

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Bakterienstämme

In Tab. 3 und Tab. 4 sind alle *E. coli*-Isolate aufgelistet, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. Darunter befinden sich 15 Isolate weltweit vorkommender EPEC- und EHEC-Stämme, die aus durchfallerkrankten Menschen innerhalb eines Zeitraumes von etwa 60 Jahren isoliert wurden. Diese darmpathogenen *E. coli*-Stämme gehören epidemiologisch bedeutenden DEC-Klonen an, die den phylogenetischen Gruppen EPEC2 und EHEC2 zugeordnet wurden und bereits ausführlich in der Literatur beschrieben worden sind (165, 96). Weiterhin gehören der Stammaswahl 2 ebenfalls beschriebene, aus Durchfallgeschehen isolierte, humane EPEC-Stämme des Serovar O111ab:H25 an (144). Neben diesen humanen *E. coli*-Isolaten wurden 26 bovine, aus Durchfallgeschehen isolierte EHEC-Stämme aus Mitteleuropa untersucht (172). Allen humanen und bovinen *E. coli*-Stämmen ist der Besitz eines LEE gemeinsam. In Tab.5 sind die in der Arbeit mitgeführten Kontrollstämme aufgelistet.

Tab. 3 Liste der verwendeten humanen *Escherichia coli*-Stämme

Stamm	Serovar	Pathovar	DEC-Gruppe	Relevante Virulenzeigenschaften	Intimin-Typ	Quelle/Referenz
2198-77	O111:NM	EHEC	08A	<i>stx1</i> , LEE	unbekannt	(165, 123)
3030A-86	O111:H8	EHEC	08B	<i>stx1</i> , <i>stx2</i> , LEE	θ	(165, 156)
C130-53	O111:H11	EHEC	08D	LEE	unbekannt	(165)
3323-61	O26:H11	EHEC	09A	<i>stx1</i> , LEE	β	(165, 123)
2262-79	O26:NM	EHEC	09B	LEE	β	(165, 123)
C240-52	O26:NM	EHEC	09C	LEE	β	(165, 123)
45	O26:H11	EHEC	09E	<i>stx1</i> , LEE	β	(165, 123)
900105	O26:H11	EHEC	10E	<i>stx1</i> , LEE	β	(165, 123)
2254-75	O128:H2	EPEC	11A	LEE	β	(165, 123)
A9619-c2	O45:H2	EPEC	11C	LEE	β	(165, 123)
E335021	O128:H2	EPEC	11D	LEE	β	(165, 123)
2966-56	O111:H2	EPEC	12B	LEE	unbekannt	(165)
3942-67	O111:H2	EPEC	12C	LEE	β	(165, 123)
9101-83	O111:H2	EPEC	12D	LEE	β	(165, 123)
3291-86	O111:NM	EPEC	12E	LEE	β	(165, 123)
42	O111ab:H25	EPEC	-	LEE	unbekannt	(23, 144)
173	O111ab:H25	EPEC	-	LEE	unbekannt	(23, 144)

Tab. 4 Liste der verwendeten bovinen *Escherichia coli*-Stämme

Stamm	Serovar	Pathovar	Relevante Virulenzeigenschaften	Intimin-Typ	Quelle/Referenz
IHIT 0084	On.t.:Hn.t.	EHEC	<i>stx1</i> , <i>hly</i> _{EHEC} , LEE	β	(169, 166, 172)
303/89	O153:Hn.t.	EHEC	<i>stx1</i> , <i>hly</i> _{EHEC} , LEE	β	(169, 166, 172)
IHIT 5671	O145:Hn.t.	EHEC	<i>stx1</i> , <i>hly</i> _{EHEC} , LEE	β	(169, 166, 172)
72/90-56	O5:NM	EHEC	<i>stx1</i> , <i>hly</i> _{EHEC} , LEE	β	(169, 166, 172)
IHIT 2087	O26:H11	EHEC	<i>stx2</i> , <i>hly</i> _{EHEC} , LEE	β	(169, 166, 172)
RW1911	O118:H16	EHEC	<i>stx2c</i> , <i>hly</i> _{EHEC} , LEE	β	(169, 166, 172)
RW2297	O118:H16	EHEC	<i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>hly</i> _{EHEC} , LEE	β	(169, 166, 172)
IHIT 3641	O17,77:H18	EHEC	<i>stx1</i> , <i>hly</i> _{EHEC} , LEE	β	(169, 166, 172)
IHIT 2169	On.t.:H11	EHEC	<i>stx1</i> , <i>hly</i> _{EHEC} , LEE	β	(169, 166, 172)
IHIT 0578	O15:H11	EHEC	<i>stx1</i> , <i>hly</i> _{EHEC} , LEE	β	(169, 166, 172)
IHIT 0304	O145:H28	EHEC	<i>stx2</i> , <i>hly</i> _{EHEC} , LEE	γ	(169, 166, 172)
IHIT 0608	On.t.:Hn.t.	EHEC	<i>stx2bo</i> , <i>hly</i> _{EHEC} , LEE	θ	(169, 166, 172)
IHIT 0067	O84:NM	EHEC	<i>stx1</i> , <i>hly</i> _{EHEC} , LEE	ζ	(169, 166, 71)
IHIT 3000	O150:NM	EHEC	<i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>hly</i> _{EHEC} , LEE	ζ	(169, 66, 71)
IHIT 3669	O84:H2	EHEC	<i>stx1</i> , LEE	ζ	(169, 166, 71)
IHIT 1190	O92:NM	EHEC	<i>stx1</i> , <i>hly</i> _{EHEC} , LEE	ζ	(169, 166, 71)
IHIT 1968	O119:H25	EHEC	<i>stx1</i> , <i>hly</i> _{EHEC} , LEE	ζ	(169, 166, 71)
IHIT 0554	On.t.:NM	EHEC	<i>stx1</i> , <i>hly</i> _{EHEC} , LEE	ε1	(169, 166, 127)
IHIT 2430	O80:NM	EHEC	<i>stx1</i> , <i>hly</i> _{EHEC} , LEE	ε1	(169, 166, 127)
IHIT 2115	O4:NM	EHEC	<i>stx2</i> , <i>hly</i> _{EHEC} , LEE	ε1	(169, 166, 127)
RW1372	O103:H2	EHEC	<i>stx1</i> , <i>hly</i> _{EHEC} , LEE	ε	(169, 166, 172)
IHIT 1703	O111:H2	EHEC	<i>stx1</i> , <i>hly</i> _{EHEC} , LEE	unbekannt	(169, 166)
IHIT 0597	O157:NM	EHEC	<i>stx1</i> , <i>hly</i> _{EHEC} , LEE	η	(169, 166, 172)
IHIT 0072	O157:H7	EHEC	<i>stx2c</i> , <i>hly</i> _{EHEC} , LEE	γ	(169, 166, 172)

Tab. 5 Liste der verwendeten *Escherichia coli*-Kontrollstämme

Stamm	Serovar	Pathovar	Relevante Eigenschaften	Herkunft	Quelle/Referenz
E2348/69	O127:H6	EPEC	LEE, <i>bfpA</i>	Mensch	(93)
RW1374	O103:H2	EHEC	<i>stx1</i> , <i>hly</i> _{EHEC} , LEE	Rind	(169, 166, 69)
413/89-1	O26:H-	EHEC	<i>stx1</i> , <i>hly</i> _{EHEC} , LEE	Rind	(167, 14)
MG1655	-	K-12	F ⁻ λ-	-	(16)

Des weiteren wurden 7 *C. rodentium*-Stämme (Tab. 6) untersucht. Es handelt sich dabei um Stämme, welche aus jungen Mäusen isoliert wurden, die unter einer Hyperplasie des Dickdarms litten. Die Isolate wurden freundlicherweise von David B. Schauer (Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts, USA) zur Verfügung gestellt. Diese Stammaswahl enthält neben 6 bereits charakterisierten *C. rodentium*-Stämmen (ehemals *C. freundii* Biotyp 4280) auch einen mäusepathogenen *E. coli*-Stamm (MPEC), der dasselbe Krankheitsbild wie *C. rodentium* verursacht (90) und nach neueren Untersuchungen auch als *C. rodentium* klassifiziert werden sollte (110).

Tab. 6 Liste der verwendeten *Citrobacter rodentium*-Stämme

Stamm	Serovar	Beschreibung	Relevante Virulenzeigenschaften	Referenz/Quelle
DBS100	O152, O173:NM	ATCC 51459	LEE	(13)
DBS125	O152, O173:NM	UMC 1136-89	LEE	(134)
DBS126	O152, O173:NM	UMC 2896-81	LEE	(134)
CDC1843-73	O56, O57,X13:NM	ATCC 51116	LEE	(19)
CDC2643-76	O152, O173:NM	ATCC 51637	LEE	(19)
CDC3311-75	O152, O173:NM	ATCC 51638	LEE	(19)
MPEC	O152, O173:NM	<i>E. coli</i> O115a,c:K(B) Stamm Ex-33	LEE	(63)

Die in Tab. 7 aufgelisteten *Hafnia alvei*-Stämme, die nach neuesten Untersuchungen als *Escherichia alvei* klassifiziert werden (65), wurden aus durchfallerkranken Kindern in Bangladesch isoliert (4, 5) und freundlicherweise von M. John Albert (Faculty of Veterinary Medicine University of Helsinki, Finnland) zur Verfügung gestellt.

