

Anhand der DNS-DNS-Hybridisierungsergebnisse wurde die Restriktionsendonuklease ermittelt, die ein Fragment der Größe zwischen 3 und 5 kb erzeugt, in dem das Tn sowie seine angrenzenden Bereiche enthalten sind. Mit einem anschließend ausgewählten Restriktionsenzym wurden erneut 10 µg DNS der Mutante verdaut und elektrophoretisch

aufgetrennt. Das durch den Hybridisierungsvorgang bestimmte Fragment wurde unter UV-Lichtkontrolle aus dem Agarose-Gel geschnitten und mit dem „Agarose Gel DNA Extraction Kit“¹ aufgereinigt.

5 µg des Klonierungsvektors pUC18 (2,868 kb; Amp^r) wurden in 100 µl Reaktionsvolumina mit dem Enzym *Sa*I verdaut und mit dem „High Pure PCR Product Purification Kit“¹ aufgereinigt.

10 und 20 µl Ligationsansätze mit unterschiedlichen Verhältnissen von Vektor zu Insert (1:1; 1:3 und 1:5) wurden über Nacht bei 16°C mit der T4-Ligase² durchgeführt. Von diesen Reaktionsansätzen wurden jeweils 2, 5 und 10 µl in 40 µl frisch hergestellte elektrokompetente *E. coli* DH5α transformiert.

Nach 1 h Inkubation bei 37°C und 400 1/min wurden die gesamten Transformationsansätze auf LB-Agarplatten mit je 50 µg/ml Kanamycin und Ampicillin für die Selektion positiver Klone ausplattiert und ü. N. bei 37°C bebrütet. Es wurde stets eine Positiv-Kontrolle mit nativem Vektor und negativ-Kontrolle ohne Vektor als Nachweis der Transformationseffizienz durchgeführt.

¹ Roche Applied Science, Mannheim.

² Promega GmbH, Mannheim.

5.10 Wachstumsanalysen

Das Wachstumsverhalten der Stämme IMT5155 und M12A09 wurde in verschiedenen Medien über einen Zeitraum von mindestens 7 h photometrisch anhand der optischen Dichte bei einer Wellenlänge λ von 600 nm (OD_{600}) und Bestimmung der Keimzahl zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Alle Wachstumsanalysen wurden mindestens dreifach wiederholt und ihre Ergebnisse anschließend protokolliert und graphisch dargestellt.

5.10.1 Wachstumskurven und Keimzahlbestimmungen

5 ml-Kulturen in LB-Medium wurden mit einer Kolonie der Stämme IMT5155 und M12A09 angelegt und bei 37°C und 200 1/min über Nacht bebrütet. 1 ml dieser Kulturen wurde in 9 ml vorgewärmtes LB-Medium (ohne Antibiotikazusatz) übertragen und auf ein frühlogarithmisches Stadium bebrütet. Während dieser Zeit (ca. 90 min) wurden beschriftete 300 ml Erlenmeyer Kolben mit 49 ml Medium vorgewärmt. Nach Erreichen der $OD_{600} \sim 1$ wurde 1 ml Kultur in Kolben mit den jeweiligen Kulturmedien übertragen und der OD_{600} -Wert dieses Zeitpunktes festgehalten. Über einen Zeitraum von mindestens 7 h wurde alle 30 min die optische Dichte der einzelnen Kulturen erneut gemessen und protokolliert.

Bei Erreichen der optischen Dichte von 1 wurden die Keimzahlen der Stämme ermittelt. Dafür wurden 500 µl der Kulturen in Verdünnungsreihen mit 4,5 ml 1 x PBS (Verh. 1:10) mit den Verdünnungsstufen 10^{-1} - 10^{-8} eingesetzt. 100 µl der Stufen 10^{-5} - 10^{-8} wurden jeweils auf drei LB-Agarplatten ausplattiert und bei 37°C ü. N. inkubiert. Die Bakterienkolonien wurden ausgezählt und die mittlere Keimzahl der einzelnen Stämme bestimmt. Hiefür wurden nur Platten mit 20 bis 400 Kolonien berücksichtigt.

Als Wachstumsmedien wurden LB-, M9+-Medium (s. Punkt 4.3.3) und hitzeinaktiviertes Hühnerserum (1 h bei 56°C im Wasserbad inkubiert) verwendet. In LB erfolgten Keimzahlbestimmungen nach 3 und 6 h, in Hühnerserum nach 3 und 5 h und in M9+-Medium nach 5 und 7 h, da sich die untersuchten Stämme zu diesen Zeitpunkten in der Phase exponentiellen Wachstums im jeweiligen Medium befinden.

Nach Abschluss des Versuches erfolgte die graphische Darstellung des Wachstumsverhaltens der einzelnen Stämme mit dem Computerprogramm Microsoft Office Excel 2003.

5.10.2 Supplementierungstests

Das Wachstum der Mutante M12A09 wurde in supplementiertem M9+-Medium und Hühnerserum untersucht. Dabei wurde nach dem Prinzip der Wachstumskurvenverfahren, allerdings wurden die Wachstumsmedien mit dem Metabolit Orotat¹ in den Endkonzentrationen 50, 150, 250, 500, 750 µg/ml, 1 und 1,5 mg/ml supplementiert. Keimzahlbestimmungen erfolgten in M9+-Medium nach 5 und 7 h. Die Protokollierung und graphische Auswertung des Wachstumsverhaltens erfolgten ebenfalls mit Microsoft Office Excel 2003.

¹ Carl Roth GmbH, Karlsruhe.

5.10.3 *In vitro* Kompetitionstest („*In vitro* Competition Assay“)

Bei diesem Verfahren konkurrieren zwei unterschiedliche Bakterienstämme mehrere Stunden in dem gleichen Wachstumsmedium um die darin enthaltenen Nährstoffe. Der Versuch dient dazu, eine Aussage darüber zu treffen, ob einer der eingesetzten Stämme *in vitro* eine geringere Vitalität als der andere besitzt.

Die ü. N.-Kulturen und deren Verdünnungen am darauf folgenden Tag wurden wie bei der Erstellung der Wachstumskurven angelegt. Nach Erreichen der OD_{600} von 1 wurde jeweils 5 ml der Wildtypkultur mit 5 ml einer Mutantenkultur in einem 15 ml Greiner Reaktionsgefäß gemischt und 10 min bei 5.000 x g in einer Kühlzentrifuge bei 4°C zentrifugiert. Die Bakterienpellets wurden in 10 ml 1 x PBS resuspendiert und jeweils 98 ml vorgewärmtes LB-

Medium in beschrifteten 500 ml Erlenmeyer Kolben wurden mit 2 ml dieser Bakteriensuspensionen inokuliert.

Es wurden über einen Zeitraum von 8 h die OD_{600} alle 60 min und nach 24 h protokolliert und die Keimzahlen zu den Zeitpunkten 4, 8 und 24 h ermittelt. Hierfür wurden die einzelnen Verdünnungsstufen auf LB-Agarplatten mit und ohne Kanamycinzusatz ausplattiert, um die Mutanten (Mut) von dem Wildtyp (Wt) unterscheiden zu können. Abschließend wurde ein Wettbewerbsindex durch Division der Output-Verhältnisse (Mut/Wt) durch die Input-Verhältnisse (Mut/Wt) kalkuliert. Der Versuch wurde dreifach ausgeführt und anschließend ausgewertet.

5.11 Komplementierung *in trans*

Das Gen *pyrD* wurde in unterschiedliche Vektoren kloniert und in die Mutante M12A09 wieder eingeführt. Anschließend wurden die Wachstumseigenschaften der transkomplementierten Mutante in M9+-Medium anhand von Wachstumskurven und Keimzahlbestimmungen im Vergleich zum Wildtyp und zur defekten Mutante dreifach überprüft.

Mittels PCR wurde das Gen *pyrD* mit seinem eigenen Promotor mit einer „high fidelity“ Polymerase¹ amplifiziert. Zu diesem Zweck wurden Primer ausgewählt, die einen ca. 400 und einen ca. 700 bp großen Bereich vor dem eigentlichen Gen und das Gen selbst (ca. 1,1 kb) erfassen.

Diese Bereiche vor dem eigentlichen Start ergaben sich aus einer Computeranalyse mit dem Programm Neural Network Promoter Prediction (NNPP) Version 2.2². Das Programm ermittelte nach Eingabe eines 700 bp großen Bereichs vor dem Start des Gens *pyrD* zwei mögliche Promotoren (Tab. 7).

Start	Ende	Promotorsequenz
-253 bp	-303 bp	ATAGGCGGCTTTATACACAGGCGTGGCGACAATCAGCCC AT CGGCCTGT
-607 bp	-657 bp	AAAAAAAGCATAAAAAAGCGCAATAAGAAAACGTTTGCT ATT TATTGCC

Tab. 7. Mit dem Programm NNPP ermittelte Promotorensequenzen für das Gen *pyrD*. Start und Ende beziehen sich auf die Positionen vor dem 5'-Ende der Start-Sequenz von *pyrD*.

¹ Herculase[®] Enhanced DNA Polymerase; Stratagene, Heidelberg.

² http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html

Es wurden 2 unterschiedliche Primerpaare entworfen, die diese Promotorpositionen berücksichtigen: *pyrDKlon1* und 2 sense und antisense (s. Tab. 2). Als Vorlage für die Ermittlung der Primerpaare diente die Genomsequenz des UPEC-Stammes CFT073 (Acc. No. AE014075). Die DNS des Stammes IMT5155 wurde als Matrize für die Amplifizierung des Gens und seines Promotors verwendet.

Die verwendeten Primer (Sequenzen in Tab. 2) und die Bedingungen der PCR-Reaktionen für die Amplifizierung des Gens *pyrD* sind in Tab. 3 unter Punkt 5.4 aufgelistet.

Die Klonierung der PCR-Produkte in den high-copy Vektor pCR[®]2.1-TOPO^{®1} (2.9 kb; Amp^r) und deren Transformation in elektrokompetente „One Shot[®] TOP10“¹ *E. coli* wurden nach den Anweisungen des „TOPO TA Cloning[®] Kit“¹ durchgeführt. Die transformierten Zellen wurden für eine blau-weiß-Selektion auf X-Gal beschichtete LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Zehn weiße Kolonien wurden direkt in 50 µl PCR-Reaktionsansätze eingesetzt und auf die erfolgreiche Klonierung des Gens elektrophoretisch überprüft. Aus drei positiven Klonen wurden die Plasmide mit dem „High Pure Plasmid Isolation Kit“² isoliert und durch Verdau mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* erneut auf die richtige Insertion der Gene überprüft.

Ein positiver Klon wurde in 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin ü. N. bei 37°C und 200 1/min bebrütet und anschließend mit 20% Glycerol als Kryokultur aufbewahrt.

Die Plasmide pCR[®]2.1-TOPO:*pyrDKlon1* und pCR[®]2.1-TOPO:*pyrDKlon2* (Insertgröße ca. 1.475 und ca. 1.791 kb entsprechend) wurden mit dieser Technik konstruiert, anschließend aus den Top 10-Zellen mit dem „QIAGEN Plasmid Midi Kit“³ extrahiert und in 1 x TE-Puffer bei 4°C aufbewahrt.

Das Konstrukt mit dem ca. 700 bp großen Promotorbereich wurde nach Isolierung aus dem pCR[®]2.1-TOPO^{®1} in einen weiteren Vektor, das low-copy Plasmid pACYC184, kloniert.

10 µg des Plasmids pACYC184 (4.245 kb; Cm^r und Tc^r) wurden mit 20 U der Restriktionsendonuklease *EcoRI* in 100 µl Reaktionsansatz linearisiert und mit dem „High Pure PCR Product Purification Kit“² aufgereinigt. 10 µl der Reaktion wurden auf 1%-igem Agarose-Gel elektrophoretisch überprüft.

¹ Invitrogen GmbH, Karlsruhe.

² Roche Applied Science, Mannheim.

³ QIAGEN GmbH, Hilden.

Ebenfalls 10 µg des Plasmide pCR[®]2.1-TOPO:*pyrDKlon2* wurden mit dem Enzym *EcoRI* gleich behandelt. Die gesamten Reaktionsansätze wurden auf 1%-igem Agarose-Gel aufgetragen und bei 90 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bande mit der entsprechenden Größe des Inserts (1.791 kb) wurde aus dem Gel geschnitten und mit dem „Agarose Gel DNA Extraction Kit“¹ aufgereinigt.

Mehrere Ligationsansätze mit den molaren Verhältnissen Vektor:Insert von 1:3 und 1:5 wurden in 25 µl Reaktionsvolumina unter Verwendung einer T4-Ligase ü. N. bei 16°C inkubiert. 5 µl dieser Reaktionen wurden anschließend in frisch hergestellte elektrokompente *E. coli* DH5α-Zellen transformiert. Nach 1 h Inkubation bei 37°C und 400 1/min wurden 20, 50 und 100 µl der Zellsuspensionen auf LB-Agarplatten mit 20 µg/ml Tetracyclinzusatz ausplattiert und ü. N. bei 37°C inkubiert.

Die Überprüfung von jeweils 10 Klonen geschah, wie bei der Klonierung in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO^{®2}, mittels PCR und Restriktionsendonukleaseverdau mit anschließender elektrophoretischer Darstellung.

Die Plasmide pCR[®]2.1-TOPO(*pyrDKlon1* und *2*) und pACYC184(*pyrDKlon2*) wurden in den elektrokompenten Stamm M12A09 mittels Elektroporation transformiert, 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend auf LB-Agarplatten mit geeignetem Antibiotikumzusatz ausplattiert.

Nach ca. 16 h Bebrütung bei 37°C wurden von jeder Transformation 10 Klone mittels PCR auf die Anwesenheit der Kanamycinkassette des Tn überprüft (PCR-Bedingungen in Tab. 3). Aus jeweils drei positiven Klonen wurden die Plasmide extrahiert und einem Verdau mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* zum Nachweis der Inserts unterzogen.

Aus den *in trans* komplementierten Stämmen M12A09:pCR[®]2.1-TOPO::*(pyrDKlon1* und *2)* und M12A09::pACYC184(*pyrDKlon2*) wurden 20%-ige Glycerolstocks angelegt und bei -20 und -70°C aufbewahrt.

Die transkomplementierten Mutanten wurden nach dem Prinzip der Wachstumskurven (s. Punkt 5.10.1) in einem dreifachen Ansatz in M9+-Medium überprüft. Die Keimzahlbestimmungen erfolgten bei der Inokulation des Mediums und 5 und 7 h später. Als Negativ-Kontrollen wurden die Stämme IMT5155::pCR[®]2.1-TOPO, IMT5155::pACYC184, M12A09::pCR[®]2.1-TOPO und M12A09::pACYC184, bei denen Wildtyp und Mutante die jeweiligen Nativ-Plasmide für ein Wachstum in Selektivmedium tragen, ebenfalls einer Wachstumsanalyse unterzogen.

¹ Roche Applied Science, Mannheim.

² Invitrogen GmbH, Karlsruhe.

5.12 Infektionsversuche

Die biodynamischen Eigenschaften der Mutante M12A09 wurden *in vivo* in Infektionsversuchen charakterisiert. Unterschiedliche Modelle standen zur Verfügung, anhand derer die Virulenz dieses Stammes im Vergleich zu der des Wildtyps getestet wurde.

Es wurden stets 5 ml ü. N.-Kulturen in LB-Medium aus einzelnen Bakterienkolonien angelegt und bei 37°C und 200 1/min inkubiert. Am Tag des Infektionsversuches wurden diese Kulturen in LB-Medium verdünnt und nach Erreichen der gewünschten optischen Dichte 10 min bei 5.000 x g und 4°C zentrifugiert. Die Bakterienpellets wurden in 1 x PBS resuspendiert und bis zur Infektion der Tiere auf Eis gehalten.

5.12.1 Hühnerembryonen-Letalitätstest [“Chicken Embryo Lethality Assay” (ELA)]

Die von Wooley *et al.* (2000) etablierte Methode dient zur diagnostischen Differenzierung zwischen primär, sekundär pathogenen und nicht-pathogenen aviären *E. coli* (198). Die Begriffe werden von den Autoren als hoch, moderat und avirulent entsprechend näher definiert. Da die Bezeichnungen primär und sekundär irreführend sein könnten, wird in dieser Arbeit auf diese verzichtet und die Stämme, nach Vergabe eines Letalitätsindex unter Beibehaltung der Kriterien, werden als hoch, moderat oder avirulent kategorisiert.

Elf Hühnerembryonen pro Stamm werden mit 100-300 CFU via Allantoishöhle am 12. Bebrütungstag infiziert und weiterbebrütet. Während eines Zeitintervalls von 4 Tagen werden die Eier alle 24 h geschickt und die abgestorbenen Embryonen protokolliert. Anschließend erfolgt die graphische Auswertung der Ergebnisse unter Vergabe von Letalitätsindizes für die einzelnen Stämme.

Die Ermittlung der Infektionsdosis erfolgte auf der Grundlage der zuvor in den Wachstumsanalysen bestimmten Keimzahlen der Stämme IMT5155 und M12A09 in LB-Kulturen bei einer OD₆₀₀ von 1.

Am Tag des Infektionsversuches wurden die ü. N.-Kulturen in einem Verhältnis von 1:10 in LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 1,2 bei 37°C und 200 1/min inkubiert. Die Bakterienkulturen wurden dann zentrifugiert und im ursprünglichen Volumen mit 1 x PBS wieder resuspendiert. Die optische Dichte dieser Suspensionen wurde auf den Wert von 1 eingestellt und eine Verdünnungsreihe in Zehnerpotenzen mit 1 x PBS angelegt. Die 4. Verdünnungsstufe wurde 20-fach verdünnt und mit 1 ml Einwegspritzen wurden 0,1 ml dieser Suspensionen in 11 embryonierte SPF-Eier (Lohmann Tierzucht GmbH) pro Infektionsgruppe in die Allantoishöhle inokuliert. Die Einstichstellen wurden anschließend mit Klebstoff (UHU®) versiegelt und die Eier in den Inkubator bei 37°C und 50-60%

Luftfeuchtigkeit gestellt. Die Wendeautomatik wurde nach 20 h Erholungspause für die Embryonen erneut auf einen 4 h Takt angeschaltet.

Die tatsächliche Infektionsdosis wurde kontrolliert, indem ebenfalls mit der Einwegspritze 0,1 ml auf 6 LB-Agarplatten pro Stamm appliziert, ausplattiert und bei 37°C ü. N. inkubiert wurden.

Die Eier wurden alle 24 h durch die Schierlampe nach Kriterien wie Gefäßinjektion, Farbe und Konsistenz des Inhaltes begutachtet und die abgestorbenen Hühnerembryonen der jeweiligen Infektionsgruppen protokolliert. Am 4. Tag wurde der Versuch abgeschlossen und die Ergebnisse ausgewertet. Die Letalitätsindizes wurden nach folgender Formel berechnet:

$$LI = \frac{\sum nTE}{n} \times (7 - d_{1-4})$$

nTE = Zahl der toten Embryonen

d₁₋₄ = Tag 1 bis 4 des Infektionsversuches

Als Referenzstämme dienten der im Hühnerinfektionsmodell als hochvirulent kategorisierte Stamm IMT5155 und ein *E. coli*-Isolat aus einem klinisch gesunden Huhn, IMT5104. Als Negativkontrolle wurde 11 Eiern 0,1ml 1 x PBS in die Allantoishöhle injiziert.

5.12.2 Infektionsversuch im Hühnerinfektionsmodell

Gruppen mit 5-6 Hühnern wurden in Käfigen aufgestellt und 7 Tage vor dem Infektionsversuch akklimatisiert. Wasser und Futter standen ihnen ad libitum zur Verfügung und die Raumtemperatur wurde konstant bei 20-22°C gehalten. Filtrierte, nicht rezirkularisierte Luft wurde zugeführt und strikte hygienische Konditionen eingehalten.

Die Hühner wurden nach höchsten Standards des menschlichen Umgangs mit Versuchstieren gehalten. Moribunde Vögel wurden unverzüglich durch zervikale Dislokation euthanasiert.

Fünf Wochen alte Hühner wurden jeweils mit ca. $2,5 \times 10^8$ CFU/ml intratracheal mit den Stämmen IMT5155 und M12A09 infiziert, um das krankheitsauslösende Potenzial der Mutante im Vergleich zu dem des Wildtyps zu beurteilen. Als Negativkontrolle wurde 5 Hühnern 0,5 ml 1 x PBS intratracheal verabreicht. Diese Tiere wurden abgesondert von den infizierten Tieren gehalten. Die Versuchsgruppen setzten sich wie folgt zusammen:

Infektionsgruppe	Getesteter Stamm	Anzahl der Tiere
A	IMT5155	10
B	M12A09	10
C	PBS-Kontrolltiere	5

Das Allgemeinbefinden der Tiere wurde während 8 h stündlich am Tag der Infektion und später in 3-stündlichen Abständen anhand des Verhaltens beurteilt und protokolliert.

Drei Hühner der Versuchsgruppen A und B wurden 24 h p. inf. euthanasiert und sezirt. Proben der inneren Organe Lunge, Milz, Leber, Niere und Herz wurden homogenisiert, mit 1 µl/mg 1 x PBS verdünnt und auf LB-Agarplatten ohne und mit Kanamycinzusatz für die Selektion der Mutante ausplattiert. Die Keimzahlen der einzelnen Stämme in den Organen wurden ermittelt. Gleichzeitig wurden Proben für die reverse Transkriptase-PCR (Punkt 5.5) entnommen.

Bei den restlichen Tieren wurde das Allgemeinbefinden weiterhin alle 3 h beurteilt. Moribunde Hühner wurden unverzüglich euthanasiert und entsorgt.

48 h p. inf. wurden 3 Tiere aus allen Versuchsgruppen A-C euthanasiert und sezirt. Mit den inneren Organen wurde wie oben beschrieben verfahren, um die Keimzahlen der Stämme zu ermitteln.

Die Organe der restlichen Tiere wurden ebenfalls entnommen, allerdings wurden in diesem Fall nur Platten nach dem Abklatsch-Verfahren angelegt, um die Vermehrung der Keime zu verifizieren.

6 Ergebnisse

6.1 Genotypische Charakterisierung der Mutante M12A09

6.1.1 Nachweis relevanter virulenzassoziierter Gene

6.1.1.1 Diagnostische Multiplex-PCR

Das Toxingen *astA*, die für die Eisenakquirierung wichtigen Gene *irp2* und *iucD*, das für die Serumresistenz relevante *iss*, das Gen für das Temperatur-sensitive Hämagglutinin *tsh* und das Fimbriengen *papC* wurden mittels einer diagnostischen Multiplex-PCR (183) für APEC-Stämme überprüft.

Die Elektropherogramme der Stämme IMT5155 und M12A09 wiesen identische Bandenmuster für *astA*, *irp2*, *iucD*, *iss* und *tsh* (Tab. 8) auf, so dass eine Mutation durch Insertion des Transposons in eines dieser virulenzassoziierten Gene ausgeschlossen werden konnte.

Das Fimbriengen *papC* ist beim Wildtypstamm und folglich bei der Mutante M12A09 nicht vorhanden.

Virulenzgen	Amplifikatgröße
<i>astA</i>	120 bp
<i>irp2</i>	287 bp
<i>iucD</i>	711 bp
<i>iss</i>	219 bp
<i>tsh</i>	823 bp

Tab. 8. Mittels Multiplex-PCR ermittelten virulenzassoziierten Gene bei den Stämmen IMT5155 und M12A09

6.1.1.2 DNS-DNS-Hybridisierungsergebnisse

Da bekannt ist, dass das ColV Plasmid in Zusammenhang mit der Virulenz von APEC steht, wurden DNS-DNS-Hybridisierungen der DNS von M12A09 mit DNS-Sonden (s. Punkt 5.7.1) für den Nachweis der episomal kodierten Gene *cvi/cva*, *iss* und *tsh* durchgeführt. Für *cvi/cva* und *tsh* wurden Signale im selben DNS-Restriktionsfragment detektiert. Ein zusätzliches Signal in einem größeren Fragment wurde ebenfalls bei der Hybridisierung mit der *tsh*-Sonde registriert (s. Diskussion). Für das ebenso episomal lokalisierte *iss* konnte ein Signal in einem kleineren Fragment identifiziert werden (Abb. 8). Desweiteren zeigt das Restriktionsmuster mit *XbaI* die Abstammung von M12A09 vom Stamm IMT5155.

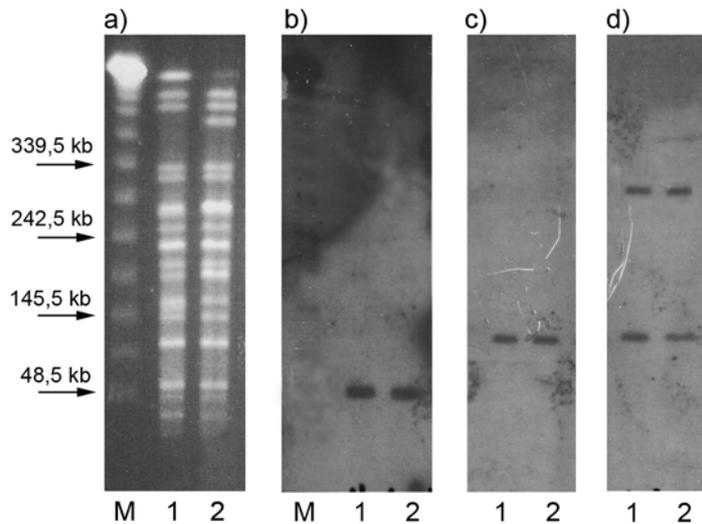


Abb. 8. PFGE-Restriktionsmuster mit der Endonuklease *Xba*I (a) und DNS-DNS-Hybridisierungen (b, c und d). Sowohl beim Wildtyp (1) als auch bei der Mutante M12A09 (2) sind Signale für den Nachweis der Plasmid-kodierten Gene *iss* (b), *cvi/a* (c) und *tsh* (d) vorhanden. M: Lambda Ladder PFG-Marker (Invitrogen GmbH, Karlsruhe).

