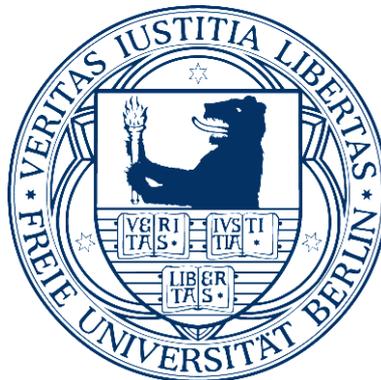


Zur Rolle des periplasmatischen Chaperons SurA in der Virulenz uropathogener *Escherichia coli*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von

Dipl. Biol. Nicole Janitzek
aus Rostock

2016

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juli 2009 bis April 2014 am Robert Koch-Institut in Berlin unter der Leitung von Frau PD Dr. Susanne Behrens-Kneip und Herrn PD Dr. Klaus Heuner in der Abteilung ZBS 2 angefertigt.

1. Gutachterin: PD Dr. Susanne Behrens-Kneip
2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am 19.07.2016

Meinen Kindern

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	III
Summary.....	V
1. Einleitung	1
1.1 Harnwegsinfektionen.....	1
1.2 Virulenzfaktoren uropathogener <i>Escherichia coli</i>	2
1.3 Das α -Hämolysin (HlyA).....	5
1.4 Außenmembranvesikel (OMV).....	8
1.4.1 Produktion von OMV.....	8
1.4.2 Funktion von OMV.....	9
1.5 Membranassoziiertes α -Hämolysin in Außenmembranvesikeln.....	10
1.6 Der Motilitätsapparat uropathogener <i>E. coli</i>	10
1.6.1 Die Funktion der Flagelle.....	10
1.6.2 Der Aufbau der Flagelle.....	12
1.6.3 Der regulierte Zusammenbau der Flagelle.....	13
1.7 Das periplasmatische Chaperon SurA.....	15
1.7.1 Das Protein und seine Funktion.....	15
1.7.2 Die Rolle von SurA in der Virulenz uropathogener <i>E. coli</i>	19
1.8 Zielsetzung der Arbeit.....	21
2. Material	23
2.1 Bakterienstämme und Plasmide.....	23
2.2 Zelllinien.....	24
2.3 Chemikalien und Laborkits.....	25
2.4 DNA- und Proteingrößenstandards.....	26
2.4.1 DNA-Größenstandard.....	26
2.4.2 Protein-Größenstandard.....	27
2.5 Antibiotika.....	28
2.6 Antikörper.....	28
2.7 Enzyme.....	29
2.8 Geräte und Software.....	29
3. Methoden	31
3.1 Mikrobiologische Methoden.....	31
3.1.1 Kultivierung von <i>E. coli</i>	31
3.1.2 Kultivierung von <i>Legionella pneumophila</i>	31

3.1.3	Konservierung von Bakterien	32
3.1.4	Herstellung elektrokompetenter Zellen	32
3.2	Nukleinsäuretechniken	33
3.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	33
3.2.2	Transformation mittels Elektroporation	34
3.2.3	Präparation von RNA	35
3.2.3.1	Isolierung von Gesamt-RNA.....	35
3.2.3.2	DNase-Verdau der RNA.....	36
3.2.3.3	Aufreinigung der RNA	36
3.2.3.4	Reverse Transkriptase (RT)-PCR	37
3.2.4	Horizontale Gelelektrophorese.....	38
3.3	Präparation und Analyse von Proteinen.....	39
3.3.1	Probengewinnung von Proteinen	39
3.3.1.1	Gesamtzellextrakt.....	40
3.3.1.2	Kulturüberstand	40
3.3.1.3	Außenmembranvesikel (OMV)	41
3.3.2	Eindimensionale SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	42
3.3.3	Immunochemischer Proteinnachweis	44
3.3.4	Zweidimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	45
3.3.4.1	Isoelektrische Fokussierung (IEF)	45
3.3.4.2	Vertikale Dimension der 2D-Gelelektrophorese	46
3.3.5	Färbung von SDS-Gelen.....	47
3.3.6	Massenspektrometrie via MALDI-TOF	48
3.4	Phänotypische Charakterisierungen	50
3.4.1	Qualitativer Hämolysetest	50
3.4.2	Quantitativer Hämolysetest (Flüssighämolysetest)	50
3.4.3	Schwärmplatten	52
3.4.4	Novobiocintest	52
3.4.5	SigmaE (σ^E)-Aktivität	53
3.4.6	Phospholipase-Aktivitätsnachweis (PLA-Assay)	54
3.5	Elektronenmikroskopie.....	55
3.5.1	Motilitätsapparat.....	55

3.5.2	Außenmembranvesikel	55
4.	Ergebnisse	57
4.1	Phänotypische Charakterisierung der <i>surA</i> -Mutante des UPEC 536 Stamms.....	57
4.1.1	Einfluss des periplasmatischen Chaperons SurA auf das Wachstumsverhalten.....	57
4.1.2	Novobiocin-Sensitivitätstest	58
4.1.3	Nachweis der SigmaE (σ^E)-Aktivität.....	59
4.2	Außenmembranvesikel	61
4.2.1	Elektronenmikroskopische Darstellung der Vesikel	61
4.2.2	Proteomanalyse der OMV via zweidimensionaler Gelelektrophorese.....	64
4.2.2.1	Analyse ausgewählter Proteinspots aus der OMV-Fraktion	64
4.2.2.2	Vergleich der OMV-Fraktionen	68
4.3	Der Einfluss von SurA auf das α -Hämolyisin (HlyA)	71
4.3.1	Qualitativer Test auf Hämolyseaktivität.....	71
4.3.2	Transkriptanalyse von <i>hlyA</i> mittels RT-PCR.....	72
4.3.3	Quantitativer Hämolysetest und immunochemischer α -Hämolyisin-Nachweis.....	73
4.3.3.1	Flüssighämolysetest.....	73
4.3.3.2	Immunochemischer α -Hämolyisin-Nachweis	78
4.3.4	Phospholipase-Aktivitätsnachweis der OMV.....	83
4.4	Motilität.....	85
4.4.1	Schwärmplattentest	85
4.4.2	Transkriptanalyse der Regulationskaskade des Flagellenapparates.....	87
4.4.3	Immunochemische Analyse der Flagellenuntereinheit FliC	89
4.4.4	Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Motilitätsapparates	90
4.4.5	Quantifizierung der Flagellierung	91
5.	Diskussion.....	95
5.1	Einfluss von SurA auf die Membranintegrität und σ^E -abhängige Stressantwort in uropathogenen <i>E. coli</i>	95
5.2	Die Rolle von SurA bei der OMV-Biogenese.....	97
5.3	Mögliche Bedeutung von SurA für die Hämolyisinsekretion und	

-aktivität.....	101
5.4 Einfluss von SurA auf die Flagellen-vermittelte Motilität.....	106
5.5 Bedeutung von SurA in der Virulenz uropathogener <i>E. coli</i>	108
6. Literaturverzeichnis	111
7. Tabellenverzeichnis	121
8. Abbildungsverzeichnis.....	123
9. Anhang.....	127
9.1 Nukleinsäuretechniken.....	127
9.2 Massenspektrometrie.....	128

Abkürzungen

Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
Cat	Chloramphenicol
CNF-1	<i>cytotoxic necrotizing factor 1</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPPC	1, 2-Dipalmitoylphosphatidylcholin
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EAEC	enteroaggregative <i>E. coli</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EIEC	enteroinvasive <i>E. coli</i>
EM	Elektronenmikroskopie
EPEC	enteropathogene <i>E. coli</i>
ETEC	enterotoxische <i>E. coli</i>
H ₂ O _{dest.}	destilliertes Wasser
HDM	<i>hemolysin deficient mutant</i>
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
HWI	Harnwegsinfektion
IBC	<i>intracellular bacterial communities</i>
IEF	isoelektrische Fokussierung
kDa	Kilodalton
LB	<i>lysogeny broth</i> (Nährmedium)
Lpp	Brauns Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
MENEC	Meningitis-auslösende <i>E. coli</i>
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
NMEC	neonatale Meningitis-auslösende <i>E. coli</i>
OD	optische Dichte
OMP	Außenmembranprotein
OMV	Außenmembranvesikel

PAI	Pathogenitätsinsel
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PPIase	Peptidyl-Prolyl-Isomerase
RNA	Ribonukleinsäure
RTX	<i>repeats in toxin</i>
RT	Raumtemperatur
SEPEC	Sepsis-auslösende <i>E. coli</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Sq-RT-PCR	semiquantitative Reverse Transkription PCR
SurA	<i>survival protein A</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
T _m	Schmelztemperatur
UPEC	uropathogene <i>E. coli</i>
ÜN-Kultur	Übernacht-Kultur
v/v	Volumen pro Volumen
Wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen

Zusammenfassung

Das periplasmatische Chaperon SurA trägt als Faltungshelfer für integrale Außenmembranproteine (OMP) maßgeblich zur Aufrechterhaltung der Zelloberflächenfunktionen von *E. coli* bei. Durch seine Beteiligung an der Biogenese der Typ 1-Fimbrien beeinflusst SurA zudem die Virulenz des uropathogenen *E. coli*-Zystitis-Isolates UTI89 (UPEC). In dieser Arbeit wurde am Beispiel der Pyelonephritis-Isolate 536 und CFT073 erstmals gezeigt, dass sich die pleiotropen Effekte von SurA auch auf weitere UPEC-Virulenzeigenschaften auswirken.

In UPEC 536 und CFT073 führte das Fehlen von SurA, wie bereits für apathogene *E. coli* beschriebene Phänotypen bekannt, zu einem Defekt der äußeren Membran sowie zu einer konstitutiven Induktion der σ^E -abhängigen Stressantwort. Da das Proteom der Zelloberfläche in den von UPEC häufig in Assoziation mit Toxinen und Virulenzfaktoren sekretierten Außenmembranvesikeln (OMV) repräsentiert ist, wurde der Einfluss von SurA auf ihre Biogenese und Proteinzusammensetzung im Isolat 536 näher untersucht. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass die 536-*surA*-Mutante vermehrt kleinere Vesikel im Vergleich zum Wildtyp abschnürt. Mutmaßlich wird dies durch die gestörte Membranintegrität und die Akkumulation von LPS im Periplasma hervorgerufen.

Die Proteomanalyse der 536-OMV ergab, dass etwa 1/3 der detektierten Proteine durch SurA beeinflusst sind. Unter den Proteinen, die in den OMV der *surA*-Mutante in geringerer bzw. erhöhter Konzentration vorlagen, wurden die Flagellin-Untereinheit FliC und das PspA-Protein identifiziert. Damit wurde erstmals ein Zusammenhang zwischen SurA und der Motilität bzw. SurA und dem Psp-System, das in vielen Bakterien durch extrazytoplasmatischen Stress induziert wird, aufgezeigt.

Die flagellenvermittelte Motilität ist für die Ausbreitung von UPEC im Wirt von zentraler Bedeutung. In dieser Arbeit konnte für die UPEC-Stämme 536, CFT073, UTI89 und F11 ein Motilitätsdefekt der *surA*-Mutanten auf Schwärmagarplatten nachgewiesen werden. EM-Aufnahmen der 536-*surA*-Mutante zeigten, dass 2/3 weniger Zellen intakte Flagellen trugen als der Wildtyp. Die Transkriptmengen von *fliC* und weiteren Genen der Flagellen-Regulationskaskade waren hingegen unverändert. Möglicherweise beruht der Motilitätsdefekt indirekt auf der verminderten Integrität der äußeren Membran und einer dadurch bedingt unzureichenden Verankerung der für den Flagellenaufbau notwendigen Hakenstruktur. Verringerte

FliC-Level ließen sich durch eine negative Rückkopplung des resultierenden Assemblierungsdefekts auf die posttranskriptionale Regulation von FliC erklären, die bisher allerdings nicht beschrieben ist.

Ferner konnten in dieser Arbeit erste Hinweise auf einen hämolytischen Defekt der 536-*surA*-Mutante mittels quantitativer Hämolysetests bestätigt werden. Filtrierete Überstände von Kulturen der *surA*-Mutante in der späten exponentiellen Wachstumsphase wiesen reproduzierbar eine signifikant geringere hämolytische Aktivität auf als die des Wildtyps. Die Expression von *hlyA* ist in der *surA*-Mutante unbeeinflusst. Immunochemische Analysen weisen aber auf eine erhöhte Sekretion von HlyA und eine rasche Degradation der sekretierten Toxinmoleküle in *surA*-defizienten Zellen hin. Schließlich wurde im Zuge dieser Studien erstmals nachgewiesen, dass das Fehlen von SurA zu einer erhöhten Aktivität von noch näher zu identifizierenden außenmembranassoziierten Phospholipasen führt.

Summary

The *Escherichia coli* periplasmic chaperone SurA for β -barrel outer membrane proteins plays an integral role in cell envelope homeostasis. Due to its participation in the biogenesis of type 1 fimbriae SurA also influences the virulence of the uropathogenic *E. coli* cystitis isolate UTI89 (UPEC). In this study using the example of the pyelonephritis isolates 536 and CFT073 we showed for the first time that the pleiotropic effects of SurA affect further UPEC virulence factors.

In UPEC 536 and CFT073 lack of SurA led to defects of the outer membrane and the constitutive induction of the σ^E -dependent stress response. Since the proteome of the cell surface is represented by the secreted outer membrane vesicles (OMV), which are often associated with toxins and virulence factors, we investigated the impact of SurA on their biogenesis and protein composition of the isolate 536. Electron microscopic analyses revealed that the 536 *surA* mutant produces an increased number of smaller vesicles compared to the wildtype. Presumably, this is caused by a defective outer membrane integrity and accumulation of lipopolysaccharides (LPS) in the periplasm.

Proteome analysis of the 536 OMV showed that about one third of the discovered proteins are influenced by SurA. Among the proteins which appeared in lower or higher concentrations we identified the flagellin subunit FliC and the PspA protein. Hence, we revealed a relationship between SurA and motility respectively SurA and the Psp-system (induced by extracytoplasmic stress) first.

Flagellum-mediated motility is important for UPEC to disseminate within the host. In this study, we verified a motility defect of the UPEC 536, UTI89, CFT073 and F11 *surA* mutants on soft agar plates. Electron microscopic analyses of the 536 *surA* mutant revealed that bacteria cells produce two third less intact flagella compared to the wildtype. Transcript level analyses of *fliC* and further genes of the flagellar regulation cascade remained unchanged. Potentially, the motility defect is indirectly based on the diminished integrity of the outer membrane and thus, essentially needed for proper assembly, a sufficient anchorage of the flagellar hook. A negative feedback mechanism on the post-transcriptional regulation of FliC by reason of the assembly defect could be an assertion of decreased FliC level.

Furthermore, using quantitative hemolysis assays, we could confirm first evidences that lack of SurA in UPEC 536 lead to a hemolytic defect. Filtrated culture supernatants at late exponential phase of the *surA* mutant showed a significant lower

hemolytic activity than the wildtype. The expression of *hlyA* is unaffected in *surA* mutant cells. However, immunoblot analysis of *surA* deficient cells suggests an increased secretion of HlyA and a rapid degradation of the secreted toxin molecules. Finally, in the course of these studies, we demonstrated for the first time that the lack of SurA leads to an increased activity of outer membrane associated phospholipases, which have yet to be identified.

1. Einleitung

1.1 Harnwegsinfektionen

Unter einer Harnwegsinfektion (HWI) versteht man die Besiedelung der üblicherweise sterilen ableitenden Harnwege (Niere, Harnleiter, Blase, Harnröhre) mit Bakterien. Die meisten HWI betreffen oft nur Teilbereiche und werden in untere (Blasenentzündung) und obere HWI (Nierenbeckenentzündung) eingeteilt. Im schlimmsten Fall können die Bakterien von den Nieren in den Blutstrom übertreten und zu einer lebensbedrohlichen Urosepsis führen. In Deutschland werden jährlich etwa zwei Mio. ärztlich behandelte Fälle von HWI gemeldet, von denen vier Fünftel auf die weibliche Bevölkerung entfallen. Aufgrund ihrer anatomischen Voraussetzungen sind Frauen sehr viel häufiger von einer HWI betroffen als Männer [1]. Die viel kürzere Harnröhre und der nähergelegene Anus begünstigen Schmierinfektionen der üblicherweise sterilen Harnröhre. Eine Besiedelung des Harntraktes mit Keimen kann ebenfalls durch eine unsachgemäße Katheterisierung verursacht werden (nosokomiale Infektion) [2]. Statistisch ist davon auszugehen, dass 50 % bis 70 % aller Frauen mindestens einmal im Leben an einer Harnwegsinfektion erkranken und viele unter rezidivierenden Reinfektionen leiden [3]. Besonders gefährdet sind schwangere Frauen, da sich die Harnwege weiten und der Urin verdünnter ausgeschieden wird. Mit zunehmendem Alter sind allerdings auch Männer gefährdeter an einer HWI zu erkranken, da eine vergrößerte Prostata zu einer unvollständigen Entleerung der Blase führt und eine Besiedelung der Bakterien begünstigt [4]. In 90 % der Infektionen verläuft die Erkrankung harmlos und unkompliziert [5]. Es zeigen sich oft keinerlei Symptome, so dass diese Fälle statistisch oft nicht erfasst werden und von einer hohen Dunkelziffer auszugehen ist. Die symptomatischen Erkrankungen hingegen äußern sich durch Brennen beim Wasserlassen oder Schmerzen im Unterleib. Meist handelt es sich um eine nicht gefährliche Blasenentzündung (Zystitis) ohne Fieber, die gut zu behandeln ist. Erreichen die Keime allerdings im aufsteigenden Verlauf der Infektion das Nierenbecken, kann dies zu einer bedrohlichen Vereiterung führen (Pyelonephritis) [6]. Die Behandlung eines Harnwegsinfekts erfolgt in der Regel mit Antibiotika (z.B. Trimethoprim, Sulfamethoxazol, Nitrofurantoin). Allerdings führt diese Therapie nicht in jedem Fall zum Erfolg. Das zunehmende Auftreten resistenter Keime erschwert die Behandlung, so dass es nach einer Erstinfektion immer häufiger zu einer wiederholten Reinfektion aus einem intrazellulär aufgebauten Reservoir an Bakterien

kommt [7]. Alternative Behandlungsmethoden mit pflanzlichen Wirkstoffen (z.B. aus Brennesselblättern, Bärentraubenblättern und Cranberries) und die Entwicklung neuer antimikrobieller Substanzen werden angesichts der entwickelten Resistenzen gegenüber herkömmlichen Antibiotika unumgänglich.

Hauptsächliche Verursacher von HWI sind uropathogene *Escherichia coli* (UPEC), die zusammen mit den Sepsis-auslösenden (SEPEC) und den Meningitis-auslösenden (MENEK) *E. coli* die Gruppe der extraintestinalen *E. coli* bilden. Weitere Erreger von Harnwegsinfekten können *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Citrobacter freundii* und *Pseudomonas aeruginosa* sein [8-11].

1.2 Virulenzfaktoren uropathogener *Escherichia coli*

Escherichia coli, entdeckt durch Theodor Escherich im Jahre 1885, ist ein gramnegatives Bakterium, das außerordentlich universell ist und die Fähigkeit besitzt, den menschlichen und tierischen Darm zu besiedeln. Der Mensch geht mit den apathogenen *E.coli*-Stämmen als Kommensale eine Symbiose ein, die beiden Beteiligten viele Vorteile verschafft. Neben den nicht virulenten *E. coli*-Stämmen existieren jedoch auch zahlreiche pathogene Stämme, die zu den häufigsten Krankheitserregern beim Menschen zählen. Hierzu gehören zum einen die intestinalen darmassoziierten pathogenen *E. coli* [enteropathogene *E. coli* (EPEC), enterotoxische *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) und enteroaggregative *E. coli* (EAEC)], und zum anderen die extraintestinalen *E.coli* [neonatale Meningitis-auslösende *E. coli* (NMEK), Sepsis-auslösende *E. coli*, Meningitis-auslösende *E. coli* und uropathogene *E. coli* (UPEC) [12]. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, sind die UPEC Hauptverursacher von Harnwegsinfekten. Die Übertragung von kommensal, intestinal lebenden *E. coli* in den Urogenitaltrakt führt zur Expressierung von Virulenzfaktoren, die ihnen eine Besiedlung und eine daraus resultierende ascendierende Infektion als pathogene *E. coli* ermöglicht. Häufig sind die Gene für die Virulenzfaktoren auf sogenannten Pathogenitätsinseln (PAI) lokalisiert und wurden vermutlich über horizontalen Gentransfer erworben [13]. Innerhalb der UPEC-Stämme gibt es sowohl deutliche Unterschiede im Repertoire als auch in der Expressionsstärke ihrer Virulenzfaktoren. Die wichtigsten Virulenzfaktoren sind fimbrielle und nichtfimbrielle Adhäsine, sekretierte Toxine und Eisensequestrierungssysteme.

Adhäsionsfaktoren

Die Fähigkeit, sich an uroepitheliale Zellen zu binden, ist für die Etablierung einer Harnwegsinfektion von zentraler Bedeutung. Zum einen können die Bakterien im Urogenitaltrakt schwieriger mit dem Urin ausgeschwemmt werden und zum anderen können sie über die Herstellung des Zellkontakts in die eukaryotischen Wirtszellen eindringen. Zu den wichtigsten Adhäsinen gehören die fimbriellen Adhäsine wie P-, Typ 1-, S- und Curli-Fimbrien und das nichtfimbrielle Adhäsine Ag34.

Die meisten kommensalen und uropathogenen Vertreter von *E. coli* tragen auf ihrer Zelloberfläche Typ 1-Fimbrien. Diese werden durch eine Reihe von beteiligten Genen, die in dem chromosomalen *fimABCDEFGH* Operon organisiert sind, codiert. Der Einfluss von Typ 1-fimbrierten UPEC-Zellen in der Pathogenese der Harnwegsinfektion wurde zuerst 1980 gezeigt. Zahlreiche Experimente in Tiermodellen untermauerten, dass *fimA*-defiziente UPEC Zellen den unteren Urogenitaltrakt schlechter besiedeln und weniger neutrophile Granulozyten als Folge einer entzündlichen Reaktion rekrutieren [14]. Die Typ 1-Fimbrien interagieren über das apikale Adhäsine FimH mit mannosehaltigen Glykoproteinen, die auf der Oberfläche verschiedener Wirtszelltypen wie Blasenepithelzellen, Erythrozyten oder auch Makrophagen zu finden sind. FimH bindet nicht nur an den Rezeptor, sondern bewirkt auch die Internalisierung der Bakterien, um sich im Urothel zu vermehren. Dies führt zur Bildung intrazellulärer bakterieller Gemeinschaften (IBC – *intracellular bacterial communities*). Zunächst handelt es sich um eine lockere Ansammlung von stäbchenförmigen *E. coli*, die während der Reifung zu IBC eine kokkoidale Form annehmen. Dieser Prozess in der Veränderung der Morphologie scheint direkt durch die Typ 1-Fimbrien induziert zu sein [15]. Die IBC bilden mit Biofilmen vergleichbare Gemeinschaften, in denen die Bakterien der Immunantwort des Wirts entzogen und vor Antibiotika geschützt sind und ein Reservoir aufbauen, um im Wirt persistieren zu können. Für eine Infektion neuer Wirtszellen und zum Aufbau weiterer IBC lösen sich in der Peripherie der IBC einige Bakterienzellen ab, die über die Membran der Epithelzelle nach außen freigesetzt und wiederum über die Typ 1-Fimbrien neue Zell-Zell-Kontakte herstellen. Auf diese Weise können sich die Bakterien tief im Urothel manifestieren und ein großes Reservoir aufbauen, das Ausgangspunkt für eine rezidivierende Harnwegsinfektion ist [16]. Außerhalb der Wirtszellen sind die Bakterien im Urin verschiedenen Faktoren ausge-

setzt, die eine Anheftung an die Wirtszelle erschweren, indem sie die Expression der Typ 1-Fimbrien durch Inhibierung von FimH reduzieren [17].

Im Gegensatz zur Etablierung einer Zystitis sind an der Entstehung einer Pyelonephritis in den oberen Harnwegen die P-Fimbrien von zentraler Bedeutung. Das apikale Adhäsion der P-Fimbrien, PapG, bindet an spezifische Glykolipid- bzw. Glykoproteinrezeptoren auf der Oberfläche von Nierenepithelzellen und Erythrozyten [18].

Curli-Fimbrien bewirken die Adhäsion auf biotischen und abiotischen Oberflächen und tragen zur Internalisierung der Bakterien und der damit verbundenen Ausbildung von Biofilmen bei der Etablierung einer Harnwegsinfektion bei. Sie interagieren mit verschiedenen Wirtsproteinen und werden auch immunologisch erkannt [19, 20].

Ein Beispiel für ein nichtfimbrielles Adhäsion ist das von vielen uropathogenen Stämmen exprimierte Antigen 43, das als Adhäsion in der äußeren Membran vorkommt. Es konnte gezeigt werden, dass es die Autoaggregation fördert und ebenfalls an der Adhäsion und Biofilmbildung beteiligt ist [21, 22].

Zytotoxine

Bakterielle Zytotoxine spielen in der Virulenz uropathogener *E. coli* und in der Pathogenese einer Harnwegsinfektion eine ganz entscheidende Rolle. Hierbei handelt es sich meist um porenbildende Zytotoxine, die von der prokaryotischen Zelle sekretiert werden. Ein wichtiges Toxin ist das α -Hämolyysin (HlyA), dessen virulente Bedeutung in Bezug auf extraintestinale Infektionen mehrfach nachgewiesen wurde und im nächsten Abschnitt genauer beschrieben wird [23]. Durch die zytotoxische Wirkung gelingt es den Bakterien, tief ins Gewebe vorzudringen und Nährstoffe aus den lysierten Wirtszellen zu akquirieren [24, 25]. Ein weiterer zytotoxischer Faktor ist CNF-1 (*cytotoxic necrotizing factor 1*), das in humanen Blasenepithelzellen sowohl apoptotische als auch phagozytotische Vorgänge induzieren kann und zur Pathogenese beiträgt [26, 27].

Weitere Virulenzfaktoren

Die ausreichende Versorgung mit Eisen wird durch verschiedene Siderophorsysteme sichergestellt. Hierzu gehören die sekretierten Siderophore (eisenchelatierenden Oligopeptide), wie z.B. Enterobaktin, Aerobaktin, und die Siderophor-

spezifischen Rezeptorproteine der äußeren Membran. Eine weitere wichtige Möglichkeit Eisen direkt zu binden, wird durch den Häminrezeptor ChuA der äußeren Membran gewährleistet. Dieser kann das Häm-Molekül, das unter anderem aus Erythrozyten freigesetzt wird, direkt in die Zelle aufnehmen. Somit trägt auch dieser Faktor sehr maßgeblich zur Virulenz bei [28]. Nicht zuletzt sind es auch die Lipopolysaccharide (O-Antigene) und die Kapseln (K-Antigene), die durch die Vermittlung einer Serumresistenz zur Persistenz der Bakterien im Urogenitaltrakt beitragen. In einer Untersuchung an Blasenepithelzellen konnte eine verminderte Zytokinantwort auf eine intakte Lipopolysaccharidstruktur zurückgeführt werden [29].

Das Zusammenwirken mehrerer Virulenzfaktoren begünstigt die Etablierung einer Harnwegsinfektion. Eine exklusive Rolle einzelner Virulenzfaktoren ist sehr selten, vielmehr agieren sie synergistisch, verstärkend oder komplementieren den Effekt des anderen. Über verschiedene regulatorische Mechanismen und Signaltransduktionswege wird die Expression der meist phasenabhängigen Virulenzfaktoren streng kontrolliert. Ein wichtiger globaler Regulator für eben diese Regulierung in *E. coli* 536 ist beispielsweise das RfaH, das Einfluss auf die Lipopolysaccharidstruktur und auf die Synthese der K15 Kapsel und des α -Hämolytins nimmt [30].

1.3 Das α -Hämolytin (HlyA)

Das porenbildende zytolytische Exotoxin α -Hämolytin (HlyA) kommt in etwa 50 % aller extraintestinalen *E. coli* vor und bewirkt eine Lyse einer Vielzahl von eukaryotischen Zellen, wie Erythrozyten, Endothelzellen, Monozyten, Granulozyten und renalen Epithelzellen [25]. α -Hämolytin gehört zur Familie der RTX (*repeats in toxin*)-Toxine, der allesamt porenbildende, hitzelabile Zytotoxine angehören, die eine Ca^{2+} -abhängige Aktivität aufweisen, als inaktive Proteine synthetisiert und posttranslational aktiviert werden. Weiterhin besitzen sie nach der Sekretion die Fähigkeit zur irreversiblen Inaktivierung durch Selbstaggregation [31, 32]. Namensgebend für die Familie der RTX-Toxine ist die Ca^{2+} -Bindedomäne, die aus einer variablen Anzahl (10-47) an glycinreichen, hintereinander geschalteten Nonapeptid-Wiederholungen mit der Konsensussequenz LXGGXG(D/N)DX besteht.

Das Gen *hlyA* codiert das α -Hämolsin und ist zusammen mit den Genen *hlyB*, *hlyC* und *hlyD*, deren Synteseprodukte das Hämolsin aktivieren und zur Sekretion beitragen, in dem Operon *hlyCABD* organisiert. Theorien gehen aufgrund des niedrigen GC-Gehaltes, des ungewöhnlichen Codon-Gebrauchs und der Lokalisation auf genomischen Inseln (Pathogenitätsinseln) von einem Erwerb durch horizontalen Gentransfer aus [33, 34].

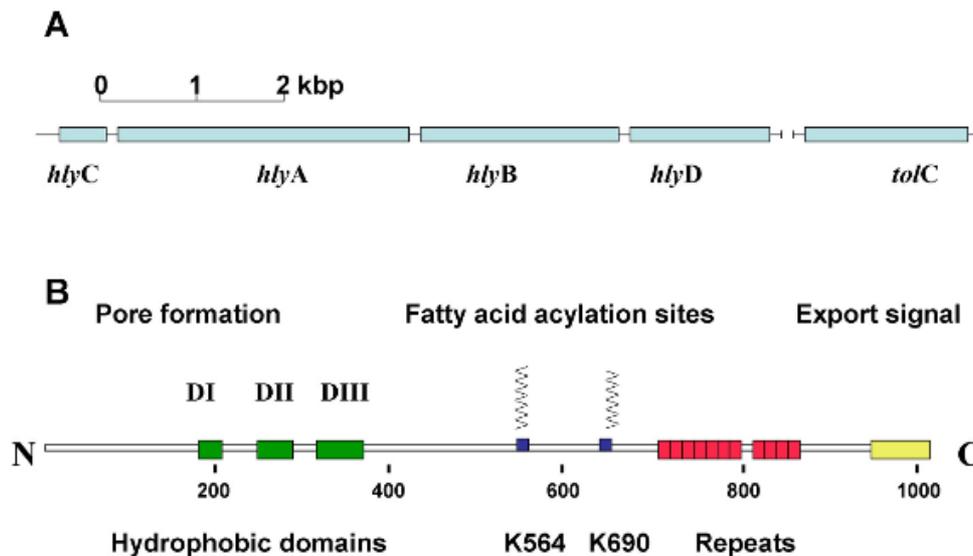


Abb. 1 A) Genomische Organisation des *rtx*-Operons *hlyCABD* für die Sekretion und Aktivierung von HlyA aus *E. coli*. Das Gen *tolC* ist nicht Teil des Operons, aber ist ein wichtiger Bestandteil des T1SS-Systems und somit essentiell für die HlyA-Sekretion. B) Strukturelle und funktionale Domänen des α -Hämolsins aus *E. coli*. DI, DII und DIII stellen die im N-terminalen Bereich liegenden hydrophoben Domänen dar, die die Porenbildung induzieren. K564 und K690 kennzeichnen die Lysinreste, an denen die Fettsäure-Acylierung posttranslational stattfindet. In rot dargestellt sind die für RTX-Toxine charakteristischen Nanopeptid-Wiederholungen und in gelb unterlegt ist die C-terminale Sequenz zur Vermittlung des Exportsignal (R. Benz 2015).

Das Syntheseprodukt des *hlyA* Gens führt zu einem inaktiven Protein mit einem Molekulargewicht von 110 kDa, das durch die Acetyltransferase HlyC im Zytoplasma durch die Fettsäure-Acylierung der Lysin-Reste Lys564 (K564) und Lys690 (K690) posttranslational modifiziert wird [35, 36]. Diese Modifikation durch Verknüpfung mit langkettigen Fettsäuren erhöht die Hydrophobizität des α -Hämolsins, ist aber für die Sekretion nicht notwendig [37]. Intrazellulär verbleibt das acylierte Hämolsin aufgrund einer niedrigen zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration in einer noch inaktiven und flexiblen Form, die einen Transport über die bakteriellen Membranen ermöglicht [38]. Das α -Hämolsin wird abhängig von einer C-terminalen Signalsequenz durch das Sec-unabhängige Typ I-

Sekretionssystem über die innere und äußere Membran in einem Schritt ohne Aufenthalt im Periplasma über die Membran transloziert. Nach erfolgter Sekretion des α -Hämolytins wird der C-Terminus nicht abgespalten [39, 40]. Der Transportkomplex besteht aus den Proteinen HlyB, HlyD und TolC, in dem das Hämolytin als erstes mit dem Transmembranprotein HlyB (ABC-Transporter), das eine zytoplasmatische ATP-Domäne besitzt, in der inneren Membran in Kontakt tritt. Kommt es zu einer substratspezifischen Bindung von HlyA mit HlyB und der Assoziation mit HlyD wird das multifunktionelle Protein TolC rekrutiert, das den letzten Schritt in der Translokation des Hämolytins einleitet und das Toxin nach außen schleust. Der energieabhängige Export von Hämolytin wird durch die Bindung und Hydrolyse von ATP realisiert [41]. Nach erfolgreicher Sekretion dissoziiert der HlyB/HlyD/TolC-Komplex in seine Komponenten und das Hämolytin kann sowohl frei, in löslicher Form oder aber auch mit Außenmembranvesikeln assoziiert vorkommen. Für Letzteres ist eine verbleibende Assoziation mit der äußeren Membran ursächlich und führt zu einer gesteigerten Stabilität und höheren hämolytischen Aktivität des Hämolytins. [42, 72]. Während der Translokation verbleibt das α -Hämolytin in seiner inaktiven Form und wird erst außerhalb der Zelle durch Ca^{2+} -Bindung an die glycinreichen Tandemwiederholungen, was die Ausbildung eines β -Faltblatts zur Folge hat, aktiviert [43]. Wie bereits erwähnt, bewirkt die Bindung von HlyA an eine Vielzahl von eukaryotischen Zellen eine Zellyse. Bisher konnte allerdings kein spezifischer Rezeptor für HlyA identifiziert werden. Man geht daher von einer unspezifischen Bindung an die Membranen eukaryotischer Zellen aus, was durch die generelle Fähigkeit der Porenbildung in Biomembranen und dem breiten Spektrum an Zielzellen untermauert werden kann [44]. Die Bindung von α -Hämolytin an die Wirtszelle scheint zunächst reversibel zu sein, bevor es irreversibel in die Wirtszellmembran integriert wird [45]. Dies bewirkt in der eukaryotischen Membran die Bildung einer 2 nm großen, kationselektiven, spannungs- und pH-abhängigen Pore. Unter dem Einfluss hoher Toxinkonzentrationen kommt es durch diesen Mechanismus zu einer Perforation und folglich zur Lyse der Zelle [44, 46]. In sublytischen Konzentrationen bewirkt HlyA eine Vielzahl zellulärer Antworten, die beispielsweise die Prostazyklinsynthese induzieren, die Zytokinproduktion beeinflussen oder aber auch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren (u.a. Leukotriene, Histamine, Serotonine und Hydroxyeicosatetraensäuren) stimulieren [24, 47-49].

1.4 Außenmembranvesikel (OMV)

1.4.1 Produktion von OMV

Das Abschnüren von Außenmembranvesikeln (OMV - *outer membrane vesicles*) ist innerhalb der gramnegativen Bakterien inklusive vieler pathogener Stämme ein konservierter gesteuerter Mechanismus, der unter natürlichen Wachstumsbedingungen in Biofilmen, auf festem Agar, in eukaryotischen Zellen, *in vivo* und *in vitro* auftritt [50, 51]. Die maximale Produktion an OMV, deren Größen im Bereich von 10 nm - 250 nm liegen erfolgt am Ende der exponentiellen Wachstumsphase [52, 53]. Sie erfüllen diverse Funktionen, abhängig von der Spezies und den Kulturbedingungen, denn die bakterielle Genexpression und die damit verbundene Zusammensetzung der äußeren Membran ist im höchsten Maße variabel. OMV entstehen durch Ausknospung, indem sich die äußere Membran von der darunterliegenden Peptidoglykanschicht löst und sich so weit ausbeult, bis sich die zukünftige Vesikelmembran abspaltet. Die OMV-Biogenese hängt in der produzierten Größe und Anzahl stark von verschiedenen Faktoren ab. So werden OMV an Orten der äußeren Membran mit wenigen Verbindungen zur Peptidoglykanschicht über Lpp (Brauns Lipoprotein), mit einer reduzierten Peptidoglykan-Hydrolaseaktivität und mit vielen akkumulierten, fehlgefalteten Proteinen verstärkt gebildet [54, 55]. Je nach Größe des Areal werden kleinere oder größere OMV gebildet. Auch durch eine äußere Anlagerung von LPS-assoziierten Proteinen oder anderen Molekülen kann es in der gebildeten Lipid-Mikrodomäne ladungsabhängig zu einer Wölbung der äußeren Membran kommen und somit die Bildung der OMV positiv beeinflussen. Wird die äußere Membran engmaschig mit der der Peptidoglykanschicht quervernetzt, führt dies zu einer Hypervesikulation. Eine temperaturabhängige Vesikelproduktion konnte in mehreren Spezies beobachtet werden. So produziert *E. coli* bei einer höheren Temperatur mehr Vesikel, was in erster Linie der erhöhten Membranfluidität zuzuschreiben ist [54]. Bei den Spezies *Shewanella livingstonensis*, *Bartonella henselae* und *Serratia marcescens* hingegen bewirkt eine verringerte Temperatur eine vermehrte OMV-Abschnürung [56-58]. Der mechanistische und funktionelle Zusammenhang für dieses Phänomen ist bisher ungeklärt.

1.4.2 Funktion von OMV

Da die Außenmembranvesikel aus der Abschnürung der äußeren Membran resultieren, beinhalten diese periplasmatische Proteine, Phospholipide und auch Lipopolysaccharide [59, 60]. OMV fungieren in erster Linie als Transportvehikel für bakterielle Toxine, Proteasen und Peptidasen und Faktoren für die Eisenaufnahme, dienen aber auch dem Export von missgefalteten Proteinen, der Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten durch den Transit von Signalmolekülen, dem Inaktivieren von antimikrobiellen Substanzen und Phagen oder der Modulation des Immunsystems [61-66]. Darüber hinaus konnte aus OMV auch genetisches Material isoliert werden, weshalb sie zur genetischen Diversität und zur Verbreitung von Resistenzen beitragen können [67]. Die prominentesten Vertreter der in OMV gefundenen Toxine sind das Zytolysin A, das α -Hämolysin aus *E. coli*, das Leukotoxin aus *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, das hitzelabile Enterotoxin enterotoxischer *E. coli* und das EHEC-Hämolysin aus enterohämorrhagischen *E. coli* [62, 69-72]. Die Verpackung von Toxinen und anderen bereits genannten Faktoren in OMV ermöglicht eine Anreicherung und zudem auch eine Kombination mit anderen zellschädigenden Agenzien sowie einen physiologischen Schutz des Vesikelinhaltes. Aufgrund der Abstammung der OMV von der äußeren Membran verfügen sie über oberflächenassoziierte Adhäsionsfaktoren, die in der Lage sind, mit der Wirtszelle zu interagieren. Im Falle von einigen Toxinen, wie dem hitzelabilen Enterotoxin (LT) aus ETEC, wird die Adhäsion und Internalisierung der OMV direkt durch das Molekül selbst veranlasst [71, 73]. OMV sind zudem reich an oberflächenassoziierten Antigenen, die als Stimulatoren das Immunsystem aktivieren und eine Immunantwort induzieren können. Ausgehend von den beschriebenen proteolytischen und adhäsiven Eigenschaften sowie ihrer geringen Größe sind OMV, anders als ganze Bakterienzellen, in der Lage, auch tief im Gewebe mit den eukaryotischen Wirtszellen zu interagieren. Aufgrund dieser Eigenschaften werden OMV immer häufiger funktional genutzt, um sie als therapeutische Vehikel für den Transport verschiedener Agenzien zur Zielzelle einzusetzen [74, 75]. Beispielsweise können Antigene zur Aktivierung des Immunsystems mit dem bakteriellen Hämolysin ClyA zu einem chimären Protein fusioniert werden, um die Antigenpräsentation gerade für Proteinuntereinheiten zu verbessern und die Immunantwort effizienter zu machen [76, 77].

1.5 Membranassoziiertes α -Hämolyisin in Außenmembranvesikeln

Wie bereits im Abschnitt 1.3 erwähnt, existiert das sekretierte α -Hämolyisin (HlyA) aus *E. coli* nicht nur als frei lösliches Toxin, sondern ist größtenteils membrangebunden in den OMV zu finden. Typischerweise wird das Toxin über die äußere Membran von innen nach außen transloziert und freigesetzt, dabei verbleiben teilweise HlyA-Moleküle an der äußeren Membran gebunden und werden durch die willkürliche Bildung der OMV auf der Zelloberfläche zufällig mit eingebunden. Wie das α -Hämolyisin mit der Membran im Detail assoziiert ist, konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Bekannt ist, dass das Toxin fest in der Membranstruktur der OMV vorliegt und nur ein Teil der Molekülstruktur exponiert ist [42]. Die Membranassoziation von Hämolyisin bietet dem Erreger gegenüber dem freien Hämolyisin den Vorteil der besseren Stabilität und der verlängerten Wirksamkeit [72]. Unter extraintestinalen *E. coli* ist der OMV-vermittelte Transport von aktivem α -Hämolyisin weit verbreitet. Pathogene *E. coli*-Stämme produzieren in der Regel deutlich mehr OMV als die apathogenen Vertreter [70], was als Indiz für eine sehr wesentliche Rolle in der Pathogenität gelten kann. Innerhalb der hämolytischen Stämme produzieren die prokaryotischen Zellen zwar ähnliche Mengen an OMV, jedoch liegen vom sekretierten α -Hämolyisin unterschiedliche Mengen assoziiert an OMV vor. Zudem unterscheiden sich die hämolyisintragenden OMV von anderen OMV durch einen größeren Durchmesser, eine geringere Dichte und durch ein unterschiedliches Proteinspektrum [42].

1.6 Der Motilitätsapparat uropathogener *E. coli*

1.6.1 Die Funktion der Flagelle

Ein bisher nicht erwähnter, aber doch ganz wesentlicher Virulenzfaktor für UPEC ist die Flagelle und die damit verbundene Motilität und zielgerichtete Chemotaxis, die eine Fortbewegung zu günstigeren Lebensbedingungen ermöglicht. Uropathogene *E. coli* sind peritrich lateral begeißelt und können sich mit Hilfe der Flagellen von der Harnröhre über die Harnblase auch in die oberen Harnwege hin ausbreiten. So konnte *in vivo* gezeigt werden, dass die ascendierende Wanderung des uropathogenen Stammes CFT073 von der Harnblase zur Niere mit der Expression der Flagellenuntereinheit FliC korreliert. Die Anwesenheit von FliC fördert nicht nur die Etablierung einer Pyelonephritis, sondern spielt auch bei der weiteren Ausbrei-

tung im Blut und der Persistenz im Urothel eine wichtige Rolle [78, 79]. Allerdings stellt die Flagelle nur einen Fitnesszugewinn und keinen exklusiven Vorteil dar, da UPEC auch ohne die flagellenvermittelte Motilität und Chemotaxis durchaus virulent sein können. In enteropathogenen *E. coli* fungieren Flagellen als wichtige Adhäsionsfaktoren, deren Expression erst bei Anwesenheit von Epithelzellen induziert wird [80]. Auch konnte gezeigt werden, dass die Invasion enterohämorrhagischer *E. coli* in das intestinale Epithelium in Verbindung mit der Synthese von FliC steht [81]. Dies konnte jedoch bei der Untersuchung von *fliC*-defizienten Zellen des uropathogenen Stammes UT189 für die Invasionseffizienz in uroepitheliale Wirtszellen nicht nachgewiesen werden [79]. Zudem wird auch vermutet, dass die Flagellen den Kontakt zwischen Bakterienzellen initiieren können und somit zur Biofilmentstehung beitragen [82, 83].

Der diarrhöauslösende und polar begeißelte Keim *Campylobacter jejuni* benötigt die Flagelle zur Kolonisierung des Darms und sekretiert über das Flagellensystem sogar Virulenzfaktoren, die als Cia (*Campylobacter invasion antigens*)-Proteine bezeichnet werden [84].

Auch in *Yersinia enterocolitica* werden virulenzassoziierte Proteine wie beispielsweise die Phospholipase YpIA über den Flagellenapparat sekretiert. Dieser Vorgang ist dem Typ III-Sekretionssystem sehr ähnlich [85].

In *Legionella sp.*, die einen biphasischen Lebenszyklus aufweisen, werden die Flagellen zu Beginn der transmissiven Phase gebildet, die sich der replikativen unbegeißelten Phase anschließt. Diese virulente Eigenschaft ermöglicht es den Legionellen, extrazellulär neue Wirtszellen zu infizieren, um dann wiederum intrazellulär in die replikative, unflagellierte Phase überzugehen [86, 87].

Aufgrund der exponierten Struktur der Flagelle weist vor allem die Strukturuntereinheit Flagellin als ein pathogenassoziiertes molekulares Muster (*pathogen-associated molecular pattern*, PAMP) sehr starke antigene Eigenschaften zur Aktivierung des Immunsystems warmblütiger Organismen auf [88, 89].

1.6.2 Der Aufbau der Flagelle

Die bakterielle Flagelle besteht aus einem 5-20 µm langen Filament, das über einen Haken mit dem Basalkörper verbunden ist. Über den Basalkörper ist die Flagelle in der Zellhülle verankert und dieser stellt den Motor für die Flagellenbewegung dar. Er ist sowohl in die innere als auch in die äußere Membran integriert und durchdringt somit den periplasmatischen Raum. Es handelt sich hierbei um einen zentralen Stift bestehend aus verschiedenen Ringstrukturen in der inneren Membran, in der Peptidoglykanschicht und in der Lipopolysaccharidschicht der äußeren Membran. Der zytoplasmatische C-Ring besteht aus den Proteinen FliN, FliM und FliG. Durch die Bindung von FliM mit dem Signalprotein CheY wird die Flagelle mit dem Chemotaxissystem verbunden. Der MS-Ring (Zytoplasmamembran), P-Ring (Peptidoglykanschicht) und L-Ring (äußere Membran) schließen sich dem C-Ring an. Der MS-Ring (Rotor) wird von den Motorproteinen MotA und MotB, die den unbeweglichen Teil des Motors darstellen und die Energie der protonenmotorischen Kraft in eine Drehbewegung der Rotorproteine FliG umwandeln, umgeben. Unterhalb des C-Rings befindet sich als Komponente des MS-Rings ein Typ III-Sekretionssystem, worüber die FliC-Monomere des Filaments durch einen zentralen Kanal des MS-Rings transportiert werden. Von dort erfolgt der Transport der Monomere über den Basalkörper und den sich an den L-Ring anschließenden Haken, auch *Hook* genannt. Die FliC-Einheiten werden mit Hilfe des Kappenproteins FliD (*Tip*) an das distale Ende des wachsenden Filaments angeknüpft. Der *Hook* dient als flexible Verbindung zwischen dem Basalkörper und dem Filament. Er besteht aus FlgE-Einheiten, die die Bewegung des Rotors in eine Rotationsbewegung des Filaments umwandeln (Abb.2) [90-98].

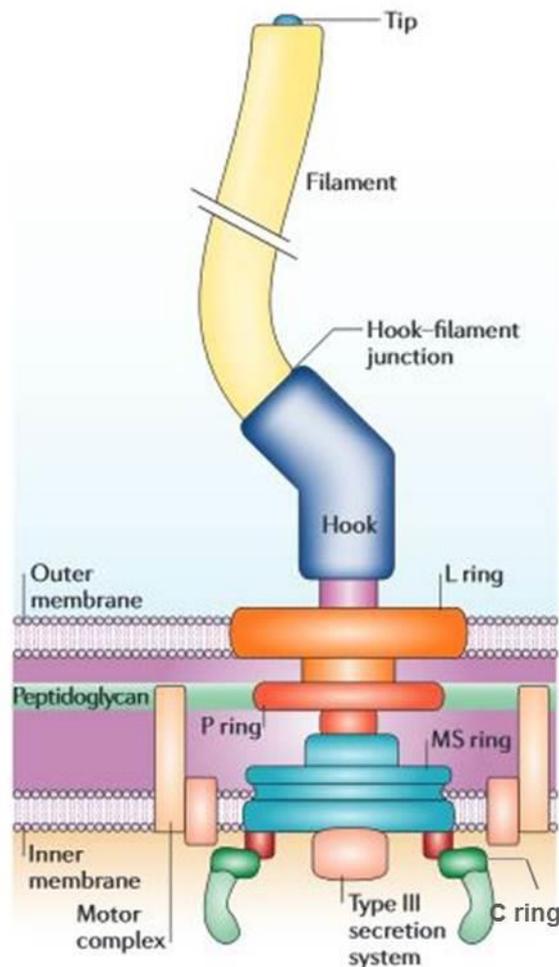


Abb. 2: Struktureller Aufbau der Flagelle. Der Basalkörper bildet eine tubuläre Struktur bestehend aus dem C-Ring, Ms-Ring, P-Ring und L-Ring. Daran schließt sich der Haken, „Hook“, als flexible Struktur an, die den Basalkörper mit dem Filament verbindet. Am distalen Ende des Filaments befindet sich eine Kappenstruktur (*Tip*) (Pallen und Matzke 2006).