Tab. 7 Liste der verwendeten *Escherichia alvei*-Stämme

Stamm	Relevante Virulenzeigenschaften	Quelle/Referenz
10457	<i>eae</i>	(5)
10790	<i>eae</i>	(5)
12502	<i>eae</i>	(5)
19982	<i>eae</i>	(4)
9194	<i>eae</i>	(5)

3.1.2 Plasmidvektoren und *Escherichia coli*-Laborstämme

In Tab. 8 sind die Plasmidvektoren und *E. coli*-Laborstämme aufgelistet, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Tab. 8 Liste der verwendeten Plasmidvektoren und *Escherichia coli*-Laborstämme

Plasmid bzw. K12-Stamm	Größe	Relevante Eigenschaften	Referenz
pSG76-A	2340 bp	Klonierungsvektor (Amp ^r , R6K γ -ori, FRT)	(114)
pSG76-C	1916 bp	Klonierungsvektor (Cm ^r , R6K γ -ori, FRT)	(114)
pST76-A	3159 bp	Klonierungsvektor (Amp ^r , pSC101 ori, Rep ^{ts} , FRT)	(114)
pST76-C	3421 bp	Klonierungsvektor (Cm ^r , pSC101 ori, Rep ^{ts} , FRT)	(114)
pUC19	2686 bp	Klonierungsvektor (Amp ^r , ColE1-ori)	(68)
TrueBlue®-BAC2	7289 bp	Klonierungsvektor (Cm ^r , <i>lacZ</i> α , S ori)	(141)
MG1655	-	F ⁻ λ -	(16)
DH5 α	-	F ⁺ Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_K-m_K</i>) <i>supE44</i> λ - <i>thi-1 gyrA relA1</i>	(121)

Das Plasmid pSG76-A/-C besitzt ein R6K γ -ori (150), der das Π -Protein zur Replikation benötigt. Dieses Plasmid repliziert deshalb nur in Wirten, die Π exprimieren [SY327 (λ *pir*)] oder in Bakterienstämmen, die Π unter Verwendung eines Helferplasmids exprimieren (pPIR-K) können. pST76-A/-C und pPIR-K besitzen das pSC101^{ts} Replikations-System (8), das temperaturabhängig eine Replikation bei 30 °C nicht aber bei Temperaturen >37 °C ermöglicht.

3.1.3 Eukaryotische Zellkulturen

Zur Durchführung eines Adhäsionstests wurden eukaryotische HEp2-Zellkulturen verwendet. HEp2 ist eine adhärenente Zelllinie, die aus einem humanem Larynxkarzinom stammt (31).

3.1.4 Geräte

200 mm-Elektroporations-Küvetten	peQlab, Erlangen
24-Loch-Platte	NUNC™ Brand Products, Dänemark
Brutschränke	Heraeus, Typ B6060
Cryo-Röhrchen	Cryovial®, Roth GmbH & Co., Karlsruhe; Greiner Bio-One
Deckgläser (60 x 24 mm)	Menzel-Gläser
Deckgläser (Ø 12 mm)	Superior; Marienfeld
Deckgläser (Ø 25 mm)	Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Digitalkamara DC 300F	Leica Microsystems AG
Elektrophoresekammern	AGS; Hybaid; MWG
Elektroporator	peQlab, Erlangen
Epi-Fluoreszenz-Mikroskop	Leica DMLB
Film (inkl. Negativ)	Polaroid Polapan 665PN ISO 80/20°
Filmkassetten	Kodak BioMax Cassette
Fluorometer	Hoefer DyNA Quant TM 200
Folien-Vakuum-Schweißautomat	Tronic [®]
Hybridisierungsofen	Hybaid
Kühlzentrifuge	Sigma 3K30
Mikroskop	ID03; Zeiss
Objektträger (76 x 26 mm)	Menzel-Gläser
pH-Meter	Knick 766 Calimatic
Photo-Kamera	Polaroid MP4+ Instant Camera System
Photospektrometer	Amersham Pharmacia Biotech Ultraspec [®] 3000 pro
Pipetten	Eppendorf Research
Pulsfeldgelelektrophorese- kammer	Rad Chef-DR [®] III System; Electrophoresis Cell; BioRad-Cooling Module
Reaktionsgefäße (0,2 – 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (12, 5 – 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH
Röntgenfilme	Kodak X-OMAT AR
Schüttler	IKA Labortechnik KS 250 basic
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific, C 24 Incubator Shaker
Spannungsgerät	Hybaid PS 250
Sterilwerkbank	Steag Laminarflow-Prozßtechnik; Heraeus Instruments HB2448
Thermocycler	Touchdown, Hybaid
Thermodrucker	Herolab; Video Graphic Printer UP 890 CE
Tischzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415D
Transilluminator	Herolab; E.A.S.Y. 429K; ICU-1; Video-Graphik Printer UP 890 CE
UV-Tisch	Biometra TI 1
Vortexer	IKA MS2 Minishaker
Waage	Sartorius LA 230S und BP 2100

Wärmeschrank	WTC Binder
Wasserbäder	Julabo; Th. Karow GmbH
Zählkammer	Neubauer
Zellkulturflaschen (250ml)	Greiner Bio-One GmbH
Zentrifuge	Hettich Universal K2S

3.1.5 Chemikalien, Nährmedien und Lösungen

3.1.5.1 Chemikalien

Folgende Kits wurden von den nachfolgenden Firmen bezogen:

- MasterPure™ Genomic DNA Purification Kit Epicentre, Biozym, Hessisch Oldendorf
- High Pure™ PCR Product Purification Kit Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
- High Pure Plasmid Isolation Kit Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Agarose Gel DNA Extraction Kit Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- PCR DIG Probe Synthesis Kit Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- DIG Luminescent Detection Kit Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
- QIAGEN® Plasmid Midi Kit (25) QIAGEN, Hilden
- QIAGEN® Plasmid Maxi Kit (25) QIAGEN, Hilden
- Roti®-Elutions-Kit Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Die Enzyme und Primer stammen von folgenden Firmen:

Life Technologies™, Karlsruhe, New England Biolabs® GmbH, Schwalbach/Taunus, Promega GmbH, Mannheim, Stratagene, Amsterdam (NL) und MWG Biotech, Ebersberg

Bezugsfirmen für weitere in dieser Arbeit verwendete organische und anorganische Reagenzien waren Acila GMNmbH, Walldorf, BioRad, München, Fluka, Hannover, Invitrogen, Groningen (NL), Merck AG, Darmstadt, Oxoid Unipath GmbH, Wesel, Roth® GmbH & Co., Karlsruhe, Serva, Heidelberg, Sigma®, Deisenhofen

3.1.5.2 Nährmedien

- 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

- Peptonwasser	Pepton	10,00 g/l
	NaCl	5,00 g/l
	Na ₂ PO ₄	3,50 g/l
	KH ₂ PO ₄	1,50 g/l
		pH 7,2±0,2

autoklaviert bei 121 °C, 15 min

- SOC-Medium	Trypton	20,00 g/l
	Hefeextrakt	5,00 g/l
	NaCl	0,50 g/l
	250 mM KCl	10,00 ml
	5 N NaOH	0,20 ml
		pH 7,0

autoklaviert bei 121 °C, 15 min
abkühlen auf 60 °C

anschließend Zugabe von autoklaviertem 2 M MgCl₂ (5,00 ml) und steril filtrierter 1 M Glucose (20,00 ml)

3.1.5.3 Lösungen

3.1.5.3.1 Lösungen für die Agarosegelelektrophorese (DNS)

- TBE-Puffer Stamm-Lösung (10 x konz.)	Tris	890 mM	107,82 g
	Borsäure	890 mM	55,03 g
	EDTA-Lsg. pH 8,0	500 mM	18,62 g
	eingestellt mit NaOH		auf 100 ml
			davon 40 ml auf 1000 ml A. bidest
- Stop-Lösung	Formamid		9,50 ml
	EDTA-Lsg. pH 8,0	500 mM	0,40 ml
	Bromphenolblau		5,00 mg
	Xylencyanol FF		5,00 mg
	A. bidest		0,100 ml
- Agarose	Agarose		0,70 g auf 100 ml 1 x TBE
- Ethidiumbromidlösung 1%			

3.1.5.3.2 Lösungen für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

- 10 x PCR buffer¹	Tris-HCl, pH 8,4 KCl	200 mM 500 mM
- Taq DNA Polymerase¹		5 U/μl
- Magnesium Chlorid Solution¹		50 mM
- dNTP²	PCR Nucleotide Mix: dATP, dCTP, dGTP, dTTP	each dNTP 10 mM

