

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main  
Zentrum der Hygiene  
Institut für Medizinische Mikrobiologie  
Direktor: Prof. V. Brade

**Analyse der molekularen Struktur und der Verbreitung *clyA*-  
homologer Zytolysingene in bakteriellen Krankheitserregern aus  
der Familie der *Enterobacteriaceae***

**DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin des Fachbereichs Medizin der Johann Wolfgang  
Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von Valeska Simon  
aus Giessen

Frankfurt am Main 2006

**Dekan:** Prof. Dr. J. Pfeilschifter  
**Referent:** Priv.-Doz. Dr. A. Ludwig  
**Koreferent:** Prof. Dr. H.W. Dörr

**Tag der mündlichen Prüfung: 18.10.2006**

## Inhalt

I. Zusammenfassung.....	6
II. Einleitung.....	11
1. Infektionskrankheiten und Bakterien.....	11
2. Enterobacteriaceae.....	13
2.1. Eigenschaften der in dieser Arbeit beschriebenen Enterobacteriaceae.....	13
2.1.1. Salmonella.....	13
2.1.2. Shigella.....	14
2.1.3. Escherichia.....	14
2.1.4. Citrobacter.....	15
2.1.5. Klebsiella.....	15
2.1.6. Enterobacter.....	16
2.1.7. Yersinia.....	16
2.1.8. Serratia.....	16
2.1.9. Proteus.....	17
2.1.10. Morganella.....	17
2.1.11. Hafnia.....	17
2.2. Verwandtschaftsverhältnisse der Enterobacteriaceae.....	18
3. Bakterientoxine.....	18
3.1. Verschiedene Familien porenbildender Zytolysine.....	20
4. Zytolysin A (ClyA).....	23
4.1. Eigenschaften und Struktur von ClyA.....	23
4.2. Vorkommen des clyA-Gens.....	25
4.3. Pathogenität und Wirkungsmechanismus von ClyA.....	26
4.4. Regulationsmechanismen von clyA.....	26
5. Zielsetzung dieser Arbeit.....	28
III. Material und Methoden.....	29
1. Material.....	29
1.1. Bakterienstämme.....	29
1.2. Plasmide.....	30
1.3. Oligonukleotidprimer.....	30
1.3.1. Primer, die von clyA von E. coli K-12 bzw. den flankierenden DNA-Sequenzen abgeleitet wurden.....	30
1.3.2. Primer, die von clyA von S. enterica Serovar Paratyphi A ATCC 9150 bzw. den flankierenden DNA-Sequenzen abgeleitet wurden.....	34
1.3.3. Sonstige Primer.....	36
1.4. Technische Geräte.....	36
1.5. Verbrauchsmaterial.....	37
1.6. Chemikalien.....	37
1.7. Stammlösungen.....	38
1.8. Antibiotika.....	38
1.9. Medien und Agarplatten für die Anzucht und Kultivierung von Bakterien.....	38
1.10. DNA-Polymerasen für die PCR.....	40
1.11. Restriktionsenzyme.....	40
1.12. Andere Enzyme.....	41
1.13. Material für die Isolierung von chromosomaler DNA.....	41
1.14. Material für die Isolierung von Plasmid-DNA.....	42

1.15. Material für die Agarosegelelektrophorese und für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	42
1.16. Material für Southern Blot-Analysen.....	43
1.17. Kommerzielle Kits und Systeme.....	46
2. Methoden.....	47
2.1. Anzucht und Kultivierung der Bakterien.....	47
2.2. Identifizierung bzw. Verifizierung von Bakterienspecies.....	47
2.3. Herstellen von Bakterienlysaten.....	48
2.4. Isolierung der chromosomalen DNA von Bakterien.....	48
2.5. Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli.....	48
2.6. PCR.....	49
2.6.1. Prinzip der PCR.....	49
2.6.2. Durchführung der PCR.....	50
2.7. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen.....	51
2.8. Reinigung und Konzentrierung von DNA.....	52
2.8.1. Phenol/Chloroform-Extraktion und Präzipitation der DNA mit Ethanol.....	52
2.8.2. DNA-Filtration durch eine Silicagel-Membran (QIAquick PCR Purification Kit bzw. MinElute Reaction Cleanup Kit [Qiagen]).....	52
2.9. Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarosegelelektrophorese.....	53
2.10. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	53
2.11. Bestimmung der DNA-Konzentration.....	54
2.12. Klonierung von DNA-Fragmenten.....	54
2.12.1. Vorbereitung von Vektor und Insertfragment.....	54
2.12.2. Ligation.....	55
2.12.3. Herstellung kompetenter Zellen von E. coli DH5 $\alpha$ .....	56
2.12.4. Transformation.....	56
2.12.5. Selektion der transformierten E. coli-Zellen durch Antibiotikaresistenz.....	57
2.12.6. Selektion mit IPTG und X-Gal (blau/weiß-Selektion).....	57
2.13. Einführung von Plasmiden in Bakterien durch Elektroporation.....	58
2.13.1. Herstellung elektrokompenter Zellen.....	58
2.13.2. Durchführung der Elektroporation.....	58
2.14. Inverse PCR.....	59
2.14.1. Prinzip der Inversen PCR.....	59
2.14.2. Durchführung der Inversen PCR.....	60
2.15. DNA-Sequenzierung.....	61
2.16. Southern Blot.....	62
2.16.1. Southern Blot-Variante mit DNA-Transfer bei pH 7,0.....	62
2.16.2. Southern Blot-Variante mit alkalischem Transferpuffer.....	64
2.16.3. Southern Blot-Variante mit Pufferreservoir.....	65
IV. Ergebnisse.....	66
1. Charakterisierung des clyA-Gens eines Salmonella enterica Serovar Paratyphi A-Stammes.....	66
1.1. Isolierung und Sequenzierung des clyA-Gens von S. enterica Serovar Paratyphi A FR1/99.....	66
1.2. Vergleich von clyAS.enterica Serovar ParatyphiA FR1/99 mit clyAE.coli K-12.....	67
1.3. Eingrenzung der Promotorregion des clyA-Gens von S. enterica Serovar ParatyphiA.....	69
2. Charakterisierung des clyA-Gens eines Shigella sonnei-Stammes.....	73
2.1. PCR-Analyse von Sh. sonnei ST2757/01 und Sh. sonnei ST3135/01.....	73
2.2. Isolierung und Sequenzierung des clyA-Gens von Sh. sonnei ST2757/01.....	75

2.2.1. Isolierung und Sequenzierung der zentralen und 3'-terminalen Region von clyA <sub>Sh.sonnei</sub> ST2757/01 (Nachweis einer IS1-Insertion im clyA-Gen).....	75
2.2.2. PCR-Analysen zur Identifikation des 5'-Endes von clyA <sub>Sh.sonnei</sub> ST2757/01	76
2.2.3. Isolierung und Sequenzierung der 5'-terminalen Region von clyA <sub>Sh.sonnei</sub> ST2757/01 (Nachweis einer zweiten IS1-Insertion im clyA-Gen).....	77
2.2.4. Nukleotidsequenz des durch zwei IS1-Insertionen zerstörten clyA-Gens von Sh. sonnei ST2757/01.....	81
2.2.5. Das Insertionselement IS1 in clyA <sub>Sh.sonnei</sub> ST2757/01.....	83
2.3. Vergleich von clyA <sub>Sh.sonnei</sub> ST2757/01 mit clyA <sub>E.coli</sub> K-12 und mit clyA von anderen Shigella-Stämmen.....	84
2.3.1. Vergleich von clyA <sub>Sh.sonnei</sub> ST2757/01 mit clyA <sub>E.coli</sub> K-12.....	84
2.3.2. Vergleich von clyA <sub>Sh.sonnei</sub> ST2757/01 mit clyA <sub>Sh. sonnei</sub> ST3112/01 .....	85
2.3.3. Vergleich von clyA <sub>Sh.sonnei</sub> ST2757/01 mit clyA <sub>Sh.dysenteriae</sub> 60R .....	85
2.3.4. Vergleich von clyA <sub>Sh.sonnei</sub> ST2757/01 mit clyA <sub>Sh.flexneri</sub> M90T .....	85
3. Untersuchung der Verbreitung des clyA-Gens innerhalb der Familie der Enterobacteriaceae.....	88
3.1. PCR-Analyse von Bakterien verschiedener Gattungen und Species aus der Familie der Enterobacteriaceae.....	88
3.2. Weitere Analyse des M. morganii-Stammes FR301.....	90
3.3. Weitere Analyse des S. marcescens-Stammes MSD-6.....	91
3.4. Southern Blot-Analyse von Bakterien verschiedener Gattungen und Species aus der Familie der Enterobacteriaceae.....	93
3.5. Untersuchung von Klebsiella spp.....	95
3.5.1. PCR-Analyse von Klebsiella spp.....	95
3.5.2. Southern Blot-Analyse von Klebsiella spp.....	96
3.6. Untersuchung von Citrobacter spp.....	97
3.6.1. PCR-Analyse von Citrobacter spp.....	97
3.6.2. Southern Blot-Analyse von Citrobacter spp.....	98
3.6.3. Analyse weiterer Citrobacter-Stämme.....	98
V. Diskussion.....	101
Anhang.....	105
Anhang 1: Sequenz von clyA <sub>E.coli</sub> K-12 mit flankierender Sequenz.....	105
Anhang 2: Vergleich von clyA <sub>E.coli</sub> K-12. mit den clyA-Genen von Sh. sonnei-, Sh. flexneri-, und Sh. dysenteriae-Stämmen.....	107
Anhang 3: Legende für alle abgebildeten Gensequenzen.....	108
Literaturverzeichnis.....	110
Abkürzungen.....	116
Lebenslauf.....	119
Eidesstattliche Erklärung.....	120
Danksagung.....	121

## **I. Zusammenfassung**

Zytolysin A (ClyA) von *Escherichia coli* ist der Prototyp einer neuartigen Familie von bakteriellen porenbildenden Zytolysinen. Es handelt sich bei diesem Toxin um ein Protein von 34 kDa, das hämolytische und zytotoxische Aktivität aufweist und das in Zellmembranen stabile Poren bildet, indem es sich zu ringförmigen ClyA-Oligomeren zusammenlagert. Das Strukturgen des ClyA-Proteins, *clyA*, wurde ursprünglich im Chromosom des *E. coli*-Laborstammes K-12 identifiziert, später wurde es aber auch im Genom von vielen *E. coli*-Stämmen gefunden, die intestinale Infektionen beim Menschen verursachen (insbesondere in enteroinvasiven, Shigatoxin-produzierenden, enteroaggregativen und enterotoxischen *E. coli*-Stämmen). Die Expression des *clyA*-Gens unterliegt einer komplexen Regulation; unter normalen in vitro-Kulturbedingungen ist das *clyA*-Gen in *E. coli* stark reprimiert.

In mehreren *Salmonella enterica* Serovar Typhi-Stämmen und in einem *S. enterica* Serovar Paratyphi A-Stamm (ATCC 9150) wurden kürzlich funktionale (intakte) *clyA*-homologe Gene gefunden, deren Proteinprodukte 90-91% Aminosäuresequenzidentität zu ClyA von *E. coli* aufweisen. Im Genom eines aviären (vogelpathogenen) *E. coli*-Stammes wurde ein intaktes *clyA*-homologes Hämolyysin identifiziert, dessen Proteinprodukt ca. 75% Identität zu ClyA von *E. coli* K-12 und anderen *E. coli*-Stämmen zeigt. Auch in mehreren *Shigella flexneri*-Stämmen sowie in einem *Shigella sonnei*- und einem *Shigella dysenteriae*-Stamm wurden *clyA*-homologe DNA-Sequenzen nachgewiesen. Alle bisher untersuchten *Shigella*-Stämme enthalten jedoch nur ein defektes *clyA*-Gen: in den untersuchten *Sh. flexneri*-Stämmen weist das *clyA*-Gen eine identische 11 bp-Deletion auf, welche aufgrund der entsprechenden Leserasterverschiebung zu einem vorzeitigen Abbruch der kodierenden Sequenz führt; in dem untersuchten *Sh. sonnei*-Stamm ST3112/01 ist das *clyA*-Gen durch ein Insertionselement (IS1 von *Sh. sonnei*) unterbrochen; und in dem untersuchten *Sh. dysenteriae*-Stamm ist ein großer Teil des *clyA*-Gens deletiert und durch ein IS-Element (iso-IS1 von *Sh. dysenteriae*) ersetzt.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden zwei weitere *Sh. sonnei*-Stämme, ein weiterer *S. enterica* Serovar Paratyphi A-Stamm sowie verschiedene andere Bakterien aus der Familie der *Enterobacteriaceae* hinsichtlich des Vorhandenseins von *clyA* bzw. von *clyA*-homologen DNA-Sequenzen untersucht. Aus den beiden *Sh. sonnei*-Stämmen ST2757/01 und ST3135/01 und aus dem *S. enterica* Serovar Paratyphi A-Stamm FR1/99 konnten durch PCR *clyA*-

## Zusammenfassung

spezifische DNA-Fragmente amplifiziert werden. Die Sequenzierung des *clyA*-spezifischen PCR-Produktes von *S. enterica* Serovar Paratyphi A FR1/99 zeigte, dass dieser Stamm ein intaktes *clyA*-Gen enthält, welches einschließlich der flankierenden DNA-Sequenzen 100% Nukleotidsequenzidentität zum *clyA*-Gen des Serovar Paratyphi A-Stammes ATCC 9150 aufweist. Um die Promotorregion dieses *clyA*-Gens (*clyA*<sub>S. enterica</sub> Serovar ParatyphiA) einzugrenzen, wurde es mit unterschiedlich langen 5'-flankierenden DNA-Sequenzen amplifiziert und in den Plasmidvektor pUC18 kloniert. Plasmidkonstrukte, die stromaufwärts vom *clyA*<sub>S. enterica</sub> Serovar ParatyphiA-Gen die ersten 102 bzw. 128 5'-flankierenden Basenpaare enthielten, führten nach Transformation in einen *E. coli*-Laborstamm (*E. coli* K-12-Derivat DH5 $\alpha$ ) zu einem ähnlich starken hämolytischen Phänotyp, während ein isogenes Plasmidkonstrukt mit 471 bp 5'-flankierender DNA-Sequenz deutlich schwächere hämolytische Aktivität vermittelte. Innerhalb der ersten 102 bp stromaufwärts vom *clyA*<sub>S. enterica</sub> Serovar ParatyphiA -Startcodon scheinen demnach regulatorische Sequenzen zu liegen, die die Expression dieses Gens gestatten, während DNA-Sequenzen, die mehr als 128 bp vor dem ATG-Startcodon liegen, die Expression anscheinend eher behindern.

Die von *Sh. sonnei* ST2757/01 und *Sh. sonnei* ST3135/01 erhaltenen *clyA*-spezifischen PCR-Produkte zeigten identische Größen; es wurde deshalb nur mit einem der beiden Stämme (ST2757/01) weitergearbeitet. Eine DNA-Sequenzanalyse ergab, dass *Sh. sonnei* ST2757/01 ein *clyA*-Gen enthält, welches an zwei Stellen (zwischen Nukleotidposition 80 und 81 und zwischen Nukleotidposition 354 und 355 von *clyA*) durch IS1 von *Sh. sonnei* unterbrochen ist. Die hintere der beiden IS1-Insertionen war dabei identisch mit der IS1-Insertion, die im *clyA*-Gen des bereits früher untersuchten *Sh. sonnei*-Stammes (ST3112/01) nachgewiesen worden war.

Aus Stämmen der Species *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter amalonaticus*, *Citrobacter gilleni*, *Citrobacter murlinae*, *Citrobacter braakii*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Hafnia alvei*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus mirabilis* und *Morganella morganii* konnten durch PCR keine *clyA*-homologen DNA-Sequenzen amplifiziert werden. Da auch in Southern Blot-Analysen mit einer *clyA*-spezifischen, 712 bp großen Gensonde keiner dieser Stämme eine signifikant positive Reaktion zeigte, wurde gefolgert, dass diese Stämme kein *clyA*-Gen und keine *clyA*-ähnlichen Sequenzen besitzen. Es spricht somit einiges dafür, dass das

## Zusammenfassung

Zytolysingen *clyA* innerhalb der Familie der *Enterobacteriaceae* nur in den Gattungen *Escherichia*, *Salmonella* und *Shigella* vorkommt.



## Summary

Cytolysin A (ClyA) of *Escherichia coli* is a novel cytolysin with little apparent resemblance to previously characterized cytolysins. It is the prototype of a new family of pore-forming bacterial toxins. ClyA is a hemolytic and cytotoxic 34 kDa protein which forms stable pores in cell membranes by assembling to ring-shaped oligomers. The gene encoding the ClyA protein, *clyA*, was first identified in *E. coli* K-12, a laboratory strain. Later, it was also found in many *E. coli* strains causing intestinal infections in humans (particularly in enteroinvasive, Shiga toxin-producing, enteroaggregative and enterotoxic *E. coli* strains). The expression of *clyA* is controlled by a complex regulation system; under normal laboratory conditions the gene is strongly repressed.

Recently, *clyA* homologues were identified in several *Salmonella enterica* serovar Typhi strains and in an *S. enterica* serovar Paratyphi A strain (strain ATCC 9150). The ClyA proteins encoded by these *clyA* homologues show 90-91% identity in amino acid sequence to ClyA of *E. coli*. In the genome of an avian *E. coli* strain, an intact *clyA* gene was found whose protein product is 75% identical in amino acid sequence to *E. coli* ClyA. Furthermore, *clyA*-homologous genes were identified in *Shigella* strains. However, in all *Shigella* strains analyzed so far, *clyA* is obviously nonfunctional: in several tested *S. flexneri* strains, *clyA* shows an 11-bp deletion leading to a frameshift with premature truncation of the gene sequence; in a tested *Sh. sonnei* strain, *clyA* is interrupted by an insertion sequence (IS1 of *Sh. sonnei*); and in a tested *Sh. dysenteriae* strain, a large part of *clyA* is deleted and replaced by an insertion sequence (iso-IS1 of *Sh. dysenteriae*).

In this work, two additional *Sh. sonnei* strains, another *S. enterica* serovar Paratyphi A strain and several other bacteria belonging to the *Enterobacteriaceae* were examined with regard to the presence and integrity of the *clyA*-gene or of *clyA*-homologous DNA-sequences.

From the *Sh. sonnei* strains (ST2757/01 and ST3135/01) and from *S. enterica* serovar Paratyphi A strain FR1/99 *clyA*-homologous sequences could be amplified by PCR.

Sequencing of the PCR product obtained from *S. enterica* serovar Paratyphi A FR1/99 showed that this strain harbors an intact *clyA* gene which is 100% identical in nucleotide sequence to *clyA* of *S. enterica* serovar Paratyphi A ATCC 9150.

To identify the promoter region of this *clyA* gene, it was amplified with different long fragments of the 5'-flanking DNA-sequence and cloned into the plasmid vector pUC18. Plasmid constructs containing the first 102 and 128 basepairs, respectively, upstream from *clyA* of *S. enterica* serovar Paratyphi A caused a similar hemolytic phenotype when transformed into the *E. coli* laboratory strain DH5 $\alpha$ , while an isogenic plasmid construct containing 471 bp of the 5'-flanking DNA sequence caused only weaker hemolytic activity. Thus, regulatory sequences permitting gene expression appear to be present within the first 102 bp upstream from *clyA* of *S. enterica* serovar Paratyphi A, while DNA sequences located more than 128 bp upstream from the *clyA* startcodon obviously inhibit gene expression.

The *clyA*-specific PCR products obtained from *Sh. sonnei* ST2757/01 and *Sh. sonnei* ST3135/01 were identical in size. Therefore, only one of these strains (ST2757/01) was further studied. DNA sequence analyses showed that *Sh. sonnei* ST2757/01 harbors a *clyA* gene which is interrupted twice by IS1 of *Sh. sonnei* (between nucleotide position 80 and 81 and between position 354 and 355 of *clyA*). The IS1 insertion at nucleotide position 354-355 proved to be identical to the single IS1 insertion that was previously found in the *clyA* gene of another *Sh. sonnei* (strain ST3112/01).

From strains of the species *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter amalonaticus*, *Citrobacter gillenii*, *Citrobacter murlinae*, *Citrobacter braakii*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Hafnia alvei*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii*, no *clyA*-homologous DNA sequences could be amplified by PCR. Furthermore, in Southern blot analyses conducted with a 712-bp *clyA* gene probe, none of these strains showed a significant positive reactivity. It can therefore be concluded that these strains do not harbor *clyA*-related DNA sequences. Thus, one may speculate that the cytolysin gene *clyA* is only found in *Escherichia*, *Salmonella* and *Shigella* species.

## **II. Einleitung**

### **1. Infektionskrankheiten und Bakterien**

Infektionskrankheiten, verursacht durch mikrobielle Erreger, sind der Menschheit schon seit Jahrtausenden phänomenologisch bekannt.

Bakterien sind Prokaryonten, d.h. einzellige Lebewesen, die RNA und DNA enthalten und selbst stoffwechselaktiv sind. Haut, Mundhöhle und Gastrointestinaltrakt des Menschen sind natürlicherweise mit Bakterien besiedelt. Die durchschnittliche Größe eines Bakteriums liegt bei ca. 0,5 bis 5µm. Ein Zellkern im engeren Sinne existiert nicht, lediglich ein Kernäquivalent (Nukleoid). Ihr gesamtes Genom ist i.d.R. auf einem ringförmigen geschlossenen Chromosom gespeichert. Es ist frei von Histonen und liegt im Zytoplasma. Die Erbinformationen liegen als doppelsträngige, stark aufspiralisierte DNA vor. Das Genom enthält etwa 1000 Strukturgene, des weiteren Funktionseinheiten (Operons) mit Promotoren und Repressorstrukturen. Hierbei kann ein Promotor mehrere Gene kontrollieren, die somit polycistronisch abgelesen werden. Die Strukturgene kommen mit wenigen Ausnahmen singular vor. Introns existieren nicht, somit entfällt bei Bakterien auch das Splicing der mRNA. Codiert wird die Erbinformation wie beim Menschen in Form von Triplets, meist sind die Codons mit denen der Eukaryonten identisch.

Weiterhin kann genetische Information auf Plasmiden, also ringförmigen, geschlossenen DNA-Molekülen, gespeichert sein. Plasmide tragen meist Eigenschaften wie Antibiotika-Resistenzen und Virulenzfaktoren.

Die Vermehrung von Bakterien erfolgt durch Querteilung nach Verdopplung der chromosomalen DNA.

Bakterien sind von einer relativ starren, widerstandsfähigen Zellwand umgeben. Diese besteht aus Ketten aus N-Acetylglucosamin und Acetylmuraminsäure, welche über kurze Peptide miteinander verknüpft sind. Diese Mureinstruktur kommt nur bei Bakterien vor und stellt einen Angriffspunkt für Antibiotika dar. Die Zellwand entscheidet über die Anfärbarkeit eines Bakteriums bei der Gram-Färbung<sup>1</sup>. Grampositive Bakterien haben eine dicke Zellwand aus mehreren Mureinschichten (30-80 nm), die von der Zellmembran nur

<sup>1</sup> Gramfärbung (C. Gram, 1884): Anfärbung mit Karbolgentianaviolett, anschließend Behandlung der Zellen mit Lugolscher Lösung (Jod-Jodkali-Lösung): die Zellwand färbt sich blau. Diese Färbung lässt sich bei grampositiven Bakterien nicht mit Alkohol auswaschen, wohl aber bei gramnegativen Bakterien. Diese erscheinen nach Gegenfärbung mit Fuchsin rot. Nicht alle Bakterien lassen sich in grampositiv oder -negativ einteilen.

## Einleitung

durch einen schmalen periplasmatischen Spalt getrennt ist. Neben den oben genannten Substanzen finden sich Teichonsäuren, Teichuronsäuren und Lipoteichonsäuren. Diese Strukturen begünstigen die Adhäsion der Bakterienzelle an Wirtszellen und wirken im menschlichen Organismus als Pyrogene.

Gramnegative Bakterien haben eine dünnere Zellwand (15-20 nm). Diese ist aber komplexer aufgebaut und besteht aus nur wenigen Mureinschichten, die in ihrem Aufbau der der grampositiven Bakterien entspricht. Das Mureingerüst ist über Proteine mit einer äußeren Membran verbunden. Diese äußere Membran ist eine Lipiddoppelschicht, durch die hydrophile Substanzen wie z.B. Proteine die Bakterienzelle nicht verlassen können. Sie akkumulieren im periplasmatischen Spalt, welcher breiter ist als bei grampositiven Bakterien. Der periplasmatische Spalt enthält das Periplasma, eine gelartige Matrix [8]. Der selektive Stoffaustausch zwischen Periplasma und extrazellulärem Medium wird durch Membranproteinkanäle reguliert (Porine, OMP). Diese Membrankanäle wirken im menschlichen Organismus als Antigene. In der äußeren Membran befinden sich Proteine, Lipoproteine und das Lipopolysaccharid (LPS), welches vor allem durch seinen Lipidanteil (Lipid A) toxisch wirkt. Als Endotoxin wird es beim Zerfall der Bakterienzelle frei und kann so den Wirtsorganismus schädigen. Unmittelbar an in der äußeren Membran integrierten Lipid A hängt das sogenannte Core-Teil, welches das Lipid A mit einer Oligosaccharidkette (O-Kette, O-Antigen) verbindet. Diese Oligosaccharidkette wird für Typisierungen herangezogen. Die O-Antigene sind von Bakterienart zu Bakterienart unterschiedlich aufgebaut. Auch innerhalb einer Art können sie sich unterscheiden und liefern so verschiedene Serovare. Je länger diese Kette, desto schleimiger erscheint die Bakterienkolonie und desto pathogener ist sie. Insgesamt sind die Wände gramnegativer Bakterien sehr widerstandsfähig gegen Druck, hohe Temperaturen und pH-Änderungen [8]. Fakultativ können Bakterien von einer polysaccharidhaltigen Kapsel umgeben sein. Sie bietet dem Bakterium Schutz vor Austrocknung, Opsonierung oder vor Phagozytose durch Makrophagen. Dadurch sind bekapselte Bakterien virulenter als unbekapselte. Bekapselte Stämme erscheinen auf Agarplatten als glatte Kolonien. Innerhalb mancher Bakterienarten lassen sich Kapselserovare unterscheiden.

Bakterien lassen sich außerdem noch nach vielen anderen Kriterien klassifizieren, z.B. Stoffwechselverhalten, Bedingungen der Anzuchtbarkeit, Form, Beweglichkeit, Sporenbildung oder aufgrund von genetischen Merkmalen.

Aufgrund von Gemeinsamkeiten in den oben genannten Punkten kann man Bakterien in Gruppen, Familien, Gattungen und Arten einteilen.

## **2. *Enterobacteriaceae***

*Enterobacteriaceae* sind gramnegative, also endotoxinbildende, fakultativ anaerobe, teilweise bewegliche, nichtsporenbildende Stäbchenbakterien. Sie fermentieren Glucose und reduzieren Nitrate. Alle Arten der Familie sind weltweit verbreitet. Als Gemeinsamkeit besitzen sie ein gemeinsames Antigen, das *Enterobacteriaceae*-common-Antigen.

*Enterobacteriaceae* sind häufige Erreger nosokomialer Infektionen. Nosokomiale Infektionen sind Infekte, welche im Krankenhaus erworben werden und die ab dem 3. Tag des Krankenhausaufenthaltes auftreten. Heute sind Harnwegsinfekte die häufigsten nosokomialen Infektionen. Intestinale Infektionen durch einige *Enterobacteriaceae* führen zu Enteritiden mit Diarrhoen und Koliken mit Flüssigkeits- und Elektrolytverlusten. Weiterhin können *Enterobacteriaceae* Auslöser von extraintestinalen Infektionen sein. Die Differenzierung der *Enterobacteriaceae* erfolgt aufgrund unterschiedlicher biochemischer Stoffwechselleistungen mittels der „bunten Reihe“.

### **2.1. Eigenschaften der in dieser Arbeit beschriebenen *Enterobacteriaceae***

#### **2.1.1. *Salmonella***

Die Gattung *Salmonella* besteht aus ca. 2000 Serovaren, die serologisch nach dem Antigenmuster der Oberfläche, der Geißeln und der Kapsel unterschieden werden und im Kauffmann-White-Schema aufgelistet sind. Aufgrund von 9 verschiedenen Oberflächenantigenen lassen sich die Gruppen A-I unterscheiden. In Deutschland am häufigsten isolierte enteritische Salmonellen sind *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis, gefolgt von *S. enterica* Serovar Typhimurium. Diese Serovare verursachen Enteritiden, die asymptomatisch bis schwer verlaufen können. Oft verläuft die Erkrankung selbstlimitierend. Bei immungeschwächten Personen können auch extraintestinale Infektionen auftreten. Der Nachweis von enteritischen Salmonellen ist nach IfSG §7 meldepflichtig.

*S. enterica* Serovar Typhi und *S. enterica* Serovar Paratyphi A, B und C sind die Verursacher des Typhus abdominalis bzw. des Paratyphus, einer schweren Allgemeininfektion.

Infektionsquelle ist der Mensch. Die Bakterien werden in kleiner Dosis oral aufgenommen und gelangen durch die Darmwand in die Lymphknoten und von dort in den gesamten Organismus. Dabei drohen Darmblutungen, Darmperforation und Kreislaufversagen.

Weiterhin treten Bradykardie, Typhus-Roseolen und häufig Milzschwellung auf. Unbehandelt liegt die Letalität bei 15%. Den Paratyphus kennzeichnet ein milderer Verlauf der Krankheit. Meldepflicht besteht bei Verdacht auf, Erkrankung an und Tod durch Typhus und Paratyphus (IfSG §6), sowie bei Nachweis von *S. enterica* Serovar Typhi und Serovar Paratyphi (IfSG §7).

### **2.1.2. *Shigella***

Shigellen sind die Verursacher der bakteriellen Ruhr und infizieren das Kolon. Die Aufnahme der Bakterien erfolgt oral. Shigellen können sich in den Enterozyten vermehren und so Ulzerationen und Nekrosen des Darmes mit Perforationsgefahr verursachen. Es lassen sich die Arten *Shigella sonnei* (Verursacher der Sommer-Ruhr, meist harmlos, häufigste Art in Europa), *Shigella flexneri* (Verursacher der Flexner-Ruhr), *Shigella dysenteriae* (Verursacher der Shiga-Kruse-Ruhr, fulminanter Verlauf durch Produktion des Shiga-Toxins = Verotoxin) und *Shigella boydii* unterscheiden. Sehr selten kann durch Infektion mit *S. dysenteriae* ein hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) ausgelöst werden [52]. Der Nachweis von *Shigella* ist meldepflichtig (IfSG §7). Shigellen sind eng verwandt mit *Escherichia coli*.