1.6.3 Der regulierte Zusammenbau der Flagelle

Zur Synthese und vollständigen Funktion des gesamten Flagellen- und Chemotaxisystems werden mehr als 50 Gene benötigt, die hierarchisch exprimiert werden. Diese lassen sich in drei Klassen unterteilen, abhängig davon, auf welcher Ebene der Hierarchie ihre Expression erfolgt [99]. Dies wird als dreistufige Regulationskaskade bezeichnet und ist für peritriche Flagellensysteme charakteristisch. Das *flhCD*-Operon steht an erster Stelle (Klasse I) und kodiert die Hauptregulatoren, die die Expression der Gene der Klasse II zunächst zusammen mit σ^{70} induzieren. Zu dieser gehören Gene, die für den Aufbau des Basalkörpers, des *Hooks* und

des Typ III-Sekretionssystems benötigt werden, sowie die Gene *fliA* und *flgM*, die jeweils den alternativen Sigmafaktor σ^{28} und den Anti-Sigmafaktor kodieren. σ^{28} wird für die Transkription der Klasse III-Gene benötigt, wird aber durch die Bindung an den Anti-Sigmafaktor inaktiv gehalten. Auf diese Weise wird die hierarchische Genexpression mit der Assemblierung der Flagelle gekoppelt. Die Expression der späten Gene (Klasse III) erfolgt erst nach Zusammenbau des Basalkörpers, des Hakens und des Sekretionssystems. Über das funktionelle Typ III-Sekretionssystem wird der Anti-Sigmafaktor aus der Zelle transportiert. Die Expression der Gene der Klasse III führt zur Synthese von Flagellin, der Motorproteine und der Chemotaxiskomponenten [100, 101].

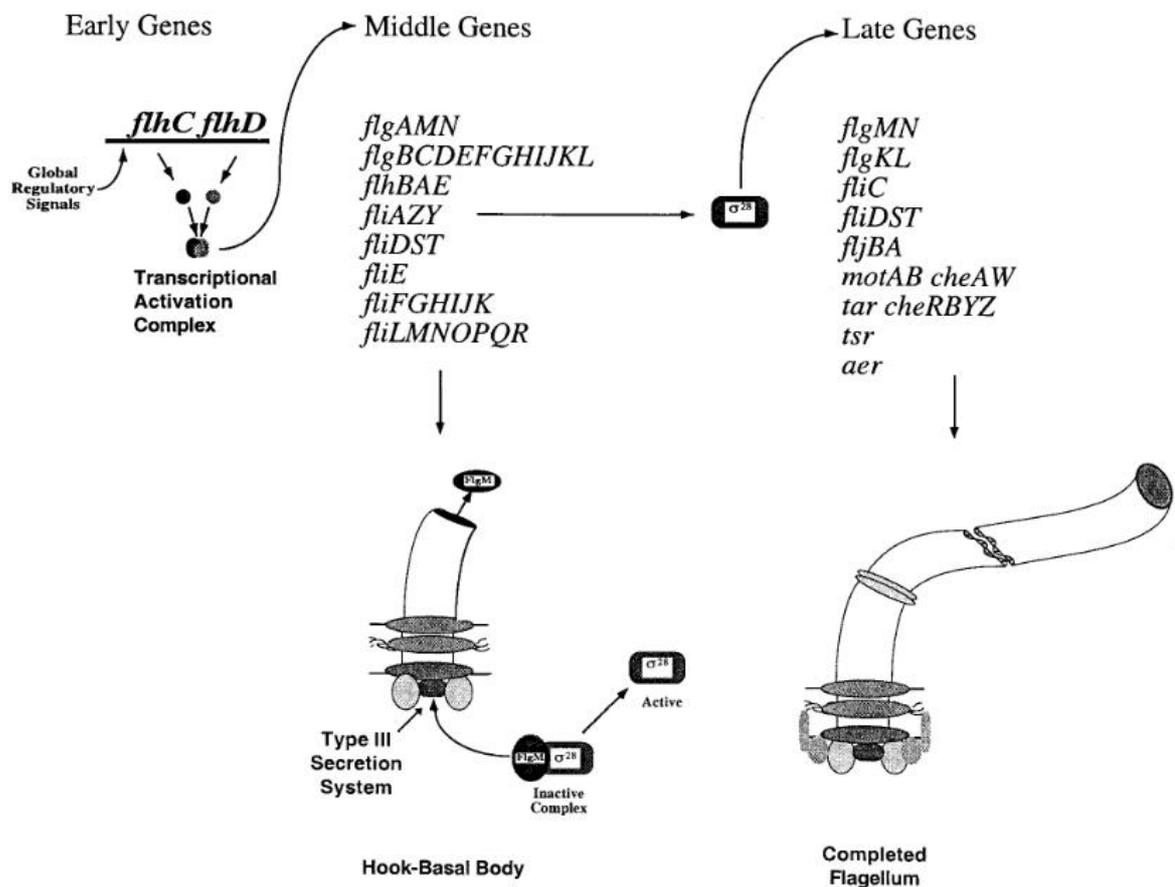


Abb. 3: Transkriptionelle Regulationskaskade der Flagellengene in Bezug auf die Assemblierung der Flagelle. Die frühen Gene (*early genes*) (Klasse I) kodieren die Transkriptionsaktivatoren, die wiederum die Expression der Klasse II-Gene (*middle genes*) induzieren, darunter Gene für den Basalkörper, das Typ III-Sekretionssystem und den Sigmafaktor/Anti-Sigmafaktor. Letztere induzieren die Expression der späten Gene (*late genes*) (Klasse III) (Chilcott und Hughes, 2000).

1.7 Das periplasmatische Chaperon SurA

1.7.1 Das Protein und seine Funktion

Das Protein SurA ist ein periplasmatisches Chaperon, das eine zentrale Rolle in der Biogenese integraler β -Fass Außenmembranproteine (OMP – *outer membrane protein*) spielt, hochkonserviert ist und in vielen Bakterienspezies vorkommt [102-104]. Die Namensgebung SurA (*survival protein A*) geht auf die erstmalige Identifizierung von *surA* (1990) als ein Gen zurück, das in Abwesenheit des Sigmafaktors σ^S für das Überleben in der stationären Phase von essentieller Bedeutung war [105, 106]. Die Primärstruktur des Syntheseproduktes von *surA* weist neben einem N-terminalen Signalpeptid (20 AS) vier charakteristische Domänen auf: eine N-terminale Domäne von 150 AS, zwei aufeinanderfolgende Parvulin-ähnliche Peptidyl-Prolyl-Isomerase-(PPIase) Domänen PI und PII von je ~100 AS und einen kurzen C-terminalen Teil von ~40 AS [107].

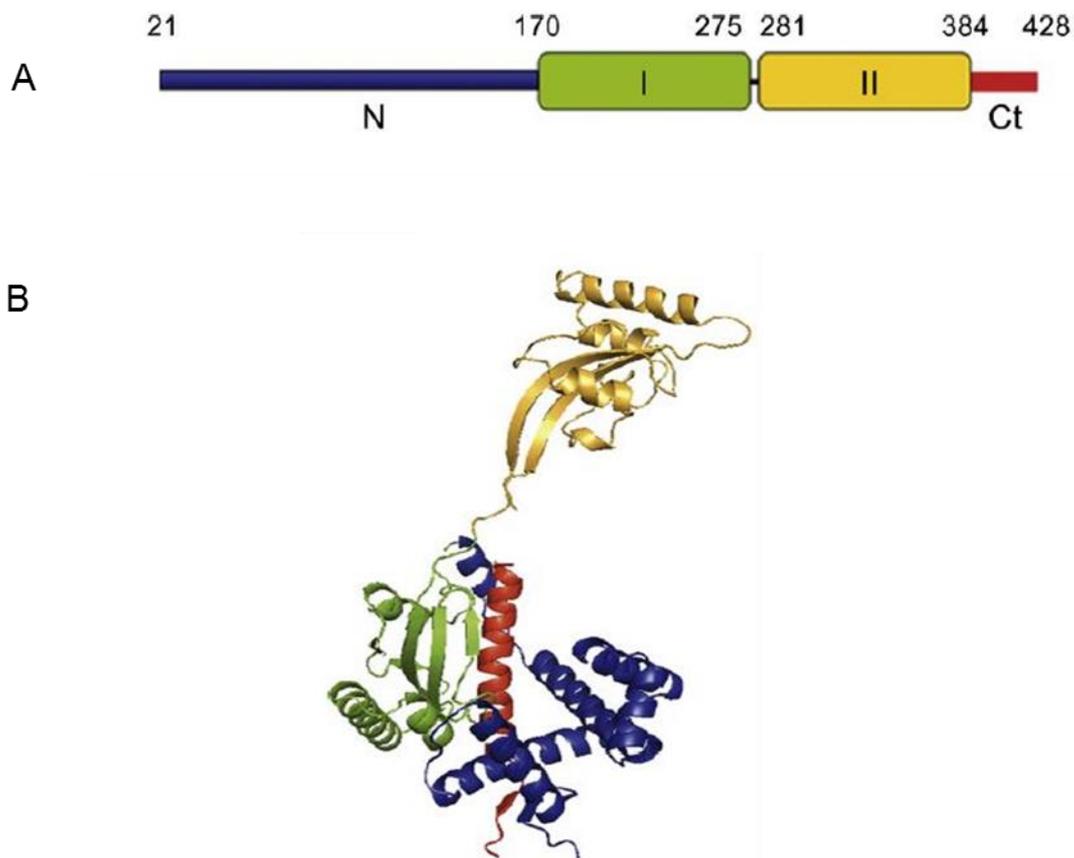


Abb. 4: Das Chaperon und die Peptidyl-Prolyl-Isomerase SurA aus *E. coli*. A) Schematische Darstellung der modularen Sequenzdomänen von SurA. Es ist das vollständige Protein ohne die N-terminale Signalsequenz (AS 1-20) gezeigt. Die Nummern oberhalb bezeichnen die Aminosäurepositionen des unprozessierten Polypeptids. Der blaue N-Terminus und der rot markierte C-Terminus zeigen die Regionen mit Chaperonaktivität. Die parvulinähnlichen PPIase Domänen I

und II sind grün und gelb dargestellt, wobei die Domäne I allein keine PPIase-Aktivität besitzt (Behrens et al., 2001). B) Darstellung der Tertiärstruktur von SurA mit den Domänen in den Farben wie in A gezeigt. Die N-terminale Region und die PPIase Domäne I bilden zusammen ein kompaktes, globuläres Kernmodul, das von der C-terminalen Helix durchquert wird. Außerhalb des Kernproteins ist die aktive PPIase Domäne II als sperate Komponente über zwei verlängerte Polypeptid-Verknüpfungen an das Kernprotein gebunden (Bitto und McKay, 2002).

In der Tertiärstruktur von SurA lagern sich die N- und C-terminale Domäne sowie die PI-Domäne zu einem globulärem Kernprotein zusammen, das über zwei lange Peptidlinker mit der PII-Domäne, auch als Satellitendomäne bezeichnet, verknüpft ist [108]. Der N-terminalen Domäne in Verbindung mit der C-terminalen Sequenz wurde eine Chaperonaktivität zugeordnet, da sie in einem *in vitro*-Testsystem die Aggregation hitzedenaturierter Citratsynthase verhindert. Von den beiden P-Domänen besitzt nur die PII-Domäne eine nachweisliche Peptidyl-Prolyl-Isomeraseaktivität mit kurzen synthetischen Peptidsubstraten. PI verhilft bei Anwesenheit allerdings zu einer effizienteren PPIase-abhängigen Faltung längerer Substrate. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass die Hauptfunktion von SurA jedoch in seiner durch den N- und C-Terminus vermittelten, von der PPIase-Aktivität unabhängigen Chaperonaktivität besteht. Ein Konstrukt ohne die beiden PPIase-Domänen komplementiert eine SurA-Deletion phänotypisch nahezu vollständig. Die N- und C-terminalen Domänen sind für die *in vivo*-Funktion von SurA hingegen essentiell [109].

Neuere Erkenntnisse zum molekularen Mechanismus der SurA-Funktion zeigten, dass die inaktive PI-Domäne eine Peptid-Bindeaktivität besitzt und es SurA ermöglicht, mit neusynthetisierten β -Fassproteinen zu interagieren [109, 110]. Eine Bindung eines Peptids in α -helikaler Konformation induziert eine Dimerisation von SurA-Proteinen. *In vitro* bindet SurA ungefaltete β -Fassproteine der äußeren Membran mit etwa 50facher Effizienz als andere vergleichbare zytoplasmatische und periplasmatische Chaperone. Einerseits dient SurA als Faltungshelfer in der frühen Phase der Assemblierung von OMP und andererseits scheint das Chaperon aber auch in der späten Phase mitzuwirken, da *in vivo* SurA direkt mit BamA, einer essentiellen Komponente der Insertionsmaschinerie für integrale β -Fassaußenmembranproteine, interagiert [104, 111, 112]. Ausgehend von diesen Befunden wurde ein Modell entwickelt, in dem OMP-Monomere nach der Sec-abhängigen Translokation über die innere Zytoplasmamembran im Periplasma von SurA gebunden, zur äußeren Membran befördert und dem Bam-Assemblierungskomplex übergeben werden [113]. Ob SurA hierbei direkt an Ba-

mA oder durch das gebundene Substrat mit dem Komplex interagiert, ist noch unklar. SurA ermöglicht neben der Faltung der OMP-Monomere wahrscheinlich auch eine gewisse Stabilisation der insertions- und assemblierungskompetenten Struktur der Faltungsintermediate. Identifizierte Substrate von SurA sind die OMP OmpA, OmpF, LamB, LptD und FhuA, deren Gehalt in der äußeren Membran einer *surA*-Mutante stark reduziert ist [102, 104, 113, 114]. Eine exklusive Rolle als Faltungshelfer besitzt SurA nur für die OMP LptD und FhuA. LptD bildet mit dem OM Lipoprotein LptE einen Komplex, der die Insertion von LPS in die äußere Membran vermittelt, so dass eine Mutation von *surA* eine Auswirkung auf die Membranintegrität der äußeren Membran auch durch resultierende verminderte LptD Level haben könnte [114-116]. Die anderen, bereits genannten OMP können redundant auch durch die periplasmatischen Chaperone Skp und DegP gefaltet werden, auch wenn sie eine bevorzugte Affinität bei der Assemblierung zu SurA haben [113]. Auch wenn Proteomanalysen des K-12-Stammes zunächst auf ein kleines Spektrum an SurA-abhängigen β -Fass-OMP hinwiesen, konnten in pathogenen *E. coli* und verwandten Organismen weitere SurA-Substrate identifiziert werden. So wird beispielsweise die Biogenese der Porenproteine FimD und PapC, die für eine funktionelle Assemblierung der Typ 1- und P-Fimbrien uropathogener *E. coli* von essentieller Bedeutung sind, von SurA beeinflusst [117]. Des Weiteren sind das Adhäsin Intimin und die Protease-Autotransporter Proteine EspP und Hbp aus enteropathogenen und enterohämorrhagischen *E. coli* sowie der Autotransporter IcsA des fakultativ intrazellulären Pathogens *Shigella flexneri* nachgewiesene Substrate von SurA [118-121].

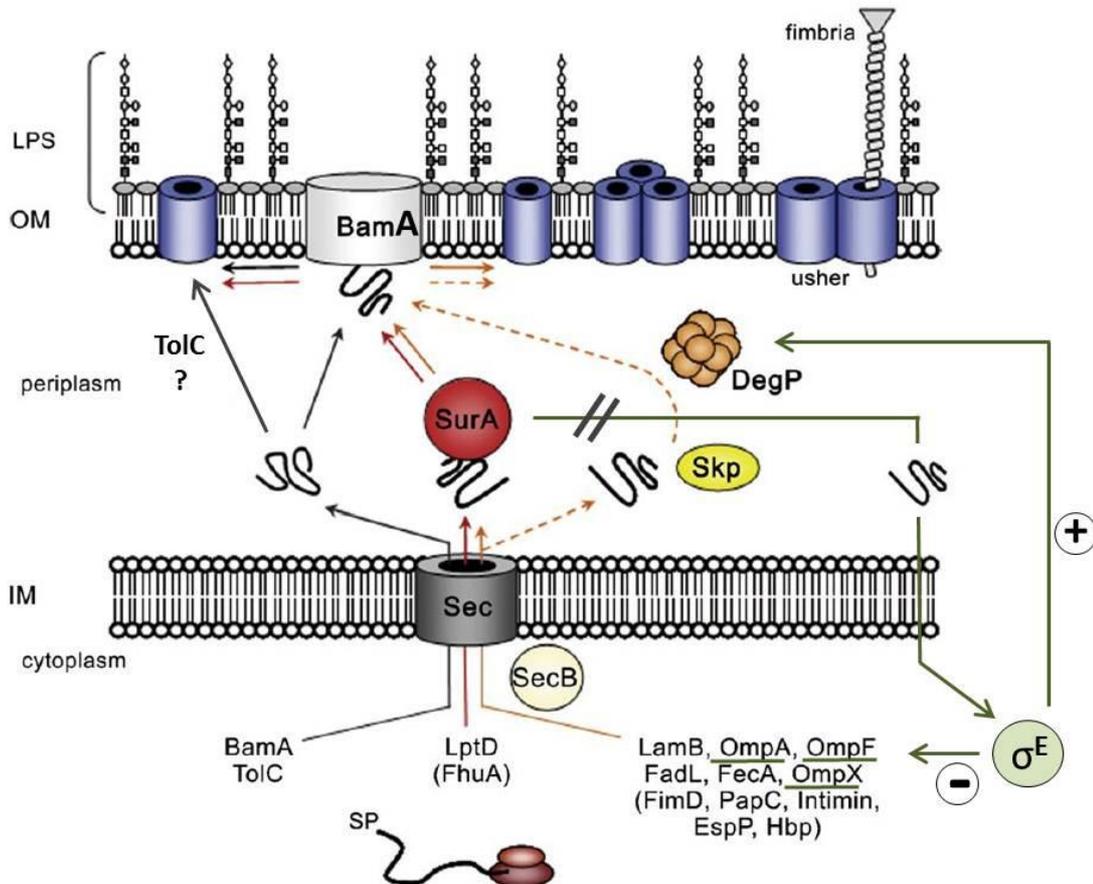


Abb. 5: Gegenwärtiges Modell zur Rolle von SurA in der Biogenese von β -Fass-OMP in *E. coli*. Nach der Synthese im Zytoplasma werden die β -Fass-OMP Sec-abhängig über die innere Membran (IM) ins Periplasma transloziert. Die N-terminale Signalpeptidsequenz (SP) wird durch die SP-1 leader Peptidase prozessiert. Durch periplasmatische Chaperone (SurA, DegP, Skp und womöglich andere noch unbekannte) werden die Proteine durch das Periplasma zum Bam-Komplex für den Zusammenbau und Einbau in die äußere Membran (OM) transportiert. Blau dargestellt sind die fertigen OMP. Einige Substrate sind SurA-spezifisch (durchgehende rote Pfeile) andere Substrate präferieren SurA (durchgehende orangene Pfeile), können aber auch durch andere Chaperone gebunden werden (gestrichelte Pfeile). In einer *surA*-Mutante wird die σ^E -vermittelte extrazytoplasmatische Stressantwort durch akkumulierte fehlgefaltete Proteine im Periplasma induziert (grüne Pfeile). Der Sigmafaktor E (σ^E) beeinflusst die Expression von *degP* und *omp* (modifiziert nach Vertommen et al., 2009 und Behrens-Kneip 2010 [114, 122]).

Die äußere Membran gramnegativer Bakterien besteht aus einem stabilen Netzwerk aus Lipopolysacchariden, OMP und kovalenten Kationen. Das Verhältnis zwischen LPS und den OMP ist maßgeblich für die Funktion der äußeren Membran als Schutzbarriere verantwortlich. In einer *surA*-Mutante gerät dieses Verhältnis aufgrund des mangelnden Einbaus von OMP in die äußere Membran aus dem Gleichgewicht und führt zu einer fehlerhaften Membranintegrität. Die Folge ist eine erhöhte Sensitivität gegenüber Detergenzien (SDS-EDTA, Gallensalz), bestimmten Antibiotika und hydrophoben Farbstoffen [102, 104]. Darüber hinaus führt das Fehlen von SurA ganz allgemein zu einem periplasmatischen Faltungsstress und

zur Akkumulation von ungefalteten Proteinen im Periplasma, was sich in der Aktivierung von mindestens drei der fünf bekannten Signaltransduktionswege bei Stress in der Zellhülle und der konstitutiven Induktion der σ^E -vermittelten extrazytoplasmatischen Stressantwort äußert. Neben der verstärkten Expression von periplasmatischen Proteasen und anderen Faltungshelferproteinen kommt es im Zuge der σ^E -vermittelten Stressantwort zu einer verminderten Expression der OMP OmpA, OmpC, OmpF und LamB. Dies wird durch die Induktion von runterregulierenden „*small RNAs*“ auf Transkriptebeane realisiert, was zusätzlich zu dem auftretenden Assemblierungsdefekt die geringe Abundanz der OMP in der äußeren Membran der *surA*-Mutante erklärt [123-125]. Weiterhin konnte eine konstitutive Aktivierung der beiden 2-Komponentensysteme CpxA/R und RcsCD/B in *surA*-defizienten Zellen nachgewiesen werden [126, 165]. Eine Aktivierung erfolgt durch Veränderungen in der Zusammensetzung der äußeren Membran sowie durch Adhäsion der Zellen an solide Oberflächen [127]. Das RcsCD/B-System nimmt Einfluss auf die Zellhüllumstrukturierung während der Biofilmbildung auf festen Oberflächen, indem es die Expression von Fimbrien, Curli und Flagellen kontrolliert [128]. Da das CpxA/R-System unter anderem die Expression von Proteinfaltungs- und Degradationsfaktoren als Antwort auf einen periplasmatischen Faltungsstress hochreguliert, nimmt es eine zentrale Rolle bei der Proteinqualitätskontrolle in der Zellhülle ein [129, 130].

1.7.2 Die Rolle von SurA in der Virulenz uropathogener *E. coli*

Der erste Zusammenhang zwischen der SurA-Funktion und der Virulenz wurde in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium gezeigt. Die *surA*-defizienten Zellen waren in ihrer Fähigkeit, an eukaryotische Wirtszellen zu adhären und in diese zu invadieren, stark eingeschränkt [131, 132]. Deletiert man *surA* in dem uropathogenen *E. coli* Stamm UTI89, führt dies im Vergleich zum Wildtyp zu einer weit aus geringeren Anzahl an Typ 1-Fimbrien. Damit einhergehend sind die Bakterien deutlich weniger in der Lage an Epithelzellen des Urogenitaltraktes zu adhären bzw. zu invadieren, um sich in den Zellen ungestört unter Ausschluss des Immunsystems zu vermehren [117, 133]. Zusätzlich konnten auf der Zelloberfläche der *surA*-Mutante gebündelte Faserstrukturen gefunden werden, in denen via Immunfluoreszenzmikroskopie kein FimH nachgewiesen werden konnte. Wie bereits erwähnt (vgl. 1.7.1) bildet FimD eine Pore in der äußeren Membran, die für die

Sekretion und Assemblierung der einzelnen Pilus-Untereinheiten verantwortlich ist und zudem die Verankerung der Fimbrien vermittelt. Eine Deletion von *surA* führt nachweislich zu einem Defekt in der Typ 1-Fimbrien Biogenese und Morphologie [117, 133]. Die Ausbildung einer Zystitis durch uropathogene *E. coli* geht mit der Expression von Typ 1-Fimbrien einher, wodurch die Adhäsion durch das Adhäsins FimH vermittelt wird. Zusammen mit dem geringeren Vorkommen an intakten Typ 1-Fimbrien auf der bakteriellen Zelloberfläche zeigte eine UTI89-*surA*-Mutante *in vitro* und *in vivo* eine stark verminderte Adhäsions- und Invasionseffizienz an epitheliale Blasen Zellen. Da auch die Biogenese der PapC-Pore zur Sekretion und Assemblierung der P-Fimbrien durch SurA beeinflusst wird, könnte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen SurA und der Fähigkeit von UPEC zur Ausbildung einer Pyelonephritis bestehen. Des Weiteren mit dem Defekt der Fimbrien-Biogenese einhergehend, zeigt die UTI89-*surA*-Mutante einen Defekt in der Bildung von IBC, was sich durch eine verminderte Fähigkeit, in Wirtszellen zu persistieren, äußert. *In vivo* ließ sich nachweisen, dass die *surA*-Mutante zwei Wochen nach der Infektion aus einem Mausmodell vollständig eliminiert worden ist, während sich der Wildtyp ungehindert vermehren und ein Reservoir an IBC ausbilden konnte. Neben den Fimbrien konnte auch der Einfluss des OMP OmpA (Substrat von SurA) in der Biofilmbildung sowie bei der Adhäsion an bzw. Invasion in Wirtszellen gezeigt werden [133]. Zusätzlich zu der morphologischen Abhängigkeit struktureller Komponenten der Zelloberfläche von SurA bewirkt das Chaperon indirekt in wildtypischen Zellen des UTI89-Stammes eine Suppression der LPS-induzierten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen. SurA nimmt hierbei keinen Einfluss auf die Struktur des LPS per se, aber sehr wohl auf die Zusammensetzung der äußeren Membran. Ein geringerer Gehalt an OMP in einer *surA*-Mutante führt womöglich zu einer veränderten Präsentation der Zelloberfläche oder auch zum Fehlen zusätzlicher wichtiger Sekretionsfaktoren, so dass die Fähigkeit der Suppression verloren geht [29]. Auch die drei genannten Signaltransduktionswege, σ^E , CpxA/R und RcsCD/B (vgl. 1.7.1), spielen während der Pathogenese gramnegativer, virulenter Stämme eine wichtige Rolle, indem ein Zusammenhang zwischen dem CpxA/R-System und den Adhäsions- und Invasionsereignissen besteht und die σ^E -Antwort die Persistenz der Bakterien im Wirt begünstigt [134]. Letztlich muss betont werden, dass sich die pleiotropischen Defekte in *surA*-

defizienten Zellen sowohl durch die fehlende Assemblierung der OMP als auch durch die Veränderungen in der Genexpression äußern.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Das periplasmatische Chaperon SurA ist ein entscheidender Faltungshelfer für OMP, der einen pleiotropischen Einfluss auf die Zellhüllhomöostase und auf die Virulenz von uropathogenen *E. coli* hat. Bisher wurde der virulenzassoziierte Zusammenhang von SurA nur für den UPEC-Zystitis-Stamm UTI89 dokumentiert. Der Virulenzdefekt einer *surA*-Mutante wird dort hauptsächlich mit der geringeren Dichte an adhäsiven Typ 1-Fimbrien auf der Zelloberfläche in Verbindung gebracht. UPEC stellen durch ihre diversen Isolate eine phäno- und genotypisch sehr heterogene Gruppe dar. Die verschiedenen Isolate produzieren eine Vielzahl verschiedener Virulenzfaktoren in unterschiedlichen Kombinationen und Expressionslevel, die ihrerseits die Schwere der Infektion des unteren und oberen Urogenitaltrakts bestimmen.

In Vorarbeiten zu der hier vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit waren in der Arbeitsgruppe bereits erste Hinweise gesammelt worden, dass SurA auch weitere virulenzrelevante Eigenschaften der UPEC-Stämme 536 und CFT073 beeinflusst. So konnte in Vortests ein Einfluss von SurA auf die Größe der produzierten OMV, die Motilität und die hämolytische Aktivität festgestellt werden.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollten die *surA*-defizienten UPEC-Stämme nun phänotypisch weiter charakterisiert und der Effekt von SurA auf die genannten Virulenzeigenschaften näher untersucht werden. Hierfür sollte in phänotypischen Studien zunächst überprüft werden, ob die Deletion von *surA* in UPEC 536 und CFT073 ebenfalls in dem für apathogene *E. coli* beschriebenen Defekt der äußeren Membran sowie einer konstitutiven Induktion der σ^E -abhängigen Stressantwort resultiert. Da das Chaperon SurA auf die beiden genannten Eigenschaften Einfluss nimmt, sollten die von gramnegativen Bakterien produzierten OMV detaillierter analysiert werden. Im Zuge dieser Arbeit sollten die Auswirkungen auf die Größe und die Menge der produzierten Vesikel bei Abwesenheit des Chaperons SurA als globaler Faktor für die Struktur der äußeren Membran mittels Transmissionselektronenmikroskopie für einen pathogenen Stamm gezeigt werden. OMV spielen eine zentrale Rolle in der frühen Phase der Erreger-Wirt-Interaktion. Da sie von der äußeren Membran abstammen und verschiedene

Komponenten des Periplasmas mit sich führen, spiegeln sie einen maßgeblichen Ausschnitt des bakteriellen Zelloberflächenproteoms wider. Mit dem Ziel, weitere Proteine zu identifizieren, die direkt oder indirekt von SurA beeinflusst sind und zur Virulenz von UPEC beitragen, sollte die Proteinzusammensetzung der von UPEC 536 Wildtyp und *surA*-defizienten Zellen produzierten OMV mittels 2D-Gelelektrophorese und massenspektroskopischer Spotanalyse verglichen werden. Weiterhin gilt das α -Hämolyysin als wichtiger Virulenzfaktor in uropathogenen *E. coli*. Mit Hilfe qualitativer und quantitativer Hämolysetests sowie immunologischer Methoden sollte das Ausmaß des beobachteten hämolytischen Defektes der *surA*-Mutante näher bestimmt und den ihm zugrunde liegenden molekularen Ursachen nachgegangen werden. Die Sekretion des Toxins erfolgt über das TolC-abhängige Typ I-Sekretionssystem. Durch die vergleichende Analyse verschiedener Zellfraktionen (einschließlich der OMV-Fraktion) im immunochemischen Nachweis sollte daher geklärt werden, ob die verminderte hämolytische Kapazität *surA*-defizienter UPEC auf einen (beispielsweise infolge der gestörten Membranintegrität) indirekten Sekretionsdefekt, auf eine Verschiebung der Anteile an freiem und OMV-gebundenen HlyA und/oder auf eine verringerte Produktion des Toxins zurückzuführen ist.

Schließlich sollten durch RT-PCR und immunochemische Analysen sowie durch Studien der Morphologie der Flagellenstrukturen im Transmissionselektronenmikroskop die molekularen Mechanismen beleuchtet werden, die für den beobachteten Effekt von SurA auf die Motilität von UPEC ursächlich sind.

Diese wissenschaftliche Arbeit sollte zum besseren Verständnis der molekularen Mechanismen, die dem Einfluss von SurA auf die Virulenz von UPEC zugrunde liegen, beitragen.

2. Material

2.1 Bakterienstämme und Plasmide

Tab. 1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

Bezeichnung	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5α		
	F-, Ω 80 Δ lacZ Δ 15, Δ (argF lac), U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17, (rk-, mk-), supE44, thi-1, gyrA69, relA1 λ -	Hanahan, 1993
<i>E. coli</i> K-12		
YK410	Wildtyp	Heuner et al. 1996
YK4101	fliA	Heuner et al. 1996
<i>E. coli</i> 536 (Pyelonephritis-Isolat; O6:K15:H31)		
SB12000	Wildtyp	U. Dobrindt
SB12001	surA::kan	U. Dobrindt
SB12002	Wildtyp; pASK75; Amp ^R	S. Behrens-Kneip
SB12003	surA::kan; pASK75; Km ^R , Amp ^R	S. Behrens-Kneip
SB12004	surA::kan; pSurA; Km ^R , Amp ^R	S. Behrens-Kneip
SB12040	Δ surA	Nadja Bier
SB12045	Δ surA; pASK75; Amp ^R	diese Arbeit
SB12046	Δ surA; pASKSurA; Amp ^R	diese Arbeit
SB12053	fliC::cat; Cm ^R	S. Behrens-Kneip
SB12005	Wildtyp; pP3CAT; Amp ^R	S. Behrens-Kneip
SB12006	surA::kan; pP3CAT; Amp ^R	S. Behrens-Kneip
SB12010	Wildtyp; pKK232-8; Amp ^R	S. Behrens-Kneip
SB12011	surA::kan; pKK232-8; Amp ^R , Km ^R	S. Behrens-Kneip
SB12012	HDM Δ hlyI Δ hlyII	U. Dobrindt
SB12016	Δ hlyI Δ hlyII surA::kan	S. Behrens-Kneip
<i>E. coli</i> CFT073 (Pyelonephritis-Isolat; O6:K2:H1)		
SB13002	Wildtyp; pASK75; Amp ^R	S. Behrens-Kneip
SB13003	surA::kan; pASK75; Amp ^R	S. Behrens-Kneip
SB13004	surA::kan; pASKSurA; Amp ^R	S. Behrens-Kneip
SB13005	Wildtyp; pP3CAT; Amp ^R	S. Behrens-Kneip
SB13006	surA::kan; pP3CAT; Km ^R , Amp ^R	S. Behrens-Kneip
SB13010	Wildtyp; pKK232-8; Amp ^R	S. Behrens-Kneip
SB13011	surA::kan; pKK232-8; Km ^R , Amp ^R	S. Behrens-Kneip

***E. coli* UTI89 (Zystitis-Isolat; O18:K1:H7)**

SB 14002	Wildtyp; pASK75; Amp ^R	S.Behrens-Kneip
SB 14005	<i>surA</i> ::kan; pASK75; Km ^R , Amp ^R	S.Behrens-Kneip
SB 14006	<i>surA</i> ::kan; pSurA; Km ^R , Amp ^R	S.Behrens-Kneip

***E. coli* F11 (Zystitis-Isolat; O6:H31)**

SB 15004	<i>surA</i> ::kan; pASK75; Km ^R , Amp ^R	S.Behrens-Kneip
SB 15005	<i>surA</i> ::kan; pSurA; Km ^R , Amp ^R	S.Behrens-Kneip
SB 15006	Wildtyp; pASK75; Amp ^R	S.Behrens-Kneip

***Legionella pneumophila* (Lp.)**

Lp. Corby	Wildtyp; Patientenisolat	Jepras <i>et al.</i> 1985
Lp. Corby	<i>plaB</i>	Flieger <i>et al.</i> 2004
Lp. Corby	<i>plaB</i> pKH192	Flieger <i>et al.</i> 2004

Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Bezeichnung	Charakteristika	Referenz
pASK75	Expressionsvektor, P/O _{tet} , <i>tetR</i> , ColEI ori, Amp ^R	Skerra, 1994
pASKSurA (pSurA)	SurA unter Kontrolle eines Tetrazyklin-induzierbaren Promotors; Amp ^R	Behrens <i>et al.</i> , 2001
pKK232-8	Kontrollplasmid ohne Promotor für Chloramphenicol- bzw. Tetrazyklin resistenzgen; Amp ^R	Brosius J., 2003
pP3CAT	σ ^E -abhängiger Promotor für Chloram- phenicolresistenzgen; Amp ^R	Carol Gross, UC San Francisco

2.2 Zelllinien**Tab. 3: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien**

Bezeichnung	Charakteristika	Referenz
5637	Blasen-Karzinom-Epithelzellen ATCC:HTB-9	Welte <i>et al.</i> , 1985

2.3 Chemikalien und Laborkits

Tab. 4: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien

Chemikalie	Bezeichnung	Hersteller
Acetonitril	Acetonitril 99,9 %	Roth
Acrylamid-Lösung	Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Roth
Agar	Agar	Hartenstein
Agarose	peqGold Universal Agarose	PEQLAB
Ammoniumsulfat	Ammoniumsulfat	Roth
Ampholyte	Bio-Lyte 3/10 Ampholyte 40 %	Bio-Rad
APS	Ammoniumperoxodisulfat, Ammoniumpersulfat	Roth
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylhydrogen- phosphat-p-toluidin (1:1)	AppliChem
BSA	Bovines Serum Albumin, 98 %	Roth
Bromphenolblau	Bromphenolblau Natriumsalz	Roth
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	Kalziumchlorid-Dihydrat	Roth
Chaps	3-[(3-Chloramidopropyl)-Dimethyl- ammonio]-Propan-Sulfonat	VWR
Coomassie	Brillant Blau G 250	Roth
DEPC	DEPC; Diethylpyrocarbonat >97 %	Roth
DTT	1, 4–Dithiothreitol	Roth
EDTA	EDTA	Roth
Eisessig	Essigsäure, 100 %	Roth
Ethanol	Ethanol, reinst	Roth
Ethanol	Ethanol, vergällt	Roth
Ethidiumbromid	Ethidiumbromidlösung 1 %	Roth
Gelatine	Gelatine, Kristall reinst	Roth
Glutaraldehyd	Glutaraldehyd, 50 %	Roth
Glycerol	Glycerol, 87 %	AppliChem
Glycin	Glycin	Roth
Hefeextrakt	Bacto Yeast Extract	BD
Lowicryl HM20	Acrylatkunststoff	Polysciences, Inc.
Methanol	Methanol	Hartenstein
NaCl	Natriumchlorid	Roth
Natriumazid	Natriumazid	Roth
Natriumhydroxid	Natriumhydroxid-Plätzchen, 99 %	Roth
Paraformaldehyd	Paraformaldehyd, reinst	Roth
Phosphorsäure	ortho-Phosphorsäure	Roth
SDS	Roti-Stock 20 % SDS, Natriumlaurylsulfat	Roth

TEMED	TEMED, 99 %	Roth
TCA	Trichloressigsäure	Roth
TFA	Trifluoressigsäure 99,9 %	Roth
Thiourea	Thiourea	Fluka
Tris	Tris, Pufferan >99,3 %	Roth
Tris-HCl	Tris-Hydrochlorid	Roth
Triton X-100	Triton X-100	Roth
Trypton	Trypton/Pepton aus Casein	Roth
Tween 20	Tween 20 Ph.Eur.	Roth
Uranylacetat	Uranylacetat	Chemapol
Urea	Urea, ultrapur	Calbiochem

Tab. 5: In dieser Arbeit verwendete Laborkits

Bezeichnung	Hersteller
FastRNA [®] Pro Blue Kit	MP Biomedicals
NEFA C Kit	Wako
One Step RT-PCR Kit	Qiagen
Pierce [®] ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific
RNase Free DNase Set	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Trypsin Profile IGD Kit	Sigma
Jetstar Plasmid Midiprep Kit 2.0	Genomed

2.4 DNA- und Proteingrößenstandards

2.4.1 DNA-Größenstandard

Für die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen wurde der DNA-Standard „GeneRuler[™] 1 kb DNA Ladder“ verwendet.

Tab. 6: Fragmentgrößen des DNA-Standards

Fragment	Größe (bp)
1	10 000
2	8 000
3	6 000
4	5 000
5	4 000
6	3 500
7	3 000
8	2 500
9	2 000
10	1 500
11	1 000
12	750
13	500
14	250

2.4.2 Protein-Größenstandard

Für die Größenbestimmung von Proteinen in Acrylamidgelen wurde der Standard *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* von Fermentas verwendet.

Tab. 7: Bandengrößen des Protein-Standards

Protein	Größe (kDa)
1	250
2	130
3	100
4	70
5	55
6	35
7	25
8	15
9	10

2.5 Antibiotika

Für die Anzucht einiger verwendeter UPEC-Stämme war die Zugabe von Antibiotika in die Kulturmedien bzw. Agarplatten notwendig. Alle Antibiotika wurden von der Firma Roth bezogen. Für den Novobiocin-Sensitivitätstest wurden kommerziell erhältliche Novobiocin-Plättchen (30 µg/Plättchen) verwendet.

Tab. 8: In dieser Arbeit verwendete Antibiotikazusätze

Antibiotikum	Lösungsmittel	Endkonzentration (µg/ml)	Hersteller
für Nährböden und Medien			
Ampicillin (Ampicillin Natriumsalz)	H ₂ O _{dest}	100	Roth
Chloramphenicol	Ethanol	40	Roth
Kanamycin (Kanamycinsulfat)	H ₂ O _{dest}	40	Roth
Novobiocin	In Form von Plättchen	30 µg	Oxoid

2.6 Antikörper

Tab. 9: In dieser Arbeit verwendete Antikörper

Bezeichnung	Charakteristika	Bezugsquelle
α-EF-TU	Primärantikörper aus der Maus gegen <i>E. coli</i> EF-Tu	Hycult Biotech
α-FliC	Primärantikörper aus dem Kaninchen gegen <i>L. pneumophila</i> FlaA (1:750); kreuzreaktiv mit <i>E. coli</i>	Klaus Heuner
α-HlyA	Primärantikörper aus dem Kaninchen gegen <i>E. coli</i> HlyA	V. Koronakis (University of Cambridge, UK)
α-HlyA	Primärantikörper aus der Maus gegen <i>E. coli</i> HlyA, monoklonal, Epitop E2	[135]
α-Kaninchen IgG, HRP	Sekundärantikörper gegen IgG aus dem Kaninchen gekoppelt mit Meerrettichperoxidase (1:10 000)	Dianova
α-Maus IgG, HRP	Sekundärantikörper gegen IgG aus der Maus gekoppelt mit Meerrettichperoxidase (1:10 000)	Dianova

2.7 Enzyme

Tab. 10: In dieser Arbeit verwendete Enzyme

Bezeichnung	Charakteristika	Hersteller
DNase	DNase I	AppliChem
Lysozym	Lysozym aus dem Hühnerei	Sigma-Aldrich
Protease-Inhibitor	inhibiert Serin-, Cystein- und Metalloproteasen	Roche
TopTaq	DNA-Polymerase	Qiagen
Trypsin	Serinprotease	Sigma-Aldrich

2.8 Geräte und Software

Tab. 11: In dieser Arbeit verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Agarosegelapparatur	Biorad Sub-Cell 192
Autoflex II	Bruker
Autoklav	Webeco
Brutschrank	Schütt Incudrive-S
Eismaschine	Scotsman AF 80
Elektroporator	Biorad Gene Pulser Xcell
Entwicklermaschine	AGFA Curix 60
Feinwaage	Sartorius AG Mechatronik
Gefrierschrank (-20 °C)	Privileg ProComfort
Gefrierschrank (-80 °C)	Sanyo Ultra Low
Geldokumentationsanlage	Alphamager TM 2200
Grobwaage	PLS 2100-2
IEF-Kammer	Biorad Protean [®] IEF Kammer
Kamera CCD „Slow Scan“	ProScan
Kamera CCD Megaview III	Olympus
Kühlschrank	Privileg Super Energiesparer
Kühlzentrifuge (groß)	HERAEUS Multifuge 1L-R
Kühlzentrifuge (klein)	Centrifuge 5417R, Eppendorf
Magnetrührer mit Heizelement	Hartenstein
Mikrowelle	Privileg
NanoDrop [®] ND 1000	Thermo Scientific
Netzgerät	Biorad Power Pac Universal
Nitrozellulosemembran	Hartenstein
PCR-Gerät	Biometra T3000 Thermocycler
PerfectBlue Semi-Dry-Elektrolyt	PeqLab

pH-Meter	Mettler Toledo FiveEasy™
Photometer	Thermo Scientific Genesys 10 Bio
Pipetten	Eppendorf Research
Proteingelkammer (groß)	Biorad Protean® II xi
Proteingelkammer (klein)	Biorad Mini-Protean Tetracell Kammer
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific Model G25 Shaker Incubator
Sterilwerkbank	Thermo Scientific Herasafe KS
Thermoblock	BioTDB-100
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer comfort
Tischzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5424
Transmissionselektronenmikroskop Tecnai BioTwin	FEI Company
Transmissionselektronenmikroskop EM 902	Zeiss
Ultraschallsonde	Bandelin Sonopuls
Ultrazentrifuge	
Vortexer	Harmony Mixer UZUSIO VTX-3000L
Whatman-Filterpapier	Hartenstein

Tab. 12: Verwendete Software

Bezeichnung	Hersteller
Delta2D	Decodon
FlexAnalysis	Bruker Daltonik
FlexControl	Bruker Daltonik
GraphPad Prism 5	GraphPad Software
Microsoft Office 2010	Microsoft
Photoshop C56	Adobe

3. Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Die Anzucht von apathogenen und uropathogenen *E. coli* erfolgte durch Animpfen mit Koloniematerial von einer LB-Agarplatte in LB-Flüssigmedium ggf. supplementiert mit Antibiotika bei 37 °C und 350 rpm. Für Übernachtskulturen wurden jeweils 5 ml Kulturvolumen angeimpft und größere Kulturen aus diesen Vorkulturen in 100facher Verdünnung überimpft.

LB-Nährböden

12 g Agar
10 g Bacto Trypton
5 g Hefe-Extrakt
5 g NaCl
in 1000 ml H₂O_{dest.} lösen und autoklavieren

LB-Flüssigmedium

10 g Bacto Trypton
5 g Hefe-Extrakt
5 g NaCl
in 1000 ml H₂O_{dest.} lösen und autoklavieren

Je nach Bedarf wurden die Nährböden und Medien durch Antibiotika supplementiert (Tab. 8)

3.1.2 Kultivierung von *Legionella pneumophila*

Die Stammkulturen wurden zunächst auf BCYE-Nährböden ausgestrichen und für 2-3 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Für die Vor- und Hauptkulturen wurden sterilee YEB- Flüssigmedien mit Koloniematerial angeimpft und bei 37 °C und 5 % CO₂ geschüttelt.

BCYE-Nährböden

10 g ACES

10 g Hefe-Extrakt

in 1000 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ lösen und den pH-Wert mit 10N KOH auf 6,9 einstellen und

Zugabe von:

2 g Aktivkohle

15 g Agar

Lösung autoklavieren, nach dem Abkühlen auf 50 °C erfolgte die Zugabe von sterilfiltriertem

0,4 g L-Cystein in 10 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$

0,25 g $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{NO}_3)_3 \times 9 \text{H}_2\text{O}$ in 10 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$

YEB-Flüssigmedium

10 g ACES

10 g Hefe-Extrakt

in 1000 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ lösen und den pH-Wert mit 10N KOH auf 6,9 einstellen und

Zugabe von:

0,4 g L-Cystein in 10 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$

0,25 g $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{NO}_3)_3 \times 9 \text{H}_2\text{O}$ in 10 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$

Lösung in sterile Schott-Flasche sterilfiltrieren (Porengröße 0,22 µm)

3.1.3 Konservierung von Bakterien

Zur langfristigen Lagerung von *E. coli*-Stämmen wurden 1200 µl einer 5 ml Übernacht-Kultur mit 400 µl sterilem 50%igem Glycerol vermischt und in einem Cryo-Röhrchen bei -80 °C eingefroren.

3.1.4 Herstellung elektrokompetenter Zellen

E. coli ist unter natürlichen Bedingungen in geringer Effizienz in der Lage genetisches Material aus der Umgebung aufzunehmen. Um die DNA-Aufnahme zu steigern und Plasmide in hoher Effizienz in Bakterien einzubringen, gibt es in der Molekularbiologie verschiedene Verfahren, die die Permeabilität der Zellmembran und der äußeren Membran kurzzeitig erhöhen. So kann man *E. coli* mittels Glycerol elektrokompetent machen und anschließend durch Elektroporation genetisches Material in die prokaryotischen Zellen einbringen (Transformation).

Für die Generierung der Stämme 536 $\Delta surA$ pASK75 und 536 $\Delta surA$ pSurA wurden zunächst aus dem Stamm 536 $\Delta surA$ elektrokompetente Zellen wie folgend beschrieben hergestellt. Aus einer Übernachtskultur wurden 50 ml frisches LB-Flüssigmedium 100fach neu angeimpft und die Zellen wurden bei einer OD_{600} von 0,8 geerntet, in dem sie für 10 Minuten bei 4 °C und 5000 rpm pelletiert wurden. Das gewonnene Pellet wurde nach dem Abnehmen des Überstandes in 1 ml 10%igem kaltem Glycerol (steril) resuspendiert und anschließend auf 40 ml mit 10%igem Glycerol aufgefüllt. Danach erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (10 min, 4 °C, 5000 rpm) Das Pellet wurde dreimal hintereinander in der gleichen Weise gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 500 μ l 10%igem Glycerol resuspendiert und unverzüglich in 80 μ l Aliquots abgefüllt, die dann bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert wurden.

3.2 Nukleinsäuretechniken

3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In dieser Arbeit wurde die PCR zum Nachweis des Hämolyisin-Gens *hlyA* in verschiedenen 536-Stämmen angewendet. Mittels einer PCR lässt sich ein genau definiertes DNA-Fragment mit geeigneten Oligonukleotiden vervielfältigen. Das PCR-Prinzip besteht typischer Weise aus einem Denaturierungsschritt, einem „*annealing*“- und einem Elongationsschritt.

Zunächst wird die DNA bei 94 °C denaturiert, so dass der DNA-Doppelstrang sich trennt und einzelsträngig vorliegt. Die mit der DNA in kurzen Bereichen komplementären Oligonukleotide (*primer*) können bei abgesenkter Temperatur (etwa 55 °C) spezifisch an die DNA hybridisieren. Nach erfolgter Bindung wird die Temperatur auf das Arbeitsoptimum der Polymerase wieder erhöht, wobei die Oligonukleotide am freien 3'-Ende durch die Polymerase elongiert werden bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt. Da die Komplementierung an beiden Strängen der Template-DNA verdoppelt sich die Zahl der Template-DNA pro Zyklus. Eine finale Elongation stellt sicher, dass alle Einzelstrangbereiche wieder doppelsträngig vorliegen.