¹ GIBCO BRL®, Life Technologies

² Promega Corporation

- 10 x Herculase™ buffer ¹		
- Herculase™ Enhanced DNA Polymerase ¹		5 U/μl
- dNTP ²	PCR Nucleotide Mix: dATP, dCTP, dGTP, dTTP	each dNTP 10 mM

¹ STRATAGENE®

² Promega Corporation

3.1.5.3.3 Lösungen für die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

- ESP-Puffer	EDTA Sarcosyl pH 9,5 eingestellt mit NaOH Proteinase K	500 mM 3,4 mM	18,62 g 1,00 g auf 100 ml A. bidest 1,80 mg/ml
- TE Puffer	Tris EDTA pH 7,5	10 mM 10 mM	1,21 g 3,72 g auf 1000 ml A. bidest
- TBE-Puffer Stamm-Lösung (10 x konz.)	Tris Borsäure EDTA-Lsg. pH 8,0 eingestellt mit NaOH	890 mM 890 mM 500 mM	107,81 g 55,03 g 18,62 g auf 100 ml davon 40 ml auf 1000 ml A. bidest.
- Enzympuffer für XbaI ¹	Tris-HCl, pH 8,0 NaCl MgCl ₂	50 mM 50 mM 10 mM	0,60 g 0,30 g 0,10 g auf 100 ml A. bidest

¹ GIBCO BRL®, Life Technologies

- Enzympuffer für <i>NotI</i>¹	Tris-HCl, pH 8,0	50 mM	0,60 g
	NaCl	100 mM	0,58 g
	MgCl ₂	10 mM	0,10 g
			auf 100 ml A. bidest

¹ GIBCO BRL[®], Life Technologies

- Enzympuffer für <i>NheI</i>¹	Tris-HCl, pH 7,9	10 mM	0,12 g
	NaCl	50 mM	0,30 g
	MgCl ₂	10 mM	0,10 g
	DTT	1 mM	0,02 g
			auf 100 ml A. bidest
	Bovines Serum Albumin		0,1 mg/ml

¹ NEW ENGLAND BioLabs[®] Inc.

3.1.5.3.4 Lösungen für das Kapillar-Blot-Verfahren (Southern-Blot)

- Depurinierungslösung	HCl	250 mM	10,80 ml auf 500 ml HCl
- Denaturierungslösung	NaCl	1,5 M	87,66 g
	NaOH	500 mM	20 g
			auf 1000 ml A. bidest
- Neutralisierungslösung	Tris-HCl, pH 7,5	500 mM	60,57 g
	NaCl	3 M	175,32 g
			auf 1000 ml A. bidest
- SSC (20 x)	Na-Citrat	300 mM	88,23 g
	NaCl	3 M	175,32 g
	pH 7, eingestellt mit HCl		
			auf 1000 ml A. bidest

3.1.5.3.5 Lösungen für die DNS-DNS-Hybridisierung

Zusammensetzung der Lösungen unter Verwendung des DIG Luminscent Detection Kit (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim)

- Maleinsäure-Puffer	Maleinsäure	100 mM	11,6 g
	NaCl	150 mM	8,8 g
	pH 7,5, 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 bis 65 °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
	NaCl	3 M	175,32 g
	pH 7, eingestellt mit HCl		auf 1000 ml A. bidest
- Hybridisierungspuffer	SSC (5 x)	20 x	12,50 ml
	BRSS (1 %)	10 x	5,00 ml
	N-Lauroylsarcosine (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
- Stringenz II	SSC (0,5 x)	20 x	10,00 ml
	SDS (0,1 %)	10 %	4,00 ml
			auf 400 ml A. bidest

- Waschpuffer 1	Maleinsäurepuffer		100 ml
	Tween [®] 20	0,3 %	0,30 ml
- Blocking Solution (1 x)	BRSS	10 x	10,00 ml
			auf 100 ml Maleinsäurepuffer
- Detektionpuffer	Tris	100 mM	12,11 g
	NaCl	100 mM	5,84 g
	pH 9,5, eingestellt mit HCl		
- Strippingpuffer	NaOH	200 mM	4,00 g
	SDS (0,1 %)	10 %	5,00 ml
			auf 500 ml A. bidest

Das Anti-Dig-AP Konjugat sowie die CSPD[®] Lösung wurden entsprechend den Angaben des DIG Luminescent Detection Kit (Boehringer Mannheim, Mannheim) verdünnt und eingesetzt.

3.1.5.3.6 Lösungen für den Fluoreszenz-Aktin-Färbungstest (FAS-Test)

- RPMI-1640-Medium	Fetales Kälberserum	2 %	50 ml
	L-Glutamin (100 x)	1 mM	5 ml
	nicht-essentielle Aminosäuren	0,1 mM	5 ml
	Hepes	14 mM	1,4 ml
	Gentamicin	10 mg/ml	2,5 ml
	Amphotericin	25 µg/ml	5 ml
			auf 500 ml RPMI-1640-Medium pH 7,4
- Hepes-Puffer	NaCl	135 mM	8,00 g/l
	KCl	4 mM	0,30 g/l
	Hepes	10 mM	2,38 g/l
	Glukose	11 mM	2,00 g/l
	pH 7,55		

- Phosphate-Buffered-Saline (PBS)	NaCl	135 mM	8,00 g/l
	KCl	3 mM	0,20 g/l
	KH ₂ PO ₄	15 mM	2,00 g/l
	NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	55 mM	9,70 g/l
	pH 7,2		
			auf 1000 ml A. bidest

3.1.5.3.7 Lösungen für die Ligation

- 5 x T4 DNA Ligase Buffer¹	Tris-HCl, pH 7,6		250 mM
	MgCl ₂		50 mM
	ATP		5 mM
	DTT		5 mM
	Polyethylenglycol-8000		25 % (w/v)
- T4 DNA Ligase²			1 U/μl

¹ GIBCO BRL®, Life Technologies

² Invitrogen®, Life Technologies

3.1.5.3.8 Lösungen für die Restriktion von DNS

- Enzympuffer für <i>EcoRI</i>¹	Tris-HCl, pH 8,0	50 mM	0,60 g
	NaCl	100 mM	0,58 g
	MgCl ₂	10 mM	0,10 g
			auf 100 ml A. bidest

¹ GIBCO BRL®, Life Technologies

- Enzympuffer für <i>BamHI</i>¹	Tris-HCl, pH 8,0	50 mM	0,60 g
	NaCl	100 mM	0,58 g
	MgCl ₂	10 mM	0,10 g
			auf 100 ml A. bidest

¹ GIBCO BRL®, Life Technologies

- Enzympuffer für <i>NheI</i>¹	Tris-HCl, pH 7,9	10 mM	0,12 g
	NaCl	50 mM	0,30 g
	MgCl ₂	10 mM	0,10 g
	DTT	1 mM	0,02 g
	Bovines Serum Albumin		A. bidest 0,1 mg/ml

¹ NEW ENGLAND BioLabs® Inc.

3.1.6 Oligonukleotid-Primer und Sonden

3.1.6.1 Oligonukleotid-Primer für die PCR-Amplifikation

Sämtliche Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma MWG Biotech, Ebersberg synthetisiert und sind in Tab. 9 aufgelistet.

Tab. 9 Überblick über Sequenzen und Spezifitäten sämtlicher in der Arbeit verwendeter Oligonukleotid-Primer

Primer	Primersequenz (5' – 3')	Zielregion	Referenz
ECW1	TGCGGCACAACAGGCGGCGA	495-514 bp in konservierter Region (5'-Ende) des <i>eae</i>	(60)
ECW2	CGGTCCGCGCACCAGGATTC	1004-1123 bp in konservierter Region (5'-Ende) des <i>eae</i>	(60)
C1zyc	GGTTAACAGTTCGTGGGTGAA	301 bp stromaufwärts vom <i>pheU</i> 5'-Ende	(127)
4750PUr	GCTTTATGGATGCTGAAACCT	751 bp stromaufwärts vom <i>pheU</i> 5'-Ende	(127)
3171PUd	TCGCCACTGTGTTGAGCAAAG	733 bp stromabwärts vom <i>pheU</i> 3'-Ende	(127)
C2dac	GAACGGCGACTGATGAGATTT	287 bp stromabwärts vom <i>pheU</i> 3'-Ende	(127)
U2leftpheV	AACGGCGATAAGCGAGAG	987 bp stromaufwärts vom <i>pheV</i> 5'-Ende	(127)
L520leftpheV	GCGCAAAACAGGACAATAATC	490 bp stromaufwärts vom <i>pheV</i> 5'-Ende	(127)
MRV6063U	CGGGCACCACGAATTCTTAAGAACCCGCCACA	24 bp stromabwärts vom <i>pheV</i> 3'-Ende	(127)
MRV6671L	AAGCCGTGGCGGATCCTGGCTGGCACAACACCT	600 bp stromabwärts vom <i>pheV</i> 3'-Ende	(127)
pST76Ccm1	CATTAAGCATTCTGCCGACA	Chloramphenicol-Gen	diese Arbeit
pST76Ccm2	CAGACCGTTCAGCTGGATATTA	Chloramphenicol-Gen	diese Arbeit