### **2.1.3. *Escherichia***

*Escherichia coli* ist eine häufig isolierte Spezies aus medizinischem Untersuchungsgut und ein typischer Fäkalindikator. *E. coli* gehört in geringer Keimzahl zur Standortflora des oberen Respirationstraktes und kommt in hoher Keimzahl im Kolon von Mensch und Tier vor. Seltener werden *Escherichia hermannii* oder *Escherichia fergusonii* beschrieben. Das peritrich begeißelte Bakterium *E. coli* ist der häufigste Verursacher nosokomialer Infektionen wie z.B. Cystitis oder Pyelonephritis (uropathogene *E. coli*, UPEC). Bei immungeschwächten Personen oder Neugeborenen kann *E. coli* jedoch auch eine Sepsis oder Meningitis verursachen (Neugeborenen-Meningitis-assoziierte *E. coli*, NMEC). Das normalerweise harmlose Bakterium kann durch verschiedene primäre und sekundäre Virulenzfaktoren zu einem pathogenen Erreger werden. Hier zu erwähnen sind hitzelabile und -stabile Toxine, Zytolysine, Shiga-like Toxin und Invasions- bzw. Kolonisationsfaktoren [21]. Häufig ist *E. coli* auch Auslöser von Entzündungen im Bauchraum, wie z.B. Appendizitis, Cholecystitis oder Peritonitis. Intestinale Infektionen durch *E. coli* werden durch bestimmte Pathovaren hervorgerufen: EPEC (enteropathogene *E. coli*) lösen durch Haftung an der Darmschleimhaut

## Einleitung

und Zerstörung der Mikrovilli Diarrhoen aus. Betroffen sind vor allem Säuglinge in Entwicklungsländern [56]. ETEC (enterotoxische *E. coli*) verursachen Reisediarrhoen durch Bildung von Enterotoxinen (Toxin I und II). EIEC (enteroinvasive *E. coli*) sind Auslöser von ruhrartigen Diarrhoen durch Eindringen in Darmepithelzellen und deren Zerstörung. EHEC (enterohämorrhagische *E. coli*) sind Erreger einer hämorrhagischen Kolitis durch die Produktion von einem Hämolysin (Verotoxin), welches dem Toxin von *Sh. dysenteriae* praktisch gleich ist (VTEC = verotoxinproduzierende *E. coli*; STEC = shigatoxinproduzierende *E. coli*). EHEC sind weiterhin Hauptauslöser des HUS, welches mit Nierenversagen, Anämie und Thrombopenie einhergeht. EHEC treten oft als Lebensmittelverunreiniger in Industrienationen in Erscheinung [56]. Seltener lösen auch EAEC (enteroaggregative *E. coli*) und DAEC (diffus adhärente *E. coli*) intestinale Infektionen aus. Meldepflichtig ist das HUS (IfSG §6) sowie der Nachweis von EHEC und sonstigen darmpathogenen *E. coli* (IfSG §7).

### **2.1.4. *Citrobacter***

Die Verstoffwechslung von Citrat ist charakteristisch für diese Bakteriengattung. *Citrobacter* spp. sind seltene Enteritiserreger und ebenfalls selten Auslöser von extraintestinalen Infektionen. Gelegentlich treten sie als Hospitalismuskkeime in Erscheinung. Es existieren folgende Species: *Citrobacter koseri*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter murlinae*, *Citrobacter gillenii*, *Citrobacter amalonaticus* und *Citrobacter braakii*. *Citrobacter diversus* wurde *Citrobacter koseri* zugeordnet.

### **2.1.5. *Klebsiella***

Klebsiellen sind fakultativ pathogene, bekapselte Bakterien und gehören in geringer Keimzahl zur Standortflora des Darmes. Als nosokomiale Erreger verursachen sie vor allem Pneumonien („Friedländer-Pneumonie“), jedoch auch andere extraintestinale Infektionen wie Abszesse, Cholecystitis, Bronchitis, Sinusitis, Cystitis oder Sepsis. Die bedeutendsten Species sind *Klebsiella pneumoniae* und *Klebsiella oxytoca*.

### **2.1.6. *Enterobacter***

Wie viele Enterobakterien sind auch *Enterobacter*-Species fakultativ pathogene Bakterien, die eine Rolle als Erreger nosokomialer Infektionen spielen. Die am häufigsten isolierten Species sind *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* und *Enterobacter agglomerans*. Kürzlich wurde ein *E. cloacae*-Stamm als Auslöser eines HUS beschrieben [52].

### **2.1.7. *Yersinia***

*Yersinia enterocolitica* verursacht eine akute, schmerzhafte Enteritis, die mit Übelkeit und Erbrechen einhergeht. Eine Übertragung erfolgt häufig über infiziertes Schweinefleisch. Ein Befall der mesenterialen Lymphknoten ruft das Bild einer Pseudoappendizitis hervor.

Weiterhin können eine Sepsis, Abszesse, Pneumonie oder Endokarditis ausgelöst werden, aber auch postinfektiöse immunologische Reaktionen des Myokards, der Gelenke oder der Haut. Ebenfalls postinfektiös kann das sogenannte Reiter-Syndrom mit Konjunktivitis, Urethritis und Arthritis auftreten. Die Pathogenität ist variabel und abhängig von plasmidkodierten Genen.

Der Nachweis von *Y. enterocolitica* ist meldepflichtig (IfSG §7).

Weitere bedeutsame Species der Gattung *Yersinia* sind *Yersinia pestis*, Auslöser der Pest, und *Yersinia pseudotuberculosis*, welche eine Pseudoappendizitis hervorrufen kann.

### **2.1.8. *Serratia***

Früher wurde *Serratia* als apathogen betrachtet und galt als Marker für Hygieneuntersuchungen. Enzyme wie Proteasen, Lipasen und Nucleasen machen das Genus *Serratia* jedoch pathogen [26] und zu einem ernstzunehmenden Auslöser von nosokomialen Infektionen wie z.B. Wundinfekten, Sepsis oder Osteomyelitis.

Eine wichtige Stoffwechsellistung ist die Produktion von Desoxyribonuklease sowie die Bildung von Prodigiosin, einem auf kohlenhydrathaltigem Agar rot erscheinenden Pigment. Es existieren zwei wichtige Species: *Serratia marcescens* und *Serratia liquefaciens*. Dabei stellt *S. marcescens* den klinisch relevanteren Stamm dar.



### **2.1.9. *Proteus***

Auch *Proteus* ist ein Auslöser nosokomialer Infektionen, vor allem des Respirationstraktes und des Urogenitaltraktes. Weiterhin kann *Proteus* Septikämien und Wundinfektionen auslösen.

Auf Agarplatten bildet *Proteus* keine Kolonien im herkömmlichen Sinn, sondern eine dünne, zusammenhängende Bakterenschicht und zeigt somit ein „Schwärmphänomen“.

Mit der Weil-Felix-Reaktion dient *Proteus* dem Nachweis von Antikörpern gegen Rickettsien, da die beiden Gattungen identische Antigene tragen.

Es werden folgende Species unterschieden: *Proteus mirabilis*, *Proteus penneri* und *Proteus vulgaris*.

### **2.1.10. *Morganella***

Die Gattung *Morganella* besteht lediglich aus der Species *Morganella morganii*. *M. morganii* gilt als opportunistisch pathogener Keim und kann Auslöser sein von Wundinfekten, Harnwegsinfekten und Septikämien.

### **2.1.11. *Hafnia***

Auch die Gattung *Hafnia* besteht aus nur einer Species, *Hafnia alvei*, und wird als nosokomialer Erreger von Wundinfekten, Sepsis und Harnwegsinfekten angesehen.

## 2.2. Verwandtschaftsverhältnisse der *Enterobacteriaceae*

In dem nachfolgenden Dendrogramm (Abb. 1, vereinfacht nach [26]) werden die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse einiger der in dieser Arbeit untersuchten *Enterobacteriaceae* aufgezeigt.

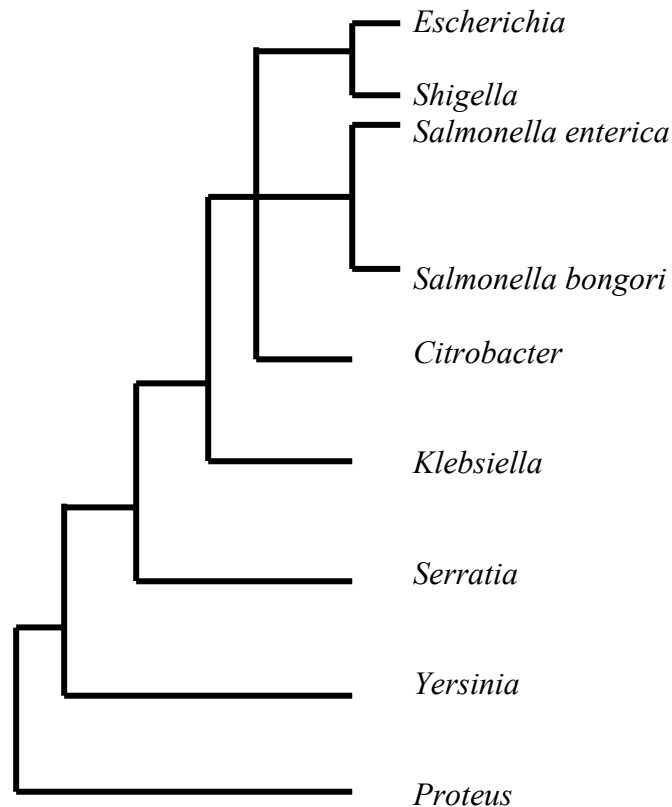


Abb. 1: Verwandtschaftsverhältnisse einiger *Enterobacteriaceae*.

## 3. Bakterientoxine

Die Pathogenität von Bakterien, insbesondere auch die der *Enterobacteriaceae*, wird durch eine große Anzahl von Virulenzfaktoren bestimmt. Eine wichtige Rolle nehmen dabei bakterielle Toxine ein. Viele pathogene Bakterien produzieren toxische Substanzen, welche sich grob in drei Kategorien einordnen lassen: Endotoxine, Exotoxine und

## Einleitung

Superantigentoxine. Superantigentoxine sind sehr starke unspezifische Immunstimulatoren, welche Fieber und Schock auslösen können.

Endotoxine werden beim Zerfall von gramnegativen Bakterien frei, es handelt sich um Zellwandbestandteile (Lipopolysaccharide, LPS). Vor allem das Lipid A induziert die Freisetzung von Zytokinen (z.B. IL-1, TNF) und führt über weitere Schritte zur Aktivierung der Komplement- und Gerinnungskaskade. Klinisch führt dies zu Fieber, Blutdruckabfall, DIC, Kreislaufversagen und letztendlich zum Endotoxin-Schock. Auch Zellwandbestandteile grampositiver Bakterien können, wenn auch seltener, einen Endotoxin-Schock auslösen.

Exotoxine sind meist Proteine, welche von der Bakterienzelle sezerniert werden. Diese können je nach Wirkspektrum und Pathogenitätsmechanismus erheblich zur Virulenz eines Bakteriums beitragen [34].

Eine große Gruppe der Exotoxine sind zytolytische Toxine, welche Zellen durch unterschiedliche Mechanismen schädigen können, z.B. durch enzymatische oder durch eine detergentienartige Wirkung auf Zellmembranen. Weiterhin können zytolytische Toxine Poren in Lipidmembranen bilden und somit in hypotonen Medien eine osmotische Lyse induzieren [58].

Porenbildende Zytolysine können auf unterschiedliche Art und Weise mit Zellmembranen interagieren. Zum einen können Lipidmembranen durch hydrophobe  $\alpha$ -Helices invadiert und überbrückt werden. Zum anderen können Toxine, die vorwiegend hydrophil sind, durch Oligomerisierung und durch Umlagerung von amphipathischen  $\beta$ -Schleifen Kanäle bilden, die auf ihrer Außenseite lipophil sind und die folglich fähig sind, in Membranen zu inserieren. [34,47,54].

Der überwiegende Anteil der bakteriellen Zytolysine zählt zu den porenbildenden Toxinen [37].

Porenbildende Zytolysine stellen eine große Gruppe bakterieller Toxine dar und kommen bei gramnegativen und grampositiven Bakterien vor. Porenbildende Toxine gramnegativer Bakterien werden oft als inaktive Proteine (Protoxine) synthetisiert, die posttranslatorisch durch Modifikation oder proteolytische Prozessierung aktiviert werden, während porenbildende Toxine grampositiver Bakterien in der Regel keine posttranslatorische Aktivierung erfordern.

Proteintoxine gramnegativer Bakterien können über unterschiedliche Mechanismen sezerniert werden, wobei fünf Sekretionstypen näher beschrieben sind [66].

### 3.1. Verschiedene Familien porenbildender Zytolysine

Porenbildende Toxine werden von einer großen Zahl pathogener Bakterien produziert. Aufgrund ihrer Struktur und ihrer funktionalen Eigenschaften lassen sich porenbildende Zytolysine verschiedenen Zytolysinfamilien zuordnen. Eine große Gruppe stellen die RTX-Toxine dar (RTX steht für Repeats-in-toxin). Es handelt sich um eine gut untersuchte Gruppe strukturell und funktionell verwandter, meist 100-120 kDa großer Proteine [37,38]. Sie werden von einem breiten Spektrum von human- und tierpathogenen Bakterien exprimiert. RTX-Toxine tragen zur Pathogenität verschiedener Bakterien bei [31,69] und schädigen verschiedene Zellen durch Porenbildung mit konsekutiver osmotischer Lyse [10,38]. Den Mitgliedern der RTX-Toxin-Familie ist eine Serie glycin- und aspartatreicher Repeats in der Form GGXG(N/D)DXUX in der C-terminalen Hälfte des Toxins gemeinsam [6,15,36,37]. In der Regel liegen alle Gene, die an Synthese, Sekretion und Aktivität des Toxins beteiligt sind, in einem RTX-typischen Operon [4,37]. Die RTX-Toxine werden als inaktive Vorstufen synthetisiert und posttranslatorisch durch Fettsäureacylierung aktiviert. Die Toxine werden über ein Typ-I-Sekretionssystem sezerniert, welches von einem C-terminalen Sekretionssignal abhängig ist [6,22,37,41,63]. Dabei erfolgt der Transport des Toxins in einem Schritt über die innere und die äußere Membran, ohne im periplasmatischen Spalt zu akkumulieren [24,38].

Die toxische Aktivität der RTX-Toxine ist  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig [10,38].  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen binden an die Repeat-Region und induzieren eine Konformationsänderung, welche die Anlagerung an die Zielmembran begünstigt [6,24,41]. Unklar ist allerdings, in welcher Weise die RTX-Toxine in die Zielmembran inserieren [6].

Das Wirkspektrum der einzelnen RTX-Toxine ist von Toxin zu Toxin unterschiedlich. Ein wichtiger, gut untersuchter Vertreter der RTX-Toxin-Familie ist das hitzelabile  $\alpha$ -Hämolysin (HlyA) aus *E. coli*. Es stellt das erste genauer charakterisierte RTX-Toxin dar. HlyA wird besonders häufig von UPEC-Stämmen produziert [36,41] und stellt einen wichtigen Virulenzfaktor dieser Stämme dar. Seltener wird HlyA in *E. coli*-Stämmen gefunden, welche extraintestinale Infektionen wie z.B. Sepsis verursachen [21,61]. Das 110 kDa-Protein lysiert tierische und humane Erythrozyten und andere Zellen wie z.B. Leukozyten und kann auf diese Weise das Immunsystem schädigen. Durch die Zerstörung von Gewebszellen ermöglicht HlyA das tiefere Eindringen von Bakterien in einen infizierten Organismus [24]. Bei menschlichen *E. coli*-Isolaten wird HlyA in der Regel chromosomal

## Einleitung

kodiert, bei tierischen Isolaten kommt es meist plasmid-kodiert vor. Das kodierende Operon ist ein typisches RTX-CABD-Operon. HlyA bildet kationenselektive Membranporen mit einem Durchmesser von ~1 nm in Zielzellmembranen, die nur für Sekunden beständig sind [37]. Die Porenbildung führt zur typischen osmotischen Zell-Lyse und darüber hinaus zu einem schnellen und irreversiblen ATP-Verlust sowie zu einer Schädigung des Zytoskeletts [21]. Ob die Poren durch HlyA-Monomere oder HlyA-Oligomere gebildet werden, ist noch unklar. Sublytische Konzentrationen von HlyA induzieren die Produktion von Entzündungsmediatoren wie IL-1, Leukotrienen, Arachidonsäurederivaten, Histamin und Serotonin [37]. Hohe Ähnlichkeit mit HlyA haben Hämolytine von *P. vulgaris* und *M. morganii* [38].

Ein zu HlyA homologes Toxin stellt das EHEC-Hämolytin (EHEC-HlyA, Ehx) dar. Es zeigt ein geringeres Wirkspektrum als HlyA [4,5]. Das Toxin ist ein putativer Virulenzfaktor für die Pathogenese der hämorrhagischen Kolitis und des hämolytisch-urämischen Syndroms. Ehx wird durch ein typisches RTX-Operon auf einem Plasmid (pO157) kodiert [5].

Weitere RTX-Toxine sind das Leukotoxin (LktA) von *Mannheimia haemolytica* (vormals *Pasteurella haemolytica*) und ApxI, ApxII und ApxIII von *Actinobacillus pleuropneumoniae*, welche für Tiere pathogen sind, sowie das Leukotoxin (LtxA) aus *Actinobacillus actinomycetemcomitans* [4,6,31,70]. Entferntere Verwandtschaft zur RTX-Toxin-Familie weisen das Adenylatcyclasetoxin (CyaA) von *Bordetella pertussis* und das Toxin RtxA von *Vibrio cholerae* [14] auf.

Die Tatsache, dass in den letzten Jahren immer mehr neue RTX-Toxine identifiziert wurden (z.B. in *Moraxella bovis*, *Pasteurella aerogenes*, *Actinobacillus suis*, *Vibrio vulnificus* und anderen Bakterien) spricht für eine weite Verbreitung dieser Toxine. Mittlerweile wurden spezifische Sonden zur einfacheren Detektion von RTX-homologen Gensequenzen entwickelt [31].

Von einer Anzahl zytolytischer Toxine ist bekannt, dass sie Cholesterol binden können. Sie stellen eine eigene Toxinfamilie dar, die Cholesterol-bindenden zytolytischen Toxine (CBTs) [2,23]. Die CBTs sind 50-60 kDa große Proteine, welche von grampositiven Bakterien der Genera *Streptococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria* und *Arcanobacterium* produziert werden. Perfringolysin O, ein längliches, stabförmiges Protein von *Clostridium perfringens* Typ A, stellt den Prototyp der CBTs dar [59,60]. Es handelt sich dabei um porenbildende Toxine. Früher wurden die CBTs auch als „thiol-activated toxins“ bezeichnet. Da die toxische Aktivität jedoch nicht an die Thiol-Gruppe gebunden ist, konnte diese Bezeichnung nicht

## Einleitung

beibehalten werden [23]. Abgesehen von Pneumolysin werden alle Toxine in den Extrazellulärraum sezerniert [2,60]. Die lytische Aktivität der Cholesterol-bindenden Toxine wird abgeschwächt durch freies Cholesterol und andere 3-Hydroxysterole [2,48].

Die CBTs binden als Monomere an Membran-Cholesterol. Zunächst formiert sich ein Prä-Poren-Komplex, welcher durch Reduktion zum Porenkomplex umgewandelt wird [29,57]. Bei der Komplexbildung der CBTs oligomerisieren 30-50 Untereinheiten [23,29], die entstehenden Aggregate bilden dann Poren in Lipidmembranen. Die Poren weisen einen Durchmesser von 15-30 nm auf. Damit sind sie auch durchlässig für Makromoleküle (Proteine, DNA) [29].

Cholesterol spielt dabei mehrere Rollen: Es fungiert als Rezeptor, und fördert die Oligomerisierung, die Insertion und stabilisiert die Membranpore [57].

Cholesterol-bindende zytolytische Proteine sind wichtige Virulenzfaktoren. Ihre Wirkungsweisen sind komplex. CBTs schädigen u.a. Immunzellen, Thrombozyten, Fibroblasten, HeLa-Zellen, Myokardzellen und somit eine große Bandbreite menschlicher Zellen [2]. Des Weiteren sind sie starke Stimuli für Entzündungen, führen zur Freisetzung von Interleukinen, Chemokinen, TNF und Leukotrienen und induzieren die Aktivierung von Komplement [2,23].

Die Cholesterol-bindenden Proteine sind untereinander bis zu 70% identisch und haben wahrscheinlich auch eine sehr ähnliche 3D-Struktur [2,57,60]. Die CBTs werden chromosomal kodiert.

Auch von *S. marcescens* ist die Existenz eines porenbildenden Toxins (ShlA) bekannt, welches jedoch Merkmale aufweist, die das Toxin von anderen porenbildenden Toxinen unterscheiden und eine Zuordnung zu einer der oben genannten Toxin-Familien ausschließen [11,37]. Das Protein stellt tatsächlich den Prototyp einer eigenständigen Toxin-Familie dar, zu der auch ein zytolytisches Toxin von *Haemophilus ducreyi* sowie ein Hämolyysin von *P. mirabilis* bzw. *P. vulgaris* gehören [37]. Das ShlA-Protein stellt einen bedeutenden Pathogenitätsfaktor dar. Das Toxin ist, wie viele porenbildende Toxine, ein chimäres Protein, da es hydrophile Aminosäuresequenzabschnitte für die Löslichkeit im Extrazellulärraum sowie eine hydrophobe Domäne für den Angriff an Lipidmembranen besitzt. Das Toxin schädigt Erythrozyten, Fibroblasten und auch Epithelzellen durch Porenbildung in der Zellmembran. Die gebildeten Poren weisen einen Durchmesser von 1-3 nm auf; möglicherweise werden kleine Poren durch Monomere und größere Poren durch Oligomere gebildet [37]. Bei der Hämolyse entstehen lediglich kleine Hämolysehöfe, da die

## Einleitung

Diffusionskapazität des hochmolekularen Toxins gering ist. Etwa 90% aller klinisch isolierten Stämme von *S. marcescens* sind hämolytisch aktiv. Die Aktivität von ShlA ist unabhängig von  $\text{Ca}^{2+}$  [37], die Wirkung ist jedoch abhängig von ShlB, einem akzessorischen Protein, das ShlA beim Transport aus der Bakterienzelle aktiviert.

Verwandt mit dem *S. marcescens*-Zytolysin sind Zytolysine von *Edwardsiella tarda* und *Erwinia carysanthemi*.

Ein weiteres, sehr gut untersuchtes porenbildendes Toxin ist das  $\alpha$ -Toxin (33 kDa) von *Staphylococcus aureus*. Das Toxin wird in aktiver Form freigesetzt und oligomerisiert nach der Bindung an die Membran zu nicht-kovalent verbundenen Heptameren, welche die Transmembranpore (1-3 nm) bilden. Die Porenbildung erfolgt  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig. Das Exotoxin wirkt hämolytisch und allgemein zytotoxisch und schädigt Thrombozyten [9].

Ein ebenfalls porenbildendes Toxin ist Aerolysin von *Aeromonas hydrophila*. Das Protein wird als inaktives Proaerolysin-Dimer sezerniert, ist aus 2 Domänen aufgebaut und reich an  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen [1]. Nach der spezifischen Bindung an GPI-gebundene Proteine wird Proaerolysin zu Aerolysin aktiviert [16,44]. Anschließend oligomerisiert Aerolysin zu einem stabilen Heptamer-Komplex, welcher eine Transmembranpore bildet. Die Poren sind durchlässig für kleine Ionen wie  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{K}^+$ , nicht aber für Proteine [1].

## 4. Zytolysin A (ClyA)

### 4.1. Eigenschaften und Struktur von ClyA

ClyA (SheA, HlyE) ist ein zytolytisches, chromosomal kodiertes Protein (33,76 kDa), welches zuerst in *E. coli* K-12, einem nicht-pathogenen Laborstamm identifiziert wurde [32]. ClyA unterscheidet sich von anderen bisher klassifizierten Toxinen. Es ist nicht verwandt mit anderen Toxinen wie RTX-Toxinen oder Cholesterol-bindenden Toxinen.

Es schädigt eine Anzahl verschiedener Zellen durch  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Porenbildung in der Zellmembran und weist eine hämolytische Aktivität auf [39,48]. Das Protein besteht aus 303 Aminosäuren.

Das monomere ClyA-Molekül besteht hauptsächlich aus vier langen (80-90 Å, 8-9 nm)  $\alpha$ -Helices (A, B, C, F) und weist Gesamtdimensionen von 100 Å x 30 Å x 20 Å auf. Die Helices

sind in einem Bündel angeordnet. An einem Ende dieses  $\alpha$ -Helix-Bündels liegt eine zusätzliche, kürzere (30 Å)  $\alpha$ -Helix ( $\alpha$ G). Diese  $\alpha$ -Helix stellt die C-terminale Region von ClyA dar. Die  $\alpha$ G-Region ist multifunktional und bildet zusammen mit den vier Haupthelices den Proteinschaft, die tail domain. In der tail domain liegen zwei Cysteinreste (Cys 87 und Cys 285, Abstand 2,03 Å). Am anderen Ende des Helixbündels befindet sich die sog. Kopfdomäne (head domain), bestehend aus einer  $\beta$ -Schleife, welche von zwei kurzen  $\alpha$ -Helices (Helices D und E) flankiert wird. Diese Struktur bildet die sog.  $\beta$ -Zunge (AS 177-203). Die  $\beta$ -Zunge ist hydrophob [68,72] und spielt vermutlich eine Rolle bei der Interaktion mit der Zielmembran. Für die Toxizität des Proteins sind sowohl der Proteinschaft als auch die Kopfdomäne von Bedeutung [3]. Die  $\alpha$ G-Region spielt bei der Sekretion des Toxins, bei der Anlagerung an Ziel-Membranen und bei der Porenbildung eine wichtige Rolle, wirkt aber isoliert nicht hämolytisch [3,67].

ClyA wird wahrscheinlich durch einen neuen Sekretionsmechanismus sezerniert. Die Translokation von ClyA über die innere Membran erfolgt wahrscheinlich durch intrinsische Aktivität des Moleküls [66]. Das Protein akkumuliert im Periplasma. Dort liegt es in monomerer Form vor, welche durch eine Disulfidbindung zwischen den zwei Cysteinresten stabilisiert wird. So wird offenbar eine vorzeitige Oligomerisierung der Moleküle verhindert. Durch die Disulfidbrücke wird die  $\alpha$ G-Region an den Hauptkörper des Proteinschaftes gebunden und ihre freie Beweglichkeit verhindert, welche für die Aktivität des Proteins anscheinend essentiell ist [3]. Für die Bildung der Disulfidbrücken sind spezifische membrangebundene und periplasmatische Enzyme (Disulfid-Isomerase bzw. -Oxidasen, DsbA, DsbB, DsbC) verantwortlich [66,67].

Vom periplasmatischen Spalt wird ClyA in Vesikeln der äußeren Membran (OMVs) freigesetzt. In den Vesikeln oligomerisiert ClyA zu Poren-Strukturen von etwa 220 kDa durch Reduktion der Cysteinreste. Die ClyA-Oligomere bestehen aus ca. 8-9 ClyA-Molekülen. Damit geht ClyA in seine aktive Form über. ClyA in den Vesikeln ist mehr als 8-fach aktiver als das monomere ClyA, welches aus dem Periplasma isoliert werden kann. In den Vesikeln liegen die ClyA-Moleküle im reduzierten Zustand vor. Hier konnten die oxidierenden Enzyme nicht nachgewiesen werden. Neben den oligomeren ClyA-Molekülen enthalten die OMVs Bestandteile der äußeren Membran wie Lipopolysaccharide und Phospholipide [66]. Verlust eines Cysteins führt zur vorzeitigen Oligomerisierung und somit zum Aktivitätsverlust. Experimentell kann die Bildung von Disulfidbindungen durch Inkubation des Moleküls in  $\text{CuCl}_2$  oder durch Behandlung mit  $\text{HgII}$  induziert werden [3]. Dadurch wird



die Aktivität von ClyA abgeschwächt. Diese Inaktivierung kann durch Zugabe einer reduzierenden Substanz zurückgewonnen werden, z.B. Dithiothreitol.

ClyA ist ein robustes Protein. Es wird durch 5-minütige Inkubation bei 25°C bei pH-Werten zwischen 3,0 und 9,0 in seiner Aktivität nicht beeinflusst. Die Halbwertszeit beträgt 1,5 Minuten bei 55°C. Auch eine 30-minütige Inkubation von 50 µg ClyA mit Proteasen (bis zu 2 U Trypsin, V8 und Pepsin) schädigt das Molekül nicht [3].

#### 4.2. Vorkommen des *clyA*-Gens

Das *clyA*-Gen wurde zuerst in *E. coli* entdeckt. Das Gen in *E. coli* K-12 liegt bei 26.49 Min. auf dem bakteriellen Chromosom [39,71]. Die Sequenz des Strukturgens beginnt am zweiten von zwei möglichen ATG-Codons [18].

Das *clyA*-Gen ist in vielen *E. coli*-Stämmen vorhanden, welche enteritische Infektionen auslösen, während *E. coli*-Stämme, welche extraintestinale Infektionen auslösen, in der Regel kein intaktes *clyA*-Gen enthalten.

Das *clyA*-Gen kommt in nicht-pathogenen *E. coli*-Stämmen vor wie z.B. *E. coli* K-12, jedoch auch in pathogenen Stämmen wie STEC, EIEC, EAEC, ETEC und *E. coli* O157:H7 [19,42,68]. In vielen EPEC-Stämmen ist *clyA* vorhanden, aufgrund einer 1 bp-Deletion in der kodierenden Sequenz jedoch defekt. Alle bisher untersuchten UPEC- [30] und NMEC-Stämme enthalten nur funktionslose *clyA*-Fragmente. Die Ursache liegt hier in zwei relativ großen Deletionen [42].

Später wurden *clyA*-homologe Gene auch in *S. enterica* Serovar Typhi-Stämmen und in einem *S. enterica* Serovar Paratyphi A-Stamm identifiziert. Die Aminosäuresequenz der von diesen *clyA*-homologen Genen kodierten Proteine ist 91% bzw. 90% identisch zur Sequenz von ClyA von *E. coli* K-12 [50,65]. Das Gen ist jedoch nicht in allen *S. enterica*-Serovaren enthalten. Es fehlt beispielsweise in *S. enterica* Serovar Typhimurium, Serovar Enteritidis und anderen enteritischen *Salmonella*-Serovaren [20,43,50,51,65]. Weiterhin ist *clyA* nicht vorhanden in *S. enterica* Serovar Paratyphi B und C. Auch in *S. enterica* Subspecies *arizonae* konnte kein *clyA*-Gen gefunden werden [65].

DNA-Sequenzen, die homolog zum *clyA*-Gen von *E. coli* sind, wurden auch in *Sh. flexneri*, *Sh. dysenteriae* und *Sh. sonnei* entdeckt. Zumindest in den bisher untersuchten Stämmen dieser *Shigella*-Arten ist jedoch kein funktionales *clyA*-Gen vorhanden. Das *clyA*-Gen in den untersuchten *Sh. flexneri*-Stämmen ist aufgrund einer 11 bp-Deletion defekt [19,68]; in einem untersuchten *Sh. sonnei*-Stamm wird *clyA* durch ein Insertionselement unterbrochen und in

einem getesteten *Sh. dysenteriae*-Stamm ist die *clyA*-Sequenz teilweise deletiert und durch ein Insertionselement ersetzt (A. Ludwig, S. Bauer und C. von Rhein, unveröffentlicht).

*E. coli*-Stämme, welche *clyA* und *hlyA* enthalten, wurden interessanterweise noch nicht identifiziert [30].

#### **4.3. Pathogenität und Wirkungsmechanismus von ClyA**

Die eigentliche Funktion von ClyA ist bisher unklar. Das ClyA-Protein wirkt zytolytisch auf eine Vielzahl von eukaryonten Zellen wie z.B. Erythrozyten (von Mensch, Pferd, Schaf, Ziege, Huhn) [32,50], HeLa-Zellen und murine und menschliche Makrophagen und apoptotisch auf Monozyten und Makrophagen [18,48]. Die Apoptose-Kaskade wird durch Stimulierung von Endonukleasen, Proteasen und Phosphatasen in Gang gebracht [32]. Die Zytotoxizität ist abhängig von der ClyA-Konzentration, der bakteriellen Infektionsdosis sowie von der Dauer der Toxinexposition [32].