Die DNS-DNS-Hybridisierung der Restriktionsendonukleasemuster von M12A09 mit den Enzymen *Eco*RI, *Eco*RV, *Kpn*I, *Sac*I, *Sal*I, *Spe*I, *Sph*I und *Pst*I mit der DNS-Sonde für das Kanamycin-Resistenzgen des Tn lieferten eindeutig jeweils nur ein Signal (s. Punkt 6.1.2.1).

Diese Ergebnisse zeigen, dass das virulenzassoziierte ColV-Plasmid nach der Tn-Mutagenese im Stamm M12A09 immer noch anwesend ist und dass es sich um eine einzige Insertion des Transposons handelt.

6.1.2 Detektion des mutierten Genlocus in M12A09

Um die Insertionsstelle des mini-Tn5Km2 zu determinieren wurden gleichzeitig zwei Methoden angewandt. Einerseits wurde gezielt das Tn durch DNS-DNS-Hybridisierung lokalisiert und versucht in 3-5 kb großen Fragmenten in den Vektor pUC18 zu klonieren, um die flankierenden Bereiche mittels inverser PCR zu amplifizieren. Andererseits wurden mit der arbitrary PCR Zufallsamplifikate erzeugt, deren Spezifität für die einzelnen flankierenden Bereiche der Transposons der Mutanten überprüft wurde.

6.1.2.1 Lokalisation des Transposons in M12A09 und Klonierung der flankierenden Bereiche in den Vektor pUC18

Der Gesamtverdau der Mutante und des Wildtyps mit den 8 verschiedenen Restriktionsendonukleasen *Eco*RI, *Eco*RV, *Kpn*I, *Sac*I, *Sal*I, *Spe*I, *Sph*I und *Pst*I wurde auf eine Nylonmembran mittels Southern Blot übertragen und hitzefixiert. Anschließend wurde mit einer DNS-Sonde für das Kanamycin-Resistenzgen das Tn visualisiert (Abb. 9). Durch

diesen Ansatz wird die einmalige Transposoninsertion in das Genom von M12A09 durch die DNS-DNS-Hybridisierungsergebnisse nachgewiesen.

Die DNS-DNS-Hybridisierungsergebnisse ergaben, dass die Restriktionsendonuklease *SalI* für M12A09 für diese Klonierungsstrategie geeignet ist, da diese ein Fragment der Größe 3,7 kb erzeugt, welches das Tn (1,7 kb) und ca. 2 kb des flankierenden Insertionsbereichs enthält.

Es wurde erneut ein Restriktionsansatz der Mutante mit dem entsprechenden Enzym durchgeführt und elektrophoretisch aufgetrennt. Unter UV-Lichtkontrolle wurde nun das ermittelte Fragment aus dem Agarose-Gel isoliert und aufgereinigt. Der Klonierungsvektor pUC18 wurde separat ebenfalls mit den Restriktionsenzymen *SalI* und *EcoRV* linearisiert und elektrophoretisch überprüft.

Anschließend wurden Ligationsansätze in den Verhältnissen Vektor zu Insert 1:1, 1:3 und 1:5 durchgeführt, von denen jeweils 2 und 5 und 10 µl in 40 µl frisch hergestellte elektrokompente *E. coli* DH5α transformiert wurden. Die Zellen wurden auf LB-Agarplatten mit Kanamycin- und Ampicillinzusatz ausgestrichen und ü. N. bei 37°C inkubiert.

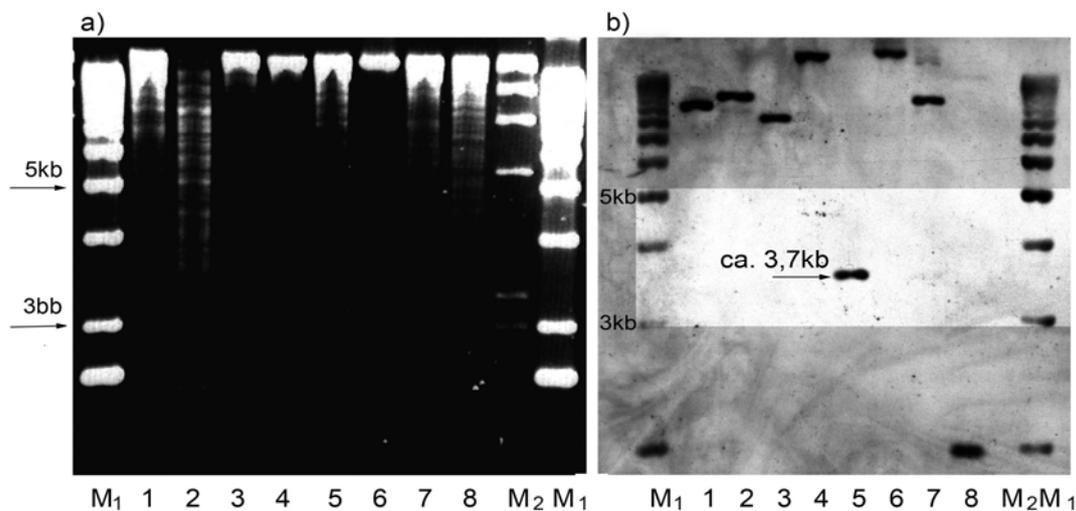


Abb. 9. Elektropherogramm des Gesamtverdaus von M12A09 mit den 8 unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen (a) *EcoRI*, *EcoRV*, *KpnI*, *SacI*, *SalI*, *SpeI*, *SphI* und *PstI* (in der Reihenfolge 1-8) und DNS-DNS-Hybridisierung mit der DNS-Sonde für das Kanamycin-Resistenzgen (b). In Bild b ist der Bereich zwischen 5 und 3 kb hervorgehoben. In diesem Bereich erzeugt der Verdau mit dem Enzym *SalI* ein Fragment in der Größe von ca. 3,7 kb, in dem das Tn enthalten ist (5). Die Marker M₁ und M₂ entsprechen einem 1 kb-Marker und einem λ *HindIII*-Marker in der Reihenfolge.

Trotz mehrmaliger Wiederholung blieb dieser Versuch erfolglos, denn es konnten keine Ampicillin- und gleichzeitig Kanamycin-resistenten Kolonien isoliert werden.

6.1.2.2 Arbitrary PCR

Die elektrophoretische Darstellung der zweiten PCR-Reaktion ergab nach zweimaliger Wiederholung des gesamten Reaktionsansatzes, dass mit dieser Methode für M12A09 mindestens ein Amplifikat erzeugt werden konnte, das in der PCR-Reaktion mit der DNS des Wildtyps als Matrize abwesend und somit für die Mutante spezifisch ist.

Für die Sequenzanalyse wurde ein PCR-Produkt ausgesucht, das eindeutig von anderen Amplifikaten unterscheidbar und isolierbar war (Abb. 10). Die Primerkombination, die diese Kriterien für M12A09 erfüllt, ist P6/arbi 4, nachdem in der ersten arbi-PCR Reaktion der Primer arbi7 (s. Punkt 5.4.2) eingesetzt wurde. Die entsprechende Bande wurde aus dem Agarose-Gel geschnitten und aufgereinigt.

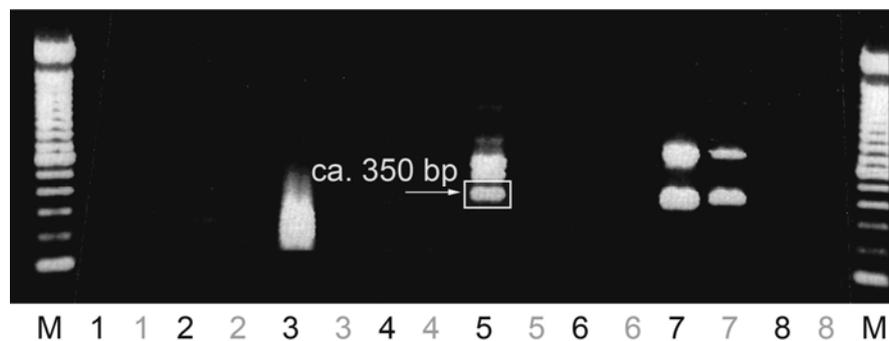


Abb. 10. Elektropherogramm der zweiten Arbi-PCR-Reaktion. Links und rechts im Bild sind die Bandenmuster des 100-bp Markers (M). Von den Reaktionen 1-8 wurden jeweils Mutante (1-8 schwarz) und Wildtyp (1-8 grau) abwechselnd aufgetragen, allerdings lieferten nicht alle ein Signal. Markiert ist das Amplifikat der Reaktion mit der Mutanten-DNS und der Primerkombination P6/arbi4 (schwarze 5), welches eindeutig nicht im Wildtyp vorhanden ist, wie die leere Spur rechts daneben zeigt (graue 5). Es wurde dieses Amplifikat ausgewählt, da es stark und gut abgesetzt von anderen Signalen ist.

Für M12A09 wurde ein ca. 350 bp großes PCR-Produkt zur Sequenzanalyse eingesandt.

6.1.2.3 Computergestützte Sequenzanalyse

6.1.2.3.1 Sequenzdatenabgleich

Die von der Firma AGOWA ermittelten Sequenzdaten des eingesandten arbitrary-PCR-Produkts für M12A09 ergaben folgende 358 bp lange Nukleotidsequenz:

```
5'-AATACCCAGAACGCCGTCATAAGGGGCTTTTTTTACGTTCTCTACGAGAGTTATCAAC
GCCAAGATTATTAAGCCCATACGAGTTGATCAAACCTTCGGTATCTACCAGACGAACAA
GTCGAGGCGTGGCCAAACCTGGCTGGGGACGTGGCGTGACGGTGCCCATCTCGATGG
ATCCTCATCCCGTGGCCACTAACGCGTCAATGCACTCCCCGTCTTTATCAAGACCGGCT
GCCAGACCAAGCGGATTTTTAAACGTCAGGCCCATGCAGTTAACAGGTTTCGCAGGCAC
TTTCTGCCGCACCAGTGCTTCAAACGGCGTTCCTGTAACACGGCGTAGTACTAGTCGAC
GCGTGG-3'
```

Diese Daten wurden mit dem Programmpaket HUSAR/GCG und NCBI-Software mit Zugriff auf die unter Punkt 4.5 erwähnten Datenbanken analysiert. Dabei stellte sich Folgendes heraus:

Für M12A09 ergab der Vergleich der PCR-Sequenz mit den oben genannten Datenbanken eine maximale Identität von 90 bis 93% mit der DNS-Sequenz von *pyrD* aus folgenden Stämmen:

<i>Escherichia coli</i> APEC_O1, Acc. No. CP000468, complete genome	93%
<i>Escherichia coli</i> UTI89, Acc. No. CP000234 complete genome	93%
<i>Escherichia coli</i> CFT073, Acc. No. AE014075, complete genome	93%
<i>Escherichia coli</i> 536, Acc. No. CP000247, complete genome	92%
<i>Escherichia coli</i> W3110 DNA, Acc. No. AP009048, complete genome	92%
<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655, Acc. No. U00096, complete genome	92%
<i>E. coli pyrD</i> gene for dihydroorotate dehydrogenase (EC 1.3.3.1)	92%
<i>Shigella boydii</i> Sb227, Acc. No. CP000036, complete genome	92%
<i>Shigella sonnei</i> Ss046, Acc. No. CP000038, complete genome	92%
<i>Shigella dysenteriae</i> Sd197, Acc. No. CP000034, complete genome	91%
<i>Shigella flexneri</i> 5 str. 8401, Acc. No. CP000266, complete genome	90%
<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301, Acc. No. AE005674, complete genome	90%
<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 2457T, Acc. No. AE014073, complete genome	90%
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. Sakai DNA, Acc. No. BA000007, complete genome	90%



Abb. 11. Die chromosomale Region des sequenzanalysierten APEC_O1-Stammes (Acc. No. CP000468), in der das Gen *pyrD* (Acc. No. NC_008563.1) lokalisiert ist, entnommen aus der NCBI Datenbank.

Das Gen *pyrD* (Acc. No. NC_008563.1) vom Stamm APEC_O1 (Acc. No. CP000468) und der Arbi-PCR-Sequenz wurden mit dem Programm DNA-Star (s. Punkt 4.5) im Modul MegAlign analysiert. Demnach entspricht die PCR-Sequenz der des *pyrD* an den Positionen 77-417. Die genetische Region des *pyrD* im Stamm APEC_O1 ist in Abb. 11 dargestellt.

6.1.2.3.2 Primerdesign

Das Primerdesign für die Entwicklung von analytischen PCRs erfolgte unter Benutzung der Sequenzdaten des UPEC-Stammes CFT073 (Acc. No. AE014075), da zum Zeitpunkt der Untersuchungen die größte Ähnlichkeit des partiell sequenzanalysierten *pyrD* von M12A09 mit diesem Stamm bestand.

6.1.2.4 Screening der Cosmidbank des Stammes IMT5155 und PCR zur Ermittlung der Insertionsstelle des Transposons

Mit dem Primerpaar M12A09arbi s und as (Sequenz in Tab. 2), welches das in der Arbi-PCR ermittelte Fragment amplifiziert, wurde eine DNS-Sonde generiert (Bedingungen in Tab. 3). Sechshundert Klone der Cosmidbank wurden im Dot-Blot-Verfahren auf Nylonmembranen fixiert und mit dieser DNS-Sonde mittels DNS-DNS-Hybridisierung analysiert. Die Entwicklung der Röntgenfilme zeigte unspezifische positive Reaktionen bei einer Vielzahl von Klonen. Dieser Effekt lässt sich durch den sogenannten K12-Hintergrund erklären. Die Cosmidkonstrukte wurden in *E. coli* K12-Zellen gespeichert und bei der Hitzelyse zur DNS-Isolierung der einzelnen Klone wird die DNS der Wirtszellen ebenfalls freigesetzt und befindet sich dann als Hintergrund bei jedem einzelnen Dot. Da das *pyrD* als „Housekeeping“-Gen ebenfalls bei *E. coli* K12 vorkommt, ist dieser Effekt erklärbar. Aus diesem Grund wurde eine Alternativmethode zur Ermittlung der genauen Insertionsstelle des Transposons angewandt.

Die Transposon-spezifischen Primer P6 und P7 (Sequenzen in Tab 2) sind so gewählt, dass sie an den Enden der Transposonsequenz nach außen gerichtet sind, und bei ihrer Anwendung die flankierenden Bereiche der Insertionsstelle amplifizieren (Abb. 13). Diese Primer wurden in einer PCR-Reaktion (Bedingungen in Tab.) mit den für die Amplifizierung des Gens *pyrD* ermittelten Primer *pyrDKlon2* s/as (Sequenzen in Tab 2) in 4 möglichen Kombinationen eingesetzt:

1) *pyrDKlon2* s/P6

2) *pyrDKlon2* s/P7

3) *pyrDKlon2* as/P6

4) *pyrDKlon2* as/P7

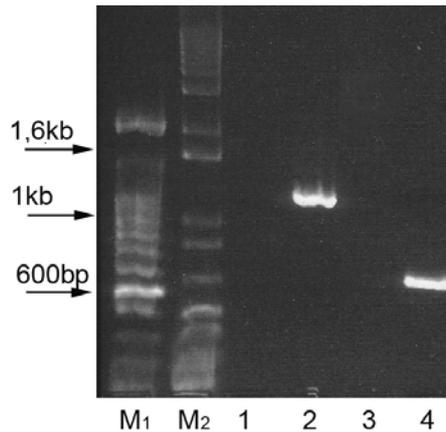


Abb. 12. PCR-Reaktion mit den Primerkombinationen *pyrDKlon2-s/P6* und *pyrDKlon2-as/P7*. Die erste Kombination ist bei IMT5155 negativ (1), und liefert bei M12A09 ein ca. 1,1 kb großes Amplifikat (2). Die zweite Kombination ist bei IMT5155 ebenfalls negativ (3), und bei der Mutante wird ein ca. 600 bp großes Amplifikat erzeugt (4). Die Marker M₁ und M₂ entsprechen einem 100 bp- und einem 1 kb-Marker in der Reihenfolge.

Dabei lieferten die Reaktion a) ein ca. 1,1 kb und d) ein ca. 700 bp großes Fragment (Abb. 12). Bei den restlichen Reaktionen gab es keine Amplifikate. Der Abschnitt, in dem sich das Transposon im Stamm M12A09 befindet, lässt sich nun auf der Grundlage der Sequenzdatenanalyse des Arbi-PCR-Produktes und der Sequenzdaten des APEC_O1-Stammes (Acc. No. CP000468) wie auf Abb. 13 konstruieren:

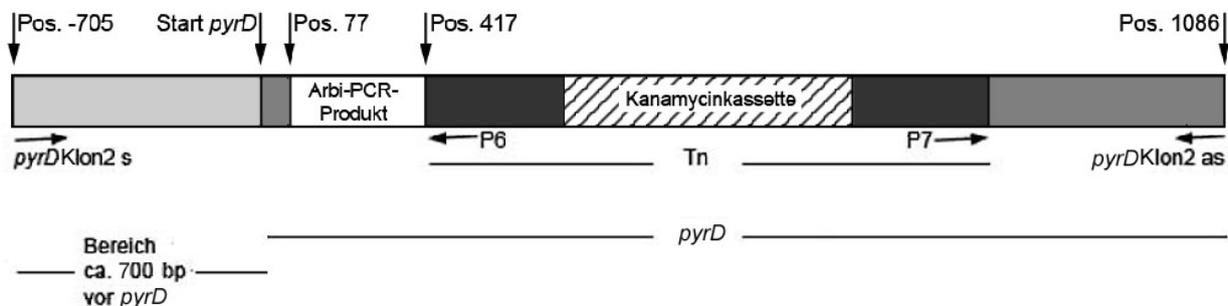


Abb. 13. Karte des Bereichs der Transposoninsertion. Ermittelt durch PCR mit Kombinationen des Primerpaares *pyrDKlon2 s/as* mit jeweils P6 oder P7. Die Positionen gelten für die chromosomale Region des Gens *pyrD* (Acc. No. NC_008563.1) beim APEC_O1-Stamm (Acc. No. CP000468).

6.1.3 Transkriptionsstudien

6.1.3.1 Transkriptionsstudien *in vitro*

Die photometrische Qualitätskontrolle der *in vitro* gewonnenen RNS ergab Extinktionswertquotienten zwischen 1.83 und 1.85_{260/280}. Die RNS der Stämme IMT5155 und M12A09 wurde aus LB- und Hühnerserumkulturen gewonnen und in cDNS umgeschrieben.

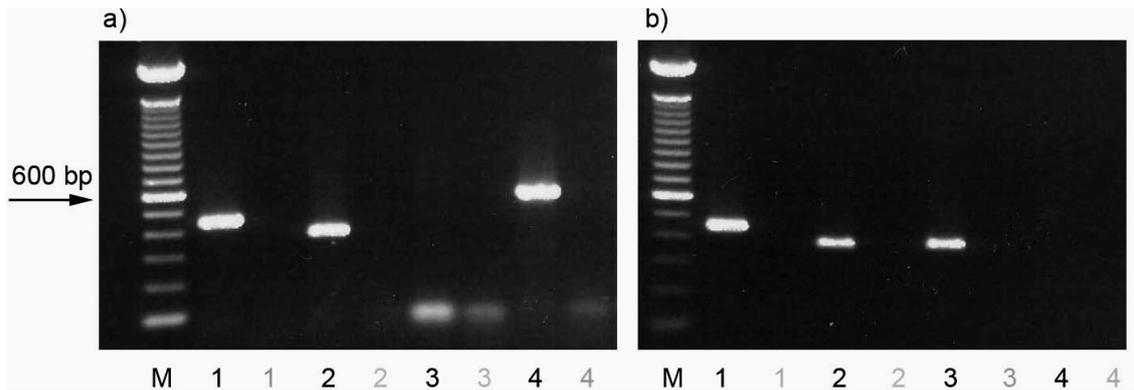


Abb. 14. Elektropherogramme der reversen Transkriptase-PCR-Reaktionen mit cDNS von M12A09 als Matrize. Links in beiden Bildern zu sehen sind die Bandenmuster des 100 bp-Markers (M). Die Signale 1-4 entsprechen den Produkten der Reaktionen für die Gene *carP*, *yjgP*, *pyrD* und das Kanamycin-Resistenzgen bei M12A09 in Bild a und bei IMT5155 in Bild b. Bei der Mutante fehlt das Signal der *pyrD*-PCR (a, 3). Bild b zeigt die Abwesenheit des Kanamycin-Resistenzgens beim Wildtyp (4). Als Kontrolle wurden PCRs mit RNS durchgeführt, die in den leeren Spuren neben den Signalen (hellgraue Beschriftung 1-4) auf die Freiheit von DNS-Rückständen bei der Gewinnung der RNS hindeuten. Die PCR ist sowohl für RNS aus LB-, als auch für solche aus Hühnerserum-Kulturen anwendbar.

Diese diente nun als Matrize für eine PCR, in der das Produkt der Arbi-PCR erneut amplifiziert werden sollte. Als Kontrolle dienten die konservierten Gene *carP*¹ und *yjgP*² und das Kanamycin Resistenzgen. Anhand der Sequenzdatenbank des UPEC-Stammes CFT073 (Acc. No. AE014075) wurden zuvor Primerpaare für *carP* und *yjgP* (s. Tab. 2) ausgesucht, anhand derer die Präsenz der Gene im APEC-Stamm IMT5155 und in der Mutante M12A09 überprüft wurde. Die PCRs für diese Gene ergaben identische Signale bei den Stämmen CFT073, IMT5155 und M12A09. Die anschließend ermittelten Primerpaare für die Transkriptionsstudien dienen zur Amplifizierung von Bereichen der cDNS in der für reverse Transkriptase-Anwendungen empfohlenen Größenordnung zwischen 200 und 500 bp (162). Es zeigte sich, dass bei dem Wildtyp die Synthese der konservierten Kontrollgene und die des *pyrD*-Genabschnitts ungestört verlaufen, während ein Signal beim Kanamycin-Resistenzgen fehlt. Bei der Mutante wird das Gen *pyrD* als einziges nicht transkribiert und fehlt demnach in der cDNS (Abb. 14).

¹ *carP* oder *pepA* (Acc. No. YP_859927) kodiert eine Leucyl-Amino-peptidase, involviert in Aminosäure-Transport und Stoffwechsel.

² *yjgP* (Acc. No. YP_859928) kodiert eine putative Permease. Die orthologen Gene bei *Escherichia coli* K-12 und *Escherichia coli* O157:H7 besitzen die entsprechenden Identifikationsnummern b4261 und z5873 und folgen im Chromosom immer dem Gen *carP*.

6.1.3.2 Transkriptionsstudien *in vivo*

Die Extinktionswertquotienten der aus den inneren Organen der Hühner isolierten RNS (s. Punkt 5.3.2) lagen zwischen und $1.80\text{-}1.98_{260/280}$ und die Konzentrationen zwischen $200\text{ ng}/\mu\text{l}$ bis $1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Die durchgeführte 16s rRNS-Kontroll-PCR für den Nachweis bakterieller RNS zeigte schwache Banden für alle untersuchten RNS-Proben in der erwarteten Größe von 466 bp (Abb. 15).

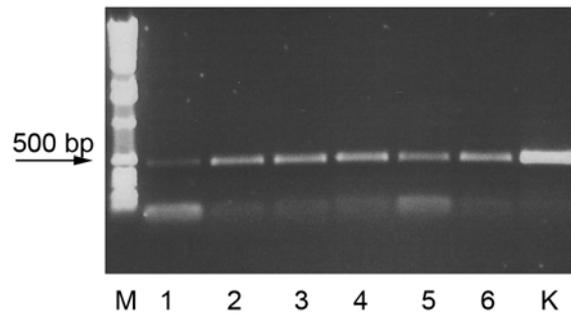


Abb. 15. Durchgeführte PCR zum Nachweis der bakteriellen 16s-RNS aus Organproben. Dargestellt sind die Ergebnisse dieser PCR mit cDNS aus Lunge (1-2), Leber (3-4) und Herz (5-6) von jeweils zwei unterschiedlichen Tieren. Unter K ist die Kontroll-PCR mit DNS vom Stamm IMT5155 aufgetragen. Der Vergleich mit dem 1 kb-Marker (M) zeigt Signale der erwarteten Größe von 466 bp.

Trotz mehrmaliger Wiederholung, sowohl der RNS-Extraktionsschritte aus den Organen, als auch der reversen Transkriptase-PCR konnte in diesem Ansatz keine PCR für den Nachweis über die fehlende Transkription von *pyrD* bei M12A09 etabliert werden. Sämtliche PCRs, die mit der RNS aus Organmaterial durchgeführt wurden, lieferten, im Gegensatz zu den Positivkontrollen mit DNS, keine positiven Signale im Elektropherogramm.

6.2 Phänotypische Charakterisierung der Mutante M12A09

6.2.1 Wachstumsanalysen in LB-Medium

Die Eigenschaften des Wachstums der Stämme IMT5155 und M12A09 wurden in LB-Medium bei 37°C und $200\text{ 1}/\text{min}$ untersucht, um die Ausgangsbedingungen der einzelnen Stämme für die Tierversuche zu definieren.