PCR-Ansatz 50 µl für "Aufkoch-PCR" (mit ganzen Bakterien)

5 µl 10 x TopTaq-Puffer
 0,25 µl Primer 536_hlyA_U
 0,25 µl Primer 536_hlyA_R
 1µl dNTPs
 0,3 µl TopTaq Polymerase
 etwas Koloniematerial
 auffüllen mit H₂O_{dd} auf 50 µl

PCR-Programm

94 °C für 10 min
 94 °C für 30 s
 59 °C für 40 s
 72 °C für 3 min 30 s
 72 °C für 5min



Tab. 13: Oligonukleotide für die Amplifikation des *hlyA*-Gens

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	nmol	Tm [°C]
536_hlyA_R	caaagttattgagttccgtccatag	36,3	60,1
536_hlyA_U	ccactgcacaaattaaagcacac	41,7	59,3

3.2.2 Transformation mittels Elektroporation

Das Einbringen des Plasmids pSurA führt in der Mutante 536 Δ *surA* zu einer Komplementation des deletierten *surA*-Gens. Um gleiche Bedingungen in der Mutante zu erzeugen wurde diese mit dem entsprechenden Leervektor pASK75 transformiert. Der Wildtyp und die bereits in der Laborsammlung bestehende *surA*-Mutante (Δ *surA*) wurden mit dem Leervektor pASK75 transformiert, der in der komplementierten *surA*-Mutante für das fehlende SurA kodiert (pSurA). Bei dem Vektor pASK75 und dessen Derivat pSurA handelt es sich um ein „*high copy*“-Plasmid, der eine Ampicillin-Resistenz vermittelt und nach der Transformation als Selektivmarker für das erfolgreiche Einbringen des Leervektors in den 536-Wildtyp und die *surA*-Deletionsmutante diente. In den Experimenten wurde stets das Antibiotikum Ampicillin als Selektivdruck zugeführt. Der Wildtyp-Stamm 536 mit dem Leervektor pASK75 existierte bereits in der laboreigenen Stammsammlung.

Für die Herstellung der Stämme 536 $\Delta surA$ pASK75 und 536 $\Delta surA$ pSurA wurden jeweils zwei Aliquots elektrokompetenter 536 $\Delta surA$ -Zellen auf Eis aufgetaut und luftblasenfrei in vorgekühlte Elektroporationsküvetten überführt (2 mm, Biorad). Zu jedem Ansatz wurden etwa 250 ng Plasmid-DNA (pASK75 und pSurA) hinzupipetiert und bei 600 Ω , 25 μ F und 2500 V (Gene Pulser, Biorad) elektroporiert. Als Negativkontrolle diente steriles H₂O. Die Zellen wurden danach sofort in 500 μ l vorgewärmten LB-Medium aufgenommen und bei 37 °C im Schüttler für mind. 1 h inkubiert. Anschließend wurden jeweils 100 μ l auf Selektiv-Agarplatten (LB mit Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

3.2.3 Präparation von RNA

Vor Beginn der Arbeiten mit RNA wurden alle verwendeten Pipetten und Arbeitsflächen mit RNase-Erase® behandelt, um eine mögliche Kontamination der Proben mit RNasen und somit einen vorzeitigen Abbau der extrahierten RNA zu verhindern. Zusätzlich wurden die Handschuhe während der Arbeiten mehrfach gewechselt und die verwendeten Puffer mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser angesetzt. Alle Arbeiten mit RNA erfolgten aus Eis.

3.2.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurde das FastRNA® Pro Blue Kit (MP Biochemicals) verwendet. Die Bakterien wurden bis zu einer OD₆₀₀ angezogen und ein Volumen von 10 ml der Kultur geerntet (10 min, 4000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 1 ml RNApro™-Lösung resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension in ein Gefäß mit „Lysing Matrix B“ überführt und die Zellen mit Hilfe des FastPrep®-24 (MP Biochemicals, 40 s bei Einstellung 6) aufgeschlossen. Nach einem Zentrifugationschritt (5 min, 13000 rpm, 4 °C) konnte die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß vorsichtig überführt werden. Durch Zugabe von 350 μ l Chloroform und anschließendem starkem Schütteln für 10 s sowie einer kurzen Inkubationszeit von 5 min mit sich anschließender Zentrifugation (5 min, 13000 rpm, 4 °C) kam es zur Phasentrennung. Die obere wässrige Phase enthielt die RNA (die Interphase die DNA und die untere Chloroformphase die Proteine) und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die enthaltene RNA wurde durch Zugabe von 500 μ l eiskaltem reinem Ethanol über Nacht bei -20

°C präzipitiert. Nach zwei Waschschritten (15 min, 13000 rpm, 4 °C) mit 500 µl eiskaltem 75%igem Ethanol wurde das Pellet bei RT getrocknet und in 80 µl RNase-freiem Wasser gelöst.

3.2.3.2 DNase-Verdau der RNA

Der DNase-Verdau der gewonnenen RNA dient der Sicherstellung, dass die Probe absolut frei von DNA ist. Hierfür wurde die Probe mit RNase-freier DNase I (Qiagen) für 1 h bei RT inkubiert.

Ansatz des Verdaus

40 µl	RNA-Probe
5 µl	RNase-freie DNase
10 µl	Puffer RDD
45 µl	DEPC-H ₂ O _{dd}

Zur Kontrolle auf mögliche DNA-Rückstände wurde nach einem Aufreinigungsschritt eine PCR durchgeführt. War ein PCR-Produkt nachweisbar, wurde der DNA-Verdau wiederholt.

3.2.3.3 Aufreinigung der RNA

Die Aufreinigung der RNA-Proben nach dem DNase-Verdau wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen) durchgeführt. Hierzu wurde das Probenvolumen von 100 µl zunächst mit 350 µl RLT-Puffer vermischt und die enthaltene RNA durch Zugabe von 250 µl reinem Ethanol präzipitiert. Anschließend wurde der Ansatz auf eine RNeasy Mini-Spin-Säule gegeben und diese für 15 s bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Die an die Säulenmatrix gebundene RNA wurde zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen (15 s, 13000 rpm, RT) und zuletzt kurz leer zentrifugiert, um mögliche Pufferreste zu beseitigen. Für die Elution der RNA wurde die Säule auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt und die RNA mit 30 µl DEPC-H₂O_{dd} bei 13000 rpm für 1 min von der Säule gelöst. Dieser Schritt erfolgte ein weiteres Mal mit 20 µl DEPC-H₂O_{dd}. Mit Hilfe des NanoDrop wurde die RNA-Konzentration des Eluats gemessen.

3.2.3.4 Reverse Transkriptase (RT)-PCR

Für die reverse Transkriptions-PCR wurde das „OneStep RT-PCR Kit“ (Qiagen) verwendet. Dieses macht es möglich, die reverse Transkription und die anschließende Vervielfältigung der hergestellten cDNA mittels konventioneller PCR in einem Schritt durchzuführen.

Die Transkription der RNA in cDNA findet bei 50 °C durch die beiden reversen Transkriptasen Oniscript® und Sensiscript® statt. Eine anschließende Temperaturerhöhung auf 95 °C inaktiviert zum einen die reversen Transkriptasen und aktiviert andererseits die HotStarTaq®-Polymerase des Enzymgemisches.

RT-PCR-Protokoll

reverse Transkription	50 °C	30 min
DNA-Polymerase-Aktivierung	95 °C	15 min
Denaturierung	94 °C	30 s
<i>annealing</i>	59-62 °C	40 s
Elongation	72 °C	1 min
finale Extension	72 °C	10 min

Ansatz der RT-PCR

5 µl	5 x OneStep RT-PCR-Puffer
1 µl	dNTP-Mix (10 mM)
1 µl	Enzym-Mix
0,5 µl	Primer F (100 pmol/µl)
0,5 µl	Primer R (100 pmol/µl)
10-150 ng	RNA
auffüllen mit RNase-freiem H ₂ O _{dd} auf 25 µl	

Für die Positivkontrolle wurde chromosomale DNA anstelle der RNA verwendet. Zur Untersuchung eines Transkriptes wurden in parallelen Ansätzen gleiche RNA-Mengen eingesetzt und dabei die Zyklenanzahl der Amplifikationsschritte sukzessiv erhöht.

Tab. 14: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Tm in °C	Sequenz 3' → 5'	Referenz
K ₁	60	CAG TCA TAG CCG AAT AGC CT	Datsenko und Wanner, 2000
RT_flgH_f	59,4	CGC CAA CGG GTC TAT TTT CC	Diese Arbeit
RT_flgH_r	61,4	CAC CCA CCA CAT GCA GGT TG	Diese Arbeit
RT_flgC_f	59,4	TGC TGC CAT TCT CAA CCG AC	Dissertation Karin Lindner, 2005
RT_flgC_r	59,4	CGG TTG ACA TAA GCT GCA GG	Dissertation Karin Lindner, 2005
RT_fliC_f	59,4	TAA CAG CGC GAA GGA TGA CG	Dissertation Karin Lindner, 2005
RT_fliC_r	59,4	TAG TCT GGC CGT CAT TCG CA	Dissertation Karin Lindner, 2005
RT_hlyA1	61,4	GCT CCC TCT CAT TCC TGT CC	Diese Arbeit
RT_hlyA2	61,4	GCA TGC CGG GCA TCA TAT CC	Diese Arbeit
RT_motB_f	59,4	CTG GTG ATG TGG CTG ATC TC	Diese Arbeit
RT_motB_r	59,4	GGC GAT TCT GGC TAT CGA TG	Diese Arbeit
RT_rrsH_f	61,4	CGA TCC CTA GCT GGT CTG AG	Dissertation Karin Lindner, 2005
RT_rrsH_r	59,4	GAT GCA GTT CCC AGG TTG AG	Dissertation Karin Lindner, 2005
RT_tsr_f	59,4	AGA CGC GTA ACA CCC TCA AC	Diese Arbeit
RT_tsr_r	59,4	GCC GAT CGT TTT GCT CCA TG	Diese Arbeit
surA_1	58	GCG ACC AGT AAC TCC AGC	S. Behrens-Kneip
surA_2	60,5	CGG CAA ACC GAG CAT CGC	S. Behrens-Kneip

Die experimentellen Durchführungen angegeben unter 3.2.3 erfolgten in Zusammenarbeit mit Nadja Bier.

3.2.4 Horizontale Gelelektrophorese

Mit Hilfe der horizontalen Gelelektrophorese lassen sich Nukleinsäurefragmente in einem elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe auftrennen und visualisieren. Hierfür wurden für ein 1%iges Agarose-Gel 100 ml TAE- Puffer und 1 g Agarose in der Mikrowelle in einer SCHOTT-Flasche aufgekocht und unter Rühren auf ca. 50 °C abgekühlt. Die noch flüssige Gellösung wurde vorsichtig in die Gießkammer der Flachgelapparatur mit bereits eingesetzten Kämmen gegossen. Nach dem Erstarren des Geles wurde dieses in die Laufkammer mit 1 x TAE-Puffer gesetzt

und die Kämme entfernt. Die Nukleinsäure-Proben wurden mit 10 x DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Von dem DNA-Größenstandard wurden 8 µl aufgetragen (vgl. 2.4.1). Für die Auftrennung der DNA-Fragmente wurde die Stromquelle so an das Gel angeschlossen, dass die negativ geladene DNA von der Kathode zur positiv geladenen Anode entsprechend ihrer Fragmentgrößen aufgetrennt wurden. Die Elektrophorese erfolgte bei 70 V bis der sichtbare Größenstandard ausreichend aufgetrennt war. Zur Visualisierung der DNA wurde das Gel für 30 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (100 µg/ml H₂O_{dest.}) gebadet. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der DNA und kann durch das Einwirken von UV-Licht sichtbar gemacht werden. Das belichtete Gel wurde in einer Geldokumentationsanlage analysiert und fotografiert.

DNA-Probenpuffer (10x)

0,127 g	Bromphenolblau
0,125 g	Xylocymol (Xylencyanol)
0,78 g	Ficol 400
auffüllen mit H ₂ O _{dest} auf 50 ml	

TAE-Puffer (50x)

242 g	Tris
57,1 ml	Eisessig
100 ml	0,5 M EDTA, pH 8,0
auffüllen mit H ₂ O _{dest} auf 1 l	

3.3 Präparation und Analyse von Proteinen

3.3.1 Probengewinnung von Proteinen

Die Kulturen wurden versuchsabhängig bis zur entsprechenden OD₆₀₀ angezogen. Für die Zellernte wurden die Flüssigkulturen bei 15 min, 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Um sicher zu stellen, dass die Kulturüberstände keine zellulären Bestandteile beinhalteten, wurde diese anschließend sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße). Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert bzw. zur längeren Aufbewahrung bei -20 °C weggefroren.

Um genaue quantitative Vergleiche der Proteinmengen oder Aktivitäten zwischen dem Wildtyp und der *surA*-Mutante machen zu können, wurden stets gleiche Kul-

turvolumina der gleichen optischen Dichte geerntet und in den sich anschließenden analytischen Methoden gleiche Volumina der zu vergleichenden Stämme eingesetzt.

3.3.1.1 Gesamtzellextrakt

Bei der Herstellung der nativen Gesamtzellextrakte zur Bestimmung der hämolytischen Aktivität wurde stets auf Eis gearbeitet. Das Pellet wurde nach der Ernte in Hämolyse-Puffer [0,9 % (w/v) NaCl, 10 mM CaCl₂ x 2 H₂O] resuspendiert. Für den Zellaufschluss wurde die Probe für 30 min auf Eis mit Lysozym (10 µg/ml) versetzt und anschließend mit Ultraschall behandelt (Branson Sonifier, 5x 30 s, Power: 70, cycle: 4). Es folgte ein Zentrifugationschritt von 15 min bei 13000 rpm und 4°C. Der Überstand, der nun die löslichen zellulären Bestandteile enthielt, wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Für die Gewinnung der Gesamtzellextrakte für die Analysen der Proteinmengen im SDS-Gel wurde jeweils 1 ml der Kultur geerntet (vgl. 3.3.1). Der direkte Zellaufschluss der Bakterien erfolgte durch Resuspension des Pellets in 100 µl 1x Harnstoffprobenpuffer (4 x Roti®-Load, reduzierend) und anschließendem Erhitzen auf 100 °C für mind. 10 min. Bis zur direkten Verwendung der Proben wurden diese bei -20 °C gelagert.

3.3.1.2 Kulturüberstand

Für die Bestimmung der hämolytischen Aktivität des Kulturüberstands im Hämolyse-Experiment wurde der sterilfiltrierte Überstand nach der Ultrazentrifugation ohne Außenmenbranvesikel eingesetzt.

Wurden die Proben für Proteinmengen-Analysen verwendet, wurden die sterilfiltrierten Kulturüberstände ohne bzw. nach der Ultrazentrifugation über Nacht bei 4 °C mit 10%igem TCA (v/v) gefällt. Anschließend folgte eine Zentrifugation von 1 h bei 11000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das vorliegende Proteinpellet in reinem eiskaltem Ethanol aufgenommen. Es folgten bis zu fünf Waschschriffe (5 min, 13000rpm, 4°C) mit Ethanol. Der letzte Waschschriff erfolgte mit 70%igem Ethanol. Das gewaschene Proteinpellet wurde über Nacht getrocknet und dann in Harnstoff-Probenpuffer resuspendieren. Die Lage-

rung erfolgte bei -20 °C. Vor der Verwendung im SDS-Gel wurden die Proben mit 4 x Roti®-Load-Proteinpuffer versetzt und für mind. 10 min bei 100 °C aufgeköcht.

Harnstoff-Probenpuffer

8 M Urea
1,5 M Thiourea

Der Harnstoff-Probenpuffer wurde in 100 µl Aliquots aufgeteilt und bei -80 °C gelagert.

3.3.1.3 Außenmembranvesikel (OMV)

Zur Gewinnung von Außenmembranvesikeln wurden die Kulturen bei OD₆₀₀ 2,4 geerntet. Bei dieser OD₆₀₀, am Ende der logarithmischen Wachstumsphase, ist die Produktionsrate an Außenmembranvesikeln am höchsten. Die zellulären Bestandteile wurden durch Zentrifugation (15 min, 5000 rpm, 4°C) pelletiert. Der Überstand wurde anschließend sterilfiltriert und die Außenmembranvesikel während der Ultrazentrifugation (3 h, 150 000 g, 4 °C) vom Überstand getrennt. Die Pellets der OMV wurden in 50 µl 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) aufgenommen und direkt für den Hämolysetest und für die Elektronenmikroskopie verwendet oder zur späteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Für Proteinanalysen mittels SDS-Gelelektrophorese wurden die OMV mit Membranprotein-Probenpuffer versetzt und für mindestens 10 min bei 100 °C aufgeköcht.

Membran-Probenpuffer (2x)

20 % (v/v) Glycerol
100 mM Tris-HCl
10 % (w/v) SDS
5 % (v/v) β-Mercaptoethanol
wenig Bromphenolblau
alles in H₂O_{dest} lösen

Die Vorbereitung der OMV-Proben für die Analyse mittels 2D-Gelelektrophorese benötigte eine andere Aufarbeitung als die Proben für den Hämolyse-Test oder die Analyse im eindimensionalen SDS-Gel.

Nach der Ultrazentrifugation des Kulturüberstands (je Stamm 4 x 180 ml) wurden die OMV zunächst in 1200 µl 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) aufgenommen und mit 60 µl 0,5%igem Triton X-100 für 25 min auf Eis stehen gelassen. Die nicht löslichen Zellfragmente wurden in einem Zentrifugationsschritt (10 min, 12000 rpm, 4 °C) pelletiert und der Überstand in 15 ml Röhrchen überführt. Es folgte eine 10fache Verdünnung mit ultrapurem Wasser. Die Proteine wurden mit 10%igem TCA (v/v) über Nacht bei 4 °C gefällt und anschließend für 1 h bei 11000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Proteinpellet wurde zunächst fünfmal mit reinem Ethanol (5 min, 13000 g, 4 °C) und final einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 450 µl Rehydrationspuffer resuspendiert und später für die 2D-Gelelektrophorese eingesetzt (vgl 3.3.4).

Rehydrationspuffer

2 M	Thiourea
8 M	Urea
4 %	CHAPS
200 mM	DTT
10 %	Ampholyte pH 3-10
wenig	Bromphenolblau
alles in H ₂ O _{dest} lösen	

3.3.2 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*; Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) lassen sich Proteine ihrer Größe entsprechend in einer Gelmatrix auftrennen. Für die Durchführung der SDS-PAGE wurde die Apparatur Mini-Protean® Tetra Cell mit dazugehörigem Gießstand verwendet.

Bei der SDS-Gelelektrophorese bilden die Proteine mit dem zugesetzten SDS einen negativ geladenen SDS-Protein-Komplex mit konstanten Ladungs-zu-Masse-Verhältnis (1,4 g SDS/g Protein in 1%iger SDS-Lösung). Diese Komplexe wandern

innerhalb der porösen Polyacrylamidmatrix im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode und werden entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. In dieser Arbeit wurde das diskontinuierliche Lämmli-System mit Tris-Glycin-Puffern angewandt. Zunächst wurde der Zwischenraum der beiden sich im Gießstand befindlichen Glasplatten zu 4/5 mit dem noch nicht polymerisierten Trenngel (12 %) befüllt und anschließend vorsichtig mit 70%igem Ethanol überschichtet. Nach der vollständigen Polymerisation wurde das restliche Ethanol entfernt und das noch nicht polymerisierte Sammelgel (5 %) über das Trenngel gegossen und ein Probenkamm eingesetzt, der nach der Polymerisation wieder entfernt wurde. Das Gel wurde in die Elektrophorese-Kammer eingespannt und in die äußere Kammer eingesetzt. Sowohl die innere als auch die äußere Kammer wurden mit 1 x-SDS-Laufpuffer befüllt und die Elektrophorese nach Auftragen der Proben gestartet. Typischerweise erfolgte die Auftrennung für 20 min bei 80 V und dann bei 120 V bis die Lauffront aus dem Gel austritt. Als Größenstandard wurden 4 μ l *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* von Fermentas aufgetragen (vgl. 2.5.2).

Tab. 15: Rezept für 2 Mini-Gele

Trenngel (12 %)		Sammelgel (5 %)	
Rotiphorese®-Gel 30 (Acrylamid/Bisacrylamidlg.)	6,4 ml	Rotiphorese®-Gel 30 (Acrylamid/Bisacrylamidlg.)	2,66 ml
Trenngel-Puffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,4 % SDS)	4,0 ml	Sammelgel-Puffer (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,4 % SDS)	4 ml
20 % (w/v) SDS	80 μ l	20 % (w/v) SDS	80 μ l
10 % (w/v) APS	80 μ l	10 % (w/v) APS	80 μ l
TEMED	10 μ l	TEMED	10 μ l
H ₂ O _{dest}	5,6 ml	H ₂ O _{dest}	8,74 ml

10 x SDS-Laufpuffer

30 g Tris
144,4 g Glycin
10 g SDS

auffüllen mit H₂O auf 1 l und pH 8,3 einstellen.

3.3.3 Immunochemischer Proteinnachweis

Mit Hilfe spezifischer Antikörper lassen sich Proteine eines Proteingemisches auf einer Nitrozellulosemembran nachweisen.

Der erste Schritt bestand in dem Transfer der Proteine nach der Elektrophorese aus dem SDS-Gel auf Nitrozellulose mittels „*semi-dry*“-Verfahren. Hierfür wurden zunächst drei in Transferpuffer getränkte Filterpapiere (8 x 10 cm) auf die Graphitanode der Blotting-Apparatur gelegt. Darüber liegend folgte die in Transferpuffer equilibrierte Nitrozellulosemembran (7 x 9 cm), auf die danach das SDS-Gel vorsichtig gelegt wurde. Das Gel wurde anschließend mit drei feuchten Filterpapieren bedeckt und durch sanftes Überstreichen wurden eventuell vorhandene Luftblasen ausgestrichen. Die Blotkammer wurde durch Auflegen der Kathodenplatte verschlossen. Der Transfer erfolgte für 1 h 15 min bei 0,8 mA pro cm² Membran.

Nach dem Transfer wurde die Membran in 5%iger TBST-Magermilch für mind. 1h blockiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Es folgte ein Waschschriff mit 1 x TBST für 10 min und anschließend die Inkubation des Primärantikörpers in 1%iger TBST-Magermilch. Nach dreimaligem Waschen mit 1 x TBST für jeweils 10 min wurde die Membran mit dem speziesspezifischen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper für 1 h in 1%iger TBST-Magermilch inkubiert. Auf die drei finalen Waschschriffe folgte die Entwicklung der Membran mit dem Pierce® *ECL Western Blotting Substrate* Kit von Thermo Scientific. Die beiden Lösungen 1 und 2 wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die Membran pipettiert. Nach der Inkubationszeit von 2 min wurde die überschüssige Flüssigkeit mit einem Filterpapier von der Membran abgesogen und in eine stabile glasklare Klarsichtfolie gelegt, die in einer lichtundurchlässige Entwicklerkassette bis zum Auflegen des Röntgenfilm in der Dunkelkammer aufbewahrt wurde. Durch Auflegen eines Röntgenfilms kann die auftretende Chemilumineszenz, die durch die Oxidation des in der Entwicklerlösung enthaltenen Luminols unter Spaltung von Wasserstoffperoxid durch die enzymatische Aktivität der Meerrettich-Peroxidase entsteht, detektiert werden und somit spezifische Proteinbanden sichtbar machen. Die Expositionszeiten variierten je nach Proteinmenge und verwendetem Primärantikörper. Die aufgelegten Filme wurden in der Agfa Curix 60 Entwicklermaschine entwickelt.

Transferpuffer

25 mM	Tris
192 mM	Glycin
20 % (v/v)	Methanol

10 x TBST

500 mM	Tris
1,5 M	NaCl
0,5 %	Tween 20

3.3.4 Zweidimensionale SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese lassen sich Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt und dem Molekulargewicht auftrennen. Der erste Schritt ist die isoelektrische Fokussierung und anschließend erfolgt eine konventionelle SDS-Gelelektrophorese. In dieser Arbeit wurde eine präparative 2D-Gelelektrophorese angewendet um charakteristische Proteinpunkte, in denen sich der Wildtyp und die *surA*-Mutante unterscheiden, auszuschneiden und mittels Massenspektrometrie analysieren zu lassen. Die erste Dimension wurde mit dem Gerät *PROTEAN® IEF Kammer* und die zweite Dimension mit dem *PROTEAN® II xi* System von Bio-Rad durchgeführt.

3.3.4.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Jedes Protein besitzt einen spezifischen isoelektrischen Punkt, an dem die negativen und positiven Ladungen der ionisierbaren Gruppen sich aufheben und die Nettoladung des Proteins gleich Null ist.

Für die Fokussierung wurden immobilisierte pH-Gradienten-Streifen (17 cm, pH 3-10, nicht linear) von Bio-Rad verwendet und nach der Anleitung des Herstellers verfahren.

Die 450 µl Gesamtvolumina der OMV-Proben (vgl. 3.3.1.3) wurden in die Furchen der Fokussierungskammer pipettiert. Die pH-Gradienten-Streifen können ohne Probe oder mit Probe und anschließender Fokussierung rehydratisiert werden. In dieser Arbeit erfolgte eine passive Rehydratisierung mit der Probe in der Fokussierungskammer. So wurden die bei -20 °C gelagerten Gelstreifen kurz aufgetaut, die

Schutzfolie entfernt und mit der Gelseite entsprechend der +/- Kennzeichnung nach unten in die Furche mit der Probe luftblasenfrei eingelegt. Anschließend erfolgte eine vorsichtige Überschichtung mit 2-3 ml Mineralöl, um eine Verdunstung der Proben zu verhindern.

Für die passive Rehydratisierung und die anschließende Fokussierung wurde eine voreingestellte Methode des Gerätes verwendet.

1) Passive Rehydratisierung:

- für 12 h bei 20 °C

2) Fokussierung:

- Voltgradient: schnell
- Voltstunden: 60 000 (für 17 cm Gelstreifen)

Nach Beendigung der isoelektrischen Fokussierung wurden die Streifen für die vertikale Dimension verwendet oder bei -80 °C in der Equilibrierungskammer gelagert.

3.3.4.2 Vertikale Dimension der 2D-Gelelektrophorese

Zunächst wurden 12%ige luftblasenfreie Polyacrylamidgele ohne Sammelgel (16 x 20 cm) mit Hilfe des Gießstandes gegossen (Tab. 15). Die fokussierten Gelstreifen wurden in der Equilibrierungskammer mit je 6 ml Equilibrierungspuffer für 15 min bei RT inkubiert und anschließend in einem hohen Messzylinder in 1 x SDS-Puffer gespült. Mit Hilfe von zwei Pinzetten wurden die Gelstreifen mit der Gelseite nach oben liegend zwischen die Glasplatten auf das polymerisierte Gel geschoben und anschließend mit noch flüssiger 1%iger Agarose vorsichtig überschichtet. Die Gellaparatur wurde nach Anleitung zusammengebaut, mit 1 x SDS-Puffer befüllt und die Gele für 17 h laufen gelassen (8 mA/Gel).

Equilibrierungspuffer

6 M	Urea
0,375 M	Tris-HCl
2 % (w/v)	SDS
20 % (v/v)	Glycerol
2 % (w/v)	DTT

3.3.5 Färbung von SDS-Gelen

Für die Färbung von SDS-Gelen wurde die sogenannte „*Blue silver*“-Färbemethode mit dem Coomassie-Farbstoff G 250 angewandt. Diese ist deutlich sensitiver als die herkömmliche Färbung mit dem Coomassie-Farbstoff R 250 und bietet zudem die Möglichkeit die Proteine im Nachhinein in der Massenspektrometrie (MS) analysieren zu können. Bei konventionell silbergefärbten Proteinbanden bzw. -punkten ist dies nicht ohne vorherige Behandlung möglich.

Die Polyacrylamidgele wurden nach der Elektrophorese zweimal für 1 h mit der Fixiererlösung inkubiert. Zwischen und nach dem Fixieren wurden die Gele in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ für 15 min gewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung mit der kolloidalen Coomassie-Färbelösung für mind. 15 h. Die Entfärbung erfolgte in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ für mehrere Tage. Die gefärbten Gele wurden in einer glasklaren Klarsichtfolie mit einem handelsüblichen Scanner eingescannt und die Lage und Größe der Proteinspots zweier Gele vergleichend mit der Software DECODON Delta2D analysiert. Für spezifische Proteinanalysen wurden zu markante Spots aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert.

Fixiererlösung

½ l $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ vorlegen
40 % (v/v) Ethanol
10 % (v/v) Essigsäure
auffüllen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ auf 1 l

Kolloidale Coomassie-Färbung – „*Blue Silver*“-Färbung

1/10 H_2O vorlegen
10 % Phosphorsäure
10 % (w/v) Ammoniumsulfat
0,12 % (w/v) Coomassie Brillant Blue G 250
nach 1 h zugeben:
20 % ml Ethanol
auffüllen mit H_2O auf 1 l

3.3.6 Massenspektrometrie via MALDI-TOF

Die Methode der *Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization* (MALDI) zur Identifikation von Proteinen gibt es seit den 80er Jahren. Um Proteine auf diesem Weg analysieren zu können, müssen diese auf einem Probenträger in Kristalle von sauren UV-absorbierenden Molekülen eingebaut werden. Bei dieser Kristallbildung werden Protonen auf die Proteine übertragen was zu einer positiven Ladung führt. Befördert man nun diese Kristalle in das Hochvakuum des Massenspektrometers, werden diese von einem UV-Laser Puls bestrahlt und die Matrixmoleküle und Protein-Ionen werden freigesetzt. So entsteht eine Gaswolke von positiv geladenen Protein-Ionen, die mittels eines TOF (*Time Of Flight*)-Analysators in einem elektrischen Feld auf einen Schlitz zu beschleunigt werden. Jedes Ion erhält die gleiche Energie multipliziert mit seiner Ladung z . So entsteht ein proportionaler Zusammenhang aus der Geschwindigkeit v der Ionen zu der Masse und Ladung der Ionen. Es ergibt sich folgende Gleichung: $E = (m/z) \times v^2$. Bedeutet, dass zwei Proteine gleicher Ladung mit unterschiedlicher Masse im elektrischen Feld unterschiedlich stark beschleunigt werden, wobei das kleinere Molekül eine höhere Geschwindigkeit erreicht. Und ein Protein mit zwei positiven Ladungen wird stärker beschleunigt, als das gleiche Protein mit einfacher Ladung. Die Ionen fliegen durch einen Schlitz in den feldfreien Vakuum-Flugzeitanalysator und treffen dort nach Zurücklegen einer definierten Strecke auf den Detektor. Aufgrund der unterschiedlichen Geschwindigkeiten der Ionen benötigen diese auch unterschiedliche Zeiten, um den Detektor zu erreichen. Diese Zeitmessung der verschiedenen Ionen wird als Spektrum erfasst und die Berechnungssoftware liefert die Informationen zu den mittleren Molekulargewichten der Ionen in der Probe. Über einen Sequenzabgleich in der Mascot-Proteindatenbank lassen sich die unbekannt Proteine über die Angabe aller Massenpunkte in der Probe identifizieren.

Für die massenspektrometrische Analyse ausgewählter Proteinspots aus dem 2D-Gel wurden diese aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und ein „In-Gel-Verdau“ angesetzt. Hierfür wurden zunächst die Gelstücke in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mit Acetonitril versehen, so dass sie gänzlich mit der Flüssigkeit bedeckt waren. Anschließend wurden die Proben kräftig geschüttelt und das Acetonitril abgenommen und durch frisches ersetzt. Dieser Schritt dient der Trocknung der Gelstücke und wurde so lange wiederholt bis die Gelstücke hart und weiß geworden sind. Zum Schluss wurde das Acetonitril gänzlich entfernt und die Proben

in der Vakuumzentrifuge vollständig getrocknet. Als Vorbereitung für die Massenspektrometrie müssen die Proteine proteolytisch gespalten werden, um kleine Peptide zu erhalten. Als Protease für den In-Gel-Verdau wurde Trypsin verwendet, was Peptidbindungen spezifisch am Carboxyende der basischen Aminosäuren Arginin und Lysin (Ausnahmen bei Aspartat, Glutamat und Prolin als unmittelbarer Nachbar der Schnittstelle) schneidet. Für den Verdau der Proben wurde nach dem Protokoll des *Trypsin Profile* IGD Kit von Sigma vorgegangen und dessen Reagenzien verwendet. Der Verdau erfolgte über Nacht für 14 h bei 37 °C. Für die anschließende Entsalzung der Proteine und deren Aufkonzentrierung wurden die Proben mit der Zip-Tip-Methode aufbereitet. Hierfür wurden jeweils 30 µl Probe mit je 1,5 µl TFA (10 %) angesäuert. Vor der Benutzung der Zip-Tip- Pipettenspitzen wurden diese dreimal mit 10 µl Acetonitril (100 %) gespült. Danach folgte eine weitere dreimalige Spülung der Spitzen mit 10 µl 0,1%iger TFA. Die Probe (34,5 µl) wurde nun mit dem Hub der Pipette achtmal in die equilibrierte Pipettenspitze auf- und abpipettiert, um die Proteine in der Säule zu binden. Nach Aufnahme der Probe wurde die Zip-Tip-Spitze dreimal mit 0,1%iger TFA gewaschen. Für die Elution der Probe muss der Elutionspuffer, bestehend aus 50 % Acetonitril in 0,1%igem TFA, immer frisch angesetzt werden. Mit der Zip-Tip-Spitze wurden 5 µl Elutionspuffer aufgenommen. Mit dem dreimaligen Hub der Pipette wurde die Probe eluiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach der Aufkonzentrierung und Reinigung der Proben erfolgte das Auftragen auf den Probenträger für die Analyse im Massenspektrometer. Für die Messung der Proben müssen diese in eine Matrix gegeben werden. Je nach Probenträger wurden je 1 µl Probe mit jeweils 1 µl gesättigter HCCA-Matrix [(12 mg/ml in TA2) (30 % Acetonitril in 0,1%igem TFA)] direkt auf dem Träger (polierter Stahl) versetzt oder je 1 µl Probe mit 9 µl vorgelegter 0,3%iger HCCA-Matrix versehen und davon je 1 µl auf den Probenträger (nicht polierter Stahl) pipettiert.

TA2

30 % Acetonitril in 0,1%iger TFA

0,3 % HCCA-Matrix

1 mg in 1ml Aceton lösen, davon 30 µl in 870 µl EtOH geben

Die Analyse der Proben erfolgte mit dem Massenspektrometer Autoflex II (MALDI-TOF) von Bruker. Dieser arbeitet mit einem Stickstofflaser bei 337 nm. Gemessen wurden die Proben im Massenbereich 0,7 – 3,5 kDa. Die Analyse der Messungen erfolgte mit der Software FlexAnalysis. Jede Probe wurde auf zwei verschiedenen Probenträgern analysiert und die Ergebnisse (Massen-*Peaks*) vereinigt und bereinigt. Diese Daten bildeten den Ausgangspunkt für den Abgleich in der Mascot Proteinendatenbank, die anhand der verschiedenen Massen der Probe das Protein identifizieren kann.

3.4 Phänotypische Charakterisierungen

3.4.1 Qualitativer Hämolysetest

Die hämolytische Aktivität der UPEC-Isolate 536 und F11 wurde zunächst qualitativ auf Blutagarplatten getestet. Hierfür wurden LB-Übernachtskulturen der Wildtypen, der *surA*-Mutante und der Komplementanten identisch auf 2×10^8 Zellen/ml eingestellt und jeweils 5 μ l auf Blutagarplatten getropft. Die Platten wurden bei 37 °C für 48 h bebrütet und anschließend fotografiert.

Blutagarplatten (1,5 % (v/v))

985 ml	LB-Nährbodenmedium, autoklaviert (3.1.1)
15 ml	humanes Erythrozytenkonzentrat

Das humane Erythrozytenkonzentrat wurde vor der Verwendung mit 10 x PBS (pH 7,4) so oft gewaschen (15 min, 4 °C, 2500 rpm) bis der zu verwerfende Überstand farblos blieb. 15 ml des Erythrozytenkonzentrates wurden zu dem handwarmen, noch flüssigem, sterilen LB-Nährbodenmedium hinzugegeben und jeweils 20 ml in sterile Petrischalen gegossen.

3.4.2 Quantitativer Hämolysetest (Flüssighämolysetest)

Für die Bestimmung der hämolytischen Aktivität wurde zunächst das Erythrozytenkonzentrat mit kaltem PBS mind. dreimal gewaschen (10 min, 2500 rpm, 4 °C) bis der Überstand farblos war. Aus dem gewaschenen Erythrozytenkonzentrat wurde mit PBS eine 4%ige Erythrozytensuspension hergestellt.

Pro Probe wurde je ein 12 ml Ansatz in sterilen 15 ml Röhrchen in Triplikaten angesetzt. Die Präparation der zu analysierenden Proben wurde im Kapitel 3.3.1 beschrieben.

Tab. 16: Zusammensetzung der Proben im quantitativen Hämolysetest

	4%ige Erythrozytensuspension	Hämolysepuffer	Probenvolumen
Zellextrakt	6 ml	5 ml	1 ml
Überstand	6 ml	5 ml	1 ml
OMV	6 ml	5,96 ml	40 µl (600fach aufkonzentriert)
Positivkontrolle	6 ml	5,88 ml	120 µl Triton X-100
Negativkontrolle 1	6 ml	6 ml	-
Negativkontrolle 2	6 ml	5 ml	1 ml LB
Negativkontrolle 3	6 ml	5,96 ml	40 µl 20 mM Tris-HCl (OMV-Puffer)

Hämolysepuffer

0,9 % NaCl

10 mM CaCl₂ x 2H₂O (Kalzium für die Hämolysinaktivierung)

Die Ansätze wurden bei 180 rpm und 37 °C inkubiert. Für die Bestimmung der hämolytischen Aktivität erfolgte zu ausgewählten Zeitpunkten eine Entnahme von jeweils 1 ml des Ansatzes, der in ein Reaktionsgefäß überführt wurde. Die zellulären Bestandteile wurden für 15 min bei 2500 rpm und 4 °C sedimentiert und der Überstand mit dem aus lysierten Erythrozyten freigesetztem Hämoglobin vorsichtig in eine Küvette überführt. Mit Hilfe eines Photometers konnte das Hämoglobin über die Absorption bei 415 nm quantifiziert werden. Bei starker Lyse der Erythrozyten (sehr rötlicher Überstand) wurde der Überstand 10fach verdünnt.

Die hämolytische Aktivität berechnet sich wie folgt:

$$\text{Hämolyse in \%} = \frac{A_{415} (\text{Probe}) - A_{415} (\text{Negativkontrolle}) * 100}{A_{415} (\text{Positivkontrolle}) - A_{415} (\text{Negativkontrolle})}$$

3.4.3 Schwärmplatten

Die Fähigkeit zur Motilität der Bakterien wurde in einem Schwärmplattentest analysiert. Dazu wurde der Schwärmagar in der Mikrowelle aufgekocht und je 20 ml in sterile Petrischalen gegossen.

Schwärmagar

2,5 g	Trypton
1,25 g	NaCl
0,625 g	Agar
auffüllen mit H ₂ O _{dest} auf 250 ml	

Für den Test wurden die zu untersuchenden Stämme aus Glycerol-Dauerkulturen in LB-Medium über Nacht bei 37 °C angezogen. Die LB-Kulturen wurden auf eine identische Zellzahl eingestellt (2×10^8 /ml). Je 5 µl der Flüssigkulturen wurden auf die Schwärmplatten getropft und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Wenn die Bakterien motil sind, bildet sich ein erkennbarer Schwärmhof um die Einstichstelle. Je größer dieser Hof ist desto beweglicher sind die Bakterien. Als Negativkontrolle diente eine *fliA*-Mutante des K-12-Stammes, die nicht zur Ausbildung von Flagellen befähigt ist.

3.4.4 Novobiocintest

Um die Sensitivität von 536-*E. coli*-Stämmen gegenüber dem Antibiotikum Novobiocin zu untersuchen, wurden je Stamm 2×10^8 Bakterien in 100 µl LB aus einer ÜN-Kultur auf LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert und kurz getrocknet. In die Mitte der Agarplatten wurde jeweils ein kleines rundes mit Novobiocin getränktes Filterpapier (30 µg) aufgelegt. Nach einer Inkubation von 24 h bei 37 °C wurden die Durchmesser der Hemmhöfe des Bakterienrasens um das Novobiocin-Plättchens bestimmt. Je größer dieser Hemmhof ausfällt, desto sensitiver ist der Stamm gegenüber dem Antibiotikum.

3.4.5 SigmaE (σ^E)-Aktivität

Die periplasmatische Akkumulation von ungefalteten β -Fass-Außenmembranproteinen induziert eine σ^E -Stressantwort. Mittels eines σ^E -Aktivitätstests wurde dies auch für die *surA*-Mutante des UPEC 536 untersucht. Grundlage für diesen Test ist ein plasmidbasierendes Chloramphenicol-Resistenzgen, das durch einen σ^E -abhängigen Promotor reguliert wird.

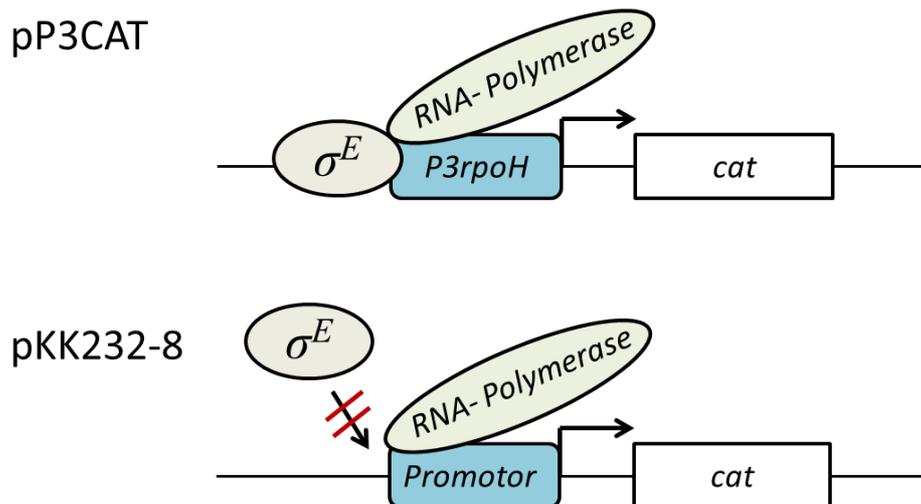


Abb. 6: Darstellung der Funktionsweise der Plasmide pP3CAT und pKK232-8. Das Plasmid pP3CAT besitzt einen σ^E -abhängigen Promotor (P3rpoH) vor dem Chloramphenicol-Resistenzgen und steuert somit dessen Transkription. pKK232-8 hingegen besitzt das Chloramphenicol-Resistenzgen unter der Kontrolle eines σ^E -unabhängigen Promotors.

Kommt es zu einer σ^E -Stressantwort in den Bakterienzellen wird eine Chloramphenicol-Resistenz vermittelt (Abb. 6). Um das quantitativ analysieren zu können, wurden der UPEC-536-Wildtyp und die *surA*-Mutante in einer ÜN-Kultur in LB bei 37 °C angezogen und je 2×10^8 Bakterien in einem Volumen von 100 μ l auf LB-Platten ausplattiert. Mittig auf die Platten wurde jeweils ein rundes mit Chloramphenicol getränktes Plättchen (30 μ g, \varnothing 6 mm) auf den Bakterienrasen gelegt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die entstehenden Hemmhöfe um das Plättchen sind indirekt ein Maß für die Höhe der σ^E -vermittelten Stressantwort. Je sensibler die Bakterien gegenüber dem einwirkenden Antibiotikum Chloramphenicol sind, d.h. je größer der Hemmhof ist, desto geringer ist die Stressantwort.

3.4.6 Phospholipase-Aktivitätsnachweis (PLA-Assay)

Das NEFA C-Kits von Wako wird in der Diagnostik zum Nachweis von freien Fettsäuren in Serum oder Plasma verwendet. Allerdings lässt sich dieses Nachweisverfahren auch auf andere Bereiche anwenden. So ist es möglich den Abbau des Substrates 1,2-Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC, Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, Al., USA) zu freien Fettsäuren durch die Anwesenheit von Phospholipasen nachzuweisen. Enthält eine zu untersuchende Probe Phospholipasen, lässt sich dies mittels des NEFA C-Kits nachweisen.

Zunächst wurde eine 100 mg/ml DPPC-Stocklösung (in Ethanol) angesetzt und für 15 min bei 37 °C geschüttelt. Durch eine anschließende Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier, 3 x 15 sec, 65% Intensität, 4 Zyklen) und der sukzessiven Zugabe von Substratpuffer wurde eine DPPC-Emulsion mit einer Endkonzentration von 6,7 mM hergestellt.

Substratpuffer

20 mM	Tris pH 7,4
3 mM	NaN ₃
0,5 % (v/v)	Triton X-100

Für den Phospholipase-Aktivitätsnachweis wurden je 25 µl der zu untersuchenden OMV-Proben (intakte Membranvesikel) in eine 96-Napf Mikrotiterplatte jeweils in Triplikaten pipettiert und je 25 µl der fertigen DPPC/Substratpuffer-Emulsion hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation für 3 h bei 37 °C und 100 rpm mit anschließender Zentrifugation für 5 min bei 600 rpm. Jeweils 10 µl des Überstands jeder Probe wurden für den enzymatisch-kolorimetrischen Nachweis in eine neue 96-Napf-Mikrotiterplatte überführt. Als Negativkontrolle wurde anstatt der OMV-Probe 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) verwendet. Mittels des im Kit enthaltenen Oleats (1 mM) und des Substratpuffers wurde eine Standardreihe in Triplikaten mit den Konzentrationen 0 mM, 0,2 mM, 0,4 mM, 0,6 mM; 0,8 mM und 1 mM pipettiert.

Nach Anleitung des Herstellers wurden die bereitgestellten Chemikalien gelöst und 50 µl der R1-Lösung zu den vorgelegten 10 µl Probenvolumen gegeben. Nach der 20-minütigen Inkubation bei 37 °C und 100 rpm wurden 100 µl der R2-Lösung hinzupipettiert und ebenfalls für 20 min bei 37 °C und 100 rpm inkubiert.

Anschließend wurde die 96-Napf-Mikrotiterplatte bei einer Wellenlänge von 550 nm ausgelesen.

$$\text{FFA [mM]} = \frac{\text{OD}_{550} (\text{Probe} - \text{Leerwert}) \times 28,2 \times 0,035}{\text{OD}_{550} (\text{Standard})}$$

In der Formel verwendete Faktoren zur Berechnung der FFA in [mM]:

28,2 mg/dl = Konzentration des Standards Oleat, mg/dl x 0,035 = mmol/l

3.5 Elektronenmikroskopie

3.5.1 Motilitätsapparat

Für die Untersuchung des Motilitätsapparates wurden ganze Zellen verwendet. Hierfür wurden die UPEC-536-Stämme [Wildtyp (12000), *surA* (12001), *fliC* (12053), *fliC/surA*] auf Schwimmagarplatten über Nacht bei 30 °C angezogen. Mit einer Impföse wurde jeweils etwas Koloniematerial am nächsten Tag auf frische Schwärmagarplatten mittig überimpft und wiederum über Nacht bei 30 °C inkubiert. Für die Elektronenmikroskopie wurde etwas Koloniematerial in 20 µl Hapes (0,05 M) suspendiert und anschließend ein beglimmtes Grid unter den Tropfen gelegt. Das Koloniematerial wurde für 20 min auf dem Grid sedimentiert. Nach viermaligem Waschen der Träger mit bidestilliertem Wasser erfolgte eine kurze Negativkontrastierung mit einer 0,5%igen Uranylacetatlösung (pH 4–pH 4,5). Die Bilddarstellung erfolgte mit dem TEM EM 902 von Zeiss bei 80 kV und die Aufnahmen wurden mit einer „Slow Scan“ CCD Kamera von ProScan aufgenommen. Frau Gudrun Holland von der Abteilung ZBS 4 (Zentrum für Biologische Gefahren und Spezielle Pathogene 4) am Robert Koch-Institut war sowohl für die Präparation als auch für die Bildaufnahmen zuständig.

3.5.2 Außenmembranvesikel

Die Außenmembranvesikel der 536 Stämme [Wildtyp pASK75 (12002), *surA* pASK75 (12045), *surA* pSurA (12046)] wurden wie unter 3.3.1.3 beschrieben isoliert. Die Proben wurden 1:20 mit bidestilliertem Wasser verdünnt. Nach der Beschichtung der Grids mit 1%iger Alcianblaulösung wurden die Grids für zehn Minuten auf 30 µl Probentropfen aufgelegt. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Negativkontrastierung mit 1%igem Uranylacetat. Die Bilddarstellung der Vesikel

erfolgte mit dem TEM Tecnai 12 BioTwin von FEI Company und die Aufnahmen wurden mit einer CCD Kamera Megaview III von Olympus gemacht. Frau Janett Piesker von der Abteilung ZBS 4 (Zentrum für Biologische Gefahren und Spezielle Pathogene 4) am Robert Koch-Institut war sowohl für die Präparation als auch für die Bildaufnahmen zuständig.