ClyA bildet calciumunabhängig kationenselektive Transmembranporen in Lipiddoppelschichten [39]. Die Poren werden durch Zusammenlagerung von 8-9 ClyA-Molekülen gebildet. Bei der Oligomerisierung der ClyA-Moleküle gehen diese keine oder nur geringfügige Konformationsänderungen ein und erhalten ihre langgestreckte Form [68]. Durch Leitfähigkeitsmessungen an künstlichen Lipidmembranen und durch osmotische Protektionstests mit Erythrozyten konnte gezeigt werden, dass die von ClyA gebildeten Poren einen effektiven Durchmesser von ca. 2,5-3 nm (25-30 Å) haben [39].

Elektronenmikroskopische Analysen von ClyA-Poren haben dies bestätigt und gleichzeitig gezeigt, dass der Außendurchmesser der Poren ca. 7-9 nm (70-90 Å) beträgt [3,39,68].

Das Innere der Poren ist negativ geladen. An der Porenaußenseite finden sich „spike-Strukturen“ mit einer Länge von 105-110 Å, die von den nicht in die Membran inserierten Anteilen der beteiligten ClyA-Moleküle gebildet werden [68].

#### **4.4. Regulationsmechanismen von *clyA***

Das *clyA*-Gen unterliegt einer Vielzahl von Regulationsmechanismen [30,71], von denen die meisten jedoch nur unspezifisch auf die Expressierung des Gens Einfluss nehmen. Die Regulation findet auf der Ebene der Transkription statt. Wichtig hierfür ist die -10 Promotor-Box (TATGAAT) [39]. Die -10-Box des Promotors des *clyA*-Gens ist ungewöhnlich, denn normalerweise ist die -10-Box bei bakteriellen Promotoren nur sechs bp lang

## Einleitung

(Consensussequenz TATAAT); d.h. im Fall des *clyA*-Gens ist ein G eingeschoben. Spezifische Änderungen in diesem Bereich führen zu einer signifikant verminderten Expression von *clyA* [39,71].

Unter normalen in vitro-Kulturbedingungen ist die Expression des *clyA*-Gens in *E. coli* stark reprimiert. Das ClyA-Protein wird unter diesen Bedingungen in so geringen Mengen produziert, z.B. von *E. coli* K-12 und den meisten *clyA*-positiven *E. coli*-Stämmen, dass die Kolonien auf Blutagar keine Hämolyse verursachen.

Zu den Regulatoren von *clyA* gehört SlyA. Es handelt sich dabei um ein 17 kDa großes Regulationsprotein, welches in verschiedenen Bakterien aus der Familie der *Enterobacteriaceae* wie z.B. *Salmonella*, *Escherichia* und *Shigella* identifiziert wurde [17,24,35,40]. Es reguliert offenbar eine Vielzahl von physiologischen Prozessen [49,71]. Genregulation durch SlyA ist von Bedeutung für die Anpassung an das Milieu eines Wirtsorganismus [13].

Bei *S. enterica* Serovar Typhimurium trägt SlyA maßgeblich zur Virulenz des Bakteriums bei [35].

Die Regulation durch SlyA kann positiv oder negativ sein [13,62]. Im Falle von *clyA* wird die Genexpression gefördert. SlyA gehört zu einer großen Familie bakterieller Transkriptionsregulatoren. Zu dieser Familie gehören beispielsweise EmrR (MprA) und MarR von *E. coli*, HprR von *Bacillus subtilis* und PecS von *Erwinia chrysanthemi* [13,28]. Weiterhin gehören die Rap- und Hor-Proteine von *S. marcescens*, *Erwinia carotovora*, und *Y. enterocolitica* zu dieser Gruppe [64].

Für die *clyA*-Expression ist SlyA nicht zwingend erforderlich, jedoch kann durch SlyA die ClyA-Produktion gefördert werden.

Das Nucleoid-Protein H-NS (histone-like nucleoid structuring protein) unterdrückt die Transkription von *clyA* [71,73]. Es bindet an Sequenzen in der Promotor-Region, dabei interagiert es mit zwei spezifischen, A/T-reichen Sequenzen und blockiert so das Gen [71]. Wie SlyA hat auch H-NS keine spezifische Wirkung auf *clyA*, sondern reprimiert verschiedene Gene.

Durch Mutation des *hns*-Gens kann die Produktion von ClyA gefördert werden [48]. Das H-NS-Protein ist für die niedrige ClyA-Konzentration in *E. coli* unter normalen in vitro-Kulturbedingungen hauptverantwortlich. Kürzlich wurde gezeigt, dass H-NS je nach Kulturbedingung positiven oder negativen Einfluss auf die *clyA*-Expression nehmen kann: Unter Glucosemangel-Konditionen wird die *clyA*-Expression durch H-NS gefördert [73].

Auch das cyclic-AMP-receptor-Protein (CRP) aktiviert die *clyA*-Expression bei Glucosemangel [71,73]. Es interagiert mit dem *clyA*-Promotor, wobei die CRP-Bindungsstelle teilweise mit der FNR-Bindungsstelle überlappt [7,71].

Das FNR-Protein (fumarate and nitrate reduction regulator) aus der gleichen Familie wie CRP [7,25,73] ist ein Transkriptionsregulator, der über die Rekrutierung der RNA-Polymerase zum *clyA*-Promotor die Expression von *clyA* unter anaeroben Bedingungen aktiviert [53].

## 5. Zielsetzung dieser Arbeit

Aufgrund der Unterschiede zu bereits gut untersuchten bakteriellen Zytolysinen stellt ClyA offenbar den Prototyp einer neuen Familie porenbildender Toxine dar. Kürzlich wurden funktionale *clyA*-homologe Gene in Stämmen von *S. enterica* Serovar Typhi und in einem *S. enterica* Serovar Paratyphi A-Stamm gefunden (90-91% Sequenzidentität auf Proteinebene). In einem vogelpathogenen *E. coli*-Stamm wurde ein *clyA*-homologes Gen identifiziert, dessen Produkt nur ca. 75% Aminosäuresequenzidentität zu ClyA von *E. coli* K-12 und anderen *E. coli*-Stämmen aufweist. Außerdem wurden defekte *clyA*-homologe Gene in einigen *Sh. flexneri*-Stämmen, in einem untersuchten *Sh. dysenteriae*-Stamm und in einem untersuchten *Sh. sonnei*-Stamm gefunden.

Diese Arbeit sollte einen weiteren Beitrag zur Charakterisierung der ClyA-Zytolysinfamilie leisten. Insbesondere sollte das *clyA*-homologe Gen eines weiteren *S. enterica* Serovar Paratyphi A-Stammes und eines weiteren *Sh. sonnei*-Stammes isoliert und sequenziert werden. Darüber hinaus sollten Stämme verschiedener anderer Species und Gattungen aus der Familie der *Enterobacteriaceae* durch PCR- bzw. Southern Blot-Analysen auf das Vorkommen von *clyA*-homologen DNA-Sequenzen untersucht werden. Ausgewählt wurden Stämme der Genera *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Morganella*, *Hafnia*, *Yersinia* und *Klebsiella*.

### III. Material und Methoden

#### 1. Material

##### 1.1. Bakterienstämme

Spezies	Stamm	Herkunft <sup>a</sup>
<i>Escherichia coli</i>	K-12 (Derivat CC118)	I
<i>Shigella sonnei</i>	ST2757/01	I
<i>Shigella sonnei</i>	ST3135/01	I
<i>Salmonella enterica</i> Serovar Paratyphi A	FR1/99	I
<i>Citrobacter freundii</i>	MSD-41	I
<i>Citrobacter freundii</i>	MSD-44	I
<i>Citrobacter freundii</i>	PEG-40690	I
<i>Citrobacter freundii</i>	PEG-41830	I
<i>Citrobacter freundii</i>	PEG-41867	I
<i>Citrobacter freundii</i>	DSM 30039	II
<i>Citrobacter koseri</i>	PEG-40047	I
<i>Citrobacter koseri</i>	DSM 4595 (=ATCC 27028)	II
<i>Citrobacter koseri</i> ( <i>Levinea malonatica</i> )	DSM 4596 (=ATCC 25408)	II
<i>Citrobacter koseri</i> ( <i>Citrobacter diversus</i> ) <sup>b</sup>	DSM 4570 (=ATCC 27156)	II
<i>Citrobacter amalonicus</i> ( <i>Levinea amalonicus</i> )	DSM 4593	II
<i>Citrobacter gillenii</i>	DSM 13694	II
<i>Citrobacter murliniae</i>	DSM 13695	II
<i>Citrobacter braakii</i>	PEG-38893	I
<i>Klebsiella oxytoca</i>	PEG-41381	I
<i>Klebsiella oxytoca</i>	PEG-39836	I
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PEG-40301	I
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PEG-40400	I
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PEG-41480	I
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PEG-41587	I
<i>Enterobacter cloacae</i>	MSD-8	I
<i>Serratia marcescens</i>	MSD-6	I
<i>Hafnia alvei</i>	RV3/97	I
<i>Yersinia enterocolitica</i>	RV2/00	I
<i>Proteus mirabilis</i>	MSD-1	I
<i>Morganella morganii</i>	FR301	I

**Tab. 1: In dieser Arbeit untersuchte Bakterienstämme.**

<sup>a</sup> I: Institut für Medizinische Mikrobiologie, Klinikum der J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main. II: DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig.

<sup>b</sup> *Citrobacter diversus* wurde *Citrobacter koseri* zugeordnet.

## 1.2. Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Hersteller/Referenz
pDrive Cloning Vector	Klonierungsvektor; Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>	Qiagen
pUC18	Klonierungsvektor; Amp <sup>r</sup>	New England Biolabs
pAL107	pACYC184-Derivat, trägt <i>slyA</i> von <i>S. enterica</i> Serovar Typhimurium, Cm <sup>r</sup>	39
pAL108	pACYC184-Derivat, trägt <i>slyA</i> von <i>E. coli</i> , Cm <sup>r</sup>	39
pAL208	pUC18-Derivat, trägt <i>clyA</i> von <i>S. enterica</i> Serovar Paratyphi A (ATCC 9150) (P55/P56-PCR-Produkt); Amp <sup>r</sup>	65
pVS1	pUC18 mit <i>clyA</i> von <i>S. enterica</i> Serovar Paratyphi A (FR1/99) (P124/P126-PCR-Produkt); Amp <sup>r</sup>	diese Arbeit
pVS2	pUC18 mit <i>clyA</i> von <i>S. enterica</i> Serovar Paratyphi A (FR1/99) (P125/P126-PCR-Produkt); Amp <sup>r</sup>	diese Arbeit

**Tab. 2: Verwendete Plasmide.**

## 1.3. Oligonukleotidprimer

### 1.3.1. Primer, die von *clyA* von *E. coli* K-12 bzw. den flankierenden DNA-Sequenzen abgeleitet wurden

Oligonukleotidprimer wurden auf Bestellung von der Firma MWG-Biotech AG synthetisiert. Die vom *clyA*-Gen von *E. coli* K-12 (*clyA*<sub>*E.coli* K-12</sub>) abgeleiteten Primer sind in Tab. 3 aufgelistet. Die Bindungsstellen der Primer in der Sequenz von *clyA*<sub>*E.coli* K-12</sub> sind in Abb. 2 eingezeichnet.

Primer	Nukleotidsequenz	Tm/°C <sup>a</sup>
P1	5' -AACAGGAGTATTCACAGGC-3'	43,5
P2	5' -TTAGCAAAGAAAGCATTA-3'	38,4
P3	5' -TCGTTCTCTTATCTTGTGC-3'	42,2
P6	5' -GACATTGACGCATCCCG-3'	47,7
P7	5' -CTTGAGTACATGGAGAG-3'	50,4
P8	5' -CAGACCTTTGATGAAACC-3'	41,5

Primer	Nukleotidsequenz	T <sub>m</sub> /°C <sup>a</sup>
P17	5'-GTTTTTAAATGTGATAAAGCTTATACCTTGAG-3'	55,8
P18	5'-AGATCTTTTTGTTTGAACCAGGGATCG-3'	n.b.
P20	5'-GCCTTAACGACGTGGATC-3'	56,0
P21	5'-CATAATGAGAGTTACCCGATACC-3'	58,9
P22	5'-CCATCAATCATAGAATCACCAC-3'	56,5
P23	5'-GCCAGCAGATCAATACTG-3'	53,7
P26	5'-CAGCAGATCAATACTGATTCAGGCTATC-3'	63,7
P28	5'-CGACGACGCTCATCCAGC-3'	60,5
P29	5'-CGCTCTGTCATAATGAGAG-3'	54,5
P31	5'-CCATTTTAAACGCCAAGCGCCTTTG-3'	62,7
P36	5'-CTGATACTCATTACAAGTG-3'	50,2
P43	5'-CACCGAAATAGCCGCCATC-3'	60,0
P44	5'-GTTAGACAGGGTGGTAAAG-3'	54,5
P57	5'-CTTATGGATAGCCAGGATAAG-3'	55,9
P111	5'-CTGCTGATTTTTTCGTTCTC-3'	52,4
P116	5'-CATTGGTTAACTGGCTATC-3'	52,4
P120	5'-CTAAAACGGAG <b>GCATGC</b> CTGTGAATAC-3' SphI	63,2
P121	5'-GTGTAT <b>GAATTC</b> TGTGGTGTTC-3' EcoRI	58,9
P122	5'-GCAGGGATTTTT <b>AAGCTT</b> CATTCAG-3' HindIII	59,7
P123	5'-GGTGTCC <b>GTCGAC</b> GGTCCATTTG-3' SalI	64,0

**Tab. 3: Verwendete Oligonukleotidprimer, die von *clxA*<sub>*E.coli* K-12</sub> bzw. den flankierenden DNA-Sequenzen abgeleitet wurden.**

Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme SphI, EcoRI, HindIII und SalI sind fettgedruckt.

<sup>a</sup>Formel für die Berechnung der Schmelzpunkte (T<sub>m</sub>): T<sub>m</sub> (°C) = 2 (N<sub>A</sub>+N<sub>T</sub>) + 4 (N<sub>G</sub>+N<sub>C</sub>); N = Anzahl der Nukleotide.

```

1                                     AGATCTTTTTGTT
                                     5'-AGATCTTTTTGTT
                                     P18
14  TGAACCAGGGATCGCCCATTTTAAACGCCAAGCGCCTTTGCCTCAGCGTTTCGGGCGATAA
    TGAACCAGGGATCG CCATTTTAAACGCCAAGCGCCTTTG-3'
    P18                                     P31
74  CGCAACCGTCATTATTCGATAGCACAACCACCGGTTTACCCATAAATCAGGGCGAAACA

134 CCGTCTCACAGCTGGCATAAAACGCGTTTACATCACAGAGGGCAAACATCAGCGCATCGC
                                     5'-GC
194 CTTAACGACGTGGATCACCACACCAAAGACATCCAGCGTATCTTCACTACTGATGGTAAT
    CTTAACGACGTGGATC-3'
    P20
254 GGGCGAGTACGCGCTGTTCATGGGAATAAGCTGTACCGTCGGCGTAGTTGCAATTTTTT

```

## Material und Methoden

314 CACCGTAAACTCGCCGTCAACAGCAGCGATGACAATATCACCATGGCTGGCGGTAATAGC

374 GCTATCGACAATCAGTAAATCACCGTCACTAATTCACCATCAATCATAGAATCACCACT  
5'-CCATCAATCATAGAATCACCACT-3'  
P22.

434 TGCTTTGACGAAGTAAGTCGCGCTGGGATGCTGGATCAACAGTTGATTTCAGATCGATGCG

494 CTGTTCAACGTAATCTGCTGCCGGTGAAGGAAAGCCACACTGAACAAGATCGCTAAATAG

554 CGGAAAAGTCACAATTTGCGGGAGATCCGCAGGCTTGATAAAACAATAATAATCTGCCT

614 GAAGTTATACTGTTTTTATATACAGTAGTCTGTTCTTGCCAGCAGATCAATACTGATTCA  
5'-GCCAGCAGATCAATACTG-3'  
P23  
5'-CAGCAGATCAATACTGATTCA  
P26

674 GGCTATCAATATTTGTCGCTGCATAGGCTGCTGATTTTTCGTTCTTATCTTGTGCTCA  
GGCTATC-3' 5'-CTGCTGATTTTTCGTTCTC-3'  
P111  
5'-TCGTTCTCTTATCTTGTGC-3'  
P3

734 CGTGGCCTTCTGGCGACGACGCTCATCCAGCAGAAATGAAAAATATCACCCGGCTAAAAA  
5'-CGACGACGCTCATCCAGC-3'  
P28

794 ATAGAATAGAAGCATTCGCCATAATGACATTAACATTGTTTGATATTTATCATATTAAT

854 AGAAATAAAGACATTGACGCATCCCGCCCGGCTAACTATGAATTAGATGAAGTAAAATTT  
5'-GACATTGACGCATCCCG-3'  
P6

914 ATTAATAGTTGTA AACAGGAGTTTCATTACAATTTATATATTTAAAGAGGCGAATGATT

974 **ATG**ACTGAAATCGTTGCAGATAAAACGGTAGAAGTAGTTAAAAACGCAATCGAAACCGCA

1034 GATGGAGCATTAGATCTTTATAATAAATATCTCGATCAGGTCATCCCCTGGCAGACCTTT  
5'-CAGACCTTT  
P8

1094 GATGAAACCATAAAAAGAGTTAAGTCGCTTTAAACAGGAGTATTCACAGGCAGCCTCCGTT  
GATGAAACC-3' 5'-AACAGGAGTATTCACAGGC-3'  
P8 P1  
3'-CATAAGTGTCCGTACGAGGCAA  
P120

1154 TTAGTCGGCGATATTTAAACCTTACTTATGGATAGCCAGGATAAGTATTTTGAAGCAACC  
AATC-5' 5'-CTTATGGATAGCCAGGATAAG-3'  
P57

1214 CAAACAGTGTATGAATGGTGTGGTGTTCGACGCAATTGCTCGCAGCGTATATTTTGCTA  
5'-GTGTATGAATCTGTGGTGTTC-3'  
P121

1274 TTTGATGAGTACAATGAGAAGAAAGCATCCGCCAGAAAGACATTCTCATTAAGGTACTG



## Material und Methoden

1334 GATGACGGCATCACGAAGCTGAATGAAGCGCAAAAATCCCTGCTGGTAAGCTCACAAAGT  
3'-GACTTACTTCGAATTTTTAGGGACG-5'  
P122

1394 TTCAACAACGCTTCCGGGAAACTGCTGGCGTTAGATAGCCAGTTAACCAATGATTTTTCA  
3'-CTATCGGTCAATTGGTTAC-5'  
P116

1454 GAAAAAAGCAGCTATTTCCAGTCACAGGTAGATAAAAATCAGGAAGGAAGCATATGCCGGT

1514 GCCGCAGCCGGTGTCTGTCGCCGGTCCATTTGGATTAATCATTTCCTATTCTATTGCTGCG  
5'-GGTGTCTGTCGTCGGTCCATTTG-3'  
P123

1574 GGC GTAGTTGAAGGAAA ACTGATTCCAGAATTGAAGAACAAGTTAAAATCTGTGCAGAAT

1634 TTCTTTACCACCCTGTCTAACACGGTTAAACAAGCGAATAAAGATATCGATGCCGCCAAA  
3'-GAAATGGTGGGACAGATTG-5'  
P44

1694 TTGAAATTAACCACCGAAATAGCCGCCATCGGTGAGATAAAAACGGAACTGAAACAACC  
5'-CACCGAAATAGCCGCCATC-3'  
P43

1754 AGATTCTACGTTGATTATGATGATTTAATGCTTTCTTTGCTAAAAGAAGCGGCCAAAAAA  
3'-ATTACGAAAGAAACGATT-5'  
P2

1814 ATGATTAACACCTGTAATGAGTATCAGAAAAGACACGGTAAAAAGACACTCTTTGAGGTA  
3'-GTGAACATTACTCATAGTC-5'  
P36

1874 CCTGAAGTCTTGATAAAGCGATTATTCTCTCCATGTA CTCAAGGTATAAGGTTTATCACATT  
3'-GAGAGGTACATGAGTTC-5'  
P7  
3'-GAGTTCCATATTCGAAATAGTGTA  
P17

1934 TAAAAACACAGACGTTTTTTTAAAGATTGAGAGTTACCTGTTGATAATAAGGTATCGGGTA  
ATTTTTG-5' 3'-CCATAGCCCAT  
P17 P21

1994 ACTCTCATTATGACAGAGCGCTTTCAAAAACAGGGCTACGAAATGGCGAGCATCCAGACG  
TGAGAGTAATAC-5'  
P21  
3'-GAGAGTAATACTGTCTCGC-5'  
P29

2054 TATATTAAGAAAGCCCCATCAGCATCTATTAAATTTATCACTGCGCCCAGTCAGGTTTA

2114 TTTAAGATATGATCCTGCCAGTCAATCACTTCTGATTCTTTCACTGCGATATGACGCACA

2174 GAGATACGTTCCACCATG

**Abb. 2: Nukleotidsequenz von *clyA*<sub>*E. coli* K-12</sub> mit Bindungsstellen der verwendeten Primer.** Weist ein Primer eine von *clyA*<sub>*E. coli* K-12</sub> abweichende Basensequenz auf, ist dies kursiv dargestellt. Das Startcodon ATG und das Stopcodon von *clyA* sind fettgedruckt und unterstrichen.

**1.3.2. Primer, die von *chyA* von *S. enterica* Serovar Paratyphi A ATCC 9150 bzw. den flankierenden DNA-Sequenzen abgeleitet wurden**

Die Bindungsstellen der in der Tab. 4 aufgeführten Primer in der Sequenz des *chyA*-Gens von *S. enterica* Serovar Paratyphi A ATCC 9150 sind in Abb. 3 dargestellt.

Primer	Nukleotidsequenz	Tm/°C
P55	5'-GGAAGATGGGATGGTCAAAGTAGG-3'	62,7
P56	5'-TGATGCTTCAACTTTTCGATC-3'	52,3
P112	5'-GGGTACGATTACTCTGCTGC-3'	59,4
P113	5'-GTGATTTCCGCATTCAGAACCTG-3'	60,6
P124	5'-CACATTAAAG <b>GTCTGAC</b> CTGACATTTATATGG-3' SalI	64,2
P125	5'-CCAGCTTCT <b>GCGATG</b> CTAACTTAAGC-3' SphI	64,8
P126	5'-GCAAAAGCC <b>GGATCC</b> GGTATCGC-3' BamHI	69,5

**Tab. 4: Verwendete Oligonukleotidprimer für *S. enterica* Serovar Paratyphi A.** Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme SalI, SphI und BamHI sind fettgedruckt.

```

1      CACATTAAAGGTCTACCTGACATTTATATGGGAGTGACAAAATATAAACCCAAACAACGT
5'-   CACATTAAAGGTCGACCTGACATTTATATGG-3'
      P124
61     TTTACCGGCTTATTTCCGCTACAGGATATATTGACTCAAAGTGTGATCAGGCATCGAAA
121    TTTGTGCCCGGTACCGATATCACCGATGCGGTGGGTATCCCCTCCGACCTAAAAGCATT
181    CAGCAAGCCATTTTGGCTATGAAGCCAAAAGATAAAACCAGCAACAATATACTGTACGTC
241    AAATTTAGCTACTTACCGGAAGATGGGATGGTCAAAGTAGGAAGCAAACAGTTTCTTTT
      5'-GGAAGATGGGATGGTCAAAGTAGG-3'
      P55
301    GGTTCGTATTCTGGAAAAATGCAGCAGAGTAATCGTACCCAGCGTAGATAAGCAGGAAGT
      3'-CGTCGTCTCATTAGCATGGG-5'
      P112
361    TGGCAGTATTTCCAGCTTCTGGAATGCTAACTTAAGCTACAAAAGCTGTCTGGAGGCAAT
      5'-CCAGCTTCTGGCATGCTAACTTAAGC-3'
      P125
421    AGGTAGGAATAAGTTATAAAACAATAGCTTAATTGCAATTTATATATTTAAAGAGGCAAA
481    TGATTATGACTGGAATATTTGCAGAACAAGTGTAGAGGTAGTTAAAAGCGCGATCGAAA
541    CCGCAGATGGGGCATTAGATTTTATAACAAATACCTCGACCAGGTTATCCCCTGGAAGA
601    CCTTTGATGAAACCATAAAAGAGTTAAGCCGTTTAAACAGGAGTACTCGCAGGAAGCTT
661    CTGTTTTAGTTGGTGATATTAAAGTTTTGCTTATGGACAGCCAGGATAAGTATTTTGAAG

```

## Material und Methoden

```
721   CGACACAAACTGTTTATGAATGGTGTGGTGTCTGTGACGCAATTACTCTCAGCGTATATTT
781   TACTATTTGATGAATATAATGAGAAAAAGCATCAGCGCAGAAAGACATTCTCATCAGGA
841   TATTAGATGATGGCGTCAATAAACTGAATGAAGCGCAAAAATCTCTCCTGGGAAGTTCAC
901   AAAGTTTCAACAACGCTTCAGGAAAAGTCTGGCATTAGATAGCCAGTTAACTAATGATT
961   TCTCGGAAAAAAGTAGTTATTTCCAGTCACAGGTGGATAGAATTCGTAAGGAAGCTTATG
1021  CCGGTGCTGCAGCAGGCATAGTCGCCGGTCCGTTTGGATTAATTATTTTCTATTCTATTG
1081  CTGCGGGCGTGATTGAAGGGAAATTGATTCCAGAATTGAATGACAGGCTAAAAGCAGTGC
1141  AAAATTTCTTTACTAGCTTATCAGTCACAGTGAAACAAGCGAATAAAGATATCGATGCGG
1201  CAAAATTGAAATTAGCCACTGAAATAGCAGCAATTGGGGAGATAAAAACGGAAACCGAAA
1261  CAACCAGATTCTACGTTGATTATGATGATTTAATGCTTTCTTTACTAAAAGGAGCTGCAA
1321  AGAAAATGATTAACACCTGTAATGAATACCAACAAAGGCACGGTAAGAAGACGCTTCTCG
1381  AGGTTCCCTGACATCTGATGATACATTTTCATTTCGCTCTGTTTACTTTTAACGCCCGATAGCGT
1441  GAAGAAAATGAGAGACGGAGAAAAAGCGATATTCAACAGCCCGATAAACAAGAGTCGTTA
1501  CCGGGCTGGCGAGGTTATCATGCGTTAAGCTGGTAGTCGAGGGTGATTTCCGCATTTCAGA
                                     5'-GTGATTTCCGCATTTCAGA
                                     P113
1561  ACCTGCGATACCGGGCACCCGGCTTTTGCTTTCTGGATGTTTGATCGAAAGTTGAAGCAT
ACCTG-3'                                     3'-CTAGCTTTCAACTTCGTA
      3'-CGCTATGGCCCTAGGGCCGAAAACG-5'                                     P56
                                     P126
1621  CA
      GT-5'
```

### Abb. 3: Gensequenz von *clyA* von *S. enterica* Serovar Paratyphi A ATCC 9150 mit Bindungsstellen der verwendeten Primer.

Weist ein Primer eine von *clyA* abweichende Basensequenz auf, ist dies kursiv dargestellt. Das ATG-Startcodon und das Stopcodon sind fettgedruckt und unterstrichen.

### 1.3.3. Sonstige Primer

Primer	Nukleotidsequenz	Bindungsstelle	Verwendungszweck
P-IS1-Sson	5'-GCGGAAATGGACGAACAGTG-3'	In IS1 von <i>Sh. sonnei</i>	Sequenzierungsprimer
pUC universal	5'-CAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3'	Polylinkerregion von pUC18 und pDrive Cloning Vector	Sequenzierungsprimer
pUC reverse	5'-GCGGATAACAATTTACACAGG-3'	Polylinkerregion von pUC18 und pDrive Cloning Vector	Sequenzierungsprimer

**Tab. 5: Sonstige in dieser Arbeit verwendete Primer.**

Die Bindungsstelle des Primers P-IS1-Sson ist in Abb. 22 eingezeichnet.

### 1.4. Technische Geräte

Material	Hersteller	Modell
Agarosegelelektrophoresekammer	Bio-Rad	Sub-Cell GT
Ausplattierer	Schütt	Petriturn Mplus
Autoklav	Integra	
Brutschrank	Heraeus	
Bunsenbrenner elektr.	Integra	Fireboy plus
Crosslinker	Biometra	
Dokumentationssystem f. Agarosegele	Cybertech	CS1+
Eismaschine	Scotsman	
Elektrische Waage	Sartorius	BP 110S
Elektroporationsgerät	Bio-Rad	Gene Pulser II
Gefrierschrank	Liebherr	Comfort
Gefrierschrank (-70°C)	Revco Scientific	ULT1786-9-V14
Hybridisierungsöfen	MWG-Biotech	Mini Oven
Inkubationsschüttler	Infors	HT AK 82
Kühl-Gefrier-Kombination	Siemens	Sikafrost
Kühlschrank	Liebherr	Profi line
Kühlschrank	Bosch	Economic super
Kühlschrank	Liebherr	Premium
Kühlzentrifuge	Heraeus	Varifuge
Magnetrührer	IKA	KMO 2 basic
Mikrowellenofen	Severin	
pH-Meter	Metrohm	654 pH-Meter
Photometer	Amersham	Ultrospec 3100
Pipette 1-20 µl	Gilson	Pipetman P20
Pipette 20-200 µl	Gilson	Pipetman P200
Pipette 200-1000 µl	Gilson	Pipetman P1000

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Modell</b>
Pipettierhilfe	Integra	Pipetboy acu
Schwenker	IKA	HS 250 basic
Sicherheitswerkbank	Kendro	Herasafe HS12
Thermocycler	Perkin Elmer	GeneAmp2400
Thermocycler	Techne	Progene 02D
Thermodrucker	Seiko	DPU-414
Thermomixer	Eppendorf	Comfort
Tischzentrifuge	Eppendorf	5415D
Tischzentrifuge	Eppendorf	Minispin plus
Tischzentrifuge	Hettich	Mikro 24-48R
UV-Transilluminator	Biometra	
Vakuumpumpe	KNF Laboport	N820.3FT.18
Vakuuszentrifuge	Eppendorf	5301
Vortexer	IKA	MS1 Minishaker
Wasserbad	GFL	1083
Zentrifuge	Eppendorf	5702R

**Tab. 6: Verwendete Technische Geräte.**

### 1.5. Verbrauchsmaterial

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Ausstrichösen	Greiner
Petrischalen	Greiner
Pipettenspitzen	Eppendorf
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße, 0,2 ml, Runddeckel (für PCR)	Biozym
Reaktionsgefäße, 0,2 ml, Flachdeckel (für DNA-Sequenzierungen)	Hybaid
Röhrchen, 10 ml, steril	Greiner

**Tab. 7: Verbrauchsmaterial.**

### 1.6. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den folgenden Herstellern bezogen: Merck, Roth, Sigma, Boehringer.

Es wurde stets der höchste zur Verfügung stehende Reinheitsgrad verwendet.