6.2.1.1 Wachstumskurven und Keimzahlbestimmung in LB-Medium

In LB-Medium zeigten die Stämme ein identisches Wachstumsverhalten, gemessen an der Entwicklung der OD_{600} über einen Zeitraum von 24 h (Abb. 16).

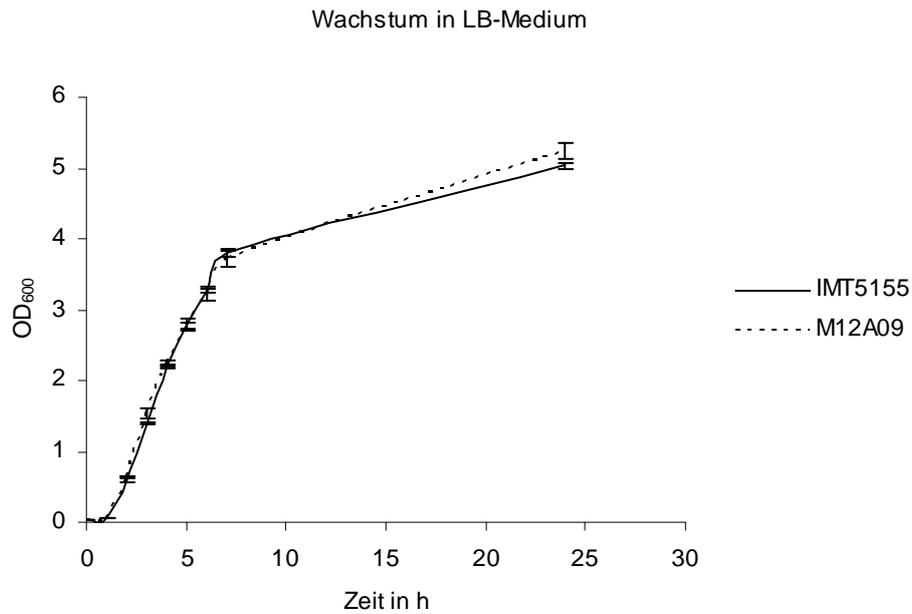


Abb. 16. Wachstumsverhalten der Stämme IMT5155 und M12A09 in LB-Medium bei 37°C, ermittelt nach dreifacher Durchführung, aus der sich die angegebenen Standardabweichungen ergeben.

Die Keimzahlen 3 und 6 Stunden nach Inokulation des Wachstumsmediums lagen bei den Stämmen IMT5155 und M12A09 entsprechend zwischen $5,4\text{-}3,3 \times 10^8$ und $2,5\text{-}2,9 \times 10^9$ CFU/ml und zeigten somit gleiche Ausgangsbedingungen für den Tierversuch (Abb. 17).

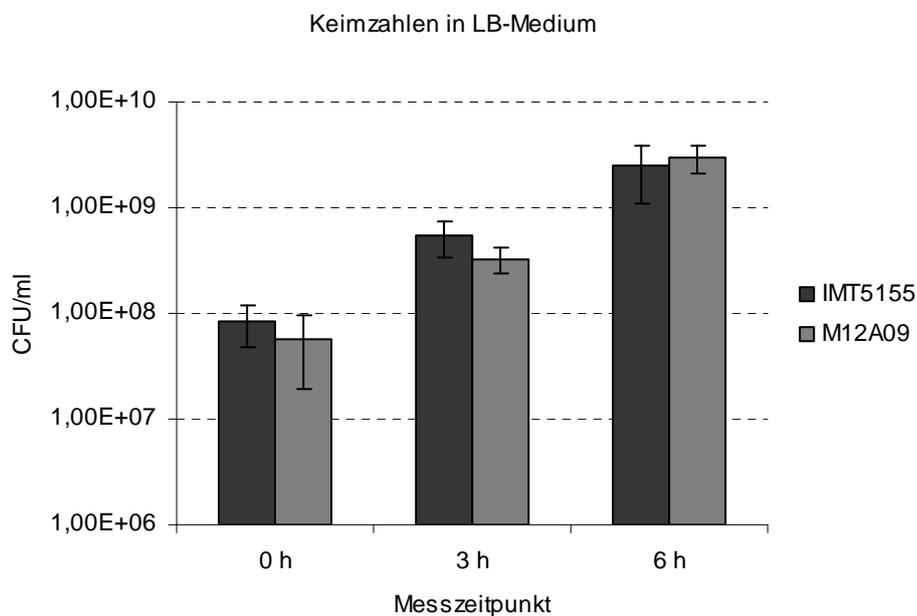


Abb. 17. Keimzahlbestimmung zum Zeitpunkt der Inokulation des LB-Mediums, sowie 3 und 6 Stunden später, während der logarithmischen Wachstumsphase. Die Ergebnisse stammen aus der dreifachen Wiederholung des Versuches.

6.2.1.2 *In Vitro* Konkurrenztest („*In vitro* Competition Assay“)

Die Fähigkeit der Mutante M12A09, mit dem Wildtyp um die in LB-Medium enthaltenen Nährstoffe zu konkurrieren, wurde überprüft. Für die Durchführung dieses Versuches wurden die Bedingungen standardisiert; ü. N.-Kulturen wurden ohne Zusatz von Antibiotikum durchgeführt und am darauf folgenden Tag im Verhältnis 1:50 mit LB-Medium verdünnt, so dass sich alle Stämme in derselben logarithmischen Phase zum Zeitpunkt der Inokulation des Wachstumsmediums befanden. Der Versuch wurde dreifach ausgeführt. Die OD₆₀₀-Werte und die Konkurrenzindizes zu den Zeitpunkten 4, 8 und 24 h (Tab. 9) ergaben in allen Messungen eine leichte (1,35-fach nach 4 Stunden) Verdrängung der Mutante durch den Wildtyp, die sich innerhalb des gemessenen Zeitraums konstant hielt. Somit konnte bei diesem Versuch keine starke Vitalitätsabnahme bei dem Stamm M12A09 registriert werden.

Zeitpunkt	Stämme	Konkurrenzindex (KI)
4 h	IMT5155/M12A09	0,74
8 h	IMT5155/M12A09	0,77
24 h	IMT5155/M12A09	0,77

Tab. 9. Ergebnisse des „*In Vitro* Konkurrenztests“ zwischen den Stämmen IMT5155 und M12A09. KI-Werte >1 zeigen eine Verdrängung des WT durch die Mutante; Werte <1 zeigen eine Verdrängung der Mutanten durch den WT. Eine Verdrängung der Mutante durch den WT um das 10-fache wurde als leichte, eine um das 100-fache als moderate und eine um mehr als das 100-fache als starke Attenuierung interpretiert.

6.2.2 Wachstumsverhalten in M9+-Medium und Hühnerserum

In M9+-Medium zeigte die Mutante M12A09 keinerlei Wachstum, wie die Wachstumskurve, die Abnahme der Keimzahlen 5 und 7 h ($1,5$ und 1×10^7 CFU/ml) nach Inokulation im Vergleich zur Ausgangskonzentration ($2,1 \times 10^7$ CFU/ml) und die fehlende Trübung des Mediums belegen, während der Wildtyp Werte im Bereich von ca. 4×10^8 CFU/ml erreichte und sein typisches sigmoides Wachstumsverhalten aufwies (Abb. 18).

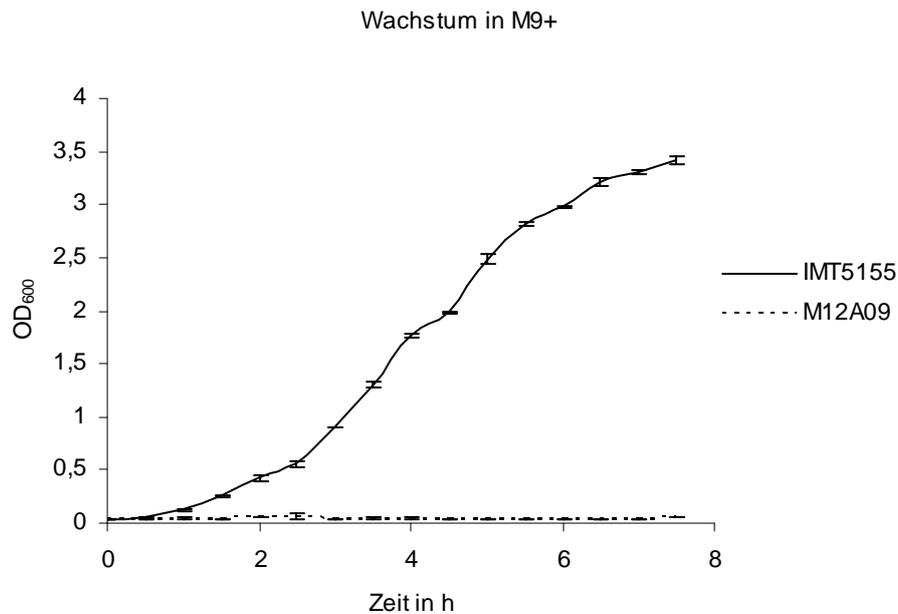


Abb. 18. Wachstumsverhalten von M12A09 im Vergleich zum Wildtyp IMT5155 in M9+-Medium bei 37°C. Gemessen an der OD₆₀₀ konnte bei der Mutante keinerlei Wachstum festgestellt werden. Die Standardabweichungen zu den Messzeitpunkten ergeben sich aus einer dreifachen Wiederholung des Versuches.

In hitzeinaktiviertem Hühnerserum hörte der Anstieg der OD₆₀₀-Werte bei der Mutante M12A09 ca. 2 h nach der Inokulation des Serums auf (Abb. 19). Die Messung der Keimzahlen ergab, dass, ausgehend von einer Keimzahl von $1,5 \times 10^7$ CFU/ml zum Zeitpunkt 0, nach 3 h ca. 4×10^8 CFU/ml M12A09 und nach 5 h eine Abnahme auf ca. 2×10^8 CFU/ml ermittelt werden konnten (Abb. 20).

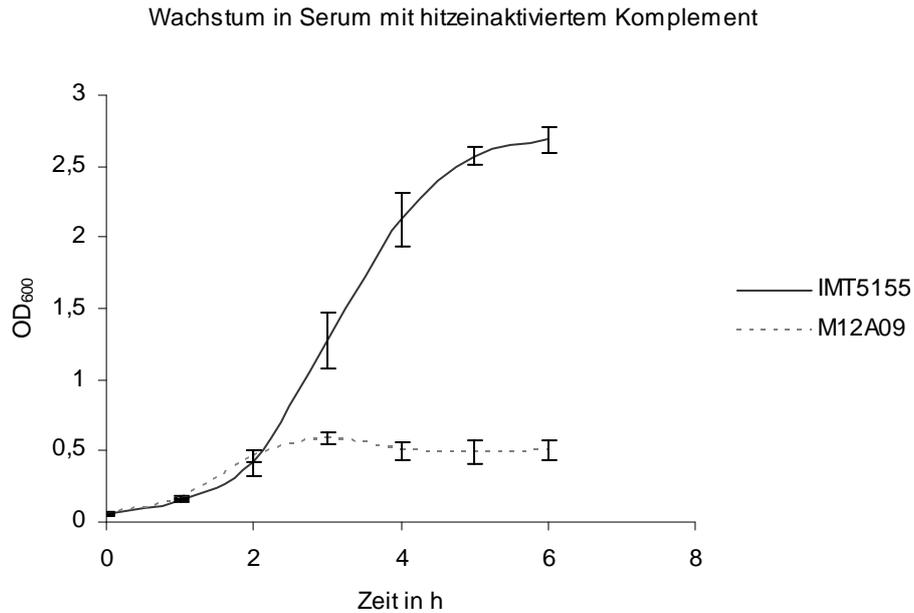


Abb. 19. Wachstumsverhalten der Stämme IMT5155 und M12A09 in hitzeinaktiviertem Serum. Nach ca. 2 Stunden hört der Anstieg der OD₆₀₀-Werte bei der Mutante auf, während der Wildtyp ungehindert weiter wachsen kann. Eingetragen sind Standardabweichungen, die sich aus der dreifachen Wiederholung des Versuches ergeben.

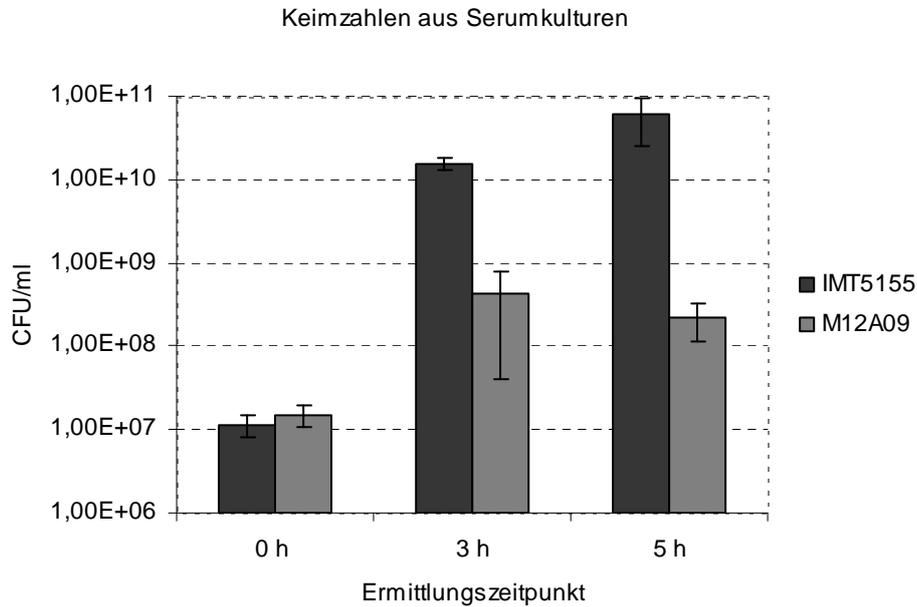


Abb. 20. Keimzahlen der Stämme IMT5155 und M12A09 nach 0, 3 und 5 h Wachstum in hitzeinaktiviertem Hühnerserum. Sie belegen die Abnahme der Vermehrungsrate für M12A09, die in der Wachstumskurve zu sehen ist. Die Ergebnisse stammen aus einer dreifachen Wiederholung des Versuches.

6.2.3 Supplementierung von M9+-Medium mit Orotat

Nach den Ergebnissen der Sequenzanalyse liegt bei M12A09 ein Defekt im Gen *pyrD* vor, welches das Enzym Dihydroorotatdehydrogenase (DHODHase, EC 1.3.3.1) kodiert. Demnach ist nach derzeitigem Wissen der 4. Schritt der *de novo* Synthese der Pyrimidine bei dieser Mutante unterbrochen. Das Enzym Dihydroorotatdehydrogenase ist nicht in der Lage das Substrat Dihydroorotat zu Orotat zu oxidieren (s. Abb. 5).

In einer Reihe von Ansätzen mit den Endkonzentrationen 50, 150, 250, 500, 750 µg/ml, 1 und 1,5 mg/ml wurde versucht, den Mangel an Orotat durch externe Zufuhr dieses Metabolits in M9+-Medium und in Hühnerserum zu kompensieren (Abb. 21). Es stellte sich heraus, dass die optimale Orotatkonzentration in M9+-Medium 750 µg/ml beträgt, um das Wachstum von M12A09 dem des Wildtyps weitestgehend anzupassen. Die Keimzahlen der Mutante lagen nach 5 und 7 h bei ca. $7,7 \times 10^7$ und 1×10^8 CFU/ml und beim Wildtyp bei 1×10^8 und 5×10^8 CFU/ml.

Die geringste Orotatkonzentration, bei der eine Verbesserung des Wachstums gerade erkennbar war, betrug 150 µg/ml (wegen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt). Ab einer Konzentration von 1 mg/ml verschlechtert sich wiederum zunehmend das Wachstumsverhalten der Mutante im Vergleich zum Wildtyp.

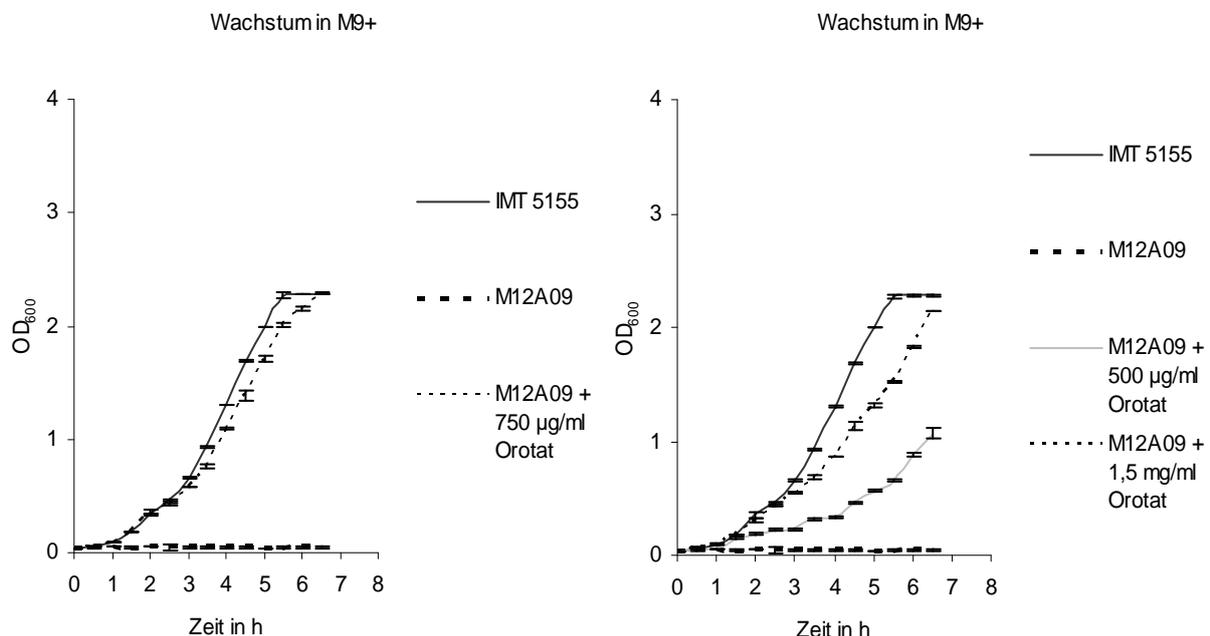


Abb. 21. Übersichtsdigramme über das Wachstumsverhalten in M9+-Medium bei 37°C supplementiert mit 500, 750 µg/ml und 1,5 mg/ml Orotat. Mutante und Wildtyp verhalten sich bei einer Supplementierung des Mediums mit 750 µg/ml annähernd gleich. Die angegebenen Standardabweichungen ergeben sich aus der dreifachen Wiederholung der Versuche.

Basierend auf den Ergebnissen in M9+-Medium wurde Hühnerserum mit 750 µg/ml Orotat supplementiert. Diese Konzentration erbrachte eine deutliche Verbesserung des Wachstums von M12A09, wenn auch der Phänotyp des Wildtyps nicht vollständig reproduziert werden konnte. (Abb. 22).

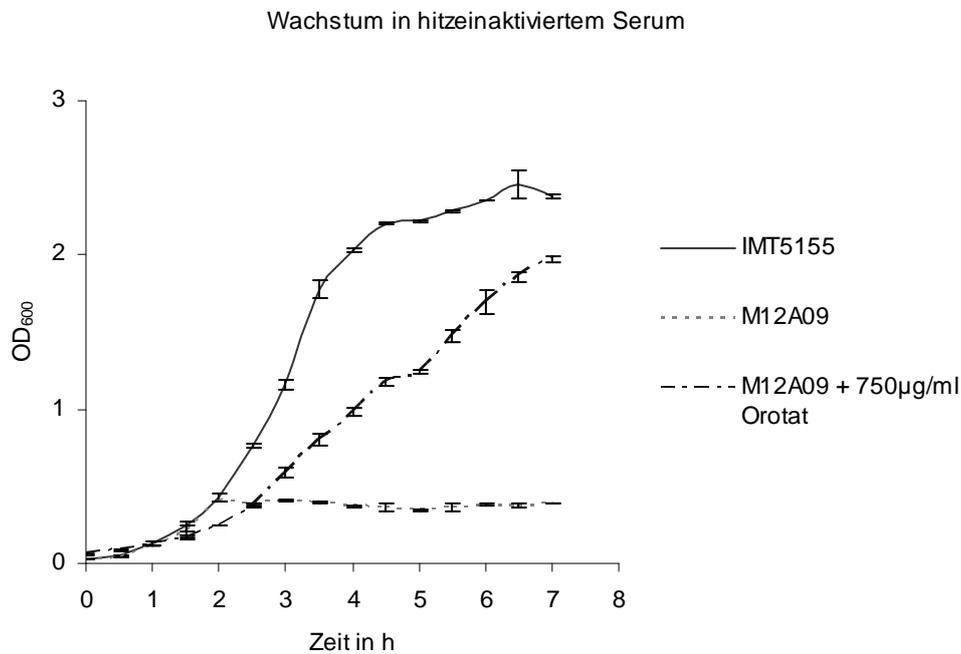


Abb. 22. Wachstumsverhalten in zuvor hitzeinaktiviertem (1 h bei 56°C im Wasserbad inkubiert) Hühnerserum bei 37°C. Eine Supplementierung mit 750 µg/ml Orotat verbessert deutlich das Wachstum der Mutante M12A09.

6.2.4 Komplementierung *in trans*

Das Gen *pyrD* und zwei Bereiche, die möglicherweise einen Promotor enthalten, wurden aus dem intakten Genom des Wildtypstammes IMT5155 amplifiziert und in die Plasmide pCR[®]2.1-TOPO[®] und pACYC184 kloniert. Mit den entstandenen Konstrukten wurden anschließend die Mutante M12A09 *in trans* komplementiert, um den Phänotyp des Wildtypstammes wiederherzustellen. Dieser Effekt wurde *in vitro* anhand von Wachstumsanalysen überprüft.

6.2.4.1 Klonierung des Gens *pyrD* und seines Promotors in verschiedene Vektoren

Anhand der Sequenzdatenbank des UPEC-Stammes CFT073 (Acc. No. AE014075) wurden zwei verschiedene Primerpaare definiert, um *pyrD* und seinen Promotor mit dem Stamm IMT5155 als Matritze zu amplifizieren. Die Produkte der PCR (s. Tab. 3) entsprachen den erwarteten Größen von 1.475 und 1.791 kb für *pyrDKlon1* und 2.

Sie wurden erfolgreich in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO^{®1} (high-copy) kloniert. Das zweitgenannte Produkt wurde ebenfalls erfolgreich in das Plasmid pACYC184² (low-copy) kloniert und mittels Elektroporation in die Mutante M12A09 transformiert.

¹ Invitrogen GmbH, Karlsruhe.

² DSMZ Nr. 4439.

Die Überprüfung der Komplementierung erfolgte mittels Wachstumsanalysen in M9+-Medium im Vergleich zum Wildtyp und zu der Mutante, die zum Zwecke der Vergleichbarkeit das jeweilige leere Plasmid trugen.

6.2.4.2 Wachstumsverhalten in M9+-Medium

Die Wachstumsanalysen in M9+-Medium ergaben, dass die Komplementierung der Mutante M12A09 *in trans* mit dem high-copy Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®](*pyrDKlon1*) keinerlei Verbesserung erbrachte. Da nach der Promotoranalyse die Möglichkeit eines zweiten, weiter upstream liegenden Promotors bestand, wurde das Primerpaar *pyrDKlon2 s/as* entworfen, um diesen Bereich zu amplifizieren. Bei dieser Klonierungsstrategie stiegen anfangs die OD₆₀₀-Werte bei der transkomplementierten Mutante, allerdings stagnierte das Wachstum nach ca. 3 h und die OD₆₀₀-Werte erreichten nur 1/10 der Werte des Wildtyps in der stationären Phase. Aus diesem Grund wurde ein Vektor mit einer geringeren Kopienzahl pro Zelle für die Transkomplementierung ausgewählt.

Die Transkomplementierung von M12A09 mit dem PCR-Produkt der Primer *pyrDKlon2 s/as* auf dem low-copy Plasmid pACYC184 war erfolgreich. Da der Verlust des Plasmids durch Zugabe von Tetracyclin in das Wachstumsmedium vermieden wird, erfolgte der Vergleich mit den Stämmen IMT5155::pACYC184 und M12A09::pACYC184, die ebenfalls tetracyclinresistent sind, um vergleichbare Bedingungen zu erhalten.

Es stellte sich heraus, dass die Wachstumskurven dieser Stämme weitgehend gleich aussahen (Abb. 23), und die Bestimmung der Keimzahl zu den Zeitpunkten 5 und 7 h nach Inokulation des Wachstumsmediums bestätigte eine Vermehrung dieser beiden Stämme in vergleichbarem Maße. Die ebenfalls tetracyclinresistente Mutante M12A09::pACYC184 konnte sich hingegen in M9+-Medium nicht vermehren, wie die abnehmenden Keimzahlen belegen (Abb. 24).