Tab. 9 (Fortsetzung)

Primer	Primersequenz (5' – 3')	Zielregion	Referenz
LEECitr5343U	TAATGACCATTGGCTCACA	5343 bp stromabwärts vom LEE _{DBS100} 5'-Ende	diese Arbeit
LEECitr6002L	GTTTGCACACATAATTGAACAA	6002 bp stromabwärts vom LEE _{DBS100} 5'-Ende	diese Arbeit
K295	CGCCGATTTTTCTTAGCCCA	<i>selC</i> flankierende Region	(93)
K296	CATTCTGAAACAAACTGCTC	linkes Ende der LEE-PAI _{<i>selC</i>}	(93)
K255	GGTTGAGTCGATTGATCTCTGG	rechtes Ende der LEE-PAI _{<i>selC</i>}	(93)
K260	GAGCGAATATTCCGATATCTGGTT	<i>selC</i> flankierende Region	(93)
K261	CCTTGCAAATAAACACGGCGCAT	<i>selC</i> flankierende Region	(93)
cadC2	AAATCTCATCAGTCGCCGTTT	267 bp stromabwärts vom <i>pheU</i> 3'-Ende	(127)
cycZ-1	TTCACCCACGAACTGTTAACC	287 bp stromaufwärts vom <i>pheU</i> 5'-Ende	(127)
4945PVd	ACTTCACCGCATGAGCAGTAA	1031 bp stromaufwärts vom <i>pheV</i> 5'-Ende	(127)
6229PVr	GTGCAGCGGCTGGAGTTTGGGA	158 bp stromabwärts vom <i>pheV</i> 3'-Ende	(127)
1484c308	CCATTGTGTGGGTATAATTGCGGG	7 bp stromabwärts vom linken <i>pheV</i> -PAI-Ende	(127)
EInt1	CAGCTTATCAGAATTCAACAAAGCAAC	5'-Ende des <i>eae</i> -Gens	diese Arbeit
BaInt1	GGTATCGCTGGGATCCAGGCTTCGTCA	5'-Ende des <i>eae</i> -Gens	diese Arbeit
help2mr	GGCCGCCCGACTGATACGTTG	pST76-A/-C spezifischer Primer	diese Arbeit
help3	TAAACCAGCCAGCCGGAAGGG	pST76-A/-C spezifischer Primer	diese Arbeit
MLV5018U	GAGATGGCGTGAATTCGGCAAACCTCCGTACAGA	<i>pheV</i> 5'-Ende flankierende Region	diese Arbeit
MLV5914L	TCAATTTACTGGATCCTGCACAATCTATCATCA	<i>pheV</i> 5'-Ende flankierende Region	diese Arbeit
MRV6090U	CCCACAAGGCGAATTCTTGCTTTTGGATCTGAC	<i>pheV</i> 3'-Ende flankierende Region	diese Arbeit
MRV6951L	AGCGATAGCCGGATCCCTGAAATCAGCGTCACT	rechte <i>pheV</i> flankierende Region	diese Arbeit
pSG76A1	CGCTGTTGAGATCCAGTTCGAT	Ampicillin-Gen	diese Arbeit
pSG76A2	TAACGCACTGAGAAGCCCTTAG	Ampicillin-Gen	diese Arbeit

Tab. 9 (Fortsetzung)

Primer	Primersequenz (5' – 3')	Zielregion	Referenz
F12	GAATCTTGACCGCGAAATCTG	753 bp stromaufwärts vom rechten <i>pheV</i> -PAI-Ende	(127)
F13	CAGTGTAAGAGGACTATGAAG	304 bp stromaufwärts vom rechten <i>pheV</i> -PAI-Ende	(127)
F14rc	CAGGTCTGGATAGATCCGG	<i>pheV</i> -Region	diese Arbeit
Merge1	CGGAGCGTTAGCGATGTAA	rechtes Ende der LEE-PAI _{RW1374}	diese Arbeit
Merge2	AAATTGGTGGTTGATAAGCGAG	pST76-C-spezifisch	diese Arbeit
Merge3	TCACCGTCTTTCATTGCCATA	pST76-C-spezifisch	diese Arbeit
Merge4	TGATGATTCTGCCGATATTGCT	<i>pheV</i> 3'-Ende flankierende Region	diese Arbeit
9900L	AACCGTCGGAGGATCCATCATCGGCAGTTTTTT	<i>pheV</i> 3'-Endeflankierende Region	diese Arbeit
2642U	TTTTTATTCTGAATTCAACACATAACCGTACAA	<i>pheV</i> 5'-Ende flankierende Region	diese Arbeit

In Tab. 10 sind die Oligonukleotid-Primerpaare und Reaktionsbedingungen der Polymerase-Kettenreaktionen aufgelistet, die dem Nachweis des Intimin-Gens (*eae*) sowie dem Nachweis einer PAI-Insertion in den tRNS-Genen *selC*, *pheU* und *pheV* dienen.

Tab. 10 Reaktionsbedingungen der Polymerase-Kettenreaktionen zum Nachweis des Intimn-Gens (*eae*) und des Insertionsortes einer LEE-Pathogenitätsinsel innerhalb der tRNS-Loci *selC*, *pheU* und *pheV*

Gen	Primer	Reaktionsbedingungen			Amplifikat (bp)
		Denaturierung	Anlagerung	Amplifizierung	
<i>eae</i>	ECW1 s / ECW2 as	94 °C, 60''	59,8 °C, 120''	72 °C, 180''	629
<i>selC</i>	K295 s / K296 as	94 °C, 60''	55,0 °C, 120''	72 °C, 180''	405
<i>selC</i>	K255 s / K260 as	94 °C, 60''	55,0 °C, 120''	72 °C, 180''	418
<i>selC</i>	K295 s / K260 as	94 °C, 60''	55,0 °C, 120''	72 °C, 180''	2173
<i>selC</i>	K261 s / K260 as	94 °C, 60''	55,0 °C, 120''	72 °C, 180''	527
<i>pheU</i>	cadC2 s / cycZ1 as	94 °C, 60''	57,2 °C, 120''	72 °C, 180''	664
<i>pheU</i>	1484c308 s / cycZ1 as	94 °C, 60''	57,4 °C, 120''	72 °C, 180''	518
<i>pheV</i>	6229PVr s / 4945PVd as	94 °C, 60''	57,3 °C, 120''	72 °C, 180''	1305
<i>pheV</i>	1484c308 s / 4945PVd as	94 °C, 60''	57,5 °C, 120''	72 °C, 180''	1268

s = sense

as = antisense

3.1.6.2 Oligonukleotid-Sonden für die DNS-DNS-Hybridisierung

Alle verwendeten DNS-Sonden, die in Tab. 11 aufgelistet sind, wurden mit Hilfe des „PCR DIG Probe Synthesis Kit“ hergestellt. Die Polymeraseketten-Reaktionen (Tab. 12) wurden entsprechend den Herstellerangaben des o.g. Kits durchgeführt.

Tab. 11 Überblick über Sequenzen und Spezifitäten der verwendeten DNS-Sonden

Primer	Primersequenz (5' – 3')	Zielregion	Referenz
ECW1 s ECW2 as	TGCGGCACAACAGGCGGCGA CGGTCGCCGCACCAGGATTC	<i>eae</i> -Gen (495-1123 bp)	(60)
C1zyc s 4750PUr as	GGTTAACAGTTCGTGGGTGAA GCTTTATGGATGCTGAAACCT	<i>pheU</i> 5'-Ende flankierende Region	(127)
3171PUd s C2dac as	TCGCCACTGTGTTGAGCAAAG GAACGGCGACTGATGAGATTT	<i>pheU</i> 3'-Ende flankierende Region	(127)
U2leftpheV s L520leftpheV as	AACGGCGATAAGCGAGAG GCGCAAAACAGGACAATAATC	<i>pheV</i> 5'-Ende flankierende Region	(127)
MRV6671L s MRV6063U as	AAGCCGTGGCGGATCCTGGCTGGCACAACACCT CGGGCACCACGAATTCTTAAGAACCCGCCACA	<i>pheV</i> 3'-Ende flankierende Region	(127)
pST76Ccm2 s pST76Ccm1 as	CAGACCGTTCAGCTGGATATTA CATTAAGCATTCTGCCGACA	<i>Cm</i> -Gen des Plasmids pST76-C	diese Arbeit
LEECitr6002L s LEECitr5343U as	GTTTGCACACATAATTGAACAA TAATGACCATTGGCTCACA	LEE _{DBS100}	diese Arbeit

s = sense

as = antisense

Tab. 12 Reaktionsbedingungen der Polymerase-Kettenreaktionen zur Generierung der DNS-Sonden

Gen	Primer	Reaktionsbedingungen			Amplifikat (bp)
		Denaturierung	Anlagerung	Amplifizierung	
<i>eae</i>	ECW1 s / ECW2 as	94 °C, 60''	59,8 °C, 120''	72 °C, 180''	629
<i>pheU</i> flankierend	C1zyc s / 4750PUr as	94 °C, 60''	56,1 °C, 120''	72 °C, 180''	491
<i>pheU</i> flankierend	3171PUd s / C2dac as	94 °C, 60''	53,1 °C, 120''	72 °C, 180''	487
<i>pheV</i> flankierend	U2leftpheV s / L520leftpheV as	94 °C, 60''	55,4 °C, 120''	72 °C, 180''	536
<i>pheV</i> flankierend	MRV6063U s / MRV6671L as	94 °C, 60''	63,7 °C, 120''	72 °C, 180''	641
<i>Cm</i>	pST76Ccm2 s / pST76Ccm1 as	94 °C, 60''	55,2 °C, 120''	72 °C, 180''	517
LEE _{DBS100}	LEECitr6002L s / LEECitr5343U as	94 °C, 60''	50,1 °C, 120''	72 °C, 180''	681

s = sense

as = antisense

3.2 Methoden

3.2.1 Lagerung und Kultivierung

Die Anzucht der Bakterienstämme erfolgte ausgehend von einer Stammsammlung (Glycerinstock, -70 °C) auf LB-Agarplatten bei 37 °C (ü.N.). Die anschließende Lagerung der ausgestrichenen Stämme erfolgte im Kühlschrank (+4 °C).