Für die Immunogoldmarkierung des α -Hämolytins (HlyA) erfolgte zunächst eine Fixierung der OMV mit 4%igem Paraformaldehyd/0,5%igem Glutaraldehyd in HEPES (0,05 M). Anschließend erfolgte eine Tieftemperatur-Einbettung nach der PLT-Technik in einen Acrylatkunststoff. Nach der UV-Polymerisation des Kunststoffs wurden mit einem Ultramikrotom Ultradünnschnitte (70 nm) der Proben angefertigt, die dann der Immunogoldmarkierung unterzogen wurden. Hierfür wurden zunächst unspezifische Bindungen mit einem „Blockpuffer“ (PBS mit 0,5 % BSA, 0,1 % Gelatine, 0,1 % Natriumazid) für 30 min blockiert. Die Markierung des HlyA mit dem monoklonalem E2 Primärantikörper, der ein nach außen gerichtetes Epitop des membrangebundenen Toxins erkennt, erfolgte in dem Blockpuffer in 1:100 Verdünnung für eine Stunde bei RT. Nach der Inkubation folgte ein viermaliges Waschen für fünf Minuten mit dem Blockpuffer. Der goldkonjugierte Sekundärantikörper wurde für die Markierung 1:20 verdünnt und sehr kräftig geschüttelt, um Gold-Cluster zu vermeiden. Die Inkubation erfolgte auch hier für eine Stunde bei RT. Anschließend wurde die Probe einmal mit Blockpuffer für fünf Minuten gewaschen und dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen. Vor der Kontrastierung mit 2%igem Uranylacetat wurde die Probe ein weiteres Mal mit 1%igem Glutaraldehyd fixiert. Nach der Kontrastierung mit Uranylacetat folgten mehrere Waschschriffe mit zweifach destilliertem Wasser und ein weitere Kontrastierung mit Bleicitrat. Die Waschschriffe erfolgten zunächst mit 0,02N NaOH/bidest. H₂O (1:1) und anschließend mit dreimal mit zweifach destilliertem Wasser. Als Sputterquelle wurden zwei Kohlefäden verwendet. Frau Gudrun Holland von der Abteilung ZBS 4 (Zentrum für Biologische Gefahren und Spezielle Pathogene 4 am Robert Koch-Institut) hat sowohl die Bildaufnahmen und die Probenvorbereitung vorgenommen.

4. Ergebnisse

Der Einfluss des periplasmatischen Chaperons SurA auf die Urovirulenz der pathogenen pyelonephritisverursachenden Isolate 536 (O6:K15:H31) und CFT073 (O6:K2:H1) wurde in dieser Arbeit unter Bezugnahme auf ausgewählte Virulenzfaktoren untersucht. Akzentuiert wurden hierbei die Außenmembranvesikel (OMV), das Hämolyseverhalten und die Motilität. Für die verschiedenen Fragestellungen wurden stets der Wildtyp (Wt) und die isogene *surA*-Deletionsmutante miteinander verglichen.

4.1 Phänotypische Charakterisierung der *surA*-Mutante des UPEC 536 Stamms

4.1.1 Einfluss des periplasmatischen Chaperons SurA auf das Wachstumsverhalten

Das Fehlen des periplasmatischen Chaperons SurA beeinflusst ganz wesentlich die Zellhüllhomöostase und führt entsprechend zu einem leicht verzögerten Wachstum. Dies wurde bereits für das Zystitis-Isolat UTI89 beschrieben [136]. Wie sich die in dieser Arbeit erzeugten UPEC-536-Genotypen (vgl. 2.1), die *surA*-Mutante (536 Δ *surA* pASK75) und der Wildtyp (536 pASK75), in ihrem Wachstumsverhalten, wurde mittels eines einfachen Wachstumstests in Flüssigkultur über mehrere Stunden untersucht.

Die *surA*-Mutante zeigte im Vergleich zum Wildtyp und der entsprechenden komplementierten Mutante (536 Δ *surA* pSurA) ein signifikant leicht verzögertes Wachstumsverhalten in allen Wachstumsphasen. Die stationäre Phase wurde bereits bei einer OD₆₀₀ von etwa 3 erreicht, während der Wildtyp diese erst bei einer OD₆₀₀ von fast 4 erreicht (Abb.7). Die Wachstumskurve der komplementierten Mutante ist fast mit der des Wildtyps identisch und es besteht kein signifikanter Unterschied

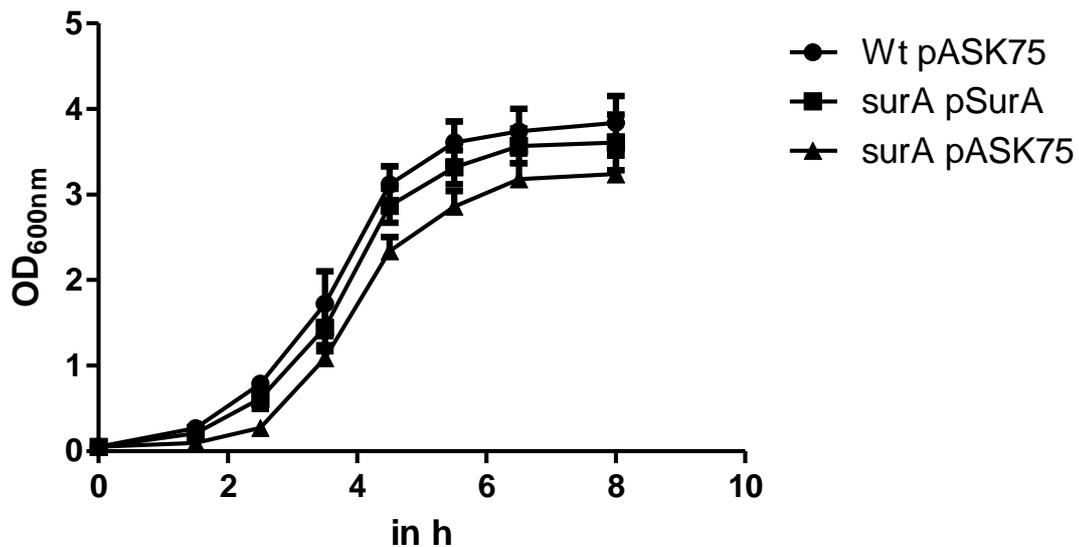


Abb. 7: Wachstumskurve des UPEC-536-Wildtyps (Wt), der isogenen *surA*-Mutante (*surA* pASK75) und der mit dem Plasmid pSurA komplementierten Mutante (*surA* pSurA) bei 37 °C und 350 rpm in LB mit Ampicillin. Der Wildtyp und die Mutante wurden mit dem Leervektor pASK75 (vermittelt Ampicillinresistenz) versehen. Angeimpft wurden die Kulturen aus ÜN-Kulturen mit OD₆₀₀ 0,05.

4.1.2 Novobiocin-Sensitivitätstest

Der UPEC-536-Stamm weist natürlicherweise den transmembranen, heterodimeren MdtABC-Komplex auf, der eine Resistenz gegenüber Desoxycholsäure und Novobiocin vermittelt [137]. Dieser Komplex befindet sich in der Zellmembran und fungiert als Efflux-Transport-System. Da SurA für die Faltung verschiedener β -Fassproteine der äußeren Membran essentiell ist und sein Fehlen zu einem Membranintegritätsdefekt führt, wurde mittels eines Novobiocin-Sensitivitätstests untersucht, ob auch die *surA*-Mutanten der UPEC Stämme 536 und CFT073 diesen Phänotyp zeigen.

Die Auswertung des Novobiocin-Sensitivitätstests ergab, dass sowohl die *surA*-Mutante des UPEC-Isolats 536 als auch des UPEC-Isolats CFT073 signifikant sensibler gegenüber dem Antibiotikum reagierten als der Wildtyp. Dies bedeutet, dass in beiden UPEC-Isolaten das Fehlen des Chaperons SurA zu einem Defekt führt und die Bakterienzelle sich nicht ausreichend gegenüber dem Einwirken von Novobiocin schützen kann und infolgedessen abstirbt. Die Komplementation der Mutation führte in beiden UPEC-Stämmen zu einer Wiederherstellung der Membranintegrität und der damit verbundenen Resistenz gegenüber Novobiocin.

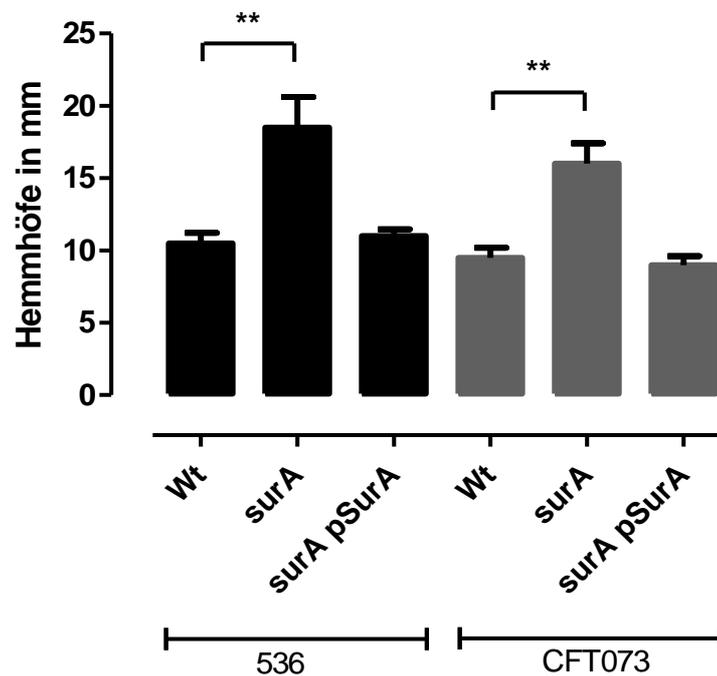


Abb. 8: Sensitivitätstest der UPEC-536- und des CFT073-Isolats auf Novobiocin. Verglichen wurde jeweils der Wildtyp (Wt) mit der isogenen *surA*-Mutante (*surA*). Die komplementierte *surA*-Mutante (*surA pSurA*) wurde jeweils einmal mitgeführt. Die Hemmhöhe um ein Novobiocin-getränktes Filterplättchen auf dem Bakterienrasen einer LB-Agarplatte wurden nach 24 h bei 37 °C mit einem Lineal ausgemessen.

4.1.3 Nachweis der SigmaE (σ^E)-Aktivität

SurA spielt bei der Biogenese von β -Fassaußenmembranproteinen (OMP) eine zentrale Rolle. Vorrangig werden die drei OMP OmpA, OmpF und LamB durch das Fehlen von SurA vor Einbau in die äußere Membran nicht korrekt gefaltet, wohingegen andere OMP nicht betroffen sind [102]. Durch die Agglomeration der ungefalteten OMP in einer *surA*-Mutante wird eine σ^E -abhängige extrazytoplasmatische Stressantwort ausgelöst. Die resultierende erhöhte σ^E -Aktivität führt zur vermehrten Synthese kleiner, nicht kodierender „small-RNAs“ (sRNA), diese die Synthese der OMPs bereits auf posttranskriptionaler Ebene negativ regulieren. Die Induktion von σ^E geht zudem mit einer verstärkten Expression der Protease *degP*, die ungefaltete Proteine degradiert, einher [123, 138].

Die σ^E -vermittelte Stressantwort lässt sich mittels eines Chloramphenicol-Sensibilitätstests indirekt messen. Durch Einbringen eines Plasmids mit einem Chloramphenicolresistenzgens unter der Kontrolle eines σ^E -abhängigen Promotors in den Wildtyp und der *surA*-Mutante der UPEC-Stämme 536 und CFT073 konnte

durch die entstehenden Hemmhöfe auf LB-Platten mit einem Chloramphenicol-getränkten Plättchen über die Messung der Hemmhofdurchmesser des Bakterienrasens ein Rückschluss auf die σ^E -Aktivität gezogen werden. Je sensibler die Bakterien gegenüber dem einwirkenden Antibiotikum Chloramphenicol sind, desto größer der resultierende Hemmhof und desto geringer die σ^E -vermittelte Stressantwort. Als Kontrollplasmid diente ein Plasmid mit dem CAT-Gen, das eine Chloramphenicolresistenz vermittelt, aber keinen Promotor besitzt (Abb. 6).

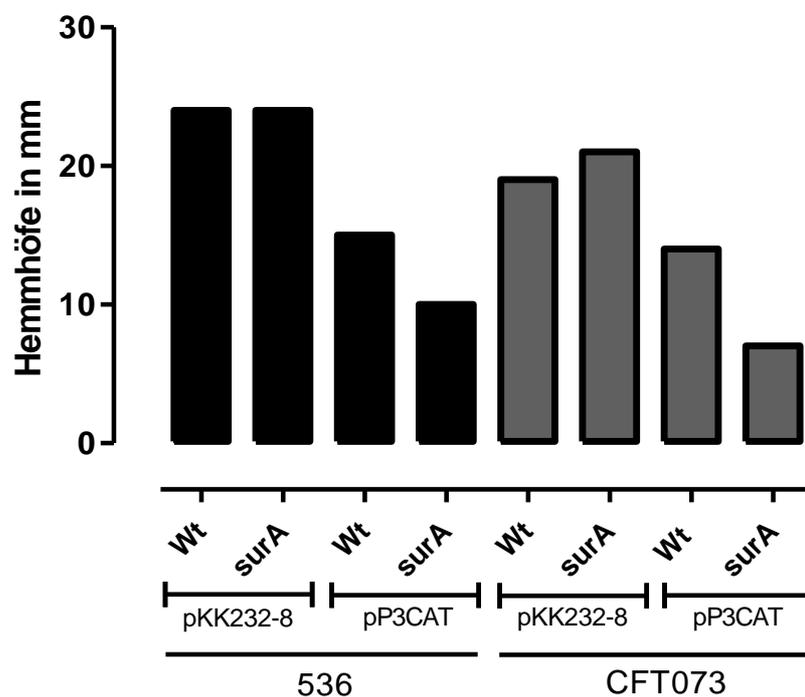


Abb. 9: Messung der chloramphenicolabhängigen Hemmhöfe als Maß für die σ^E -vermittelte Stressantwort im Wildtyp und der *surA*-Mutante der uropathogenen Isolate 536 und CFT073. Die Hemmhöfe um ein mit Chloramphenicol-getränktes Filterplättchen (30 μ g) auf den jeweiligen Bakterienrasen auf LB-Agarplatten wurden nach einer Inkubation von 24 h bei 37 °C mit einem Lineal vermessen. Das Plasmid pP3CAT besitzt einen σ^E -abhängigen Promotor (P3rpoH) für das CAT-Gen, das für ein Chloramphenicolresistenzgen (Chloramphenicol-Acetyltransferase) kodiert. Bei pKK232-8 handelt es sich um das Kontrollplasmid mit dem CAT-Gen ohne Promotor (vgl. 3.4.5).

Die Vermessung der Hemmhöfe der Kontrollstämme 536 und CFT073 ergab eine deutliche Sensibilität gegenüber Chloramphenicol. Diese Stämme tragen das Kontrollplasmid pKK232-8 und besitzen keine natürliche Resistenz gegenüber Chloramphenicol (Abb. 9). Zwischen dem Wildtyp (Wt) und der *surA*-Mutante (*surA*) des Stammes 536 zeigte sich in der Sensibilität gegenüber Chloramphenicol kein Unterschied. Gleiches wurde auch für den Stamm CFT073 festgestellt. Die beiden

Genotypen weisen keine natürliche Resistenz gegen Chloramphenicol auf und können daher im weiteren Umfeld des Testplättchens nicht wachsen. Betrachtet man hingegen die Stämme, die das σ^E -Reporterplasmid pP3CAT enthalten, ließ sich feststellen, dass der Wildtyp im Vergleich zur *surA*-Mutante eine deutlich niedrigere Resistenz gegenüber Chloramphenicol zeigte, was sich in einem fast doppelt so großen Hemmhof für CFT073 und in einem um ein Drittel größeren Hemmhof für 536 äußerte. Dieser Befund verdeutlicht, dass in beiden *surA*-Mutanten das CAT-Gen deutlich häufiger exprimiert wurde als im Wildtyp und eine erhöhte Menge an σ^E vorlag. Unterschiede zwischen den Wildtyp-Stämmen 536 und CFT073 sind kaum sichtbar. Zwischen den beiden *surA*-Mutanten konnte hingegen ein kleiner Unterschied in der Hemmhofgröße beobachtet werden. Der Vergleich zwischen den Wildtyp-Stämmen mit dem pP3CAT und mit Kontrollplasmid zeigte, dass unter normalen Wachstumsbedingungen eine gewisse σ^E -Aktivität grundlegend vorhanden ist, da der Wildtyp mit dem Kontrollplasmid sensitiver auf das Antibiotikum reagierte.

4.2 Außenmembranvesikel

4.2.1 Elektronenmikroskopische Darstellung der Vesikel

Uropathogene *E. coli* schnüren, wie alle anderen gramnegativen Bakterien, Außenmembranvesikel ab. Diese bestehen aufgrund ihrer Herkunft von der äußeren Membran aus Phospholipiden, Lipopolysacchariden (LPS) und Membranproteinen. Sie dienen als Transportvehikel für verschiedene Faktoren, Enzyme (z.B. Proteasen), Toxine, Lipide und Erbgutinformationen [59-62, 64, 66]. Da ein Defekt des Chaperons SurA, wie bereits erwähnt, Einfluss auf die Membranintegrität nimmt, wurden in dieser Arbeit die abgeschnürten Vesikel des 536-Wildtyps und der *surA*-Mutante elektronenmikroskopisch analysiert und verglichen.

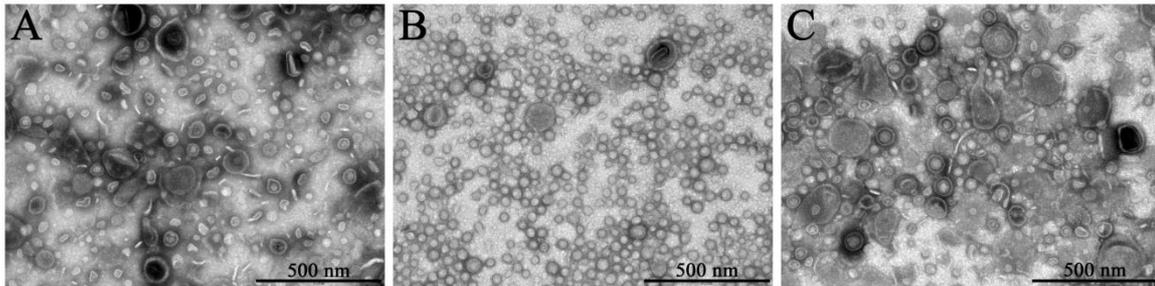


Abb. 10: Elektronenmikroskopische Aufnahmen isolierter Außenmembranvesikel (OMV) des uropathogenen Stammes 536. A) zeigt die OMV des Wildtyps (wt pASK75), B) die der *surA*-Mutante (*surA* pASK75) und C) die der Komplementante. Nach der Ultrazentrifugation des filtrierten Kulturüberstandes (OD 2,4) wurden die Pellets in 20µl 20mM Tris-Puffer (pH 8,0) resuspendiert und anschließend 1:20 verdünnt. Die Kontrastierung für die Transmissionselektronenmikroskopie erfolgte mit Uranylacetat. Aufnahmen von Gudrun Holland (Robert Koch-Institut, ZBS 4). Abb. entnommen aus [164].

Die Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigte, dass es einen Unterschied in der Größe und Anzahl der Außenmembranvesikel zwischen dem 536 Wildtyp und der *surA*-Mutante gibt. Die Mutante schnürt deutlich mehr kleinere Vesikel ab als der Wildtyp. Das Gesamtbild erscheint bezüglich der Größe sehr viel einheitlicher. Um den optischen Eindruck der viel kleineren Vesikel der *surA*-Mutante statistisch zu untermauern, wurden von den drei 536-UPEC-Stämmen (Wt, *surA*, *surA* pSurA) jeweils über 1200 Vesikel ausgemessen und die prozentualen Anteile verglichen. Die Komplementation führte zu einer heterogenen Vesikelgröße wie beim Wildtyp.

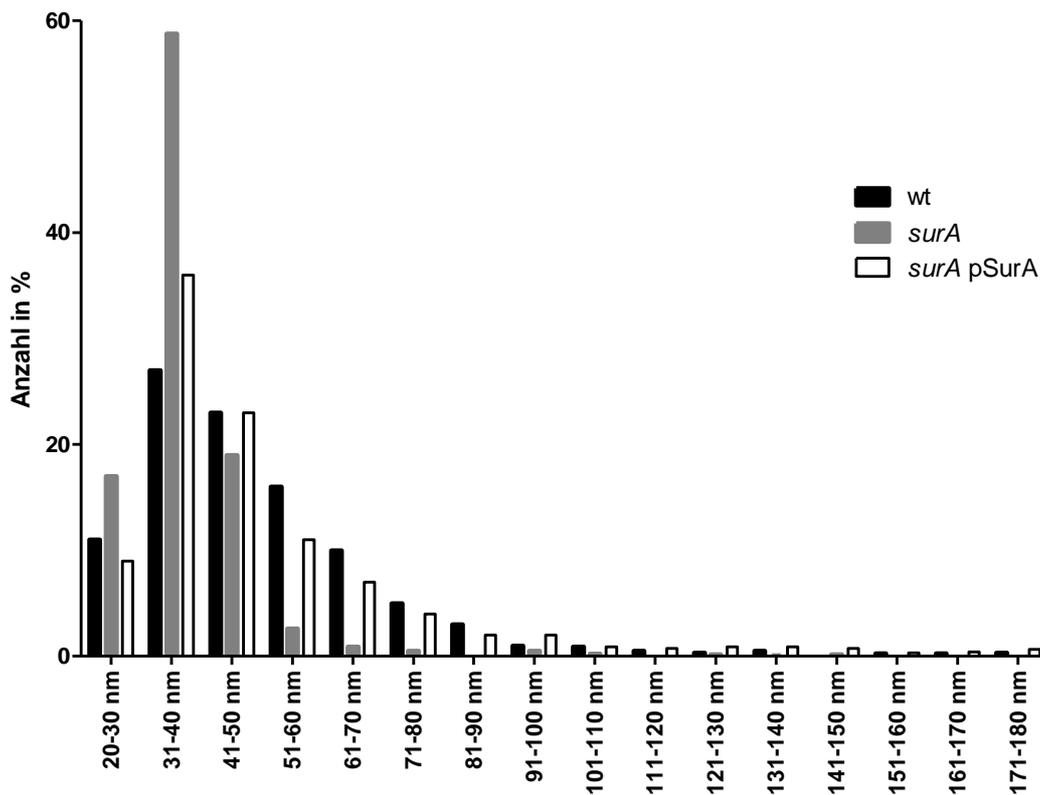


Abb. 11: Prozentuale Größenverteilung der OMV des 536-Wildtyps, der *surA*-Mutante und der entsprechenden komplementierten Mutante. Grundlage der Ausmessung waren elektronenmikroskopische Aufnahmen der OMV durch Gudrun Holland (Robert Koch-Institut, ZBS 4). Es wurden für jeden Stamm 1200 Vesikel vermessen (=100 %) und in 10er Schritten hinsichtlich des Durchmessers in nm gruppiert und grafisch dargestellt.

Der Hauptanteil der Vesikel lag bei der *surA*-Mutante bei einer Größe zwischen 30 nm und 40 nm mit einer durchschnittlichen Vesikelgröße von 37 nm. Vesikel größer als 50 nm konnten relativ selten gefunden werden. Der Wildtyp und die Komplementante zeigten hinsichtlich der Vesikelgröße ein breiteres Spektrum. Die meisten Vesikel waren zwischen 20 nm und 90 nm groß mit einer durchschnittlichen Vesikelgröße von etwa 50 nm.

Bei genauerer Betrachtung fallen neben den Vesikeln filamentöse Strukturen auf, die allerdings vorrangig beim Wildtyp und der Komplementante zu finden waren (Abb. 10 A und C). Vermutlich handelte es sich hierbei um Filamentfragmente von Flagellen, die in etwa einen Durchmesser von 15 nm- 20 nm aufweisen. Für andere Pili-Strukturen, wie z.B. P-Pili, wäre der Durchmesser zu groß. Wäre diese Vermutung zutreffend, würde dies bedeuten, dass anscheinend die *surA*-Mutante weniger Flagellen bildet, da die elektronenmikroskopischen Bildaufnahmen der

OMV-Fraktion kaum derartige Filamentstrukturen zeigten. Dieser Anhaltspunkt wurde in Kapitel 4.4 näher untersucht.

4.2.2 Proteomanalyse der OMV via zweidimensionaler Gelelektrophorese

Um die möglichen Unterschiede in der Proteinzusammensetzung der Außenmembranvesikel vom 536-Wildtyp und der *surA*-Mutante zu charakterisieren, wurden die OMV-Fractionen mittels der 2D-Geltechnik untersucht. Dazu wurden die Kulturüberstände ultrazentrifugiert und die im Pellet befindlichen OMV für die zweidimensionale (2D) Gelelektrophorese präpariert. Die Proben wurden in der ersten Dimension jeweils über den pH-Bereich 3-10 und in der zweiten Dimension entsprechend der Molekulargewichte der Proteine im elektrischen Feld aufgetrennt.

4.2.2.1 Analyse ausgewählter Proteinspots aus der OMV-Fraktion

Vergleicht man die Proteinzusammensetzung der OMV des Wildtyps mit der *surA*-Mutante fällt zunächst auf, dass sich die Mehrzahl der Proteinpunkte in beiden Gelen wiederfinden (Abb. 12). Einige Spots unterscheiden sich in ihrer Intensität (Volumen). Ausgewählte Punkte wurden mittels einer massenspektrometrischen Analyse identifiziert. Hierfür wurden die Punkte 1-12 (Abb. 12) ausgeschnitten und analysiert (vgl. 3.3.6).

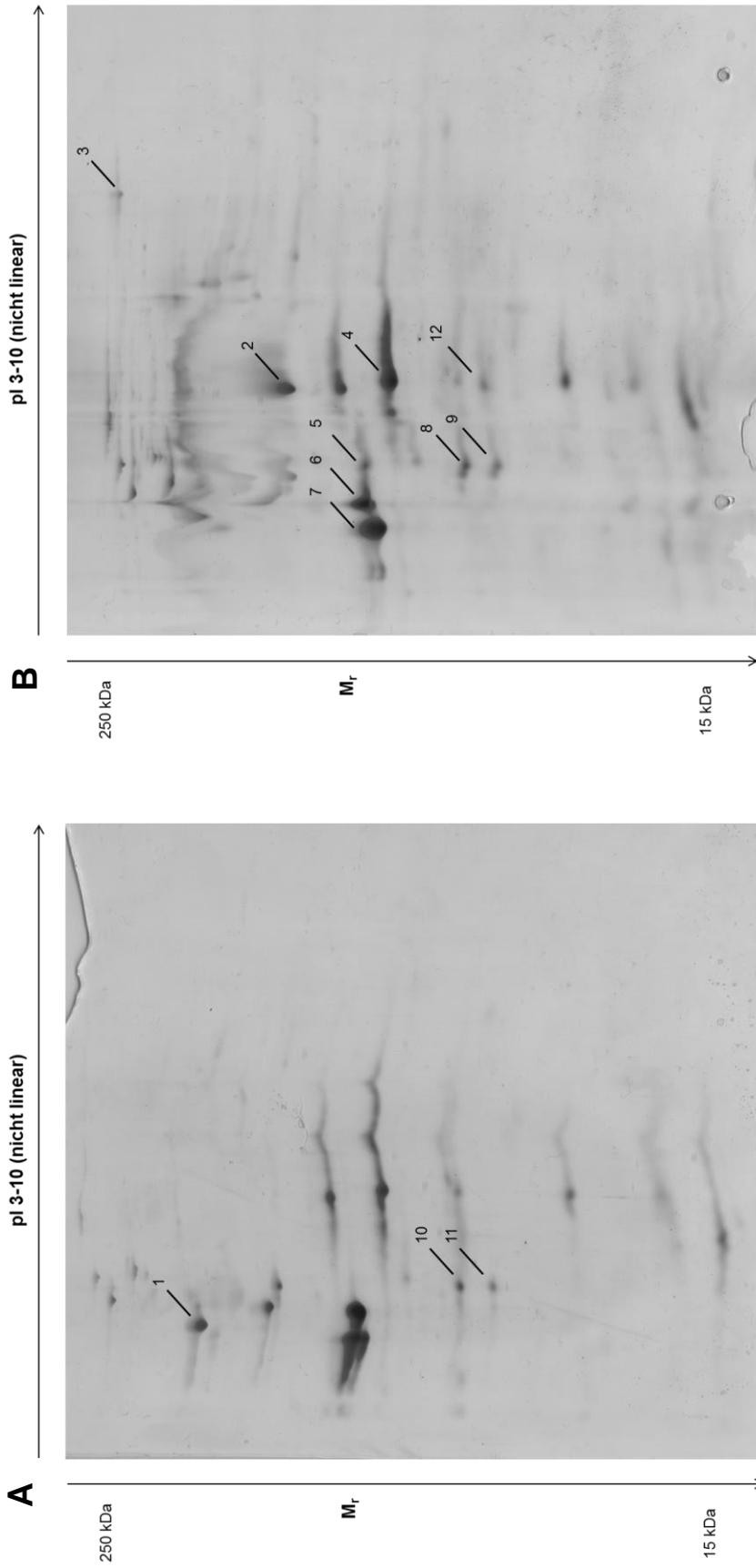


Abb. 12: Zweidimensionale Gelelektrophorese von Außenmembranvesikeln (OMV) des Wildtyp-Stammes 536 (A) und der *sura*-Mutante (B). OMV-Fraktion wurde durch Ultrazentrifugation des Kulturüberstandes bei OD 2,4 gewonnen. Das Gel wurde mit einer kolloidalen Coomassie-Lösung gefärbt („Blue-Silver“-Färbung). Die im Gel markierten Proteinspots (1-12) wurden ausgeschnitten, vorbereitet (3.3.6) und mittels der MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert. pI= isoelektrischer Punkt; Mr= relatives Molekulargewicht.

Die Auswertung der Massenspektrometriedaten und die erhaltenen Aminosäuresequenzen führten unter Zuhilfenahme der Datenbank Mascot zur Identifizierung einiger Proteine, die von Interesse waren.

Tab. 17: Spotanalyse mittels MALDI-TOF MS System und Identifizierung der Proteine mit Hilfe der Online-Datenbank Mascot; Mowse-Wert $>56 = p < 0,05$

Probe	Identifiziertes Protein	Funktion	Mowse-Wert	Proteinüber-einstimmung in %	Anzahl der paarigen Peptide	Größe in kDa	Ratio Wildtyp/surA
1	FliC	Untereinheit des Flagellen-Filaments	39	23	9 von 40	~ 51	3,492/1,193
2	k.A.						0,474/6,104
3	EF-Tu	Elongationsfaktor (Zytoplasma)	95	45	17 von 42	~ 43	0,098/0,385
4	YeaO	uncharakterisiertes Protein	39	50	6 von 39	~ 13	6,724/5,918
5	LpxH	UDP-2, 3-diacetylglucosaminhydrolase	43	28	4 von 41	~ 27	0,321/1,758
6	NmpC	Putatives OM-Porin	45	38	9 von 45	~ 40	9,099/6,533
7	OmpC	Außenmembranprotein	50	33	12 von 40	~ 40	13,193/7,963
8	DeoC	Desoxyribose-Phosphataldolase (Zytoplasma)	39	21	5 aus 32	~ 28	0,110/0,212
9	RppH	RNA-Pyrophosphohydrolase	37	41	6 von 58	~ 20	0,073/0,277
10	RimK	Ribosomale Proteinligase	40	38	9 von 54	~ 32	1,967/1,893
11	MipA	MitA-interagierendes Protein	37	41	6 von 49	~ 28	0,893/0,904
12	PspA	Membranintegrität/Chemotaxis	35	39	10 von 49	~ 25	0,084/1,243

Das Protein mit der Probennummer 1 (isoliert aus dem Wildtyp-Gel, Abb. 12 A) wurde als die Flagellin-Untereinheit FliC identifiziert. Auch wenn der Mowse-Wert mit 39 unterhalb der Signifikanzgrenze von 56 lag, stimmten der pH-Wert und die Größe des Proteins mit den theoretischen Angaben für das Protein mit der Lage im Gel überein. Auch stimmt die Position im Gel verglichen mit anderen Forschungsarbeiten mit 2-D-Gel-Analysen überein [161]. In der OMV-Fraktion des Wildtyps zeichnete sich hierfür ein deutlicher Proteinspot ab. Dieser konnte in der Stärke für die *surA*-Mutante nicht ausgemacht werden. Die Proteine der Mutante sind in dem Bereich deutlich unsauberer aufgetrennt als beim Wildtyp, aber in diesem Größenbereich ist eine solch hohe Proteinmenge nicht zu erkennen. Auch ein definierter FliC-Spot konnte mit bloßem Auge für die *surA*-Mutante nicht ausgemacht werden. Allerdings wurden die Spots mittels einer Software (Delta 2D) hinsichtlich ihrer Stärke analysiert und ein FliC-Spot für die Mutante konnte gefunden werden (vgl. 4.2.2.2). Da die Vesikel durch die Abschnürung über die äußere Membran entstehen, deutet das geringe Vorkommen an FliC, welches als Flagellinuntereinheit an der äußeren Membran zu finden ist, in der *surA*-Mutante auf eine mögliche Reduktion dieser Filamente hin.

Der Elongationsfaktor EF-Tu (Probe 3, isoliert aus dem Gel des Wildtyps) konnte als einziges Protein signifikant bestimmt werden, da der Mowse-Wert über 56 lag (Signifikanzgrenze). In der Mutante zeigte sich ein etwa 4fach erhöhter Proteingehalt. Weiterhin wurden die beiden Außenmembranproteine NmpC und OmpC mit den Probennummern 6 und 7 identifiziert. Sie konnten in beiden Stämmen als Bestandteile der Vesikel nachgewiesen werden. Die OmpC-Level sind in den OMV der *surA*-Mutante etwa um den Faktor 2 geringer als in den wildtypischen OMV.

Die Proteinproben Nummer 8 und 9 wurden aus dem 2D-Gel der Mutante isoliert. Zum einen handelte es sich um eine Desoxyribose-Phosphataldolase, DeoC, und zum anderen um die RNA-Pyrophosphohydrolase RppH. Beide Proteine entstammen dem Zytoplasma und kamen in wildtypischen OMV deutlich geringer vor. Benachbart zu den Proteinpunkten 8 und 9 wurden die Spots 10 und 11 aus dem 2D-Gel des Wildtyps analysiert. Die Analyse des Proteinspots Nummer 10 ergab eine ribosomale Proteinligase, RimK. Bei dem Protein mit der Nummer 11 handelte es sich um MipA, ein sogenanntes „Scaffold-Protein“ der äußeren Membran, das der Vermittlung von Proteinkomplexen dient. Beide Proteine konnten in den

Fraktionen, sowohl im Wildtyp als auch in der *surA*-Mutante, in fast gleichen Mengen gefunden werden.

Ein weiteres identifiziertes Protein ist das Phage-Shock-Protein PspA (Nummer 12), das 14fach erhöht in den OMV der *surA*-Mutante vorkam. Das Protein reguliert die Expression des Operons *pspABCDE*, *pspG* und *pspF* negativ unter limitierenden Wachstumsfaktoren. Das Protein wird darüber hinaus auch für die Membranintegrität und den Protonengradienten benötigt.

Für den Spot 2 konnte leider in der Datenbank kein Treffer erzielt werden. Grund hierfür ist die geringe Anzahl an Peptiden für einen Sequenzabgleich. Die Proben mit den Nummern 4 und 5 lieferten zwar ein Ergebnis in der Datenbank, allerdings erwiesen sich die Ergebnisse aufgrund der Molekulargewichte und der Lage im 2D-Gel als nicht plausibel. Auch hier war die Anzahl der erhaltenen paarigen Peptide für einen Sequenzabgleich mit der Proteindatenbank zu gering. Eine erneute Analyse des Spots 4 mittels massenspektrometrischen Analysen wäre von Interesse, da dieses Protein um den Faktor 6 in der Mutante erhöht war.

4.2.2.2 Vergleich der OMV-Fraktionen

Mit Hilfe der Delta2D-Software lassen sich mehrere Proteingele miteinander vergleichen („*matching*“) und die Spotvolumina quantitativ analysieren. So wurde das OMV-2D-Gel des 536-Wildtyps mit dem OMV-2D-Gel der *surA*-Mutante mittels der Software identisch übereinander gelegt und die Proteinspots definiert. Die Software ermittelt die Volumina der Spots und ermittelt das Volumenverhältnis zwischen dem Wildtyp und der *surA*-Mutante. Ausgemacht wurden 116 Proteine, die in beiden Stämmen oder in sehr seltenen Fällen nur in einem Stamm vorkamen.

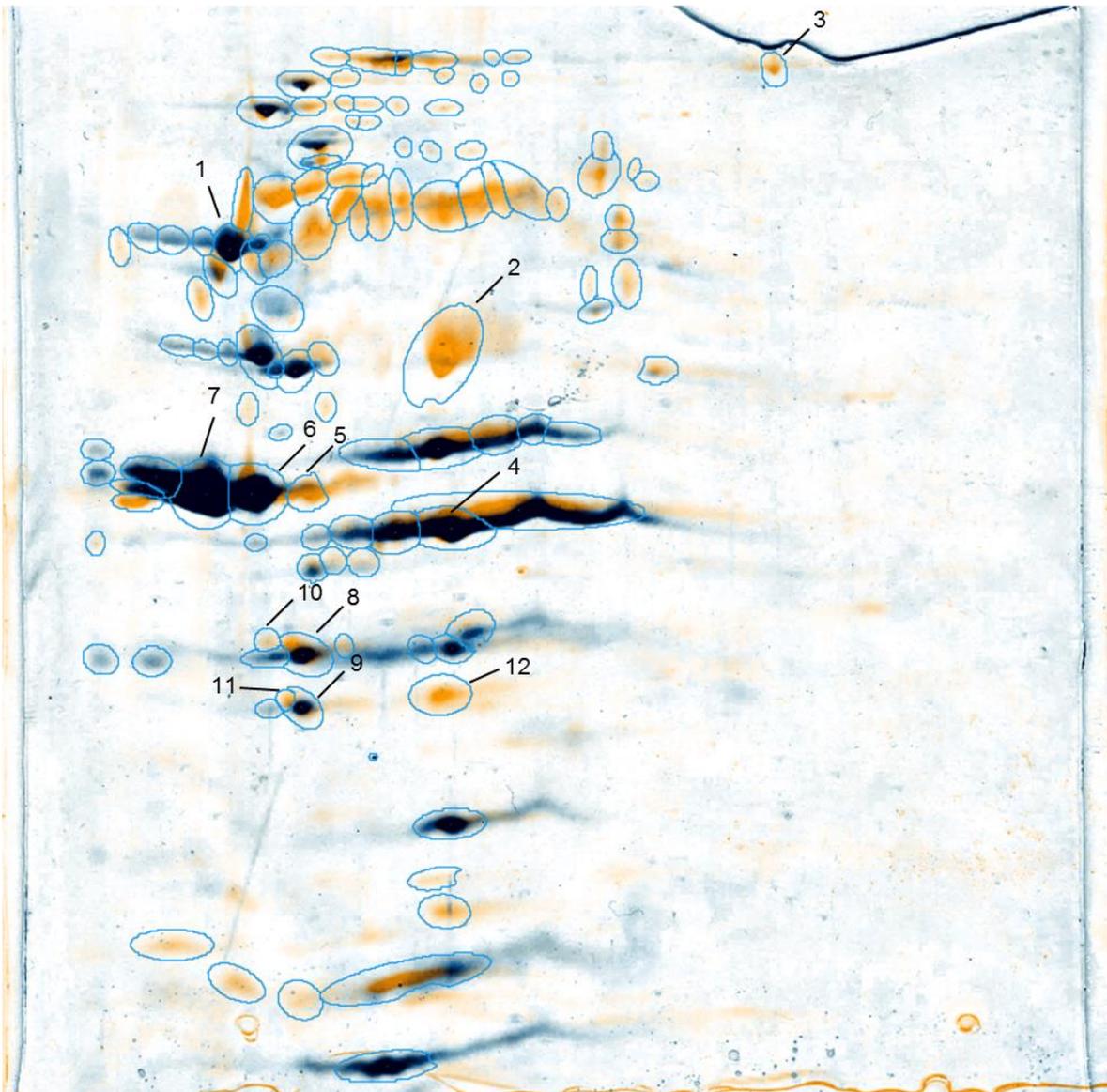


Abb. 13: „*Matching*“ der 2D-Gele von OMV des 536 Wildtyps (blau) und der *surA*-Mutante (orange) mit Hilfe der Delta 2D-Software. Es wurden die Bilder der Gele, die auch für die Spotanalyse mittels MALDI-TOF verwendet worden sind (Abb. 12), für die Fusion und Spotdetektion verwendet.

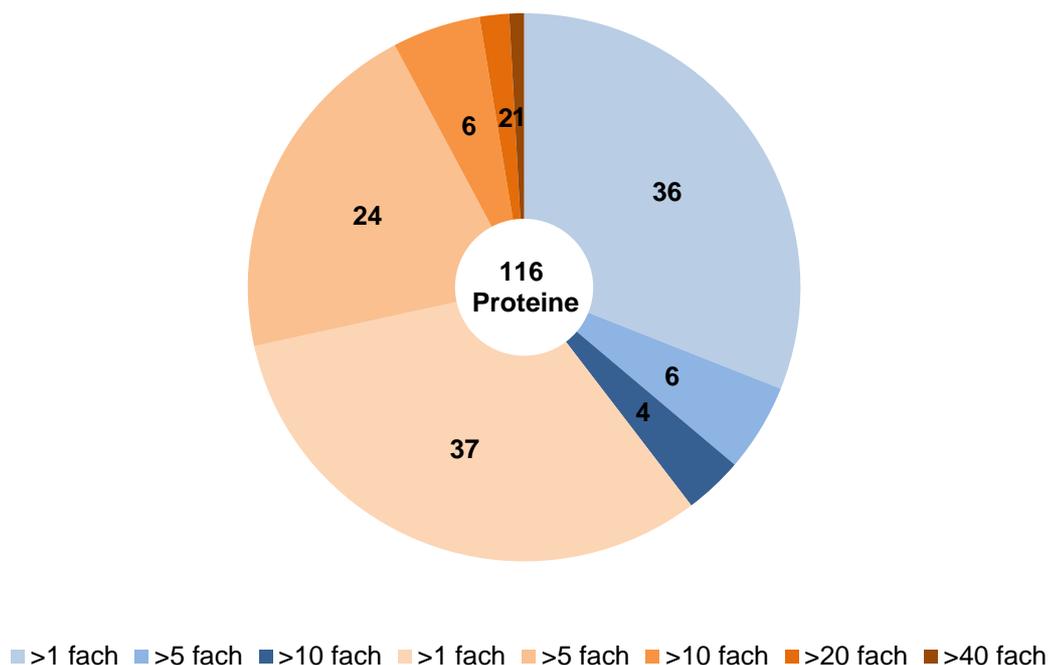


Abb. 14: Verteilung der Volumina-Verhältnisse zwischen Wildtyp und *surA*-Mutante der identifizierten 116 gemeinsamen Proteinpunkte mittels Delta 2D-Software. In Blautönen untergliedert dargestellt sind Proteine, die im Wildtyp ein höheres Volumen aufwiesen als in der *surA*-Mutante. In Orangetönen untergliedert sind entsprechend Proteine dargestellt, die in der *surA*-Mutante ein höheres Volumen zeigten. Die Abstufungen beziehen sich auf den Vergleich der Proteinvolumina.

Die Analyse der Volumina der ausgemachten Proteinspots zeigte geringe bis teilweise starke Unterschiede. Die meisten Proteine zeigten einen weniger als 5fachen Volumenunterschied. Insgesamt 73 Proteine (36 Proteine des Wildtyps, 37 Proteine der *surA*-Mutante) waren im Vergleich beider Stämme weniger als 5fach in ihrer Volumenstärke verändert. Dies weist darauf hin, dass diese Proteine eher unbeeinflusst von SurA sind. Deutlichere Unterschiede der Volumina (>5fach) lassen eher auf einen (direkten oder indirekten) Einfluss von SurA schließen. Demnach sind 33 Proteine mehr als 5fach erhöht in der *surA*-Mutante, wohingegen nur etwa 10 Proteine mehr als 5fach verringert sind.

4.3 Der Einfluss von SurA auf das α -Hämolyisin (HlyA)

4.3.1 Qualitativer Test auf Hämolyseaktivität

Die Sekretion von α -Hämolyisin ist hauptsächlich mit uropathogenen *E. coli* Stämmen assoziiert und ist ein wichtiger Virulenzfaktor in der Etablierung extraintestinaler Infektionen. Zahlreiche Untersuchungen zu SurA zeigten, dass das periplasmatische Chaperon für die Urovirulenz von zentraler Bedeutung ist. In dieser Arbeit wurde erstmals aufgezeigt, dass auch die Größe der Außenmembranvesikel, über die α -Hämolyisin unter anderem membrangebunden transportiert wird, indirekt von SurA beeinflusst ist. In der Literatur ist ein Zusammenhang zwischen der Vesikelgröße und dem Hämolyisingehalt beschrieben. Demnach sind größere Vesikel pathogener *E. coli* vorrangig hämolysinhaltiger [42]. Um zu prüfen, ob daher ein möglicher Zusammenhang zwischen der beobachteten geringeren durchschnittlichen Größe der von der UPEC 536-*surA*-Mutante sekretierten OMV (vgl. 4.2.1) und der hämolysischen Aktivität besteht, wurde ein vergleichender qualitativer Test zur Analyse der Hämolyseaktivität durchgeführt. Hierbei wurden jeweils der Wildtyp und die *surA*-Mutante der beiden hämolysischen UPEC-Stämme 536 und F11 auf Blutagarplatten getestet.

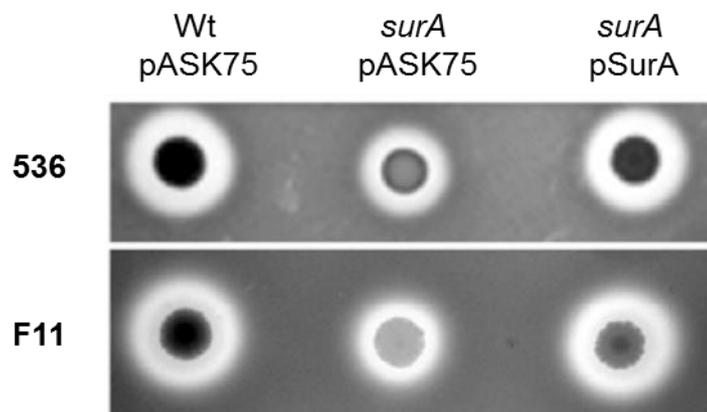


Abb. 15: Qualitativer Hämolysetest der UPEC-Stämme 536 und F11 auf Blutagarplatten (1,5 % (v/v)). Untersucht wurden jeweils der Wildtyp (wt pASK75), die *surA*-Mutante (*surA* pASK75) und die komplementierte *surA*-Mutante des jeweiligen Stammes. Übernachtskulturen der zu untersuchenden Stämme wurden auf eine identische Zellzahl eingestellt (2×10^8 /ml) und je 5 μ l der Flüssigkultur wurde auf die Blutagarplatte getropft. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 48 h.

Die *surA*-Mutante beider hämolysischer UPEC-Stämme 536 und F11 zeigte im Vergleich zum Wildtyp eine verringerte Hämolyseaktivität, die sich durch einen kleineren Hämolysehof auf Blutagarplatten darstellte (Abb. 14). Die Komplementa-

tion der Mutante führte in beiden Stämmen zu einer Wiederherstellung der vollen Hämolyseaktivität. SurA hat den Ergebnissen zufolge einen Effekt auf das hämolytische Potential der getesteten UPEC-Stämme. Der beobachtete Defekt in der hämolytischen Aktivität der *surA*-Mutante könnte auf eine (i) geringere Produktion des α -Hämolysins, (ii) schlechtere Sekretion des α -Hämolysins oder (iii) geringere Aktivität des α -Hämolysins zurückzuführen sein. Um den mechanistischen Zusammenhang für den leichten hämolytischen Defekt der *surA*-Mutante zu verstehen, wurden nachfolgend Analysen zur Bestimmung der *hlyA*-Transkriptmengen sowie der HlyA-Proteinlevel und der enzymatischen Aktivität in verschiedenen Zellkulturfraktionen (Zellextrakt, Überstand, OMV) durchgeführt.

4.3.2 Transkriptanalyse von *hlyA* mittels RT-PCR

Um Rückschlüsse auf die Transkriptmengen von *hlyA* des 536-Wildtyps und der *surA*-Mutante sowie der komplementierten *surA*-Mutante ziehen zu können, wurde eine Transkriptanalyse mittels semi-quantitativer RT-PCR (reverse Transkriptions-PCR) durchgeführt. Hierzu wurde Gesamt-RNA aus den Zellen der späten exponentiellen Phase (OD_{600} 3,0) isoliert und das *hlyA*-Gen mit den Primern RT_hlyA1 und RT_hlyA2 amplifiziert.