## 1.7. Stammlösungen

Lösung	Hinweis/Herstellung
1 M Tris-HCl pH 8,0	pH-Einstellung mit konz. HCl, autoklavieren
1 M Tris-HCl pH 7,5	
0,5 M Na EDTA pH 8,0	pH-Einstellung mit 10 N NaOH
3 M Na-Acetat pH 4,8	pH-Einstellung mit konz. Essigsäure
0,3 M Na-Citrat pH 7,0	
50 mM CaCl <sub>2</sub> + 20% Glycerin	

**Tab. 8: Stammlösungen.**

## 1.8. Antibiotika

Antibiotikum	Eigenschaften	Herstellung und Konzentrationen
Ampicillin (Amp)	Aminopenicillin, Hemmung der Zellwandsynthese von Bakterien	<b>Stammlösung</b> (100 mg/ml): 1 g Ampicillin-Na-Salz wird in 10 ml H <sub>2</sub> O gelöst. Anschließend wird die Lösung sterilfiltriert und in 1 ml-Portionen bei -20 °C eingefroren. <b>Endkonzentration:</b> 100 µg/ml (in Agarplatten und Flüssigmedien)
Chloramphenicol (Cm)	Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese durch Hemmung der Peptidyltransferase	<b>Stammlösung:</b> 30 mg/ml in Ethanol (Lagerung bei -20 °C) <b>Endkonzentration:</b> 30 µg/ml (in Agarplatten und Flüssigmedien)

**Tab. 9: Verwendete Antibiotika.**

## 1.9. Medien und Agarplatten für die Anzucht und Kultivierung von Bakterien

### 2×YT-Medium

16 g/l Bacto-Trypton

10 g/l Yeast-Extrakt

10 g/l NaCl

Bestandteile in 1,0 l H<sub>2</sub>O lösen und autoklavieren.

### **YT-Agarplatten und YT-Blutagarplatten**

8 g/l Bacto-Trypton

5 g/l Yeast-Extrakt

5 g/l NaCl

15 g/l Agar

Bestandteile in 1,0 l H<sub>2</sub>O vollständig lösen, autoklavieren und auf ca. 50°C abkühlen lassen.

In Petrischalen gießen.

Für die Herstellung von YT-Agarplatten mit Pferdeblut wird dem Agar vor dem Gießen defibriniertes Pferdeblut (Fa. Oxoid, 40 ml pro 1 l Agar) zugesetzt (Endkonzentration 4%).

Die Zugabe von Antibiotika erfolgt bei Bedarf unmittelbar vor dem Gießen des Agars (1,0 ml Ampicillin-Stammlösung [100 mg/ml in H<sub>2</sub>O] bzw. 1,0 ml Chloramphenicol-Stammlösung [30 mg/ml in Ethanol] pro 1,0 l Agarlösung).

### **YT-Agarplatten mit IPTG, X-Gal und Ampicillin**

4,0 g Bacto-Trypton

2,5 g NaCl

2,5 g Yeast-Extrakt

7,5 g Agar

Zutaten in 0,5 l H<sub>2</sub>O lösen und autoklavieren. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C 500 µl Ampicillin-Stammlösung (100 mg/ml in H<sub>2</sub>O), 750 µl X-Gal-Lösung (2% [w/v] in Dimethylformamid) und 250 µl 100 mM IPTG (in H<sub>2</sub>O) zugeben. In Petrischalen gießen.

### **2×YT/Glycerin-Gemisch**

Zur Dauerkultivierung von Bakterienstämmen: Glycerin und 2×YT-Medium im Verhältnis 1:1 mischen.

### 1.10. DNA-Polymerasen für die PCR

Polymerase	Hersteller	Reaktionspuffer
DeepVent-Polymerase	NewEngland Biolabs	10× Thermo-Pol-Puffer
Taq-Polymerase	Eppendorf	10× Taq-Puffer 5× Taq-Master
Pfu-Polymerase	Stratagene	10× Pfu-Puffer
Pwo-Polymerase	NewEngland Biolabs	10× Pwo-Puffer komplett

**Tab. 10: Verwendete Polymerasen.**  
Näheres und Eigenschaften s. 2.6.2.

### 1.11. Restriktionsenzyme

Enzym	Schnittstelle	Hersteller	Reaktionspuffer
BamHI	5'...G/GATCC...3' 3'...CCTAG/G...5'	NewEngland Biolabs	One-phor-All Buffer plus, 10× konz. (Amersham Biosciences)
EcoRI	5'...G/AATTC...3' 3'...CTTAA/G...5'	NewEngland Biolabs	
HindIII	5'...A/AGCTT...3' 3'...TTCGA/A...5'	NewEngland Biolabs	
PstI	5'...CTGCA/G...3' 3'...G/ACGTC...5'	NewEngland Biolabs	
RsaI	5'...GT/AC...3' 3'...CA/TG...5'	NewEngland Biolabs	
SaII	5'...G/TCGAC...3' 3'...CAGCT/G...5'	NewEngland Biolabs	
SphI	5'...GCATG/C...3' 3'...C/GTACG...5'	NewEngland Biolabs	

**Tab. 11: Restriktionsenzyme.**



### 1.12. Andere Enzyme

<b>Enzym</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Reaktionspuffer</b>	<b>Eigenschaften</b>
Lysozym	Sigma		Katalysiert den Abbau von Murein
Proteinase K	Boehringer Mannheim		Endopeptidase
RNase	NewEngland Biolabs		Katalysiert den Abbau von RNA
T4-DNA-Ligase	NewEngland Biolabs	10× Ligationspuffer (NewEngland Biolabs)	Katalysiert Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-P- und 3'-OH-Enden in Doppelstrang-DNA oder -RNA.

**Tab. 12: Andere Enzyme.**

### 1.13. Material für die Isolierung von chromosomaler DNA

#### **Lysispuffer**

100 mM Tris-HCl pH 8,0

5 mM Na-EDTA pH 8,0

200 mM NaCl

#### **LysozymbLösung**

10 mg Lysozym in 1,0 ml Lysispuffer lösen.

### **1.14. Material für die Isolierung von Plasmid-DNA**

#### **Lösung I**

25 mM Tris-HCl pH 8,0

50 mM Glucose

10 mM Na-EDTA

4 mg/ml Lysozym (wird unmittelbar vor Gebrauch zugesetzt)

H<sub>2</sub>O

#### **Lösung II**

0,2 N NaOH

1% SDS

H<sub>2</sub>O

Die Lösung II muss immer frisch angesetzt werden.

### **1.15. Material für die Agarosegelelektrophorese und für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

#### **Stoppuffer**

1 mg Bromphenolblau

5 g Saccharose

5 µl 500 mM Na-EDTA pH 8,0

H<sub>2</sub>O ad 10 ml

#### **10× TBE-Puffer**

55,62 g Borsäure

109,03 g Tris

9,31 g Na-EDTA

H<sub>2</sub>O ad 1 l

### Agarosegel 1%

1,5 g Agarose

135 ml H<sub>2</sub>O

15 ml 10×TBE-Puffer

15 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml in H<sub>2</sub>O)

Agarose in H<sub>2</sub>O und 10× TBE lösen. 3 Min. in der Mikrowelle (600 Watt) kochen, danach 5-8 Min. abkühlen lassen. Anschließend 15 µl Ethidiumbromidlösung zugeben. Gellösung in Gelkammer (15x15 cm) gießen, Luftblasen mit Pipette entfernen und Gel erstarren lassen. Durch Einsetzen von Kämmen werden Taschen erzeugt, in die die DNA-Lösung pipettiert wird. Das fertige Gel kann, eingeschlagen in Frischhaltefolie, im Kühlschrank bei 4°C oder in 1× TBE-Puffer aufbewahrt werden.

### SPP1-Marker/DNA-Längenstandards

2 µl SPP1-DNA (geschnitten mit EcoRI, 0,25 µg/µl,

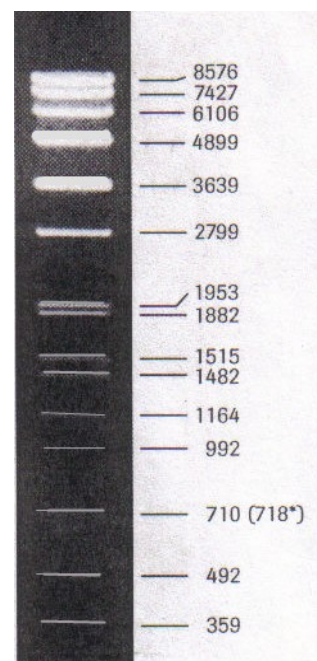
DNA Molecular Weight Marker VII von Roche)

8 µl H<sub>2</sub>O

5 µl Stopppuffer

#### Abb. 4: DNA-Längenstandard VII der Firma Roche.

Dieser DNA-Marker besteht aus den EcoRI-Fragmenten des Genoms des Phagen SPP1. Nach Auftrennung in einem Agarosegel sind 15 DNA-Fragmente folgender Größe zu erkennen: 8576 bp, 7427 bp, 6106 bp, 4899 bp, 3639 bp, 2799 bp, 1953 bp, 1882 bp, 1515 bp, 1482 bp, 1164 bp, 992 bp, 710 bp, 492 bp und 359 bp.



### TNE-Puffer

0,02 M Tris-HCl pH 7,5

1,5 M NaCl

0,001 M Na-EDTA

### 1.16. Material für Southern Blot-Analysen

## Material und Methoden

### **Denaturierungslösung**

0,5 N NaOH

1,5 M NaCl

H<sub>2</sub>O

### **Neutralisationspuffer**

0,5 M Tris-HCl pH 7,5

1,5 M NaCl

H<sub>2</sub>O

### **20×SSC-Puffer**

3 M NaCl

0,3 M Na<sub>3</sub>-Citrat pH 7,0

H<sub>2</sub>O

### **6×SSC-Puffer**

0,9 M NaCl

0,09 M Na<sub>3</sub>-Citrat pH 7,0

H<sub>2</sub>O

### **Alkalischer Transferpuffer**

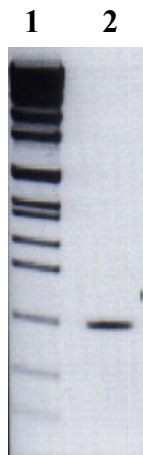
0,4 N NaOH

1 M NaCl

H<sub>2</sub>O

### ***clyA*-Gensonde**

Als *clyA*-Gensonde für alle Southern Blots wurde ein PCR-Produkt aus *E. coli* CC118 (ein Derivat von *E. coli* K-12), dem hier verwendeten Referenzstamm, verwendet. Dazu wurde mit den Primern P8 und P2 eine Standard-PCR mit Taq-Polymerase durchgeführt. Das PCR-Produkt (712 bp) wurde durch präparative Agarosegelelektrophorese isoliert. 1/20 Vol. des isolierten Fragmentes wurde nochmals auf ein Agarosegel aufgetragen um den DNA-Gehalt der Isolierung abzuschätzen. Nach Markierung mit dem ECL-Kit (Amersham) konnte das PCR-Produkt als Sonde verwendet werden.



**Abb. 5: *clyA*-Gensonde aus *E. coli* CC118 nach Isolierung durch präparative Agarosegelelektrophorese.**

Spur 1: DNA-Längenstandards

Spur 2: ca. 0,2 µg gereinigte *clyA*-Gensonde.

### **Hybridisierungspuffer (ECL-Kit/Amersham)**

100 ml Hybridisierungspuffer (ECL-Kit)

2,92 g NaCl (0,5 M Endkonzentration)

5,0 g Blocking Agent (ECL-Kit)

NaCl in Hybridisierungspuffer lösen. Unter Rühren Blocking Agent zugeben, 1 h weiterrühren. Puffer in 20 ml-Portionen abfüllen. Anschließend 30 Min.-1 h bei 42°C inkubieren. Der Puffer kann bei -20°C aufbewahrt werden.

### **Primärer Waschpuffer (niedrige Stringenz)**

6 M Harnstoff

0,4% SDS

2,5% 20×SSC-Puffer

H<sub>2</sub>O

### **Sekundärer Waschpuffer**

100 ml 20×SSC-Puffer

900 ml H<sub>2</sub>O

### **1.17. Kommerzielle Kits und Systeme**

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
Api 20 E	bioMerieux
MinElute Reaction Cleanup Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
ECL direct nucleic acid labelling and detection system (Kit für Southern Blots)	Amersham

**Tab. 13: Verwendete kommerzielle Kits und Systeme.**

Verwendung jeweils nach den Abgaben des Herstellers.

## 2. Methoden

### 2.1. Anzucht und Kultivierung der Bakterien

Für die laufenden Untersuchungen wurden die Bakterienstämme in Form von Einzelkolonieausstrichen auf Agarplatten kultiviert. Hierzu wurde jeweils eine Bakterienkolonie mittels Dreiösenausstrich auf einer Agarplatte ausgestrichen und diese dann über Nacht bei 37°C (im Brutschrank) inkubiert. Die Agarplatten mit den frisch ausgestrichenen Bakterien wurden bei 4°C gelagert. Mindestens alle 4 Wochen wurden die Stämme auf neue Agarplatten überimpft.

Zur Herstellung von Übernachtskulturen wurden jeweils 10-20 ml 2×YT-Medium in einem 100 ml-Erlenmeyerkolben (oder 3 ml 2×YT-Medium in einem 10 ml-Plastikröhrchen) mit einer Bakterienkolonie angeimpft. Im Fall von rekombinanten (plasmidtragenden) *E. coli*-Stämmen wurde auch das entsprechende Antibiotikum zugegeben, um einen Selektionsdruck für die Beibehaltung des Plasmids auszuüben (0,001 Vol. Ampicillin-Stammlösung [100 mg/ml in H<sub>2</sub>O] bzw. 0,001 Vol. Chloramphenicol-Stammlösung [30 mg/ml in Ethanol]). Die angesetzten Kulturen wurden über Nacht (16-18 h) bei 37°C unter Schütteln (200 UpM) inkubiert.

Von allen verwendeten Stämmen wurden Dauerkulturen mit einem Glycerin-Endgehalt von 25% angelegt. Dafür wurde eine Bakterienkolonie in 2 ml 2×YT-Medium inokuliert und die angesetzte Kultur über Nacht bei 37°C unter Schütteln (200 UpM) inkubiert. 0,5 ml der Übernachtskultur wurden am nächsten Tag mit 0,5 ml einer Glycerin/2×YT-Mischung (1:1) vermischt. Die Dauerkultur wurde bei -75°C gelagert. Bei Bedarf wurden wenige µl der Dauerkultur aufgetaut und auf einer Agarplatte ausgestrichen.

### 2.2. Identifizierung bzw. Verifizierung von Bakterienspecies

Zur Identifizierung bzw. Verifizierung von Bakterienspecies wurde das Api 20 E-System zur Identifizierung von *Enterobacteriaceae* der Firma bioMerieux verwendet („bunte Reihe“). Nach Herstellung einer Bakteriensuspension des zu überprüfenden Stammes wurde diese in 20 Mikroröhrchen mit verschiedenen Testreagenzien aufgetragen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Standardisierte Stoffwechselforgänge in den Röhrchen bewirken spezifische Farbänderungen, die mit Hilfe eines PC-Programms ausgewertet werden können.

### **2.3. Herstellen von Bakterienlysaten**

Um ein Bakterienlysat herzustellen, wurde eine Einzelkolonie des betreffenden Bakterienstammes in 100 µl H<sub>2</sub>O aufgelöst und 10 Min. bei 99°C inkubiert.

### **2.4. Isolierung der chromosomalen DNA von Bakterien**

Eine Bakterienkolonie wurde in 10 ml 2×YT-Medium in einem Erlenmeyerkolben über Nacht bei 37°C im Schüttler (200 UpM) inkubiert.

Am nächsten Tag wurden 1,3 ml der Übernachtskultur in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 5 Min. zentrifugiert (Tischzentrifuge, 12000 UpM). Nach Entfernung des Überstands wurden die sedimentierten Bakterien in 400 µl Lysispuffer resuspendiert. Dann erfolgte die Zugabe von 100 µl Lysozymlösung und der Ansatz wurde 15 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 10 µl 10% SDS und 5 µl Proteinase K (10 mg/ml in A. dest.) zugegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht unter Bewegung bei 55°C. Am nächsten Tag wurde die DNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol ausgefällt und konnte dem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit einer Pipettenspitze entnommen werden. Die DNA wurde zunächst in 1 ml Ethanol p.a. überführt und direkt anschließend in 1 ml 70% Ethanol p.a. gewaschen. Danach wurde die DNA in ein leeres Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und ca. 5 Min. im Vakuum getrocknet. Die DNA wurde schließlich in 50 µl H<sub>2</sub>O (+20 µg/ml RNase) gelöst und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

### **2.5. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde von dem betreffenden *E. coli*-Stamm zunächst eine Übernachtskultur in 2×YT-Medium mit entsprechendem Antibiotikum hergestellt. 1,4 ml der Übernachtskultur wurden 2 Min. abzentrifugiert (Tischzentrifuge, 12000 UpM) und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde in 100 µl eiskalter Lösung I resuspendiert und 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von 200 µl Lösung II, danach eine 2-minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurde der Ansatz mit 150 µl eiskaltem 3 M Na-Acetat pH 4,8 versetzt, gemischt und 5 Min. auf Eis inkubiert. Die präzipitierte chromosomale DNA und die Proteine wurden durch 5-minütige Zentrifugation pelletiert. Der Überstand mit der darin gelösten Plasmid-DNA wurde mit einem Gemisch aus 100 µl Phenol und 100 µl Chloroform versetzt. Nach kräftigem Mischen wurde 4 Min. in der



Tischzentrifuge zentrifugiert (12000 UpM), der wässrige Überstand abgezogen und die darin enthaltene Plasmid-DNA durch Zugabe von 1 ml Ethanol p.a. ausgefällt. Nach 2 Min. Inkubation bei Raumtemperatur wurde die präzipitierte Plasmid-DNA abzentrifugiert (Tischzentrifuge, 12000 UpM, 5 Min.). Das DNA-Pellet wurde mit 1 ml Ethanol gewaschen, dann im Vakuum getrocknet und anschließend in 20 µl H<sub>2</sub>O mit 20 ng/µl RNase gelöst. Für Sequenzierungen wurden Plasmide mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen gemäß den Anweisungen des Herstellers isoliert.

## 2.6. PCR

### 2.6.1. Prinzip der PCR

Ziel der PCR ist die Amplifizierung definierter DNA-Abschnitte.

In der PCR wird die DNA enzymatisch vervielfältigt. In einer Standard-PCR wird die zu vermehrende DNA (template DNA) mit zwei Oligonukleotidprimern, einer thermostabilen DNA-Polymerase sowie mit Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) und einem Reaktionspuffer versetzt. Die einzelnen Schritte der PCR umfassen (i) die Denaturierung der DNA, (ii) die Bindung der Primer („Annealing“) und (iii) die DNA-Synthese ausgehend von den Primern („Extension“).

Im Denaturierungsschritt wird die Doppelstrang-DNA bei 94°C in Einzelstränge aufgetrennt. Die Denaturierungszeit sollte möglichst kurz sein, um Enzyminaktivierung und/oder Zerstörung des Templates zu vermeiden. Im Annealingschritt binden die Oligonukleotidprimer an die passenden DNA-Sequenzen. Die Annealing-Temperatur sollte nahe an der Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) der verwendeten Primer liegen, um die Spezifität des gewünschten PCR-Produktes zu erhöhen. Dafür sollten, wenn möglich, zwei Primer mit ähnlicher T<sub>m</sub> gewählt werden. Im anschließenden Extensionsschritt lagern sich mit Hilfe der DNA-Polymerase die Nukleotide an. Der Primer wird so enzymatisch verlängert, wobei der Template-DNA-Strang als Matrize dient. Es entsteht ein komplementärer DNA-Strang und somit wieder ein doppelsträngiges DNA-Fragment. Die Extensionszeit ist von der Länge des erwarteten PCR-Produktes abhängig und muss ausreichend lang sein, um eine optimale Synthese zu ermöglichen.

Diese Schritte werden so oft wiederholt, bis eine hohe Anzahl an DNA-Kopien entstanden ist. Bei einer Standard-PCR werden i.d.R. 25-30 Zyklen durchgeführt.

## 2.6.2. Durchführung der PCR

	<b>DeepVent-Polymerase</b>	<b>Taq-Polymerase</b>	<b>Pfu-Polymerase</b>	<b>Pwo-Polymerase</b>
<b>Menge</b>	1 µl (bei 2U/µl)	1 µl (bei 5U/µl)	1 µl (bei 2,5-5 U/µl)	2 µl (bei 2,5-5 U/µl)
<b>Puffer</b>	10 µl 10× Thermo-Pol-Puffer	10 µl 10× Taq-Puffer	10 µl 10× Pfu-Puffer	10 µl 10× Pwo-Puffer komplett
<b>Primer X (1µg/µl)</b>	1 µl	1 µl	1 µl	1µl
<b>Primer Y (1µg/µl)</b>	1 µl	1µl	1µl	1µl
<b>10 mM dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Boehringer)</b>	2 µl	2 µl	2µl	2 µl
<b>Sonstiges</b>	evtl. 2 µl MgSO <sub>4</sub>	20 µl 5× Taq Master		
<b>Template</b>	2-10 µl Lysat bzw. chromosomale DNA			
<b>H<sub>2</sub>O</b>	ad 100 µl			
<b>Endvolumen</b>	100 µl			
<b>Anzahl der Replikationszyklen</b>	30			
<b>Inkubations-temperatur und Inkubationszeiten pro Zyklus</b>	Denaturierung: 94°C/30 Sek. (beim 1. Zyklus 3 Min. länger) Annealing: 50-55°C/30 Sek. Extension: 72°C/1 Min. pro kb (beim letzten Zyklus 3 Min. länger) Abkühlung: 4°C			

Tab. 14: Zusammensetzung der Standard-PCR-Ansätze.

Bei jeder PCR wurden 30 Zyklen durchgeführt. Denaturiert wurde stets 30 Sekunden bei 94°C (beim 1. Zyklus 3 Min. länger). Die Annealingzeit betrug 30 Sekunden, die Annealingtemperatur war variabel (50°C bzw. 55°C). Extendiert wurde jeweils bei 72°C, beim letzten Zyklus wurde die Inkubation bei 72°C um 3 Min. verlängert. Die Extensionszeit wurde abhängig vom verwendeten Template bzw. der erwarteten Größe des PCR-Produktes gewählt (1 Min./kb Template).

Standard PCR-Analysen wurden mit Taq-Polymerase durchgeführt. Die Taq-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* wurde 1987 eingeführt. Sie zeichnet sich durch eine hohe Umsatzgeschwindigkeit (ca. 2800 Nukleotide/Min.) aus. Die Fehlerrate ist aber relativ hoch, da eine "Proofreading"-Aktivität fehlt [45]. Die Taq-Polymerase besitzt keine 3'-Exonuclease-

Aktivität. Durch endständige Transferase-Aktivität entstehen PCR-Produkte mit einem A-Überhang, was beim Klonieren des Fragmentes beachtet werden muss.

Weiterhin wurde DeepVent-Polymerase verwendet. Die DeepVent-Polymerase (aus *Pyrococcus* spp.) zeichnet sich durch „Proofreading“-Aktivität und eine geringe Fehlerrate beim Einbau der Nukleotide aus. Ungünstiger ist die geringere Polymerisationsrate. Die 3'-5'-Exonuclease-Aktivität kann eine Primerdegradation verursachen. Deshalb sollte darauf geachtet werden, die Polymerase immer als letzte Komponente zum PCR-Ansatz hinzuzufügen, da sonst die Primer geschädigt werden können. Bei der PCR mit DeepVent-Polymerase werden DNA-Fragmente mit glatten Enden („blunt ends“) erzeugt, da keine endständige Transferase-Aktivität besteht.

In einigen Versuchen wurde Pfu-Polymerase verwendet. Sie weist eine Umsatzgeschwindigkeit von ca. 550 Nukleotiden/Min. auf und wird aus *Pyrococcus furiosus* isoliert. Auch hier fehlt eine endständige Transferaseaktivität. Die Pfu-Polymerase weist „Proofreading“-Aktivität auf und ist wie die Taq- und die DeepVent-Polymerase thermostabil.

Die ebenfalls thermostabile Pwo-Polymerase aus *Pyrococcus woesei* generiert DNA-Fragmente mit glatten Enden und zeichnet sich ebenfalls durch „Proofreading“-Aktivität aus.

## 2.7. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

a) Standard-Ansatz für die Spaltung von Plasmiden und PCR-Produkten:

0,1-1,0 µg DNA (z.B. 2 µl Plasmidlösung)

1 µl Restriktionsenzym X (5-20 U/µl)

1 µl Restriktionsenzym Y (5-20 U/µl) (bei Bedarf)

1 µl One-phor-All-Buffer plus, 10× konzentriert

H<sub>2</sub>O ad 10µl

Für die Spaltung größerer DNA-Mengen wurde entsprechend mehr Restriktionsenzym eingesetzt und das Gesamtvolumen des Ansatzes entsprechend vergrößert. Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch eine Inkubation für 10 Min. bei 68°C oder durch Zugabe von 0,5 Vol. Stoppuffer beendet. Mit Stoppuffer versetzte Reaktionsansätze wurden anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 2.9). Mit Hilfe eines DNA-Größenmarkers (DNA Molecular Weight Marker VII, Roche) konnte die Größe der bei der Restriktionsspaltung entstandenen DNA-Fragmente bestimmt werden.

b) Standard-Ansatz zur Fragmentierung von chromosomaler DNA mit EcoRI/HindIII

2-5 µl chromosomale DNA

1,5 µl HindIII (20 U/µl)

1,5 µl EcoRI (20 U/µl)

1,5 µl One-phor-All-Buffer plus (10× konzentriert)

H<sub>2</sub>O ad 15µl

Der Ansatz wurde 3 h bei 37°C inkubiert.

## **2.8. Reinigung und Konzentrierung von DNA**

### **2.8.1. Phenol/Chloroform-Extraktion und Präzipitation der DNA mit Ethanol**

Um Plasmid-DNA oder DNA-Fragmente von Verunreinigungen (z.B. Enzymen) zu befreien, wurde die DNA-Lösung (i.d.R. 40-100 µl) mit der gleichen Menge Phenol gemischt und 4 Min. zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde mit Hilfe einer Pipette abgetrennt und mit 1 Vol. Phenol/Chloroform (1:1) versetzt. Nach 4 Minuten Zentrifugation wurde die wässrige Phase abgezogen und mit 1 Vol. Chloroform gemischt. Nach erneuter 4-minütiger Zentrifugation wurde wiederum die wässrige Phase isoliert. Um die DNA in der wässrigen Phase auszufällen, wurde anschließend 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat pH 4,8 und 2,5 Vol. Ethanol p.a. zugegeben. Die DNA wurde 20 Min. bei -70°C ausgefällt. Danach wurde die DNA abzentrifugiert (Tischzentrifuge, 12000 UpM, 5 Min.), der Überstand entfernt und das DNA-Pellet zweimal mit je 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde anschließend im Vakuum 10-15 Min. getrocknet und in 10 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

### **2.8.2. DNA-Filtration durch eine Silicagel-Membran (QIAquick PCR Purification Kit bzw. MinElute Reaction Cleanup Kit [Qiagen])**

Alternativ wurden DNA-Fragmente und PCR-Produkte mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits bzw. des MinElute Reaction Cleanup Kits der Firma Qiagen gemäß den Herstelleranweisungen von Primern, der Polymerase, Salzen und Nukleotiden gereinigt. Dabei wurde das Volumen der DNA-Lösung auf 30 µl bzw. 10 µl (MinElute Reaction Cleanup Kit) reduziert. Die DNA wurde nach dem Reinigungsschritt in H<sub>2</sub>O gelöst.

## **2.9. Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarosegelelektrophorese**

PCR-Ansätze bzw. gereinigte PCR-Produkte und Restriktionsansätze wurden mit ½ Vol. Stoppuffer versetzt und auf ein 1%iges, horizontales Agarosegel aufgetragen. Der Stoppuffer inaktiviert DNA-modifizierende Enzyme im Ansatz (z.B. Restriktionsenzyme, Polymerasen etc.) und erhöht die Dichte der DNA-Probe (durch hohen Sucrose-Gehalt). Dies führt zum Absinken der DNA in der Geltasche. Nicht zuletzt visualisiert der Stoppuffer die Auftrennung der DNA im Agarosegel.

Die Gele wurden etwa 45 Min. bei 200 V in einer Elektrophoresekammer laufen gelassen, wobei die DNA-Fragmente aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode wandern. Die Wanderungsstrecke hängt von ihrer Größe ab.

Nach Beendigung der Agarosegelelektrophorese wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht. Das Ergebnis wurde fotografiert. Zur Abschätzung der Größe wurde stets ein Größenmarker (DNA Molecular Weight Marker VII, Roche) verwendet. Als Laufpuffer wurde bei der Agarosegelelektrophorese 1× TBE eingesetzt. Enthält eine DNA-Bande weniger als 25 ng DNA, ist sie meist nicht erkennbar.

## **2.10. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Der Teil des Agarosegels oberhalb der gewünschten Banden wurde mit einem Skalpell abgetrennt und verworfen. Unmittelbar unterhalb der Banden wurden Taschen eingeschnitten, die seitlich ebenfalls durch einen Skalpellschnitt begrenzt wurden. In diese Taschen wurden auf eine Größe von ca. 1 cm x 0,5 cm zurechtgeschnittene, 30 Min. in 2,5 M NaCl inkubierte und mit H<sub>2</sub>O gespülte DEAE-Membranplättchen (NA 45, Schleicher & Schuell) eingelegt. Anschließend wurde die Elektrophorese für ca. 10-12 Min. bei 200 V fortgesetzt, um die DNA auf die Membranplättchen auflaufen zu lassen. Danach wurden die Membranplättchen aus dem Agarosegel entfernt und zweimal in je 1 ml H<sub>2</sub>O gespült.

Die Membranplättchen wurden dann zur Ablösung des DNA-Fragmentes von der Membran mit 150 µl TNE-Puffer versetzt und bei 37°C/400 UpM inkubiert. Nach 1 h wurde der Puffer mit der gelösten DNA abgezogen und das Volumen gemessen. Die DNA wurde wie in 2.8.1. beschrieben durch Extraktion mit Phenol, Phenol/Chloroform und Chloroform von Verunreinigungen befreit und anschließend durch Zugabe von 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat pH 4,8 und 2,5 Vol. Ethanol ausgefällt. Die präzipitierte DNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und in H<sub>2</sub>O aufgenommen.

1/10 Vol. des fertigen Isolates wurde erneut auf ein Agarosegel aufgetragen, um die korrekte Isolierung der Zielbande zu bestätigen und um die Menge des isolierten Fragmentes abzuschätzen.

Alternativ wurden einzelne DNA-Banden auch mit dem QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen isoliert.

### **2.11. Bestimmung der DNA-Konzentration**

Die DNA-Konzentration von PCR-Produkten und Plasmiden wurde mittels UltraviolettabSORptionsspektrometrie ermittelt. Dabei ist die Menge der ultravioletten Strahlung, die von einer DNA-Lösung absorbiert wird, ihrem DNA-Gehalt direkt proportional. Bei Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht ein Absorptionswert von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA. Zur Messung wird die DNA-Lösung 1:50 in einem Gesamtvolumen von 100 µl mit H<sub>2</sub>O verdünnt und gegen Leerwert (H<sub>2</sub>O) gemessen.