Zur Kultivierung von *E. coli*-Stämmen mit rekombinanten Plasmiden wurde das Medium je nach vorhandenem Plasmid mit folgenden Antibiotikakonzentrationen supplementiert:

pUC19	50 µg Ampicillin je ml
pSG76-A	50 µg Ampicillin je ml
pST-76-A	50 µg Ampicillin je ml
pSG76-C	12,5 µg Chloramphenicol je ml
pST76-C	12,5 µg Chloramphenicol je ml
TrueBlue®-BAC2	12,5 µg Chloramphenicol je ml

Die Kultivierung der im Fluoreszenz-Aktin-Färbungstest (FAS-Test) eingesetzten Bakterienstämme erfolgte 18 Stunden vor dem Test in Peptonwasser.

Um Bakterienstämme neu zu konservieren, wurden in einem Reagenzröhrchen in 5 ml LB-Medium jeweils eine Kolonie einer ü.N. bebrüteten LB-Agarplatte angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Von dieser Bakterienkultur wurde 1,3 ml entnommen, mit 0,5 ml Glycerin (Rotipuran®, Glycerol, Roth GmbH & Co., Karlsruhe) vermischt und in einem 2 ml Cryo-Röhrchen bei -70° C gelagert.

Die Lagerung der eukaryotischen Zellen, die mit 10 % DMSO versetzt wurden, erfolgte in einem Cryo-Röhrchen in flüssigem Stickstoff bei -198 °C. Eingefrorene HEp2-Zellen wurden bei 37 °C aufgetaut. Nach Aufnahme in 10 ml eines auf 37 °C vorgewärmten Erhaltungsmediums (RPMI 1640-Medium) wurden sie 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 20 ml Erhaltungsmedium aufgenommen. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 5 %-iger CO₂-Spannung in wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert.

3.2.2 DNS-Isolierung

3.2.2.1 Gewinnung genomischer DNS

MasterPure™ Genomic DNA Purification Kit

Zur Isolierung reiner genomischer DNS wurden die untersuchten Stämme mit Hilfe diesen Kits entsprechend den Herstellerangaben gewonnen.

Hitze-Lyse

Diese Methode ermöglicht es, auf einfache und schnelle Weise genomische DNS aus Bakterien zu gewinnen und in der Polymerase-Kettenreaktion einzusetzen. Eine Kolonie einer ü.N. bebrüteten LB-Agarplatte wurde in 5 ml LB-Medium geimpft und bei 37 °C ü.N. unter Schütteln inkubiert. 50 µl dieser Übernacht-Bouillon-Kultur wurden mit 150,0 µl A. bidest in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Typ „safe-lock“, Eppendorf, Hamburg) überführt, gemischt und für 10 min in einem Wasserbad (Biometra, Göttingen) bei 100 °C gekocht. Nach anschließender Zentrifugation (10 min, RT, 14.000 rpm) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

3.2.2.2 Gewinnung von Plasmid-DNS

Die Isolierung von Plasmiden erfolgte je nach Kopienzahl, benötigter Menge oder Reinheitsgrad des Plasmids mit Hilfe unterschiedlicher Kits („High Pure Plasmid Isolation Kit“, „QIAGEN® Plasmid Midi Kit (25)“ und „QIAGEN® Plasmid Maxi Kit (25)“). Die Plasmid-Präparation wurde nach dem jeweiligen Protokoll des Herstellers durchgeführt. Mittels einer Agarose-Gelelektrophorese wurde festgestellt, ob die Plasmid-Isolierung erfolgreich durchgeführt wurde.

3.2.2.3 Gewinnung von DNS-Fragmenten und PCR-Produkten

Die Isolierung und Reinigung sehr großer DNS-Fragmente (30 kb und 70 kb) erfolgte mit Hilfe des „Roti®-Elutions-Kit“. Für diesen Zweck wurde die Gesamt-DNS des Bakterienstammes enzymatisch verdaut und die restringierten DNS-Fragmente in einer Pulsfeld-Gelelektrophorese aufgetrennt (s. Punkt 3.2.6). Das bestimmte DNS-Fragment wurde anschließend aus dem Agarose-Gel herausgeschnitten und mittels o.g. Kits aufgereinigt.

PCR-Produkte wurden nach Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (s. Punkt 3.2.4) auf ein präparatives Agarose-Gel aufgetragen und mit Hilfe des „High Pure™ PCR Product Purification Kit“ aufgereinigt.

3.2.2.4 Konzentrierung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren lassen sich aus wässrigen Lösungen mit Hilfe einer Ethanol-fällung anreichern. Diese Ethanol-fällung wurde nach Vorschriften von Standardprotokollen durchgeführt (130).

3.2.3 DNS-DNS-Hybridisierung

Mit Hilfe der DNS-DNS-Hybridisierung lassen sich gleiche oder sehr ähnliche Sequenzen der zu untersuchenden Nukleinsäure und der markierten Sonden nachweisen.

Durch den Hybridisierungsvorgang kommt es zu einem Kontakt zwischen einer DNS-Sonde und der auf der Membran gebundenen denaturierten DNS, so dass die Sonde während der Inkubation an die entsprechenden homologen Bereiche bindet. Es bilden sich sogenannte „Hybrid-Moleküle“, die nach Entfernung der nicht gebundenen DNS-Sonde sichtbar gemacht werden können (s. Punkt 3.2.3.4).

3.2.3.1 Sondenherstellung mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten DNS-Sonden wurden durch den Einbau von Digoxigenin-gelabelten dUTP's im Rahmen einer PCR markiert. Die Markierung wurde unter Verwendung des „PCR DIG Probe Synthesis Kit“ entsprechend den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Als Template wurde die mittels „Master Pure™ Genomic DNA Purification Kit“ isolierte DNS der Stämme RW1374, MG1655 und DBS100 verwendet. Mittels einer Agarose-Gelelektrophorese wurde festgestellt, ob die Markierung der Sonden erfolgreich durchgeführt wurde, da das Laufverhalten des markierten gegenüber dem nicht markierten Amplifikat verändert ist. Um die gewonnene DNS-Sonde zu reinigen, wurde das DNS-Fragment anschließend in einem präparativen Agarose-Gel aufgetrennt und mit dem „Agarose Gel DNA Extraction Kit“ nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt.

3.2.3.2 Dot Blot

Für die Herstellung eines Dot-Blot wurden per Hitzelyse oder mittels „MasterPure™ Genomic DNA Purification Kit“ isolierte DNS verwendet. Um die DNS zu denaturieren, wurde sie 10 min bei 100 °C im Wasserbad gekocht und anschließend sofort auf Eis gestellt. Von dieser denaturierten DNS (100 ng/μl) wurden 5 μl auf eine positiv geladene Nylonmembran (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim) punktförmig aufgetropft. Nach kurzer Trocknung der Membran wurde die DNS anschließend durch Inkubation bei 120 °C für 30 min fixiert und bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

3.2.3.3 Southern Blot

Für die Herstellung eines Southern Blots (Kapillartransfer) wurde restringierte und mittels PFGE aufgetrennte DNS verwendet, die vom Agarose-Gel direkt auf eine positiv geladene Nylonmembran (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim) übertragen wurde (143).

Dafür wurde das DNS enthaltende Agarose-Gel speziell behandelt. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur in einer Plastik-Fotoschale, in der das Agarose-Gel in der jeweiligen Reaktionslösung geschwenkt wurde. Die Depurinierung der DNS mit HCl bewirkte eine Fragmentierung großer DNS-Fragmente. Um die DNS für den Hybridisierungsvorgang zugänglich zu machen, musste diese denaturiert, also einzelsträngig, auf der Trägermembran immobilisiert werden. Die Behandlung des Agarose-Gels und der anschließende Transfer der DNS auf die Nylonmembran erfolgte nach Anleitung des „DIG Application Manual for Filter Hybridisation“ (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim). Nach kurzer Trocknung der Membran wurde die DNS anschließend durch Inkubation bei 120 °C für 30 min fixiert und bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

3.2.3.4 Hybridisierungsvorgang und Visualisierung

Der Hybridisierungsvorgang und die Visualisierung wurden entsprechend den Vorschriften des „DIG Application Manual for Filter Hybridisation“ (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) durchgeführt. Die verwendeten Reagenzien und Puffer sind unter Punkt 3.1.5.3.5 aufgeführt.