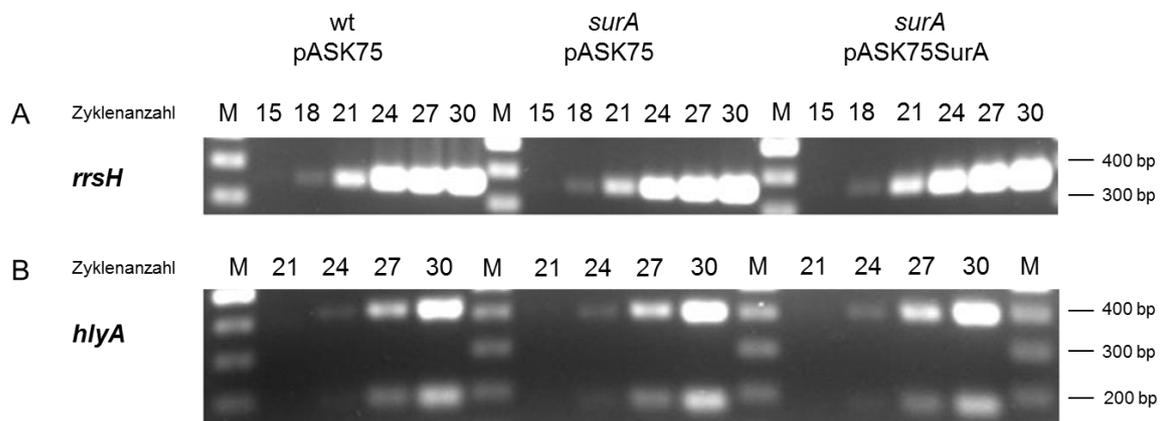


Abb. 16: Vergleichende Transkriptmengenanalyse von *hlyA* mittels RT-PCR. Analysiert wurden der Wildtyp, die *surA*-Mutante und die komplementierte *surA*-Mutante des 536 Stammes. Die eingesetzte RNA wurde aus Kulturen der späten exponentiellen Phase isoliert. Für die Amplifikation des *hlyA*-Gens (400 bp) bei einer „annealing“-Temperatur von 62 °C wurden 10 ng RNA eingesetzt. Es erfolgten 21-30 Amplifikationszyklen. Als „house keeping“-Gen diente *rrsH*, das unbeeinflusst der *surA*-Mutation exprimiert wird. Es wurden 10 ng RNA für die Amplifikation von *rrsH* (350 bp) bei einer „annealing“-Temperatur von 60 °C eingesetzt und 15 – 30 Zyklen durchgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 2%igen (w/v) Agarosegel. Die Versuche wurden mit zwei unabhängigen Kulturen durchgeführt. Experimentelle Durchführung in Zusammenarbeit mit Nadja Bier. Abb. entnommen aus [164].

Ein Vergleich der Transkriptmengen des *hlyA*-Gens (400 bp) zwischen dem 536-Wildtyp und der *surA*-Mutante zeigte keinen signifikanten Unterschied (Abb. 16), so dass die Expression von *hlyA* nicht durch SurA beeinflusst ist. Bei der Amplifikation zeigte sich für *hlyA* ein unspezifisches Produkt bei etwa 200 bp für alle drei untersuchten Stämme. Vermutlich handelt es sich hier um eine unspezifische Bindung der Primer. Diese Nebenprodukte konnten weder durch Erhöhung der „annealing“-Temperatur noch durch die Verwendung des im Kit enthaltenen Q-Puffers zur Auflösung von Sekundärstrukturen verhindert werden.

4.3.3 Quantitativer Hämolysetest und immunochemischer α -Hämolsin-Nachweis

4.3.3.1 Flüssighämolysetest

Der qualitative Hämolysetest der Isolate 536 und F11 ergab (vgl. 4.3.1), dass die *surA*-Mutanten eine verringerte Hämolyseaktivität zeigten. Auf Transkriptionsebene konnte im vorherigen Abschnitt allerdings kein Unterschied in der *surA*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden (vgl. 4.3.2). Ob die Ursache des eruierten hämolytischen Defekts auf Blutplatten womöglich auf Translationsebene zu suchen ist oder auf einer reduzierten enzymatischen Aktivität des α -Hämolsins beruht, wurde in einem quantitativen Flüssighämolysetest und einem immunochemischen α -Hämolsin-Nachweis analysiert. Da es sich bei α -Hämolsin um ein sekretiertes Toxin handelt, das über die Membran von innen nach außen transloziert und außerhalb der Zelle durch Kalzium aktiviert wird, wurden die Bakterienkulturen fraktioniert und die HlyA-Proteinlevel sowie seine hämolytische Aktivität vergleichend im Zellextrakt, im Überstand (ohne OMV) und in den OMV bestimmt. Bekannterweise sekretiert die *surA*-Mutante aufgrund der gestörten Membranzintegrität indirekt viele Proteasen, die sich vermehrt in der Mutante im Periplasma befinden, ins Medium, die wiederum auch Einfluss auf den Abbau und die Inaktivierung von α -Hämolsin haben können. Dieser Effekt führt eventuell zu einer Verfälschung der Ergebnisse hinsichtlich der hämolytischen Aktivität, so dass die Untersuchungen sowohl ohne als auch mit Zugabe eines Proteaseinhibitors durchgeführt wurden.

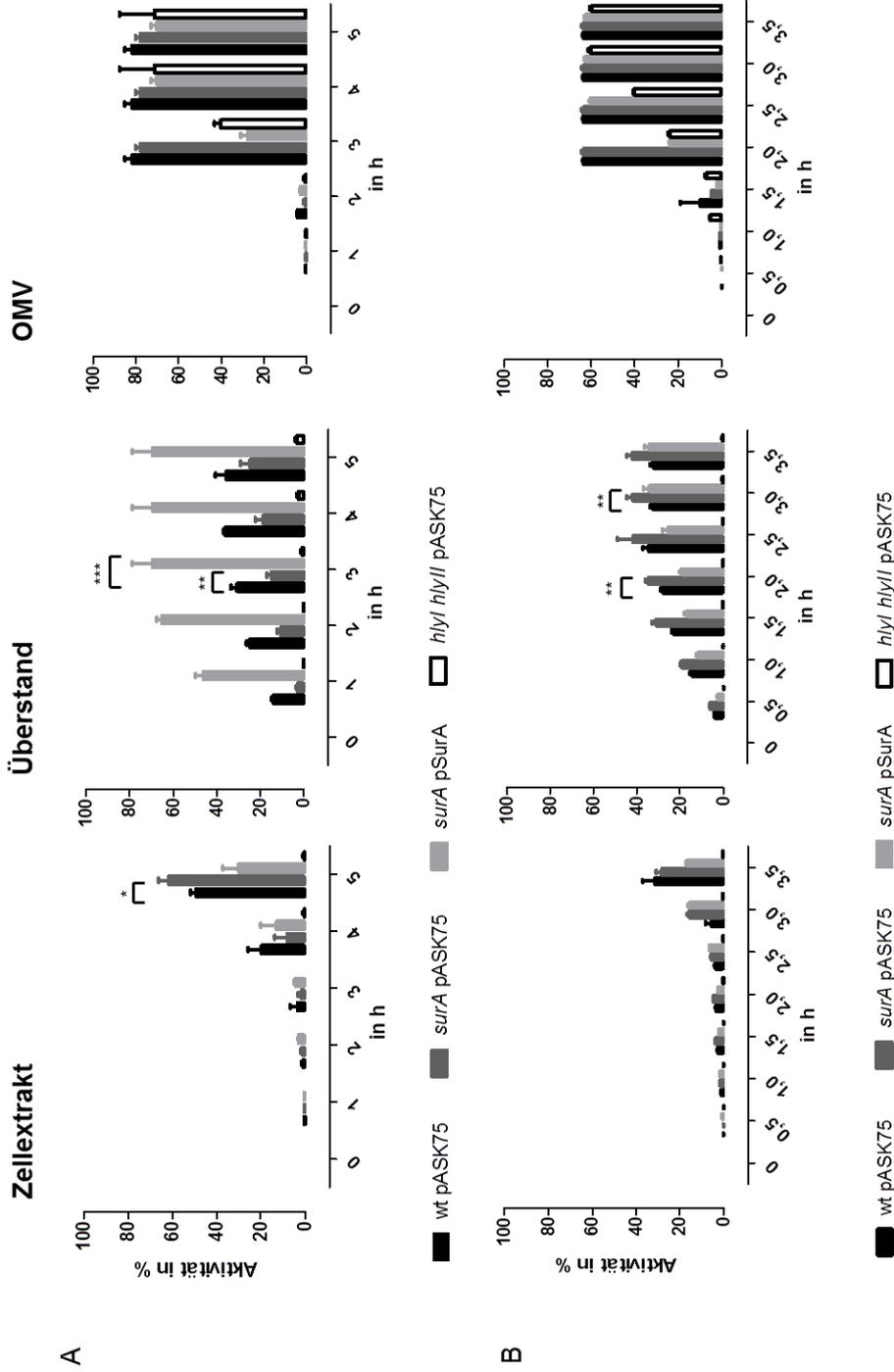


Abb. 17: Messung der hämolysischen Aktivität des uropathogenen Stammes 536 in einem Flüssighämolysetest. Untersucht wurden der 536-Wildtyp (wt pASK75), die 536-surA-Mutante (surA pASK75), die komplementierte surA-Mutante (surA pSurA) und die hlyI hlyII-Mutante (hlyI hlyII pASK75). Je 1 ml Zellextraktprobe, 1 ml Überstandprobe oder 40 µl OMV-Probe (OD_{600nm} 2,4) wurden zu 11 ml bzw. 11,96 ml der Erythrozytensuspension (mit Kalzium 4mM) hinzupipettiert (Endkonz. 2 %) und bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Stündlich wurde die OD_{415nm} gemessen und die Hämolyseaktivität in % bestimmt. Der experimentelle Ansatz erfolgte jeweils in Triplikaten. Zusätzlich wurden die entsprechenden Negativ- und die Positivkontrollen mitgeführt (siehe 3.3.1.1). Die OMV-Proben sind im Vergleich zu den Zellextrakt- und Überstandproben 600fach aufkonzentriert. A) Durchführung des Tests ohne Zugabe von Proteaseinhibitor vor Fraktionierung nach Anzucht und B) zeigt die Ergebnisse mit Zugabe eines Proteaseinhibitors vor Fraktionierung nach Anzucht.

Im Flüssighämolysetest konnte für den Zellextrakt ohne Zugabe des Proteaseinhibitors erst nach fünfstündiger Inkubationszeit ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) in der Hämolyseaktivität zwischen dem 536-Wildtyp und der *surA*-Mutante gesehen werden (Abb. 17 A). Nach vier Stunden Inkubation zeichnete sich ein sichtbarer Anstieg der Hämolyseaktivität sowohl im Wildtyp als auch in der *surA*-Mutante auf etwa 15-20 % ab. Nach fünf Stunden betrug die Aktivität bereits 50 % für den Wildtyp und 60 % für die *surA*-Mutante. Die komplementierte *surA*-Mutante wies zu Beginn die gleiche hämolytische Aktivität auf wie der Wildtyp, allerdings konnte diese nach fünf Stunden nicht ganz das Niveau des Wildtyps erreichen und lag signifikant darunter ($p < 0,05$), steigerte sich aber stetig im Verlauf des Experimentes. Bei dem Kontrollstamm 536 *hlyI hlyII* handelt es sich um eine Hämolyseinmutante HDM (*hemolysin deficient mutant*), in der beide auf Pathogenitätsinseln befindlichen Loci (*hlyI* und *hlyII*-Operon) ausgeschaltet sind. Dieser Stamm zeigte folglich in dem Hämolysetest keine bis sehr geringe hämolytische Aktivität nach fünfstündiger Inkubation.

Für die Überstandfraktion ohne Proteaseinhibitor konnte ebenfalls im Vergleich zum Zellextrakt ein signifikanter Unterschied zwischen dem 536-Wildtyp und der *surA*-Mutante eruiert werden, allerdings war für diese Fraktion der Wildtyp hämolytischer (Abb. 17A). Dieser wies bereits nach einer Stunde Inkubationszeit eine Aktivität von 20 % auf, die sich im Verlauf des Experiments bis auf 35 % steigerte. Die *surA*-Mutante hingegen wies zu den jeweiligen Probenentnahmezeiten meist die Hälfte der hämolytischen Aktivität des Wildtyps auf. Die maximale Aktivität lag bei der *surA*-Mutante für den Überstand bei 25 %. Anders als bei den Zellextrakt-Proben zeigte die komplementierte *surA*-Mutante eine deutlich signifikante Überkomplementation ($p < 0,001$). Schon nach einer Stunde lag die Aktivität bei fast 50 % und manifestierte sich nach drei Stunden Inkubation bei etwa 70 %. Die Kontrolle in Form der *hlyI hlyII*-Mutante war auch nach fünf Stunden kaum in der Lage die Erythrozyten zu lysieren. Am Ende lag die hämolytische Aktivität bei knapp 4 %. Im Vergleich der hämolytischen Aktivität des Wildtyps mit der *surA*-Mutante für die OMV-Fraktion (Außenmembranvesikel) ohne Proteaseinhibitor zeigte sich kein Unterschied (Abb. 17 A). In den ersten beiden Stunden des Experimentes lag die Aktivität für beide Stämme noch auf einem sehr niedrigen Niveau, das dann nach drei Stunden Inkubation rapide auf etwa 80 % anstieg und auf diesem Niveau blieb. Die komplementierte Mutante benötigte in etwa eine Stunde länger, um das

Aktivitätsniveau des Wildtyps und der *surA*-Mutante von etwa 80 % fast zu erreichen. Besonders auffällig in diesem Experiment ist das Verhalten der OMV-Probe der Hämolsin-Mutante, die auch nach drei Stunden eine hämolytische Aktivität von zunächst 40 % und nach fünf Stunden eine Aktivität von etwa 70 % aufwies, wie es eigentlich nicht zu erwarten gewesen wäre. Das Experiment wurde mehrfach wiederholt und dieser Effekt stets beobachtet.

Tab. 18: Tabellarische Darstellung der hämolytischen Aktivität der untersuchten 536-Stämme. -: keine hämolytische Aktivität; +: geringe hämolytische Aktivität; ++: mittlere hämolytische Aktivität; +++: hohe hämolytische Aktivität

	wt	<i>surA</i>	<i>surA</i> p<i>SurA</i>	<i>hlyI hlyII</i>
Zellextrakt	++	+++	+(+)	-
Überstand	++	+	+++	-
OMV	+++	+++	++(+)	++(+)

Die Versuche zur Analyse der hämolytischen Aktivität unter Zugabe eines Proteaseinhibitors vor der Probengewinnung lieferten fraktionsabhängig geringe bis deutliche Unterschiede zu den Ergebnissen ohne Zugabe des Proteaseinhibitors.

Für die Zellextrakt-Fraktion zeigte sich kein Unterschied in der hämolytischen Aktivität durch die Zugabe eines Proteaseinhibitors, was auch zu erwarten war, da dieser im LB-Medium gelöst wurde und nicht in die Bakterienzellen aufgenommen wird. Wie auch bei den vorherigen Versuchen setzte die Aktivität merklich nach drei Stunden ein. Zunächst lag die Aktivität des Wildtyps leicht hinter der der *surA*-Mutante und der komplementierten Mutante, aber holte diesen Rückstand innerhalb von dreißig Minuten auf. Die maximale Aktivität wurde nach dreieinhalb Stunden mit etwa 35 % im Wildtyp und in der *surA*-Mutante erreicht, was eineinhalb Stunden schneller war, als im Versuch ohne Proteaseinhibitor. Die Komplementante (*surA* p*SurA*) verblieb bei knapp 20 %. Die Hämolsin-Mutante zeigte wie auch im vorherigen Versuch keine hämolytische Aktivität.

Der Vergleich der Hämolyseaktivitäten zwischen den Experimenten mit und ohne Proteaseinhibitor für die Fraktion des Überstandes zeigte einen sehr deutlichen Unterschied (Abb. 17). Anders als bei den Versuchen ohne Inhibitor wies der Wildtyp keine höhere hämolytische Aktivität als die *surA*-Mutante auf (Abb. 17 B). Im Gegenteil, die *surA*-Mutante zeigte eine leicht erhöhte Aktivität und bleibt auch nach zweieinhalb Stunden überhalb des Niveaus des Wildtyps (ca. 40 % Aktivität). Diesen Wert erreichte im Experiment ohne Inhibitor nur der Wildtyp, allerdings erst

nach vier Stunden Inkubation. Im Versuch mit Inhibitor wurde die maximale Hämolyse bereits nach zweieinhalb Stunden erreicht und lag bei etwa 35 %. Die komplementierte Mutante zeigte eine kontinuierliche Steigerung der hämolysischen Aktivität bis auf 35 %, blieb aber bis zum Dreistundenwert hinter dem Wildtyp. Wie erwartet, konnte für die Hämolysin-Mutante (*hlyI hlyII*) nur eine sehr geringe Hämolyseaktivität beobachtet werden. Zusammenfassend lässt sich für die Überstand-Fraktion festhalten, dass die Zugabe des Proteaseinhibitors ein Unterschied für die hämolysische Aktivität in der *surA*-Mutante bedeutet und der angenommene Effekt der geringeren Hämolyse gegenüber dem Wildtyp indirekt durch den Einfluss der Proteasen zu Stande kommt. Und generell betrachtet setzt die Hämolyse durch Zugabe des Inhibitors in allen Stämmen (außer der Hämolysinmutante) früher ein und die maximale Hämolyseaktivität wird nach zweieinhalb Stunden, etwa 30 Minuten früher, erreicht.

Die Zugabe des Proteaseinhibitors wirkte sich auf den Vergleich des Wildtyps mit der *surA*-Mutante in der OMV-Fraktion nur sehr gering aus (Abb. 17 B). Nach einer anfänglich geringen hämolysischen Aktivität erreichten beide Stämme nach zwei Stunden ihre maximale Aktivität von ca. 65 %. Eine halbe Stunde später erzielte die komplementierte *surA*-Mutante ebenfalls diesen Wert. Verwunderlich in diesem Versuch mit Proteaseinhibitor war, wie auch schon für den Versuch ohne Inhibitor beschrieben wurde, die hämolysische Aktivität der Hämolysin-Mutante. Nach einer Inkubation der OMV-Probe mit den Erythrozyten für drei Stunden zeigte sich auch hier eine maximale Aktivität von rund 60 %. Dieser Effekt konnte nur in der Fraktion der Außenmembranvesikel beobachtet werden.

Tab. 19: Tabellarische Darstellung der hämolysischen Aktivität der untersuchten 536-Stämme mit Zugabe von Proteaseinhibitor. -: keine hämolysische Aktivität; +: geringe hämolysische Aktivität; ++: mittlere hämolysische Aktivität; +++: hohe hämolysische Aktivität

	536 wt	536 <i>surA</i>	536 <i>surA</i> p <i>SurA</i>	536 <i>hlyI hlyII</i>
Zellextrakt	+	+	+	-
Überstand	+	++	+	-
OMV	+++	+++	++(+)	++

Zusammenfassend lässt sich über die Versuchsergebnisse der Experimente unter Zugabe eines Proteaseinhibitors festhalten, dass es in allen drei Fraktionen kei-

nen signifikanten Unterschied in der hämolytischen Aktivität zwischen dem Wildtyp und der *surA*-Mutante gibt (Tab. 19).

Die Ergebnisse des Flüssighämolysetests zeigten einen signifikanten Unterschied in der hämolytischen Aktivität von Wildtyp und *surA*-Mutante nur im OMV-freien Überstand, der durch externe Zugabe eines Proteaseinhibitors aufgehoben wird. Dies spricht für einen proteolytischen Abbau des frei sekretierten HlyA in der *surA*-Mutante als Ursache für den beobachteten hämolytischen Defekt. Durch immunochemische Detektion von HlyA in den verschiedenen Fraktionen des Wildtyps und der *surA*-Mutante wurden die Befunde des Flüssighämolysetests nachfolgend geprüft werden.

4.3.3.2 Immunochemischer α -Hämolysin-Nachweis

Im Zuge der Probengewinnung für den Flüssighämolysetest wurden von den jeweiligen Kulturen auch Proben für den immunochemischen Nachweis von α -Hämolysin (HlyA) entnommen und entsprechend präpariert (vgl. 3.3.1).

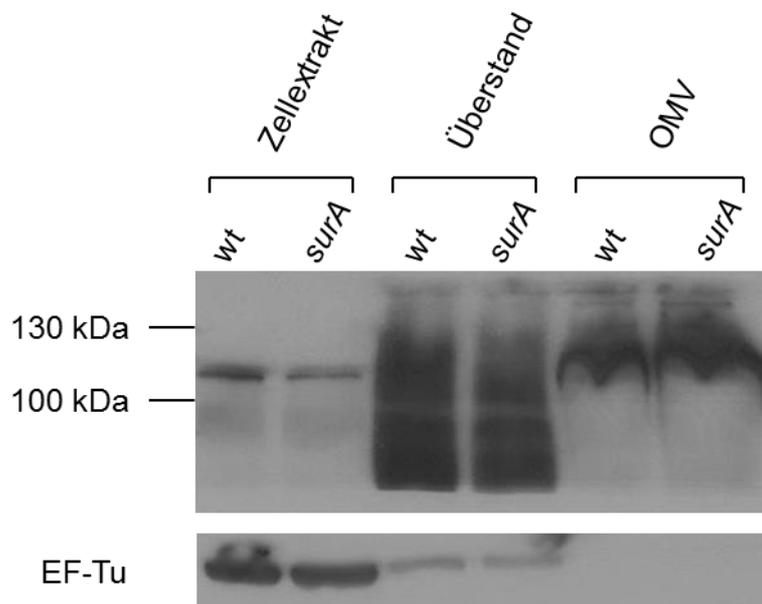


Abb. 18: Immunochemischer α -Hämolysin-Nachweis in den Fraktionen Zellextrakt, Überstand und OMV. Untersucht wurden der Wildtyp (wt) und die *surA*-Mutante (*surA*) des 536-Stammes. Aufgetragen wurden für jeweils gleiche Volumina innerhalb einer Fraktion. Die Proben (OD_{600nm} 2,4) wurden in einem 12%igem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Das α -Hämolysin (~110 kDa) wurde mit einem spezifischen polyklonalen Primärantikörper markiert und mit einem HPR-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert. Als Ladekontrolle diente der prokaryotische Elongationsfaktor EF-Tu (43 kDa). Die Proteinmengen an EF-Tu lagen in den Außenmembranvesikeln unterhalb der Detektionsgrenze.

Die Ergebnisse des immunochemischen Nachweises von α -Hämolysin (HlyA) decken sich in etwa mit denen des Flüssighämolysetestes ohne Proteaseinhibitor. In den Fraktionen des Zellextraktes und des Überstandes wies der Wildtyp etwas mehr HlyA auf als die *surA*-Mutante, was mit einer geringfügig höheren Aktivität einherging. Der Proteingehalt in den OMV ist fast identisch und somit deckungsgleich mit der gleichen hämolytischen Aktivität. Auffällig bei der Betrachtung des Ergebnisses (Abb. 18) sind die vielen Abbauprodukte des Hämolysins in der Überstand-Fraktion, so dass keine definierte Bande, sondern ein durchgängiger Schmier zu sehen war. Freies sekretiertes Hämolysin neigt schnell zur Selbstaggregation (Inaktivierung) und andere ins Medium abgegebene Faktoren, z.B. Proteasen, können zur Degradation des Hämolysins führen. Um dies zu verhindern wurden die Flüssighämolysetestes auch mit Zugabe eines Proteaseinhibitors in das LB-Nährmedium vor der Probengewinnung durchgeführt.

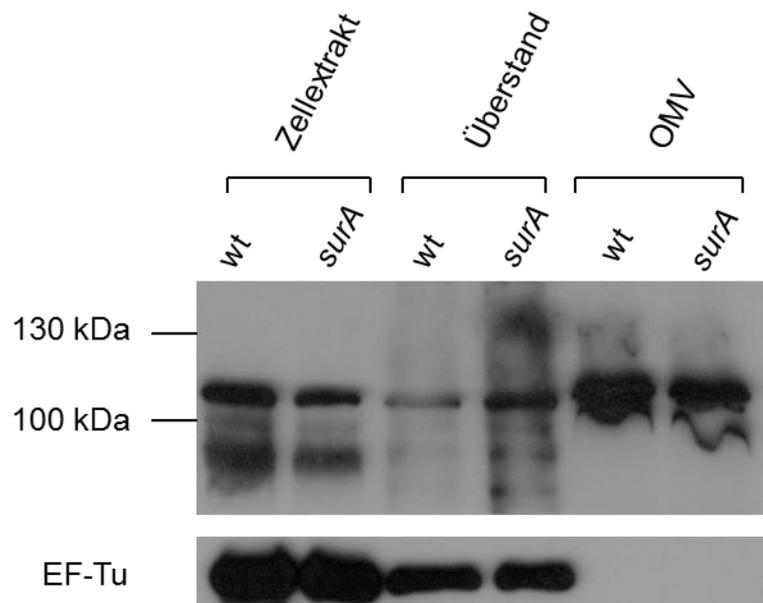


Abb. 19: Immunochemischer α -Hämolysin-Nachweis in den Fraktionen Zellextrakt, Überstand und OMV unter Zugabe eines Proteaseinhibitors. Untersucht wurden der Wildtyp (wt) und die *surA*-Mutante (*surA*) des 536-Stammes. Aufgetragen wurden innerhalb einer Fraktion jeweils gleiche Volumina der Proben. Die Proben (OD_{600nm} 2,4) wurden in einem 12%igem SDS-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Das α -Hämolysin (~110 kDa) wurde mit einem spezifischen polyklonalen Primärantikörper markiert und mit einem HPR-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert. Als Ladekontrolle diente der prokaryotische Elongationsfaktor EF-Tu (43 kDa). Die Proteinmengen an EF-Tu lagen in den Außenmembranvesikeln unterhalb der Detektionsgrenze.

Die immunochemische Detektion von α -Hämolysin in den verschiedenen Fraktionen zeigte im Vergleich zu den Ergebnissen des Flüssighämolysetestes Unter-

schiede zwischen dem Wildtyp und der *surA*-Mutante (Abb. 19). In der Zellextrakt-Fraktion konnte in der Mutante ein geringerer Gehalt an α -Hämolyysin festgestellt werden. Im Gegensatz dazu war der Gehalt des Toxins im Überstand der Mutante deutlich höher als im Wildtyp. Dieser Unterschied zwischen dem Wildtyp und der *surA*-Mutante konnte in der Flüssighämolyse ebenfalls beobachtet werden. Wie zu erwarten war, konnten durch den Einsatz des Proteaseinhibitors die vielen Abbauprodukte des Hämolyisins im Überstand vermieden und eine klarere Aussage über den tatsächlichen Gehalt an produziertem Hämolyysin getroffen werden als ohne Inhibitor (Abb. 18). Die Mengen an α -Hämolyysin in den Außenmembranvesikeln waren für beide Stämme gleich. Im Vergleich zu den anderen Fraktionen ist das Molekulargewicht von α -Hämolyysin etwas höher, was vermutlich im Zusammenhang mit der Membranassoziation des Toxins in den OMV steht.

Ursachenforschung der hämolytischen Aktivität der *hlyI hlyII*-Mutante

Eigenartig ist die hämolytische Aktivität der Außenmembranvesikel der Hämolyysin-Doppelmutante (536 *hlyI hlyII*) (vgl. 4.3.3.1, Abb. 17, Tab. 18, 19). Der Zellextrakt und der Überstand wiesen erwartungsgemäß keine hämolytische Aktivität auf, jedoch die Außenmembranvesikel. Um den Ursachen dieses Befundes nachzugehen, wurden zunächst mittels des immunologischen Nachweises die OMV der Hämolyysinmutante auf die Anwesenheit von HlyA überprüft (Abb. 20). In der *surA*-Mutante konnte in allen Fraktionen α -Hämolyysin nachgewiesen werden. Im Zellextrakt und dem Überstand der Kultur der Hämolyysinmutante konnte keine spezifische Bande für das α -Hämolyysin detektiert werden. In den OMV der *hlyI hlyII*-Doppelmutante wurde mittels HlyA-spezifischer Antikörper ein Signal erhalten, das eine ähnliche Intensität wie das HlyA-spezifische Signal der *surA*-Mutante, jedoch ein geringfügig geringeres Molekulargewicht als OMV-assoziiertes HlyA des Wildtyps und der *surA*-Mutante (Abb. 19) aufweist.

Eine mögliche Kreuzreaktion des α -HlyA-Antikörpers mit dem Toxin CNF-1, das zytotoxisch wirkt, in Vesikeln der UPEC-Stämme vorkommt und etwa ein Molekulargewicht von 115 kDa aufweist, konnte durch ein Sequenzvergleich der Aminosäuren auf Homologie („*blast*“), der keine signifikanten Übereinstimmungen lieferte, theoretisch ausgeschlossen werden. Ein anderer hämolytischer, in OMV befindlicher Faktor ist das porenformende Toxin ClyA, das aber im 536-Stamm nicht vorkommt und somit nicht in Betracht kommt.

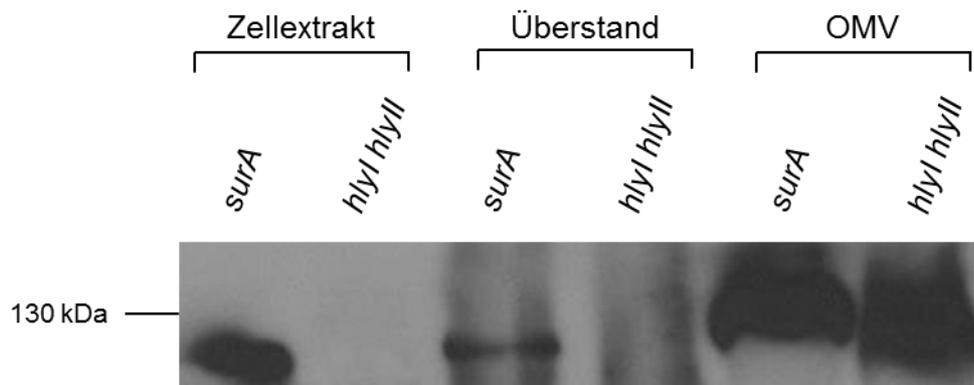


Abb. 20: Immunochemischer HlyA-Nachweis im Zellextrakt, im Überstand und in den OMV der *surA*-Mutante und der Hämolyysinmutante (*hlyI hlyII*) des uropathogenen Stammes 536. Die Proben wurden in einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Das α -Hämolyysin (~110 kDa) wurde mit einem spezifischen polyklonalen Primärantikörper markiert und mit einem HPR-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert.

Nachdem in den OMV der Hämolyysinmutante mit HlyA-spezifischen Antikörpern ein Protein von HlyA-ähnlicher Größe detektiert wurde, wurde die Deletion der in den Operons *hlyI* und *hlyII* lokalisierten *hlyA*-Gene im Stamm 536 *hlyI hlyII* nochmals auf DNA-Ebene verifiziert. Mittels PCR ließ sich in der *hlyI hlyII*-Mutante erwartungsgemäß kein *hlyA*-Produkt amplifizieren.

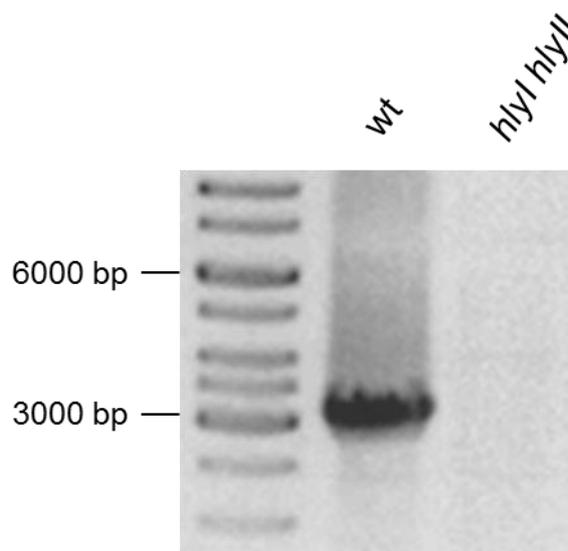


Abb. 21: PCR-Amplifikation von *hlyA* im 536-Wildtyp (wt) und der 536-HDM-Mutante (*hlyI hlyII*). Die Amplifikation des *hlyA*-Gens erfolgte mit den Oligonukleotiden 536_hlyA_U und 536_hlyA_R mittels konventioneller Polymerase-Kettenreaktion (vgl. 3.2.1). Die Amplifikate wurden in einem 1%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid detektiert.

Es ist davon auszugehen, dass die hämolytische Aktivität der OMV der 536-*hlyI hlyII*-Mutante nicht auf dem α -Hämolyysin beruht. Die PCR-Ergebnisse zeigen ein-

deutig, dass ein *hlyA*-Gen in diesem Stamm nicht mehr gegenwärtig ist. Auch die Publikation zu diesem Stamm lässt keine Zweifel an der Abwesenheit des Gens [139]. Es muss sich um eine Kreuzreaktion des Antikörpers handeln, die aber nicht im Zusammenhang mit der hämolytischen Aktivität steht. Ein Vergleich der hämolytischen Aktivität der *hlyI hlyII*-defizienten OMV zu der anderer untersuchten Stämme zeigt eine Verzögerung im Anstieg, was ein Hinweis auf einen anderen Faktor sein kann. Entweder führt die Deletion der beiden *hly*-Loci ersatzweise zur Bildung eines weiteren hämolytischen Faktors, der sich nur in dieser Mutante äußert oder ein genereller hämolytischer Faktor tritt auf, der in nicht *hlyI hlyII*-defizienten 536-Zellen durch die α -Hämolsin-bedingte hämolytische Aktivität überdeckt wird.

4.3.4 Phospholipase-Aktivitätsnachweis der OMV

Ein möglicher hämolytischer Faktor im Zusammenhang mit den OMV könnten die Phospholipasen sein, die zum Teil assoziiert mit der bakteriellen Außenmembran vorkommen. Sie bilden eine Unterklasse der Lipasen, die Phospholipide der Membran enzymatisch spalten und eben auf diese Weise eine Zellyse bewirken können (Abb. 22).

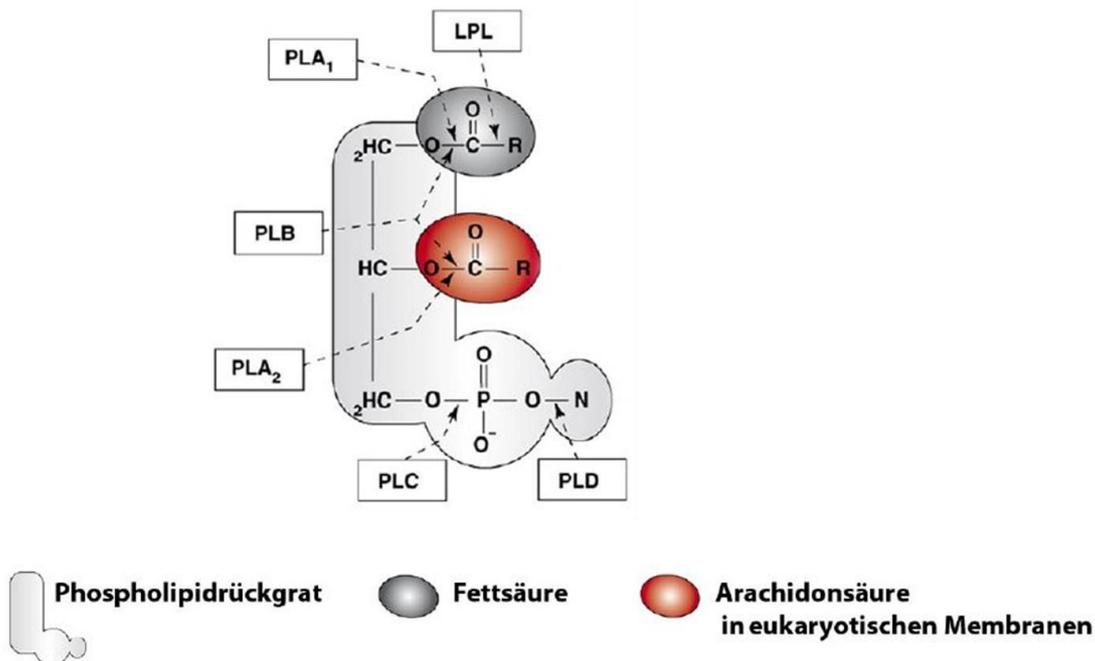


Abb. 22: Einteilung der Phospholipasen nach Hydrolyseposition in Phospholipiden. Die Phospholipase A (PLA₁, PLA₂) und die Phospholipase B hydrolysieren Carboxylesterbindungen. Die Phospholipase C spaltet innerhalb der Phosphatgruppe und an der alkoholorientierten Seite die Phospholipase D. Lysophospholipasen (LPL) spalten innerhalb der Fettsäure am Carbonyl-Kohlenstoff den Acylrest ab (modifiziert nach Sitkiewicz et al., 2007).

Im Genom des 536-E. coli-Stammes sind drei Phospholipasen annotiert (CP000247.1). Zum einen die Phospholipase A₁, eine außenmembranassoziierte Lipase, zum anderen die Lysophospholipase L₂ in der inneren Membran und zuletzt eine putative Phospholipase (uncharakterisiert). Im Zusammenhang mit einer möglichen hämolytischen Aktivität kommt die Phospholipase A₁ in Frage, da es sich hierbei um eine außenmembranassoziierte Lipase handelt, somit auch Bestandteil der OMV sein kann, deren Aktivität zur Lyse von Erythrozyten führen kann [140, 141]. Für die Analyse der Phospholipase-Aktivität wurden die OMV der 536-Stämme wt pASK75, surA pASK75, surA pSurA und hlyI hlyII durch Ultrazentrifugation der Kulturüberstände (mit Proteaseinhibitor behandelt, OD 2,4) gewon-

nen. Die indirekte Quantifizierung der enzymatischen Aktivität der Phospholipasen der OMV erfolgte durch Messung des Substratumsatzes durch Abspaltung freier Fettsäuren (vgl. 3.4.6). Je mehr freie Fettsäuren durch Hydrolyse des Substrates abgespalten wurden, desto größer war die Phospholipaseaktivität der untersuchten Außenmembranvesikel.

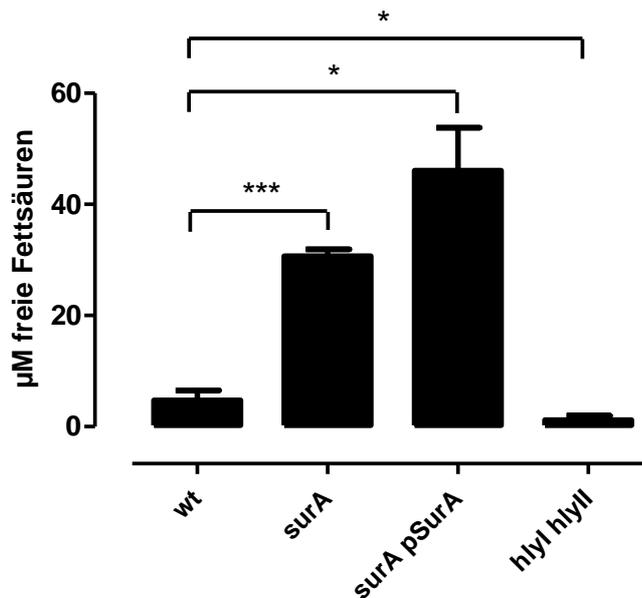


Abb. 23: Nachweis der Phospholipaseaktivität in OMV verschiedener 536-Stämme zur Untersuchung des Einflusses von SurA. Die OMV wurden durch Ultrazentrifugation (150 000 g, 3 h, 4 °C) der Kulturüberstände (OD₆₀₀ 2,4) gewonnen. Die Bestimmung des Substratumsatzes durch die Phospholipasen wurde mit Hilfe des NEFA C-Kits von Wako durchgeführt und nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen. Die Messungen wurden für jeden Stamm jeweils in Triplikaten vorgenommen. Es wurden jeweils gleiche Volumina der Proben eingesetzt. Mit Hilfe eines Oleats wurde für die Berechnung der freien Fettsäuren eine Eichgerade erstellt ($p < 0,05 = *$; $p < 0,01 = **$; $p < 0,001 = ***$; nach SPSS).

Der Vergleich der Phospholipaseaktivitäten der Außenmembranvesikel des Wildtyps und der *surA*-Mutante zeigte eine deutlich geringere Aktivität der wildtypischen OMV gegenüber denen der Mutante, die etwa viereinhalbmal mehr freie Fettsäuren vom Substrat abgespalten. Die Komplementation des *surA*-Gens führte zu einer deutlich erhöhten Aktivität als der Wildtyp und die *surA*-Mutante. Eine signifikant geringere, aber dennoch messbare Aktivität konnte für die Hämolyse-Mutante festgestellt werden, von der eine mögliche hämolytische Aktivität ausgehen könnte.

4.4 Motilität

4.4.1 Schwärmlattentest

Hinweise auf ein mögliches Problem in der Motilität der UPEC-Stämme durch das Fehlen von SurA zeigten die Auswertungen der elektronenmikroskopischen Aufnahmen der OMV und auch die 2D-Gel-Analysen. Diesem Verdacht wurde zunächst mittels eines Schwärmlattentests nachgegangen. Hierfür wurden der Wildtyp, die *surA*-Mutante sowie die entsprechende Komplementante der bekannten UPEC-Stämme 536 (Pyelonephritis-Isolat), CFT073 (Urospeisis-Isolat), UTI89 (Zystitis-Isolat) und F11(Zystitis/Bakteriurie-Isolat) miteinander verglichen. Als Kontrollen wurden die K-12-Stämme *fliA*⁺ (motil) und die *fliA*-Mutante (nicht motil) verwendet.

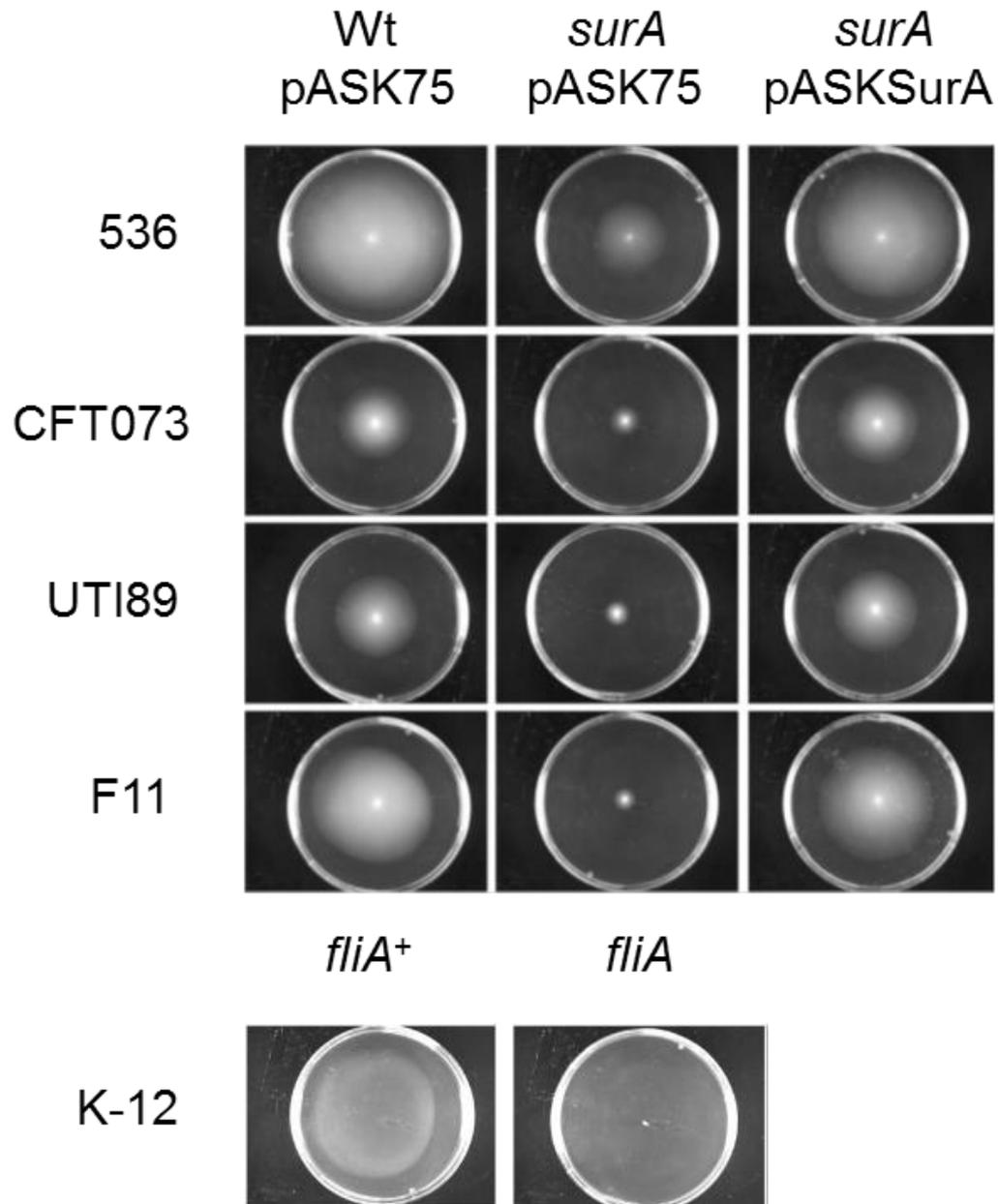


Abb. 24: Einfluss von SurA auf die Motilität der uropathogenen Stämme 536, CFT073, UTI89 und F11. Die LB-Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C angezogen und auf eine identische Zellzahl eingestellt (2×10^9 /ml). Je 5 µl der Flüssigkulturen wurden auf die Schwärmplatten getropft über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die Durchführung und Darstellung des Experiments erfolgte durch S. Behrens-Kneip. Abb. entnommen aus [164].

Die Auswertung der Schwärmplatten zeigte, dass die *surA*-Mutanten aller getesteten UPEC-Stämme in ihrer Motilität deutlich eingeschränkt sind im Vergleich zu den Wildtypen. Bis auf den Stamm 536 waren die Mutanten fast unfähig zu schwärmen. Die Komplementation von *surA* hob diesen Defekt in allen Stämmen wieder auf. Die Positivkontrolle K-12 *fliA*⁺ war, wie erwartet, schwärmfähig und die nicht motile *fliA*-Mutante bildete keinen Schwärmhof. Das Chaperon SurA hat somit einen deutlichen Effekt auf die Motilität der Bakterien.

4.4.2 Transkriptanalyse der Regulationskaskade des Flagellenapparates

Der Aufbau der Flagelle wird durch ein hierarchisch regulatorisches Netzwerk gesteuert und kontrolliert. Die Gene für die Regulation, den strukturellen Aufbau und den Motor der Flagelle sind in einem umfangreichen Flagellenregulon in mehreren Operonen organisiert. Die Analyse einiger Gene des Regulons auf Transkriptebe-
ne sollte weiter Aufschluss darüber geben, worauf der Motilitätsdefekt in der *surA*-Mutante beruhen könnte. Ausgewählt wurden die Gene *tsr* (kodiert für den Serin-Chemorezeptor; Klasse III), *fliC* (kodiert für Flagellin; Klasse III), *flhC* (kodiert für eine Einheit des *master* Regulators; Klasse I), *flgH* (kodiert für die Komponente des L-Ringes des Basalkörpers innerhalb der äußeren Membran; Klasse II), *motB* (kodiert ein Motorprotein; Klasse III) und *fliA* (Gen für den alternativen Sigmafaktor σ^{28} ; Klasse II). Als Haushaltsgen wurde das Gen *rrsH* zum Vergleich der eingesetzten RNA-Mengen in der Transkriptmengenanalyse gewählt, das die ribosomale 16S RNA kodiert und unbeeinflusst von SurA konstitutiv in allen Zellen expri-
miert wird. Für die Analyse wurde die Gesamt-RNA aus Kulturen der späten expo-
nentiellen Phase bei OD_{600} 3 isoliert und die jeweiligen Transkriptmengen der zu untersuchenden Gene anschließend mittels semi-quantitativer reverser Transkriptions-PCR (Sq-RT-PCR) bestimmt.

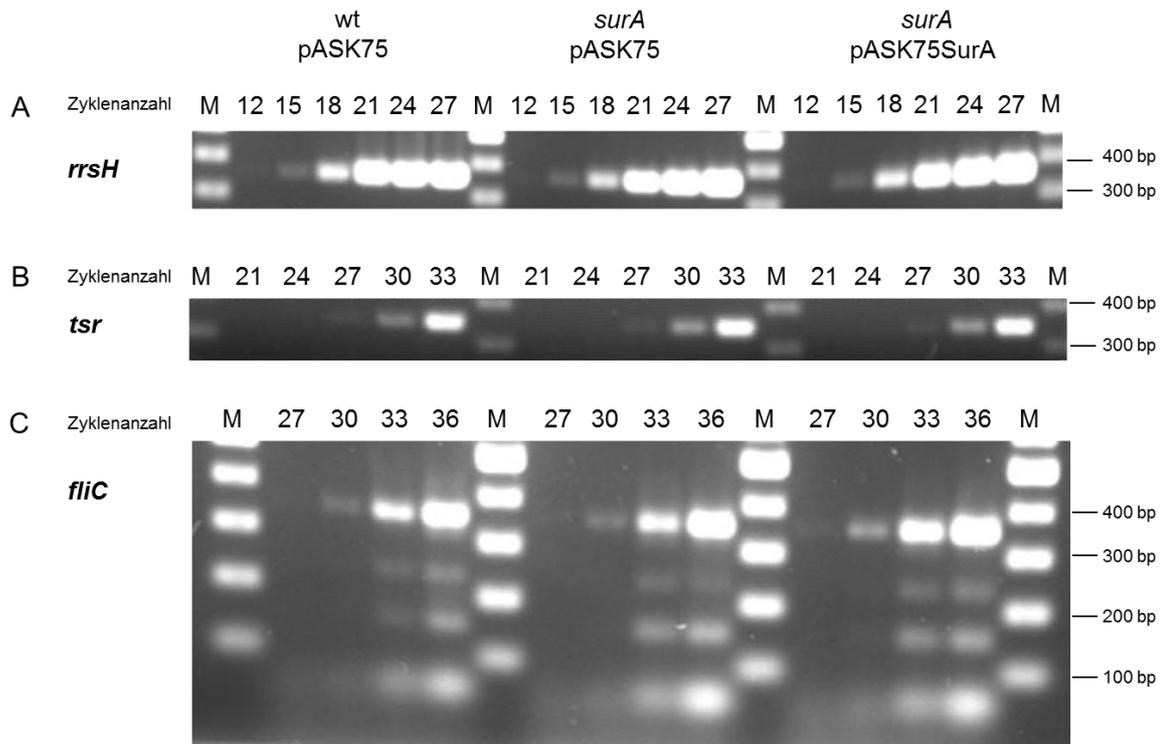


Abb. 25: Transkriptmengenvergleich der Gene *rrsH* (A), *tsr* (B) und *fliC* (C) in Zellen des 536-Wildtyps (wt pASK75), der *surA*-Mutante (*surA* pASK75) und der komplementierten *surA*-Mutante (*surA* p*SurA*) mittels Sq-RT-PCR. Für die Amplifikation wurden folgende RNA-Mengen eingesetzt: *rrsH*: 10 ng; *tsr*: 100 ng; *fliC*: 150 ng. Die Annealingtemperatur betrug 60 °C. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt. Experimentelle Durchführung in Zusammenarbeit mit Nadja Bier. Abb. entnommen aus [164].