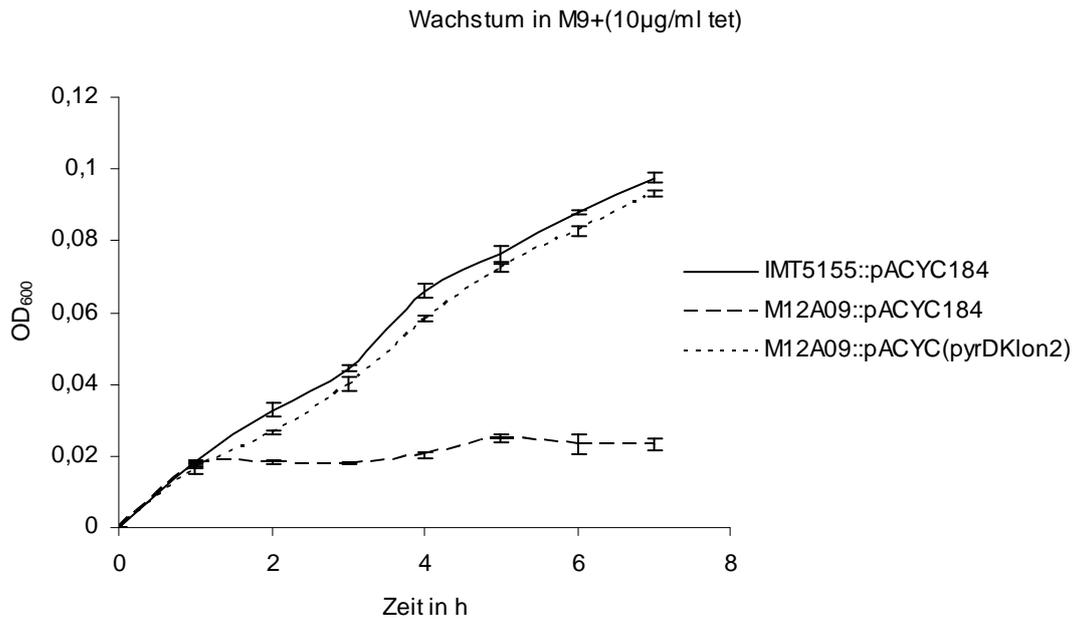


Abb. 23. Wachstumsverhalten der Mutante M12A09::pACYC(*pyrDKlon2*) mit dem Gen *pyrD* komplementiert *in trans* in M9+-Medium bei 37°C. Der Vergleich erfolgt mit den ebenfalls tetracyclinresistenten IMT5155::pACYC184 und M12A09::pACYC184. Messungen der optischen Dichte und Trübung des Mediums nach 7 h zeigen dasselbe Verhalten, wie bei dem Wildtypstamm. Bei der Mutante, die ein natives Plasmid trägt, bleibt das Medium klar. Die Kurven ergeben sich aus einer dreifachen Wiederholung des Versuches.

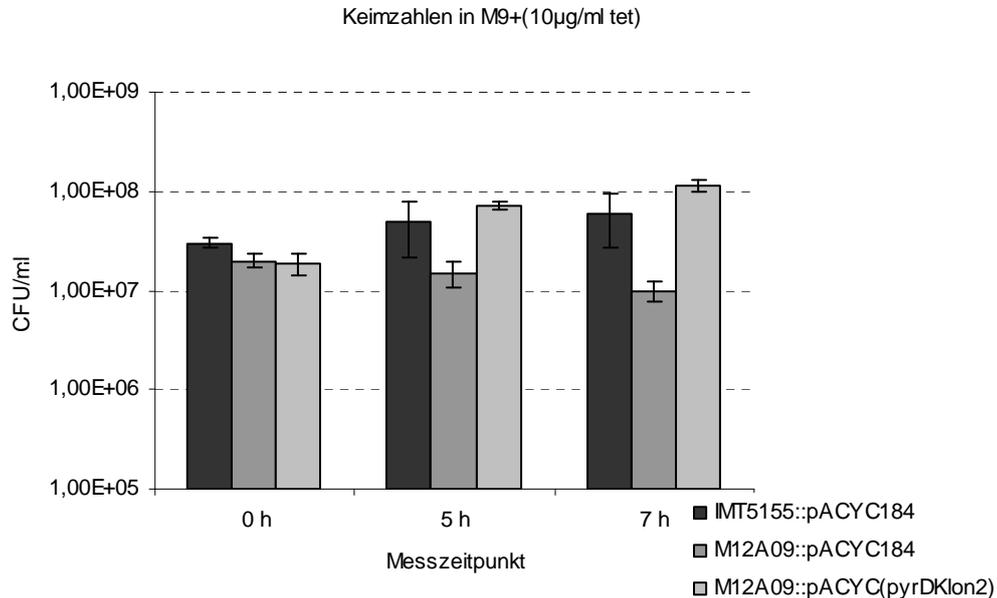


Abb. 24. Graphische Darstellung des Vermehrungsverhaltens der Stämme IMT5155::pACYC184, M12A09::pACYC184 und M12A09::pACYC(*pyrDKlon2*) in M9+-Medium bei 37°C. Deutlich zu erkennen sind Unterschiede in der Wachstumstendenz. Während sich IMT5155::pACYC184 und M12A09::pACYC(*pyrDKlon2*) vermehren, ist die Keimzahl bei M12A09::pACYC184 abnehmend, was auf das Absterben der Bakterien hindeutet. Die Daten wurden nach einer dreifachen Wiederholung des Versuches erhoben.

6.2.5 Charakterisierung der Mutante M12A09 *in vivo*

6.2.5.1 Hühnerembryonen-Letalitätstest [“Chicken Embryo Lethality Assay” (ELA)]

Die mit der Mutante M12A09 infizierten Hühnerembryonen starben alle innerhalb von 2 Tagen, so dass der Stamm nach der Klassifizierung mittels Letalitätsindex als hoch pathogen eingestuft werden konnte. Die Kontrollstämme IMT5155 und IMT5104 wurden als hoch und moderat pathogen entsprechend klassifiziert.

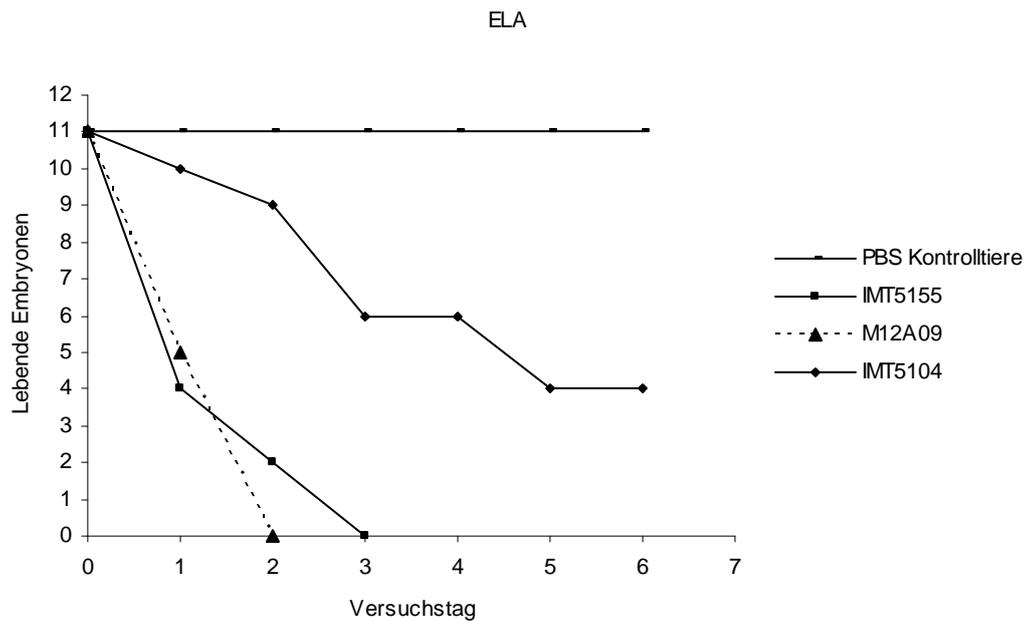


Abb. 25. Graphische Darstellung der Ergebnisse für vier Stämme unterschiedlichen Virulenzgrades im Hühnerembryonen-Letalitätstest. Die unterschiedlichen Tendenzen sind deutlich am Abfall der Geraden vor allem in den ersten 2 Versuchstagen erkennbar.

Die applizierten Infektionsdosen lagen zwischen 190-256 CFU und somit im Bereich der in der Literatur empfohlenen Werte von 100-300 CFU (198).

Mit PBS inokulierte Embryonen zeigten, nach deren Vitalität zu urteilen, keinerlei Beeinträchtigung bis zum Abschluss des Versuches. (Abb. 25).

Die im ELA ermittelten Tendenzen bezüglich der Pathogenität korrelierten nur zum Teil mit den im Hühnerinfektionsmodell definierten Virulenzgraden der getesteten Stämme (Tab. 10).

Stamm	Virulenzgrad im Hühnerinfektionsmodell	Letalitätsindex im ELA (LI*)
IMT5155	Hoch	60
M12A09	Niedrig	60
IMT 5104	Niedrig	23

Tab. 10. Unterschiedliche Pathogenitätsgrade von verschiedenen Stämmen. Ermittelte Ergebnisse mit dem Hühnerinfektionsmodell und dem ELA im Vergleich. *Einstufung der Pathogenität der Stämme nach Punkten (LI): LI \geq 45 (max. 66) hoch pathogen; LI zw. 14-44 moderat pathogen; LI \leq (min 0) apathogen.

6.2.5.2 Charakterisierung der Virulenz von M12A09 im Hühnerinfektionsmodell

Den Tieren wurde, nach Ermittlung der Keimzahlen der Inokula, $2,7 \times 10^8$ und $3,4 \times 10^8$ CFU/ml der Mutante und des Wildtyps entsprechend intratracheal appliziert. 24 h später wurden die ersten Hühner getötet, wobei der Unterschied im Allgemeinbefinden zwischen den Infektionsgruppen deutlich war. Während in der Gruppe A (Inokulum mit IMT5155) die meisten Tiere mit gestäubtem Gefieder und apathisch in einer Ecke des Käfigs kauerten, waren die Hühner, die mit M12A09 infiziert wurden, munter, fraßen und zeigten keine Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens. Während der nächsten 24 h mussten 2 Tiere der Gruppe A euthanasiert werden, da sie in Seitenlage bei schlechter Atmung vorgefunden wurden. In der Gruppe B (Inokulum mit M12A09) konnten weiterhin keine Auffälligkeiten protokolliert werden.

Während der Sektion fiel auf, dass alle Tiere aus der Infektionsgruppe A die typischen makroskopischen Läsionen der durch APEC hervorgerufenen systemischen Infektion in unterschiedlich starkem Ausmaß ausgebildet hatten: Aerosacculitis, Pericarditis, Perihepatitis und Splenomegalie konnten durch Lungen- und Milzkongestion, Hypertrophie der Organe, Exsudatansammlung und fibrinöse Beläge diagnostiziert werden. In der Infektionsgruppe mit dem Stamm M12A09 konnte bei allen Tieren eine Luftsackentzündung festgehalten werden. Bei den restlichen Organen war 24h p. inf. keine makroskopische Veränderung sichtbar. 48 h p. inf. konnten lediglich eine milde Perihepatitis und eine leichte Vergrößerung der Milz beobachtet werden. Bei einem Tier war eine Entzündung des Herzbeutels mit Exsudatansammlung vorhanden.

Die unterschiedlichen post mortem ermittelten Keimzahlen während des Infektionsversuches sind in den Abbildungen 26 und 27 aufgeführt.

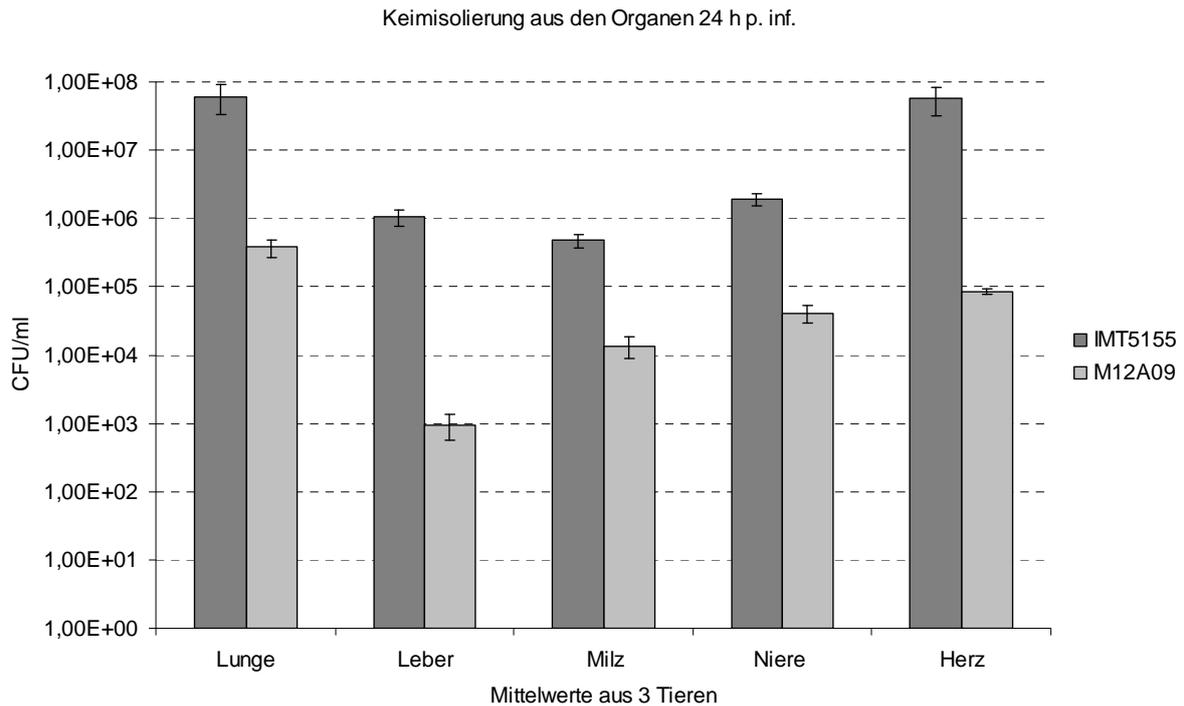


Abb. 26. Infektionsversuch mit fünf Wochen alten SPF-Hühnern der Rasse White Leghorn. Dargestellt werden die ermittelten Keimzahlen in den inneren Organen 24 h nach Inokulation von Wildtyp und Mutante im Vergleich. Die Mittelwerte von jeweils drei euthanasierten Tieren wurden herangezogen. Zu jedem Organ wurde die Standardabweichung ermittelt.

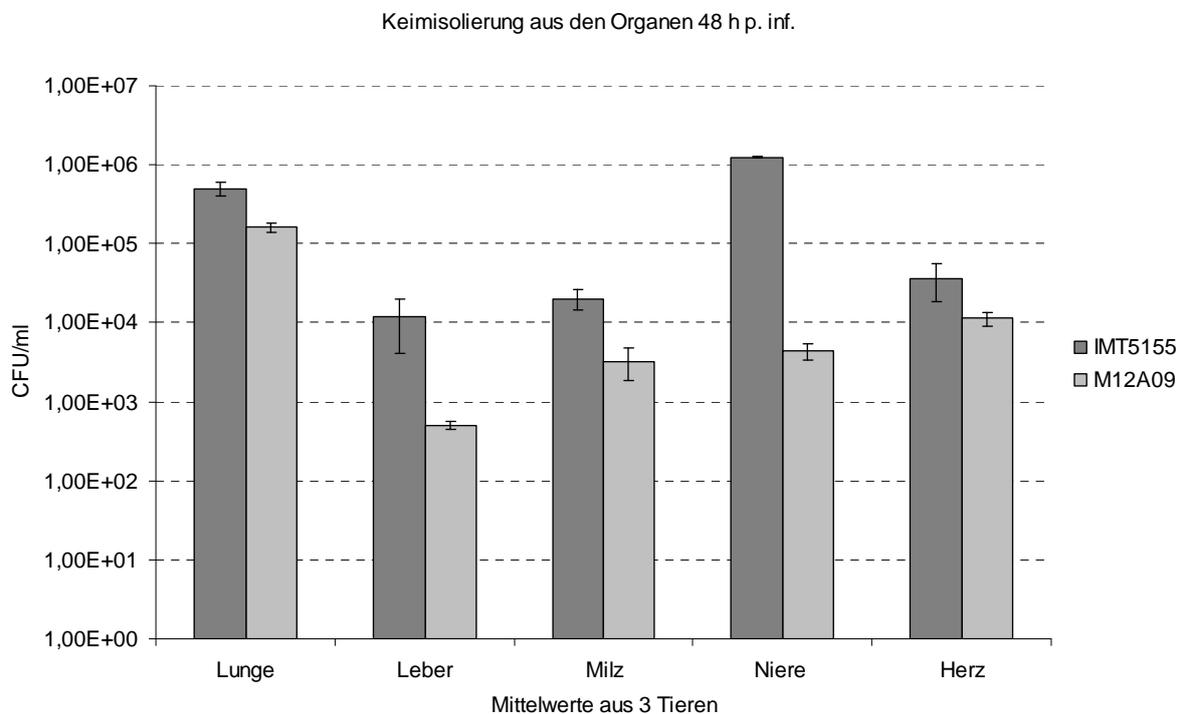


Abb. 27. Keimzahlen in den Organen 48 h nach Inokulation des Wildtyps und der Mutante in jeweils drei SPF-Hühnern der Rasse White Leghorn im Alter von 5 Wochen. Es wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen für jedes Organ ermittelt.

Die Ermittlung der Keimzahlen der Mutante erreichten in den verschiedenen Organen 24 h p. inf. nur Werte unter 2% des Wildtypgehalts. 48 h p. inf. war der Bakteriengehalt in den Organen im Vergleich zum Wildtyp immer noch niedrig, hatte jedoch deutlich zugenommen (Tab. 11).

Organ	Gehalt an M12A09 im Vergleich zum Wildtyp IMT5155 (Angaben in Prozent)
Lunge	71,76
Leber	3,23
Milz	7,30
Niere	9,04
Herz	40,00

Tab. 11. Prozentualer Bakteriengehalt in den Organen 48 h p. inf., berechnet in Relation zu den vom Wildtyp im selben Organ erreichten Keimgehalte (100%). Die mit der Mutante infizierten Tiere haben nach Internalisierung der Bakterien wesentlich geringere Keimzahlen im Verhältnis zu den Keimzahlen aus der Infektionsgruppe mit dem Wildtyp-Stamm.

7 Diskussion

Escherichia coli gehört zu der normalen Darmflora von Geflügel und führt in der Regel nicht zu Krankheit. Dennoch hat sich eine Gruppe dieses Erregers zu potenziell virulenten Mikroorganismen entwickelt, die unter dem Begriff aviär pathogene *E. coli* (APEC) zusammengefasst werden. Zahlreiche Faktoren, wie Adhäsine, Toxine, Eisen-akquirierende Systeme, Colicin-V Plasmid, Serum-Resistenz-Proteine, Kapsel und Lipopolysaccharid-komplex, die zur Virulenz von APEC beitragen, sind identifiziert und untersucht worden, allerdings ist bis heute keine eindeutige Definition dieses Pathotyps gelungen (153). Manche Schritte in der Pathogenese der APEC-Infektion konnten bisher nicht aufgeklärt werden, unter anderem wegen der Anwendung von Infektionsmodellen, die den natürlichen Infektionsweg nicht widerspiegeln, wie das Eintagskükenmodell oder durch direkte Inokulation der Luftsäcke und subkutane Erregerapplikation (32, 33, 40).

In den vergangenen Jahren sind Molekulartechniken, wie IVET, DFI, IVIAT, STM, SCOTS oder GAMBIT entwickelt worden, die eine differenziertere Analyse der Erreger-Wirt-Interaktion erlauben, indem das Tiermodell als Selektivmedium benutzt wird. In fast allen Studien, die mit diesen Methoden durchgeführt wurden, konnte nachgewiesen werden, dass viele „Housekeeping“-Gene bei der Ausprägung der Virulenz eine entscheidende Rolle spielen. Attenuierte Mutanten von unterschiedlichen Erregern mit Defekten im Purin- und Pyrimidinhaushalt sind in solchen Untersuchungen bereits isoliert worden (69, 90).

SCOTS und STM wurden von Dozois *et al.* (2003) und Li (2005) entsprechend an APEC-Stämmen appliziert und in beiden Studien konnten virulenzassoziierte Gene isoliert werden, die im bakteriellen Stoffwechsel involviert sind (36, 100). In der STM Studie von Li (2005), für die ein systemisches Infektionsmodell mit 5 Wochen alten Hühnern mit intratrachealer Erregerapplikation entwickelt wurde, konnten zahlreiche attenuierte Mutanten mit defekten Genen, die in unterschiedlichen Bereichen eine Rolle spielen, isoliert werden (100, 102). Zu diesen Bereichen zählt die Produktion des LPS und extrazellulärer Polysaccharide, der Eisentransport, die Synthese einiger membranassoziierter und periplasmatischer Proteine, sowie die metabolischer Enzyme mit einer Rolle im Vitaminstoffwechsel und uncharakterisierte genetische Bereiche (102). Eine der Mutanten, M12A09, die nach dem ersten Screening als potenziell attenuiert galt, ist Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit. Deren Ziel war es, die Insertionsstelle des Transposons nachzuweisen und mit unterschiedlichen Mitteln die Mutante sowohl *in* als auch *ex vivo* näher zu charakterisieren. Für die Untersuchung des mutierten Genbereichs dieser und anderer Mutanten wurde eine Cosmid-Genbibliothek erstellt. Multiplex-PCR und DNS-DNS-Hybridisierungen bestätigten die Unversehrtheit von wichtigen Virulenzfaktoren und ergaben eine einmalige Insertion des Tn in das Genom, sodass die Attenuierung nicht auf die Mutation eines bereits bekannten Virulenzfaktors (*astA*, *irp2*, *iucD*, *iss*, *cvi/cva* und *tsh*) oder

auf die gleichzeitige Ausschaltung mehrerer Gene zurückzuführen ist. An dieser Stelle wird darauf hingewiesen, dass die in dieser Arbeit angewendete Multiplex-PCR mit Primern durchgeführt wurde, die wegen ihrer Unspezifität überarbeitet werden mussten. Zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit wurde angenommen, dass die Primer für *tsh* die chromosomale und episomale Kopie dieses Gens amplifizieren. Viel wahrscheinlicher ist es aber, dass ein Signal von der chromosomalen Variante von *tsh*, während das zweite vom Gen *vat* stammt, dessen Produkt 75% Protein-Homologie mit Tsh besitzt (136). Aktualisierte Angaben zur Durchführung einer Multiplex-PCR zur Identifizierung von 8 virulenzassoziierten Genen (*papC*, *iucD*, *irp2*, *tsh*, *vat*, *iss*, *astA* und *cva/cvi*) bei APEC liefert die Publikation von Ewers *et al.* (2005) (39).

Die Ermittlung der Insertionsstelle des Tn ergab einen Defekt im Gen *pyrD*, welches das für den vierten Schritt der *de novo* Biosynthese der Pyrimidine zuständige Enzym Dihydroorotat Dehydrogenase kodiert. Untersuchungen mit reverser Transkriptase-PCR bestätigten eine Unterbrechung der Transkription des Gens *pyrD* bei der Mutante M12A09. *In vitro*-Wachstumsanalysen zeigten, dass M12A09 mit dem Wildtypstamm IMT5155 in LB-Medium um die darin enthaltenen Nährstoffe konkurrieren kann und somit in einem nährstoffreichen Medium die gleiche Fitness, wie der Wildtypstamm aufweist. In hitzeinaktiviertem Hühnerserum jedoch tritt bei der Mutante ein deutliches Vermehrungsdefizit bereits nach zwei Stunden ein, das durch niedrigere OD₆₀₀-Werte und Keimzahlen als beim Wildtyp deutlich wird. In Minimalmedium 9 mit Glucose als einzige Kohlenstoffquelle (M9+) kann M12A09 nur nach Supplementierung des Mediums mit Orotat oder nach Transkomplementierung mit *pyrD* auf einem low-copy Plasmid wachsen. Abschließend konnte mit dieser Studie nachgewiesen werden, dass diese Mutante im Hühnerembryonenmodell keinen Virulenzverlust, jedoch im systemischen Infektionsmodell mit 5 Wochen alten Hühnern eine starke Attenuierung aufweist. Nach Infektion der Hühner konnte M12A09 aus allen untersuchten inneren Organen reisoliert werden, obwohl kein einziges Tier während des Versuches erkrankte, Eigenschaften, die von potenziellen Kandidaten für die Entwicklung von antimikrobiellen Protektiva erfüllt werden.

7.1 Die Mutante M12A09 besitzt eine durch die Insertion des Tn hervorgerufene Unterbrechung im Gen *pyrD*

7.1.1 Klonierung und arbitrary PCR

Eine geeignete Restriktionsendonuklease zu ermitteln, mit der ein Fragment in der Größenordnung zwischen 3 und 5 kb generiert wird und dieses in einen einfachen Vektor, wie den pUC18 zu klonieren, ist die Standardmethode, um Sequenzdatenanalysen durchzuführen. Diese Methodik fand besonders Anwendung in der Zeit vor der Sequenzierung ganzer bakterieller Genome, da größere DNS-Sequenzen nötig waren, um

ihre Lokalisation im Chromosom zu ermitteln. Heute, in der postgenomischen Zeit, reichen schon kurze Nukleotidsequenzen aus, um sie im entsprechenden Genom zu lokalisieren.