Der Nachweis von DNS-DNS-Hybriden erfolgte durch die Chemilumineszenz-Reaktion anhand der Schwärzung der Röntgenfilme. Dafür wurden die hybridisierten DNS-Blots in eine Klarsichthülle eingeschweißt und auf einen Röntgenfilm gelegt. Anschließend wurden sie in einer lichtdichten Filmkassette je nach verwendeter Sonde zwischen 1 min und 4 h bei Raumtemperatur exponiert. Anschließend musste der Film 3 min entwickelt, 1 min gewässert, 3 min fixiert und abschließend gewässert werden. Die Auswertung erfolgte nach Trocknung des Röntgenfilms.

3.2.4 Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird ein bestimmter DNS-Bereich *in vitro* enzymatisch mittels zweier Primer sowie der DNA-Polymerase exponentiell amplifiziert (129, 104, 9).

Als Template-DNS wurde chromosomale DNS verwendet, die mittels „MasterPure™ Genomic DNA Purification Kit“ bzw. Hitzelyse (s. Punkt 3.2.2.1) isoliert wurde. Nach erfolgter thermischer Denaturierung der Template-DNS binden die Primer - kurze synthetisch hergestellte Oligonukleotide (18-26mer) - bei entsprechenden Annealingtemperaturen an die komplementären DNS-Einzelstrangbereiche. Die Annealingtemperatur leitet sich aus der Schmelztemperatur der Primer ab. Mithilfe der *Taq* DNA-Polymerase bzw. *Herculase* DNA-Polymerase findet dann die Elongation statt, wobei die Länge des Amplifikates exakt dem Abstand der beiden Primer entspricht. Da jedes Amplifikat eine neue Matrizen-DNS darstellt, werden bis zu 2^{28} Kopien (bei 30 Zyklen) der ursprünglichen DNS synthetisiert.

Der auf Eis pipettierte Reaktionsansatz für die *Taq* DNA-Polymerase setzte sich wie folgt zusammen:

1,0 µl	10 x PCR Puffer
1,5 mM	MgCl ₂ (50 mM)
0,2 mM each	dNTPs
0,5 µM	je Reaktionsprimer (10 pM)
0,05 U/µl	<i>Taq</i> DNA-Polymerase
0,2 ng/µl	Template DNS
ad 10 µl	A. bidest.

Der auf Eis pipettierte Reaktionsansatz für die *Herculase* DNA-Polymerase setzte sich wie folgt zusammen:

1,0 µl	10 x Herculase Puffer
0,2 mM each	dNTPs
0,5 µM	je Reaktionsprimer (10pM)
0,05 U/µl	<i>Herculase</i> DNA-Polymerase
0,2 ng/µl	Template DNS
ad 10 µl	A. bidest.

Der PCR-Ansatz wurde nach Schütteln kurz hochtourig zentrifugiert, mit 15 µl Mineralöl überschichtet und in den Thermocycler gestellt. Die Bedingungen der PCR waren eine initiale Denaturierung bei 94 °C für 5 min, gefolgt von 30 Zyklen des Temperaturprofils 94 °C für 1 min, eine variierende Annealingtemperatur (50 – 65 °C) für 2 min, eine Elongationszeit von 3 min bei 72 °C sowie einer einmaligen finalen Amplifizierung von 72 °C für 7 min.

Die *Herculase* DNA-Polymerase wurde zur Amplifizierung großer DNS-Fragmente eingesetzt. Die initiale Denaturierungstemperatur wurde auf 92 °C für 2 min reduziert, gefolgt von ebenfalls 30 Zyklen des Temperaturprofils 92 °C für 30 sec, einer variierenden Annealingtemperatur sowie einer Elongationszeit von 4 min bei < 4 kb großen und 8 min bei > 4 kb großen DNS-Fragmenten. Die finale Amplifikation betrug 10 min bei 72 °C.

Die Programme des Thermocyclers für die jeweils eingesetzten Primer und Polymerase sind den Tabellen 13 und 14 zu entnehmen.

Tab. 13 Programm des Thermocyclers für die *Taq* DNA-Polymerase:

Schritt 1	Denaturierung der doppelsträngigen DNS	94 °C	5 min
Schritt 2	Denaturierung der doppelsträngigen DNS	94 °C	1 min
Schritt 3	Anlagerung der Primer an den DNS-Einzelstrang - Annealing	50 – 65 °C	2 min
Schritt 4	Extension - Amplifikation	72 °C	3 min
Schritt 2 - 4 30 x			
Schritt 5	Extension	72 °C	7 min

Tab. 14 Programm des Thermocyclers für die *Herculase* DNA-Polymerase:

Schritt 1	Denaturierung der doppelsträngigen DNS	92 °C	2 min
Schritt 2	Denaturierung der doppelsträngigen DNS	92 °C	30 sec
Schritt 3	Anlagerung der Primer an den DNS-Einzelstrang - Annealing	50 – 65 °C	40 sec
Schritt 4	Extension - Amplifikation	72 °C	8 min
Schritt 2 - 4 30 x			
Schritt 5	Extension	72 °C	10 min

Zur Ermittlung und Identifizierung der Fragmentgröße wurde anschließend eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

3.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine einfache und sehr effektive Methode, DNS-Fragmente zu separieren, identifizieren und aufzureinigen; diese werden nach ihrer Größe aufgetrennt.

0,7 g Agarose wurde durch Aufkochen in 100 ml 1 x TBE gelöst. Nach Abkühlen auf etwa 55 °C und Zugabe von 5 µl einer Ethidiumbromidlösung (1 %-ig) zum Zwecke der Sichtbarmachung der DNS-Banden auf einem UV-Tisch wurde die flüssige Agarose in eine Gelkammer gegossen, in der sich ein Probenaschenkamm mit 12 bis 24 Taschen befand. Nach dem Erhärten wurde das Gel in die entsprechende, mit 1 x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Nachdem 10 µl des PCR-Produktes, vermischt mit 3 µl der Stop-Lösung sowie in Abhängigkeit der polymerisierten DNS-Fragmentgröße der 1 kb DNA Ladder bzw. 100 bp DNA Ladder (Life TechnologiesTM, Life Technologies GmbH, Karlsruhe) in die einzelnen Probenaschen pipettiert worden sind, wurde ein elektrisches Feld von 90 V für 90 min an die Elektrophoresekammer angelegt. Zur Konzentrationsbestimmung amplifizierter PCR-Produkte oder isolierter Plasmid-DNS diente ein λ -DNA/*Hind*III-restringierter Marker (Promega). Anschließend wurden die DNS-Banden mittels eines Transilluminators visualisiert. Die Dokumentation erfolgte mittels einer CCD-Kamera über einen angeschlossenen Thermodrucker.

3.2.6 Counter-clamped homogeneous electric field – Pulsfeld-Gelelektrophorese (CHEF-PFGE)

Diese Methode beschreibt ein Verfahren, mit welchem größere DNS-Fragmente (0,1 kb – 20 Mb) aufgetrennt werden können. Auf diese Weise können Bakterienstämme anhand des generierten Fragmentlängenmusters einfach bewertet und unterhalb der Speziesenebene subtypisiert werden (139).

Von einer 5 ml Übernacht-Kultur der Isolate in LB-Bouillon (37 °C, Schüttelinkubator) wurde 1 ml entnommen. Anschließend wurde unter Zugabe einer 0,9 %-igen Kochsalzlösung photometrisch eine optische Dichte OD₆₀₀ von 1,0 eingestellt. Von dieser Suspension wurden 1,5 ml in 2 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) überführt und 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 1,0 ml sowie nach erneuter Zentrifugation in 0,5 ml Kochsalzlösung resuspendiert. Nach der Zugabe dieser 500 µl Bakteriensuspension zu 750 µl einer 1,5 %-igen, auf ca. 56 °C temperierten Agarose (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad, München) und guter Durchmischung wurden ca. 100 µl zügig und ohne Bildung von Luftblasen in die entsprechende Gießformen für Agarose-Blöckchen pipettiert. Nachdem die Blöckchen erstarrt waren, wurden sie vorsichtig aus der Gießschablone entfernt und jeweils in 500 µl ESP-Lösung mit 1,8 mg/ml Proteinase K bei 56 °C für 24 h im Sandbad inkubiert.