### **2.12. Klonierung von DNA-Fragmenten**

Die Technik des Klonierens umfasst die Insertion eines DNA-Fragmentes in einen Vektor und das Einbringen des rekombinanten Vektors in eine Wirtszelle. Durch die Klonierung kann man ein bestimmtes Gen unabhängig von seinem ursprünglichen Umfeld analysieren. Als Vektoren dienen i.d.R. Plasmide, d.h. DNA-Ringe, die sich unabhängig vom Chromosom der Wirtszelle vermehren. Neben ein bis zwei Genen, die für Antibiotikaresistenzen kodieren, enthalten diese Plasmide eine DNA-Sequenz, die als Startpunkt für die Replikation dient („origin of replication“) sowie mehrere Restriktionsschnittstellen, in die fremde DNA-Fragmente inseriert werden können.

#### **2.12.1. Vorbereitung von Vektor und Insertfragment**

Zur Klonierung wird der Vektor aufgeschnitten. Dies erfolgt mit Restriktionsenzymen, welche DNA an spezifischen Stellen schneiden. Die Restriktionsspaltung kann, abhängig vom jeweils verwendeten Restriktionsenzym, glatte Enden („blunt ends“) oder überhängende Enden („sticky ends“) des DNA-Moleküls erzeugen.

Als Insertfragment wurden hier ausnahmslos PCR-Produkte verwendet. Entsteht bei der PCR ein einzelnes, sauberes Fragment, so kann das PCR-Produkt direkt zur Ligation in ein Plasmid

verwendet werden. Entstehen neben der gewünschten Bande auf dem Agarosegel noch Nebenbanden (Artefakte), so muss das Fragment zunächst aus dem Gel isoliert werden (siehe 2.10.)

### **2.12.2. Ligation**

Das zu klonierende DNA-Fragment wird zum aufgeschnittenen Vektor gegeben und mit DNA-Ligase versetzt. Diese katalysiert die konvalente Verknüpfung sowohl glatter als auch überhängender Enden über die Bildung von Phosphodiesterbindungen.

Effizienter ist die Ligation von überhängenden „klebrigen“ Enden („sticky ends“), dies erfordert jedoch, dass das zu klonierende Fragment überhängende Enden besitzt, die zu den überhängenden Enden des Vektors komplementär sind. Dies wird erreicht durch das Schneiden beider Komponenten mit dem gleichen Restriktionsenzym (oder den gleichen Restriktionsenzymen).

Standard-Ligationsansatz:

0,05-0,2 µg linealisierter Vektor

0,1-0,4 µg DNA-Fragment (Insert-Fragment)

1,5 µl 10× Ligationspuffer

1-2 U T4-DNA-Ligase

H<sub>2</sub>O ad 15 µl

Der Ansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert.

Für einige Klonierungen wurde der pDrive Cloning Vector der Firma Qiagen verwendet. Es handelt sich um ein 3,85 kb-Plasmid, welches in linearer Form an beiden Enden einen U-Überhang aufweist und somit optimal für Ligationen mit PCR-Produkten mit A-Überhang geeignet ist. Dies ist der Fall bei mit Taq-Polymerase generierten PCR-Produkten und anderen PCR-Produkten, die durch Polymerasen ohne „Proofreading“-Aktivität entstehen. Der pDrive Cloning Vector lässt sich durch Ampicillin- bzw. Kanamycin-Resistenz und durch blau/weiß-Selektion (siehe 2.12.6.) selektionieren.

Die Ligation und die Transformation mit dem pDrive Cloning Vector erfolgte gemäß den Anweisungen von Qiagen. Der Ligationsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

4 µl Insert (z.B. isoliertes und gereinigtes PCR-Produkt)

1 µl pDrive Cloning Vector

5 µl Ligation Master Mix

Die Inkubation erfolgte für 4 h bei 16°C. Das fertige rekombinante Plasmid wurde anschließend in einen Bakterienstamm (hier *E. coli* DH5α) eingebracht (Transformation). Damit *E. coli*-Zellen Plasmide aufnehmen können, müssen sie vorbehandelt – kompetent gemacht – werden.

Ob die Wirtszelle das Plasmid aufgenommen hat, muss mit Selektionsmechanismen überprüft werden.

### **2.12.3. Herstellung kompetenter Zellen von *E. coli* DH5α**

300 µl einer Übernachtskultur von *E. coli* DH5α wurden in 30 ml 2×YT-Medium verdünnt und unter Bewegung (200 UpM) bei 37°C inkubiert. Nach Erreichen einer optischen Dichte (OD) von 0,7-0,8 bei einer Wellenlänge von 600 nm wurden die Zellen abzentrifugiert (10 Min., 4°C, 6000 UpM). Die pelletierten Zellen wurden in 10 ml eiskaltem 50 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Anschließend wurden 15 ml eiskaltes 50 mM CaCl<sub>2</sub> zugegeben und der Ansatz nach Resuspendierung der Bakterien für 30 Min. auf Eis inkubiert. Danach wurde erneut abzentrifugiert (s.o.). Die sedimentierten Zellen wurden in 3 ml eiskaltem 50 mM CaCl<sub>2</sub>/20% Glycerin resuspendiert und in Portionen von je 200 µl in vorgekühlten Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei –75°C gelagert.

Die nun kompetenten Zellen konnten nach dem Auftauen für Transformationen verwendet werden.

### **2.12.4. Transformation**

10 µl eines Ligationsansatzes wurden mit 200 µl kompetenten *E. coli* DH5α-Zellen gemischt und 20-30 Min. auf Eis inkubiert, anschließend 3 Min. bei 43°C. Der Ansatz wurde danach sofort 20-30 Min. auf Eis abgekühlt. Es erfolgte die Zugabe von 1 ml 2×YT-Medium. Der Ansatz wurde bei 37°C/400 UpM inkubiert und nach 1 h auf zwei YT-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin, 30 µg/ml X-Gal und 0,05 mM IPTG ausplattiert. Auf der ersten Platte wurden 1/10 Vol. des Transformationsansatzes ausplattiert, auf der zweiten Platte die verbleibenden 9/10 Vol. Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.



Einzelkolonien, die auf den Transformationsplatten gewachsen waren, wurden mit sterilen Zahnstochern auf eine frische Agarplatte gepickt und erneut über Nacht bei 37°C inkubiert. Gleichzeitig wurden von den gepickten Klonen Übernachtskulturen (in 2×YT-Medium + Ampicillin [100µg/ml]) angesetzt, welche bei 37°C und 200 UpM inkubiert wurden. Aus diesen Übernachtskulturen wurde dann am nächsten Tag die Plasmid-DNA isoliert (siehe 2.5.) und durch Restriktionsspaltung analysiert.

#### **2.12.5. Selektion der transformierten *E. coli*-Zellen durch Antibiotikaresistenz**

Um bei der Transformation die Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben, von den nichttransformierten Zellen zu selektionieren, wurde die Gegebenheit ausgenutzt, dass Klonierungsvektoren Antibiotikaresistenzgene enthalten. Bei Anwesenheit eines entsprechenden Antibiotikums in den Transformationsagarplatten (im Falle von pUC18 und pDrive Cloning Vector: Ampicillin) konnten somit nur diejenigen *E. coli*-Zellen überleben und Kolonien bilden, die das Plasmid aufgenommen hatten.

#### **2.12.6. Selektion mit IPTG und X-Gal (blau/weiß-Selektion)**

Um sicher zu gehen, dass die transformierten Zellen nicht nur den Ausgangsvektor, sondern den Vektor mit dem klonierten DNA-Fragment enthalten, wurde eine zusätzliche Selektionsmethode angewandt.

Normalerweise ist in den *E. coli* DH5α-Zellen, welche für die Transformation verwendet wurden, das *lacZ*-Gen durch das Fehlen eines Gensegmentes defekt. Dies bedeutet, dass diese Zellen das Enzym β-Galaktosidase nicht bilden können, welches in vivo Laktose in Galaktose und Glukose spaltet. Weiterhin kann β-Galaktosidase den künstlichen Zucker X-Gal spalten, wobei ein blauer Farbstoff entsteht.

Nimmt *E. coli* DH5α ein Plasmid auf, welches das fehlende Gensegment für β-Galaktosidase enthält (wie z.B. pDrive Cloning Vector [Qiagen] und pUC18), so wird X-Gal gespalten und die Kolonien erscheinen blau. Das *lacZ*-Fragment dieser Vektoren wird allerdings inaktiviert, sobald die Vektoren ein fremdes DNA-Fragment als Insert aufnehmen, da die für Klonierungen verwendeten Restriktionsschnittstellen des Vektors innerhalb dieses *lacZ*-Fragments liegen. Dies bedeutet, dass *E. coli* DH5α-Zellen, welche ein korrektes Plasmid mit dem gewünschten Insert enthalten, auf einer Agarplatte mit X-Gal und IPTG weiße Kolonien bilden.

Der Zusatz von IPTG ist erforderlich, um das *lac*-Operon von *E. coli* zu induzieren.

### **2.13. Einführung von Plasmiden in Bakterien durch Elektroporation**

Eine weitere Technik, mit der Plasmide in Wirtszellen eingebracht werden können, ist die Elektroporation. Dabei werden die kompetenten Zellen einem kurzen elektrischen Impuls ausgesetzt, welcher die Zellmembran kurzfristig durchlässig macht, so dass DNA-Moleküle aufgenommen werden können. Die Zellmembran regeneriert sich anschließend wieder.

#### **2.13.1. Herstellung elektrokompetenter Zellen**

400 µl Übernachtskultur des betreffenden Bakterienstammes wurden in 40 ml 2× YT-Medium verdünnt und bei 37°C so lange inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> (optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge) von 0,7-0,8 erreicht war. Anschließend wurde die Kultur 15-30 Min. auf Eis gestellt und dann abzentrifugiert (10 Min., 4°C, 4800 UpM). Der Überstand wurde entfernt und das Bakterienpellet in 40 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O suspendiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation (s.o.). Das Zellpellet wurde in 500 µl 10% Glycerin (eiskalt) resuspendiert und anschließend in 100 µl-Portionen bei -75°C eingefroren.

#### **2.13.2. Durchführung der Elektroporation**

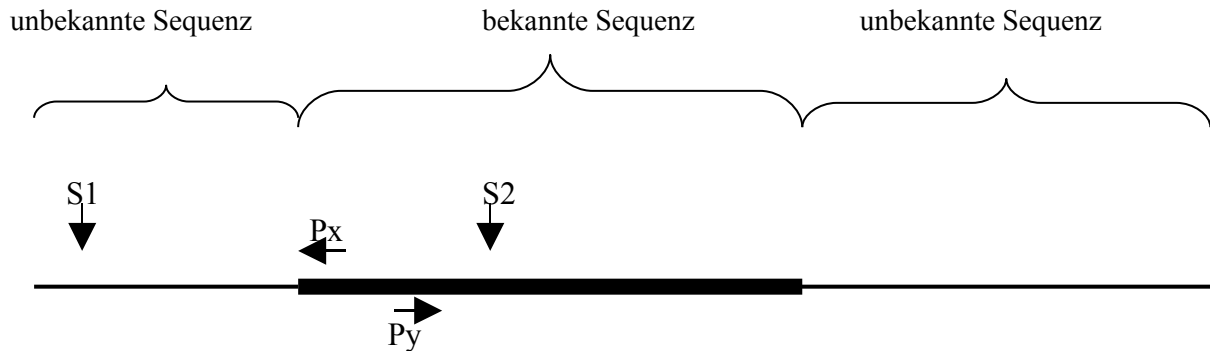
100 µl elektrokompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 1-2 µl isolierte Plasmide zugegeben und der Ansatz 30 Sek.-1 Min. auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen in eine gekühlte, sterile 0,2 cm-Küvette überführt und in das Elektroporationsgerät gestellt.

Die Elektroporation wurde bei 25 µF, 2,5 kV und 200 Ω durchgeführt. Nach der Elektroporation wurden die Zellen mit 1 ml 2×YT-Medium versetzt und bei 37°C inkubiert. Nach 1 h wurden die Zellen auf YT-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert.

## 2.14. Inverse PCR

Mit der Technik der Inversen PCR kann ein unbekanntes DNA-Fragment, welches an ein bekanntes DNA-Fragment angrenzt, analysiert werden.

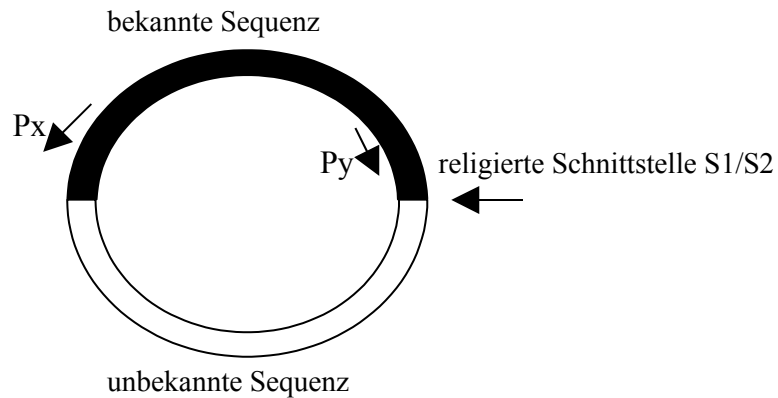
### 2.14.1. Prinzip der Inversen PCR



**Abb. 6: Methode der Inversen PCR (1).**

Erläuterung siehe Text.

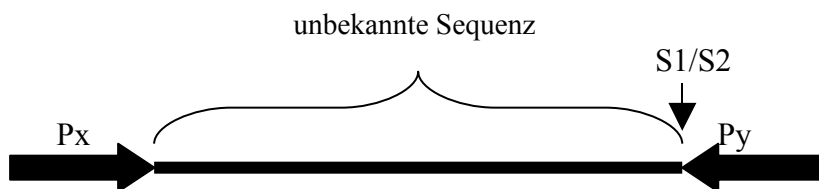
Die DNA wird mit einem Enzym geschnitten, welches in der bekannten Sequenz schneidet (Schnittstelle S2). Auch in der unbekannt Sequenz wird das Enzym – an unbekannter Stelle – schneiden (Schnittstelle S1) (Abb. 6). Die beiden Enden des erzeugten DNA-Fragments werden miteinander ligiert, so dass ein DNA-Ring entsteht, welcher teilweise aus bekannter und teilweise aus unbekannter DNA besteht (Abb. 7). Die Ligationsstelle trennt die bekannte von der unbekannt Sequenz. Dieser DNA-Ring dient anschließend als Template für eine PCR.



**Abb. 7: Methode der Inversen PCR (2).**

Erläuterung siehe Text.

Diese PCR wird mit zwei Oligonukleotidprimern, Px und Py, durchgeführt, welche bei Bindung an die ursprüngliche, lineare DNA divergent orientiert wären. Bei Verwendung des zirkularisierten DNA-Fragments als Template sind sie jedoch aufeinander zu gerichtet. Bei der Inversen PCR entstehen folglich viele lineare Kopien der unbekannt Sequenz (Abb. 8).



**Abb. 8: Methode der Inversen PCR (3).**  
Erläuterung siehe Text.

Falls die verwendeten Primer künstliche Schnittstellen enthalten, kann das PCR-Produkt mit den passenden Restriktionsenzymen geschnitten werden. Danach kann das DNA-Fragment kloniert und sequenziert werden. Auch eine direkte Sequenzierung des PCR-Produktes ist möglich. Nach dem gleichen Verfahren kann eine unbekannte Sequenz am 3'-Ende einer bekannten DNA-Sequenz analysiert werden.

#### 2.14.2. Durchführung der Inversen PCR

Zunächst wurde 1 µl der chromosomalen DNA des zu untersuchenden Bakterienstammes in einem Reaktionsansatz von 20 µl mit 20 U des ausgewählten Restriktionsenzymes verdaut. Der Ansatz wurde hierzu 3 h bei 37°C inkubiert und anschließend 10 Min. bei 68°C hitzeinaktiviert. Anschließend wurde das Volumen mit H<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt. Es folgte eine Reinigung der DNA mittels Phenol/Chloroform-Extraktion (siehe 2.8.1.). Die entstandenen DNA-Fragmente wurden nun zirkularisiert. Dazu wurden die in 10 µl H<sub>2</sub>O gelösten Fragmente mit 5 µl 10× Ligationspuffer, 1 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl) und 34 µl H<sub>2</sub>O versetzt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 16°C ligiert und anschließend 15 Min. bei 68°C hitzeinaktiviert. Es erfolgte die Zugabe von 0,1 Vol. Na-Acetat pH 4,8 und 2,5 Vol. Ethanol p.a. Der Ansatz wurde 20 Min. bei -70°C inkubiert und dann zur Pelletierung der präzipitierten DNA 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet einmal mit

70% Ethanol gewaschen, 10 Min. im Vakuum getrocknet und letztendlich in 10  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  gelöst.

Die so gereinigten, religierten Fragmente konnten nun als PCR-Template verwendet werden. Durchgeführt wurde die PCR standardmäßig mit Taq-Polymerase bzw. DeepVent-Polymerase. Da die Länge des PCR-Produktes aufgrund der unbekanntenen Lage einer der beiden Restriktionsschnittstellen nicht vorausgesagt werden konnte, wurde bei der Inversen PCR eine relativ lange Extensionszeit von 2 Min. gewählt. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes und die PCR-Bedingungen entsprachen ansonsten denen einer Standard-PCR. Auch bei der Inversen PCR wurden 30 Zyklen durchgeführt.

### **2.15. DNA-Sequenzierung**

Alle DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma Seqlab (Sequence Laboratories Göttingen GmbH) durchgeführt.

Die Nukleotidsequenz von DNA-Fragmenten wurde dabei durch automatisierte Cycle-Sequenzierung analysiert. Die Sequenzierungen wurden nach Anweisung von Seqlab folgendermaßen vorbereitet: Für sog. Hotshot-Sequenzierungen (Leseweite  $<500$  bp) wurden in einem 0,2-ml-Reaktionsgefäß 0,6  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA bzw. 40-200 ng PCR-Produkt mit 20 pmol Sequenzierungsprimer gemischt und mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf ein Gesamtvolumen von 7  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Für längere Sequenzierungen wurden ca. 3  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA (200 ng/ $\mu\text{l}$  in  $\text{H}_2\text{O}$ ) bzw. 1  $\mu\text{g}$  PCR-Produkt (50 ng/ $\mu\text{l}$  in  $\text{H}_2\text{O}$ ) pro 1 kb Länge des PCR-Produkts in ein Reaktionsgefäß abgefüllt und der zugehörige Sequenzierungsprimer (100 pmol; 10 pmol/ $\mu\text{l}$ ) in einem separaten Reaktionsgefäß mitgeliefert.

Für die direkte Sequenzierung von PCR-Produkten wurden die jeweiligen PCR-Primer und z.T. auch intern bindende Primer als Sequenzierungsprimer verwendet. Für die Sequenzierung von klonierten DNA-Fragmenten (d.h. von Insertfragmenten in pUC18 bzw. pDrive Cloning Vector) wurden meist die Sequenzierungsprimer pUC universal und pUC reverse (siehe auch 1.3.3.) verwendet, die unmittelbar vor bzw. hinter den Polylinkerregionen (MCS-Regionen) von pUC18 und pDrive Cloning Vector binden und dabei jeweils zur Polylinkerregion hin orientiert sind.

## 2.16. Southern Blot

Die Methodik des „Blottens“ wurde 1975 von E. M. Southern entwickelt. Bei diesem Vorgang wird zuvor fragmentierte und elektrophoretisch aufgetrennte DNA auf einer Membran fixiert. Mit Hilfe einer Gensonde können dann bestimmte Gensegmente identifiziert und visualisiert werden.

Bei den hier durchgeführten Southern Blot-Analysen wurde die Detektion mit dem ECL direct nucleic acid labelling and detection system von Amersham durchgeführt. Die Methode basiert auf direkter Markierung der DNA-Sonde mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase mit Hilfe von Glutaraldehyd.

Das Detection Reagent 1 zerfällt zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), welches das Substrat für die Meerrettich-Peroxidase darstellt und von dieser reduziert wird. Bei dieser Reduktion entsteht ein  $O_2$ -Radikal, welches dann das im Detection Reagent 2 enthaltene Luminol unter Lichtemission oxidiert. Auf einem entsprechend sensitiven Film (Hyperfilm-ECL) kann dies nachgewiesen werden. DNA-Fragmente auf der Membran, die die markierte DNA-Sonde gebunden haben, werden somit nach Auflegen eines solchen Films als schwarze Banden sichtbar.

### 2.16.1. Southern Blot-Variante mit DNA-Transfer bei pH 7,0

Zunächst wurde die isolierte chromosomale DNA in einem Standard-Restriktionsansatz mit EcoRI und HindIII (siehe 2.7.) fragmentiert. Danach wurde die geschnittene DNA mit  $\frac{1}{2}$  Vol. Stoppuffer versetzt und auf einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurde das Gel 10-30 Min. in 250 ml 0,25 N HCl unter leichter Bewegung depuriniert. Die Länge der Inkubation in HCl war abhängig vom Farbumschlag des im Stoppuffer enthaltenen Bromphenolblaus in einen gelblichen Farbton. Anschließend wurde das Gel mit  $H_2O$  gespült und zweimal je 15 Min. in je 250 ml 0,5 N NaOH/1,5 M NaCl geschwenkt und dadurch denaturiert. Nach Spülung mit  $H_2O$  erfolgte eine 30-minütige Neutralisation des Gels in 500 ml 0,5 M Tris-HCl pH 7,5/1,5 M NaCl.

Anschließend konnte die DNA vom Agarosegel auf eine Membran geblottet werden.

Verwendet wurde die Membran S & S SuPerCharge (Schleicher & Schuell), eine positiv geladene Nylonmembran. Als Transferpuffer wurde 20×SSC-Puffer eingesetzt.

Der Blot wurde folgendermaßen aufgebaut (Abb. 9):

Drei Lagen Filterpapier (Whatman 3MM) wurden in einer Wanne mit 20×SSC getränkt, das Agarosegel wurde aufgelegt. Darauf wurde gut haftend die Nylonmembran aufgebracht, welche zuvor 5 Min. in H<sub>2</sub>O und 15 Min. in 20×SSC inkubiert wurde. Auf die Nylonmembran wurden drei auf Gelgröße zurechtgeschnittene Filterpapiere, angefeuchtet mit 20×SSC, gelegt. Darauf folgte ein 3-5 cm hoher, auf Gelgröße zurechtgeschnittener Stapel aus Papierhandtüchern. Die Materialien müssen auf Gelgröße zurechtgeschnitten werden, um Kurzschlüsse des Flüssigkeitsstromes zu vermeiden.

Der Aufbau wurde mit einer Glasplatte abgedeckt, die mit einem Gewicht (0,5-1 kg) gleichmäßig beschwert wurde.

Der Blot blieb über Nacht stehen. Durch Kapillarkräfte wird der Puffer durch Gel und Nylonmembran in die Papierhandtücher gesogen und nimmt dabei die DNA mit, welche von der Nylonmembran adsorbiert wird.

Am nächsten Tag wurde die Nylonmembran 1 Min. in 6×SSC geschwenkt, um Agarosereste zu entfernen. Anschließend wurde die DNA mit UV-Licht (254 nm/120 mJ/cm<sup>2</sup>) auf der Nylonmembran fixiert. Durch dieses sogenannte Crosslinking werden Thyminreste der DNA kovalent an positiv geladene Aminogruppen der Nylonmembran gebunden. Nun kann die DNA auf der Nylonmembran mit einer Gensonde hybridisiert werden. Als Gensonde wurde ein 712 bp großes Fragment des *clvA*-Gens von *E. coli* K-12 verwendet, welches durch PCR aus dem K-12-Stamm CC118 amplifiziert wurde (siehe 1.16.).

Die benötigte Menge der Gensonde wurde nach folgender Methode ermittelt: Für 1 cm<sup>2</sup> Nylonmembran wurden 0,25 ml Hybridisierungspuffer (ECL-Kit) verwendet. Pro ml Hybridisierungspuffer wurden 10 ng Gensonde eingesetzt.

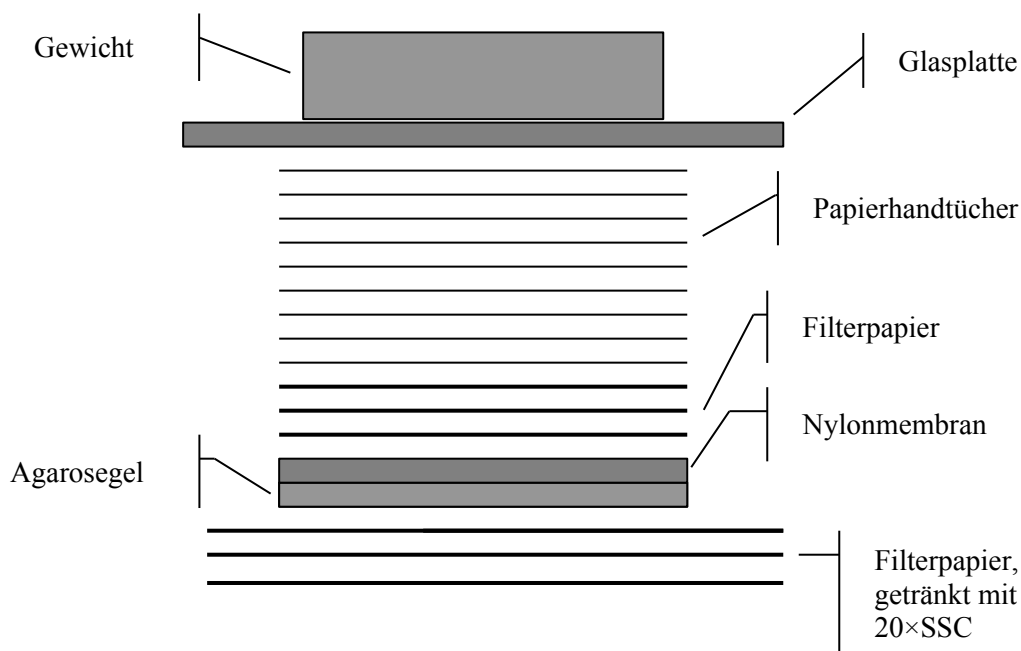
Die Gensonde wurde für die Markierung auf eine Konzentration von 10 ng/μl eingestellt und anschließend 5 Min. im kochenden Wasserbad denaturiert. Die Sonde wurde 5 Min. auf Eis abgekühlt und mit 1 Vol. DNA-Labeling-Reagent (ECL-Kit) versetzt. Es folgte die Zugabe von 1 Vol. Glutaraldehyd-Solution (ECL-Kit). Die Sonde wurde 10 Min. bei 37°C inkubiert. Die fertige Sonde wurde unmittelbar anschließend zur Hybridisierung verwendet.

Dazu wurde zunächst die benötigte Menge des Hybridisierungspuffers (s.o.) auf 42°C vorgewärmt. Die Nylonmembran wurde in den Hybridisierungspuffer eingelegt und 1 h unter ständiger Bewegung bei 42°C prähybridisiert.

Die markierte Sonde wurde anschließend zum Hybridisierungspuffer gegeben. Die eigentliche Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C unter ständiger Bewegung.

Am nächsten Tag wurde die Nylonmembran zunächst mit primärem Waschpuffer und anschließend mit sekundärem Waschpuffer gewaschen. Dazu wurde der primäre Waschpuffer

auf 42°C vorgewärmt (2-5 ml/cm<sup>2</sup> Nylonmembran) und die Nylonmembran 20 Min. darin geschwenkt. Nach Wiederholung dieses Waschschriffs mit frischem Puffer wurde der sekundäre Waschpuffer bei Raumtemperatur angewandt. Die Nylonmembran wurde darin 5 Min. inkubiert und der Schritt mit frischem sekundärem Waschpuffer einmal wiederholt. Die gewaschene Nylonmembran wurde anschließend für 1 Min. mit Detection Reagent (ECL-Kit) bedeckt. Benötigt wurden 0,125 ml/cm<sup>2</sup> Nylonmembran. Das Detection Reagent wird frisch aus gleichen Teilen Detection Reagent 1 und Detection Reagent 2 hergestellt. Danach wurde das Detection Reagent wieder entfernt und die Nylonmembran auf Filterpapier getrocknet. Die Nylonmembran wurde in Frischhaltefolie eingeschlagen und konnte nun in der Dunkelkammer einem sensitiven Film (Hyperfilm-ECL) exponiert werden. Es wurden sechs Expositionen mit den folgenden Zeiten durchgeführt: 30 sec, 1 Min., 2 Min., 5 Min., 10 Min. und 20 Min.



**Abb. 9: Aufbau des klassischen Southern Blots.**

### 2.16.2. Southern Blot-Variante mit alkalischem Transferpuffer

Wie beim „neutralen“ Southern Blot (DNA-Transfer bei neutralem pH) wurde die DNA in einem Standard-Restriktionsansatz fragmentiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA-Fragmente auf dem Agarosegel wurden in 250 ml 0,25 N HCl 10 Min. inkubiert, bis ein



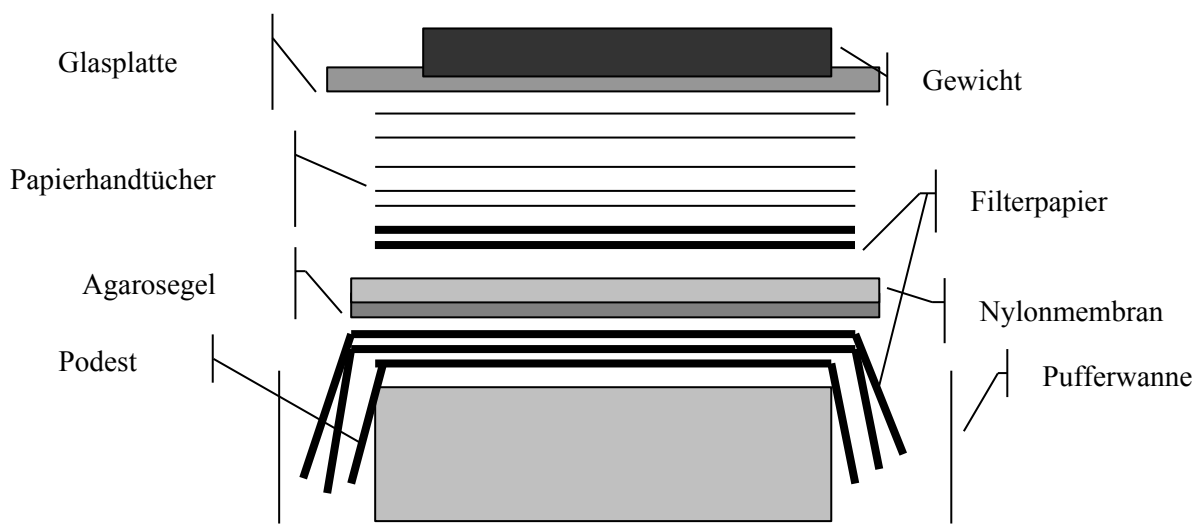
Farbumschlag des Bromphenolblaus in einen gelblichen Farbton erfolgte. Das Gel wurde mit H<sub>2</sub>O gespült und anschließend 15 Min. bei Raumtemperatur in alkalischem Transferpuffer inkubiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Der Blot-Aufbau erfolgte wie beim neutralen Southern Blot. Die Nylonmembran wurde unter gleichen Bedingungen wie beim neutralen Transfer in alkalischem Transferpuffer inkubiert, die Filterpapier-Abschnitte unterhalb des Agarosegels wurden mit alkalischem Transferpuffer angefeuchtet.