In dieser Arbeit wurde das Enzym *SaI* verwendet, und nach Selektion von Ampicillin- (Vektormerkmal) und Kanamycin- (Tn-Merkmal) resistenten Kolonien sollten mit inverser PCR die flankierenden Bereiche der Tn-Insertionsstelle ermittelt werden. Parallel dazu wurde die Methode der arbitrary PCR angewandt, die in zwei PCR-Reaktionen ein Produkt liefert, welches direkt sequenzanalysiert werden kann. Diese Technik ist sehr schnell und einfach durchzuführen und mit ihrer Hilfe gelang es ein 358 bp großes Fragment zu amplifizieren, bevor Ampicillin- und Kanamycinresistente Kolonien mittels Klonierung isoliert werden konnten. Allerdings lässt sich nicht in jedem Fall ein Amplikon mittels arbitrary PCR generieren, weshalb beide Strategien gleichzeitig verfolgt wurden.

7.1.2 Sequenzdatenabgleich

Das eingesandte arbitrary PCR-Produkt von 358 bp wurde Sequenzanalysiert, mit dem Ergebnis, dass bis zu 93% Ähnlichkeit mit dem Gen *pyrD* von vielen Mikroorganismen besteht. Das von *pyrD* kodierte, membranassoziierte Enzym Dihydroorotat Dehydrogenase konnte erstmals von Lieberman und Kornberg (1953) aus dem obligat anaeroben *Zymobacterium oroticum* durch Anreicherung in Orotat-haltigen Medien isoliert werden (103). Für *E. coli* (135) und *Salmonella* Typhimurium (201) sind *pyrD*-Mutanten beschrieben. Diese haben einen essentiellen Bedarf an Pyrimidinen, der von Orotsäure oder Uracil kompensiert werden kann.

Zum Zeitpunkt der Untersuchungen gab es keinen vollständig sequenzierten APEC-Stamm, weshalb bei der Sequenzdatenanalyse die größte Ähnlichkeit mit dem UPEC-Stamm CFT073 (Acc. No. AE014075) bestand, welcher fortan als Matrize für Primerdesign und genomische Analysen verwendet wurde. Ein Vergleich der Genloci zwischen den Stämmen *E. coli* K12, UPEC CFT073 und APEC_O1 zeigt, dass *pyrD* in einer konservierten Genregion liegt und immer von derselben Familie von Genen, *ycb*, gefolgt wird (s. Abb. 11, S. 62), die für putative Proteine kodiert. In den drei Fällen ist *pyrD* ca. 1000 bp groß und nach den Ergebnissen der PCR unter Punkt 6.1.2.4 liegt das Tn bei M12A09 ca. 400 bp nach dem Startcodon (s. Abb. 13). Der Promotor des Gens ist nicht betroffen, wodurch ein Einfluss auf weitere genomische Strukturen, die mit dem Promotor von *pyrD* gekoppelt wären, von dieser Mutation sehr unwahrscheinlich ausgehen könnte.

Mutationen durch Transposoninsertionen können unerwünschte Nebenwirkungen haben, wenn sie so genannte polare Effekte hervorrufen. Diese sind zu erwarten, wenn eine Mutation in einem Gen die Transkription eines weiteren oder mehrerer Gene desselben Operons bei bestehender polycistronischer Transkriptionsweise oder bei sog. translationalen

Koppelungen beeinflusst. Es ist bekannt, dass eine Transposoninsertion in der Nähe des Anfangs eines Operons die Expression von stromabwärts gelegenen Genen abschwächen kann (13). Derartige polare Effekte können dazu führen, dass der Phänotyp einer Mutante fälschlicherweise einem Gen stromaufwärts des stattfindenden Effektes zugeordnet wird. Dieses Phänomen kommt beispielsweise beim 5,7 kb großen Tn5 vor, welches über starke Terminationssequenzen in der Kanamycinkassette verfügt und somit die Transkription von gemeinsam organisierten Genen beeinflussen kann. Eine Studie von Berg *et al.* (1980) untersuchte den Effekt von Tn5 Insertionen im *lacZ*-Gen von *E. coli* auf die zwei weiteren Gene des Lac-Operons, *lacY* und *lacA* (13). In zwei Dritteln der Mutationen konnte keine Genaktivität bei den stromabwärts gelegenen Genen festgestellt werden.

Die viel kleineren Minitransposons (z. B. miniTn5) sind rekombinante Transposons, die nur die für die Transposition nötigen Elemente außerhalb des mobilen DNS-Elements beinhalten. Der Vorteil ist, dass, wenn Minitransposons erst einmal in das Genom integriert worden sind, in einer stabilen Weise vererbt werden und im Gegensatz zu natürlichen Transposons keine DNS-Neukombinationen verursachen, da sie kein Gen für die Transposase besitzen und ihnen der größte Teil an Insertionselementen fehlt (27). Sie verfügen jedoch auch über Antibiotikakassetten mit Terminationssequenzen und können somit auch polare Effekte induzieren.

Ein Operon, wie im Modell von Jacob und Monod (1961) beschrieben, setzt sich aus Funktionseinheiten auf der DNS von Prokaryonten zusammen, die aus Promotor, Operator und Strukturgen(-en) bestehen (72). Über den Operator können unterschiedliche Moleküle die Transkription der Strukturgene an- oder ausschalten und somit die Proteinsynthese beeinflussen. Außerdem bestehen in vielen Operons translationale Koppelungen wegen Überlappungen von Start- und Stop-Kodonsequenzen. Im Fall der *de novo* Biosynthese der Pyrimidine kommt nur in einigen Ausnahmen, wie bei *Bacillus subtilis*, ein echtes *pyr*-Operon vor. Ansonsten liegen bei den meisten Prokaryonten (inkl. *E. coli*) diese Gene ubiquitär im Chromosom verteilt und werden über einzelne Mechanismen reguliert. *PyrD* und *pyrC* liegen relativ nah beieinander (ca. 100 kb dazwischen) auf dem Chromosom und haben keinerlei Verbindung zueinander oder zu den anderen Pyrimidin-Genloci (201). Es ist bekannt, dass das *pyrF*-Gen von *Salmonella Typhimurium* mit dem stromabwärts gelegenen *orfF* translational gekoppelt ist (184). In diesem Fall liegt allerdings eine Überlappung von Terminations- und Startsequenzen vor. Im Genom des sequenzanalysierten APEC_O1-Stammes (Acc. No. CP000468) liegt *pyrD* (Acc. No. NC_008563.1) stromaufwärts, strukturell unabhängig vom *ycbW*-Gen, welches hypothetisch ein Protein unbekannter Funktion kodiert. Obwohl die Möglichkeit eines polaren Effektes durch die Transposoninsertion auf dieses Gen theoretisch nur durch die Konstruktion einer isogenen Deletionsmutante ausgeschlossen werden kann, ist nicht anzunehmen, dass ein solcher zu dem festgestellten Phänotyp führt.

Die durchgeführten Transkomplementierungsstudien bestätigen, dass allein durch die Präsenz des *pyrD*-Gens *in trans* ein Wachstumsverhalten bei der Mutante erzeugt werden kann, welches dem des Wildtyps gleicht. Die Supplementierung des Minimalmediums mit Orotat spricht ebenfalls für die alleinige Beteiligung von *pyrD* am Phänotyp von M12A09.

7.1.3 Reverse Transkriptase-PCR

Auf Grund der sehr stabilen RNasen erfordert der Umgang mit RNS wesentlich mehr Sorgfalt als der Umgang mit der sehr viel stabileren DNS. Während dieser Arbeit wurde sowohl mit der RNS aus Kulturen als auch mit der aus den Organen der Hühner isolierten besonders vorsichtig verfahren. Einerseits weil diese Substanz bekannterweise von den ubiquitär vorhandenen RNasen leicht degradiert werden kann, und andererseits um eine Kontamination mit Fremdmaterial zu vermeiden, die ggf. zu falsch positiven Ergebnissen über die Transkription des hoch konservierten *pyrD* Gens führen könnte. Aus diesem Grund wurden die aus derzeitigem Standard empfohlenen Sicherheitsvorkehrungen für den Umgang mit RNS getroffen (siehe Punkt 5.3.2).

Die Isolierung von RNS ermöglicht eine Momentaufnahme der Zelltätigkeit zu einem definierten Zeitpunkt, da nur die Gene, die auch aktuell in der Zelle transkribiert werden in diesem Moment als RNS vorliegen. Dies wird in der Molekularbiologie zur Analyse der Genexpression genutzt. Mit der reversen Transkriptase-PCR lässt sich die Expression eines bestimmten Gens in einer Zelle zum Zeitpunkt der RNS-Isolierung nachweisen. Da die DNS-Polymerase keine RNS amplifizieren kann, wird zunächst mit der reversen Transkriptase (RNS-abhängige DNS-Polymerase) die RNS in cDNS umgeschrieben. Diese kann anschließend mit einer PCR analysiert werden, um spezifische Sequenzen zu amplifizieren. Auf diese Weise kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob die Expression eines Zielgens in dem untersuchten Mikroorganismus vorliegt. Andere Methoden in der RNS-Analytik sind der Northern-Blot, die Real-Time PCR, cDNS-Bibliotheken oder Microarrays (für eine genaue Beschreibung der Methoden wird auf Fachliteratur verwiesen).

Die Isolierung von RNS aus Bakterienkulturen ist unter der Benutzung von Kits relativ einfach und schnell. Das in dieser Arbeit verwendete „SV Total RNA Isolation“¹ System empfiehlt die Verwendung einer Bakterienkultur in der frühlogarithmischen Wachstumsphase mit einer OD₆₀₀ zwischen 0,6 und 1. Diese Empfehlung wurde in dieser Arbeit befolgt, da in diesem Stadium die Vermehrung der Bakterien und demzufolge die Expression der an der Nukleinsäuresynthese beteiligten Gene verstärkt stattfinden.

¹ Promega GmbH, Mannheim,

Die Methode kombiniert die Eigenschaften von Guanidinisothiocyanat (GITC) und β -Mercaptoethanol, um die Zellen aufzubrechen und sie vor Ribonukleasen in den Zellextrakten zu schützen (23). Zusätzlich wird die bakterielle Zellwand mit Lysozym aufgelöst. Die Prozedur bewirkt die Bindung der RNS an Glasfasern von Säulen durch Zentrifugation und einfache Waschschriffe. Die gereinigte RNS wird anschließend mit RNase-freier DNase I vor dem letzten Elutionsschritt behandelt und kann so ohne organische Extraktionen und Präzipitationen isoliert werden.

Die Isolierung von RNS aus Geweben gestaltet sich im Gegensatz dazu wesentlich komplizierter. Die RNS-Stabilisierung ist eine wesentliche Voraussetzung für zuverlässige Genexpressionsanalysen. Unmittelbar nach Probenentnahme kann es durch spezifische und unspezifische RNS-Abbauprozesse und auch durch die Induktion der Transkription zu Veränderungen im Genexpressionsmuster kommen. Solche Veränderungen des Genexpressionsmusters müssen aber unbedingt vermieden werden, um zuverlässige Genexpressions-Analysedaten zu erhalten. Der Aufbruch von Zellen ist ein kritischer Schritt, denn hier entscheidet sich die Menge und Qualität der erhaltenen RNS. Deshalb sollte dieser Schritt schnell und gründlich stattfinden. Es gibt mehrere Möglichkeiten, ein Gewebehomogenat herzustellen, wie die Benutzung von Rotor-Stator-Homogenisatoren, Mörser und Stößel, Ultraschall, French Press oder Mühlen; wichtig ist nur, dass das Produkt keine Klumpen enthält, weshalb in dieser Arbeit ein Rotor-Stator-Homogenisator verwendet wurde. Weiterhin ist zu beachten, dass alle Gewebearten RNasen in unterschiedlich starkem Ausmaß enthalten. Dies ist bei der Verarbeitung von Proben beispielsweise aus der Milz und Bauchspeicheldrüse zu berücksichtigen, da diese Zellen besonders reich an endogenen RNasen sind (146). Gewebeprobeen sollten möglichst innerhalb von 30 min nach der Sektion verarbeitet werden. Die GITC-Lösung soll während der Homogenisation dazugegeben werden und Proben dürfen nie längere Zeit bei Raumtemperatur in dieser Lysislösung unzerkleinert verbleiben, denn das führt zur Degradierung von RNS durch endogene RNasen, die innerhalb der noch intakten Zelle von dem GTC nicht erreicht werden können. Wenn Gewebeprobeen nicht sofort nach der Sektion bearbeitet werden können, sollten sie sofort bei -70°C eingefroren werden, da dies die Aktivität der RNasen hemmt. Für die weitere Verarbeitung müssen diese Proben in gefrorenem Zustand beispielsweise mit einem Mörser pulverisiert und anschließend mit der GITC-Lösung zu einem Homogenat vermischt werden. In der vorliegenden Arbeit sollte RNS aus den inneren Organen infizierter Tiere isoliert werden, mit dem Ziel, das Expressionsprofil der Mutante M12A09 bezüglich *pyrD* während des Infektionsprozesses zu untersuchen. Die PCR-Bedingungen für die Analyse der cDNS aus Laborkulturen waren bereits etabliert und sollten auf bakterielle cDNS aus den Organen der Hühner angewandt werden.

Zu diesem Zweck wurde darauf geachtet, dass die Organe unmittelbar nach der Sektion gekühlt wurden und binnen 30 min durch Kühlung stabilisiert und bei gleichzeitiger Zugabe des Lysispuffers (RLT-Puffer¹ enthält GITC) mit einem Rotor-Stator-Homogenisator (Ultra Turrax[®] T25) homogenisiert werden. Bis zu ihrer weiteren Verarbeitung wurden sie bei -70°C eingefroren. Für die Isolierung der RNS wurde der „RNeasy Midi Kit“¹ verwendet, der die selektiven Bindungseigenschaften einer Silicagel-Membran mit der einfach durchzuführenden Zentrifugationstechnik kombiniert. Da dieser Kit kein Protokoll enthält, das bei der Isolierung bakterieller RNS aus Organgewebe die Lyse der Bakterien-Zellwand berücksichtigt, wurde das Homogenisat vor der Applikation des Überstandes auf die Silicagel-Membran mit Lysozym behandelt. Dieser Schritt ist entscheidend, denn hierbei wurde die eigentliche Ziel-RNS freigesetzt.

RNasen werden von allen Organismen produziert und ausgeschieden. Sie sind beispielsweise auch in menschlichem Schweiß enthalten und benötigen keine Co-Faktoren, wie Mg²⁺. Zusätzlich sind die meisten RNasen aus nur einer Polypeptidkette aufgebaut, weshalb sie bei Hitzeeinwirkung zwar denaturieren, beim Abkühlen jedoch wieder renaturieren und somit wieder katalytisch aktiv werden (162). Sie sind demnach extrem schwierig zu inaktivieren. Deshalb sollte möglichst verhindert werden, RNasen aus der Umgebung in die Probe einzubringen. Um dies zu erreichen, wurden stets Einweghandschuhe getragen, sofern möglich RNase-freie Einwegmaterialien oder Glasware verwendet und unter der Abzugshaube gearbeitet.

Die Gewinnung der RNS aus Bakterienkulturen musste während dieser Arbeit, wegen der oben aufgeführten Schwierigkeiten beim Umgang mit RNS, mehrmals wiederholt werden, bis Menge und Beschaffenheit von geeigneter Qualität für die Überprüfung der Genexpression von *pyrD* waren. Die Transkription von *pyrD* in LB und Hühnerserum konnte ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse der reverse Transkriptase-PCR zeigen, dass dieses Gen in M12A09 im Gegensatz zu IMT5155 nicht in cDNS umgeschrieben wird. Als Gegenprobe wird wiederum bei der Mutante ein Kanamycinresistenzgen transkribiert, während dies beim Wildtyp nicht der Fall ist. Die zwei weiteren Gene *carP* und *yjgP*, die nichts mit der Mutation zu tun haben, werden nach diesen Untersuchungen ohne weiteres in beiden Stämmen transkribiert und untermauern somit die PCR-Ergebnisse.

Die aus den inneren Organen der Tiere isolierte bakterielle RNS konnte in dieser Arbeit nicht analysiert werden. Die PCRs lieferten keine spezifischen Signale, obwohl die photometrischen Messungen RNS guter Qualität (Extinktion zw. 1.80-1.98_{260/280}) in Konzentrationen zwischen 200 ng/µl bis 1 µg/µl und die Überprüfung der 16s rRNS-Kontroll-PCR positive Ergebnisse ergaben.

¹ QIAGEN GmbH, Hilden

Trotz Behandlung mit Lysozym, zum Aufbrechen der bakteriellen Zellwand, lag das Verhältnis von eukaryontischer zu prokaryontischer RNS vermutlich zugunsten ersterer, so dass nicht ausreichend bakterielle RNS als Matrize für die PCR vorlag.

7.2 Charakterisierung der Mutante M12A09 *in vitro*

7.2.1 M12A09 ist auxotroph und die Supplementierung des Minimalmediums mit Orotat führt zu einer Normalisierung des Wachstums

Die durchgeführten Wachstumsanalysen in unterschiedlichen Medien zeigen, dass *pyrD* essentiell für ein ungestörtes Wachstumsverhalten von APEC in Hühnerserum und in Minimalmedium 9+ ist. Im nährstoffreichen LB-Medium verhält sich die Mutante wie der Wildtypstamm und ist sogar in der Lage mit diesem um die darin enthaltenen Stoffe zu konkurrieren, wie die Ergebnisse des Competitionstests zeigen. Das Wachstumsverhalten von M12A09 kann in M9+-Medium unter Orotatzugabe dem des Wildtyps angepasst werden und in Hühnerserum wird es dadurch deutlich verbessert.

Salmonella- und *Escherichia coli*-Wildtypen sind nicht leicht permeabel für Zwischenprodukte der Pyrimidinsynthese, mit Ausnahme von Orotat, welches von der Dihydroorotat Dehydrogenase, kodiert von *pyrD*, synthetisiert wird (10). Orotat deckt den Bedarf an Pyrimidinen bei *carAB*, *pyrBI*, *pyrC* und *pyrD* Mutanten und ist als Supplement eines Minimalmediums besonders effizient, wenn Glycerol als Kohlenstoffquelle verwendet wird (127, 201). Dient hingegen Glucose im Minimalmedium als Kohlenstoffquelle, muss Orotat in höheren Konzentrationen dazugegeben werden (10), weshalb in dieser Studie das Wachstum von M12A09 in M9+ erst bei einer Konzentration von 750 µg/ml dem des Wildtyps angepasst werden konnte. Diese signifikant höhere Konzentration an Orotat, die benötigt wird, um das Wachstum von Pyrimidin-auxotrophen zu fördern, lässt sich durch einen katabolisch-repressiven Effekt auf *dctA* erklären. Dieses Gen kodiert den C4-Dicarboxylate Transporter, verantwortlich für die Aufnahme von Orotat in die Bakterienzelle, und besitzt direkt stromaufwärts seines Promotors eine putative cAMP-Rezeptor-Proteinkomplex-Bindungsstelle. Während des Wachstums unter Glyceroleinfluss wird cAMP in höherem Maße produziert, was zu einer verminderten Expression von *dctA* führt, wodurch der eigenregulatorische negative Feedback unter diesen Bedingungen geringer ausfällt (86).

Orotsäure wurde erstmals 1904 in Kuhmilch gefunden. Da man früher davon ausging, dass Orotsäure lebensnotwendig sei, wurde sie auch als Vitamin B₁₃ bezeichnet. Heute weiß man, dass sie kein Vitamin ist. Außer ihrer Rolle in der Synthese von UMP dient sie auch als Magnesium-fixierende Substanz, da sie in der Lage ist, den intrazellulären ATP-Spiegel und damit die Menge an gebundenem Magnesium zu erhöhen, da ungebundenes Mg²⁺ schnell wieder renal ausgeschieden wird (8).

7.2.2 Die Transkomplementierung auf einem low-copy Plasmid gleicht das Wachstum der Mutante dem des Wildtypstammes weitgehend an

In der Regel werden high-copy Plasmide für die Expression von rekombinanten Genen in *E. coli* benutzt. Die hohe Kopienzahl wird wegen der maximalen Genexpression bevorzugt. Allerdings stellt dies manchmal eine Überforderung des bakteriellen Stoffwechsels dar, die sich nachteilig auf bestimmte molekulartechnische Anwendungen auswirkt.

In der vorliegenden Studie erbrachte die Komplementierung der Mutante *in trans* auf dem high-copy Vektor (pCR2.1-TOPO^{®1}, 50 bis 100 Kopien pro Zelle) eine Verbesserung des Wachstums, das jedoch nach einiger Zeit stagnierte. Die Transkomplementierung von M12A09 mit *pyrD* auf einem Vektor mit einer maximalen Kopienzahl von 15 pro Zelle (pACYC184²) erreichte, dass Wachstumskurven in M9+-Medium und Keimzahlen von Mutante und Wildtyp weitgehend gleich ausfallen. Jones *et al.* (2000) führten eine Studie durch, bei der sie die Effizienz von Transkomplementierungen zweier Metabolite (Polyphosphat und Lykopen) in *E. coli* mit high- und low-copy Plasmiden miteinander verglichen (82). Sie stellten fest, dass die Transkomplementierung von *polyP* mit beiden Plasmidtypen die Anreicherung von *polyP* um 80% auf zellulärer Ebene verbessert. Die Dichte der high-copy-Kultur jedoch war 24% geringer, was bedeutet, dass diese Zellen nicht so viele Nachkommen produzieren, wie die, die ein low-copy Plasmid tragen.

Außerdem beobachteten sie, dass, wenn das Gen der DXP-Synthase (erster Schritt bei der Synthese von Lykopen) vom *tac*-Promotor beider Plasmidvarianten exprimiert wird, sich die Menge an Lycopen verdoppelt bis verdreifacht im Vergleich zu Zellen, die nur die chromosomale Kopie besitzen. Zellwachstum und die Lykopenproduktion nahmen allerdings ab, wenn IPTG (Induktor des *tac*-Promotors) zu der high-copy-Kultur hinzugefügt wurde, während in der low-copy-Kultur keine Veränderungen nach Zugabe von IPTG zu beobachten waren. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Produktion von hohen Kopienzahlen eines Plasmids den Stoffwechsel des Bakteriums stark belasten und zu schlechteren Ergebnissen führen kann als die Expression eines Gens, die von einer geringen Menge an Plasmiden stammt.

¹ Invitrogen GmbH, Karlsruhe.

² DSMZ Nr. 4439.

7.3 Charakterisierung der Mutante M12A09 *in vivo*

7.3.1 Die Mutante M12A09 ist nach der Klassifizierung im Hühnerembryonen-Letalitätstest [„Embryo Lethality Assay“ (ELA)] hoch pathogen

Der Hühnerembryonen-Letalitätstest wurde als diagnostisches Mittel etabliert, um virulente aviäre *E. coli*-Stämme von apathogenen zu unterscheiden, da eine sichere

Virulentypisierung sonst nur im Infektionsversuch mit Hühnern zwar möglich, allerdings mit erheblich größerem Aufwand verbunden ist. 1999 unternahmen Wooley *et al.* eine Studie mit Gruppen von 100 Embryonen pro getesteten Stamm, um herauszufinden, unter welchen Parametern ihr Letalitätstest virulente aviäre *E. coli*-Stämme von avirulenten unterscheidet (198). Sie verglichen Isolate aus klinischen Fällen von APEC-Infektionen mit *E. coli*-Stämmen, die aus dem Darm gesunder Broiler bei der Schlachtung entnommen wurden. Nach den makroskopischen und histopathologischen Ergebnissen dieser Studie wurde der embryonale Letalitätstest etabliert. Demnach reichen 100 CFU bereits aus, die in die Allantoishöhle von 12 Tage bebrüteten Hühnerembryonen appliziert werden, um nach 4 Tagen die getesteten Isolate nach ihrer Pathogenität in 3 Gruppen zu klassifizieren. Stämme mit Todesraten <10% sind avirulent, solche mit 10-29% sind moderat pathogen und die mit mehr Todesfällen werden als hoch virulent eingestuft. Die höchsten Todesraten konnten am 2. Tag des Versuches protokolliert werden. Die Autoren weisen auf die Relevanz der Frische und Homogenität der embryonierten Eier hin, da bekannt ist, dass diese, wenn sie kühl und trocken gelagert werden, zu einem späteren Zeitpunkt weiter bebrütet werden können. Bei der Durchführung des ELA für die vorliegende Arbeit wurde aus diesem Grund darauf geachtet, dass zwischen dem Legedatum und dem Versuch nicht mehr als 24 h lagen und dass die SPF-Eier alle aus derselben Charge stammten.

In einer anderen Studie wurden die Ergebnisse eines intravenösen (IV) Hühnerinfektionsmodells mit denen des ELA miteinander verglichen, um Korrelationen zwischen diesen zu finden (55). Zehn Isolate aus klinischen Fällen von APEC-Infektionen und 10 aus den Därmen gesunder Tiere wurden in verschiedenen Dosen intravenös an jeweils 10 SPF-Hühner im Alter von 3 Wochen appliziert und die Ergebnisse mit denen aus dem vorher dokumentierten ELA (54, 198) verglichen. Das intravenöse Infektionsmodell war in der Lage, neben diskriminierenden Aussagen im Virulenzgrad einzelner Isolate, zusätzliche Informationen bezüglich ihrer Morbidität auf der Basis von Läsionen der inneren Organe und Grad des Gewichtsverlustes zu liefern. Basierend auf den Mortalitätsraten des IV-Infektionsversuches und denen des ELA konnten signifikante Korrelationen zwischen beiden Tests beobachtet werden. Die höchsten Korrelationskoeffizienten kamen jedoch zustande, wenn die Ergebnisse aus Morbidität und Mortalität des IV-Tests kombiniert mit den Mortalitätsraten des ELA verglichen wurden. Weiterhin wird auf die unspezifischen Todesfälle im ELA hingewiesen, bei denen Embryonen inokuliert mit avirulenten Stämmen oder mit PBS während des Versuches sterben, die den ELA aber nach statistischen Ergebnissen nicht in seiner Fähigkeit, zwischen virulenten Stämmen zu unterscheiden, in Frage stellt.