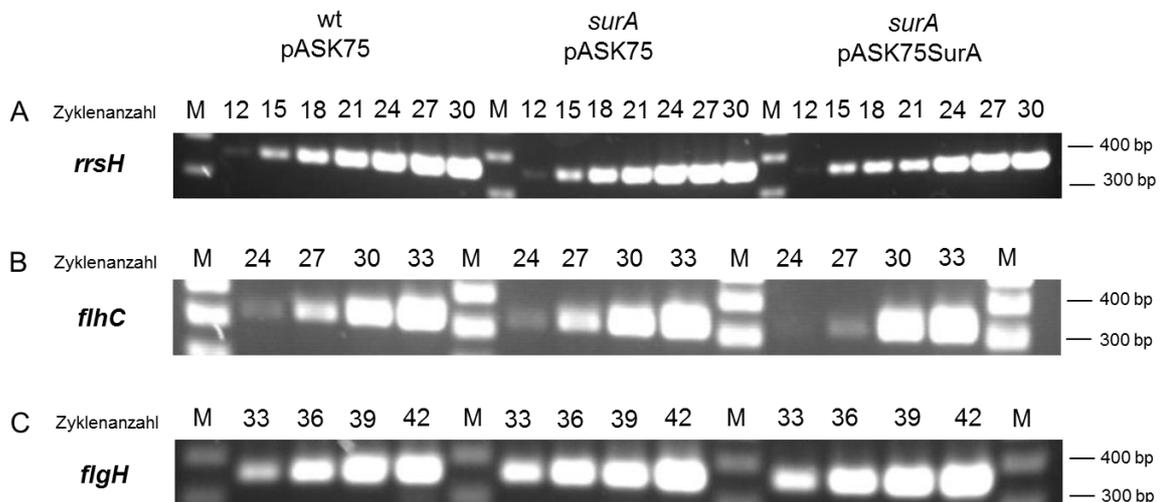


Abb. 26: Transkriptmengenvergleich der Gene *rrsH* (A), *flhC* (B) und *flgH* (C) in Zellen des 536-Wildtyps (wt pASK75), der *surA*-Mutante (*surA* pASK75) und der komplementierten *surA*-Mutante (*surA* p*SurA*) mittels Sq-RT-PCR. Für die Amplifikation wurden folgende RNA-Mengen eingesetzt: *rrsH*: 10 ng; *flhC*: 100 ng; *flgH*: 100 ng. Die Annealingtemperatur betrug 60 °C. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt. Experimentelle Durchführung in Zusammenarbeit mit Nadja Bier. Abb. entnommen aus [164].

Die Transkriptmengenanalyse der untersuchten Gene des Flagellenregulons zeigte, dass ihr Expressionslevel in der *surA*-Mutante verglichen mit dem Wildtyp in der spätexponentiellen Phase unverändert ist. Daraus lässt sich zunächst schlussfolgern, dass der Motilitätsdefekt auf posttranskriptionellen bzw. posttranslationalen Mechanismen beruht. Die Sq-RT-PCR für das Gen *fliA* führte auch bei einem hohen Einsatz von 300 ng RNA zu keinem Transkript. Mehrere unspezifische Nebenprodukte lieferte das *motB*-Transkript, so dass diese Ergebnisse nicht ausgewertet werden konnten (nicht dargestellt).

4.4.3 Immunochemische Analyse der Flagellenuntereinheit FliC

Für den Zellextrakt und den Kulturüberstand konnte mittels eines immunochemischen FliC-Nachweises gezeigt werden, dass die *surA*-Mutante in beiden Fraktionen weniger FliC besitzt (Abb. 27). Als Negativkontrolle diente die 536 *fliC*-Mutante, die wie erwartet keine Bande für FliC zeigte. Das berechnete Molekulargewicht von FliC lag bei ~58 kDa. FliC wird bei der Translokation über die Membranen glykolysiert, was sich bei den FliC-Monomeren im Überstand durch ein erhöhtes Molekulargewicht darstellt, so dass die Proteinbanden bei etwa 70 kDa lagen.

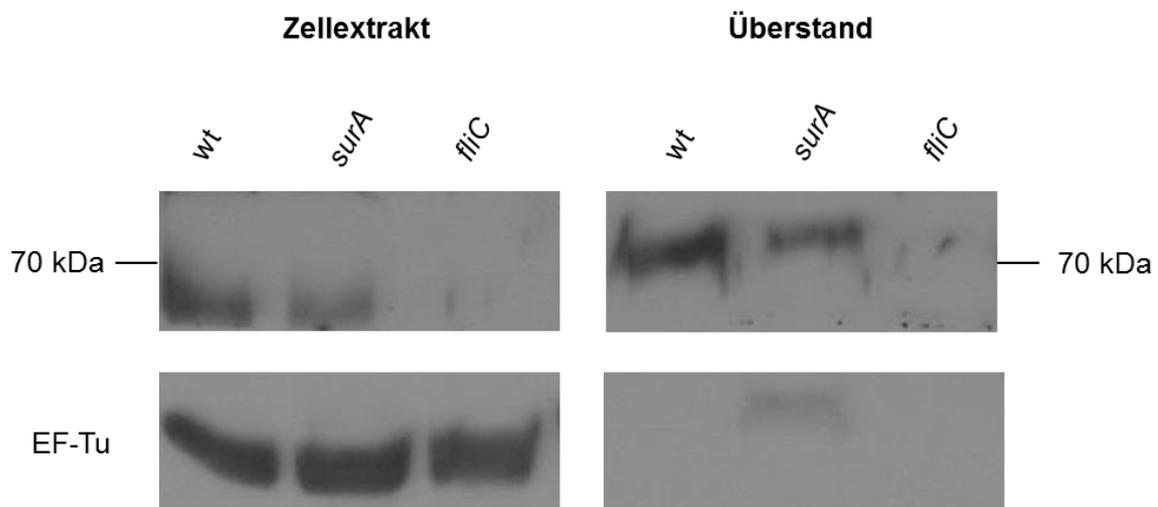


Abb. 27: Immunochemischer FliC-Nachweis im Zellextrakt und im Überstand des 536-Wildtyps, der *surA*-Mutante und der *fliC*-Mutante (OD₆₀₀ 1,0). Als Primärantikörper diente ein mit *E. coli* kreuzreaktiver FliC-Antikörper gegen die Flagellinuntereinheit FlaA aus *Legionella pneumophila* (FliC ist in *Legionella* als FlaA bezeichnet). Die Proben wurden in einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Das FliC (berechnetes Molekulargewicht ~58 kDa) wurde mit einem spezifischen polyklonalen Primärantikörper markiert und mit einem HPR-gekoppelten Sekundärantikörper markiert. Als Ladekontrolle diente der prokaryotische Elongationsfaktor EF-Tu (43 kDa).

4.4.4 Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Motilitätsapparates

Der Schwärmplattentest (vgl. 4.4.1) bestätigte die Annahme eines möglichen Motilitätsdefekts in der *surA*-Mutante. Untersuchungen auf proteinbiochemischer Ebene untermauerten diesen Defekt durch eine geringere Menge des synthetisiertem FliC im Zellextrakt und im Überstand (vgl. 4.4.3). Um zu ergründen, inwieweit sich dies auf die Anzahl der Flagellen auf der Zelloberfläche auswirkt und ob das Fehlen von SurA ggf. auch die Flagellenstruktur beeinflusst, wurden elektronenmikroskopische Studien durchgeführt. Dabei wurden der Wildtyp, die *surA*-Mutante, die komplementierte *surA*-Mutante (*surA* p*SurA*) und die nicht motile *fliC*-Mutante elektronenmikroskopisch verglichen.

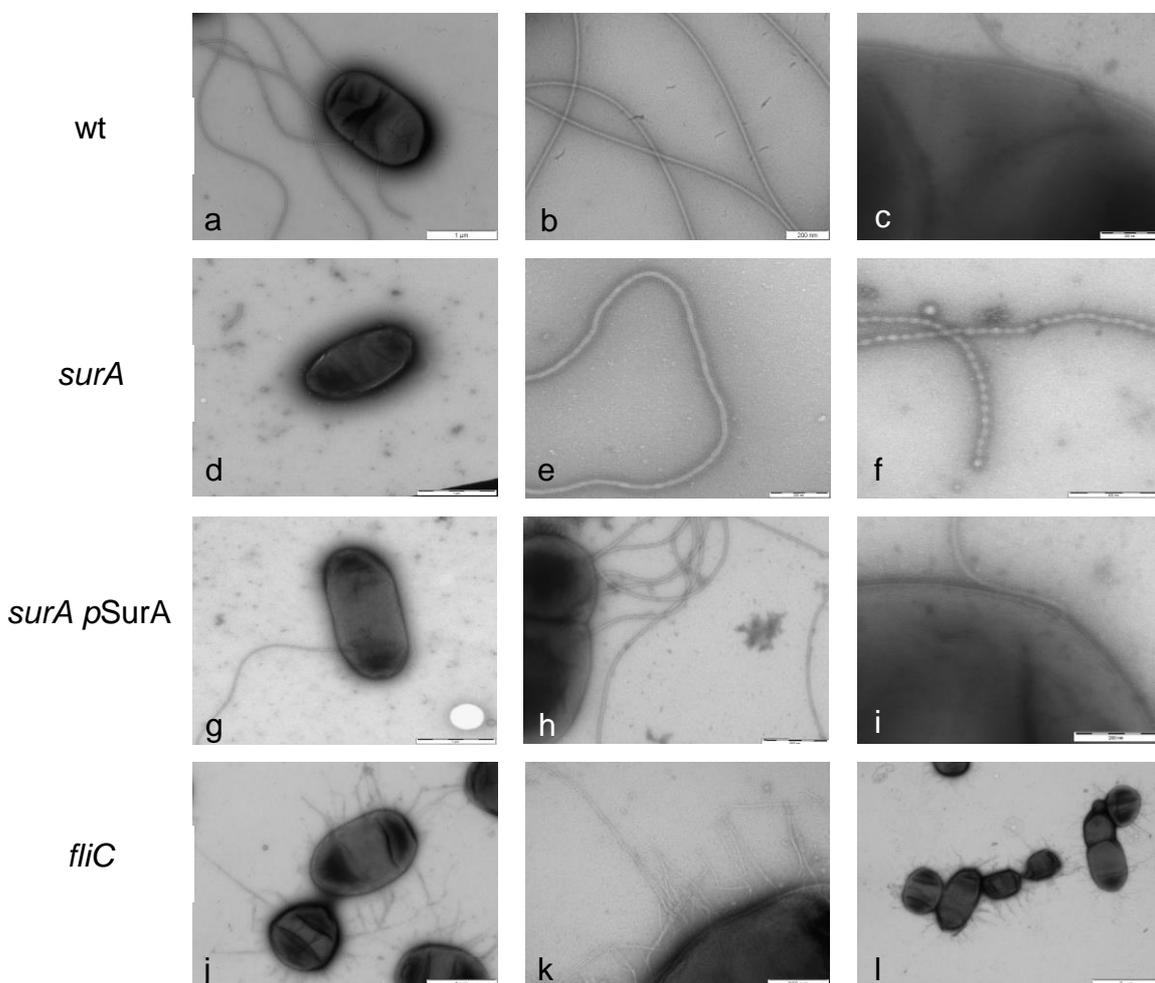


Abb. 28: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Flagellierung des uropathogenen Stammes 536. Verglichen wurde der Wildtyp (wt) (a-c) mit den Mutanten *surA* (d-g) und *fliC* (j-k) sowie der Komplementante *surA* p*SurA* (g-i). Die Bakterienzellen wurden von Schwärmplatten in HEPES (0,5 M) suspendiert, auf einem Grid sedimentiert und mit 0,5%igem Uranylacetat negativ kontrastiert. Messbalkenangabe: a) 1 μ m; b) 200 μ m; c) 200 nm; d) 1 μ m; e) 200 nm; f) 500 nm; g) 1 μ m; h) 500 nm; i) 200 nm; j) 1 μ m; k) 200 nm; l) 2 μ m. Aufnahmen von Gudrun Holland (Robert Koch-Institut, ZBS 4)

Die Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen für den Wildtyp (Abb. 28 a-c) zeigte, dass mindestens die Hälfte der Zellen regelmäßig flagelliert waren und die Flagellen auch die typische makromolekulare Struktur in ihrer Regelmäßigkeit und Geradlinigkeit aufwiesen. Gleichartige Strukturen fanden sich auch bei der *surA*-Mutante, allerdings in sehr geringer Anzahl. Die meisten Zellen waren unflagelliert oder trugen höchstens eine Geißel pro Bakterienzelle (Abb. 28 d). Der makroskopische Vergleich deutete auf einen Strukturunterschied der Flagelle hin. Die Flagellen des Wildtyps lassen eine helikale Anordnung der Flagellineinheiten erkennen (b), wohingegen viele der *surA*-Mutante (e) unregelmäßig, geschwulstartig und ungerade erscheinen. Auch die helikale Anordnung der Untereinheiten lässt sich nicht recht erkennen. Diese Strukturen werden in dieser Arbeit fortgehend als „Filamente“ bezeichnet. Einige Flagellen in der *surA*-Mutante erscheinen hingegen gänzlich normal aufgebaut. Besonders auffällig bei der Betrachtung der Bildaufnahmen der *surA*-Mutante sind die Perlenschnüre, die in großer Häufigkeit zu finden sind (f). Vermutlich handelt es sich hierbei um aneinandergereihte Membranvesikel mit einem jeweiligen Durchmesser von etwa 20 nm. Diese Strukturen wurden in der Wildtyp-Probe äußerst selten beobachtet. Deutlich erkennbar bei einigen Zellen des Wildtyps war die Hakenstruktur (*hook*) der Flagelle (c). Diese konnte bei flagellierten und unflagellierten Zellen der *surA*-Mutante nicht gesehen werden. Die Komplementation der *surA*-Mutation führte zur Wiederherstellung der Flagellensynthese. Die meisten Zellen waren flagelliert und auch der Aufbau der Flagelle glich dem des Wildtyps (g-h). Die Hakenstruktur der Flagelle konnte in der Komplementante wie auch im Wildtyp gefunden werden (i). Wie erwartet wiesen die Bakterien der *fliC*-Mutante keine intakten Flagellen auf (h-j). Auf der Zelloberfläche waren viele ungleichmäßige und kurze Filamente zu erkennen. Hierbei handelte es sich um Pili, die durch das Fehlen der Flagellen anscheinend vermehrt gebildet werden. Bei der Betrachtung der Bildaufnahmen der *surA*-Mutante fielen die die Perlenschnüre auf, die in hoher Anzahl zu finden waren (f). Aufgrund der Größe und der Morphologie handelt es sich hierbei vermutlich um aneinandergereihte Außenmembranvesikel.

4.4.5 Quantifizierung der Flagellierung

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der uropathogenen *E. coli* zur vergleichenden Untersuchung der Flagellierung des Wildtyps und der *surA*-Mutante zeig-

ten bedingt durch das Fehlen des Chaperons SurA eine geringere Flagellierung (Abb. 28). Für eine Quantifizierung und statistische Auswertung wurden von jedem Stamm die Flagellen von jeweils 100 Bakterienzellen gezählt. Neben regulär aufgebauten und etwas andersartig erscheinenden Flagellen wurden in der *surA*-Mutante auch perlenschnurartige Strukturen als Zellanhängsel gesichtet (Tab. 20). Auf 100 Zellen finden sich vier solcher Strukturen. Diese waren sowohl an unbegeißelten als auch an begeißelten Zellen zu finden. Wie auch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten (vgl. 4.4.4), wurden in der Auszählung die perlenschnurartigen Strukturen nur in der *surA*-Mutante gesichtet.

Tab. 20: Auszählung der Flagellen und Bewertung der Strukturen. Grundlage für jede Auszählung bildeten 100 Bakterienzellen unter elektronenmikroskopischer Betrachtung.

	Anzahl der begeißelten Zellen	Anzahl der nicht begeißelten Zellen	Anzahl der Geißeln mit zellulärem Kontakt	Anzahl der Perlenschnüre mit zellulärem Kontakt
Wildtyp	50	50	72	0
<i>surA</i>	18	82	25	4
<i>surA</i> p <i>SurA</i>	76	24	133	0

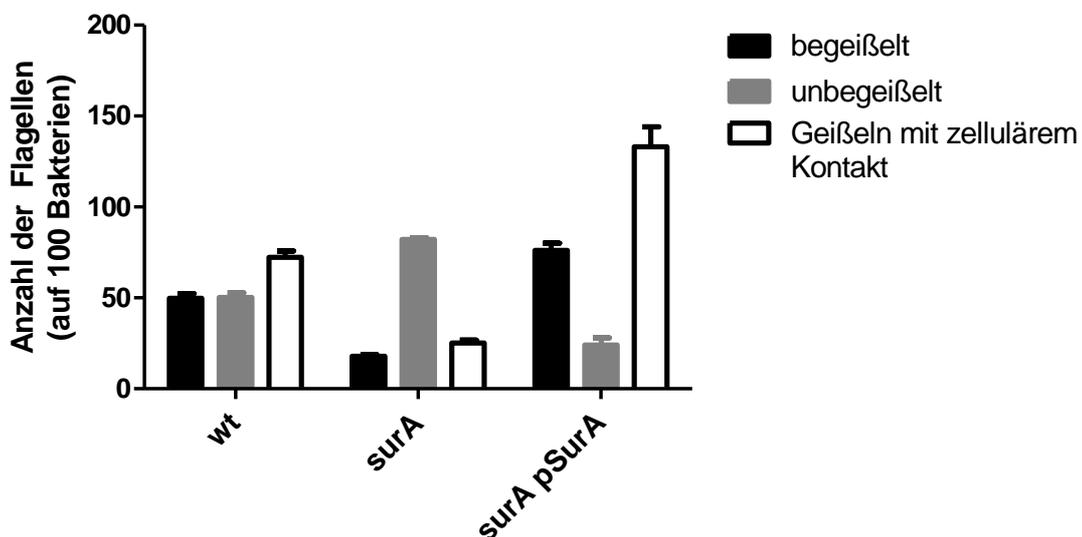


Abb. 29: Quantifizierung der Flagellierung des 536-Wildtyps, der 536-*surA*-Mutante und der entsprechenden 536 komplementierten *surA*-Mutante auf der Grundlage von elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Die Bakterien wurden auf Schwärmagarplatten über Nacht bei 30 °C angezogen und am nächsten Tag einmal überimpft und wiederum über Nacht bei 30 °C inkubiert. Von diesen Platten wurden Proben für die Elektronenmikroskopie auf einem Grid sedimentiert und mit einer 0,5%igen Uranylacetatlösung kontrastiert. Es wurden jeweils die Flagellen von 100 Bakterienzellen gezählt.

In Zahlen dargestellt, sind etwa nur ein Fünftel der Zellen der *surA*-Mutante begeißelt. Im Wildtyp hingegen ist jede zweite Zelle begeißelt und mehr als die Hälfte dieser Zellen besaßen auch mehr als eine Geißel (Abb. 29). Die *surA*-defizienten Zellen waren monotrich begeißelt oder trugen seltens zwei Flagellen. Wie bereits schon in anderen Experimenten beobachtet, zeigte die komplementierte *surA*-Mutante auch hier eine leichte Überkomplementation. Die Zellen waren deutlich häufiger flagelliert als der Wildtyp und zum Teil auch polytrich begeißelt (Abb. 28 h).

Zusammenfassend wurde in diesem Kapitel ein Motilitätsdefekt in den *surA*-defizienten Zellen des 536-Stammes festgestellt. Die Zellen waren weniger motil und seltener begeißelt als die wildtypischen Zellen. Zudem zeigte die makromolekulare Struktur einiger Flagellen der *surA*-Mutante einen ungeradlinigen gewulstigen Aufbau. Ein verminderter FliC-Gehalt konnte in der *surA*-Mutante für den Gesamtzellextrakt und für den Kulturüberstand festgestellt werden. Ein Effekt von SurA auf der Transkriptionsebene in der Regulationskaskade des Flagellenregulons konnte für die untersuchten Gene nicht eruiert werden.

5. Diskussion

5.1 Einfluss von SurA auf die Membranintegrität und σ^E -abhängige Stressantwort in uropathogenen *E. coli*

In *E. coli* führt das Fehlen von SurA zu einem periplasmatischen Faltungstress und zur Akkumulation von ungefalteten Proteinen im Periplasma, was sich in der Aktivierung von mindestens drei der fünf bekannten Signaltransduktionswege für Stress in der Zellhülle und der konstitutiven Induktion der σ^E -vermittelten, extrazytoplasmatischen Stressantwort äußert [104]. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals auch für die UPEC-Stämme 536 und CFT073 gezeigt werden (vgl. 4.1.3). In einem Chloramphenicol-Sensibilitätstest, bei dem die Chloramphenicol-resistenz über einen σ^E -abhängigen Promotor vermittelt wird, wiesen die *surA*-Mutanten der genannten uropathogenen Stämme eine deutlich höhere Resistenz gegenüber dem Antibiotikum auf als die entsprechenden Wildtypen. Die Induktion der σ^E -Stressantwort erfolgt durch Akkumulation von ungefalteten OMP-Monomeren im Periplasma der *surA*-Mutanten, die einerseits zu einer verstärkten Expression von periplasmatischen Proteasen (z. B. DegS) und Chaperonen sowie andererseits zu einer verminderten Expression der Außenmembranporine (OmpA, OmpC, LamB, OmpF) führt, was zusätzlich zu dem auftretenden Assemblierungsdefekt die geringe Abundanz der OMP in der äußeren Membran der *surA*-Mutante erklärt.

Die konstitutive Induktion einer σ^E -abhängigen, extrazytoplasmatischen Stressantwort und eine fehlerhafte Außenmembran wurden bereits ausführlich für *E. coli* K-12 *surA*-defiziente Zellen beschrieben und auf das Fehlen der Chaperonaktivität von SurA zurückgeführt [102-104, 109]. In der vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich der uropathogene Pyelonephritis-auslösende *E. coli*-Stamm 536 hinsichtlich der Rolle von SurA in der Urovirulenz untersucht. SurA dient β -Fassproteinen der Außenmembran wie beispielsweise OmpA, OmpF, LamB, LptD und FhuA als Faltungshelfer. Eine exklusive Rolle als Faltungshelfer von SurA ist bisher nur für die OMP LptD und FhuA bekannt [102, 104, 113, 114]. LptD bildet mit dem OM-Lipoprotein LptE einen Komplex, der die Insertion von LPS (Lipopolysaccharide) in die äußere Membran vermittelt [115, 116]. LPS bilden bei gramnegativen Bakterien den Hauptbestandteil der äußeren Schicht und dienen in erster Linie als Diffusionsbarriere für größere Moleküle. In diese Schicht eingelagert, befinden sich zahlreiche Porine und integrale Proteine, die für diverse Transportpro-

zesse verantwortlich sind. Eine Mutation von *surA* hat dementsprechend eine bedeutsame Auswirkung auf die äußere Membran. Die verminderte Membranintegrität ist möglicherweise daher nicht nur vom Fehlen der Chaperonaktivität von SurA abhängig, sondern vielmehr von dem resultierenden verminderten LptD-Level einer *surA*-Mutante.

Die anderen, bereits genannten OMP können vermutlich redundant auch durch die periplasmatischen Chaperone Skp und DegP gefaltet werden, auch wenn sie eine bevorzugte Affinität bei der Assemblierung zu SurA haben und somit auch in geringerer Menge in der Membran vorkommen als in wildtypischen Zellen [113]. Gegenüber einwirkenden Agenzien, wie SDS (unveröffentlicht, pers. Mitteilung Behrens-Kneip) und Novobiocin, zeigten *surA*-Mutanten des 536-UPEC-Stammes eine erhöhte Sensitivität mit der Folge des Absterbens der Bakterien. Novobiocin wird direkt von der Zelle über Siderophorrezeptoren (Fhu- bzw. Ton-Komplex) in der äußeren und inneren Membran aufgenommen. Eine Resistenz gegenüber Novobiocin wird in *E. coli* durch einen Transportkomplex TolC/AcrAB, der für den Efflux der Substanz nach vorheriger aktiver Aufnahme ins Zytoplasma über beide Membranen verantwortlich ist, vermittelt. Dieser Komplex besteht aus einem AcrB-Protonenantiporter (Translocase der inneren Membran) und dem AcrA-Adapter, die mit TolC in der äußeren Membran interagieren und dabei eine, das Periplasma überspannende, Effluxpumpe bilden [142]. Die Aufnahme von Novobiocin über Siderophorrezeptoren in die *surA*-defizienten Zellen könnte beeinträchtigt sein, weil der Siderophorrezeptor FhuA (TonA) ein nachgewiesenes, exklusives Substrat von SurA ist und somit in *surA*-Zellen nicht korrekt gefaltet vorkommt. Ausgehend davon würde die Resistenz in *surA*-defizienten Zellen gegenüber Novobiocin erhöht sein, was sich mit dem Plättchen-Test nicht zeigen ließ (vgl. 4.1.2). Möglicherweise ist auch eine Kombination aus verringerter aktiver Novobiocinaufnahme und erhöhter indirekter Aufnahme durch mangelnde Membranintegrität und mangelnden Efflux die Ursache der erhöhten Sensitivität. Der TolC/AcrAB-Effluxkomplex kann unter Umständen bedingt durch die verminderte Membranintegrität der äußeren Membran in *surA*-defizienten Zellen instabil und der Efflux daher sehr ineffizient sein. Ein direkter Einfluss von SurA auf die Synthese des Effluxkomplexes ist nahezu auszuschließen, da TolC kein SurA-spezifisches Substrat ist und die Mengen von TolC in einer *surA*-Mutante sogar erhöht sind [114]. Auch der Antiporter AcrB und das Adaptermolekül AcrA sind höchstwahrscheinlich

nicht durch das Chaperon SurA beeinflusst, da sie Bestandteil der Zytoplasmamembran sind.

Durch eine gestörte Membranintegrität und weniger Porine gelangt die Zellhomöostase aus dem Gleichgewicht, so dass die Bakterien in ihrem Wachstum leicht gestört sind, aber dennoch lebens- und teilungsfähig bleiben. Die *surA*-Mutante des Stammes 536 wurde phänotypisch charakterisiert. Unter normalen Wachstumsbedingungen in LB bei 37 °C zeigte die 536-*surA*-Mutante gegenüber dem Wildtyp ein signifikant verzögertes Wachstumsverhalten in allen drei Wachstumsphasen, wobei der typische Verlauf der Wachstumskurve nicht beeinträchtigt war (vgl. 4.1.1). Die maximale OD₆₀₀ stagnierte bereits bei einem Wert von 3, der im Vergleich zum Wildtyp leicht verzögert erreicht wurde, wohingegen der Wildtyp die stationäre Phase nach gleicher Wachstumszeit bei einer OD₆₀₀ von 3,8 erreichte. Als mögliche Ursachen für den beobachteten Wachstumsdefekt der *surA*-Mutante des 536-Isolates können zum einen die Aktivierung der σ^E -abhängigen, extrazytoplasmatischen Stressantwort sowie zum anderen die gestörte Membranintegrität der äußeren Membran angeführt werden.

5.2 Die Rolle von SurA bei der OMV-Biogenese

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Effekt des periplasmatischen Chaperons SurA auf die OMV-Biogenese eruiert. Das Fehlen von SurA führte in dem uropathogenen Stamm 536 zur Produktion einer homogeneren Vesikelgröße und einer höheren Anzahl kleinerer Vesikeln als im Wildtyp. Hauptsächlich bildete die *surA*-Mutante Vesikel zwischen 30 nm und 40 nm Durchmesser, wohingegen der Wildtyp vorrangig Vesikel zwischen 20 nm und 90 nm Durchmesser, aber auch Vesikel bis hin zu 180 nm Durchmesser abschnürte (4.2.1). OMV entstehen durch Ausknospung der äußeren Membran, indem sie sich von der darunterliegenden Peptidoglykanschicht löst und ausbeult bis sich die zukünftige Vesikelmembran abspaltet. Bekannt für apathogene *E. coli* (DH5 α , K-12) ist, dass eine erhöhte Vesikelproduktion an Orten der äußeren Membran mit wenigen Verbindungen zur Peptidoglykanschicht über Lpp (Brauns Lipoprotein) mit einer reduzierten Peptidoglykan-Hydrolaseaktivität und vielen akkumulierten fehlgefalteten Proteinen sowie einer Akkumulation von LPS im Periplasma stattfindet [54]. In einer *surA*-Mutante kommt es nachweislich durch die fehlende Chaperonaktivität zu einer Anhäufung von fehlgefalteten Proteinen im Periplasma. In einigen Hypothesen stellt die Vesi-

kulation kein zufälliges Ereignis dar, sondern wird als unabhängiger, flexibler Prozess der Stressinduktion verstanden [54, 57]. Sowohl in *degP*- (periplasmatisches Chaperon) als auch in *degS*- (periplasmatische Protease) defizienten Zellen apathogener gramnegativer Bakterien ließ sich ebenfalls eine Akkumulation fehlgefalteter Proteine nachweisen und damit in Zusammenhang stehend eine Hypervesikulation beobachten [54, 143]. Möglicherweise handelt es sich um einen Überlebensmechanismus unter sublethalen Bedingungen, der dem Ausschleusen der fehlgefalteten Proteine dient. Davon ausgehend müssten sich in den Vesikeln von Chaperon- bzw. Protease-Mutanten entsprechend fehlgefaltete Proteine befinden. Proteomanalysen der OMV in dieser Arbeit zeigten für das SurA-Substrat OmpC in den Vesikeln der *surA*-Mutante im Vergleich zu denen des 536-Wildtyps eine um etwa die Hälfte reduzierte Menge. OmpC kann teilweise redundant durch Skp oder DegP gefaltet werden, so dass kein direkter Rückschluss auf die Proteinmenge möglich ist. Weiterhin müssten spezielle Verfahren eingesetzt werden, um einen Nachweis für akkumulierte, fehlgefaltete Proteine in OMV zu erbringen. Auch gelangen möglicherweise nicht korrekt gefaltete Proteine durch raschen proteolytischen Abbau im Periplasma erst gar nicht in das Lumen der OMV. Die exklusiven SurA-Substrate FhuA und LptD konnten in den Proteomanalysen ausgewählter Proteinspots nicht gefunden werden. Etwaige Mengen dieser Proteine in *surA*-defizienten OMV hätten Aufschluss über den möglichen erhöhten Export gegeben. Aber auch dann wäre weiter zu eruieren, ob es sich hierbei um einen gezielten Export oder um ein zufälliges Ereignis aufgrund der Entstehung der OMV und der implizierten Mitnahme periplasmatischer Bestandteile handelt. Das Fehlen von LptD führt zur Akkumulation von LPS im Periplasma und genau an den Orten mit weniger LPS erfolgt eine erhöhte Vesikelbildung, so dass SurA hier vermutlich indirekt die Vesikelproduktion maßgeblich bestimmt [115, 116]. Dies steht auch im Einklang mit der beobachteten Hypervesikulation in $\Delta rfaC$, $\Delta rfaG$ und $\Delta rfaP$ *Salmonella typhimurium*-Stämmen bei denen ebenfalls eine Akkumulation von LPS im Periplasma auftritt [144].

Weiterhin konnte in den Ergebnissen der elektronenmikroskopischen Aufnahmen dieser Arbeit zur Beurteilung der Vesikelproduktion geklärt werden, dass die *surA*-Mutante im Durchschnitt deutlich kleinere Vesikel und eine erhöhte Anzahl von OMV sekretiert. Hierbei spricht man von einer Hypervesikulation. Ausgehend von der Annahme, Faltungsstress führt zum erhöhten Export missgefalteter Proteine

durch eine erhöhte OMV-Biogenese, wäre zu eruieren, ob der exportierte Inhalt, bezogen auf das Volumen der Vesikel (Membranoberfläche), tatsächlich größer ist als bei wildtypischen OMV. Vermutlich handelt es sich bei der Hypervesikulation der *surA*-Mutante nur um ein Phänomen, das durch Defekte einhergehend mit der Membranintegrität und der daraus resultierenden veränderten Vesikelbildung ohne aktiven Exportdruck entsteht. Untermauert werden kann dies durch die vermehrte Bildung kleinerer Vesikel in einer *ompA*-Mutante des apathogenen K-12-*E. coli* Stammes (BW25113) [145]. Hier entsteht kein Faltungstress, sondern nur ein Defekt in der äußeren Membran, so dass es nicht zwingend erforderlich ist, missgefaltete Proteine zu exportieren. Weiterhin kommt es ebenfalls zu einer Hypervesikulation, wenn Lpp (Brauns Lipoprotein), das die OM-Peptidoglykan (PG)-Einheiten quervernetzt, fehlt und auch hier die Membranintegrität beeinflusst wird [55]. Anhand der Proteomanalysen der OMV des Wildtyps und der *surA*-Mutante ließen sich weitere Proteine feststellen, die bedingt durch das Fehlen von SurA Einfluss auf die äußere Membran und auf andere Faktoren nehmen.

In OMV der *surA*-Mutante konnte das Protein PspA in 14fach erhöhter Menge im Vergleich zu wildtypischen OMV, in denen die Menge bei 0,084 lag, nachgewiesen werden. Die Induktion des Psp (*phage shock protein*)-Systems, dessen hauptsächlicher Effektor das periphere Membranprotein PspA ist, erfolgt durch extrazytoplasmatischen Stress in vielen Bakterien und wurde zuerst in *E. coli* entdeckt [146, 147]. Ein typischer Stress für die Induktion des Psp-Systems ist die Misslokalisierung von porenformenden Sekretinen der äußeren Membran bedingt durch Defekte der Integrität der äußeren Membran [148-151]. Diese Misslokalisierung erfolgt durch das Fehlen spezifischer, chaperonähnlicher Proteine, so dass aufgrund der erhöhten PspA-Menge in den OMV ein Zusammenhang zwischen SurA und der Biogenese bestimmter Sekretine angenommen werden kann. Hier kann also erstmals ein Hinweis zwischen SurA und der Psp-Regulation hergestellt werden. Ein Defekt des Typ IV-Sekretionssystems und der damit einhergehenden, verminderten Pilus-Biogenese im Zusammenhang mit dem Fehlen von SurA wurde bereits beschrieben [152]. In *Salmonella* wurde allerdings kein Effekt von SurA auf das Typ III-Sekretionssystem eruiert, was aber für *E. coli* nicht der Fall sein muss [153]. Ob SurA auf die Typ II- oder Typ III-Sekretionssysteme in uropathogenen *E. coli* Einfluss nimmt, sollte man in weiteren Experimenten genauer untersuchen, denn PspA spielt durch seine Funktion eine wesentliche Rolle in der Virulenz pa-

thogener gramnegativer Bakterien. In *Yersinia enterocolitica* beispielsweise schützt die Stressantwort die Zellhülle während der Infektion [154]. Auch in *Salmonella typhimurium* konnte während der Makrophageninfektion, in apathogenen *E. coli* während der Biofilmbildung und der Entwicklung von Multiresistenzen gegenüber Antibiotika eine erhöhte *psp*-Expression festgestellt werden [155, 156]. Weitere Proteine, die im Zuge der Proteomanalyse identifiziert wurden, sind die beiden Außenmembranproteine MipA und NmpC. Bei MipA (MltA-interacting protein) handelt es sich um ein „scaffold protein“, das die Vermittlung von Proteinkomplexen gewährleistet. In neueren Untersuchungen wurde MipA als Antibiotikaresistenz-ähnliches Protein in *E. coli* K-12 herausgestellt, so dass MipA durchaus einen Fitnessfaktor darstellt [160]. Der Vergleich der Proteinmengen in den OMV des Wildtyps und der *surA*-Mutante zeigte keine Änderung der MipA-Mengen durch das Fehlen von SurA. Ein direkter Zusammenhang wurde bisher nicht erforscht. NmpC ist ein putatives Porin der äußeren Membran und wurde in der *surA* Mutante in etwas verringerter Menge nachgewiesen. Über NmpC in *E. coli* (AW 1.7) ist bisher vor allem bekannt, dass es maßgeblich zusammen mit anderen Faktoren als Überlebensfaktor zur Hitzeresistenz beiträgt [157]. Die nur geringfügig verminderte NmpC-Menge in der *surA*-Mutante lässt eine redundante Faltung durch andere periplasmatische Chaperone vermuten, wobei SurA möglicherweise die größte Affinität zu NmpC zeigt.

Als ein weiterer Virulenzfaktor uropathogener *E. coli* wurde sowohl in wildtypischen 536-OMV als auch in OMV der *surA*-Mutante die Flagellenuntereinheit FliC nachgewiesen. Ein Vergleich der Mengen wies auf eine dreifach verringerte FliC-Menge in *surA*-defizienten OMV hin. Der Motilitätsapparat ist Teil der inneren, aber auch der äußeren Membran. Der Aufbau des Flagellenfilaments geschieht durch einen Transport der FliC-Monomere über ein Typ III-Sekretionssystem (MS-Ring) in der äußeren Membran. Es ist durchaus vorstellbar, dass in einer *surA*-Mutante die gestörte Membranintegrität indirekt Einfluss auf die strukturellen Komponenten des Motilitätsapparats nimmt. Eine ausführliche Untersuchung eines möglichen Motilitätsdefekts wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt und die Ergebnisse werden unter 5.5 diskutiert.

Bei der Proteomanalyse mittels MS wurden nur die markantesten Proteinspots ausgewählt und analysiert. Die Auswertung der 2D-Gele der OMV des Wildtyps und der der *surA*-Mutante mit Hilfe der Delta2D Software wies auf viele weitere Protei-

ne hin, die in ihren Mengen vergleichend in beiden Stämmen unterschiedlich waren. Die begrenzten technischen Rahmenbedingungen ließen eine Gesamtproteomanalyse der OMV nicht zu. In weiterführenden Studien könnten mit entsprechender Laborausstattung alle Proteine identifiziert werden, um den Einfluss von SurA auf das OMV-Proteom der UPEC, stellvertretend für das extrazytoplasmatische Proteom der Zellen, vollständig zu erfassen.

5.3 Mögliche Bedeutung von SurA für die Hämolysesekretion und -aktivität

Ein wichtiger Virulenzfaktor uropathogener *E. coli* ist das porenformende RTX-Toxin α -Hämolyse. Es wird über ein Typ I-Sekretionssystem in löslicher Form freigesetzt oder verbleibt nach seiner Sekretion an der äußeren Membran und wird im Zuge der Vesikelabschnürung mit den OMV assoziiert freigesetzt. Die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Analyse der OMV führten zu der Annahme, dass der α -Hämolyse-Gehalt der OMV der *surA*-Mutante geringer sein könnte, da bereits bekannt ist, dass hämolyse-tragende OMV größer sind als nicht hämolyse-tragende OMV [42].

Eine erste phänotypische Charakterisierung der 536-*surA*-Mutante auf Blutagarplatten zeigte einen leichten hämolytischen Defekt. Da es sich bei dem Test um aufgetropfte Flüssigkulturen handelte, muss der Hämolysedefekt nicht in erster Linie auf den OMV beruhen, sondern kann auch auf der Menge oder der Aktivität des insgesamt sekretierten α -Hämolyse basieren. In weiteren Studien wurde den molekularen Ursachen des Defekts nachgegangen. Mittels quantitativer Transkriptanalyse (sq-RT-PCR) konnte zunächst ein Einfluss möglicher regulatorischer Mechanismen auf die Transkriptmenge des für α -Hämolyse kodierenden Gens, *hlyA*, ausgeschlossen werden. Wildtyp und *surA*-Mutante zeigten gleiche *hlyA*-mRNA-Mengen.

Bestimmungen der Hämolyseaktivität in quantitativen Flüssighämolysetests deuteten auf eine signifikante Reduktion der Aktivität des sekretierten α -Hämolyse in der *surA*-Mutante hin ($p < 0,01$). Auch die immunochemische Analyse (Nachweis von HlyA (ca. 110 kDa) zeigte eine leicht geringere Hämolysemenge im Überstand der *surA*-defizienten Kultur. Es zeigten sich hierbei sehr viele Abbauprodukte des Toxins. Im Gegensatz dazu lag die Hämolyseaktivität für die Zellextraktfraktion nach fünfstündiger Inkubationszeit signifikant höher als die des Wildtyps ($p < 0,05$). Normalerweise wird das α -Hämolyse erst nach Sekretion unter der Anwe-

senheit von Kalziumionen (Ca^{2+}) ohne Abspaltung von Signalsequenzen final aktiviert, so dass das intrazelluläre Hämolsin per se keine Aktivität besitzt [38]. Intrazellulär erfolgt nur eine posttranslationale Acylierung, die für die Aktivität von Bedeutung ist, für die Sekretion jedoch keine Rolle spielt. In dem Flüssighämolysetest wurde deshalb ein kalziumhaltiger Hämolysepuffer zur Aktivierung des α -Hämolsins in allen drei untersuchten Fraktionen zugeführt. Im Gegensatz zu der etwas höheren Aktivität des α -Hämolsins im Zellextrakt der *surA*-Mutante wies diese allerdings eine deutlich geringere Menge an α -Hämolsin auf als der Wildtyp. Ein möglicher indirekter Einfluss von SurA auf die posttranslationale Acetylierung von HlyA durch HlyC ist nicht auszuschließen. Denkbar wäre eine regulatorische Rückkopplung mit erhöhter Expression von HlyC. Freies α -Hämolsin neigt dazu, mit sich selbst zu aggregieren [72]. Man könnte mutmaßen, dass Hämolsin in höherer Konzentration stärker aggregiert und damit einhergehend im Wildtyp vergleichsweise mehr Moleküle inaktiviert werden als in der *surA*-Mutante. In die Analysen wurde die Komplementante der *surA*-Mutante miteinbezogen. Für die Zellextrakt-Fraktion verhielt sich diese ähnlich dem Wildtyp, wohingegen die hämolytische Aktivität in der Überstandfraktion der Komplementante signifikant über dem Niveau (etwa die Hälfte höher) des Wildtyps und der *surA*-Mutante lag. Wie bereits in mehreren Experimenten beobachtet, kommt es bei Verwendung eines „*high copy number*“-Plasmides zur Komplementation der *surA*-Deletion häufig zu einer Überkomplementation. Dieser Effekt wurde für die Überstandfraktion mehrfach reproduziert.

Die OMV-Fractionen von Wildtyp und *surA*-Mutante unterscheiden sich weder in ihrer hämolytischen Aktivität noch in den detektierten Hämolsin-Mengen. Die Komplementante verhielt sich in dieser Fraktion entsprechend des Zellextrakts und wies eine verzögerte Aktivität auf, erreichte aber fast das Niveau des Wildtyps. Dies untermauert, dass die Überkomplementation sich nur in der Sekretion des löslichen α -Hämolsins äußert.

Die immunochemischen Analysen der Probenfraktionen, die für den Flüssighämolysetest eingesetzt worden sind, zeigten für die Überstand-Fraktion beider Stämme sehr viele Abbauprodukte des α -Hämolsins. Um den proteolytischen Abbau zu reduzieren, wurden die Experimente unter Zugabe eines Proteaseinhibitors unmittelbar vor der Probenfraktionierung nochmals durchgeführt. Generell führte der Einsatz des Proteaseinhibitors zum zeitigeren Einsetzen der Hämolyse, was

vermutlich an einer größeren Menge zur Verfügung stehender, undegradierter α -Hämolsin-Moleküle liegt. Für die Zellextrakt-Fraktion konnte kein signifikanter Unterschied der maximalen Aktivität zwischen dem Wildtyp und der *surA*-Mutante, wie es ohne Proteaseinhibitor der Fall war, festgestellt werden. Wie aber auch für die immunochemischen Analysen der Proben ohne Proteaseinhibitor gezeigt wurde, sind die Mengen an α -Hämolsin in der *surA*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert. Demzufolge kann auch hier angenommen werden, dass sich im Wildtyp womöglich mehr Moleküle durch Aggregation selbst inaktivieren. Ein sehr deutlicher Unterschied durch die Zugabe des Proteaseinhibitors zeigte sich für die Überstand-Fraktion. Der zunächst ohne Proteaseinhibitor beobachtete hämolytische Defekt der *surA*-Mutante durch weniger sekretiertes Hämolsin bestätigte sich hier nicht. Vielmehr steigerte sich die Hämolyseaktivität unter Einfluss des Proteaseinhibitors signifikant auf einen Wert über dem des Wildtyps ($p < 0,01$). Damit einhergehend zeigten die immunochemischen Untersuchungen eine größere Menge an intaktem HlyA in der *surA*-Mutante und kaum Abbauprodukte. Da die *hlyA*-Transkriptmengen in der *surA*-Mutante gegenüber dem Wildtyp unverändert sind, ist davon auszugehen, dass auch die intrazellulären HlyA-Mengen in beiden Stämmen weitgehend gleich sind. Insgesamt lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass die *surA*-Mutante α -Hämolsin effektiver sekretiert als der Wildtyp. Das Gleichgewicht zwischen intrazellulärem und sekretiertem α -Hämolsin, wie es für den Wildtyp gezeigt wurde, ist in der *surA*-Mutante in Richtung des sekretierten α -Hämolsins verschoben. Die Summe der α -Hämolsin-Mengen des Zellextrakts und des Überstands wäre für beide Stämme etwa gleich.

Die Sekretion des α -Hämolsins erfolgt über das Typ I-Sekretionssystem. Der Transportkomplex besteht aus den Proteinen HlyB, HlyD und TolC. Das α -Hämolsin tritt als erstes mit dem Transmembranprotein HlyB (ABC-Transporter) in der inneren Membran in Kontakt. Dieses wiederum besitzt eine zytoplasmatische ATP-Domäne und ist mit dem Membranfusionsprotein HlyD assoziiert [41]. Kommt es zu einer substratspezifischen Bindung von HlyA an HlyB und der Assoziation mit HlyD, wird das multifunktionelle Protein TolC rekrutiert, das den letzten Schritt in der Translokation des α -Hämolsins einleitet und das Toxin über die äußere Membran nach außen schleust. In einer *surA*-Mutante ist eine erhöhte TolC-Menge in der äußeren Membran bekannt [114]. Denkbar wäre eine effizientere Sekretion, da mehr TolC zu einer häufigeren Bildung des Transportkomplexes füh-

ren könnte. Sobald ein Toxinmolekül transloziert wurde, dissoziiert der Komplex und muss von neuem gebildet werden [41]. Das könnte allerdings in gewisser Weise im Widerspruch zu den Ergebnissen der Komplementante für die Überstandfraktion ohne Zugabe eines Proteaseinhibitors stehen, da dort die hämolytische Aktivität weitaus höher war als in der *surA*-Mutante. In der Komplementante sollte die Menge an TolC nicht erhöht sein und daher keine verstärkte Sekretion stattfinden. Möglicherweise bringt die Überproduktion von SurA eine geringere Sekretion von Proteasen via Typ I-Sekretionssystem mit sich (z.B. weniger TolC), so dass das sekretierte α -Hämolysin stabiler ist als im Wildtyp. Letztlich muss aber festgehalten werden, dass das Level an α -Hämolysin im Überstand der *surA*-defizienten Kultur nur bei Zugabe des Proteaseinhibitors unter artifiziellen Bedingungen detektierbar ist. Dieser Umstand entspricht nicht den realen Wachstumsbedingungen der Bakterien *in vivo*. Betrachtet man SurA als mögliches therapeutisches Target, steht dennoch die verminderte Menge an α -Hämolysin und damit einhergehend die verminderte hämolytische Aktivität im Vergleich zum Wildtyp im Vordergrund und der hämolytische Defekt der *surA*-Mutante auf Blutagarplatten bleibt existent.

Unter dem Einfluss des Proteaseinhibitors wurden ebenfalls die OMV-Fractionen hinsichtlich ihrer hämolytischen Aktivität untersucht. Hier zeigten sich im Vergleich zu den Ergebnissen ohne Zugabe des Proteaseinhibitors ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Weder der Gehalt, die Stabilität noch die Aktivität des α -Hämolysins scheinen durch SurA in den OMV beeinflusst. Die Annahme, dass die Hypervesikulation der *surA*-defizienten Zellen, im Umkehrschluss zu bisher publizierten Ergebnissen zu einem verminderten Gehalt an α -Hämolysin führt, konnte nicht bestätigt werden.