Die Fixierung der DNA auf der Nylonmembran ist nicht notwendig, da die DNA durch die Alkalisierung kovalent an die Membran gebunden wird.

Der weitere Ablauf entsprach dem Southern Blot-Protokoll mit neutralem Transferpuffer.

### 2.16.3. Southern Blot-Variante mit Pufferreservoir

Bei dieser Variante des Blot-Aufbaus wurde der verwendete Transferpuffer in eine Plastikwanne gegeben. In die Wanne wurde ein Podest gestellt (Abb. 10). Auf das Podest wurden drei mit Puffer angefeuchtete Filterpapierabschnitte gelegt, die mit ihren Seiten in die Pufferlösung in der Plastikwanne tauchten. Auf den Filterpapieren wurde der Blot wie in 2.16.1. beschrieben aufgebaut. Dieser Aufbau hat den Vorteil, dass eine größere Menge Puffer durch die Kapillarkräfte vertikal nach oben gesogen wird. Somit ist der Transport der DNA effektiver, da das Gel von einer größeren Menge Flüssigkeit durchspült wird.



**Abb. 10: Aufbau des Southern Blots mit Puffer-Reservoir.**

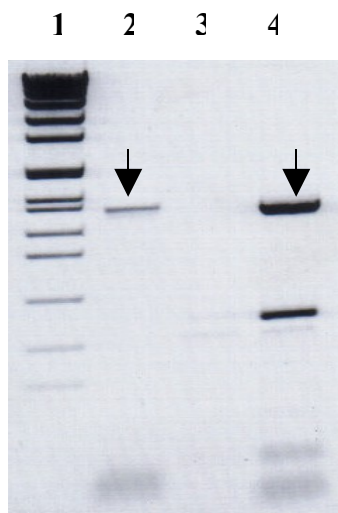
## IV. Ergebnisse

### 1. Charakterisierung des *clyA*-Gens eines *Salmonella enterica* Serovar Paratyphi A-Stammes

#### 1.1. Isolierung und Sequenzierung des *clyA*-Gens von *S. enterica* Serovar Paratyphi A FR1/99

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass der *S. enterica* Serovar Paratyphi A-Stamm ATCC 9150 ein funktionales *clyA*-Gen besitzt, welches homolog zu *clyA* von *E. coli* K-12 ist. Hier sollte das Vorliegen des *clyA*-Gens in einem weiteren Stamm von *S. enterica* Serovar Paratyphi A (Stamm FR1/99) nachgewiesen werden.

Zunächst wurden PCR-Analysen durchgeführt. Hergestellt wurden drei PCR-Ansätze mit Lysat von *S. enterica* Serovar Paratyphi A FR1/99 nach Standardprotokoll mit Taq-Polymerase, Pfu-Polymerase und DeepVent-Polymerase. Eingesetzt wurden in allen drei Ansätzen die Primer P55 und P56, welche außerhalb der *clyA*-Gensequenz des Stammes ATCC 9150 hybridisieren. Erwartet wurde ein 1366 bp-Produkt. Ein deutliches, größenadäquates Produkt entstand aus dem Ansatz mit DeepVent-Polymerase, ein ebensolches, wenn auch in geringerer Menge, aus dem Ansatz mit Taq-Polymerase (Abb. 11).



**Abb. 11: Analyse von PCR-Produkten durch Agarosegelelektrophorese.**

Spur 1: DNA-Längenstandards  
 Spur 2: *S. enterica* Serovar Paratyphi A FR1/99, Primer P55/P56, Taq-Pol.  
 Spur 3: *S. enterica* Serovar Paratyphi A FR1/99, Primer P55/P56, Pfu-Pol.  
 Spur 4: *S. enterica* Serovar Paratyphi A FR1/99, Primer P55/P56, DeepVent-Pol.  
 Pfeile: 1366 bp-Banden  
 1% Agarosegel

Das PCR-Produkt aus dem Ansatz mit DeepVent-Polymerase wurde mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen) gereinigt und durch präparative Agarosegelelektrophorese

isoliert. Das Fragment wurde mit den Primern P55 und P56 fast vollständig sequenziert. Lediglich die ersten Nukleotide unmittelbar hinter den Primerbindungsstellen konnten mit diesen Sequenzierungsreaktionen nicht detektiert werden. Um auch die 5'- und 3'-terminalen Regionen des PCR-Produktes zu erfassen, wurden deshalb zusätzliche Sequenzierungen mit den Primern P112 und P113 durchgeführt. Diese beiden Primer binden im Innern des *clyA*-Gens von *S. enterica* Serovar Paratyphi A ATCC 9150 und sind dabei nach außen zum 5'-Ende bzw. zum 3'-Ende des Gens hin orientiert.

Somit konnte die vollständige Sequenz des *clyA*-Gens von *S. enterica* Serovar Paratyphi A FR1/99 ermittelt werden. Dabei fand sich kein Nukleotidaustausch und damit auch kein Aminosäureaustausch im Vergleich zur *clyA*-Sequenz des bereits analysierten *S. enterica* Serovar Paratyphi A-Stammes ATCC 9150. Auch die unmittelbar das Gen flankierenden Sequenzen sind identisch (Abb. 12).

## 1.2. Vergleich von *clyA*<sub>*S. enterica* Serovar Paratyphi A FR1/99</sub> mit *clyA*<sub>*E. coli* K-12</sub>

Die DNA-Sequenz in Abb. 12 zeigt das *clyA*-Gen und die *clyA*-flankierenden Sequenzen des *S. enterica* Serovar Paratyphi A-Stammes FR1/99. Im Vergleich mit *clyA*<sub>*E. coli* K-12</sub> finden sich 126 Austausche in der Basensequenz. Dies resultiert in insgesamt 31 Austauschen in der Aminosäuresequenz. Dies entspricht einer Übereinstimmung der Gensequenz von 86,14% und einer Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von 89,77%.

### Abb. 12: *clyA* von *S. enterica* Serovar Paratyphi A Stamm FR1/99.

Das DNA-Fragment wurde mit den Primern P55 und P56 unter Verwendung von DeepVent-Pol. aus dem Genom von *S. enterica* Serovar Paratyphi A FR1/99 durch PCR amplifiziert. Das ATG-Startcodon und das Stopcodon des *clyA*-Gens sind fettgedruckt und unterstrichen. Basenaustausche (fettgedruckt) und Aminosäureaustausche (kursiv gedruckt) im Vergleich zu *clyA*<sub>*E. coli* K-12</sub> sind eingetragen. Sequenzunterschiede in den *clyA*-flankierenden DNA-Abschnitten sind nicht eingezeichnet.

```

1      GGAAGATGGGATGGTGAAAGTAGGAAGCAAACAGTTTCTTTTGGTCGTATTCTGGAAAA
61     AATGCAGCAGAGTAATCGTACCCAGCGTAGATAAGCAGGAAGTTGGCAGTATTCCAGCT
121    TCTGGAATGCTAACTTAAGCTACAAAAGCTGTCTGGAGGCAATAGGTAGGAATAAGTTAT

```

Ergebnisse

181 AAAACAATAGCTTAATTGCAATTTATATATTTAAAGAGGCCAAATGATT**ATGACTGGAATA**  
M T G I  
E

241 **G TA G .A . A A . . A .**  
TTTGCAGAA**ACAAACTGTAGAGG**TAGTTAAA**AGCGCGATCGAAACCGCAGATGGGCATTA**  
F A E Q T V E V V K S A I E T A D G A L  
V D K N

301 **C . T T . T C C . .**  
GATTTTATA**ACAAATACCTCGACCAGGTTATCCCCTGGAAGACCTTTGATGAAACCATA**  
D F Y N K Y L D Q V I P W K T F D E T I  
L Q

361 **. T C . T A C . C C . C C .**  
AAAGAGTTAAG**CCGT**TTTTAAACAGGAGT**ACTCGCAGGAAGCTTCTGTTTTAGTTGGTGAT**  
K E L S R F K Q E Y S Q E A S V L V G D  
A

421 **ACC. A .T . . A C . A G .**  
ATTAAA**GTTTTGCTTATGGACAGCCAGGATAAGTATTTTGAAGCGACACAAACTGTTTAT**  
I K V L L M D S Q D K Y F E A T Q T V Y  
T

481 **. T C . G .G . G . G C**  
GAATGGTGTGGTGT**CGTGACGCAATTACTCTCAGCGTATATTTTACTATTTGATGAATAT**  
E W C G V V T Q L L S A Y I L L F D E Y  
A A

541 **G. C .C . T.A G C G . C A .**  
AATGAGAAA**AAAAGCATCAGCGCAGAAAGACATTCTCATCAGGATATTAGATGATGGCGTC**  
N E K K A S A Q K D I L I R I L D D G V  
K V I

601 **CG G . . C G T C. . .**  
AATA**AACTGAATGAAGCGCAAAAATCTCTCCTGGGAAGTTCACAAAGTTTCAACAACGCT**  
N K L N E A Q K S L L G S S Q S F N N A  
T V

661 **C G . G . . C . T A . C C**  
TC**AGGAAA**ACTGCTGGC**ATTAGATAGCCAGTTAACTAATGATTTCTCGGAAAAAAGTAGT**  
S G K L L A L D S Q L T N D F S E K S S

721 **. A . A CA G A. .C C T**  
TATTTCCAGTCACAGGT**GGATAGAATTCGTAAGGAAGCTTATGCCGGTGCTGCAGCAGGC**  
Y F Q S Q V D R I R K E A Y A G A A A G  
K

## Ergebnisse

```
781  G C . A . C . . AG .
    ATAGTCGCCGGTCCGTTTGGATTAATTATTTCTATTCTATTGCTGCGGGCGTGAATTGAA
    I V A G P F G L I I S Y S I A A G V I E
    V V

841  A C . . GA A.T T T. G . C C.
    GGGAAATTGATTCCAGAATTGAATGACAGGCTAAAAGCAGTGCAAAATTTCTTTACTAGC
    G K L I P E L N D R L K A V Q N F F T S
    K N K S T

901  C G TAA . G T . . C C . A .
    TTATCAGTCACAGTGAAACAAGCGAATAAAGATATCGATGCGGCAAAATTGAAATTAGCC
    L S V T V K Q A N K D I D A A K L K L A
    N T

961  C . C C C .T . T. .
    ACTGAAATAGCAGCAATTGGGGAGATAAAAACGGAAACCGAAACAACCAGATTCTACGTT
    T E I A A I G E I K T E T E T T R F Y V

1021 . . G . A G . C A . .
    GATTATGATGATTTAATGCTTTTCTTTACTAAAAGGAGCTGCAAGAAAATGATTAACACC
    D Y D D L M L S L L K G A A K K M I N T
    E

1081 G . T GA .A A A CT T A . AG .
    TGTAATGAATACCAACAAAGGCACGGTAAAGAACGCTTCTCGAGGTTCTCTGACATCTGA
    C N E Y Q Q R H G K K T L L E V P D I
    K F E V

1141 . . . . .
    TACATTTTCATTTCGCTCTGTTTACTTTTAAACGCCCGATAGCGTGAAGAAAATGAGAGACG

1201 . . . . .
    GAGAAAAAGCGATATTC AACAGCCCGATAAACAAAGAGTCGTTACCGGGCTGGCGAGGTTA

1261 . . . . .
    TCATGCGTTAAGCTGGTAGTCGAGGGTGATTTCCGCATTTCAGAACCTGCGATACCGGGCA

1321 . . . . .
    CCCGGCTTTTGCTTTCTGGATGATTTGATCGAAAGTTGAAGCATCA
```

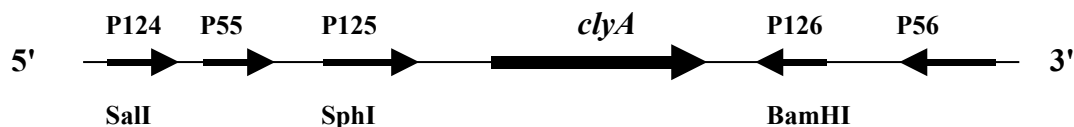
### 1.3. Eingrenzung der Promotorregion des *clyA*-Gens von *S. enterica* Serovar ParatyphiA

Um die Lage des Promotors des *clyA*-Gens von *S. enterica* Serovar Paratyphi A einzugrenzen, wurde das *clyA*-Gen mit flankierenden Sequenzen mit zwei verschiedenen 5'-Primern aus dem Stamm FR1/99 amplifiziert. Die beiden resultierenden PCR-Produkte hatten damit eine unterschiedlich lange Sequenz am 5'-Ende. Für das 3'-Ende wurde jeweils der gleiche Oligonukleotidprimer eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden in den Vektor pUC18 inseriert, und zwar so herum, dass das klonierte *clyA*-Gen nicht unter dem Einfluss des *lacZ*-Promotors

des Plasmids liegt. Auf diese Weise war das Gen von seinem eigenen Promotor abhängig, d.h. nur wenn der Promotor des *clyA*-Gens auf dem amplifizierten PCR-Produkt lag, konnte das Gen exprimiert werden und einen hämolytischen Phänotyp induzieren.

Um einen gerichteten Einbau des *clyA*-Gens mit seinen flankierenden Sequenzen zu erreichen, mußten in die PCR-Primer spezifische Schnittstellen für Restriktionsenzyme eingebracht werden, die auch in der MCS des Vektors schneiden. An diesen Schnittstellen konnten dann Insert und Vektor gerichtet miteinander ligiert werden.

Zunächst wurden zwei neue, außerhalb des *clyA*-Gens hybridisierende Primer für das 5'-Ende synthetisiert (Abb. 13): P124 mit einer Sall-Schnittstelle (5'-CACATTAAGGTCGACCTGACATTTATATGG-3') und P125 mit einer SphI-Schnittstelle (5'-CCAGCTTCTGGCATGCTAACTTAAGC-3'). Diese Primer binden in unterschiedlicher Entfernung stromaufwärts vom *clyA*-Startcodon. Ein extern hybridisierender Primer für das 3'-Ende (P126 mit einer BamHI-Schnittstelle: 5'-GCAAAAGCCGGGATCCCGGTATCGC-3') wurde ebenfalls synthetisiert, um eine künstliche Schnittstelle einzufügen.



**Abb. 13: Bindungsstellen der Primer P124, P55, P125, P126 und P56 (schematisch).**

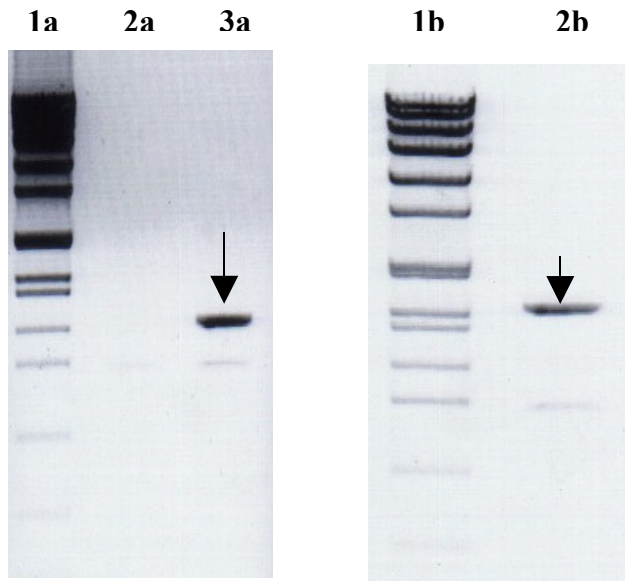
Zwischen der Bindungsstelle des Primers P124 und dem Startcodon von *clyA* liegen 454 bp, zwischen der Bindungsstelle von P125 und dem Startcodon liegen 88 bp. Zwischen dem Primer P55 und dem Startcodon liegen 204 bp.

Der Vektor pUC18 wurde für die Klonierung mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten: Kombination A mit BamHI/Sall und Kombination B mit SphI/BamHI. Die Ansätze wurden mit dem MinElute Reaction Cleanup Kit (Qiagen) gereinigt und die linearisierten Plasmide durch präparative Agarosegelelektrophorese isoliert.

Zur Generierung der Insertelemente wurden Standard-PCRs mit DeepVent-Polymerase durchgeführt. Verwendet wurden die Primerkombinationen A: P124/P126 und B: P125/P126. Eingesetzt wurde in beiden Ansätzen Lysat. Identische Ansätze mit Zusatz von 2 µl MgSO<sub>4</sub> verbesserten die PCR-Bedingungen nicht. Erwartet wurde bei A ein 1589 bp PCR-Produkt,

## Ergebnisse

bei B ein 1218 bp-Produkt. Die PCR-Produkte wurden durch Auftragen von 1/10 Vol. des PCR-Produktes auf ein Agarosegel visualisiert (Abb. 14a und 14b), die verbleibenden 90  $\mu$ l wurden mit Hilfe des MinElute Reaction Cleanup Kits (Qiagen) gereinigt. Die daraus resultierende DNA wurde auf ein Agarosegel aufgetragen, aus diesem wurden die größenadäquaten Banden isoliert. Die fertig isolierte DNA wurde in H<sub>2</sub>O gelöst und mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten.



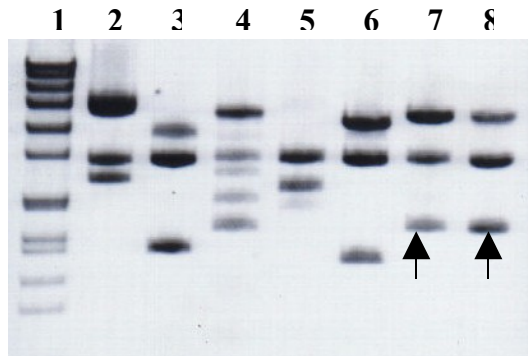
**Abb. 14a (links) und 14b (rechts):  
Analyse von PCR-Produkten durch  
Agarosegelelektrophorese.**

Spur 1a/1b: DNA-Längenstandards  
Spur 2a: n.n.  
Spur 3a: *S. enterica* Serovar Paratyphi  
A FR1/99, Primer P125/P126,  
DeepVent Pol.  
Pfeil (Abb. 14a): 1218 bp-Bande  
Spur 2b: *S. enterica* Serovar Paratyphi  
A FR1/99, Primer P124/P126,  
DeepVent Pol.  
Pfeil (Abb. 14b): 1589 bp-Bande  
1% Agarosegel (14a u. 14b)

Das A: P124/P126 (1589 bp)-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen SalI und BamHI geschnitten, das B: P125/P126 (1218 bp)-Produkt wurde mit SphI und BamHI geschnitten. Anschließend wurden die Ansätze mit dem MinElute Reaction Cleanup Kit (Qiagen) gereinigt und mit H<sub>2</sub>O eluiert.

Nun wurden die fertigen DNA-Fragmente in den jeweilig entsprechend präparierten Vektor pUC18 ligiert; es resultierten die Plasmide pVS1 (pUC18 mit *clyA* von *S. enterica* Serovar Paratyphi A FR1/99 [P124/P126-PCR-Produkt]; Amp<sup>r</sup>) und pVS2 (pUC18 mit *clyA* von *S. enterica* Serovar Paratyphi A FR1/99 [P125/P126-PCR-Produkt]; Amp<sup>r</sup>). Anschließend wurden die Plasmide nach dem Standardprotokoll in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert und auf YT-Agar + Ampicillin + X-Gal + IPTG ausplattiert.

Aus den unter Selektionsdruck gewachsenen Kolonien wurden die Plasmide isoliert, mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen (Abb. 15 und Abb. 16).



**Abb. 15: Restriktionsanalyse der Plasmide pVS1.**

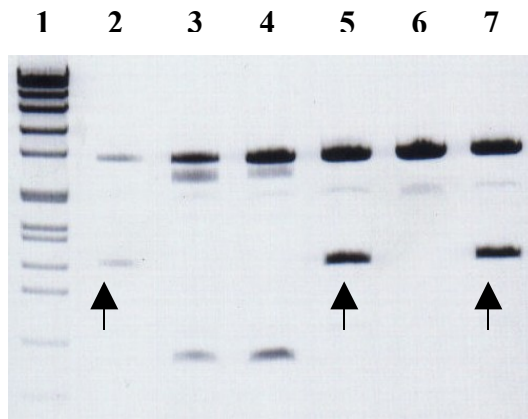
(Klonierung pUC18 mit *clyA* von *S. enterica* Serovar Paratyphi A FR1/99, PCR-Produkt, Primer P124/P126.

Spur 1: DNA-Längenstandards

Spur 2-8: Klone 1-7

Die Klone 6 und 7 haben das korrekte Insert (1589 bp, Pfeile). Zur weiteren Analyse wurde Klon 7 ausgewählt.

1% Agarosegel



**Abb. 16: Restriktionsanalyse der Plasmide pVS2.**

(Klonierung pUC18 mit *clyA* von *S. enterica* Serovar Paratyphi A FR1/99, PCR-Produkt, Primer P125/P126.

Spur 1: DNA-Längenstandards

Spur 2-7: Klone 1-6

Die Klone 1,4 und 6 haben das korrekte Insert (1218 bp, Pfeile). Zur weiteren Analyse wurde Klon 4 ausgewählt.

1% Agarosegel

Die fertigen Produkte der Klonierungen (*E. coli* DH5 $\alpha$ /pVS1 [Klon 7, s. Abb. 15] und *E. coli* DH5 $\alpha$ /pVS2 [Klon 4, s. Abb. 16]) wurden auf YT-Agarplatten mit Ampicillin und Pferdeblut überstrichen.

Im Vergleich zu *E. coli* DH5 $\alpha$ /pAL208 zeigte sich, dass *E. coli* DH5 $\alpha$ /pVS1 die geringste Hämolyseaktivität aufweist, während sich die Hämolyseaktivitäten von *E. coli* DH5 $\alpha$ /pVS2 und *E. coli* DH5 $\alpha$ /pAL208 kaum unterscheiden. Da bereits beim kürzesten der Fragmente (P125/P126-PCR-Produkt) ein hämolytischer Phänotyp induziert wurde, kann vermutet werden, dass die für die *clyA*-Expression entscheidenden Promotorstrukturen innerhalb der ersten ~100 bp vor dem ATG-Startcodon des *clyA*-Gens enthalten sind. Diese sind jedoch auch auf dem längsten Fragment (P124/P126-PCR-Produkt), welches zur geringsten Hämolyseaktivität führt, vorhanden. Die Transkription von *clyA* wird anscheinend durch die am 5'-Ende liegende Sequenz gestört.



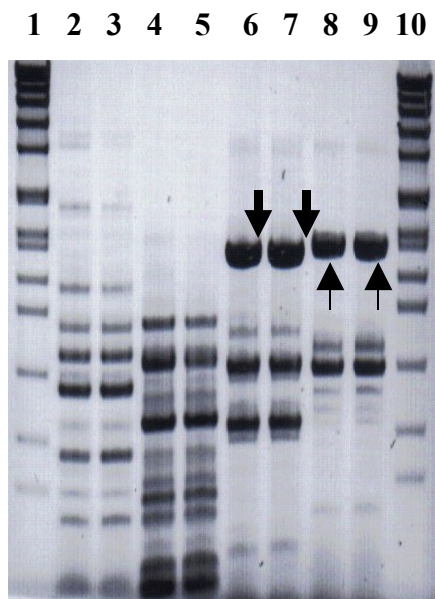
## 2. Charakterisierung des *clyA*-Gens eines *Shigella sonnei*-Stammes

### 2.1. PCR-Analyse von *Sh. sonnei* ST2757/01 und *Sh. sonnei* ST3135/01

In verschiedenen Stämmen des Genus *Shigella* wurden bereits *clyA*-homologe DNA-Sequenzen nachgewiesen. In einem *Sh. dysenteriae*-Stamm (Stamm 60R) wurde ein *clyA*-Gen identifiziert, welches jedoch durch das Insertionselement iso-IS1 unterbrochen wird und gleichzeitig an der Insertionsstelle eine 632 bp große Deletion aufweist. Auch in einem *Sh. sonnei*-Stamm (Stamm ST3112/01) wurde ein *clyA*-Gen mit einem integrierten Insertionselement (IS1 von *Sh. sonnei*) nachgewiesen (A. Ludwig, unveröffentlicht). In mehreren *Sh. flexneri*-Stämmen wurde ein *clyA*-Gen identifiziert, das eine 11 bp-Deletion enthält und aufgrund der entsprechenden Verschiebung des Leserasters nur ein N-terminales Fragment von ClyA kodiert.

Hier sollten nun zwei weitere Stämme von *Sh. sonnei* auf das *clyA*-Gen untersucht werden, nämlich die Stämme *Sh. sonnei* ST2757/01 und *Sh. sonnei* ST3135/01. Überprüft werden sollte insbesondere, ob eine *clyA*-homologe Sequenz vorhanden ist und ob diese intakt ist. Zunächst wurden PCR-Analysen mit Lysaten der zwei *Sh. sonnei*-Stämme durchgeführt, wobei Oligonukleotidprimer verwendet wurden, die innerhalb oder außerhalb des *clyA*-Gens von *E. coli* binden. Verwendet wurde Taq-Polymerase. Eingesetzt wurden folgende extern hybridisierende Primerkombinationen: P111/P21, resultierend im Fall von *E. coli* in einem 1305 bp-Produkt und P28/P19, resultierend in einem 1444 bp-Produkt. Außerdem wurden folgende intern bindende Primerkombinationen eingesetzt: P8/P44, resultierend in einem 570 bp-Produkt und P57/P2, resultierend in einem 619 bp-Produkt. Da vermutet wurde, dass die hier untersuchten Stämme möglicherweise ein Insertionselement im *clyA*-Gen enthalten könnten, musste dessen Größe bei den Längen der entstehenden PCR-Produkte berücksichtigt werden.

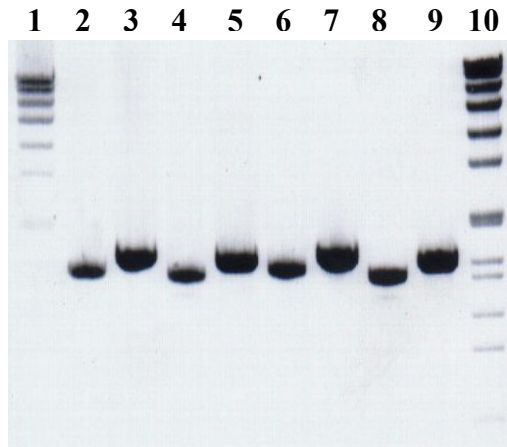
Es entstanden Banden auf dem Agarosegel aus den PCR-Ansätzen mit den intern hybridisierenden Primern, welche jedoch alle ~800 bp zu groß waren (Abb. 17). Folglich wurde gemutmaßt, dass dies an einem Insertionselement liegen könnte.



**Abb. 17: PCR-Analysen der Stämme *Sh. sonnei* ST2757/01 und *Sh. sonnei* 3135/01 unter Berücksichtigung eines möglichen Insertionselements im *clyA*-Gen (I).**

Spur 1: DNA-Längenstandards  
Spur 2: *Sh. sonnei* ST2757/01, PCR mit P111/P21  
Spur 3: *Sh. sonnei* ST3135/01, PCR mit P111/P21  
Spur 4: *Sh. sonnei* ST2757/01, PCR mit P28/P19  
Spur 5: *Sh. sonnei* ST3135/01, PCR mit P28/P19  
Spur 6: *Sh. sonnei* ST2757/01, PCR mit P8/P44  
Spur 7: *Sh. sonnei* ST3135/01, PCR mit P8/P44  
Spur 8: *Sh. sonnei* ST2757/01, PCR mit P57/P2  
Spur 9: *Sh. sonnei* ST3135/01, PCR mit P57/P2  
Spur 10: DNA-Längenstandards  
Dicke Pfeile: ~1,37 kb-Produkt  
Dünne Pfeile: ~1,42 kb-Produkt  
1% Agarosegel

Anschließend wurden weitere PCR-Analysen mit internen und externen Primern durchgeführt. Eingesetzt wurden die internen Primerkombinationen P8/P2, die im Fall von *E. coli* zu einem 713 bp-Produkt führen und P1/P2, resultierend in einem 672 bp-Produkt. Weiterhin wurden die Kombinationen P8/P7, resultierend in einem 830 bp-Produkt und P1/P7, resultierend in einem 790 bp-Produkt, verwendet. Dabei stellen P8 und P1 interne Primer dar, während P7 hinter dem *clyA*-Gen von *E. coli* hybridisiert. Wieder entstanden unter Berücksichtigung des möglichen Insertionselementes größenadäquate Banden (Abb. 18).



**Abb. 18: PCR-Analysen der Stämme *Sh. sonnei* ST2757/01 und *Sh. sonnei* 3135/01 unter Berücksichtigung eines möglichen Insertionselements im *clyA*-Gen (II).**

Spur 1: DNA-Längenstandards  
Spur 2: *Sh. sonnei* ST2757/01, PCR mit P8/P2  
Spur 3: *Sh. sonnei* ST2757/01, PCR mit P8/P7  
Spur 4: *Sh. sonnei* ST2757/01, PCR mit P1/P2  
Spur 5: *Sh. sonnei* ST2757/01, PCR mit P1/P7  
Spur 6: *Sh. sonnei* ST3135/01, PCR mit P8/P2  
Spur 7: *Sh. sonnei* ST3135/01, PCR mit P1/P2  
Spur 8: *Sh. sonnei* ST3135/01, PCR mit P8/P7  
Spur 9: *Sh. sonnei* ST3135/01, PCR mit P1/P7  
Spur 10: DNA-Längenstandards  
1% Agarosegel

Da die PCR-Analysen der *Sh. sonnei*-Stämme ST2757/01 und ST3135/01 praktisch zu identischen Ergebnissen führten, wurden die weiteren Untersuchungen nur noch mit einem der beiden Stämme, nämlich mit *Sh. sonnei* ST2757/01, durchgeführt.

## **2.2. Isolierung und Sequenzierung des *clyA*-Gens von *Sh. sonnei* ST2757/01**

### **2.2.1. Isolierung und Sequenzierung der zentralen und 3'-terminalen Region von *clyA*<sub>*Sh. sonnei* ST2757/01</sub> (Nachweis einer IS1-Insertion im *clyA*-Gen)**

Das PCR-Produkt aus dem PCR-Ansatz *Sh. sonnei* ST2757/01 mit den Primern P7 und P8 mit einer Größe von ~1,5 kb wurde gereinigt, aus dem Agarosegel isoliert und mit den PCR-Primern P7 und P8 sequenziert. Zur Identifikation des 3'-Endes wurde das mit den Primern P7 und P8 erzeugte PCR-Produkt mit dem Primer P43 sequenziert. Damit wurde noch über das 3'-Ende des *clyA*-Gens hinausgelesen.

Die Sequenzierung ergab eine ca. 98%ige Übereinstimmung mit dem *clyA*-Gen von *E. coli* K-12. Des Weiteren konnte auch in diesem Stamm ein Insertionselement, IS1 (768 bp), welches von einer Repeat-Sequenz flankiert wird, nachgewiesen werden (s.u.).

### 2.2.2. PCR-Analysen zur Identifikation des 5'-Endes von *clyA*<sub>*Sh. sonnei* ST2757/01</sub>

Aufgrund der Tatsache, dass der Primer P8 ein intern im *clyA*-Gen hybridisierender Primer ist, konnte nicht das gesamte *clyA*-Gen aus *Sh. sonnei* ST2757/01 nachgewiesen und isoliert werden, da die Sequenz am 5'-Ende nicht vollständig war.

Mit weiteren PCR-Ansätzen mit am 5'-Ende extern hybridisierenden Primern unter Standardbedingungen mit Taq-Polymerase sollte das ganze Gen identifiziert werden.