In der vorliegenden Arbeit korrelierten die Ergebnisse des intratrachealen Hühnerinfektionsmodells mit denen im ELA ermittelten nur teilweise. Der im systemischen

Infektionsmodell ermittelte, hoch virulente Typus des Stammes IMT5155 konnte im ELA bestätigt werden, während der im Infektionsmodell als avirulent typisierte Stamm IMT5104 im ELA eine Stufe höher im Virulenzgrad klassifiziert wurde. Bei Betrachtung des Diagramms (s. Punkt 6.2.5.1) lassen sich Unterschiede zwischen den einzelnen Kategorien am stärksten erkennen, wenn man die Todesfälle im Verlauf der Zeit beobachtet. Im ELA von Wooley wird darauf hingewiesen, dass das „days to death“ ein wichtiges Kriterium für die Virulenz darstellt, weshalb dies bei der Berechnung der Indizes berücksichtigt wird. Die höchsten Mortalitätsraten konnten in der vorliegenden Arbeit ebenfalls am zweiten und dritten Versuchstag protokolliert werden. Interessanterweise lebten bei der Infektionsgruppe mit dem Wildtyp noch zwei Embryonen am zweiten Tag, während in der mit M12A09 schon alle tot waren. In der Gruppe, die den apathogenen Stamm IMT5104 appliziert bekam, waren am zweiten Tag nur zwei Embryonen tot.

Die generelle Organisation und Funktion des Immunsystems von Vögeln und Säugern ist sehr ähnlich. Die primären lymphoiden Organe in Hühnern sind die Bursa fabricii und der Thymus. Dabei ist die im distalen Darmbereich lokalisierte Bursa von besonderem Interesse, da sie einzigartig in Vögeln ist und kein Äquivalent in Säugern besitzt. Hier findet die B-Zell Differenzierung statt, während sich T-Zellen im bilateralen, multilobulären Thymus differenzieren. Trotz der unterentwickelten Lymphknoten, besitzen Vögel gut entwickelte sekundäre lymphoide Strukturen. Dazu zählen die Harder-Drüse, Knochenmark, kojunktival-, Darm- und bronchial-assoziiertes lymphoides Gewebe. Die Entwicklung des Immunsystems beim Huhn setzt früh ein. Vorläuferzellen der Bursa fabricii können schon am 7. Bebrütungstag detektiert werden. IgM-, IgG- und IgA-exprimierende Zellen werden entsprechend am 10., 14. und 16. Tag der Embryonierung gefunden (165). Vorläufer der T-Zellen wandern zum Thymus in drei Wellen: am 6.5., 12. und 18. Tag der Embryonalentwicklung (25). Das Immunsystem in der späten embryonalen Phase (ab 16 Tagen Bebrütung) und in gerade geschlüpften Hühnern ist auf Grund der unvollendeten strukturellen Organisation ihrer sekundären Immunorgane, wie der Milz, nicht vollständig entwickelt (115).

Die Milz ist bei Vögeln bei der Entstehung von Immunantworten von zentraler Bedeutung, da diese nur unterentwickelte Lymphknoten besitzen. Hinzu kommt, dass lymphoide Strukturen, wie das Meckel'sche Divertikulum und die Caecal-Tonsillen, sich erst postnatal entwickeln. Die in der Milz von Vögeln gut ausgebildeten Ellipsoide oder Schweiger-Seidel-Hülsen, bestehend aus Makrophagen und Lymphozyten, werden zusammen mit den periarteriellen lymphatischen Scheiden (PELS) funktionell analog zur marginalen Zone in Säugern angesehen (75). Untersuchungen zeigen, dass Ellipsoide und PELS erst am 20. Bebrütungstag ausgebildet werden, womit die Funktion der Milz bei der Immunantwort eingeschränkt wird (114).

Dem gegenüber stehen zahlreiche, erfolgreiche Applikationen von *in ovo*-Lebendvakzinen gegen die Erreger der Newcastle und Marek'schen Krankheit, infektiöse Bursitis und infektiöse Bronchitis (2, 3, 166, 192). Obwohl der Schutz gegen diese viralen Erkrankungen sehr wahrscheinlich von einer Immunantwort vermittelt wird, ist der genaue Mechanismus nicht geklärt. Möglich ist, dass die applizierten Viren über längere Zeit im Hühnerorganismus leben und nach dem Schlüpfen eine Immunantwort induzieren (115). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass diese lebenden, attenuierten Viren die Entwicklung der lymphoiden Strukturen beschleunigen oder immunkompetente Zellen aktivieren, beispielsweise durch eine Zytokin-vermittelte Überexpression von Zelloberflächen-Liganden. Ein Paradebeispiel für dieses Phänomen stellt die gamma-Interferon-induzierte Überexpression von MHC-II-Molekülen (85).

Die Immunkompetenz von Hühnerembryonen ist somit im Vergleich zu der von 5 Wochen alten Tieren erheblich unterentwickelt. Vermutlich können 11 Tage alte Embryonen deshalb eine Infektion mit einem pathogenen Keim nicht überleben, während 5 Wochen alte Tiere in der Lage dazu sind. Dies könnte auch der Grund sein, weshalb die Kombination aus Mortalitäts- und Morbiditätsraten zu einem höherem Korrelationskoeffizienten mit den Ergebnissen des ELA führt (55). Möglicherweise führen schon mikroskopische Läsionen in Zusammenhang mit einem unvollständig entwickelten Immunsystem in den Embryonen zu deren Tod, was die strengere Einstufung des Stammes IMT5104 im ELA erklären könnte. Gleichzeitig ist genau aus diesem Grund das Hühnerinfektionsmodell diskriminativer. Hier können Mortalität und Morbidität getrennt behandelt und kategorisiert werden. Solche Ergebnisse haben eine applikablere Aussage, da sie bei der Charakterisierung von Stämmen genauere Aussagen erlauben.

Im Hühnerdotter ist eine große Menge an Substanzen enthalten, die dem Embryo als Reserve während des Brütens zum Aufbau dienen. Proteine, Fette, Aminosäuren, Mineralien und Vitamine (A, D, E, K, Thiamin, Riboflavin, Niacin, Pantothenensäure, B6, Folsäure, B12, und Biotin) kommen darin vor, die durch den Dottersackkreislauf dem Embryo zugeführt werden. Weiterhin ist bekannt, dass bestimmte Elemente, wie zum Beispiel Eisen, in den Organen sich entwickelnder Hühnerembryonen in höheren Konzentrationen vorkommen, als bei gerade geschlüpften Hühnern (117). Ab dem zweiten Bebrütungstag beginnt das embryonale Herz zu schlagen, womit der Dottersackkreislauf in Gang gesetzt wird. Zwischen dem 4. und 5. Tag bildet sich die Allantois als Verbindung zum Chorion unter Ausbildung der Chorio-Allantoismembran für den Gasaustausch durch die Eierschale. Oxygeniertes Blut wird durch den Allantoiskreislauf direkt ins Herz des Hühnerembryos zugeführt. Die Ausscheidungen des Embryos werden in die Allantoishöhle abgegeben und Eiweiß zur Ernährung wird darin resorbiert. Am 11. Tag kommt es zu einer Verbindung zwischen Eiweißsack und Dottersack, wodurch eine Mischung aus Eiweiß und Dotter geschieht (169).

Am 12. Tag sind alle Strukturen, die für die Versorgung des Hühnerembryos mit Nährstoffen zuständig sind, voll ausgebildet und funktionsfähig. Die Mutante M12A09 ist nach dem ELA als hoch virulent zu klassifizieren, während sie im systemischen Infektionsmodell bei keinem einzigen Tier zum Tod oder schweren Läsionen führte. Der Grund hierfür liegt vermutlich darin, dass das embryonierte Hühnerembryo mit all seinen nährstoffreichen Kompartimenten, zu jedem Zeitpunkt, von der Inokulation in die Allantoishöhle bis zur Infektion des Embryos, den essentiellen Bedarf der Mutante an Pyrimidinen deckt. (Die Verfügbarkeit von Pyrimidinen in tierischem Gewebe wird unter Punkt 7.3.2, ab S. 95 näher diskutiert.) Somit konnte die Verwendung des ELA als adäquates Medium zur Charakterisierung von Mutanten, wie von Wooley *et al.* (2000) suggeriert (198), für die Mutante M12A09 nicht bestätigt werden. Möglicherweise ist der ELA generell kein adäquates Testmedium für auxotrophe Mutanten.

7.3.2 *PyrD* ist essentiell für das Auslösen der APEC-Infektionskrankheit im systemischen Hühnerinfektionsmodell

Eine Reihe von Infektionsmodellen für die Untersuchung der Kolibazillose sind bisher entwickelt worden. Von der Inokulation in Hühnerembryonen über die Allantoishöhle und das Eintagskükenmodell bis hin zu Modellen mit erwachsenen Puten und Hühnern mit und ohne vorherige(r) Sensibilisierung (33, 64, 155, 202). Unterschiedliche Inokulationswege: subkutan, intravenös, über Aerosol oder die direkte Applikation in die Luftsäcke oder durch die Trachea wurden bereits getestet (6, 36, 37, 96, 118, 144, 176, 202).

Van den Hurk *et al.* (1994) untersuchten die Auswirkung einer Inokulation mit dem hämorrhagischen Enteritis-Virus von Puten (HEV) auf die Sensibilität gegenüber einer Infektion mit unterschiedlich applizierten APEC (188). Sie konnten einen synergistischen Effekt beobachten, bei dem Mortalität und makroskopische Organläsionen am größten ausfielen, wenn die Tiere das HEV bekamen und über die Trachea mit dem APEC-Stamm infiziert wurden. Ähnliche Beobachtungen sind auch für das infektiöse Bronchitis Virus, Newcastle Disease Virus und Mykoplasmen gemacht worden. Hohe Ammoniakkonzentrationen in der Luft führen ebenfalls zu einem sensibilisierenden Effekt. Peighambari *et al.* (2000) etablierten ein Infektionsmodell unter Feldbedingungen und benutzten Broiler im Alter von 2-4 Wochen, die den Erreger als Aerosol nach Sensibilisierung mit dem infektiösen Bronchitis Virus (IBV) bekamen (139). In diesem Infektionsmodell ruft die Sensibilisierung von 20 Tage alten Puten mit IBV und die Applikation von APEC 4 Tage danach die APEC-Infektionskrankheit hervor, wie sie unter Feldbedingungen zu beobachten ist, nämlich mit niedriger Mortalität, hohem Anteil an Luftsackentzündungen und geringem Anteil an Läsionen der inneren Organe.

Die Ergebnisse über die Rolle von virulenzassoziierten Faktoren in der Pathogenese der APEC-Infektionen, die unter Benutzung verschiedener Infektionsmodelle publiziert wurden,

sind oft inhomogen. Aus diesem Grund wurde für die Durchführung der „signature-tagged“ Mutagenese ein eigenes Infektionsmodell etabliert, welches den natürlichen Infektionsweg nachahmt, einfach applizierbar und reproduzierbar ist. In diesem Modell wurde der Wildtypstamm IMT5155 (O2:H5:K1) verwendet, der zu einer der am häufigsten unter Feldbedingungen vorkommenden Serogruppen und zusätzlich in Deutschland repräsentativsten klonalen Linien gehört (38). Vorläufige Studien mit diesem Feldisolat zeigten, dass es in der Lage ist, schwerwiegende Organläsionen und Symptome der APEC-Infektion mit hohen Mortalitätsraten in 6 Monate alten Hühnern hervorzurufen (unpublizierte Daten). Der Stamm IMT5155NaI^r, welcher Nalidixinsäure-resistent ist, entstand durch Mutation aus dem Wildtyp und diente als Empfängerstamm für die Transposonmutagenese. Die Eigenschaften beider Stämme wurden im Hühnerinfektionsmodell analysiert und miteinander verglichen, wobei keine Unterschiede bezüglich ihres Potenzials, die typischen Symptome der Kolibazillose hervorzurufen, festgestellt werden konnten. Dynamische Studien mit 5 Wochen alten SPF-Hühnern belegen, dass der Stamm IMT5155NaI^r nach intratrachealer Inokulation von 1×10^8 CFU/ml schon 3 Stunden nach Inokulation aus den inneren Organen (Leber, Herz, Niere, Lunge und Milz) der Tiere isoliert werden konnte. 24 und 48 h p. inf. wurden die höchsten Keimkonzentrationen mit Spitzenwerten von 10^7 - 10^8 CFU/g in Lunge und Herz gefunden, die danach drastisch sanken, um in einer Eliminierung des Erregers nach spätestens 7 Tagen zu resultieren. Eine Kolonisation der inneren Organe konnte in ca. 85% der infizierten Tiere festgestellt werden (100).

In der vorliegenden Arbeit wurde nach diesem Infektionsmodell verfahren. Die Verwendung von SPF-Hühnern spielt dabei eine zentrale Rolle, denn unabhängig von ihren pathogenen Eigenschaften wirken sich viele Erreger auf die Physiologie der Tiere aus und damit auf die Ergebnisse von Tierversuchen. Zusätzlich können Infektionen, auch wenn sie asymptomatisch verlaufen, die interindividuelle Variabilität erhöhen. Das hat zur Folge, dass erhöhte Tierzahlen zur Durchführung aussagekräftiger Experimente benötigt werden. Direkte Auswirkungen von Erregern auf Versuchsergebnisse können zu Fehlinterpretationen von Ergebnissen führen und somit auch zu einer mangelnden Reproduzierbarkeit der Experimente (189). Die Verwendung von Tieren, die frei von unerwünschten Mikroorganismen sind, ist eine wichtige Voraussetzung für die Durchführung von aussagekräftigen und reproduzierbaren Experimenten mit einem Minimum an Tieren und stellt somit einen wesentlichen Beitrag zum Tierschutz dar.

In dem während dieser Arbeit durchgeführten Infektionsversuch zum Nachweis der Attenuierung von Stamm M12A09 konnten nach 24 h beim Wildtyp Maximalwerte von 10^7 CFU/g in der Lunge und Herz gefunden werden, während diese bei der Mutante M12A09 in beiden Organen bei 10^5 CFU/g lagen. 48 h p. inf. waren beim Wildtyp Lunge und Niere am meisten kolonisiert mit Werten von 10^5 und 10^6 CFU/g. Bei der Mutante lagen die

Keimzahlen bei 10^4 in Lunge und Herz und in der Niere bei 10^3 CFU/g. Insgesamt konnten hier also Maximalwerte 24 h p. inf. festgestellt werden, wobei in der Infektionsgruppe mit dem Wildtyp eine langsamere Eliminierung in der Niere als bei den Tieren festgestellt werden konnte, die mit der Mutante inokuliert wurden. Zusammenfassend korrelieren diese Ergebnisse mit denen, die bei der Etablierung des Tiermodells festgestellt wurden. Während der Wildtyp in der Lage ist, die APEC-Infektionskrankheit innerhalb von Stunden auszulösen, grobe Läsionen in den inneren Organen und den Tod von einigen Tieren innerhalb von Stunden herbeizuführen, konnten diese Eigenschaften für M12A09 nicht festgestellt werden. Durch den Tierversuch konnte allerdings eine Vermehrung der Mutante in den inneren Organen, und somit ihre ausreichende Fitness und Vitalität, die Blutbahn zu penetrieren und unterschiedliche Gewebearten zu kolonisieren, bestätigt werden.

Es gibt zwei Möglichkeiten, wie Mikroorganismen ihren essentiellen Bedarf an Pyrimidinen decken können: entweder (i) sie synthetisieren sie selber über den *de novo* Biosyntheseweg oder (ii) via „salvage pathway“ über die Resorption von Pyrimidinbasen und ihren Ribonukleosid-Derivaten aus dem Wachstumsmilieu. Voraussetzung dafür sind Enzyme, wie die Thymidin-Kinase, Uridin-Kinase, Thymidin-Phosphorylase oder Cytidin-Deaminase, die die Umwandlung von Nukleosid-Vorläufermolekülen (Uridin, Thymidin, Cytosin) in die entsprechenden Nukleotide katalysieren. Sind keine exogenen Pyrimidine in der Umgebung, können die meisten Mikroorganismen UMP *de novo* synthetisieren. Bakterien, die in reichen Medien leben, können diese Fähigkeit verlieren und sind dann komplett auf die exogene Zufuhr von Pyrimidinen angewiesen (128).

Der Bezug von Nährstoffen ist ein zentrales Merkmal der Erreger-Wirt-Interaktionen und bakterielle Pathogenität ist abhängig von Verfügbarkeit und Bezug von Nährstoffen (113). Bereits 1953 vermutete Lewis, dass Sensitivität und Resistenz eines Wirtes gegenüber einem „Parasiten“ von der Verfügbarkeit an Nährstoffen in den unterschiedlichen Wirtskompartimenten abhängig ist und, dass diese sogar unter den Individuen einer Wirtsspezies variierten (99). Über die Verfügbarkeit von Pyrimidinen im Wirtorganismus gibt es in der Literatur entsprechend dieser Hypothese unterschiedliche Aussagen. *Toxoplasma gondii*, ein Parasit mit einem eingeschränkten „salvage pathway“, könnte sich zu einem solchen entwickelt haben aus der Tatsache heraus, dass Pyrimidine in tierischen Geweben nur begrenzt zur Verfügung stehen (51). Transposon-Mutanten von *Salmonella* Typhimurium wurden auf ihre Fähigkeit zur intrazellulären Replikation in Mäusemakrophagen hin getestet. Neben Mutanten mit Insertionen in Virulenzgenen fand man vier von 14 auxotrophen Mutanten, die Defekte im Pyrimidinstoffwechsel hatten und sich nicht intrazellulär vermehren konnten. Die Attenuierung einiger dieser auxotrophen Bakterien zeigt, dass Wachstum und/oder die Biosynthese von Virulenzfaktoren für das Überleben in Makrophagen nötig sind. Eine Mutante mit einem Bedarf an bestimmten Metaboliten, die

in vivo nicht verfügbar sind, kann nicht wachsen und konsequenterweise ist sie nicht dazu fähig, im Makrophagen zu überleben (46). In einer weiteren Studie wurde ebenfalls eine Transposon-Mutagenese an *S. Typhimurium* zur Selektion von Mutanten mit einer defekten intrazellulären Replikation in Epithelzellen durchgeführt (98). Es konnten 10 Mutanten mit Purin-, Pyrimidin- und Aminosäureauxotrophien isoliert werden, die zwar wie der Wildtyp in Vakuolen innerhalb der Epithelzellen aufgenommen wurden, jedoch im Gegensatz zu diesem nicht zum Untergang der Zellen führten. Die Mutanten konnten in Makrophagen von Mäusen überleben, sodass es sich nicht um Gene, die für das Überleben in phagozytischen Zellen handelt. Wurden Purine oder Pyrimidine zum Zellkulturmedium hinzugefügt, vermehrten sich die auxotrophen Mutanten in den Epithelzellen wie der Wildtyp, was dafür spricht, dass diese Stoffe nicht genügend in diesen Zellen vorhanden sind. Erstaunlicherweise waren die Pyrimidin-auxotrophen Mutanten im Mäuseinfektionsmodell voll virulent, sodass eine ausreichende Verfügbarkeit dieser Stoffe im Wirtstier vermutet wird. Mutanten des Erregers menschlicher Endokarditiden *Enterococcus faecalis* mit defekten Enzymen PurL und PyrC wurden in einem Mäuse-Peritonitismodell getestet (168). Während die Purin-auxotrophe Mutante deutlich attenuiert war, konnte für die Pyrimidin-auxotrophe dieser Effekt nicht bestätigt werden. Zur Etablierung von IVET durch Mahan *et al.* (1993) wurde die Genexpression von *Salmonella Typhimurium* in Mäusen untersucht. Das *carAB*-Operon zeigte in dieser Untersuchung eine erhöhte Expression in den Zellen der Milz. Die Induktion dieses Operons während der Infektion weist auf die geringe Menge an Pyrimidinen in tierischem Gewebe hin (109).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass *pyr*-Mutanten unterschiedlicher Mikroorganismen verschiedene Grade an Attenuierung bis hin zur Beibehaltung der vollen Virulenz in einer Vielzahl von Infektionsmodellen aufweisen. Die Gründe dafür könnten unterschiedliche Bedarfsmengen an diesen Metaboliten und/oder verschiedene Konzentrationen in den extra- und intrazellulären Wirtskompartimenten sein, die den Bedarf der Mikroorganismen decken können oder nicht. In der Literatur gibt es nicht viele Informationen über den Pyrimidingehalt in Geweben des Geflügels. Eine *carAB*-Mutante von einem aviären pathogenen *E. coli* Stamm war im Puteninfektionsmodell attenuiert und konnte die Tiere vor einer Infektion mit dem Wildtyp schützen (92). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Pyrimidin-auxotrophe Mutante M12A09 ist ebenfalls attenuiert in Hühnern. Um ihre protektiven Eigenschaften zu verifizieren, müssen weitere Versuche durchgeführt werden, aber die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Pyrimidingehalt im Huhn keine ausreichende Quelle für den Bedarf Pyrimidin-auxotropher Mutanten darstellt und dass dieser Umstand das Gleichgewicht in der Erreger-Wirt-Interaktion zugunsten des Wirtes verschiebt.

Wieso sind Gene, die *in vitro* benötigt werden von Interesse? Die Mehrheit der „Housekeeping“-Gene wird wahrscheinlich auch während der Infektion benötigt. Außerdem sind solche Gene viel praktischere Untersuchungsobjekte als Gene, die speziell für das Auslösen der Erkrankung erforderlich sind, da Tests auf Antibiotikaempfindlichkeit und Resistenz viel einfacher im Labor durchzuführen sind. Die meisten Antibiotika im heutigen Einsatz sind gegen „Housekeeping“-Gene gerichtet. Auxotrophe Mutanten von zahlreichen Mikroorganismen werden in der Prävention von Krankheiten als Vakzine eingesetzt. Lebendvakzinen mit attenuierten Bakterien, die sich noch vermehren können ohne die Krankheit auszulösen, rufen in der Regel eine wirksamere Immunität hervor, da sie neben einer humoralen auch eine bis zu lebenslang anhaltende zelluläre Immunantwort auslösen.

Ein Leucin-abhängiger Stamm und eine Lysin-Pantothemat-auxotrophe Doppelmutante von *Mycobacterium bovis* zeigten eine gute Protektion gegen den Wildtypstamm in Rindern und riefen eine Langzeit-Immunität in Mäusen und Meerschweinchen hervor (87, 161, 163). Eine Mutante von *Francisella tularensis* mit einem Defekt im *purMCD*-Locus der Purin-Biosynthese schützte schon in geringen Dosen Mäuse komplett gegen die letale Wirkung des Wildtypstammes (138). Eine *Streptococcus suis*-Mutante mit ausgeschaltetem *aro*-Operon und essentiellm Bedarf an aromatischen Aminosäuren konnte Schweine vor einer Erkrankung mit dem Wildtypstamm bewahren (49).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass M12A09 eine auxotrophe Mutante ist, die nach preliminären Virulenzstudien nicht in der Lage ist, klinische Symptome des Krankheitskomplexes der APEC-Infektion in Hühnern auszulösen, sich aber trotzdem im Wirt replizieren kann. Ihr potenzieller Charakter als Vakzine sollte näher untersucht werden. Es hat sich gezeigt, dass Vakzinen mit attenuierten APEC-Stämmen keine Kreuzimmunität hervorrufen (7, 26, 28, 59). Es ist also nicht zu erwarten, dass M12A09 einen Schutz gegen andere Serogruppen als O2 verleiht. Allerdings gehört diese immerhin zu den am meisten in Zusammenhang mit APEC-Ausbrüchen isolierten Serogruppen. Immunologische Studien könnten darüber aufklären ob diese Mutante eine Immunantwort im Wirt induziert. Anschließend müsste eine Vakzinierung mit diesem Stamm und abschließend ein Belastungstest mit dem Wildtypstamm IMT5155 durchgeführt werden.

7.3.3 Vorschlag für die Ermittlung der protektiven Eigenschaften der APEC Mutante M12A09

In der Regel werden Hühner über das Trinkwasser oder Augentropfen, wegen der Praktikabilität dieser Verabreichungsformen, geimpft. Impfprogramme sehen vor, die Tiere schon in den ersten Tagen gegen Erkrankungen wie Marek's und Newcastle Disease zu schützen. Für den APEC-Stamm IMT5155 gibt es ein etabliertes Hühnerinfektionsmodell mit fünf Wochen alten Tieren. Für Protektivitätsstudien mit der Mutante M12A09 sollte aus

Gründen der Praktikabilität eine Impfung im Alter von 2 Wochen und eine Verstärkung zwei Wochen später durch intratracheale Applikation durchgeführt werden. Sieben Tage nach der zweiten Immunisierung sollten mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) IgY-Antikörper in Serum und Spülproben der Luftsäcke detektiert werden. Die Titer sollten bei den vakzinierten Tieren signifikant höher als bei den PBS-Kontrolltieren sein.