Sowohl in den Versuchen ohne als auch in den Versuchen mit Proteaseinhibitor wurde eine hämolytische Aktivität der OMV der Hämolysin-Mutante (*hlyI hlyII*) beobachtet. Diese trat im Vergleich zum Wildtyp und der *surA*-Mutante verzögert auf und auch die maximale Hämolyseaktivität von knapp 60-70 % wurde zu einem späteren Zeitpunkt erreicht. Die immunochemischen Analysen zeigten eine Bande auf Höhe der 110 kDa auf. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um eine Kreuzreaktion, da auch mittels PCR kein *hlyA* in der Hämolysin-Mutante amplifiziert werden konnte. Auch muss das durch Kreuzreaktion detektierte Protein nicht zwingend mit der hämolytischen Aktivität der OMV der Hämolysin-Mutante in Zu-

sammenhang stehen. Die verwendete Mutante war detailliert in einer Publikation charakterisiert und getestet worden [139]. Mögliche Ursache für die dennoch nachweisbare hämolysierende Aktivität der Mutante wären andere hämolysierende Faktoren, die im uropathogenen Stamm 536 vorkommen. Entweder führt die Deletion der beiden *hly*-Loci ersatzweise zur Bildung eines weiteren hämolysierenden Faktors, der sich nur in dieser Mutante äußert, oder ein genereller hämolysierender Faktor tritt auf, der in nicht *hlyI hlyII*-defizienten 536-Zellen durch die α -Hämolysin bedingte hämolysierende Aktivität überdeckt wird.

Bekannt ist die hämolysierende Wirkung von Phospholipasen [140]. Im Genom des 536-E. coli-Isolates sind drei Phospholipasen annotiert (CP000247.1). Zum einen die Phospholipase A₁, eine außenmembranassoziierte Lipase, zum anderen die Lysophospholipase L₂ in der inneren Membran und zuletzt eine putative Phospholipase (uncharakterisiert). Im Zusammenhang mit einer möglichen hämolysierenden Aktivität kommt die Phospholipase A1 in Betracht, da es sich hierbei um eine außenmembranassoziierte Lipase handelt, die somit auch Bestandteil der OMV sein kann, deren Aktivität zur Lyse von Erythrozyten führen kann [141]. Der in dieser Arbeit durchgeführte Phospholipaseaktivitätsnachweis zeigte eine signifikant höhere Aktivität in den OMV der *surA*-Mutante als in den OMV des Wildtyps. Wie vermutet, wiesen auch die OMV des *hlyI hlyII*-536-Stammes eine Phospholipaseaktivität auf, allerdings signifikant niedriger als der Wildtyp, die *surA*-Mutante und die Komplementante. Dennoch kann dies eine mögliche Erklärung für die hämolysierende Aktivität der hämolysindefizienten OMV sein. Die Hämolyse in den Flüssighämolysetests tritt hierbei im Gegensatz zum Wildtyp und der *surA*-Mutante sehr verzögert auf, so dass im späteren Verlauf des Experiments die Phospholipasen zum Tragen kommen könnten. Im Wildtyp und der *surA*-Mutante wäre dieser Effekt zum Teil durch die hämolysinbedingte Hämolyse überdeckt bzw. verstärkt. So kann der Umstand einer gleichwertigen hämolysierenden Aktivität des Zellextrakts der *surA*-Mutante bei geringerer Hämolysinmenge (ohne Proteaseinhibitor) durch die vielfach höhere Phospholipaseaktivität und der damit einhergehenden Hämolyse erklärt werden und nicht mit der Selbstaggregation des α -Hämolysins im Wildtyp. Um das genauer zu eruieren, könnte man die Zellen mit einem Phospholipaseinhibitor behandeln und die hämolysierende Aktivität mit den bereits erzielten Ergebnissen vergleichen.

5.4 Einfluss von SurA auf die Flagellen-vermittelte Motilität

In der vorliegenden Arbeit wurde im Zuge der Proteomanalysen der OMV des 536-Wildtyps und der *surA*-Mutante ein verminderter Gehalt von FliC in den OMV der Mutante nachgewiesen. Entsprechend diesen Hinweisen wurden Untersuchungen zum Einfluss des periplasmatischen Chaperons SurA auf die flagellenvermittelte Motilität der uropathogenen *E. coli* 536, CFT073, UTI89 und F11 durchgeführt. Für alle untersuchten Stämme konnte der Motilitätsdefekt auf Schwärmpalten mehrfach unabhängig eindeutig auf das Fehlen von SurA zurückgeführt werden. Durch die Komplementation der *surA*-Deletion konnte der Motilitätsdefekt in allen untersuchten Stämmen aufgehoben werden.

Zur Synthese und vollständigen Funktion des gesamten Flagellen- und Chemotaxisystems werden mehr als 50 Gene benötigt, die hierarchisch exprimiert werden [99]. In Untersuchungen auf Transkriptionsebene konnten für den uropathogenen 536-Stamm keine Unterschiede in der Expression ausgewählter Gene der drei regulatorischen Hierarchien festgestellt werden, so dass der verminderte FliC-Gehalt in der *surA*-Mutante (OMV, Zellextrakt und Kulturüberstand) nicht bereits in einer verminderten Expression von *fliC* begründet ist. Der alternative Sigmafaktor σ^{28} , auch als *fliA* bezeichnet, konnte in der semiquantitativen RT-PCR nicht amplifiziert werden, jedoch hätte eine Veränderung in der Expression Auswirkung auf die Expressionslevel der Klasse III-Gene innerhalb des Flagellenregulons, was sich wiederum in einer veränderten Expression von *fliC* (Klasse III-Gen) im Vergleich zum Wildtyp äußern würde. Auch wurde das Gen *tsr*, ebenfalls Teil des Chemotaxisystems, in die Analyse einbezogen, aber auch hier zeigte sich kein Unterschied im Expressionslevel im Vergleich zum Wildtyp.

Ausgehend von diesen Ergebnissen scheint die verminderte FliC-Menge posttranskriptionalen Ursprung zu haben. Posttranskriptionale Mechanismen zur Regulation des Flagellenapparates sind wenig bekannt und können in diesem Zusammenhang nur gemutmaßt werden. So konnte beispielsweise in *Borrelia hermsii* eine Regulation von *fliH* auf die posttranskriptionale Synthese von FlaB gezeigt werden [158].

Die Flagellenuntereinheit FliC muss bei der Assemblierung der Flagelle zunächst aus dem intrazellulären Raum über einen Kanal der Flagellenverankerung bestehend aus einem tubulären Basalkörper und mehreren Ringen aktiv nach außen transportiert werden (Typ III-Sekretionssystem). Über die Hakenstruktur (auch als

„hook“ bezeichnet) werden die FliC-Untereinheiten mit dem wachsenden Strang distal verknüpft. Zur genaueren Analyse des Motilitätsdefekts wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen der bakteriellen Flagellierung angefertigt. Entsprechend der verringerten intrazellulären und im Überstand befindlichen FliC-Menge der *surA*-defizienten Zellen wurden deutlich weniger flagellierte Zellen beobachtet. In Zahlen bedeutet dies, dass von 100 Zellen der *surA*-Mutante nur 18 begeißelt waren, wohingegen der Wildtyp ein Verhältnis von 50:50 zwischen begeißelten und unbegeißelten Zellen und die Komplementante sogar ein Verhältnis von 76:24 aufwies.

Interessanterweise unterscheiden sich einige der vorhandenen Flagellen von *surA*-defizienten Zellen in ihrem strukturellen Aufbau von denen des Wildtyps. Normal aufgebaute Flagellen sind regelmäßig mit geradliniger Begrenzung aufgebaut, während einige Flagellen der *surA*-Mutante gewulstartig und unregelmäßig erschienen. Diese Strukturen wiesen allerdings selten einen zellulären Kontakt auf, sondern befanden sich in der Umgebung. Die regelmäßig gebauten Flagellen konnten meist direkt an den Zellen gefunden werden. Es lässt sich festhalten, dass der Motilitätsdefekt mit einer reduzierten Flagellenanzahl in der *surA*-Mutante einhergeht. Das Vorkommen von auch andersartig gewulstartigen Flagellenstrukturen neben normal aufgebauten Flagellen deutet dort auf einen Assemblierungsdefekt hin, so dass die FliC-Monomere nicht korrekt miteinander verbunden werden. Denkbar wäre eine veränderte Konformation der FliC-Untereinheiten. In Betracht würde zunächst eine fehlende Glykosylierung der FliC-Monomere kommen. Allerdings weisen diese in der immunochemischen Analyse für den Überstand (geschüttelte Kultur enthält die meisten Flagellen im Überstand) ein erhöhtes Molekulargewicht auf, was auf eine Glykosylierung, wie auch im Wildtyp, hindeutet. Den Einfluss von SurA auf die Membranintegrität betrachtend, wäre auch eine ausbleibende Assemblierung der FliC-Monomere über die Hakenstruktur denkbar, die möglicherweise im Zuge der Translokation im Wildtyp korrekt stattfindet, aber in der *surA*-Mutante teilweise ausbleibt, da der Flagellenapparat nicht flächendeckend gleichermaßen korrekt in den periplasmatischen Raum und in die äußere Membran integriert ist. In *surA*-defizienten Zellen mit normal aufgebauter Flagelle ließ sich auf den elektronenmikroskopischen Bildern oft die Hakenstruktur erkennen. Bei nicht flagellierten *surA*-Zellen konnte abgesehen von dem Filament auch keine Hakenstruktur auf der Zelloberfläche gefunden werden. Der Haken besteht

aus FlgE-Untereinheiten, die der Klasse II-Genen des Regulons angehören, also regulatorisch auf Expressionsebene vor den FliC-Untereinheiten (Klasse III) gebildet werden. Möglicherweise führt ein teilweise bestehender Defekt der Integrität des L-Rings in der äußeren Membran oder die Akkumulation von LPS im Periplasma (sterische Behinderung) einer *surA*-Mutante zur Bildung keiner oder einer nur unvollständigen Hakenstruktur mit dem Resultat morphologisch nicht normal gebauter Filamente. Der Haken ist für das Wachsen des Filaments essentiell [159]. Ohne Haken wird kein Filament aufgebaut und da morphologisch inkorrekte Filamente jedoch fast immer ohne Zellkontakt gefunden wurden, lässt das auf ein integratives Stabilitätsproblem des Flagellenapparats schließen. Möglich wäre an dieser Stelle eine negative Rückkopplung des Assemblierungsdefekts auf die posttranskriptionale Regulation von FliC, wie es bereits angedeutet wurde. Hier wären weiterführende Experimente zur Untersuchung der transkriptionsregulatorischen Mechanismen innerhalb des Flagellenregulons erforderlich.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass durch das Fehlen von SurA ein Motilitätsdefekt hervorgerufen wird. Das Chaperon nimmt hier allerdings keinen direkten Einfluss auf die Motilität. Wahrscheinlich ist hier ein indirekter Einfluss durch die verminderte SurA-bedingte Membranintegrität der äußeren Membran ursächlich. Ein direkter Einfluss der Chaperonaktivität von SurA auf die Flagellenbiosynthese wie er für die Biogenese anderer Zellanhängsel, z.B. die Fimbrien, gezeigt wurde, kann auf Basis der hier dargestellten Ergebnisse ausgeschlossen werden.

5.5 Bedeutung von SurA in der Virulenz uropathogener *E. coli*

Die Rolle von SurA in der Urovirulenz wurde bislang nur für den Zystitisverursachenden *E. coli*-Stamm UTI89 untersucht [29, 117, 133]. Die Ergebnisse zeigten eine verminderte Fähigkeit einer UTI89-*surA*-Mutante, eine Zystitis zu etablieren und im Blasenepithel des Wirts durch Bildung eines Reservoirs an IBC zu persistieren. Dies wurde vorwiegend auf den Defekt in der Typ 1-Fimbrien-Biogenese zurückgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Einfluss von SurA auf die Virulenz uropathogener *E. coli* erstmals auch für andere UPEC-Stämme nachgewiesen. Der Pyelonephritis-Stamm 536 stand dabei im Zentrum der hier dargestellten Untersuchungen. Die für eine *E. coli* 536-*surA*-Mutante beobachteten Einschränkungen in der Membranintegrität, der hämolytischen Aktivität und

der Motilität können, zusätzlich zu der geringeren Dichte an Typ 1-Fimbrien, maßgeblich zur Beeinträchtigung der Virulenz uropathogener *E. coli* beitragen.

Zunehmend zeigt sich im Zusammenhang mit uropathogenen Keimen die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen. Das Fehlen von SurA begünstigt eine verminderte Membranintegrität und mindert die Barrierefunktion der äußeren Membran, so dass die Zellen gegenüber bestimmten Agenzien sensibler werden. Dies konnte in dieser Arbeit für das Antibiotikum Novobiocin gezeigt werden. Neben der Barrierefunktion der äußeren Membran beruhen viele Resistenzen auf angepassten Efflux-Systemen, die durch Fehlen von SurA ebenfalls in ihrer Effektivität beeinträchtigt werden können.

Die in dieser Arbeit neu beobachteten Effekte von SurA auf verschiedene Virulenzdeterminanten scheinen allerdings eher indirekter Natur. Vor allem das α -Hämolyysin ist für die Virulenz uropathogener *E. coli* von zentraler Bedeutung, da die Lyse von Erythrozyten eine Eisenquelle sicherstellt und das tiefere Eindringen ins Gewebe ermöglicht. Die verminderte hämolytische Aktivität der *surA*-Mutante beeinträchtigt auf diese Weise die Fähigkeit zur Etablierung einer Pyelonephritis und auch die Persistenz im Wirt. Hinsichtlich des Motilitätsdefekts der *surA*-Mutante ist davon auszugehen, dass dieser *in vivo* zu einer verminderten Wanderung der Bakterien von der Blase zur Niere führt und damit einhergehend die ascendierende Infektion und auch der Übertritt der Bakterien ins Blut erschwert werden [68]. Diese Annahme könnte in weiterführenden Versuchen in einem murinen Infektionsmodell verifiziert werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass SurA innerhalb der genotypisch und phänotypisch sehr diversen Gruppe uropathogener *E. coli* nicht nur Auswirkungen auf virulenzrelevante Eigenschaften der Zystitis-Derivate hat, sondern sein Einfluss auf die Urovirulenz weitreichender ist. Das Ausmaß des Einflusses mag jedoch von Isolat zu Isolat variieren. Hinweise auf mögliche weitere durch SurA beeinflusste Proteine liefert vor allem auch das Proteom der Außenmembranvesikel, da es als Abbild des periplasmatischen und des Außenmembranproteoms verstanden werden kann. Auf einen möglichen Einfluss der beobachteten Hypervesikulation *surA*-defizienter Zellen auf die Urovirulenz kann auf Basis der bisher erhaltenen Daten jedoch nicht geschlossen werden.

Zusammenfassend dokumentieren die Ergebnisse dieser Arbeit neue, bisher nicht beschriebene Defekte einer *surA*-Mutante, die zu einer verminderten Virulenz von

UPEC beitragen können, auch wenn sie aus indirekten regulatorischen Mechanismen und/oder dem Defekt der äußeren Membran resultieren.

6. Literaturverzeichnis

1. Hacker, J.u.H., J., *Molekulare Infektionsbiologie*. 2000: Spektrum, Thieme Verlag.
2. Struelens, M.J., O. Denis, and H. Rodriguez-Villalobos, *Microbiology of nosocomial infections: progress and challenges*. *Microbes Infect*, 2004. **6**(11): p. 1043-8.
3. Barnett, B.J. and D.S. Stephens, *Urinary tract infection: an overview*. *Am J Med Sci*, 1997. **314**(4): p. 245-9.
4. Langer, D., *Dissertation: Harnwegsinfektionen bei der Urolithiasis (eine retrospektive Analyse des Patientengutes der Universitätsklinik und Ploiklinik für Urologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg der Jahre 1988 bis 1992 und 1996)*. 2001.
5. Zhang, L. and B. Foxman, *Molecular epidemiology of Escherichia coli mediated urinary tract infections*. *Front Biosci*, 2003. **8**: p. e235-44.
6. Brumfitt, W., R.A. Gargan, and J.M. Hamilton-Miller, *Periurethral enterobacterial carriage preceding urinary infection*. *Lancet*, 1987. **1**(8537): p. 824-6.
7. Hooton, T.M., *Recurrent urinary tract infection in women*. *Int J Antimicrob Agents*, 2001. **17**(4): p. 259-68.
8. Bonadio, M., et al., *Current microbiological and clinical aspects of urinary tract infections*. *Eur Urol*, 2001. **40**(4): p. 439-44; discussion 445.
9. Hess, P., *Dissertation: Genetische und molekularbiologische Analyse von fim Determinanten bei Citrobacter freundii und Escherichia coli*. 2003.
10. Nicolle, L.E., *Resistant pathogens in urinary tract infections*. *J Am Geriatr Soc*, 2002. **50**(7 Suppl): p. S230-5.
11. Oelschlaeger, T.A.a.H., J., *Urinary tract infections: important bacteria, virulence factors and development of resistance*. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 1998. **7**: p. 33-40.
12. Kayser, F.H., *Medical Microbiology*. 2005: Thieme.
13. Brzuszkiewicz, E., et al., *How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic Escherichia coli strains*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(34): p. 12879-84.
14. Connell, I., et al., *Type 1 fimbrial expression enhances Escherichia coli virulence for the urinary tract*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(18): p. 9827-32.
15. Wright, K.J., P.C. Seed, and S.J. Hultgren, *Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic Escherichia coli depends on type 1 pili*. *Cell Microbiol*, 2007. **9**(9): p. 2230-41.
16. Mulvey, M.A., J.D. Schilling, and S.J. Hultgren, *Establishment of a persistent Escherichia coli reservoir during the acute phase of a bladder infection*. *Infect Immun*, 2001. **69**(7): p. 4572-9.
17. Greene, S.E., et al., *Human Urine Decreases Function and Expression of Type 1 Pili in Uropathogenic Escherichia coli*. *MBio*, 2015. **6**(4): p. e00820.
18. Mulvey, M.A., *Adhesion and entry of uropathogenic Escherichia coli*. *Cell Microbiol*, 2002. **4**(5): p. 257-71.
19. Olsen, A., A. Jonsson, and S. Normark, *Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on Escherichia coli*. *Nature*, 1989. **338**(6217): p. 652-5.

20. Prigent-Combaret, C., et al., *Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing Escherichia coli strains: role of flagella, curli and colanic acid*. Environ Microbiol, 2000. **2**(4): p. 450-64.
21. Hasman, H., T. Chakraborty, and P. Klemm, *Antigen-43-mediated autoaggregation of Escherichia coli is blocked by fimbriation*. J Bacteriol, 1999. **181**(16): p. 4834-41.
22. Danese, P.N., et al., *The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within Escherichia coli biofilms*. Mol Microbiol, 2000. **37**(2): p. 424-32.
23. May, A.K., et al., *Contribution of Escherichia coli alpha-hemolysin to bacterial virulence and to intraperitoneal alterations in peritonitis*. Infect Immun, 2000. **68**(1): p. 176-83.
24. Bhakdi, S., et al., *Effects of Escherichia coli hemolysin on human monocytes. Cytocidal action and stimulation of interleukin 1 release*. J Clin Invest, 1990. **85**(6): p. 1746-53.
25. Keane, W.F., et al., *Mechanism of Escherichia coli alpha-hemolysin-induced injury to isolated renal tubular cells*. Am J Pathol, 1987. **126**(2): p. 350-7.
26. Mills, M., K.C. Meysick, and A.D. O'Brien, *Cytotoxic necrotizing factor type 1 of uropathogenic Escherichia coli kills cultured human uroepithelial 5637 cells by an apoptotic mechanism*. Infect Immun, 2000. **68**(10): p. 5869-80.
27. Falzano, L., et al., *Induction of phagocytic behaviour in human epithelial cells by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor type 1*. Mol Microbiol, 1993. **9**(6): p. 1247-54.
28. Torres, A.G., et al., *TonB-dependent systems of uropathogenic Escherichia coli: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse*. Infect Immun, 2001. **69**(10): p. 6179-85.
29. Hunstad, D.A., et al., *Suppression of bladder epithelial cytokine responses by uropathogenic Escherichia coli*. Infect Immun, 2005. **73**(7): p. 3999-4006.
30. Nagy, G., et al., *Loss of regulatory protein RfaH attenuates virulence of uropathogenic Escherichia coli*. Infect Immun, 2002. **70**(8): p. 4406-13.
31. Bauer, M.E. and R.A. Welch, *Association of RTX toxins with erythrocytes*. Infect Immun, 1996. **64**(11): p. 4665-72.
32. Soloaga, A., J.M. Ramirez, and F.M. Goni, *Reversible denaturation, self-aggregation, and membrane activity of Escherichia coli alpha-hemolysin, a protein stable in 6 M urea*. Biochemistry, 1998. **37**(18): p. 6387-93.
33. Felmlee, T., S. Pellett, and R.A. Welch, *Nucleotide sequence of an Escherichia coli chromosomal hemolysin*. J Bacteriol, 1985. **163**(1): p. 94-105.
34. Dobrindt, U., et al., *Toxin genes on pathogenicity islands: impact for microbial evolution*. Int J Med Microbiol, 2000. **290**(4-5): p. 307-11.
35. Mourino, M., et al., *Environmental regulation of alpha-haemolysin expression in Escherichia coli*. Microb Pathog, 1994. **16**(4): p. 249-59.
36. Oropeza-Wekerle, R.L., et al., *Synthesis, inactivation, and localization of extracellular and intracellular Escherichia coli hemolysins*. J Bacteriol, 1989. **171**(5): p. 2783-8.
37. Ludwig, A., M. Vogel, and W. Goebel, *Mutations affecting activity and transport of haemolysin in Escherichia coli*. Mol Gen Genet, 1987. **206**(2): p. 238-45.

38. Stanley, P., V. Koronakis, and C. Hughes, *Acylation of Escherichia coli hemolysin: a unique protein lipidation mechanism underlying toxin function*. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. **62**(2): p. 309-33.
39. Felmlee, T. and R.A. Welch, *Alterations of amino acid repeats in the Escherichia coli hemolysin affect cytolytic activity and secretion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(14): p. 5269-73.
40. Thanabalu, T., et al., *Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from E.coli: reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore*. EMBO J, 1998. **17**(22): p. 6487-96.
41. Balakrishnan, L., C. Hughes, and V. Koronakis, *Substrate-triggered recruitment of the TolC channel-tunnel during type I export of hemolysin by Escherichia coli*. J Mol Biol, 2001. **313**(3): p. 501-10.
42. Balsalobre, C., et al., *Release of the type I secreted alpha-haemolysin via outer membrane vesicles from Escherichia coli*. Mol Microbiol, 2006. **59**(1): p. 99-112.
43. Lilie, H., et al., *Folding of a synthetic parallel beta-roll protein*. FEBS Lett, 2000. **470**(2): p. 173-7.
44. Menestrina, G., et al., *Pore-formation by Escherichia coli hemolysin (HlyA) and other members of the RTX toxins family*. Toxicology, 1994. **87**(1-3): p. 249-67.
45. Bakas, L., et al., *Reversible adsorption and nonreversible insertion of Escherichia coli alpha-hemolysin into lipid bilayers*. Biophys J, 1996. **71**(4): p. 1869-76.
46. Menestrina, G., et al., *Bacterial hemolysins and leukotoxins affect target cells by forming large exogenous pores into their plasma membrane: Escherichia coli hemolysin A as a case example*. Biosci Rep, 1995. **15**(6): p. 543-51.
47. Konig, B., et al., *Role of Escherichia coli alpha-hemolysin and bacterial adherence in infection: requirement for release of inflammatory mediators from granulocytes and mast cells*. Infect Immun, 1986. **54**(3): p. 886-92.
48. Suttorp, N., et al., *Effects of Escherichia coli hemolysin on endothelial cell function*. Infect Immun, 1990. **58**(11): p. 3796-801.
49. Konig, B., et al., *Pore formation by the Escherichia coli alpha-hemolysin: role for mediator release from human inflammatory cells*. Infect Immun, 1994. **62**(10): p. 4611-7.
50. Beveridge, T.J., *Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles*. J Bacteriol, 1999. **181**(16): p. 4725-33.
51. Schooling, S.R. and T.J. Beveridge, *Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms*. J Bacteriol, 2006. **188**(16): p. 5945-57.
52. Kuehn, M.J. and N.C. Kesty, *Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction*. Genes Dev, 2005. **19**(22): p. 2645-55.
53. Hoekstra, D., et al., *Release of outer membrane fragments from normally growing Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta, 1976. **455**(3): p. 889-99.
54. McBroom, A.J. and M.J. Kuehn, *Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response*. Mol Microbiol, 2007. **63**(2): p. 545-58.
55. Schwechheimer, C., A. Kulp, and M.J. Kuehn, *Modulation of bacterial outer membrane vesicle production by envelope structure and content*. BMC Microbiol, 2014. **14**: p. 324.

56. Roden, J.A., et al., *Hemin binding protein C is found in outer membrane vesicles and protects Bartonella henselae against toxic concentrations of hemin*. Infect Immun, 2012. **80**(3): p. 929-42.
57. McMahon, K.J., et al., *Biogenesis of outer membrane vesicles in Serratia marcescens is thermoregulated and can be induced by activation of the Rcs phosphorelay system*. J Bacteriol, 2012. **194**(12): p. 3241-9.
58. Frias, A., et al., *Membrane vesicles: a common feature in the extracellular matter of cold-adapted antarctic bacteria*. Microb Ecol, 2010. **59**(3): p. 476-86.
59. Mayrand, D. and D. Grenier, *Biological activities of outer membrane vesicles*. Can J Microbiol, 1989. **35**(6): p. 607-13.
60. Zhou, L., et al., *On the origin of membrane vesicles in gram-negative bacteria*. FEMS Microbiol Lett, 1998. **163**(2): p. 223-8.
61. Mashburn, L.M. and M. Whiteley, *Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote*. Nature, 2005. **437**(7057): p. 422-5.
62. Wai, S.N., et al., *Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin*. Cell, 2003. **115**(1): p. 25-35.
63. Fernandez-Moreira, E., J.H. Helbig, and M.S. Swanson, *Membrane vesicles shed by Legionella pneumophila inhibit fusion of phagosomes with lysosomes*. Infect Immun, 2006. **74**(6): p. 3285-95.
64. Dashper, S.G., et al., *Characterization of a novel outer membrane hemin-binding protein of Porphyromonas gingivalis*. J Bacteriol, 2000. **182**(22): p. 6456-62.
65. Manning, A.J. and M.J. Kuehn, *Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense*. BMC Microbiol, 2011. **11**: p. 258.
66. Kulkarni, H.M., V. Swamy Ch, and M.V. Jagannadham, *Molecular characterization and functional analysis of outer membrane vesicles from the antarctic bacterium Pseudomonas syringae suggest a possible response to environmental conditions*. J Proteome Res, 2014. **13**(3): p. 1345-58.
67. Sjostrom, A.E., et al., *Membrane vesicle-mediated release of bacterial RNA*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 15329.
68. Olofsson, A., et al., *Biochemical and functional characterization of Helicobacter pylori vesicles*. Mol Microbiol, 2010. **77**(6): p. 1539-55.
69. Kato, S., Y. Kowashi, and D.R. Demuth, *Outer membrane-like vesicles secreted by Actinobacillus actinomycetemcomitans are enriched in leukotoxin*. Microb Pathog, 2002. **32**(1): p. 1-13.
70. Wai, S.N., A. Takade, and K. Amako, *The release of outer membrane vesicles from the strains of enterotoxigenic Escherichia coli*. Microbiol Immunol, 1995. **39**(7): p. 451-6.
71. Horstman, A.L. and M.J. Kuehn, *Enterotoxigenic Escherichia coli secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles*. J Biol Chem, 2000. **275**(17): p. 12489-96.
72. Aldick, T., et al., *Vesicular stabilization and activity augmentation of enterohaemorrhagic Escherichia coli haemolysin*. Mol Microbiol, 2009. **71**(6): p. 1496-508.
73. Kesty, N.C., et al., *Enterotoxigenic Escherichia coli vesicles target toxin delivery into mammalian cells*. EMBO J, 2004. **23**(23): p. 4538-49.

74. Kolling, G.L. and K.R. Matthews, *Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of Escherichia coli O157:H7*. Appl Environ Microbiol, 1999. **65**(5): p. 1843-8.
75. Kesty, N.C. and M.J. Kuehn, *Incorporation of heterologous outer membrane and periplasmic proteins into Escherichia coli outer membrane vesicles*. J Biol Chem, 2004. **279**(3): p. 2069-76.
76. Cheng, H.T., Megha, and E. London, *Preparation and properties of asymmetric vesicles that mimic cell membranes: effect upon lipid raft formation and transmembrane helix orientation*. J Biol Chem, 2009. **284**(10): p. 6079-92.
77. Kim, J.Y., et al., *Engineered bacterial outer membrane vesicles with enhanced functionality*. J Mol Biol, 2008. **380**(1): p. 51-66.
78. Lane, M.C., et al., *Expression of flagella is coincident with uropathogenic Escherichia coli ascension to the upper urinary tract*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(42): p. 16669-74.
79. Wright, K.J., P.C. Seed, and S.J. Hultgren, *Uropathogenic Escherichia coli flagella aid in efficient urinary tract colonization*. Infect Immun, 2005. **73**(11): p. 7657-68.
80. Giron, J.A., et al., *The flagella of enteropathogenic Escherichia coli mediate adherence to epithelial cells*. Mol Microbiol, 2002. **44**(2): p. 361-79.
81. Luck, S.N., et al., *Contribution of FliC to epithelial cell invasion by enterohemorrhagic Escherichia coli O113:H21*. Infect Immun, 2006. **74**(12): p. 6999-7004.
82. Pratt, L.A. and R. Kolter, *Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili*. Mol Microbiol, 1998. **30**(2): p. 285-93.
83. Wood, T.K., et al., *Motility influences biofilm architecture in Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol, 2006. **72**(2): p. 361-7.
84. Konkkel, M.E., et al., *Secretion of virulence proteins from Campylobacter jejuni is dependent on a functional flagellar export apparatus*. J Bacteriol, 2004. **186**(11): p. 3296-303.
85. Young, G.M., D.H. Schmiel, and V.L. Miller, *A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(11): p. 6456-61.
86. Byrne, B. and M.S. Swanson, *Expression of Legionella pneumophila virulence traits in response to growth conditions*. Infect Immun, 1998. **66**(7): p. 3029-34.
87. Heuner, K., B.C. Brand, and J. Hacker, *The expression of the flagellum of Legionella pneumophila is modulated by different environmental factors*. FEMS Microbiol Lett, 1999. **175**(1): p. 69-77.
88. Smith, K.D. and A. Ozinsky, *Toll-like receptor-5 and the innate immune response to bacterial flagellin*. Curr Top Microbiol Immunol, 2002. **270**: p. 93-108.
89. Hawn, T.R., et al., *A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease*. J Exp Med, 2003. **198**(10): p. 1563-72.
90. Larsen, S.H., et al., *Change in direction of flagellar rotation is the basis of the chemotactic response in Escherichia coli*. Nature, 1974. **249**(452): p. 74-7.

91. Manson, M.D., et al., *A protonmotive force drives bacterial flagella*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(7): p. 3060-4.
92. Hirota, N. and Y. Imae, *Na⁺-driven flagellar motors of an alkalophilic Bacillus strain YN-1*. J Biol Chem, 1983. **258**(17): p. 10577-81.
93. Dean, G.E., et al., *Gene sequence and predicted amino acid sequence of the motA protein, a membrane-associated protein required for flagellar rotation in Escherichia coli*. J Bacteriol, 1984. **159**(3): p. 991-9.
94. Jones, C.J., M. Homma, and R.M. Macnab, *Identification of proteins of the outer (L and P) rings of the flagellar basal body of Escherichia coli*. J Bacteriol, 1987. **169**(4): p. 1489-92.
95. Homma, M., D.J. DeRosier, and R.M. Macnab, *Flagellar hook and hook-associated proteins of Salmonella typhimurium and their relationship to other axial components of the flagellum*. J Mol Biol, 1990. **213**(4): p. 819-32.
96. Homma, M., et al., *FlgB, FlgC, FlgF and FlgG. A family of structurally related proteins in the flagellar basal body of Salmonella typhimurium*. J Mol Biol, 1990. **211**(2): p. 465-77.
97. Francis, N.R., et al., *Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex*. J Mol Biol, 1994. **235**(4): p. 1261-70.
98. Toker, A.S. and R.M. Macnab, *Distinct regions of bacterial flagellar switch protein FliM interact with FliG, FliN and CheY*. J Mol Biol, 1997. **273**(3): p. 623-34.
99. Chilcott, G.S. and K.T. Hughes, *Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in Salmonella enterica serovar typhimurium and Escherichia coli*. Microbiol Mol Biol Rev, 2000. **64**(4): p. 694-708.
100. Liu, X. and P. Matsumura, *The FliH/FliC complex, a transcriptional activator of the Escherichia coli flagellar class II operons*. J Bacteriol, 1994. **176**(23): p. 7345-51.
101. Liu, X. and P. Matsumura, *An alternative sigma factor controls transcription of flagellar class-III operons in Escherichia coli: gene sequence, overproduction, purification and characterization*. Gene, 1995. **164**(1): p. 81-4.
102. Lazar, S.W. and R. Kolter, *SurA assists the folding of Escherichia coli outer membrane proteins*. J Bacteriol, 1996. **178**(6): p. 1770-3.
103. Missiakas, D., J.M. Betton, and S. Raina, *New components of protein folding in extracytoplasmic compartments of Escherichia coli SurA, FkpA and Skp/OmpH*. Mol Microbiol, 1996. **21**(4): p. 871-84.
104. Rouviere, P.E. and C.A. Gross, *SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins*. Genes Dev, 1996. **10**(24): p. 3170-82.
105. Tormo, A., M. Almiron, and R. Kolter, *surA, an Escherichia coli gene essential for survival in stationary phase*. J Bacteriol, 1990. **172**(8): p. 4339-47.
106. Lazar, S.W., et al., *Role of the Escherichia coli SurA protein in stationary-phase survival*. J Bacteriol, 1998. **180**(21): p. 5704-11.
107. Rahfeld, J.U., et al., *A novel peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from Escherichia coli*. FEBS Lett, 1994. **343**(1): p. 65-9.
108. Bitto, E. and D.B. McKay, *Crystallographic structure of SurA, a molecular chaperone that facilitates folding of outer membrane porins*. Structure, 2002. **10**(11): p. 1489-98.

109. Behrens, S., et al., *The SurA periplasmic PPIase lacking its parvulin domains functions in vivo and has chaperone activity*. EMBO J, 2001. **20**(1-2): p. 285-94.
110. Xu, X., et al., *The periplasmic bacterial molecular chaperone SurA adapts its structure to bind peptides in different conformations to assert a sequence preference for aromatic residues*. J Mol Biol, 2007. **373**(2): p. 367-81.
111. Hennecke, G., et al., *The periplasmic chaperone SurA exploits two features characteristic of integral outer membrane proteins for selective substrate recognition*. J Biol Chem, 2005. **280**(25): p. 23540-8.
112. Wu, T., et al., *Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in Escherichia coli*. Cell, 2005. **121**(2): p. 235-45.
113. Sklar, J.G., et al., *Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in Escherichia coli*. Genes Dev, 2007. **21**(19): p. 2473-84.
114. Vertommen, D., et al., *Characterization of the role of the Escherichia coli periplasmic chaperone SurA using differential proteomics*. Proteomics, 2009. **9**(9): p. 2432-43.
115. Bos, M.P., et al., *Identification of an outer membrane protein required for the transport of lipopolysaccharide to the bacterial cell surface*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(25): p. 9417-22.
116. Wu, T., et al., *Identification of a protein complex that assembles lipopolysaccharide in the outer membrane of Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(31): p. 11754-9.
117. Justice, S.S., et al., *Periplasmic peptidyl prolyl cis-trans isomerases are not essential for viability, but SurA is required for pilus biogenesis in Escherichia coli*. J Bacteriol, 2005. **187**(22): p. 7680-6.
118. Bodelon, G., E. Marin, and L.A. Fernandez, *Role of periplasmic chaperones and BamA (YaeT/Omp85) in folding and secretion of intimin from enteropathogenic Escherichia coli strains*. J Bacteriol, 2009. **191**(16): p. 5169-79.
119. Ieva, R. and H.D. Bernstein, *Interaction of an autotransporter passenger domain with BamA during its translocation across the bacterial outer membrane*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(45): p. 19120-5.
120. Sauri, A., et al., *The Bam (Omp85) complex is involved in secretion of the autotransporter haemoglobin protease*. Microbiology, 2009. **155**(Pt 12): p. 3982-91.
121. Purdy, G.E., C.R. Fisher, and S.M. Payne, *IcsA surface presentation in Shigella flexneri requires the periplasmic chaperones DegP, Skp, and SurA*. J Bacteriol, 2007. **189**(15): p. 5566-73.
122. Behrens-Kneip, S., *The role of SurA factor in outer membrane protein transport and virulence*. Int J Med Microbiol, 2010. **300**(7): p. 421-8.
123. Johansen, J., et al., *Conserved small non-coding RNAs that belong to the sigmaE regulon: role in down-regulation of outer membrane proteins*. J Mol Biol, 2006. **364**(1): p. 1-8.
124. Udekwu, K.I. and E.G. Wagner, *Sigma E controls biogenesis of the antisense RNA MicA*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(4): p. 1279-88.
125. Dartigalongue, C., D. Missiakas, and S. Raina, *Characterization of the Escherichia coli sigma E regulon*. J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 20866-75.
126. Castanie-Cornet, M.P., K. Cam, and A. Jacq, *RcsF is an outer membrane lipoprotein involved in the RcsCDB phosphorelay signaling pathway in Escherichia coli*. J Bacteriol, 2006. **188**(12): p. 4264-70.

127. Otto, K. and T.J. Silhavy, *Surface sensing and adhesion of Escherichia coli controlled by the Cpx-signaling pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(4): p. 2287-92.
128. Ferrieres, L. and D.J. Clarke, *The RcsC sensor kinase is required for normal biofilm formation in Escherichia coli K-12 and controls the expression of a regulon in response to growth on a solid surface*. Mol Microbiol, 2003. **50**(5): p. 1665-82.
129. De Wulf, P., O. Kwon, and E.C. Lin, *The CpxRA signal transduction system of Escherichia coli: growth-related autoactivation and control of unanticipated target operons*. J Bacteriol, 1999. **181**(21): p. 6772-8.
130. Price, N.L. and T.L. Raivio, *Characterization of the Cpx regulon in Escherichia coli strain MC4100*. J Bacteriol, 2009. **191**(6): p. 1798-815.
131. Sydenham, M., et al., *Salmonella enterica serovar typhimurium surA mutants are attenuated and effective live oral vaccines*. Infect Immun, 2000. **68**(3): p. 1109-15.
132. Tamayo, R., et al., *Identification and genetic characterization of PmrA-regulated genes and genes involved in polymyxin B resistance in Salmonella enterica serovar typhimurium*. Infect Immun, 2002. **70**(12): p. 6770-8.
133. Justice, S.S., et al., *Maturation of intracellular Escherichia coli communities requires SurA*. Infect Immun, 2006. **74**(8): p. 4793-800.
134. Raivio, T.L., *Envelope stress responses and Gram-negative bacterial pathogenesis*. Mol Microbiol, 2005. **56**(5): p. 1119-28.
135. Pellett, S., et al., *Characterization of monoclonal antibodies against the Escherichia coli hemolysin*. Infect Immun, 1990. **58**(3): p. 822-7.
136. Watts, K.M. and D.A. Hunstad, *Components of SurA required for outer membrane biogenesis in uropathogenic Escherichia coli*. PLoS One, 2008. **3**(10): p. e3359.
137. Nagakubo, S., et al., *The putative response regulator BaeR stimulates multidrug resistance of Escherichia coli via a novel multidrug exporter system, MdtABC*. J Bacteriol, 2002. **184**(15): p. 4161-7.
138. Vogel, J. and K. Papenfort, *Small non-coding RNAs and the bacterial outer membrane*. Curr Opin Microbiol, 2006. **9**(6): p. 605-11.
139. Nagy, G., et al., *Both alpha-haemolysin determinants contribute to full virulence of uropathogenic Escherichia coli strain 536*. Microbes Infect, 2006. **8**(8): p. 2006-12.
140. Bender, J., et al., *Phospholipase PlaB of Legionella pneumophila represents a novel lipase family: protein residues essential for lipolytic activity, substrate specificity, and hemolysis*. J Biol Chem, 2009. **284**(40): p. 27185-94.
141. Berlanda Scorza, F., et al., *Proteomics characterization of outer membrane vesicles from the extraintestinal pathogenic Escherichia coli DeltatolR IHE3034 mutant*. Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(3): p. 473-85.
142. Touze, T., et al., *Interactions underlying assembly of the Escherichia coli AcrAB-TolC multidrug efflux system*. Mol Microbiol, 2004. **53**(2): p. 697-706.
143. Mogensen, J.E. and D.E. Otzen, *Interactions between folding factors and bacterial outer membrane proteins*. Mol Microbiol, 2005. **57**(2): p. 326-46.
144. Smit, J., Y. Kamio, and H. Nikaido, *Outer membrane of Salmonella typhimurium: chemical analysis and freeze-fracture studies with lipopolysaccharide mutants*. J Bacteriol, 1975. **124**(2): p. 942-58.

145. Deatherage, B.L., et al., *Biogenesis of bacterial membrane vesicles*. Mol Microbiol, 2009. **72**(6): p. 1395-407.
146. Brissette, J.L., et al., *Phage shock protein, a stress protein of Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(3): p. 862-6.
147. Green, R.C. and A.J. Darwin, *PspG, a new member of the Yersinia enterocolitica phage shock protein regulon*. J Bacteriol, 2004. **186**(15): p. 4910-20.
148. Hardie, K.R., et al., *The secretin-specific, chaperone-like protein of the general secretory pathway: separation of proteolytic protection and piloting functions*. Mol Microbiol, 1996. **22**(5): p. 967-76.
149. Model, P., G. Jovanovic, and J. Dworkin, *The Escherichia coli phage-shock-protein (psp) operon*. Mol Microbiol, 1997. **24**(2): p. 255-61.
150. Maxson, M.E. and A.J. Darwin, *Identification of inducers of the Yersinia enterocolitica phage shock protein system and comparison to the regulation of the RpoE and Cpx extracytoplasmic stress responses*. J Bacteriol, 2004. **186**(13): p. 4199-208.
151. Genin, S. and C.A. Boucher, *A superfamily of proteins involved in different secretion pathways in gram-negative bacteria: modular structure and specificity of the N-terminal domain*. Mol Gen Genet, 1994. **243**(1): p. 112-8.
152. Kline, K.A., et al., *Bacterial adhesins in host-microbe interactions*. Cell Host Microbe, 2009. **5**(6): p. 580-92.
153. Fardini, Y., et al., *Investigation of the role of the BAM complex and SurA chaperone in outer-membrane protein biogenesis and type III secretion system expression in Salmonella*. Microbiology, 2009. **155**(Pt 5): p. 1613-22.
154. Darwin, A.J. and V.L. Miller, *The psp locus of Yersinia enterocolitica is required for virulence and for growth in vitro when the Ysc type III secretion system is produced*. Mol Microbiol, 2001. **39**(2): p. 429-44.
155. Eriksson, S., et al., *Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular Salmonella enterica*. Mol Microbiol, 2003. **47**(1): p. 103-18.
156. Beloin, C., et al., *Global impact of mature biofilm lifestyle on Escherichia coli K-12 gene expression*. Mol Microbiol, 2004. **51**(3): p. 659-74.
157. Ruan, L., et al., *Solute transport proteins and the outer membrane protein NmpC contribute to heat resistance of Escherichia coli AW1.7*. Appl Environ Microbiol, 2011. **77**(9): p. 2961-7.
158. Guyard, C., et al., *Periplasmic flagellar export apparatus protein, FliH, is involved in post-transcriptional regulation of FlaB, motility and virulence of the relapsing fever spirochete Borrelia hermsii*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e72550.
159. Muramoto, K., et al., *Effect of hook subunit concentration on assembly and control of length of the flagellar hook of Salmonella*. J Bacteriol, 1999. **181**(18): p. 5808-13.
160. Li, H., et al., *Outer membrane proteomics of kanamycin-resistant Escherichia Coli identified MipA as a novel antibiotic resistance-related protein*. FEMS Microbiol. Lett., 2015. **362**(11)
161. Galka, F., Dissertation: *Untersuchungen zum Proteom und zur Funktion von sekretierten Proteinen und äußeren Membranvesikeln von Legionella pneumophila*. 2007. Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

162. Hubert, R., Letzel, T., *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*, 6. Auflage, 2010, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg
163. Ehrmann, M., *The Periplasm*, 2007, ASM Press Washington, D.C.
- 164.- Bier, N., *Untersuchungen zum Einfluss des periplasmatischen Chaperons SurA auf Virulenz-assoziierte Eigenschaften uropathogener Escherichia coli*. 2010. Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald und Robert Koch-Institut, Berlin.
165. Matern, Y., Barion, B. and Behrens-Kneip S., *PpiD is a player in the network of periplasmic chaperones in Escherichia coli*. BMC Microbiol, 2010. **10**: p.1-17.