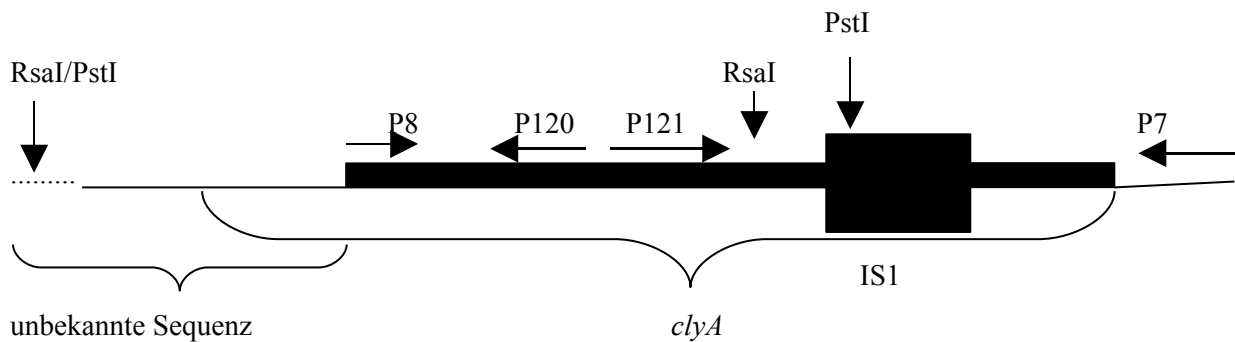
Eingesetzt wurden folgende Primerkombinationen:

P31/P116, resultierend in einem 1417 bp-Produkt, P20/P116, resultierend in einem 1254 bp-Produkt, P22/P116, resultierend in einem 1035 bp-Produkt, P26/P116, resultierend in einem 793 bp-Produkt, P23/P116, resultierend in einem 795 bp-Produkt, P18/P116, resultierend in einem 445 bp-Produkt, P111/P116, resultierend in einem 745 bp-Produkt, P3/P116, resultierend in einem 734 bp-Produkt, P28/P116, resultierend in einem 699 bp-Produkt und P6/P116, resultierend in einem 583 bp-Produkt. Der hierbei eingesetzte Primer P116 für das 3'-Ende hybridisiert innerhalb des *clyA*-Gens hinter dem inserierten IS-Element.

Die auf dem Agarosegel durch die PCR-Produkte entstandenen Banden stimmten nicht mit den jeweils erwarteten Größen der Produkte (d.h. mit der Länge des lt. *E. coli*-Sequenz erwarteten Produktes zuzüglich 768 bp des Insertionselementes) überein.

Dies ließ vermuten, dass offensichtlich die Struktur des *clyA*-Gens von *Sh. sonnei* ST2757/01 am 5'-Ende so verändert ist, dass die zur Verfügung stehenden Primer nicht binden konnten bzw. das erwartete PCR-Produkt nicht auf dem Agarosegel erschien. Um das 5'-Ende vollständig zu charakterisieren, wurde eine Inverse PCR (IPCR) durchgeführt.

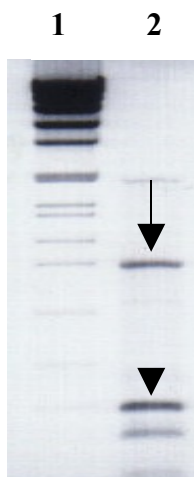
### 2.2.3. Isolierung und Sequenzierung der 5'-terminalen Region von *clyA*<sub>*Sh. sonnei* ST2757/01</sub> (Nachweis einer zweiten IS1-Insertion im *clyA*-Gen)



**Abb. 19: Inverse PCR: Schematische Darstellung.**

Eingezeichnet sind die Schnittstellen der Restriktionsenzyme RsaI und PstI, die verwendeten Oligonukleotidprimer P120 und P121 sowie zur Orientierung P7 und P8.

Für die Inverse PCR wurde chromosomale DNA von *Sh. sonnei* ST2757/01 mit PstI verdaut. Die geschnittenen DNA-Fragmente wurden mit Phenol und Chloroform gereinigt, mit Ethanol ausgefällt und in H<sub>2</sub>O gelöst. Anschließend wurden die entstandenen PstI-Fragmente mit T4-DNA-Ligase zirkularisiert. Mit den zirkularisierten Fragmenten wurde die Inverse PCR durchgeführt. Verwendet wurden die Primer P120 (enthält eine SphI-Schnittstelle) und P121 (enthält eine EcoRI-Schnittstelle) (Abb. 19). Durchgeführt wurde die Inverse PCR mit Pwo-Polymerase. Es resultierten deutliche Banden von ~ 990 bp bzw. ~360 bp (Abb. 20).

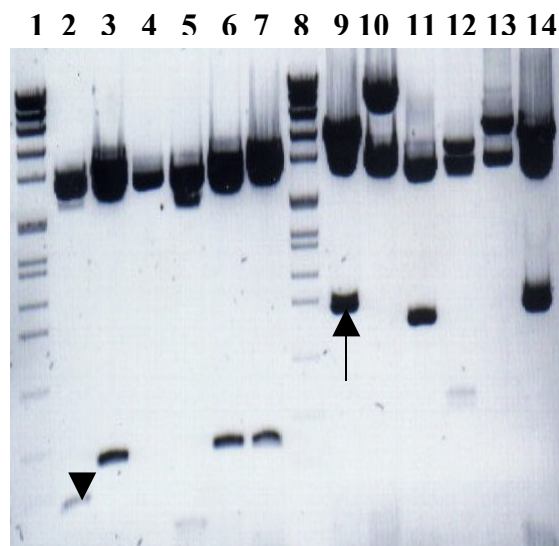


**Abb. 20: Resultat der IPCR/*Sh. sonnei* ST2757/01.**

Spur 1: DNA-Längenstandards  
 Spur 2: *Sh. sonnei* ST2757/01 x PstI, religiert, IPCR mit P120/P121, Pwo-Polymerase.  
 Langer Pfeil: ~990 bp-PCR-Produkt  
 Kurzer Pfeil: ~360 bp-PCR-Produkt  
 1% Agarosegel

## Ergebnisse

Die entstandenen Banden wurden aus dem Agarosegel isoliert und mit dem MinElute Reaction Cleanup Kit (Qiagen) aufbereitet. Die aus dem Agarosegel isolierten Fragmente wurden mit EcoRI und SphI geschnitten. Nach Hitzeinaktivierung wurden die Fragmente jeweils in pUC18 (ebenfalls geschnitten mit SphI und EcoRI) inseriert. Die Ligationsprodukte wurden jeweils in kompetente *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert und auf YT-Agar + Ampicillin + IPTG + X-Gal ausplattiert. Nach Bebrütung über Nacht bei 37°C wurden von jedem der beiden Klonierungsansätze sechs Kolonien ausgewählt. Aus den Klonen wurden die Plasmide isoliert und mit den Restriktionsenzymen EcoRI und SphI geschnitten (Abb. 21).



**Abb. 21: Restriktionsanalyse der Plasmide pUC18 mit 360 bp- bzw. 990 bp-Fragment .**

(IPCR-Produkte, Primer P120/P121, Pwo-Polymerase.)  
Spur 1 u. 8: DNA-Längenstandards  
Spur 2-7: 360 bp-Klone Nr. 1-6  
Spur 9-14: 990 bp-Klone Nr. 1-6  
Der 360 bp-Klon Nr. 1 (kurzer Pfeil) sowie der 990 bp-Klon Nr. 1 (langer Pfeil) zeigen das korrekte Insert.  
1% Agarosegel

Die Plasmide mit dem korrekten Insert (360 bp-Klon Nr.1 und 990 bp-Klon Nr.1, s. Abb. 21) wurden jeweils aus einer Übernachtskultur des entsprechenden *E. coli* DH5 $\alpha$ -Klons mit dem QIAprep Spin Miniprep-Kit (Qiagen) isoliert.

Das Plasmid mit dem ~360 bp-Fragment wurde mit dem Primer pUC-reverse sequenziert, das Plasmid mit dem ~990 bp-Fragment wurde von beiden Seiten mit den Primern pUC-reverse und pUC-universal sequenziert.

Die Sequenzierung des ~360 bp-Fragmentes zeigte nicht das erwartete Ergebnis, da eine *clyA*- bzw. IS1-spezifische DNA-Sequenz nicht lesbar war. Somit wurde hier von einem Artefakt ausgegangen.

## Ergebnisse

Bei der Sequenzierung des ~990 bp-Fragmentes mit dem Primer pUC-universal wurde zunächst die SphI-Schnittstelle des Primers P120 überlesen (Ligationsstelle), anschließend die Bindungsstelle des Primers P8. Weiter stromaufwärts stimmte die Sequenz noch über 39 bp mit der Sequenz von *clyA*<sub>*E.coli* K-12</sub> überein, dann änderte sich die Sequenz abrupt.

Diese Resultate konnten durch eine weitere, unter veränderten Bedingungen durchgeführte Inverse PCR bestätigt werden. Verwendet wurde hier das Restriktionsenzym RsaI sowie Taq-Polymerase bzw. DeepVent-Polymerase für die PCR.

Ein Sequenzvergleich ergab, dass es sich bei der veränderten Gensequenz wiederum um das bekannte Insertionselement IS1 von *Sh. sonnei* handelt. Somit wird *clyA*<sub>*Sh.sonnei* ST2757/01</sub> also nicht nur einmal, sondern zweimal von einem Insertionselement unterbrochen.

Mit dieser Inversen PCR konnte nur ein Teil des vorderen, am 5'-Ende von *clyA* gelegenen Insertionselements erfasst werden. Die 5'-terminale Region dieses Insertionselements und die stromaufwärts davon gelegene DNA-Sequenz war auf dem Produkt der Inversen PCR nicht mehr enthalten.

Um die Sequenz von *clyA*<sub>*Sh.sonnei* ST2757/01</sub> vollständig zu ermitteln, wurde daher erneut eine PCR mit den Primern P22 und P116 durchgeführt, wobei nun jedoch ein Endprodukt von insgesamt 2571 bp erwartet wurde (Länge des PCR-Produkts lt. DNA-Sequenz von *E. coli* K-12 zuzüglich zwei Insertionselemente von je 768 bp). Bei Verwendung von Taq-Polymerase wurde ein Produkt dieser Größe tatsächlich spezifisch gebildet, während PCR-Ansätze mit DeepVent-Polymerase bzw. Pwo-Polymerase nicht zur Amplifikation dieses Fragments führten. Durch Isolation des mit Taq-Polymerase erzeugten PCR-Produktes aus dem Agarosegel und anschließende Sequenzierung mit den Primern P6, P22 und P116 konnte die Sequenz von *clyA*<sub>*Sh.sonnei* ST2757/01</sub> vollständig ermittelt werden.

Diese Sequenzierungen zeigten insbesondere, dass stromaufwärts von dem vorderen IS1-Element das 5'-terminale Ende des *clyA*-Gens und davor die 5'-flankierende DNA-Region folgen.

Um das 3'-terminale Ende des vorderen IS1-Elements in *clyA*<sub>*Sh.sonnei* ST2757/01</sub> zu überprüfen, wurde eine PCR mit den Primern P6 und P116 durchgeführt. Es entstand ein ~2,1 kb-Produkt, welches nach Isolierung aus dem Agarosegel mit dem Primer P-IS1-Sson, der in IS1 bindet, sequenziert wurde. Auch hiermit wurde die Sequenz der zuvor durchgeführten IPCR bestätigt.

Somit war nachgewiesen, dass auch in *Sh. sonnei* ST2757/01 eine *clyA*-homologe Sequenz enthalten ist.

## Ergebnisse

Das *clyA*-Gen von *Sh. sonnei* ST2757/01 wird zweimal von IS1 unterbrochen. Dabei werden beide Insertionselemente von einer Repeat-Sequenz flankiert, welche aber nicht identisch ist. Diese Sequenzwiederholungen (Repeats) sind offensichtlich jeweils durch die Verdopplung eines kurzen Abschnitts des *clyA*-Gens unmittelbar am Insertionsort entstanden.

Das vollständige *clyA*-Gen von *Sh. sonnei* ST2757/01 ist in 2.2.4., Abb. 22, dargestellt.



## 2.2.4. Nukleotidsequenz des durch zwei IS1-Insertionen zerstörten *clyA*-Gens von *Sh. sonnei* ST2757/01

### Abb. 22: *clyA* von *Sh. sonnei* ST2757/01 mit Insertionselementen.

Die Gensequenz wurde ermittelt aus der PCR mit Taq-Pol./P8/P7, der Inversen PCR mit Pwo-Pol./P120/P121 und der PCR mit Taq-Pol./P22/P116. Eingezeichnet sind die Primer P-IS1-Sson, P120 und P121 sowie die Schnittstellen von PstI (CTGCAG) und RsaI (GTAC). Die Sequenz der Insertionselemente ist kursiv gedruckt. Die die Insertionselemente flankierenden Repeat-Sequenzen sind fettgedruckt. Das ATG-Startcodon und das Stopcodon des *clyA*-Gens sind fettgedruckt und unterstrichen.

```

1      ATTAATAGTTGTA AAAACAGGAGTTTCATTACAATTTATATATTTAAAGAGGGCGAATGATT
      .
      .
61     ATGACTGAAATCGTTGCAGATAAAAACGGTAGAAGTAGTTAAAAACGCAATCGAAACCGCA
      .
      .
121    GATGGAGCATTAGATCTTTAAGGTGATGCTGCCAACTTACTGATTTAGTGTATGATGGTGT
      .
      .
181    TTTTGAGGTGCTCCAGTGGCTTCTGTTTCTATCAGCTGTCCCTCCTGTTCCAGCTACTGAC
      .
      .
241    GGGGTGGTGCGTAACGGCAAAAGCACTGCCGGACATCAGCGCTATCTCTGCTCTCACTGC
      .
      .
301    CGTAAAACATGGCAACTGCAGTTCACCTTACACCGCTTCTCAACCCGGTACGCACCAGAAA
      .
      CTGCAG                               GTAC
      PstI                               RsaI
      .
      .
361    ATCATTGATATGGCCATGAATGGCGTTGGATGCCGGGCAACTGCACGCATTATGGGCGTT
      .
      .
421    GGCTCAACACGATTTTACGTCACTTAAAAAACTCAGGCCGCAGTCGGTAACCTCGCGCA
      .
      .
481    TACAGCCGGGCAGTGACGTCATCGTCTGCGCGAAATGGACGAACAGTGGGGCTATGTCTG
      .
      5' -GCGGAAATGGACGAACAGTG-3'
      P-IS1-Sson
      .
      .
541    GGGCTAAATCGCGCCAGCGCTGGCTGTTTTACGCGTATGACAGTCTCCGGAAGACGGTTG
      .
      .
601    TTGCGCACGTATTCGGTGAACGCACTATGGCGACGCTGGGGCGTCTTATGAGCCTGCTGT
      .
      .
661    CACCCTTTGACGTGGTGATATGGATGACGGATGGCTGGCCGCTGTATGAATCCCGCCTGA
      .
      .
721    AGGGAAAGCTGCACGTAATCAGCAAGCGATATACGCAGCGAATTGAGCGGCATAACCTGA
      .
      .
781    ATCTGAGGCAGCACCTGGCACGGCTGGGACGGAAAGTCGCTGTCGTTCTCAAAAATCGGTGG
      .
      .
841    AGCTGCATGACAAAGTCATCGGGCATTATCTGAACATAAAACACTATCAATAAGTTGGAG
      .
      .
901    TCATTACCGATCTTTATGATCAGTATCTCGATCACGCCATCCCCTGGGAGACCTTTGATG
      .
      .
961    AAACCATGGAAGAGTTAAGTCGCTTTAAACAGGAGTATTCACAGGCAGCCTCCGTTTTAG
      .
      3' -CATAAGTGTCCGTACGAGGCAAAATC-5'
      P120
      .
      .
1021   TCGGCGATATTA AAAACCTTACTTATGGATAGCCAGGATAAGTATTTTGAAGCAACCCAAA
  
```

## Ergebnisse

1081 CAGTGTATGAATGGTGTGGTGTTCGACGCAATTGCTCGCTGCGTATATTTTGTCTATTTG  
5'-GTGTATGAATTCTGTGGTGTTC-3'  
P121

1141 ATGAGTACAATGAGAAGAAAGCATCCGCCAGAAAGACATT**CTCATTAAAG**GGTGATGCTG  
GTAC  
RsaI

1201 CCAACTTACTGATTTAGTGTATGATGGTGTTCGAGGTGCTCCAGTGGCTTCTGTTTCT

1261 ATCAGCTGTCCCTCCTGTTTCTGACTACTGACGGGGTGGTGCCTAACGGCAAAGCACTGCC

1321 GGACATCAGCGCTATCTCTGCTCTCACTGCCGTAACATGGCAACTGCAGTTCCTTAC  
CTGCAG  
PstI

1381 ACCGCTTCTCAACCCGGTACGCACCAGAAAATCATTGATATGGCCATGAATGGCGTTGGA

1441 TGCCGGGCAACTGCACGCATTATGGGCGTTGGCCTCAACACGATTTTACGTCCTTAAAA

1501 AACTCAGGCCGAGTCCGTAACCTCGCGCATAACAGCCGGGCAGTGACGTCATCGTCTGCG

1561 CGGAAATGGACGAACAGTGGGGCTATGTGGGGCTAAATCGCGCCAGCGCTGGCTGTTTT

1621 ACGCGTATGACAGTCTCCGGAAGACGGTTGTTGCGCACGTATTCGGTGAACGCACTATGG

1681 CGACGCTGGGGCGTCTTATGAGCCTGCTGTCACCCTTTGACGTGGTATGATGATGACGG

1741 ATGGCTGGCCGCTGTATGAATCCCGCTGAAGGAAAGCTGCACGTAATCAGCAAGCGAT

1801 ATACGCAGCGAATTGAGCGGCATAACCTGAATCTGAGGCAGCACCTGGCACGGCTGGGAC

1861 GGAAGTCGCTGTCGTTCTCAAAATCGGTGGAGCTGCATGACAAAGTCATCGGGCATTATC

1921 TGAACATAAAACACTATCAATAAGTTGGAGTCATTACC**CTCATTAAAG**GTAAGTGGATGACG

1981 GCATCACGAAGCTGAATGAAGCGCAAAAATCCCTGCTGGTAAGCTCACAAAGTTTCAACA

2041 ACGCTTCCGGGAAACTGCTGGCGTTAGATAGCCAGTTAACCAATGATTTTTCAGAAAAA

2101 GCAGCTATTTCCAGTCACAGGTAGATAAAATCAGGAAGGAAGCGTATGCCGGTGCCGCAG

2161 CCGGTGTCGTCGCCGGTCCATTTGGTTAATCATTTCCCTATTCTATTGCTGCGGGCGTAG

2221 TTGAAGGGAAACTGATCCCAGAATTGAAGAACAAGTTAAAATCTGTGCAGAGTTTCTTTA

2281 CCACCCTGTCTAACACGGTTAAACAAGCGAATAAAGATATCGATGCCGCCAAATTGAAAT

2341 TAACCACCGAAATAGCCGCATCGGAGAGATAAAAACGGAAACTGAAACCACAGATTCT

2401 ACGTTGATTATGATGATTTAATGCTTTCTTTGCTAAAAGAAGCGGCCAAAAAATGATTA

2461 ACACCTGTAATGAGTATCAGAAAAACACGGTAAAAGACACTCTTTGAGGTACCTGAAG

2521 TC**TGA**

### 2.2.5. Das Insertionselement IS1 in *clyA*<sub>*Sh.sonnei* ST2757/01</sub>

Durch Abgleich mit einer DNA-Datenbank (GenBank) wurde ermittelt, dass es sich bei dem in *Sh. sonnei* ST2757/01 identifizierten Insertionselement um das bekannte Insertionselement IS1 von *Sh. sonnei* (768 bp) handelt. Die Übereinstimmung auf Nukleotid-Ebene beträgt >99%. Lediglich an Position 360 des Insertionselementes findet sich folgender Austausch: G→C. Das IS1 ist an zwei Stellen in das *clyA*-Gen integriert, nämlich zwischen Nukleotidposition 80 und 81 sowie zwischen Position 354 und 355. Das IS1 wird jeweils von Repeat-Sequenzen flankiert: Die Repeat-Sequenz des IS1 am 5'-Ende des *clyA*-Gens umfasst 8 bp: 5' GATCTTTA 3'. Das zwischen Nukleotidposition 354 und 355 inserierte IS1 wird von einer 9 bp-Repeat-Sequenz flankiert: 5' CTCATTAAG 3'. Im *clyA*-Gen von *E. coli* sind diese Sequenzen an der entsprechenden Stelle nur in einfacher Ausführung vorhanden, woraus geschlossen werden kann, dass die Repeats jeweils durch eine Verdopplung dieser Sequenzen bei der Insertion von IS1 entstanden sind. IS1 selbst enthält an seinen beiden Enden unvollständige invertierte Repeat-Sequenzen (5' GGTGATGCTGCCAA CTTACTGATTTAGTGT.....AAACACTATCAATAAGTTGGAGTCATTACC 3') (Abb. 23).

#### Abb. 23: Sequenz des Insertionselementes IS1 aus *Sh. sonnei* ST2757/01.

Veränderungen im Vergleich zur publizierten Sequenz des IS1 von *Sh. sonnei* (GenBank-Nr. M37615, gi: 149094) sind eingezeichnet und fettgedruckt. An den Enden des Insertionselementes findet sich eine unvollständige invertierte Repeat-Sequenz (unterstrichen).

```

1      GGTGATGCTGCCAACTTACTGATTTAGTGTTATGATGGTGT TTTTGAGGTGCTCCAGTGGC
      .
      .
61     TTCTGTTTCTATCAGCTGTCCCTCCTGTTTCAGCTACTGACGGGGTGGTGCGTAACGGCAA
      .
      .
121    AAGCACTGCCGGACATCAGCGCTATCTCTGCTCTCACTGCCGTAAAACATGGCAACTGCA
      .
      .
181    GTTCACTTACACCGCTTCTCAACCCGGTACGCACCAGAAAATCATTGATATGGCCATGAA
      .
      .
241    TGGCGTTGGATGCCGGGCAACTGCACGCATTATGGGCGTTGGCCTCAACACGATTTTACG

```



Die inserierten Insertionselemente und die Duplikation der *clyA*-spezifischen Sequenzen an den Insertionsstellen wurden bei diesem Sequenzvergleich außer Acht gelassen.

### 2.3.2. Vergleich von *clyA*<sub>*Sh. sonnei* ST2757/01</sub> mit *clyA*<sub>*Sh. sonnei* ST3112/01</sub>

Auch in *Sh. sonnei* ST3112/01 wurde kürzlich das Vorkommen von *clyA* nachgewiesen (A. Ludwig, unveröffentlicht). Hier wird das Gen ebenfalls von IS1 unterbrochen, jedoch nur einmal. Die Insertionsstelle befindet sich zwischen Nukleotidposition 354 und 355 von *clyA*, d.h. sie ist identisch mit der hinteren IS1-Insertionsstelle von *clyA* von *Sh. sonnei* S2757/01. Auch die flankierenden Repeats sind identisch (5' CTCATTAAG 3').

In der Sequenz von *clyA* finden sich insgesamt nur wenige Unterschiede zwischen *clyA*<sub>*Sh. sonnei* ST2757/01</sub> und *clyA*<sub>*Sh. sonnei* ST3112/01</sub>. Die Veränderungen sind in Abb. 24 dargestellt: An Nukleotidposition 119 T→C, an Position 636 G→A und an Position 735 C→G. Der Nukleotidaustausch an Position 119 resultiert in einer Änderung der Aminosäuresequenz an Aminosäureposition 40: F→S.

### 2.3.3. Vergleich von *clyA*<sub>*Sh. sonnei* ST2757/01</sub> mit *clyA*<sub>*Sh. dysenteriae* 60R</sub>

Im *clyA*-Gen von *Sh. dysenteriae* 60R ist ein 632 bp langes Fragment (Nukleotidposition 233 bis 864) durch ein 764 bp langes Insertionselement ersetzt, das 99,3% Sequenzidentität zu dem Insertionselement iso-IS1 (NuXi) von *Sh. dysenteriae* aufweist (A. Ludwig, unveröffentlicht). Dieses Insertionselement ist nicht identisch mit IS1 von *Sh. sonnei*. Abgesehen von der 632 bp großen Deletion in *clyA*<sub>*Sh. dysenteriae* 60R</sub> unterscheidet sich *clyA*<sub>*Sh. dysenteriae* 60R</sub> von *clyA*<sub>*Sh. sonnei* ST2757/01</sub> durch folgende Nukleotidsubstitutionen: An Nukleotidposition 16 G→A, an Position 33 A→G, an Position 72 A→G, an Position 186 C→T und an Position 882 A→G. Dies resultiert in der Aminosäuresequenz in einem Aminosäureaustausch an Position 6: A→T. Die Austausche sind in Abb. 24 dargestellt.

### 2.3.4. Vergleich von *clyA*<sub>*Sh. sonnei* ST2757/01</sub> mit *clyA*<sub>*Sh. flexneri* M90T</sub>

Das in *Sh. flexneri* M90T identifizierte *clyA*-Gen weist an Nukleotidposition 335-345 eine 11 bp-Deletion auf. Im Vergleich mit *clyA*<sub>*Sh. sonnei* ST2757/01</sub> finden sich folgende Basenaustausche (Abb. 24): An Nukleotidposition 285 T→A, an Position 551 G→A, an Position 624 C→T, an Position 753 A→G, an Position 777 C→A, an Position 789 C→T und an Position 872 A→G. Dies führt zu zwei Austauschen in der Aminosäuresequenz, wenn die 11 bp große Deletion

und die durch diese Deletion verursachte Verschiebung des Codon-Leserasters nicht berücksichtigt wird: An Aminosäureposition 184 G→D und an Aminosäureposition 291 K→R. In *clyA<sub>Sh.flexneri</sub> M90T* findet sich kein Insertionselement. Interessanterweise liegt die deletierte 11 bp-Sequenz unmittelbar vor der Sequenz CTCATTAAG, welche in *clyA<sub>Sh.sonnei</sub> ST2757/01* als flankierende Repeat-Sequenz für das Insertionselement IS1 fungiert.

**Abb. 24: Sequenz von *clyA<sub>Sh.sonnei</sub> ST2757/01* ohne Insertionselemente.**

Vergleich der Nukleotidsequenz von *clyA<sub>Sh.sonnei</sub> ST2757/01* mit *clyA<sub>Sh.sonnei</sub> ST3112/01*, *clyA<sub>Sh.flexneri</sub> M90T*, *clyA<sub>Sh.dysenteriae</sub> 60R* und *clyA<sub>E.coli</sub> K-12*. Basenaustausche (fett) und Aminosäureaustausche (kursiv) sind farblich markiert: *clyA<sub>E.coli</sub> K-12*:schwarz, *clyA<sub>Sh.flexneri</sub> M90T*:grün, *clyA<sub>Sh.sonnei</sub> ST3112/01*:rot, *clyA<sub>Sh.dysenteriae</sub> 60R*:blau. Das ATG-Startcodon und das Stopcodon des *clyA*-Gens sind fettgedruckt und unterstrichen. In *clyA<sub>Sh.dysenteriae</sub> 60R* ist die DNA-Sequenz von Nukleotidposition 233 bis einschließlich 864 deletiert und durch das Insertionselement iso-IS1 ersetzt. Die mit + markierten Nukleotide sind in *clyA<sub>Sh.flexneri</sub> M90T* deletiert.

```

1   ATGACTGAAATCGTTAGAGATAAAAACGGTAGAAGTAGTTAAAAACGCAATCGAAACCGCA
    M T E I V A D K T V E V V K N A I E T A
    T

61  GATGGAGCATTAGATCTTTATA A AGATCAGTATCTCGATCAG.TCCATCCCCTGGCGAGACCTC.TT
    D G A L D L Y D Q Y L D H A I P W E T F
    N K Q V Q S

121 GATGAAACCATAAGAGAGTTAAGTCGCTTTAAACAGGAGTATTCACAGGCAGCCTCCGTT
    D E T M E E L S R F K Q E Y S Q A A S V
    I K

181 TTAGTTCGGCATATTTAAACCTTACTTATGGATAGCCAGGATAAGTATTTTGAAGCAACC
    L V G D I K T L L M D S Q D K Y F E A T

241 CAAACAGTGTATGAATGGTGTGGTGTGCGACGCAATTGCTCGCTAGCATATTTTGGCTA
    Q T V Y E W C G V A T Q L L A A Y I L L
    A

301 TTTGATGAGTACAATGAGAAGAAAGCATCCGCCAGAAAGACATTCTCATTAAGGTACTG
    F D E Y N E K K A S A Q K D I L I K V L
    ++++++++

```

# Ergebnisse

361 GATGACGGCATCACGAAGCTGAATGAAGCGCAAAAATCCCTGCTGGTAAGCTCACAAAGT  
D D G I T K L N E A Q K S L L V S S Q S

421 TTCAACAACGCTTCCGGGAAACTGCTGGCGTTAGATAGCCAGTTAACCAATGATTTTCA  
F N N A S G K L L A L D S Q L T N D F S

481 GAAAAAAGCAGCTATTTCCAGTCACAGGTAGATAAAAATCAGGAAGGAAGCGTATGCCGGT  
E K S S Y F Q S Q V D K I R K E A Y A G

541 GCCGCAGCCG**G**TGTCGTCGCCGGTCCATTTGG**T**TTAATCATTTCCTATTCTATTGCTGCG  
A A A G V V A G P F G L I I S Y S I A A  
*D*

601 GGCGTAGTTGAAGG**G**AAACTGAT**C**CCAGAATTGA**A**GAACAAGTTAAAATCTGTGCAGAG**T**  
G V V E G K L I P E L K N K L K S V Q S  
N

661 TTCTTTACCACCCTGTCTAACACGGTTAAACAAGCGAATAAAGATATCGATGCCGCCAAA  
F F T T L S N T V K Q A N K D I D A A K

721 TTGAAATTAACCAC**G**GAAATAGCCGCCATCGG**A**GAGATAAAAAACGGAAACTGAAACC**C**ACC  
L K L T T E I A A I G E I K T E T E T T

781 AGATTCTA**C**GGTTGATTATGATGATTTAATGCTTTCTTTGCTAAAAGAAGCGGCCAAAAAA  
R F Y V D Y D D L M L S L L K E A A K K

841 ATGATTAACACCTGTAATGAGTATCAGAAAA**A**ACACGGTAA**A**AGACACTCTTTGAGGTA  
M I N T C N E Y Q K K H G K K T L F E V  
R  
R

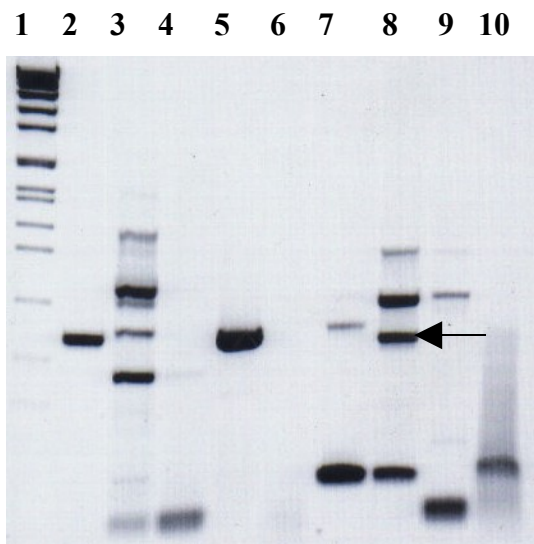
901 CCTGAAGTC**TGA**  
P E V

### 3. Untersuchung der Verbreitung des *clyA*-Gens innerhalb der Familie der *Enterobacteriaceae*

#### 3.1. PCR-Analyse von Bakterien verschiedener Gattungen und Species aus der Familie der *Enterobacteriaceae*

Zunächst wurden Standard-PCR-Analysen mit Taq-Polymerase mit einfachen Lysaten der folgenden Stämme durchgeführt: *E. cloacae* MSD-8, *C. freundii* MSD-41, *S. marcescens* MSD-6, *P. mirabilis* MSD-1, *M. morgani* FR301, *H. alvei* RV3/97, *Y. enterocolitica* RV2/00 und *E. coli* CC118 als Positivkontrolle. Zu Beginn wurden Oligonukleotidprimer für die PCR verwendet, welche innerhalb der Sequenz des *clyA*-Gens von *E. coli* hybridisieren. Eingesetzt wurden die Primer P8 und P44. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurde ein 570 bp-Produkt erwartet.