Viele Autoren beschreiben die Applikation von Viren, wie Infektiöse Bronchitis Virus (IBV) vor dem eigentlichen Challenge mit dem Wildtypstamm. Dieser Einsatz ist nur in Fällen, wo der Wildtyp nicht ohne vorherige Sensibilisierung der Tiere die Krankheit auslöst, gerechtfertigt. Beim APEC-Stamm IMT5155 ist dies nicht der Fall, sodass eine Belastung der immunisierten Tiere mit 5 Wochen ohne weitere Maßnahmen durchgeführt werden könnte. Nach einer Beobachtungszeit von drei Tagen sollten nach den bereits etablierten Dynamik- und Virulenz-Studien signifikante Unterschiede in den Mortalitäts- und Morbiditätsraten zwischen den immunisierten und den Kontrolltieren vorliegen, um einen effektiven Impfschutz nachzuweisen.

8 Zusammenfassung

Die am hoch pathogenen APEC-Stamm IMT5155 (O2:K1:H5) durchgeführte STM von Li *et al.* (2005) lieferte zahlreiche Mutanten mit Defekten in Genen, die zu einem attenuierten Phänotyp im Infektionsmodell mit 5 Wochen alten Hühnern führten (100, 102). In dieser Arbeit werden erstmals die Ergebnisse der geno- und phänotypischen Charakterisierung einer dieser Mutanten aufgeführt.

Nach diesen Untersuchungen handelt es sich bei M12A09 um einen Abkömmling des Stammes IMT5155 mit einer Transposon-Insertion in einem Gen der *de novo* Biosynthese der Pyrimidine, *pyrD*, wie durch Multiplex-PCR, PFGE-Restriktionsmuster, DNS-DNS-Hybridisierungen und arbitrary PCR demonstriert. Durch Genexpressions-Analysen mittels reverser Transkriptase-PCR konnte die fehlende Transkription von *pyrD* in Hühnerserum und LB-Medium nachgewiesen werden.

Die Untersuchungen zur Etablierung eines Phänotyps ergaben, dass die Mutante ohne weiteres in LB wachsen und sogar mit dem Wildtyp um die darin enthaltenen Nährstoffe konkurrieren kann. Der auxotrophe Charakter von M12A09 äußert sich jedoch in M9+ und in hitzeinaktiviertem Hühnerserum durch die fehlende und verminderte Vermehrung der Mutante. Dieses Wachstumsdefizit konnte durch externe Zufuhr von 750 µg/ml Orotat kompensiert werden. Weiterhin könnte nachgewiesen werden, dass erst durch das Wiedereinführen des intakten *pyrD*-Gens und eines ca. 700 bp großen Abschnitts stromaufwärts des Gens auf einem low-copy Plasmid der Phänotyp des Wildtypstammes in M9+ wieder hergestellt werden kann.

Die Verwendung des Embryonen-Letalitätstests (ELA) als adäquates Medium zur Klassifizierung von Mutanten nach ihrer Pathogenität konnte in dieser Studie für die auxotrophe Mutante M12A09 nicht bestätigt werden, da die Charakterisierung der Virulenz im zuverlässigen Hühnerinfektionsmodell ergab, dass M12A09 zwar eine Infektion verursacht, allerdings deutlich milder im Vergleich zum Wildtyp. Nach den Ergebnissen des ELA ist die Mutante M12A09 jedoch als hoch pathogen einzustufen. Dies konnte im bereits etablierten Hühnerinfektionsmodell nach der intratrachealen Applikation von ca. $2,5 \times 10^8$ CFU nicht bestätigt werden. Während die Inokulation des Wildtyps zu den klassischen Anzeichen der APEC-Infektion mit hochgradig gestörtem Allgemeinbefinden, Todesfällen und typischen Organläsionen post mortem führte, zeigten sich die Tiere, die die Mutante bekamen weitgehend ungestört und die pathologische Untersuchung belegte einen abgeschwächten Infektionsprozess. Somit ist die Mutante M12A09 mit einem defekten *pyrD*-Gen nach dieser Studie als attenuierter Erreger einzustufen, dessen protektive Eigenschaften weiter untersucht werden sollten.

9 Summary

Investigations for the geno- and phenotypical characterization of the avian pathogenic *E. coli* (APEC) mutant M09A12, which harbours a transposon insertion in the gene *pyrD*

Li *et al.* (2005) applied STM to the highly pathogenic APEC-strain IMT5155 (O2:K1:H5) and created a large amount of attenuated mutants as demonstrated by inoculation to 5-week old chickens (100, 102). In this study we present the results of the geno- and phenotypic characterization of one of these mutants.

The mutant M12A09 is a derivative of the strain IMT5155 carrying a transposon insertion in the gene *pyrD*, involved in the *de novo* pyrimidine biosynthesis, as shown by the results of multiplex PCR, DNA Hybridization and arbitrary PCR. The analysis of gene expression by applying reverse transcriptase PCR demonstrated that *pyrD* is neither transcribed in LB nor chicken serum when strain M12A09 is cultivated in these media.

Further studies to establish a phenotype reveal that the mutant strain M12A09 displays the same growth characteristics as strain IMT5155 in LB and when grown together in this medium, the wildtype strain is not able to outcompete the mutant strain. The auxotrophic nature of *pyrD* mutants though, hinders strain M12A09 from growing in M9+ medium and heat inactivated chicken serum. Furthermore, we demonstrate that the addition of 750 µg/ml orotate to these media compensates the growth deficiency and that the gene *pyrD* together with approx. 700 bp upstream of the gene is needed to be reintroduced on a low-copy plasmid to M12A09 in order to re-establish the phenotype of strain IMT5155 in M9+ medium.

We were not able to confirm that the embryo lethality assay (ELA) is an appropriate medium to classify mutants after their virulence since the results of the more reliable chicken infection model differ from those obtained by the ELA, after which M12A09 is to be categorized as highly virulent. The intratracheal application of ca. 2.5×10^8 CFUs of strain IMT5155 to 5 week old chickens releases typical symptoms of the APEC-infection, as poor general condition, death cases and gross lesions in the internal organs. In contrast, most of the animals that were inoculated with the mutant strain performed well and the pathological findings suggest that they undergo a moderate infection process. Thus, we conclude that the APEC-mutant M12A09, with a defective *pyrD* gene, is attenuated and its potential protectiveness should be further studied.

10 Literatur

1. **Aguero, M. E., G. de la Fuente, E. Vivaldi, and F. Cabello.** 1989. ColV increases the virulence of *Escherichia coli* K1 strains in animal models of neonatal meningitis and urinary infection. *Med Microbiol Immunol* **178**:211-216.
2. **Ahmad, J., and J. M. Sharma.** 1992. Evaluation of a modified-live virus vaccine administered in ovo to protect chickens against Newcastle disease. *Am J Vet Res* **53**:1999-2004.
3. **Ahmad, J., and J. M. Sharma.** 1993. Protection against hemorrhagic enteritis and Newcastle disease in turkeys by embryo vaccination with monovalent and bivalent vaccines. *Avian Dis* **37**:485-491.
4. **Akerley, B. J., E. J. Rubin, A. Camilli, D. J. Lampe, H. M. Robertson, and J. J. Mekalanos.** 1998. Systematic identification of essential genes by *in vitro* mariner mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:8927-8932.
5. **Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**:403-410.
6. **Arne, P., D. Marc, A. Bree, C. Schouler, and M. Dho-Moulin.** 2000. Increased tracheal colonization in chickens without impairing pathogenic properties of avian pathogenic *Escherichia coli* MT78 with a *fimH* deletion. *Avian Dis* **44**:343-355.
7. **Arp, L. H.** 1980. Consequences of active or passive immunization of turkeys against *Escherichia coli* O78. *Avian Dis* **24**:808-815.
8. **Bachstez, M.** 1868-1997. Über die Konstitution der Orotsäure. *Chemische Berichte* **63**:1000 - 1007.
9. **Bagg, A., and J. B. Neilands.** 1987. Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. *Microbiol Rev* **51**:509-518.
10. **Baker, K. E., K. P. Ditullio, J. Neuhard, and R. A. Kelln.** 1996. Utilization of orotate as a pyrimidine source by *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* requires the dicarboxylate transport protein encoded by *dctA*. *J Bacteriol* **178**:7099-7105.
11. **Baltes, N., and G. F. Gerlach.** 2004. Identification of genes transcribed by *Actinobacillus pleuropneumoniae* in necrotic porcine lung tissue by using selective capture of transcribed sequences. *Infect Immun* **72**:6711-6716.
12. **Barnes, H. J., and Gross, W.B.** 1997. Colibacillosis, p. 131-141. *In* Calnek, B. W. (ed.), *Diseases of poultry*. Iowa State University Press, Ames Iowa.

13. **Berg, D. E., A. Weiss, and L. Crossland.** 1980. Polarity of Tn5 insertion mutations in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **142**:439-446.
14. **Blanco, J. E., M. Blanco, A. Mora, W. H. Jansen, V. Garcia, M. L. Vazquez, and J. Blanco.** 1998. Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicaemic chickens in Galicia (northwest Spain). *Vet Microbiol* **61**:229-235.
15. **Bree, A., M. Dho, and J. P. Lafont.** 1989. Comparative infectivity for axenic and specific-pathogen-free chickens of O2 *Escherichia coli* strains with or without virulence factors. *Avian Dis* **33**:134-139.
16. **Briozzo, P., C. Evrin, P. Meyer, L. Assairi, N. Joly, O. Barzu, and A. M. Gilles.** 2005. Structure of *Escherichia coli* UMP kinase differs from that of other nucleoside monophosphate kinases and sheds new light on enzyme regulation. *J Biol Chem* **280**:25533-25540.
17. **Brown, P. K., and R. Curtiss, 3rd.** 1996. Unique chromosomal regions associated with virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:11149-11154.
18. **Buchmeier, N. A., and F. Heffron.** 1989. Intracellular survival of wild-type *Salmonella typhimurium* and macrophage-sensitive mutants in diverse populations of macrophages. *Infect Immun* **57**:1-7.
19. **Burall, L. S., J. M. Harro, X. Li, C. V. Lockett, S. D. Himpsl, J. R. Hebel, D. E. Johnson, and H. L. Mobley.** 2004. *Proteus mirabilis* genes that contribute to pathogenesis of urinary tract infection: identification of 25 signature-tagged mutants attenuated at least 100-fold. *Infect Immun* **72**:2922-2938.
20. **Camilli, A., D. T. Beattie, and J. J. Mekalanos.** 1994. Use of genetic recombination as a reporter of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:2634-2638.
21. **Casadevall, A., and L. A. Pirofski.** 2000. Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infect Immun* **68**:6511-6518.
22. **Charlier, D., G. Weyens, M. Roovers, J. Piette, C. Bocquet, A. Pierard, and N. Glansdorff.** 1988. Molecular interactions in the control region of the *carAB* operon encoding *Escherichia coli* carbamoylphosphate synthetase. *J Mol Biol* **204**:867-877.
23. **Chirgwin, J. M., A. E. Przybyla, R. J. MacDonald, and W. J. Rutter.** 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**:5294-5299.

24. **Cloud, S. S., J. K. Rosenberger, P. A. Fries, R. A. Wilson, and E. M. Odor.** 1985. *In vitro* and *in vivo* characterization of avian *Escherichia coli*. I. Serotypes, metabolic activity, and antibiotic sensitivity. *Avian Dis* **29**:1084-1093.
25. **Coltey, M., R. P. Bucy, C. H. Chen, J. Cihak, U. Losch, D. Char, N. M. Le Douarin, and M. D. Cooper.** 1989. Analysis of the first two waves of thymus homing stem cells and their T cell progeny in chick-quail chimeras. *J Exp Med* **170**:543-557.
26. **Cotter, P. A., and J. F. Miller.** 1996. Triggering bacterial virulence. *Science* **273**:1183-1184.
27. **de Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik, and K. N. Timmis.** 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J Bacteriol* **172**:6568-6572.
28. **Deb, J. R., and E. G. Harry.** 1976. Laboratory trials with inactivated vaccines against *Escherichia coli* (O78 K80) infection in fowls. *Res Vet Sci* **20**:131-138.
29. **Delicato, E. R., B. G. de Brito, L. C. Gaziri, and M. C. Vidotto.** 2003. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Vet Microbiol* **94**:97-103.
30. **Denis-Duphil, M.** 1989. Pyrimidine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the *ura2* cluster gene, its multifunctional enzyme product, and other structural or regulatory genes involved in *de novo* UMP synthesis. *Biochem Cell Biol* **67**:612-631.
31. **Devroede, N., T. L. Thia-Toong, D. Gigot, D. Maes, and D. Charlier.** 2004. Purine and pyrimidine-specific repression of the *Escherichia coli carAB* operon are functionally and structurally coupled. *J Mol Biol* **336**:25-42.
32. **Dho-Moulin, M., and J. M. Fairbrother.** 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet Res* **30**:299-316.
33. **Dho, M., and J. P. Lafont.** 1984. Adhesive properties and iron uptake ability in *Escherichia coli* lethal and nonlethal for chicks. *Avian Dis* **28**:1016-1025.
34. **Dias da Silveira, W., A. Ferreira, M. Brocchi, L. Maria de Hollanda, A. F. Pestana de Castro, A. Tatsumi Yamada, and M. Lancellotti.** 2002. Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. *Vet Microbiol* **85**:47-53.
35. **Dozois, C. M., N. Chanteloup, M. Dho-Moulin, A. Bree, C. Desautels, and J. M. Fairbrother.** 1994. Bacterial colonization and *in vivo* expression of F1 (type 1)

- fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*. Avian Dis **38**:231-239.
36. **Dozois, C. M., F. Daigle, and R. Curtiss, 3rd.** 2003. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed *in vivo* by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. Proc Natl Acad Sci U S A **100**:247-252.
37. **Dozois, C. M., M. Dho-Moulin, A. Bree, J. M. Fairbrother, C. Desautels, and R. Curtiss, 3rd.** 2000. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. Infect Immun **68**:4145-4154.
38. **Ewers, C., T. Janssen, S. Kiessling, H. C. Philipp, and L. H. Wieler.** 2004. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. Vet Microbiol **104**:91-101.
39. **Ewers, C., T. Janssen, S. Kiessling, H. C. Philipp, and L. H. Wieler.** 2005. Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. Avian diseases **49**:269-273.
40. **Ewers, C., T. Janssen, and L. H. Wieler.** 2003. [Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC)]. Berl Munch Tierarztl Wochenschr **116**:381-395.
41. **Ewers, C., G. Li, H. Wilking, S. Kiessling, K. Alt, E. M. Antao, C. Laturus, I. Diehl, S. Glodde, T. Homeier, U. Bohnke, H. Steinruck, H. C. Philipp, and L. H. Wieler.** 2007. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? Int J Med Microbiol **297**:163-176.
42. **Falkow, S.** 1988. Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. Rev Infect Dis **10 Suppl 2**:S274-276.
43. **Falkow, S.** 1997. Perspectives series: host/pathogen interactions. Invasion and intracellular sorting of bacteria: searching for bacterial genes expressed during host/pathogen interactions. J Clin Invest **100**:239-243.
44. **Fasoli, M. O., D. Kerridge, and J. F. Ryley.** 1990. Pathogenicity of 5-fluorocytosine resistant strains of *Candida albicans*. J Med Vet Mycol **28**:27-34.
45. **Faucher, S. P., S. Porwollik, C. M. Dozois, M. McClelland, and F. Daigle.** 2006. Transcriptome of *Salmonella enterica* serovar Typhi within macrophages revealed through the selective capture of transcribed sequences. Proc Natl Acad Sci U S A **103**:1906-1911.

46. **Fields, P. I., R. V. Swanson, C. G. Haidaris, and F. Heffron.** 1986. Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. Proc Natl Acad Sci U S A **83**:5189-5193.
47. **Finlay, B. B., and S. Falkow.** 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. Microbiol Mol Biol Rev **61**:136-169.
48. **Fittipaldi, N., M. Gottschalk, G. Vanier, F. Daigle, and J. Harel.** 2007. Use of selective capture of transcribed sequences to identify genes preferentially expressed by *Streptococcus suis* upon interaction with porcine brain microvascular endothelial cells. Applied and environmental microbiology **73**:4359-4364.
49. **Fittipaldi, N., J. Harel, B. D'Amours, S. Lacouture, M. Kobisch, and M. Gottschalk.** 2007. Potential use of an unencapsulated and aromatic amino acid-auxotrophic *Streptococcus suis* mutant as a live attenuated vaccine in swine. Vaccine **25**:3524-3535.
50. **Ford, W. W.** 1927. Text-book of bacteriology, p. 826–844. W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pa.
51. **Fox, B. A., and D. J. Bzik.** 2002. *De novo* pyrimidine biosynthesis is required for virulence of *Toxoplasma gondii*. Nature **415**:926-929.
52. **Gahring, L. C., F. Heffron, B. B. Finlay, and S. Falkow.** 1990. Invasion and replication of *Salmonella typhimurium* in animal cells. Infect Immun **58**:443-448.
53. **Gan, K., K. Sankaran, M. G. Williams, M. Aldea, K. E. Rudd, S. R. Kushner, and H. C. Wu.** 1995. The *umpA* gene of *Escherichia coli* encodes phosphatidylglycerol:prolipoprotein diacylglyceryl transferase (lgt) and regulates thymidylate synthase levels through translational coupling. J Bacteriol **177**:1879-1882.
54. **Gibbs, P. S., J. J. Maurer, L. K. Nolan, and R. E. Wooley.** 2003. Prediction of chicken embryo lethality with the avian *Escherichia coli* traits complement resistance, colicin V production, and presence of the increased serum survival gene cluster (*iss*). Avian Dis **47**:370-379.
55. **Gibbs, P. S., and R. E. Wooley.** 2003. Comparison of the intravenous chicken challenge method with the embryo lethality assay for studies in avian colibacillosis. Avian Dis **47**:672-680.

56. **Goes, C. R., L. C. Gaziri, and M. C. Vidotto.** 1993. Cloned genes of the aerobactin system of virulent avian *Escherichia coli* do not confer virulence to recombinant strains. *Braz J Med Biol Res* **26**:261-275.
57. **Graham, J. E., and J. E. Clark-Curtiss.** 1999. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:11554-11559.
58. **Gross, W. B.** 1994. Diseases due to *Escherichia coli* in poultry, p. 237–259. In G. C.L. (ed.), *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. CAB International, Wallingford.
59. **Gyimah, J. E., B. Panigrahy, and J. D. Williams.** 1986. Immunogenicity of an *Escherichia coli* multivalent pilus vaccine in chickens. *Avian Dis* **30**:687-689.
60. **Han, X., and C. L. Turnbough, Jr.** 1998. Regulation of *carAB* expression in *Escherichia coli* occurs in part through UTP-sensitive reiterative transcription. *J Bacteriol* **180**:705-713.
61. **Handfield, M., and R. C. Levesque.** 1999. Strategies for isolation of *in vivo* expressed genes from bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **23**:69-91.
62. **Hang, L., M. John, M. Asaduzzaman, E. A. Bridges, C. Vanderspurt, T. J. Kirn, R. K. Taylor, J. D. Hillman, A. Progulske-Fox, M. Handfield, E. T. Ryan, and S. B. Calderwood.** 2003. Use of *in vivo*-induced antigen technology (IVIAT) to identify genes uniquely expressed during human infection with *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:8508-8513.
63. **Harper, M., J. D. Boyce, I. W. Wilkie, and B. Adler.** 2003. Signature-tagged mutagenesis of *Pasteurella multocida* identifies mutants displaying differential virulence characteristics in mice and chickens. *Infect Immun* **71**:5440-5446.
64. **Harry, E. G., and L. A. Hemsley.** 1965. The Association between the Presence of Septicaemia Strains of *Escherichia Coli* in the Respiratory and Intestinal Tracts of Chickens and the Occurrence of Coli Septicaemia. *Vet Rec* **77**:35-40.
65. **Heithoff, D. M., C. P. Conner, P. C. Hanna, S. M. Julio, U. Hentschel, and M. J. Mahan.** 1997. Bacterial infection as assessed by *in vivo* gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:934-939.

66. **Hensel, M., J. E. Shea, C. Gleeson, M. D. Jones, E. Dalton, and D. W. Holden.** 1995. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* **269**:400-403.
67. **Heyworth, P. G., W. E. Gutteridge, and C. D. Ginger.** 1984. Pyrimidine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Lett* **176**:55-60.
68. **Hoeprich, P. D.** 1983. Host-parasite relationships and the pathogenesis of infectious disease, p. 45–56. *In* P. D. Hoeprich (ed.), *Infectious diseases*. Harper & Row, Philadelphia, Pa.
69. **Hou, J. Y., J. E. Graham, and J. E. Clark-Curtiss.** 2002. *Mycobacterium avium* genes expressed during growth in human macrophages detected by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Infect Immun* **70**:3714-3726.
70. **Ike, K., K. Kawahara, H. Danbara, and K. Kume.** 1992. Serum resistance and aerobactin iron uptake in avian *Escherichia coli* mediated by conjugative 100-megadalton plasmid. *J Vet Med Sci* **54**:1091-1098.
71. **Ike, K., K. Kume, K. Kawahara, and H. Danbara.** 1990. Serotyping of O and pilus antigens of *Escherichia coli* strains isolated from chickens with coli-septicemia. *Nippon Juigaku Zasshi* **52**:1023-1027.
72. **Jacob F, P. D., Sánchez C, Monod J, Edelstein S.** 1960. The operon: a group of genes with expression coordinated by an operator. *C.R.Acad. Sci. Paris* **250**:1727-1729.
73. **Janben, T., C. Schwarz, P. Preikschat, M. Voss, H. C. Philipp, 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.
74. **Janßen, T.** 2002. Molekulare epidemiologische Untersuchungen aviärer pathogener *Escherichia coli* (APEC) – Wildtypstämme und Etablierung einer diagnostischen Multiplex-PCR. Freie Universität Berlin, Berlin.
75. **Jeurissen, S. H.** 1993. The role of various compartments in the chicken spleen during an antigen-specific humoral response. *Immunology* **80**:29-33.
76. **John, M., I. T. Kudva, R. W. Griffin, A. W. Dodson, B. McManus, B. Krastins, D. Sarracino, A. Progulske-Fox, J. D. Hillman, M. Handfield, P. I. Tarr, and S. B. Calderwood.** 2005. Use of *in vivo*-induced antigen technology for identification of

- Escherichia coli* O157:H7 proteins expressed during human infection. *Infect Immun* **73**:2665-2679.
77. **Johnson, J. R., P. Delavari, M. Kuskowski, and A. L. Stell.** 2001. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **183**:78-88.
78. **Johnson, J. R., A. Gajewski, A. J. Lesse, and T. A. Russo.** 2003. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as a cause of invasive nonurinary infections. *J Clin Microbiol* **41**:5798-5802.
79. **Johnson, T. J., S. Kariyawasam, Y. Wannemuehler, P. Mangiamele, S. J. Johnson, C. Doetkott, J. A. Skyberg, A. M. Lynne, J. R. Johnson, and L. K. Nolan.** 2007. The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *J Bacteriol* **189**:3228-3236.
80. **Johnson, T. J., K. E. Siek, S. J. Johnson, and L. K. Nolan.** 2006. DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. *J Bacteriol* **188**:745-758.
81. **Johnson, T. J., J. Skyberg, and L. K. Nolan.** 2004. Multiple antimicrobial resistance region of a putative virulence plasmid from an *Escherichia coli* isolate incriminated in avian colibacillosis. *Avian diseases* **48**:351-360.
82. **Jones, K. L., S. W. Kim, and J. D. Keasling.** 2000. Low-copy plasmids can perform as well as or better than high-copy plasmids for metabolic engineering of bacteria. *Metab Eng* **2**:328-338.
83. **Judson, N., and J. J. Mekalanos.** 2000. TnAraOut, a transposon-based approach to identify and characterize essential bacterial genes. *Nat Biotechnol* **18**:740-745.
84. **Kariyawasam, S., B. N. Wilkie, and C. L. Gyles.** 2004. Construction, characterization, and evaluation of the vaccine potential of three genetically defined mutants of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Dis* **48**:287-299.
85. **Kaspers, B., H. S. Lillehoj, and E. P. Lillehoj.** 1993. Chicken macrophages and thrombocytes share a common cell surface antigen defined by a monoclonal antibody. *Vet Immunol Immunopathol* **36**:333-346.
86. **Kay, W. W., and H. L. Kornberg.** 1971. The uptake of C4-dicarboxylic acids by *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **18**:274-281.

87. **Khare, S., M. K. Hondalus, J. Nunes, B. R. Bloom, and L. Garry Adams.** 2007. *Mycobacterium bovis* DeltaleuD auxotroph-induced protective immunity against tissue colonization, burden and distribution in cattle intranasally challenged with *Mycobacterium bovis* Ravenel S. Vaccine **25**:1743-1755.
88. **Kholtli, A., D. Charlier, D. Gigot, N. Huysveld, M. Roovers, and N. Glansdorff.** 1998. *pyrH*-encoded UMP-kinase directly participates in pyrimidine-specific modulation of promoter activity in *Escherichia coli*. J Mol Biol **280**:571-582.
89. **Kim, Y. R., S. E. Lee, C. M. Kim, S. Y. Kim, E. K. Shin, D. H. Shin, S. S. Chung, H. E. Choy, A. Progulske-Fox, J. D. Hillman, M. Handfield, and J. H. Rhee.** 2003. Characterization and pathogenic significance of *Vibrio vulnificus* antigens preferentially expressed in septicemic patients. Infect Immun **71**:5461-5471.
90. **Kirsch, D. R., and R. R. Whitney.** 1991. Pathogenicity of *Candida albicans* auxotrophic mutants in experimental infections. Infect Immun **59**:3297-3300.
91. **Klarsfeld, A. D., P. L. Goossens, and P. Cossart.** 1994. Five *Listeria monocytogenes* genes preferentially expressed in infected mammalian cells: *plcA*, *purH*, *purD*, *pyrE* and an arginine ABC transporter gene, *arpJ*. Mol Microbiol **13**:585-597.
92. **Kwaga, J. K., B. J. Allan, J. V. van der Hurk, H. Seida, and A. A. Potter.** 1994. A *carAB* mutant of avian pathogenic *Escherichia coli* serogroup O2 is attenuated and effective as a live oral vaccine against colibacillosis in turkeys. Infect Immun **62**:3766-3772.
93. **La Ragione, R. M., and M. J. Woodward.** 2002. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. Res Vet Sci **73**:27-35.
94. **Lafont, J. P., M. Dho, H. M. D'Hauteville, A. Bree, and P. J. Sansonetti.** 1987. Presence and expression of aerobactin genes in virulent avian strains of *Escherichia coli*. Infect Immun **55**:193-197.
95. **Lai, Y. C., H. L. Peng, and H. Y. Chang.** 2001. Identification of genes induced in vivo during *Klebsiella pneumoniae* CG43 infection. Infect Immun **69**:7140-7145.
96. **Lamarche, M. G., C. M. Dozois, F. Daigle, M. Caza, R. Curtiss, 3rd, J. D. Dubreuil, and J. Harel.** 2005. Inactivation of the *pst* system reduces the virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain. Infect Immun **73**:4138-4145.