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme	23
Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete Plasmide	24
Tab. 3: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien.....	24
Tab. 4: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien	25
Tab. 5: In dieser Arbeit verwendete Laborkits	26
Tab. 6: Fragmentgrößen des DNA-Standards.....	27
Tab. 7: Bandengrößen des Protein-Standards.....	27
Tab. 8: In dieser Arbeit verwendete Antibiotikazusätze	28
Tab. 9: In dieser Arbeit verwendete Antikörper	28
Tab. 10: In dieser Arbeit verwendete Enzyme	29
Tab. 11: In dieser Arbeit verwendete Geräte.....	29
Tab. 12: Verwendete Software	30
Tab. 13: Oligonukleotide für die Amplifikation des <i>hlyA</i> -Gens.....	34
Tab. 14: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide	38
Tab. 15: Rezept für 2 Mini-Gele	43
Tab. 16: Zusammensetzung der Proben im quantitativen Hämolysetest	51
Tab. 17: Spotanalyse mittels MALDI-TOF MS System und Identifizierung der Proteine mit Hilfe der Online-Datenbank Mascot.....	66
Tab. 18: Tabellarische Darstellung der hämolytischen Aktivität der untersuchten 536-Stämme.....	76
Tab. 19: Tabellarische Darstellung der hämolytischen Aktivität der untersuchten 536-Stämme mit Zugabe von Proteaseinhibitor	77
Tab. 20: Auszählung der Flagellen und Bewertung der Strukturen	92
Tab. A1: Massen der identifizierten Peptide nach Trypsinverdau (1 – 6).	134
Tab. A2: Massen der identifizierten Peptide nach Trypsinverdau (7 – 12)	135
Tab. A3: Volumenverhältnisse der Proteinspots aus OMV für 536-Wildtyp (wt) und <i>surA</i> -Mutante.....	136
Tab. A4: Auflistung der Proteinvolumina der analysierten OMV-Spots vergleichend zwischen 536-Wildtyp und der <i>surA</i> -Mutante.	136

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 A) Genomische Organisation des rtx-Operons <i>hlyCABD</i> für die Sekretion und Aktivierung von HlyA aus <i>E. coli</i>	6
Abb. 1 B) Strukturelle und funktionale Domänen des α -Hämolytins aus <i>E. coli</i>	6
Abb. 2: Struktureller Aufbau der Flagelle.....	13
Abb. 3: Transkriptionelle Regulationskaskade der Flagellengene in Bezug auf die Assemblierung der Flagelle.....	14
Abb. 4: Das Chaperon und die Peptidyl-Prolyl-Isomerase SurA aus <i>E. coli</i>	15
Abb. 5: Gegenwärtiges Modell zur Rolle von SurA in der Biogenese von β -Fass-OMP in <i>E. coli</i>	18
Abb. 6: Darstellung der Funktionsweise der Plasmide pP3CAT und pKK232-8...	53
Abb. 7: Wachstumskurve des UPEC-536-Wildtyps (Wt), der isogenen <i>surA</i> -Mutante (<i>surA</i> pASK75) und der mit dem Plasmid pSurA komplementierten Mutante (<i>surA</i> pSurA) bei 37 °C und 350 rpm in LB mit Ampicillin	58
Abb. 8: Sensitivitätstest der UPEC-536- und des CFT073-Isolats auf Novobiocin	59
Abb. 9: Messung der chloramphenicolabhängigen Hemmhöhe als Maß für die σ^E -vermittelte Stressantwort im Wildtyp und der <i>surA</i> -Mutante der uropathogenen Isolate 536 und CFT073.....	60
Abb. 10: Elektronenmikroskopische Aufnahmen isolierter Außenmembranvesikel (OMV) des uropathogenen Stammes 536.....	62
Abb. 11: Prozentuale Größenverteilung der OMV des 536-Wildtyps, der <i>surA</i> -Mutante und der entsprechenden komplementierten Mutante	63
Abb. 12: Zweidimensionale Gelelektrophorese von Außenmembranvesikeln (OMV) des Wildtyp-Stammes 536 (A) und der <i>surA</i> -Mutante (B).....	65
Abb. 13: „ <i>Matching</i> “ der 2D-Gele von OMV des 536 Wildtyps (blau) und der <i>surA</i> -Mutante (orange) mit Hilfe der Delta 2D-Software.....	69
Abb. 14: Verteilung der Volumina-Verhältnisse zwischen Wildtyp und <i>surA</i> -Mutante der identifizierten 116 gemeinsamen Proteinpunkte mittels Delta 2D-Software	70
Abb. 15: Qualitativer Hämolysetest der UPEC-Stämme 536 und F11 auf Blutagarplatten (1,5 % (v/v)	71
Abb. 16: Vergleichende Transkriptmengenanalyse von <i>hlyA</i> mittels RT-PCR	72
Abb. 17: Messung der hämolysistischen Aktivität des uropathogenen Stammes 536 in einem Flüssighämolysetest	74

Abb. 18: Immunochemischer α -Hämolyisin-Nachweis in den Fraktionen Zellextrakt, Überstand und OMV.....	78
Abb. 19: Immunochemischer α -Hämolyisin-Nachweis in den Fraktionen Zellextrakt, Überstand und OMV unter Zugabe eines Proteaseinhibitors	79
Abb. 20: Immunochemischer HlyA-Nachweis im Zellextrakt, im Überstand und in den OMV der <i>surA</i> -Mutante und der Hämolyisinmutante (<i>hlyI hlyII</i>) des uropathogenen Stammes 536	81
Abb. 21: PCR-Amplifikation von <i>hlyA</i> im 536-Wildtyp (wt) und der 536-HDM-Mutante (<i>hlyI hlyII</i>).....	81
Abb. 22: Einteilung der Phospholipasen nach Hydrolyseposition in Phospholipiden.....	83
Abb. 23: Nachweis der Phospholipaseaktivität in OMV verschiedener 536-Stämme zur Untersuchung des Einflusses von SurA	84
Abb. 24: Einfluss von SurA auf die Motilität der uropathogenen Stämme 536, CFT073, UIT89 und F11	86
Abb. 25: Transkriptmengenvergleich der Gene <i>rrsH</i> (A), <i>tsr</i> (B) und <i>fliC</i> (C) in Zellen des 536-Wildtyps (wt pASK75), der <i>surA</i> -Mutante (<i>surA</i> pASK75) und der komplementierten <i>surA</i> -Mutante (<i>surA</i> pSurA) mittels Sq-RT-PCR	88
Abb. 26: Transkriptmengenvergleich der Gene <i>rrsH</i> (A), <i>flhC</i> (B) und <i>flgH</i> (C) in Zellen des 536-Wildtyps (wt pASK75), der <i>surA</i> -Mutante (<i>surA</i> pASK75) und der komplementierten <i>surA</i> -Mutante (<i>surA</i> pSurA) mittels Sq-RT-PCR	88
Abb. 27: Immunochemischer FliC-Nachweis im Zellextrakt und im Überstand des 536-Wildtyps, der <i>surA</i> -Mutante und der <i>fliC</i> -Mutante (OD ₆₀₀ 1,0).....	89
Abb. 28: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Flagellierung des uropathogenen Stammes 536	90
Abb. 29: Quantifizierung der Flagellierung des 536-Wildtyps, der 536- <i>surA</i> -Mutante und der entsprechenden 536 komplementierten <i>surA</i> -Mutante auf der Grundlage von elektronenmikroskopischen Aufnahmen	92
Abb. A1: Fragmentierte Massenspektren des Proteinspots 1.....	128
Abb. A2: Fragmentierte Massenspektren des Proteinspots 2.....	128
Abb. A3: Fragmentierte Massenspektren des Proteinspots 3.....	129
Abb. A4: Fragmentierte Massenspektren des Proteinspots 4.....	129
Abb. A5: Fragmentierte Massenspektren des Proteinspots 5.....	130
Abb. A6: Fragmentierte Massenspektren des Proteinspots 6.....	130

Abb. A7: Fragmentierte Massenspektren des Proteinspots 7.....	131
Abb. A8: Fragmentierte Massenspektren des Proteinspots 8.....	131
Abb. A9: Fragmentierte Massenspektren des Proteinspots 9.....	132
Abb. 10: Fragmentierte Massenspektren des Proteinspots 10.....	132
Abb. A11: Fragmentierte Massenspektren des Proteinspots 11.....	133
Abb. A12: Fragmentierte Massenspektren des Proteinspots 12.....	133

9. Anhang

9.1 Nukleinsäuretechniken

Nukleotidsequenz von *hlyA* aus dem *E. coli*-Stamm 536 (Primersequenzen in blau):

```

atgccaacaa taaccactgc acaaattaaa agcacactgc agtctgcaaa gcaatccgct      60
gcaaataaat tgcactcagc aggacaaagc acgaaagatg cattaaaaaaa agcagcagag      120
caaaccgcga atgcgggaaa cagactcatt ttacttatcc ctaaagatta taaaggacag      180
ggttcaagcc ttaatgacct tgtcaggacg gcagatgaac tgggaattga agtccagtat      240
gatgaaaaga atggcacggc gattactaaa caggtattcg gcacagcaga gaaactcatt      300
ggcctcaccg aacggggagt gactatcttt gcaccacaat tagacaaatt actgcaaaag      360
tatcaaaaag cgggtaataa attaggcggc agtgctgaaa atataggtga taacttagga      420
aaggcaggca gtgactgtc aacgtttcaa aattttctgg gtactgact ttctcaatg      480
aaaatagacg aactgataaa gaaacaaaaa tctggtagca atgtcagttc ttctgaactg      540
gcaaaagcga gtattgagct aatcaaccaa ctctgtagca cagctgccag cattaataat      600
aatgttaact cattttctca acaactcaat aagctgggaa gtgtattatc caatacaaaag      660
cacctgaacg gtgttggtaa taagttacag aatttaccta accttgataa tatcggtgca      720
gggttagata ctgtatcggg tattttatct gtgatttcag caagtttcat tctgagcaat      780
gcagatgcag ataccggaac taaagctgca gcaggtgttg aattaacaac gaaagtactg      840
ggtaatgttg gaaaaggat ttctcaatat attatcgcac agcgtgcagc acaggggtta      900
tctacatctg ctgctgctgc cggtttaatt gcttctgctg tgacactggc aattagtccc      960
ctctcattcc tgtccattgc cgataagttt aaacgtgcaa ataaaataga ggagtattca     1020
caacgattca aaaaacttgg atacgatggt gacagtttac ttgctgcttt ccacaaagaa     1080
acaggagcta ttgatgcac attaacacag ataagcactg tactggcttc agtatcctca     1140
ggtattagtg ctgctgcaac gacatctctt gttgggtgcac cggtaagcgc actggtaggt     1200
gctgttacgg ggataatttc aggtatcctt gaggcttcaa aacaggcaat gtttgaacat     1260
gtcgccagta aaatggccga tgttattgct gaatgggaga aaaaacacgg caaaaattac     1320
tttgaaaatg gatatgatgc ccgccatgct gcatttttag aagataactt taaaatatta     1380
tctcagtata ataaagagta ttctgttgaa agatcagtcc tcattactca gcaacattgg     1440
gatacgctga taggtgagtt agctggtgtc accagaaatg gagacaaaac actcagtggt     1500
aaaagttata ttgactatta tgaagaagga aaacgtctgg agaaaaaacc ggatgaattc     1560
cagaagcaag tctttgacc attgaaagga aatattgacc tttctgacag caaatcttct     1620
acgttattga aatttgttac accattgtta actcccggt aggaaattcg tgaaggagg     1680
cagtccggaa aatatgaata tattaccgag ttattagtca aggtgttga taaatggacg     1740
gtgaaggggg ttcaggataa ggggtctgta tatgattact ctaacctgat tcagcatgca     1800
tcagtgggta ataaccagta tcgggaaatt cgtattgagt cacacctggg agacggggat     1860
gataaggtct ttttagctgc cggctcagcc aatatctacg caggaaaggg gcatgatgtt     1920
gtttactatg ataaaacaga taccggttat ctgaccatcg atggtacaaa agcaactgaa     1980
gccggtaatt acacggtaac acgtgtactt ggtggcgatg ttaaggtttt acaggaagtt     2040
gtgaaggagc aggaggtttc agttggcaaa aggactgaaa aaacacaata tcgaagctat     2100
gaattcactc atattaatgg cacagactta accgagacag ataacttata ctccgtggag     2160
gagctcatcg gaaccaaccg tgctgataag ttttttggca gcaaatttac agatatcttc     2220
catggcgcgg atggtgatga ccacatagaa ggaaatgatg ggaatgaccg cttatatggt     2280
gataaaggta atgacacact gaggggcgga aacggggatg accagctcta tggcggtgat     2340
ggtaacgata agctaaccgg aggtgtgggt aataactacc ttaatggcgg agacggggat     2400
gatgagcttc aggttcaggg taattctctt gctaaaaatg tattatccgg tggaaaaggt     2460
aatgacaagc tgtacggcag tgagggggca gatctgcttg atggcgggaga agggaatgat     2520
ctcctgaagg gggggtatgg taatgatatt tatcgttatc tttcaggata tggccatcat     2580
attattgacg atgatggggg aaaagacgat aaactcagtt tggctgatat tgatttccgg     2640
gacgttgcct ttaagcgaga aggaaatgac ctcatcatgt ataaagctga aggtaatgtt     2700
ctttccattg gtcataaaaa tggtattaca ttcaggaact ggtttgaaaa agatcaggt     2760
gatatcctta atcaccagat agagcagatt tttgataaag atggcgggt catcacacca     2820
gattccctta aaaaagcatt tgaatatcag cagagtaata atcaagccaa ttatgtgat     2880
ggagagtatg catcaactta tgcagacctg gataatctga atccattaat taatgaaatc     2940
agcaaaaatta tttcagctgc aggtaacttc gatgttaagg aggaaagatc tgccgcttct     3000
ttattgcagt tgtccggtaa tgccagtgat ttttcatatg gacggaactc aataactttg     3060
accgcatcag cataa                                     3075

```

9.2 Massenspektrometrie

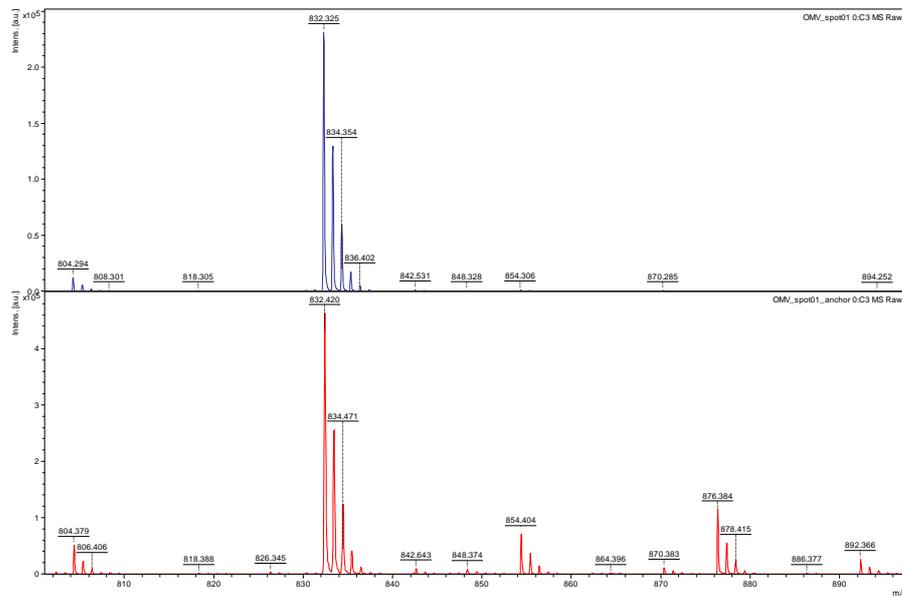


Abb. A1: Fragmentierte Massenspektren des Proteinspots 1. Probe wurde jeweils auf einem Probenträger aus nicht poliertem Stahlträger (oben) und auf einem Probenträger aus poliertem Stahl analysiert.

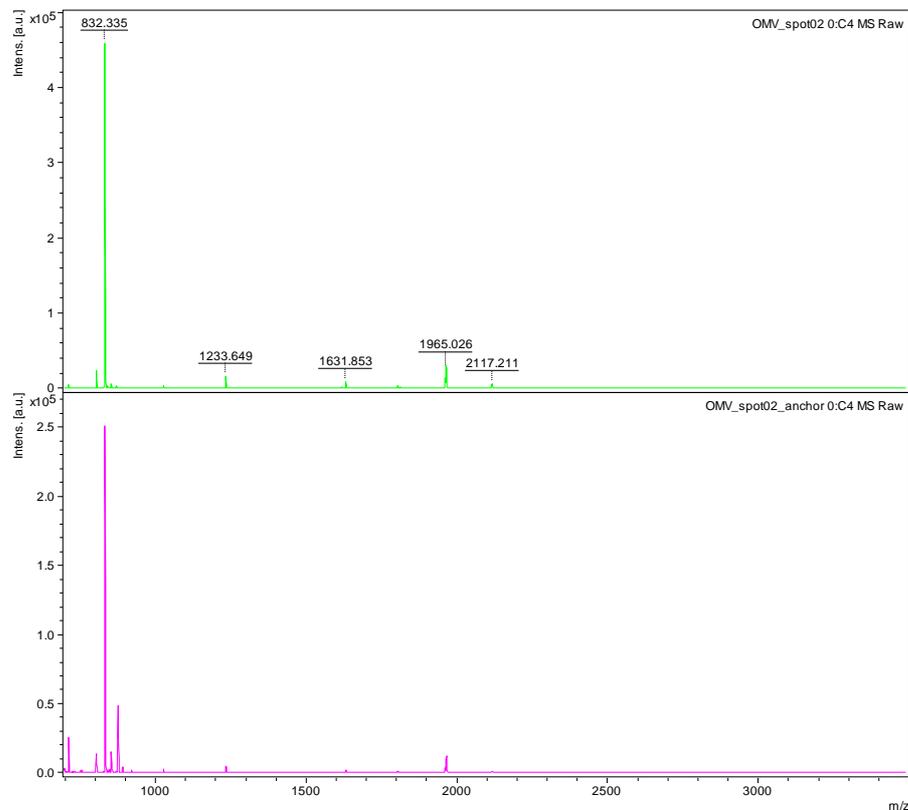


Abb. A2: Fragmentierte Massenspektren des Proteinspots 2. Probe wurde jeweils auf einem Probenträger aus nicht poliertem Stahlträger (oben) und auf einem Probenträger aus poliertem Stahl analysiert.

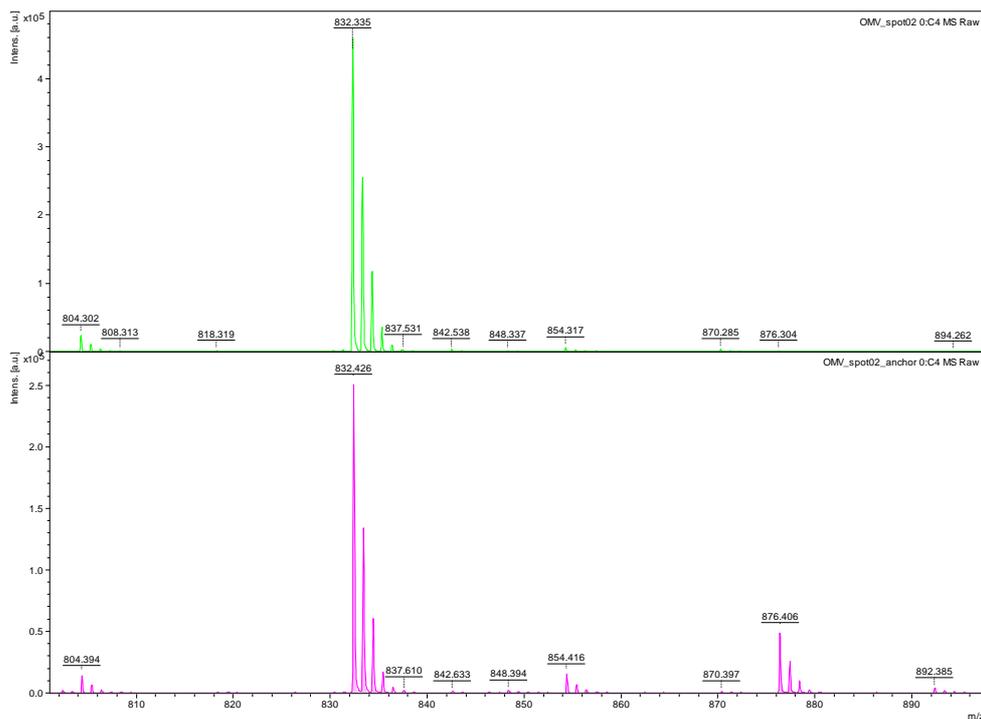


Abb. A3: Fragmentierte Massenspektren des Proteinspots 3. Probe wurde jeweils auf einem Proben-träger aus nicht poliertem Stahl-träger (oben) und auf einem Proben-träger aus poliertem Stahl analysiert.

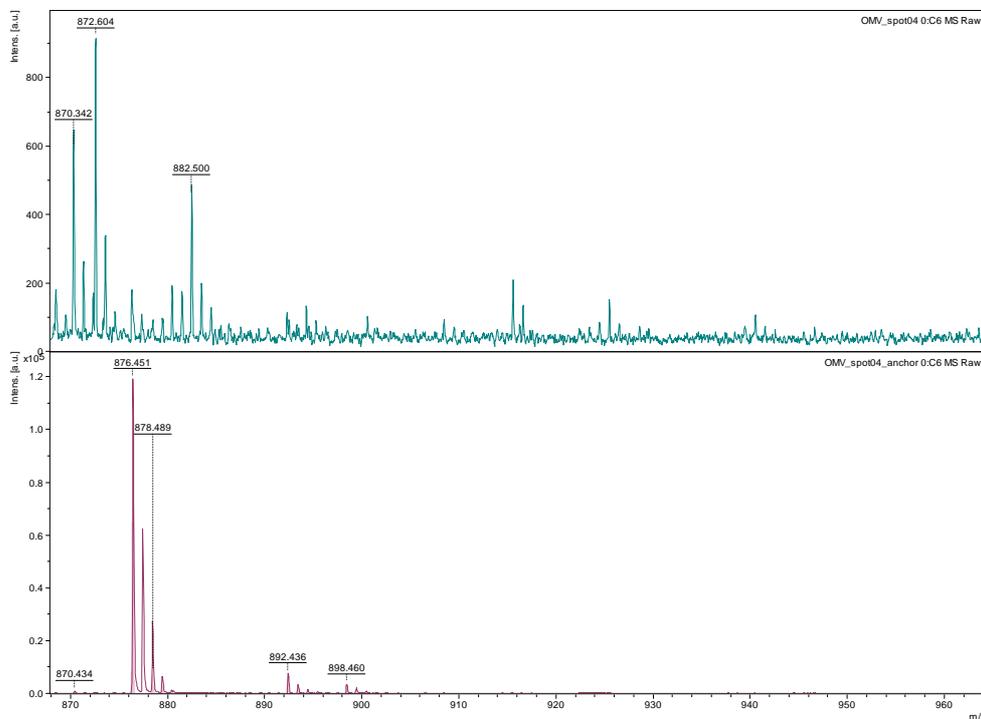


Abb. A4: Fragmentierte Massenspektren des Proteinspots 4. Probe wurde jeweils auf einem Proben-träger aus nicht poliertem Stahl-träger (oben) und auf einem Proben-träger aus poliertem Stahl analysiert.

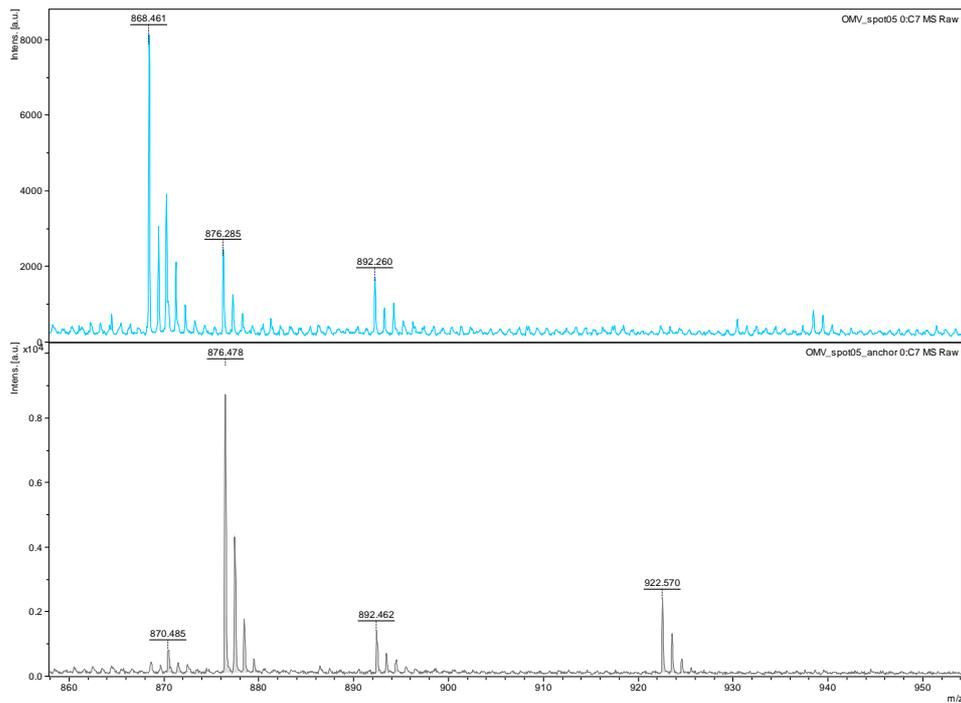


Abb. A5: Fragmentierte Massenspektren des Proteinspots 5. Probe wurde jeweils auf einem Proben­träger aus nicht poliertem Stahl­träger (oben) und auf einem Proben­träger aus poliertem Stahl analysiert.

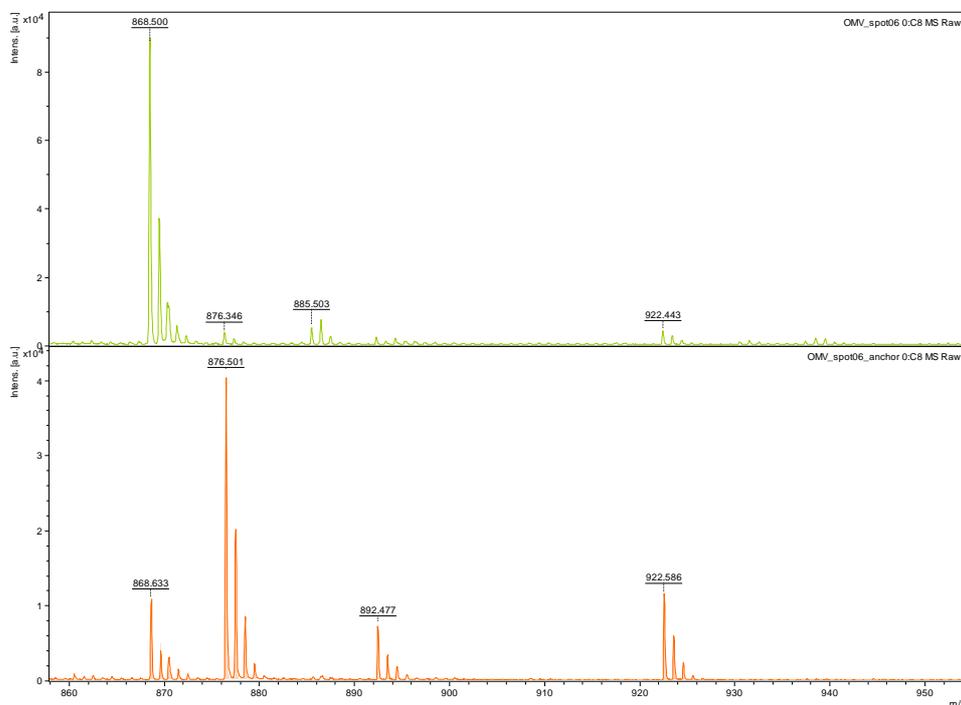


Abb. A6: Fragmentierte Massenspektren des Proteinspots 6. Probe wurde jeweils auf einem Proben­träger aus nicht poliertem Stahl­träger (oben) und auf einem Proben­träger aus poliertem Stahl analysiert.

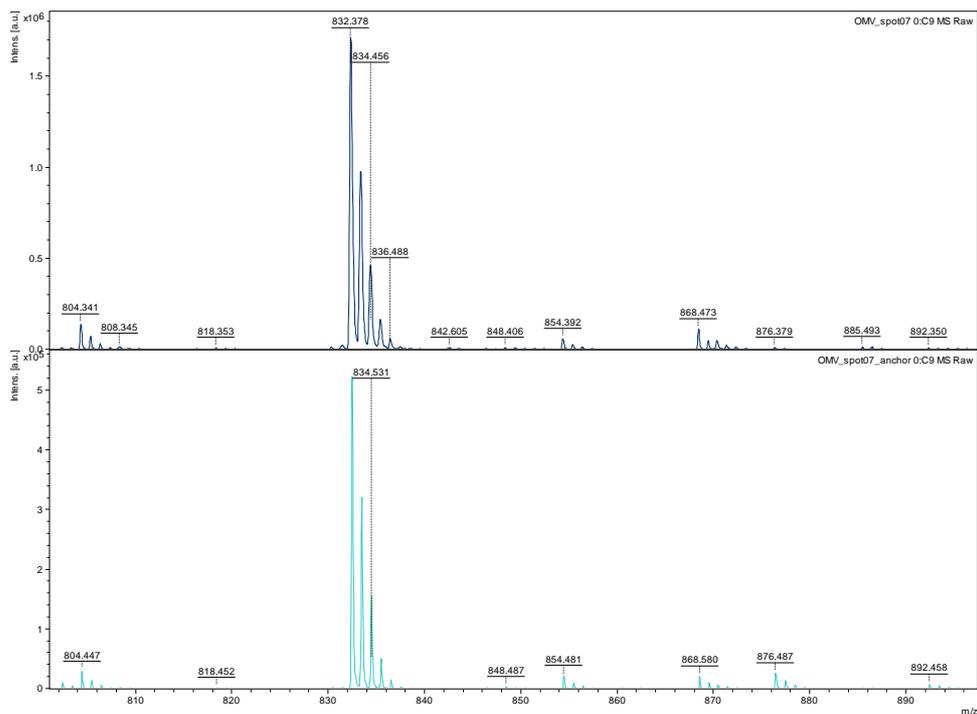


Abb. A7: Fragmentierte Massenspektren des Proteinspots 7. Probe wurde jeweils auf einem Probenträger aus nicht poliertem Stahlträger (oben) und auf einem Probenträger aus poliertem Stahl analysiert.

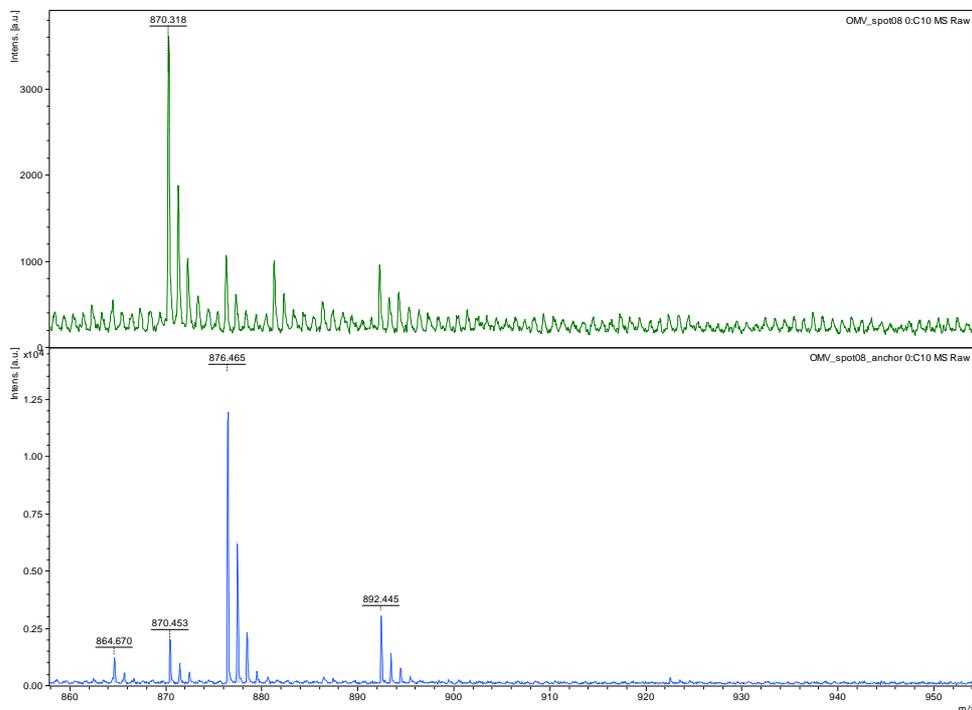


Abb. A8: Fragmentierte Massenspektren des Proteinspots 8. Probe wurde jeweils auf einem Probenträger aus nicht poliertem Stahlträger (oben) und auf einem Probenträger aus poliertem Stahl analysiert.

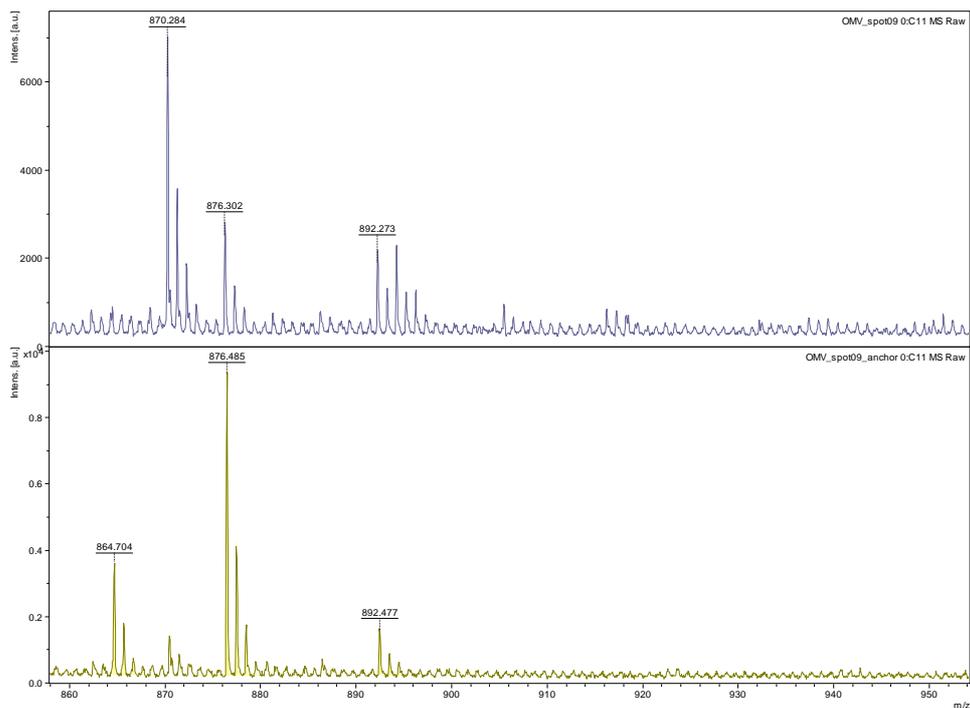


Abb. A9: Fragmentierte Massenspektren des Proteinspots 9. Probe wurde jeweils auf einem Probenträger aus nicht poliertem Stahlträger (oben) und auf einem Probenträger aus poliertem Stahl analysiert.

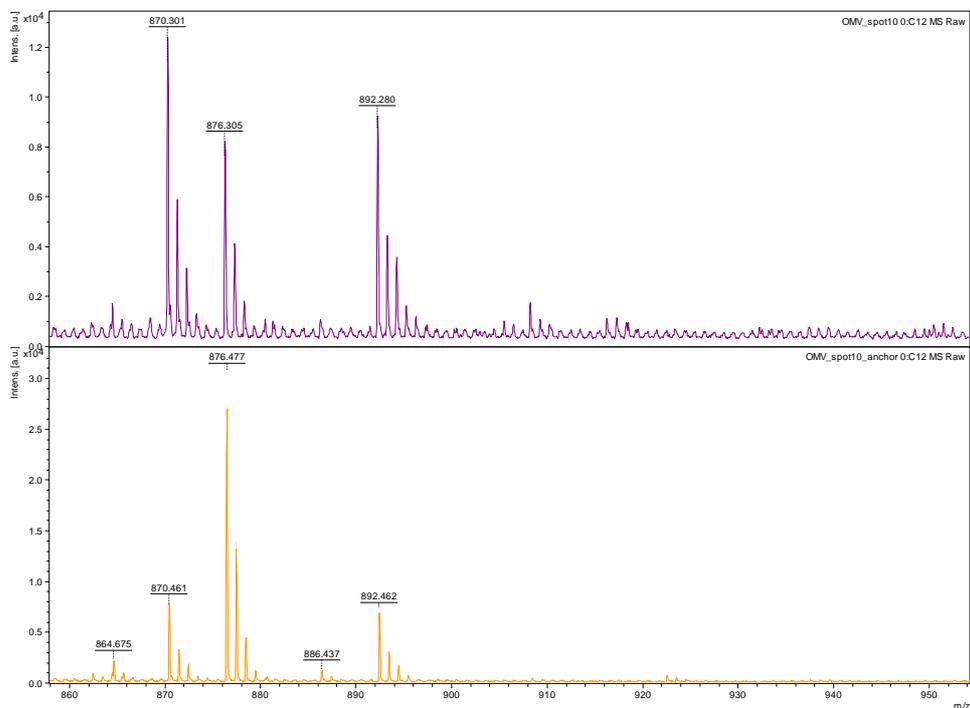


Abb. 10: Fragmentierte Massenspektren des Proteinspots 10. Probe wurde jeweils auf einem Probenträger aus nicht poliertem Stahlträger (oben) und auf einem Probenträger aus poliertem Stahl analysiert.

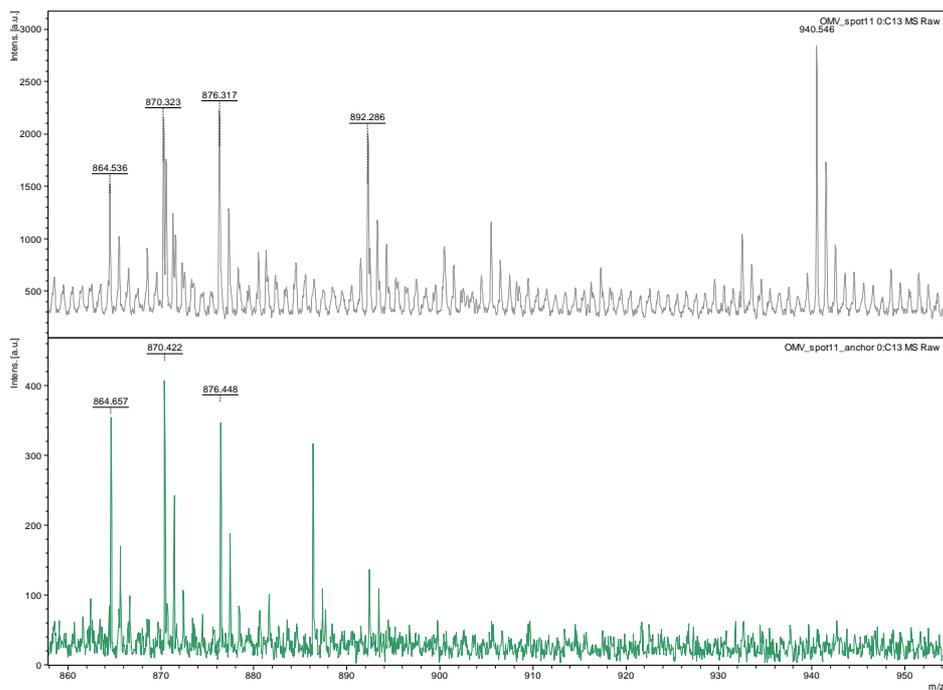


Abb. A11: Fragmentierte Massenspektren des Proteinspots 11. Probe wurde jeweils auf einem Probenträger aus nicht poliertem Stahlträger (oben) und auf einem Probenträger aus poliertem Stahl analysiert.

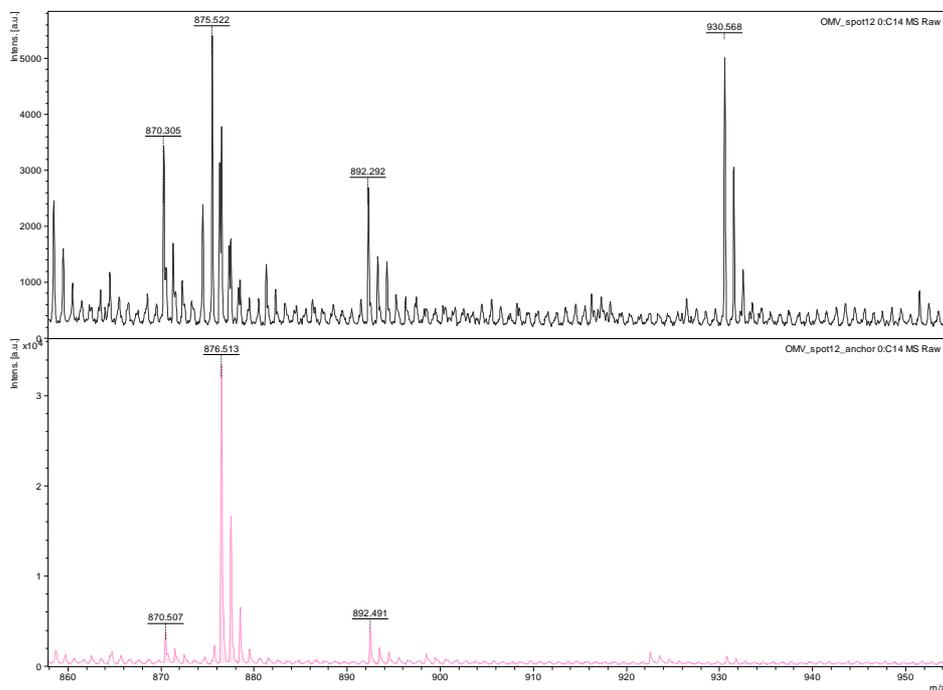


Abb. A12: Fragmentierte Massenspektren des Proteinspots 12. Probe wurde jeweils auf einem Probenträger aus nicht poliertem Stahlträger (oben) und auf einem Probenträger aus poliertem Stahl analysiert.

Tab. A1: Massen der identifizierten Peptide nach Trypsinverdau (Spot 1 – Spot 6).

Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 4	Spot 5	Spot 6
706,383		702,395		719,461	714,32
716,496	832,335	706,409	706,428	806,306	719,501
734,346	1233,649	724,862	724,986	832,319	734,433
756,312	1631,853	756,325	756,38	836,387	756,42
776,359	1965,026	776,433	784,21	851,359	789,334
806,406	2117,211	789,295	786,503	868,461	806,354
826,345		816,378	832,385	892,26	832,376
832,42		819,512	838,513	922,57	851,433
833,475		832,335	850,501	998,898	868,5
846,408		837,531	862,478	1003,349	885,503
864,396		851,375	864,494	1015,523	886,486
878,415		857,46	866,504	1045,586	892,477
886,377		894,262	872,604	1058,578	922,443
892,366		922,503	882,5	1088,552	998,981
898,381		930,475	892,436	1090,56	1002,402
922,496		1003,364	898,46	1179,611	1003,423
931,629		1027,617	1045,663	1205,568	1045,648
1002,331		1055,643	1055,579	1234,582	1053,641
1101,687		1156,559	1070,653	1249,56	1058,631
1156,55		1214,663	1157,709	1271,539	1088,61
1191,765		1218,599	1165,73	1275,579	1156,603
1462,956		1233,651	1222,779	1290,582	1187,597
1464,942		1246,627	1228,75	1296,628	1205,641
1483,758		1250,597	1236,752	1307,683	1234,609
1516,968		1325,795	1262,741	1348,694	1249,645
1518,937		1445,845	1280,77	1439,687	1275,647
1562,851		1617,836	1306,784	1475,758	1290,662
1584,972		1631,854	1378,898	1934,776	1296,718
1685,922		1659,882	1423,818	1940,931	1323,808
1729,733		1762,035	1451,853	2003,944	1348,779
1765,93		1797	1505,94	2219,035	1439,764
2052,291		1803,942	1640,978	2239,121	1567,814
2085,158		1812,99	1666,998	2383,958	1723,793
2107,305		1828,983	2232,385	2390,07	1847,937
2215,151		1946,994	2235,388	2691,281	1920,386
2249,329		1962,076	2254,556	2807,318	1934,879
2630,535		1965,021	2276,54	2921,366	1962,92
2658,289		1990,099	2376,411	2978,483	2004,042
2926,309		1993,034	2601,52	3155,405	2218,144
2947,617		2064,974	2629,541	3324,557	2354,198
		2117,216		3348,642	2356,232
		2778,314			2390,175
					2978,573
					3155,518
					3324,684

Tab. A2: Massen der identifizierten Peptide nach Trypsinverdau (Spot 7 – Spot 12)

Spot 7	Spot 8	Spot 9	Spot 10	Spot 11	Spot 12
705,474	717,422	709,358	706,493		
714,342	789,321	717,423	709,37	708,412	706,504
734,404	806,365	806,319	717,435	709,375	709,381
756,392	832,356	832,327	806,335	832,353	814,42
802,329	851,401	851,37	826,432	864,536	832,354
806,366	864,67	864,704	832,342	892,286	858,506
832,378	892,445	892,273	836,434	940,546	874,495
836,488	1003,402	894,262	851,39	1037,589	892,292
851,446	1045,597	1003,363	864,675	1045,62	930,568
868,473	1857,808	1045,59	886,437	1047,577	961,518
885,493	1898,938	1107,564	892,28	1090,589	1045,623
886,474	2239,158	1118,54	894,276	1107,594	1165,638
892,35	2263,96	1165,611	1045,61	1118,575	1179,661
894,344	2691,324	1179,626	1088,712	1165,643	1193,663
922,452	2724,279	1193,637	1107,585	1179,66	1234,717
1003,441	2748,346	1234,678	1118,561	1193,67	1307,733
1156,637	2807,347	1249,573	1165,632	1234,732	1320,656
1187,577	2825,29	1280,667	1179,645	1308,725	1365,71
1249,633	2978,513	1307,688	1193,654	1320,648	1401,778
1275,637	3348,684	1320,607	1234,699	1365,703	1475,815
1290,664		1339,708	1280,691	1423,77	1493,795
1295,717		1365,662	1307,713	1426,82	1638,918
1316,684		1378,727	1320,631	1458,807	1644,948
1319,684		1383,7	1339,732	1475,821	1707,839
1348,777		1423,692	1365,682	1493,801	1716,92
1374,792		1434,778	1423,72	1559,883	1725,973
1439,776		1452,71	1451,73	1608,766	1737,899
1567,79		1463,682	1463,707	1629,816	1753,979
1701,671		1475,774	1475,799	1636,812	1791,806
1722,921		1493,744	1493,772	1707,841	1799,911
1723,835		1640,829	1640,858	1791,802	1850,911
1962,909		1707,777	1707,804	1940,987	1878,923
2136,563		1716,854	1716,893	2083,08	1994,046
2337,215		1791,762	1791,798	2177,964	2239,208
2354,237		1806,805	1806,843	2229,092	2384,038
2356,205		1840,827	1840,853	2239,209	2549,355
2619,32		1847,917	1847,949	2384,054	2691,387
2637,313		1857,795	1857,825	2691,403	2807,436
2835,498		1873,803	1898,959	2724,356	
2978,646		1898,926	1914,952	2807,445	
		1914,914	1930,95	3367,727	
		1930,918	2204,935		
		2204,905	2239,179		
		2239,141	2263,991		
		2263,953	2279,99		
		2267,96	2292,022		
		2279,951	2295,994		
		2291,989	2384,009		
		2294,957	2601,363		
		2383,972	2691,36		
		2601,322	2807,387		
		2691,306	2825,289		
		2724,748	2978,553		
		2748,841	3117,546		
		2807,331			
		2825,245			
		2978,504			
		3117,491			

Tab. A3: Volumenverhältnisse der Proteinspots aus OMV für 536-Wildtyp (wt) und *surA*-Mutante; Vergleich zweier Experimente (Gele 1 und Gele2)

	Wt/ <i>surA</i> ; Ratio Gele 1	Wt/ <i>surA</i> ; Ratio Gele 2
Spot 1	3,492/1,193 ; 0,342	1,888/1,124 ; 0,595
Spot 2	0,474/6,104 ; 12,886	1,108/5,118 ; 4,620
Spot 3	0,098/0,385 ; 3,943	0/0,549 ; ∞
Spot 4	6,724/5,918 ; 0,880	10,138/6,236 ; 0,615
Spot 5	0,321/1,758 ; 5,473	-
Spot 6	9,099/6,533 ; 0,718	7,118/5,920 ; 0,832
Spot 7	13,193/7,963 ; 0,604	24,568/8,405 ; 0,342
Spot 8	0,110/0,212 ; 1,930	0/1,137 ; ∞
Spot 9	0,073/0,277 ; 3,808	0/0,479 ; ∞
Spot 10	1,967/1,893 ; 0,962	2,469/2,398 ; 0,972
Spot 11	0,893/0,904 ; 1,1012	-
Spot 12	0,084/1,243 ; 14,718	0/0,628 ; ∞

Tab. A4: Auflistung der Proteinvolumina der analysierten OMV-Spots vergleichend zwischen 536-Wildtyp und der *surA*-Mutante. Blaumarkierte Voluminaverhältnisse: Proteinmenge Wt > *surA*; orangemarkierte Voluminaverhältnisse: Proteinmengen *surA* > Wt; farbliche Abstufungen kennzeichnen die Stärke der Unterschiede. Die mittels MS analysierten Proteinpunkte sind in der Tabelle grün unterlegt.

Spot	Normierte Proteinvolumina des Wildtyps	Normierte Proteinvolumina der <i>surA</i> -Mutante	Verhältnis der Volumina xfach
	0,25899	0,01309	19,79
	4,03203	0,20763	19,42
	0,19473	0,01313	14,83
	0,19703	0,0154	12,79
	0,17949	0,02295	7,82
	5,52059	0,84366	6,54
	0,44821	0,06979	6,42
	0,30478	0,05503	5,54
	0,06847	0,01273	5,38
	0,14041	0,02697	5,21
	0,7115	0,15525	4,58
	0,58347	0,13248	4,40
	0,49364	0,11308	4,37
	0,4436	0,1035	4,29
	0,31098	0,08243	3,77
	2,17057	0,62908	3,45
	0,34032	0,10521	3,23
1	3,49208	1,19343	2,93

	0,41495	0,15301	2,71
	0,34238	0,12891	2,66
	1,09614	0,47187	2,32
	3,12062	1,3746	2,27
	0,46772	0,21137	2,21
	1,50667	0,73208	2,06
	0,91032	0,48256	1,89
	1,07097	0,57746	1,85
	0,83021	0,45626	1,82
	0,94394	0,53581	1,76
7	13,19278	7,96281	1,66
	0,94335	0,62007	1,52
6	9,09913	6,53344	1,40
	1,06877	0,77754	1,37
	1,18145	0,89801	1,32
	0,04832	0,03717	1,30
	0,0674	0,05478	1,23
	3,15318	2,57476	1,22
	0,20454	0,1692	1,21
	4,24273	3,62925	1,17
	0,29755	0,26065	1,14
4	6,72436	5,91772	1,14
	1,7762	1,5828	1,12
	2,39541	2,15796	1,11
	9,03123	8,55729	1,06
	1,10152	1,04823	1,05
	0,40679	0,39133	1,04
10	1,96718	1,89252	1,04
11	0,8934	0,90449	1,01241
	0,18698	0,21863	1,1693
	0,52244	0,69605	1,33231
	0,39006	0,53131	1,36212
	0,19105	0,27055	1,41609
	0,12891	0,1961	1,52115
	0,03456	0,05533	1,60101
	0,15022	0,25478	1,69601
	0,19618	0,34559	1,76156
	3,09027	5,46016	1,76689
	0,04878	0,08969	1,83856
	0,46401	0,86463	1,86339

8	0,10991	0,21208	1,92958
	0,04491	0,08816	1,96308
	0,11044	0,24904	2,25489
	0,42853	0,99703	2,32665
	0,04249	0,10385	2,44399
	0,31292	0,76495	2,44457
	0,01515	0,03747	2,47339
	0,24118	0,60415	2,50494
	0,14303	0,39308	2,74831
	0,15124	0,42041	2,77982
	0,02435	0,08327	3,4191
	0,13249	0,46331	3,49692
	0,0905	0,31832	3,51743
	0,0133	0,04896	3,6805
	0,32583	1,20793	3,70719
9	0,07271	0,27692	3,80834
	0,11631	0,44411	3,81828
3	0,09755	0,38465	3,94325
	0,20474	0,84976	4,15039
	0,28356	1,18378	4,17465
	0,00838	0,03564	4,25497
	0,01601	0,07247	4,5207
	0,02214	0,10129	4,57493
	0,08268	0,38476	4,65381
	0,14659	0,72002	4,91189
	0,03854	0,19502	5,05974
	0,06629	0,33644	5,07508
	0,03166	0,1706	5,38846
	0,1736	0,94702	5,4552
5	0,32117	1,75773	5,47299
	0,11605	0,65856	5,67464
	0,08076	0,46379	5,74306
	0,05334	0,31709	5,94461
	0,26281	1,58367	6,02598
	0,01245	0,07969	6,39855
	0,00581	0,03756	6,46257
	0,01114	0,07288	6,53997
	0,02199	0,14391	6,54357
	0,01725	0,11994	6,95246
	0,01066	0,07452	6,98777

	0,00886	0,06191	6,99023
	0,15583	1,11365	7,14652
	0,11146	0,80571	7,22874
	0,26288	1,9289	7,33753
	0,14334	1,06403	7,42306
	0,11522	0,90222	7,8302
	0,128	0,10943	8,54609
	0,0919	0,84613	9,20694
	0,00777	0,07625	9,81657
	0,03891	0,45831	11,77808
	0,05478	0,66175	12,08041
2	0,47364	6,10353	12,88647
	0,00828	0,10752	12,97942
	0,08972	1,1884	13,24505
12	0,08448	1,24346	14,71827
	0,04268	0,85409	20,01359
	0,0319	0,73983	23,19168
	0,01148	0,45943	40,03315