Die so in den Agarose-Blöckchen freigesetzte und der nachfolgenden Restriktion zugänglich gemachte DNS wurde am nächsten Tag dreimal mit jeweils 14 ml TE-Puffer bei 4 °C unter vorsichtigem Schwenken in einen 100 ml Erlenmeyerkolben jeweils 90 min gewaschen. Anschließend wurden die Blöckchen gedrittelt und entweder unmittelbar für die Restriktion vorbereitet oder in TE-Puffer bei 4 °C gelagert. Zur Durchführung des DNS-Restriktionsendonuklease-Verdaus wurde jeweils ein gedritteltes Gelblöckchen in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei Raumtemperatur 30 min in 600 µl Enzympuffer für *NotI*, *NheI*, oder *XbaI* inkubiert. Anschließend wurde der Enzympuffer entnommen. Die gedrittelten Blöckchen wurden nach erneuter Zugabe von 150 µl des Enzympuffers vermischt mit 20 Einheiten des entsprechenden Enzyms und über Nacht bei der von den Bezugsfirmen angegebenen Temperatur im Sandbad inkubiert.

Nach Beendigung der Restriktion wurden die Blöckchen vorsichtig mit einem Spatel in die Taschen eines 1 %-igen Agarose-Gels überführt; die Taschen wurden mit der entsprechenden Agarose versiegelt. Die elektrophoretische Auftrennung der restringierten DNS-Fragmente wurde in einer Contour-clamped homogeneous electric field-Kammer (CHEF DR III; BioRad, München) in 0,5 x TBE unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Laufzeit: 22 h; Temperatur: 14 °C; Winkel: 120°; Spannung: 6 V; Pulszeit: 5 - 50 sec. Die Auswertung erfolgte nach 20-minütiger Färbung in einer Ethidiumbromidlösung mit anschließender Wässerung in A. bidest. Die Dokumentation erfolgte entweder mit Hilfe einer CCD-Kamera über einen angeschlossenen Thermodrucker oder mittels Fotografieren der Gele unter UV-Licht (Transilluminator TI, Biometra, Wiesbaden; Photo-Kamera Polaroid MP4+ Instant Camera System).

3.2.7 Restriktionsendonukleasen-Analyse

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen lässt sich DNS an spezifischen Sequenzen schneiden.

Die Restriktion von Plasmid-DNS und PCR-Produkten erfolgte je nach Zweck in 10 bis 120 µl Gesamtvolumen unter den von der Bezugsfirma angegebenen Bedingungen. Zur Restriktion von 1 µg DNS wurde 1 U des entsprechenden Enzyms (*EcoRI*, *BamHI*, *NheI*) eingesetzt. Mittels einer Agarose-Gelelektrophorese wurde festgestellt, ob die Restriktion erfolgreich durchgeführt wurde, indem das ebenfalls aufgetragene unverdaute Plasmid bzw. PCR-Produkt als Kontrolle diente.

3.2.8 Klonierung

3.2.8.1 Dephosphorylierung

Um die intermolekulare Ligationsrate von DNS zu erhöhen, wurde der Ligation ein Dephosphorylierungsschritt des zu verwendenden restringierten Vektors vorgeschaltet. Die Phosphatase entfernt die 5'-Phosphatgruppen der DNS und verhindert somit die Rezirkularisation und Religation des linearisierten Vektors.

Für diesen Zweck wurde die Vektor-DNS in einem 5 µl Ansatz mit 1 U/µg DNS Shrimp Alkaline Phosphatase (Promega, 1 U/µl) versetzt. Das Gemisch wurde 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine 30 minütige Inkubation bei 65 °C gestoppt.

3.2.8.2 Ligation

Bei einer Ligation werden DNS-Fragmente in natürlicher 5' - 3'-Richtung kovalent miteinander verknüpft. Diese Reaktion wird von der T4-DNA-Ligase katalysiert, die unter Verbrauch von ATP eine Phosphodiesterbindung zwischen dem 5'-Phosphatende und dem 3'-Hydroxyende doppelsträngiger DNS ausbildet (164). Eine Ligation kann mit glatten („blunt ends“) oder überhängenden („sticky ends“) DNS-Fragmentenden erfolgen.

Ligationsreaktionen wurden nach Vorschriften von Standardprotokollen durchgeführt (130). Ligationen von Insert-DNS in einen linearisierten Vektor wurden in einem Gesamtvolumen von 10 - 20 µl unter Zusatz von 0,5 - 1 µl T4-DNA-Ligase sowie 1 - 2 µl 10 x Ligase-Puffer durchgeführt. Mit A. bidest. wurde auf das Gesamtvolumen aufgefüllt. Es wurde zuvor restringierte und mittels „Agarose Gel DNA Extraction Kit“ aufgereinigte Plasmid-DNS und PCR-Amplifikate verwendet. Die Ansätze wurden über Nacht bei 16° C inkubiert. Um eine durchgeführte Ligation zu überprüfen, wurde eine PCR oder eine Restriktion durchgeführt.

3.2.8.3 Transformation

Die Transformation bezeichnet einen Vorgang, bei dem DNS-Moleküle von Bakterienzellen aufgenommen werden. Unter normalen Bedingungen nehmen *E. coli*-Zellen nur in begrenztem Umfang DNS-Moleküle auf. Um die Zellen effektiv zu transformieren, müssen sie Behandlungen unterzogen werden, die ihre Fähigkeit erhöhen, fremde DNS aufzunehmen. Wenn Bakterienzellen eine solche physikalische oder chemische Behandlung durchlaufen haben, werden sie als „kompetent“ bezeichnet. Transformationen werden durchgeführt, um rekombinante DNS-Moleküle in Bakterienzellen einzuführen.

3.2.8.3.1 Calciumchlorid-Transformation

Zur Herstellung chemisch-kompetenter Zellen werden *E. coli*-Zellen einer Behandlung mit eiskalter Salzlösung (Calciumchlorid, CaCl₂) unterzogen, um anschließend DNS wesentlich

effizienter aufzunehmen. Die genaue Wirkungsweise des CaCl_2 ist jedoch nicht bekannt. Es wird angenommen, dass die Kalzium-Ionen die Zellmembran destabilisieren und ein Kalzium-Phosphat-DNS-Komplex an der Zellmembran bindet. Durch eine kurzzeitige Temperaturerhöhung wird die eigentliche Transformation in Gang gesetzt (54).

Die Herstellung der kompetenten Zellen und Durchführung der CaCl_2 -Transformation erfolgte nach der Methode von Hanahan (54). Für die Herstellung chemisch-kompetenter Zellen wurden 0,5 ml einer Übernachtskultur in 50 ml LB-Bouillon angeimpft und weiterhin bei 37 °C schüttelinkubiert, bis eine OD_{600} von 0,3 erreicht war. Während der Behandlung der Zellen musste stets auf die Einhaltung einer konstanten Kühlkette geachtet werden. Nach Portionierung der LB-Bouillon in eisgekühlte Röhrchen (Greiner) wurden die Zellen sofort für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (6000 rpm, 4 °C, 10 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5 ml eiskalter 0,1 M CaCl_2 -Lösung resuspendiert und erneut unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde jetzt in 1 ml eiskalter CaCl_2 -Lösung resuspendiert und in 200 μl Aliquots aufgeteilt. Die Aliquots wurden abschließend entweder bei -70 °C gelagert oder sofort für die Transformation verwendet.

Für die Transformation wurden zu jedem 1,5 ml Reaktionsgefäß, das 50 μl kompetente Zellen enthält, 4 μl Plamid-DNS gegeben, gut durchmischt und für 40 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde der Zellen-DNS-Mix für genau 90 sec bei 42 °C inkubiert, erneut für einige Minuten auf Eis gestellt, 200 μl sterile LB-Bouillon dazugegeben und durchmischt. Bei der Transformation temperatursensitiver Plasmide erfolgte anschließend die Inkubation dieser Zellsuspensionen für 60 min bei 30 °C im Thermomixer. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 100 μl der Zellsuspensionen auf Selektivplatten ausplattiert und über Nacht bei 30 °C inkubiert.

Die Transformationseffizienz der kompetenten Zellen wurde anhand der Positivkontrolle pUC19 (1ng/ μl) getestet. Als Negativkontrolle dienten kompetente Zellen ohne Zugabe von Vektor-DNS.

3.2.8.3.2 Elektroporation

Die Elektroporation ist eine Methode, mit der innerhalb kurzer Zeit eine große Zellzahl transfiziert werden kann. Die Elektroporationseffizienz ist gegenüber chemisch hergestellten

kompetenten Zellen 10 bis 20 mal größer. Bei der Elektroporation wird einer DNS-Zell-Suspension einem kurzen Stromstoß ausgesetzt, welcher den Aufbau eines transmembranalen elektrischen Feldes induziert. Diese transmembranale Spannung verursacht eine vorübergehende lokale Zerstörung der Zellmembran. Durch die so erzeugten Poren gelangt fremde DNS in die Zelle (37).