97. **Lee, S. E., S. Y. Kim, C. M. Kim, M. K. Kim, Y. R. Kim, K. Jeong, H. J. Ryu, Y. S. Lee, S. S. Chung, H. E. Choy, and J. H. Rhee.** 2007. The *pyrH* gene of *Vibrio vulnificus* is an essential in vivo survival factor. *Infect Immun* **75**:2795-2801.
98. **Leung, K. Y., and B. B. Finlay.** 1991. Intracellular replication is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:11470-11474.
99. **Lewis, R. W.** 1953. An Outline of the Balance Hypothesis of Parasitism *The American Naturalist* **87**:273-281.
100. **Li, G.** 2005. Identification of avian pathogenic *E. coli* (APEC) crucial genes for the pathogenesis of *E. coli*-Septicemia in chickens by Signature-tagged transposon mutagenesis (STM). Freie Universität Berlin, Berlin.
101. **Li, G., C. Ewers, C. Laternus, I. Diehl, K. Alt, J. Dai, E. M. Antao, K. Schnetz, and L. H. Wieler.** 2008. Characterization of a *yjiQ* mutant of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Microbiology* **154**:1082-1093.
102. **Li, G., C. Laternus, C. Ewers, and L. H. Wieler.** 2005. Identification of genes required for avian *Escherichia coli* septicemia by signature-tagged mutagenesis. *Infect Immun* **73**:2818-2827.
103. **Lieberman, I., and A. Kornberg.** 1953. Enzymic synthesis and breakdown of a pyrimidine, orotic acid. I. Dihydro-orotic dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* **12**:223-234.
104. **Lindmark, D. G., and E. L. Jarroll.** 1982. Pyrimidine metabolism in *Giardia lamblia* trophozoites. *Mol Biochem Parasitol* **5**:291-296.
105. **Lun, Z. R., Q. P. Wang, X. G. Chen, A. X. Li, and X. Q. Zhu.** 2007. *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. *The Lancet infectious diseases* **7**:201-209.
106. **Lynne, A. M., S. L. Foley, and L. K. Nolan.** 2006. Immune response to recombinant *Escherichia coli* Iss protein in poultry. *Avian Dis* **50**:273-276.
107. **Lynne, A. M., J. A. Skyberg, C. M. Logue, C. Doetkott, S. L. Foley, and L. K. Nolan.** 2007. Characterization of a series of transconjugant mutants of an avian pathogenic *Escherichia coli* isolate for resistance to serum complement. *Avian Dis* **51**:771-776.
108. **Mackness, G. B.** 1962. Cellular resistance to infection. *J Exp Med* **116**:381-406.
109. **Mahan, M. J., J. M. Slauch, and J. J. Mekalanos.** 1993. Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science* **259**:686-688.

110. **Maier, T. M., R. Pechous, M. Casey, T. C. Zahrt, and D. W. Frank.** 2006. *In vivo Himar1*-based transposon mutagenesis of *Francisella tularensis*. *Appl Environ Microbiol* **72**:1878-1885.
111. **Makoff, A. J., and A. Radford.** 1978. Genetics and biochemistry of carbamoyl phosphate biosynthesis and its utilization in the pyrimidine biosynthetic pathway. *Microbiol Rev* **42**:307-328.
112. **Marc, D., P. Arne, A. Bree, and M. Dho-Moulin.** 1998. Colonization ability and pathogenic properties of a fim- mutant of an avian strain of *Escherichia coli*. *Res Microbiol* **149**:473-485.
113. **Marquis, H., H. G. Bouwer, D. J. Hinrichs, and D. A. Portnoy.** 1993. Intracytoplasmic growth and virulence of *Listeria monocytogenes* auxotrophic mutants. *Infect Immun* **61**:3756-3760.
114. **Mast, J., and B. M. Goddeeris.** 1998. CD57, a marker for B-cell activation and splenic ellipsoid-associated reticular cells of the chicken. *Cell Tissue Res* **291**:107-115.
115. **Mast, J., and B. M. Goddeeris.** 1999. Development of immunocompetence of broiler chickens. *Vet Immunol Immunopathol* **70**:245-256.
116. **Maurelli, A. T.** 1989. Temperature regulation of virulence genes in pathogenic bacteria: a general strategy for human pathogens? *Microb Pathog* **7**:1-10.
117. **McFarlane, W. D., H. L. Fulmer, and T. H. Jukes.** 1930. Studies in embryonic mortality in the chick: The effect of diet upon the nitrogen, amino-nitrogen, tyrosine, tryptophan, cystine and iron content of the proteins and on the total copper of the hen's egg. *Biochem J* **24**:1611-1631.
118. **Mellata, M., M. Dho-Moulin, C. M. Dozois, R. Curtiss, 3rd, P. K. Brown, P. Arne, A. Bree, C. Desautels, and J. M. Fairbrother.** 2003. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. *Infect Immun* **71**:536-540.
119. **Miller, J. F., J. J. Mekalanos, and S. Falkow.** 1989. Coordinate regulation and sensory transduction in the control of bacterial virulence. *Science* **243**:916-922.
120. **Miller, V. L.** 1995. Tissue-culture invasion: fact or artefact? *Trends Microbiol* **3**:69-71.

121. **Mintz, C. S., J. X. Chen, and H. A. Shuman.** 1988. Isolation and characterization of auxotrophic mutants of *Legionella pneumophila* that fail to multiply in human monocytes. *Infect Immun* **56**:1449-1455.
122. **Morris, M.** 1989. Poultry health issue. *Poultry Times*:11.
123. **Morrison, M. a. M. R. I.** 1997. Biosynthesis of Nitrogen-Containing Compounds, p. 451-456. *In* R. I. M. Brian A. White (ed.), *Gastrointestinal Microbiology*, vol. 1. Chapman and Hall, Ltd., New York.
124. **Moulin-Schouleur, M., M. Reperant, S. Laurent, A. Bree, S. Mignon-Grasteau, P. Germon, D. Rasschaert, and C. Schouler.** 2007. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *Journal of clinical microbiology* **45**:3366-3376.
125. **Mousslim, C., D. A. Cano, A. Flores, and J. Casadesus.** 2000. Regulation of septation: a novel role for SerC/PdxF in *Salmonella*? *Mol Gen Genet* **264**:184-192.
126. **Nagaraja, K. V., and C. B. Hamre.** 1992. International patent publication. patent W092-12.732.
127. **Neuhard, J., and R. A. Kelln.** 1996. Biosynthesis and conversions of pyrimidines, p. 580-599. *In* R. C. I. F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
128. **Nicoloff, H., A. Elagoz, F. Arsene-Ploetze, B. Kammerer, J. Martinussen, and F. Bringel.** 2005. Repression of the pyr operon in *Lactobacillus plantarum* prevents its ability to grow at low carbon dioxide levels. *J Bacteriol* **187**:2093-2104.
129. **Nolan, L. K., C. W. Giddings, S. M. Horne, C. Doetkott, P. S. Gibbs, R. E. Wooley, and S. L. Foley.** 2002. Complement resistance, as determined by viable count and flow cytometric methods, and its association with the presence of *iss* and the virulence of avian *Escherichia coli*. *Avian diseases* **46**:386-392.
130. **Nolan, L. K., S. M. Horne, C. W. Giddings, S. L. Foley, T. J. Johnson, A. M. Lynne, and J. Skyberg.** 2003. Resistance to serum complement, *iss*, and virulence of avian *Escherichia coli*. *Veterinary research communications* **27**:101-110.
131. **Ochman, H., and R. K. Selander.** 1984. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J Bacteriol* **157**:690-693.

132. **Okada, N., C. Sasakawa, T. Tobe, M. Yamada, S. Nagai, K. A. Talukder, K. Komatsu, S. Kanegasaki, and M. Yoshikawa.** 1991. Virulence-associated chromosomal loci of *Shigella flexneri* identified by random Tn5 insertion mutagenesis. *Mol Microbiol* **5**:187-195.
133. **Olson, E. R.** 1993. Influence of pH on bacterial gene expression. *Mol Microbiol* **8**:5-14.
134. **Osbourn, A. E., C. E. Barber, and M. J. Daniels.** 1987. Identification of plant-induced genes of the bacterial pathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* using a promoter-probe plasmid. *EMBO J* **6**:23-28.
135. **Pardee, A. B., and R. A. Yates.** 1956. Pyrimidine biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **221**:743-756.
136. **Parreira, V. R., and C. L. Gyles.** 2003. A novel pathogenicity island integrated adjacent to the *thrW* tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin. *Infect Immun* **71**:5087-5096.
137. **Payne, S. M.** 1993. Iron acquisition in microbial pathogenesis. *Trends Microbiol* **1**:66-69.
138. **Pechous, R., J. Celli, R. Penoske, S. F. Hayes, D. W. Frank, and T. C. Zahrt.** 2006. Construction and characterization of an attenuated purine auxotroph in a *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Infect Immun* **74**:4452-4461.
139. **Peighambari, S. M., R. J. Julian, and C. L. Gyles.** 2000. Experimental *Escherichia coli* respiratory infection in broilers. *Avian Dis* **44**:759-769.
140. **Perfect, J. R., D. L. Toffaletti, and T. H. Rude.** 1993. The gene encoding phosphoribosylaminoimidazole carboxylase (ADE2) is essential for growth of *Cryptococcus neoformans* in cerebrospinal fluid. *Infect Immun* **61**:4446-4451.
141. **Pfaff-McDonough, S. J., S. M. Horne, C. W. Giddings, J. O. Ebert, C. Doetkott, M. H. Smith, and L. K. Nolan.** 2000. Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis. *Avian Dis* **44**:23-33.
142. **Polissi, A., A. Pontiggia, G. Feger, M. Altieri, H. Mottl, L. Ferrari, and D. Simon.** 1998. Large-scale identification of virulence genes from *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **66**:5620-5629.

143. **Pourbakhsh, S. A., M. Boulianne, B. Martineau-Doize, C. M. Dozois, C. Desautels, and J. M. Fairbrother.** 1997. Dynamics of *Escherichia coli* infection in experimentally inoculated chickens. *Avian Dis* **41**:221-233.
144. **Pourbakhsh, S. A., M. Dho-Moulin, A. Bree, C. Desautels, B. Martineau-Doize, and J. M. Fairbrother.** 1997. Localization of the in vivo expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. *Microb Pathog* **22**:331-341.
145. **Quinn, C. L., B. T. Stephenson, and R. L. Switzer.** 1991. Functional organization and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* pyrimidine biosynthetic operon. *J Biol Chem* **266**:9113-9127.
146. **Rapley, R., Manning, David L.** 1998. RNA Isolation and Characterization Protocols. Humana Press, Inc., Totowa, New Jersey.
147. **Rediers, H., P. B. Rainey, J. Vanderleyden, and R. De Mot.** 2005. Unraveling the secret lives of bacteria: use of in vivo expression technology and differential fluorescence induction promoter traps as tools for exploring niche-specific gene expression. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**:217-261.
148. **Reischl, U.** 1996. Application of molecular biology-based methods to the diagnosis of infectious diseases. *Front Biosci* **1**:e72-77.
149. **Retallack, D. M., E. L. Heinecke, R. Gibbons, G. S. Deepe, Jr., and J. P. Woods.** 1999. The URA5 gene is necessary for histoplasma capsulatum growth during infection of mouse and human cells. *Infect Immun* **67**:624-629.
150. **Reynes, J. P., M. Tiraby, M. Baron, D. Drocourt, and G. Tiraby.** 1996. *Escherichia coli* thymidylate kinase: molecular cloning, nucleotide sequence, and genetic organization of the corresponding tmk locus. *J Bacteriol* **178**:2804-2812.
151. **Rhodes, J. C., and D. H. Howard.** 1980. Isolation and characterization of arginine auxotrophs of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **27**:910-914.
152. **Rodriguez-Siek, K. E., C. W. Giddings, C. Doetkott, T. J. Johnson, M. K. Fakhr, and L. K. Nolan.** 2005. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology* **151**:2097-2110.
153. **Rodriguez-Siek, K. E., C. W. Giddings, C. Doetkott, T. J. Johnson, and L. K. Nolan.** 2005. Characterizing the APEC pathotype. *Vet Res* **36**:241-256.

154. **Rollins, S. M., A. Peppercorn, L. Hang, J. D. Hillman, S. B. Calderwood, M. Handfield, and E. T. Ryan.** 2005. *In vivo* induced antigen technology (IVIAT). *Cell Microbiol* **7**:1-9.
155. **Rosenberger, J. K., P. A. Fries, S. S. Cloud, and R. A. Wilson.** 1985. *In vitro* and *in vivo* characterization of avian *Escherichia coli*. II. Factors associated with pathogenicity. *Avian Dis* **29**:1094-1107.
156. **Rosenow, E. C.** 1907. Human pneumococcal opsonin and the anti-opsonic substance in virulent pneumococci. *J. Infect. Dis.* **4**:285–296.
157. **Runyen-Janecky, L. J., S. A. Reeves, E. G. Gonzales, and S. M. Payne.** 2003. Contribution of the *Shigella flexneri* Sit, luc, and Feo iron acquisition systems to iron acquisition in vitro and in cultured cells. *Infection and immunity* **71**:1919-1928.
158. **Russo, T. A., C. D. McFadden, U. B. Carlino-MacDonald, J. M. Beanan, T. J. Barnard, and J. R. Johnson.** 2002. IroN functions as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infection and immunity* **70**:7156-7160.
159. **Sabri, M., M. Caza, J. Proulx, M. H. Lymberopoulos, A. Bree, M. Moulin-Schouleur, R. Curtiss, 3rd, and C. M. Dozois.** 2008. Contribution of the SitABCD, MntH, and FeoB metal transporters to the virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain chi7122. *Infect Immun* **76**:601-611.
160. **Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491.
161. **Sambandamurthy, V. K., S. C. Derrick, K. V. Jalapathy, B. Chen, R. G. Russell, S. L. Morris, and W. R. Jacobs, Jr.** 2005. Long-term protection against tuberculosis following vaccination with a severely attenuated double lysine and pantothenate auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **73**:1196-1203.
162. **Sambrook, J., Russell, DW., (ed.).** 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
163. **Sampson, S. L., C. C. Dascher, V. K. Sambandamurthy, R. G. Russell, W. R. Jacobs, Jr., B. R. Bloom, and M. K. Hondalus.** 2004. Protection elicited by a double leucine and pantothenate auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis* in guinea pigs. *Infection and immunity* **72**:3031-3037.

164. **Schubert, S., A. Rakin, H. Karch, E. Carniel, 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.
165. **Sharma, J. M.** 1999. Introduction to poultry vaccines and immunity. *Adv Vet Med* **41**:481-494.
166. **Sharma, J. M., and B. R. Burmester.** 1982. Resistance to Marek's disease at hatching in chickens vaccinated as embryos with the turkey herpesvirus. *Avian Dis* **26**:134-149.
167. **Shepherd, M. G.** 1985. Pathogenicity of morphological and auxotrophic mutants of *Candida albicans* in experimental infections. *Infect Immun* **50**:541-544.
168. **Singh, K. V., X. Qin, G. M. Weinstock, and B. E. Murray.** 1998. Generation and testing of mutants of *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model. *J Infect Dis* **178**:1416-1420.
169. **Sinowatz, I. R. a. F.** 1998. Lehrbuch der Embryologie der Haustiere, 2. Aufl. ed. Parey Verlag, Berlin, Hamburg.
170. **Skyberg, J. A., T. J. Johnson, J. R. Johnson, C. Clabots, C. M. Logue, and L. K. Nolan.** 2006. Acquisition of avian pathogenic *Escherichia coli* plasmids by a commensal *E. coli* isolate enhances its abilities to kill chicken embryos, grow in human urine, and colonize the murine kidney. *Infect Immun* **74**:6287-6292.
171. **Skyberg, J. A., T. J. Johnson, and L. K. Nolan.** 2008. Mutational and transcriptional analyses of an avian pathogenic *Escherichia coli* ColV plasmid. *BMC Microbiol* **8**:24.
172. **Slauch, J. M., and A. Camilli.** 2000. IVET and RIVET: use of gene fusions to identify bacterial virulence factors specifically induced in host tissues. *Methods Enzymol* **326**:73-96.
173. **Slauch, J. M., M. J. Mahan, and J. J. Mekalanos.** 1994. *In vivo* expression technology for selection of bacterial genes specifically induced in host tissues. *Methods Enzymol* **235**:481-492.
174. **Smith, H. E., H. Buijs, R. R. de Vries, H. J. Wisselink, N. Stockhofe-Zurwieden, and M. A. Smits.** 2001. Environmentally regulated genes of *Streptococcus suis*: identification by the use of iron-restricted conditions *in vitro* and by experimental infection of piglets. *Microbiology* **147**:271-280.

175. **Smith, H. W.** 1974. A search for transmissible pathogenic characters in invasive strains of *Escherichia coli*: the discovery of a plasmid-controlled toxin and a plasmid-controlled lethal character closely associated, or identical, with colicine V. *J Gen Microbiol* **83**:95-111.
176. **Smith, H. W., J. K. Cook, and Z. E. Parsell.** 1985. The experimental infection of chickens with mixtures of infectious bronchitis virus and *Escherichia coli*. *J Gen Virol* **66 (Pt 4)**:777-786.
177. **Smith, H. W., and S. Halls.** 1967. Studies on *Escherichia coli* enterotoxin. *J Pathol Bacteriol* **93**:531-543.
178. **Smith, T.** 1913. An attempt to interpret present-day uses of vaccines. *JAMA* **60**:1591–1599.
179. **Sojka, W. J. a. C., R.B.A.** 1961. *Escherichia coli* infection in poultry. *Research in Veterinary Science* **2**:340-352
180. **Stehling, E. G., T. A. Campos, M. Brocchi, V. A. de Carvalho Azevedo, and W. D. da Silveira.** 2008. The expression of plasmid mediated afimbrial adhesin genes in an avian septicemic *Escherichia coli* strain. *J Vet Sci* **9**:75-83.
181. **Stocki, S. L., L. A. Babiuk, N. A. Rawlyk, A. A. Potter, and B. J. Allan.** 2002. Identification of genomic differences between *Escherichia coli* strains pathogenic for poultry and *E. coli* K-12 MG1655 using suppression subtractive hybridization analysis. *Microb Pathog* **33**:289-298.
182. **Switzer, R. L., and D. C. Sogin.** 1973. Regulation and mechanism of phosphoribosylpyrophosphate synthetase. V. Inhibition by end products and regulation by adenosine diphosphate. *J Biol Chem* **248**:1063-1073.
183. **T. Janßen, D. H.-C., Philipp, Dr. Mathias Voß, Prof. Rudolph Preisinger und Prof. Lothar H. Wieler.** 2002. Die Multiplex-PCR ermöglicht erstmals den spezifischen und sensitiven Nachweis von aviären pathogenen *Escherichia coli* (APEC), p. 1-5. Lohmann Information. Cuxhaven.
184. **Theisen, M., and J. Neuhard.** 1990. Translational coupling in the *pyrF* operon of *Salmonella typhimurium*. *Mol Gen Genet* **222**:345-352.
185. **Tivendale, K. A., J. L. Allen, C. A. Ginns, B. S. Crabb, and G. F. Browning.** 2004. Association of *iss* and *iucA*, but not *tsh*, with plasmid-mediated virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **72**:6554-6560.

186. **Tonjum, T., and E. Seeberg.** 2001. Microbial fitness and genome dynamics. Trends in microbiology **9**:356-358.
187. **Valdivia, R. H., and S. Falkow.** 1996. Bacterial genetics by flow cytometry: rapid isolation of *Salmonella typhimurium* acid-inducible promoters by differential fluorescence induction. Mol Microbiol **22**:367-378.
188. **van den Hurk, J., B. J. Allan, C. Riddell, T. Watts, and A. A. Potter.** 1994. Effect of infection with hemorrhagic enteritis virus on susceptibility of turkeys to *Escherichia coli*. Avian Dis **38**:708-716.
189. **Van der Waaij, D., and D. W. van Bekkum.** 1967. Resident infection in laboratory animal colonies and their influences on experiments, p. 373-386. In M. L. Conalty (ed.), Husbandry of Laboratory animals. Proceedings of the 3rd international symposium organized by the International Committee on Laboratory Animals. Academic Press, London.
190. **Vandemaele, F., N. Bleyen, O. Abuaboud, E. vanderMeer, A. Jacobs, and B. M. Goddeeris.** 2006. Immunization with the biologically active lectin domain of PapGII induces strong adhesion-inhibiting antibody responses but not protection against avian pathogenic *Escherichia coli*. Avian Pathol **35**:238-249.
191. **Vandemaele, F., C. Ververken, N. Bleyen, J. Geys, C. D'Hulst, T. Addwebi, P. van Empel, and B. M. Goddeeris.** 2005. Immunization with the binding domain of FimH, the adhesin of type 1 fimbriae, does not protect chickens against avian pathogenic *Escherichia coli*. Avian Pathol **34**:264-272.
192. **Wakenell, P. S., and J. M. Sharma.** 1986. Chicken embryonal vaccination with avian infectious bronchitis virus. Am J Vet Res **47**:933-938.
193. **Watson, D. W., and C. A. Brandly.** 1949. Virulence and pathogenicity, p. 195–220. In S. R. C. E. Clifton, and H. A. Barker (ed.), Annual review of microbiology. Annual Reviews, Inc., Stanford, Calif.
194. **Weinberg, E. D.** 1978. Iron and infection. Microbiological reviews **42**:45-66.
195. **Weiser, J. N., and E. C. Gotschlich.** 1991. Outer membrane protein A (OmpA) contributes to serum resistance and pathogenicity of *Escherichia coli* K-1. Infect Immun **59**:2252-2258.
196. **Willinger, H.** 1992. *Enterobacteriaceae*-Infektionen, p. 97-110. In G. H. a. G. Monreal (ed.), Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels Band II. Gustav Fischer Verlag, Jena.

197. **Wong, S. M., and J. J. Mekalanos.** 2000. Genetic footprinting with mariner-based transposition in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A **97**:10191-10196.
198. **Wooley, R. E., P. S. Gibbs, T. P. Brown, and J. J. Maurer.** 2000. Chicken embryo lethality assay for determining the virulence of avian *Escherichia coli* isolates. Avian Dis **44**:318-324.
199. **Wooley, R. E., L. K. Nolan, J. Brown, P. S. Gibbs, C. W. Giddings, and K. S. Turner.** 1993. Association of K-1 capsule, smooth lipopolysaccharides, *traT* gene, and Colicin V production with complement resistance and virulence of avian *Escherichia coli*. Avian Dis **37**:1092-1096.
200. **Yamamoto, T., and P. Echeverria.** 1996. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. Infect Immun **64**:1441-1445.
201. **Yan, Y., and M. Demerec.** 1965. Genetic analysis of pyrimidine mutants of *Salmonella typhimurium*. Genetics **52**:643-651.
202. **Yoder, H. W., Jr., C. W. Beard, and B. W. Mitchell.** 1989. Pathogenicity of *Escherichia coli* in aerosols for young chickens. Avian Dis **33**:676-683.
203. **Zinsser, H.** 1914. Infection and resistance, p. 1–27. The Macmillan Company, New York, N.Y.

Mein herzlichster Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Wieler für seine hervorragende Betreuung, sein Verständnis und sein Vertrauen in meine Arbeit,

Herrn Dr. Ganwu Li für die Betreuung meiner Arbeit, seine Freundschaft sowie für seine Kritik,

Frau Dr. Ewers für ihre Unterstützung und wertvollen Ratschläge,

Frau Sabine Kießling für ihre hervorragende Einweisung in die molekular biologische Arbeitsweise und Beratung in technischen Angelegenheiten,

der H. Wilhelm Schaumann Stiftung für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit,

meinen lieben Schwiegereltern, Uta und Wolfgang Alt, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen,

Herrn Rainer Stahl für die Hilfe beim Korrekturlesen

und schließlich meinem geliebten Ehemann Moritz Alt für sein liebevolles Verständnis und seine Unterstützung sowie meinen drei wunderbaren Kindern, die mich immer daran erinnerten, wie wichtig mir auch die berufliche Seite des Lebens ist.

Selbständigkeitserklärung:

hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ausschließlich mit den aufgeführten Hilfsmitteln erstellt habe.

Berlin, den 17.07.2008

Katja Pamela Luarca de Alt