Elektrokompetente Zellen wurden nach dem Protokoll von EquiBio Ltd. (Kent, UK) hergestellt. Danach wurden 200 ml LB-Medium mit 4 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C schüttelinkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht war. Die zweimal mit eiskaltem Ultrapureinstwasser gewaschenen Zellen wurden abschließend in 100 µl Portionen unter Zugabe von 10 % Glycerol aliquotiert, schockgefroren und bei -70 °C aufbewahrt oder ohne Zugabe von Glycerol sofort zur Elektroporation benutzt. Bei der Herstellung elektrokompetenter Zellen ist es wichtig, dass während der Behandlung der Zellen und der anschließenden Elektroporation stets eine Temperatur von 0 °C bis 4 °C eingehalten wird, da eine höhere Temperatur die Transformationseffizienz herabsetzt.

Elektroporationen wurden nach der Anleitung von EquiBio Ltd. (Kent, UK) durchgeführt. Dabei wurden 1 – 4 µl des Ligationsansatzes oder des Plasmids zu 40 µl elektrokompetenter Zellen gegeben, durchmischt und 1 min auf Eis inkubiert. Sofort nach der Elektroporation wurde zur Zellsuspension in der Elektroporationsküvette 1 ml steriles SOC-Medium gegeben und in Röhrchen überführt, die 1 h bei 37 °C schüttelinkubiert wurden. Bei der Elektroporation temperatursensitiver Plasmide wurde die Zellsuspension bei 30 °C schüttelinkubiert. Anschließend erfolgte die Ausplattierung von 100 µl der Zellsuspensionen auf Selektivplatten, die über Nacht bei 30 °C, 37 °C oder 42 °C inkubiert wurden. Die Inkubation temperatursensitiver Plasmide bei 30 °C, einer permissiven Temperatur, diente als interne Kontrolle zu der Inkubation bei 37 °C bis 42 °C im Suizidmodus.

Die Elektroporationseffizienz der elektrokompetenten Zellen wurde anhand der Positivkontrolle pUC19 (1ng/µl) getestet. Als Negativkontrolle dienten elektrokompetente Zellen ohne Zugabe von Vektor-DNS.

3.2.9 Markierung von DNS-Segmenten

Die Markierung von DNS-Abschnitten innerhalb des bakteriellen Chromosoms erfolgte nach der von Pósfai et al. (114) entwickelten Methode zur Charakterisierung und *in vivo* Exzision

von 50 – 100 kb großen DNS-Abschnitten. Diese Methode beruht auf der Insertion von Erkennungssequenzen für selten schneidende Restriktionsendonukleasen in das Genom der Empfängerbakterien. Suizid-Vektoren fungieren als Träger für diese Insertionen in das Chromosom. Verschiedene dieser Suizid-Insertion-Plasmide wurden entwickelt, die die seltene Restriktionsendonuklease-Erkennungssequenz für *NotI*, verschiedene Antibiotika-Resistenzgene und eines von zwei konditionellen Replikationssystemen (pSC101^{ts} oder R6K) enthalten. Die Insertion dieser Plasmide in ausgesuchte Zielsequenzen des Genoms erfolgt durch Rekombination mit DNS-Fragmenten, die homolog zum Empfängergenom sind und in die Vektoren kloniert werden.

Diese homologen Fragmente wurden mittels PCR aus dem zu mutagenisierenden Stamm oder aus Stämmen amplifiziert, die gleiche DNS-Abschnitte enthalten. Anschließend wurden sie in die Suizid-Plasmide ligiert und in kompetente Zellen transformiert (s. Punkt 3.2.8.3). Die Effizienz der Integration der Suizid-Vektoren kann durch die Elektroporation im konditionellen Suizid-Modus gesteigert werden. Dabei werden Transformation und homologe Rekombination in zwei Schritte aufgeteilt. Die Elektroporation erfolgte unter Bedingungen, die die Replikation der Suizid-Vektoren erlaubt (bei 30 °C oder in Anwesenheit des Π -Proteins). Transformanten, die erst den Suizid-Vektor aufgenommen haben, wurden dann unter unpermissive Bedingungen gestellt (bei 37 °C bzw. 42 °C, so dass pST76-A/-C nicht mehr replizieren), die zur homologen Rekombination führen. Mit Hilfe der PCR und Makrorestriktions-Analyse erfolgte die Kontrolle der durchgeführten Markierung von DNS-Segmenten.

3.2.10 Konjugation

Die Konjugation ist ein unter Bakterien natürlich vorkommender Prozess des horizontalen DNS-Transfers. Der Kontakt zweier Zellen ist dabei meist mit dem Austausch genetischen Materials verbunden.

Die Konjugationsexperimente wurden nach Vorschriften von Standardprotokollen durchgeführt (98). Ein mit einer Antibiotika-Resistenz markierter Stamm diente dabei als Donorstamm; die *E. coli* K12-Stämme MG1655 (Rif^r und Nal^r) und DH5 α (Rif^r) als Empfängerstämme. Die Resistenzen der Empfängerstämme gegen die Antibiotika Rifampizin (Rif) und Nalidixinsäure (Nal) wurden als Spontanmutagenese erreicht, indem ü.N.-Kulturen bei 37 °C von MG1655 und DH5 α unter Zusatz von 25 μ g Rif/ml LB-Medium und 15 μ g

Nal/ml LB-Medium angelegt wurden. 0,1 ml der ü.N.-Kultur wurde auf Rifampizin- und Nalidixinsäure-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert und einzelne Kolonien selektioniert. Bevor die Stämme in bestimmten Donor-Rezipient-Verhältnissen gemischt wurden, erfolgte die Entfernung der Antibiotikazusätze durch Zentrifugationsschritte (5 min, 4000 rpm). Die Selektion von Transkonjuganten erfolgte durch Ausplattierung der Mischungsverhältnisse auf Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten (25 µg Amp/ml, 25 µg Rif/ml und 15 µg Nal/ml).

3.2.11 Funktionelle Testsysteme zur Bestimmung der Adhäsivität

3.2.11.1 Fluoreszenz-Aktin-Färbungstest (FAS-Test)

Der Fluoreszenz-Aktin-Färbungstest (FAS-Test) wurde zur Diagnose von „attaching and effacing“- (AE-) Läsionen entwickelt (80). Dabei wird das filamentöse Aktin durch Fluoreszein-Isothiocyanat markiertes Phalloidin gebunden. Das polymerisierte Aktin kann durch Fluoreszenz unmittelbar unter den Bakterien nachgewiesen werden.

Der Nachweis von Aktinakkumulationen unterhalb der Anheftungsstelle von Bakterien wurde mit HEP2-Zellen durchgeführt. 48 h vor dem Test wurden die HEP2-Zellen der Stammkultur zweimal mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend 5 min mit 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert. Abgelöste Zellen wurden in 10 ml Antibiotika-freiem RPMI 1640-Medium suspendiert. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 1000 rpm wurde das Zellpellet erneut in 10 ml Medium aufgenommen. Die Zellzählung erfolgte in einer Blutzellkammer nach Thomas. Anschließend wurden die Zellen in 24-Loch-Platten auf sterile Glasplättchen (Ø 25 mm, Roth) ausgesät (5×10^5 Zellen/Vertiefung/ml). 18 h vor dem Test wurden Einzelkolonien der Bakterienstämme in sterilem Peptonwasser angeimpft und ü.N. bei 37 °C schüttelinkubiert. Am Tag des Tests wurde zunächst die OD_{600} der Übernacht-Kulturen gemessen. Durch Verdünnung in RPMI 1640-Medium wurde eine „Multiplicity of Infection“ (MOI) von 100 eingestellt (1×10^8 Bakterien/ml). Bei der Berechnung der MOI wurde davon ausgegangen, dass sich die Zahl der eingesäten Zellen innerhalb von 48 h verdoppelt. Nachdem die vorbereiteten Zellkultur-Monolayer zweimal mit HEPES-Lösung gewaschen worden waren, erfolgte die Beimpfung mit 1 ml der Bakteriensuspension. Einer ersten Inkubationsperiode von 3 h (37 °C) folgte dreimaliges Waschen der Vertiefungen mit HEPES-Lösung, Zugabe von jeweils 1 ml RPMI 1640-Medium und eine zweite Inkubationsperiode von 3 h bei 37 °C. Der Test wurde durch erneutes dreimaliges Waschen mit HEPES-Lösung beendet.

Die weiteren Arbeitsschritte dienten der Fixation und Einbettung der Deckglaspräparate für die mikroskopische Untersuchung. Die Präparate wurden mit einer 3 %igen Formaldehyd/PBS-Lösung 10 min bei 4 °C fixiert, dann dreimal mit eisgekühltem PBS gewaschen und anschließend für 4 min mit einer 0,1 %igen Triton X/PBS-Lösung bei 4 °C permeabilisiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit eisgekühltem PBS erfolgte die Anfärbung der Deckglaspräparate für 30 min in einer feuchten, abgedunkelten Kammer mit 10 µl Fluoreszein-Isothiozyanat-markiertem Phalloidin (5 µg/ml PBS, SIGMA, München). Nach wiederholtem dreimaliges Waschen mit PBS wurden die Glasplättchen auf einen Objektträger geklebt und mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. *E. coli*-Bakterien wurden im FAS-Test als positiv bewertet, wenn fluoreszierende „Spots“ unterhalb der Bakterienzellen sichtbar wurden.