Alle PCR-Ansätze der verschiedenen Stämme resultierten in unspezifischen PCR-Produkten und es zeigten sich Banden verschiedener Größe auf dem Agarosegel, wobei aus dem Lysat von *M. morgani* FR301 auch eine deutliche Bande von ~570 bp entstand (Abb. 25).



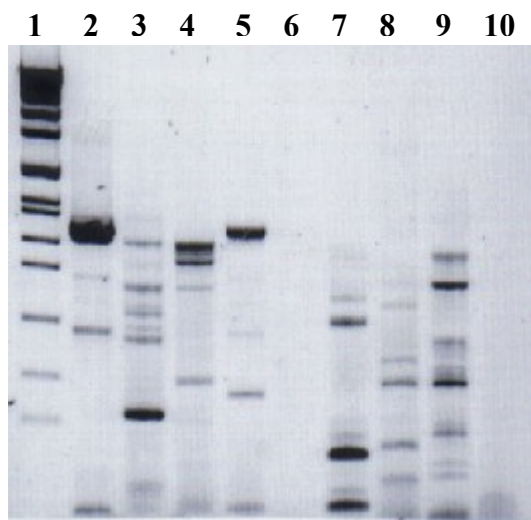
**Abb. 25:** Analyse der P8/P44-PCR-Produkte von verschiedenen Bakterien aus der Familie der *Enterobacteriaceae* durch Agarosegelelektrophorese.

Spur 1: DNA-Längenstandards  
Spur 2: *E. coli* CC118 (Positivkontrolle)  
Spur 3: *E. cloacae* MSD-8  
Spur 4: *C. freundii* MSD-41  
Spur 5: *E. coli* n.n.  
Spur 6: *S. marcescens* MSD-6  
Spur 7: *P. mirabilis* MSD-1  
Spur 8: *M. morgani* FR301  
Spur 9: *H. alvei* RV3/97  
Spur 10: *Y. enterocolitica* RV2/00  
Pfeil: 0,57 kb PCR-Produkt von *M. morgani* FR301.  
Das Produkt zeigt die erwartete Größe.  
1% Agarosegel



Unter gleichen Bedingungen wurde eine PCR mit chromosomaler DNA der zu untersuchenden Stämme durchgeführt. Es resultierten weniger unspezifische Banden, im Fall von *M. morganii* FR301 zeigte sich wiederum eine schwache Bande der erwarteten Größe. Ein ebensolches PCR-Produkt entstand im PCR-Ansatz mit chromosomaler DNA von *S. marcescens* MSD-6.

Die PCR-Analysen wurden mit Primern, welche außerhalb des *clyA*-Gens von *E. coli* binden, fortgesetzt. Verwendet wurden Lysate der o.g. Stämme und die Primer P111 und P21, erwartet wurde ein 1305 bp-Produkt. Hier zeigten sich nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte keine Banden der erwarteten Größe (Abb. 26).



**Abb. 26: Analyse der P111/P21-PCR-Produkte von verschiedenen Bakterien aus der Familie der *Enterobacteriaceae* durch Agarosegelelektrophorese.**

Spur 1: DNA-Längenstandards  
Spur 2: *E. coli* CC118 (Positivkontrolle)  
Spur 3: *E. cloacae* MSD-8  
Spur 4: *C. freundii* MSD-41  
Spur 5: *E. coli* n.n.  
Spur 6: *S. marcescens* MSD-6  
Spur 7: *P. mirabilis* MSD-1  
Spur 8: *M. morganii* FR301  
Spur 9: *H. alvei* RV 3/97  
Spur 10: *Y. enterocolitica* RV 2/00  
Die PCR-Versuche mit den extern bindenden Primern P111 und P21 resultierten nicht in PCR-Produkten der erwarteten Größe.  
1% Agarosegel

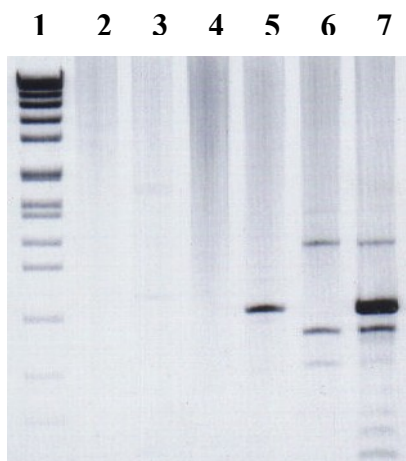
Ein PCR-Ansatz unter gleichen Bedingungen mit chromosomaler DNA unter wiederholter Verwendung der Primer P111 und P21 lieferte als Ergebnis eine schwache Bande bei *S. marcescens* MSD-6 in der erwarteten Größe.

### 3.2. Weitere Analyse des *M. morganii*-Stammes FR301

Nach der Entstehung von größenadäquaten Produkten in den PCR-Analysen mit den Primern P8 und P44 wurden mit der chromosomalen DNA des Stammes *M. morganii* FR301 weitere PCR-Analysen mit verschiedenen Primerkombinationen durchgeführt. Verwendet wurden Standard-PCR-Ansätze mit Taq-Polymerase. Eingesetzt wurden die Primerkombinationen P3/P7, resultierend im Fall von *E. coli* K-12 in einem 1203 bp-Produkt und P3/P21, resultierend in einem 1294 bp-Produkt. Es entstanden jedoch keine Banden auf dem Agarosegel.

Weitere PCR-Analysen wurden mit extern von *clyA*<sub>*E. coli* K-12</sub> hybridisierenden Primern durchgeführt, wobei verschiedene Primerkombinationen in Standard-Ansätzen mit Taq-Polymerase verwendet wurden: Bei den Kombinationen P3/P29, resultierend im Fall von *E. coli* K-12 in einem 1302 bp-Produkt, P3/P7, resultierend in einem 1203 bp-Produkt, und bei P23/P29, resultierend in einem 1303 bp-Produkt, ergab die PCR-Analyse kein Ergebnis in Form von größenadäquaten Banden auf dem Agarosegel.

Bei Verwendung der Primerkombinationen P23/P7, resultierend im Fall von *E. coli* K-12 in einem 1264 bp-Fragment, P28/P29, resultierend in einem 1267 bp-Fragment und P28/P7, resultierend in einem 1168 bp-Fragment zeigten sich lediglich Banden auf dem Agarosegel, welche nicht den erwarteten Größen entsprachen. Banden gleicher Größe entstanden aus PCR-Ansätzen mit den Primerkombinationen P28/P29 und P28/P7, was für Artefakte des Primers P28 spricht (Abb. 27).

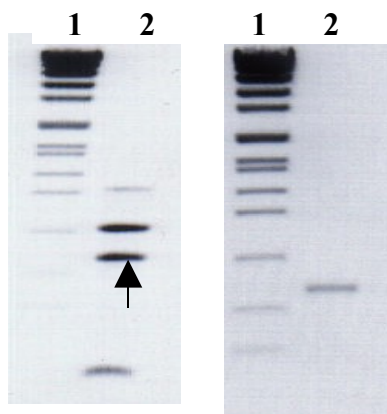


**Abb. 27: PCR-Analysen mit *M. morganii* FR301.**

Spur 1: DNA-Längenstandards  
 Spur 2: *M. morganii* FR301, P3/P29  
 Spur 3: *M. morganii* FR301, P3/P7  
 Spur 4: *M. morganii* FR301, P23/P29  
 Spur 5: *M. morganii* FR301, P23/P7  
 Spur 6: *M. morganii* FR301, P28/P29  
 Spur 7: *M. morganii* FR301, P28/P7  
 Die PCR-Produkte mit den extern bindenden Primern resultierten nicht in PCR-Produkten der erwarteten Größe.  
 1% Agarosegel

## Ergebnisse

Da mit den außerhalb von *clyA*<sub>*E.coli* K-12</sub> bindenden Primern keine positiven Ergebnisse erzielt werden konnten, wurde die PCR mit der Primerkombination P8/P44 und Lysat von *M. morgani* FR301 unter Standardbedingungen mit Taq-Polymerase wiederholt. Es entstand wieder neben anderen, unspezifischen Banden das erwartete ~0,57 kb große Fragment (Abb. 28). Dieses Fragment wurde nach Reinigung und Konzentration des PCR-Ansatzes (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen) durch präparative Agarosegelelektrophorese isoliert (Abb. 29).



**Abb. 28 (links) und 29 (rechts): Analyse und Isolierung des ~0,57 kb PCR-Produkts von *M. morgani* FR301 durch Agarosegelelektrophorese.**

Spur 1: (Abb. 28 und 29): DNA-Längenstandards  
Spur 2 (Abb. 28): *M. morgani* FR301, Primer P8/P44  
Pfeil: ~0,57 kb PCR-Produkt  
Spur 2 (Abb. 29): ~0,57 kb PCR-Produkt nach Isolierung des Fragments.  
1% Agarosegel

Das isolierte DNA-Fragment wurde in den pDrive Cloning Vector ligiert und nach Standard-Protokoll in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Nach blau/weiß/Ampicillin-Selektion wurde das Plasmid einer positiven Kolonie isoliert und der Einbau des ~0,57 kb-Fragmentes in den verwendeten Vektor durch Restriktionsanalyse des Plasmids mit EcoRI bestätigt.

Anschließend wurde das Insert dieses Plasmids mit den Primern P8 und P44 sequenziert. Die ermittelte DNA-Sequenz zeigte keinerlei Ähnlichkeit zum *clyA*-Gen. Das aus *M. morgani* FR301 mit den Primern P8 und P44 amplifizierte ~0,57 kb-Fragment war demnach ein unspezifisches Zufallsprodukt.

### 3.3. Weitere Analyse des *S. marcescens*-Stammes MSD-6

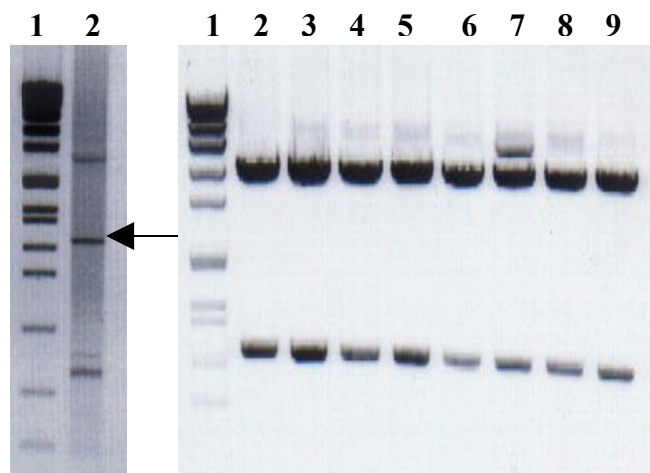
Auch mit der chromosomalen DNA von *S. marcescens* MSD-6 wurden nach Entstehung eines größenadäquaten PCR-Produkts in den PCR-Analysen mit den Primern P111 und P21 mit Taq-Polymerase weitere PCR-Analysen mit Taq-Polymerase durchgeführt. Zunächst wurden die Primerkombinationen P3/P7 und P3/P21 eingesetzt. Erwartet wurde ein 1203 bp-Produkt

## Ergebnisse

bzw. ein 1294 bp-Produkt. Es zeigten sich jedoch keine PCR-Produkte dieser Größe auf dem Agarosegel.

Um das – wenn auch schwache – Produkt aus der PCR mit Taq-Polymerase und den Primern P111 und P21 weiter zu analysieren, wurden Standard PCR-Ansätze unter den o.g. Bedingungen reproduziert (Abb. 30).

Die PCR-Ansätze wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt und im Vakuum konzentriert. Das entstandene ~1,3 kb-Fragment wurde mit dem pDrive Cloning Vector (Qiagen) ligiert. Es erfolgte die Transformation in *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen nach Standard-Protokoll. Nach blau/weiß/Ampicillin-Selektion wurden die Plasmide aus acht positiven Kolonien isoliert und mit EcoRI geschnitten, um das Vorhandensein des Insertfragments zu überprüfen (Abb. 31). Aus einem Klon mit korrektem rekombinanten Plasmid wurde die Plasmid-DNA für die Sequenzierung des Inserts mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) isoliert.



**Abb. 30 (links) und Abb. 31 (rechts): Analyse des ~1,3 kb-PCR-Produkts von *S. marcescens* MSD-6 durch Klonierung in pUC18 und Restriktionsanalyse.**

Spur 1: (Abb. 30 u. 31) DNA-Längenstandards

Spur 2 (Abb. 30) *S. marcescens* MSD-6, Primer P111/P21, Pfeil : ~1,3 kb PCR-Produkt

Spur 2-9 (Abb. 31): Klone 1-8: selektionierte pDrive Cloning-Derivate mit inseriertem ~1,3 kb Fragment von *S. marcescens* MSD-6, verdaut mit EcoRI. Die 8 Klone zeigen das korrekte Insert.

Die Sequenzierung erfolgte zum einen mit den Primern pUC universal und pUC reverse, zum anderen mit den Primern P111 und P21.

Die Sequenzierung zeigte, dass das klonierte DNA-Segment aus *S. marcescens* MSD-6 keine Homologie zum *clyA*-Gen aufweist. Das größenadäquate PCR-Produkt war somit ein Zufallsprodukt.

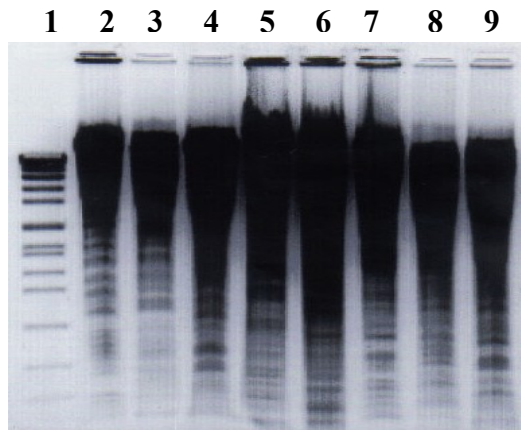
### **3.4. Southern Blot-Analyse von Bakterien verschiedener Gattungen und Species aus der Familie der *Enterobacteriaceae***

Durch die PCR-Analysen bzw. durch die Sequenzierungen größenadäquater PCR-Produkte konnten keine Homologien zwischen den untersuchten *Enterobacteriaceae* und *clyA* festgestellt werden. Für detaillierte Aussagen sind die PCR-Versuche jedoch zu unspezifisch, da die entstehenden Produkte von der korrekten Hybridisierung der PCR-Primer abhängig sind. Bei Veränderungen in der *clyA*-Gensequenz wird die Wahrscheinlichkeit einer Bindung der Primer an die Gensequenz stark vermindert, zumal diese auch noch von den anderen PCR-Parametern abhängig ist. Außerdem ist die Möglichkeit der Bildung unspezifischer PCR-Produkte hoch.

Im Southern Blot wird eine DNA-Sonde an die zu überprüfende DNA hybridisiert. Dabei fallen kleinere Änderungen in der Gensequenz nicht stark ins Gewicht; außerdem sind unspezifische Bindungen unwahrscheinlich.

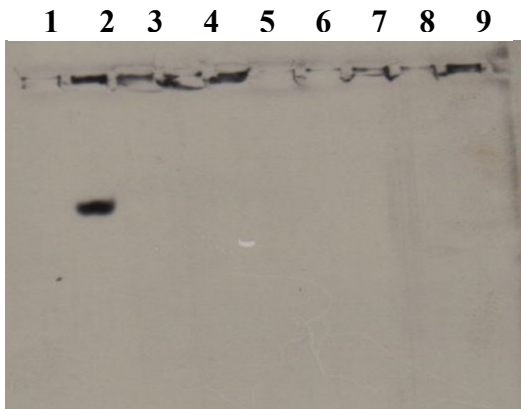
Als Sonde für die Detektion *clyA*-homologer DNA-Sequenzen wurde in dieser Arbeit ein 712 bp großes Fragment aus dem *clyA*-Gen von *E. coli* K-12 verwendet. Dieses Fragment, welches einen Großteil des *clyA*-Gens umfaßt, wurde durch PCR mit den Primern P8 und P2 aus dem *E. coli* K-12-Stamm CC118 amplifiziert.

Mit EcoRI/HindIII-verdauter chromosomaler DNA der Stämme *E. cloacae* MSD-8, *C. freundii* MSD-41, *S. marcescens* MSD-6, *P. mirabilis* MSD-1, *M. morgani* FR301, *H. alvei* RV3/97 und *Y. enterocolitica* RV2/00 wurden zwei Southern Blot-Analysen nach neutraler Methode durchgeführt (Abb. 32 und 33). Als Resultat zeigte sich, dass offenbar in keinem der untersuchten Stämme eine zu *clyA* homologe Sequenz vorhanden ist, denn keiner dieser Stämme zeigte ein Hybridisierungssignal. Bei der Positivkontrolle *E. coli* CC118 war dagegen eine starke Bindung der *clyA*-Sonde an ein definiertes DNA-Fragment zu sehen.



**Abb. 32: Southern Blot: Auftrennung der mit EcoRI/HindIII verdauten DNA der zu untersuchenden Stämme.**

Spur 1: DNA-Längenstandards  
Spur 2: *E. coli* CC118 (Positivkontrolle)  
Spur 3: *E. cloacae* MSD-8  
Spur 4: *C. freundii* MSD-41  
Spur 5: *S. marcescens* MSD-6  
Spur 6: *P. mirabilis* MSD-1  
Spur 7: *M. morgani* FR301  
Spur 8: *H. alvei* RV3/97  
Spur 9: *Y. enterocolitica* RV2/00  
1% Agarosegel



**Abb. 33: Southern Blot: Ergebnis nach Hybridisierung der geblotteten DNA-Fragmente mit einer 712 bp *clyA*-Gensonde (entwickelter ECL-Film).**

Expositionszeit: 20 Min.  
Nur bei der Positivkontrolle erscheint eine positive Bande (Pfeil).  
Spuren 1-9: siehe Abb. 32.

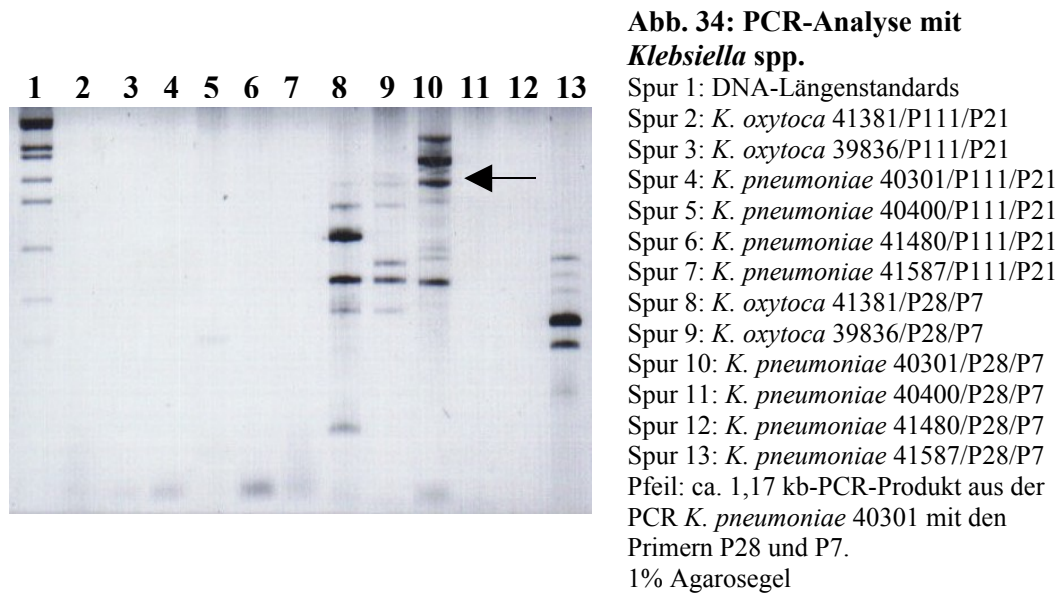
### 3.5. Untersuchung von *Klebsiella* spp.

#### 3.5.1. PCR-Analyse von *Klebsiella* spp.

Verschiedene Stämme der Spezies *Klebsiella oxytoca* und *Klebsiella pneumoniae* wurden sowohl mittels PCR als auch durch Southern Blot-Analysen auf den Besitz *clyA*-homologer DNA-Sequenzen hin untersucht. Untersucht wurde *K. oxytoca* 41381 (eingesetzt wurde in allen Versuchen Lysat), *K. oxytoca* 39836 (chromosomale DNA), *K. pneumoniae* 40301 (chromosomale DNA), *K. pneumoniae* 40400 (chromosomale DNA), *K. pneumoniae* 41480 (chromosomale DNA), und *K. pneumoniae* 41587 (Lysat). Durchgeführt wurden Standard-PCR-Analysen mit Taq-Polymerase. Zunächst wurden Primer eingesetzt, welche innerhalb des *clyA*-Gens von *E. coli* K-12 binden: Die Kombination P8/P44 resultiert im Fall von *E. coli* K-12 bei korrekter Bindung in einem 570 bp-Produkt, die Kombination P57/P2 in einem 619 bp-Produkt.

Auf dem Agarosegel erschienen nur bei den Ansätzen mit *K. oxytoca* 39836/P8/P44 und *K. pneumoniae* 40301/P8/P44 ungefähr passende Banden. Weiterhin waren einige Banden anderer Größe zu sehen.

Anschließend wurden PCR-Analysen mit Oligonukleotidprimern durchgeführt, welche außerhalb des *clyA*-Gens von *E. coli* K-12 hybridisieren. Verwendet wurden hier die Primerkombinationen P28/P7, resultierend im Fall von *E. coli* K-12 in einem 1168 bp-Fragment und P111/P21, resultierend in einem 1305 bp-Fragment (Abb. 34). Aus dem Ansatz *K. pneumoniae* 40301/P28/P7 resultierte wieder eine ungefähr passende Bande, es waren jedoch auch PCR-Produkte anderer Größe zu sehen. Schwächere Banden der gleichen Größe entstanden, neben zahlreichen anderen Banden, im Fall von *K. oxytoca* 41381 und *K. oxytoca* 39836 bei einer PCR mit den Primern P28 und P7.



Vor der Sequenzierung wurden die Stämme im Southern Blot überprüft, um Artefakte, welche zufällig die erwartete Größe haben, auszuschließen, da die Zahl der Primerbindungsartefakte in den hier durchgeführten PCR-Analysen insgesamt hoch war.

### 3.5.2. Southern Blot-Analyse von *Klebsiella* spp.

Durchgeführt wurde zunächst ein Southern Blot mit alkalischem Transferpuffer. Untersucht wurde EcoRI/HindIII-verdaute chromosomale DNA der Stämme *K. oxytoca* 41381, *K. oxytoca* 39836, *K. pneumoniae* 40301, *K. pneumoniae* 40400, *K. pneumoniae* 41480 und *K. pneumoniae* 41587. Dabei zeigte sich keine positive Reaktion mit der 712 bp-*clyA*-Sonde aus *E. coli* K-12. Auch im Southern Blot mit neutralem Transferpuffer unter Verwendung der feuchten Kammer (Puffer-Reservoir) wurde dieses Ergebnis bestätigt. Daraus wurde gefolgert, dass in den getesteten *K. oxytoca*- und *K. pneumoniae*-Stämmen keine zu *clyA* homologen DNA-Sequenzen vorhanden sind. Weiterhin bedeutete dies, dass die in den PCR-Ansätzen entstandenen DNA-Fragmente lediglich unspezifische Zufallsprodukte waren. Auf eine Isolierung und Sequenzierung dieser DNA-Fragmente wurde deshalb verzichtet.



### 3.6. Untersuchung von *Citrobacter* spp.

Zusätzlich zu dem bereits anfänglich untersuchten Stamm *C. freundii* MSD-41 wurden weitere Stämme des Genus *Citrobacter* auf den Besitz *clyA*-homologer DNA-Sequenzen hin analysiert, da *Citrobacter* und *E. coli* relativ nah miteinander verwandt sind. Diese Untersuchungen, in die verschiedene *Citrobacter*-Species einbezogen wurden, sollten zeigen, ob sich diese Verwandtschaft auch auf das *clyA*-Gen erstreckt.

#### 3.6.1. PCR-Analyse von *Citrobacter* spp.

Die Stämme *C. freundii* 40690, *C. freundii* 41380, *C. freundii* 41867, *C. braakii* 38893 und der bereits analysierte Stamm *C. freundii* MSD-41 wurden zunächst mit Standard PCR-Ansätzen mit Taq-Polymerase untersucht. Verwendet wurde chromosomale DNA. Eingesetzt wurden die Primerkombinationen P8/P44, resultierend im Fall von *E. coli* K-12 in einem 570 bp-Produkt, P8/P36, resultierend in einem 756 bp-Produkt, P57/P36, resultierend in einem 663 bp-Produkt und P57/P44, resultierend in einem 477 bp-Produkt. Eine in der Größe ungefähr passende Bande zeigte lediglich das Produkt der PCR *C. braakii* 38893/P57/P44 auf dem Agarosegel (Abb. 35).



**Abb. 35: PCR-Analyse von *C. freundii* 41867 und *C. braakii* 38893.**

Spur 1: DNA-Längenstandards

Spur 2: *C. freundii* 41867, PCR mit den Primern P57/P44

Spur 3: *C. braakii* 38893, PCR mit den Primern P57/P44

Pfeil: ~0,48 kb-PCR-Produkt der PCR *C. braakii* 38893/P57/P44. Das Fragment zeigt die erwartete Größe.

1% Agarosegel

Das PCR-Produkt wurde gereinigt und die Bande aus dem Agarosegel isoliert. Das isolierte Fragment wurde mit den PCR-Primern P57 und P44 sequenziert. Die Sequenzierung ergab jedoch keine Übereinstimmung mit der entsprechenden *clyA*-Sequenz. Das aus der PCR

entstandene größenadäquate DNA-Fragment wurde demnach offensichtlich durch unspezifische Bindung der Primer erzeugt.

Mit dem Stamm *C. freundii* MSD-44 wurden PCR-Analysen mit Lysat durchgeführt. Dabei wurden zunächst unter Verwendung eines Standard-PCR-Ansatzes mit Taq-Polymerase intern in *clyA* von *E. coli* K-12 hybridisierende Primer eingesetzt: P8/P44, resultierend in einem 570 bp-Produkt, P57/P2, resultierend in einem 619 bp-Produkt, P57/P44, resultierend in einem 477 bp-Produkt und P8/P2, resultierend in einem 720 bp-Produkt. Als extern von *clyA*<sub>*E. coli* K-12</sub> bindende Primer wurden P111/P21, resultierend in einem 1305 bp-Produkt und P3/P21, resultierend in einem 1294 bp-Produkt, verwendet. Als Ergebnis zeigte sich lediglich eine Vielzahl von unspezifischen Banden auf dem Agarosegel.

### 3.6.2. Southern Blot-Analyse von *Citrobacter* spp.

Southern Blot-Analysen wurden mit den Stämmen *C. freundii* MSD-41, *C. freundii* 40690, *C. freundii* 41830, *C. freundii* 41867, *C. braakii* 38893 und *C. freundii* MSD-44 durchgeführt. Der Standard-Southern Blot mit neutralem Transferpuffer ergab, dass die chromosomale DNA der hier getesteten Stämme keine *clyA*-homologe Sequenz enthält. Im Fall von *C. freundii* MSD-41 bestätigte dieser Befund das Ergebnis einer schon vorher durchgeführten Southern Blot-Analyse (s.o.)

### 3.6.3. Analyse weiterer *Citrobacter*-Stämme

Um die Untersuchungen mit dem Genus *Citrobacter* auszuweiten, wurden von der DSMZ die folgenden *Citrobacter*-Stämme erworben: *C. koseri* DSM 4595, *C. koseri* DSM 4596 (*Levinea malonatica*), *C. koseri* DSM 4570 (*C. diversus*)<sup>2</sup>, *C. amalonaticus* DSM 4593, *C. freundii* DSM 30039, *C. gillanii* DSM 13694 und *C. murliniae* DSM 13695.

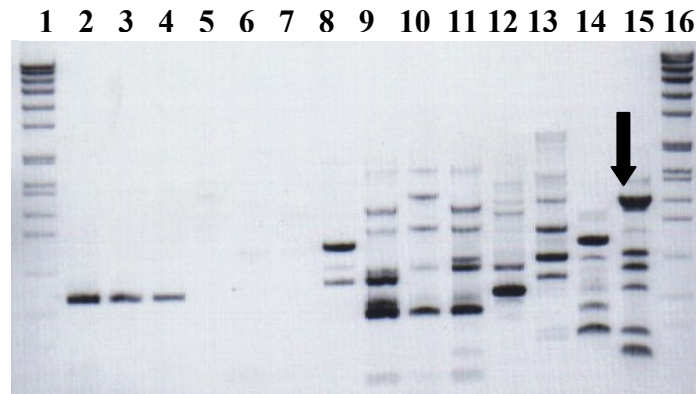
Durchgeführt wurden Standard-PCRs mit Taq-Polymerase und Lysat. Zunächst wurden mit extern hybridisierenden Primern PCR-Analysen durchgeführt. Die Kombination P111/P21 führt bei *E. coli* K-12 zur Amplifikation eines 1305 bp-Produktes und die Kombination P28/P7 zu einem 1168 bp-Produkt. Aus der PCR mit *C. murliniae* 13695/P28/P7 ergab sich neben mehreren anderen Banden eine deutliche Bande ungefähr passender Größe auf dem Agarosegel (Abb. 36).

---

<sup>2</sup> *Citrobacter diversus* wurde *Citrobacter koseri* zugeordnet.

## Ergebnisse

Um die erzielten Resultate zu verifizieren, wurden PCR-Analysen mit intern in *clyA* von *E. coli* K-12 hybridisierenden Primern durchgeführt. Dabei wurden alle oben genannten *Citrobacter*-Stämme mit Standard-PCR-Ansätzen mit Taq-Polymerase und mit den Primerkombinationen P57/P2, resultierend in einem 619 bp-Produkt, und P8/P44, resultierend in einem 570 bp-Produkt, untersucht.



**Abb. 36: PCR-Analyse von *Citrobacter*-Stämmen mit den Primern P111/P21 bzw. P28/P7.**

Spur 1: DNA-Längenstandards  
Spur 2: *C. koseri* DSM 4595  
Spur 3: *C. koseri* DSM 4596  
Spur 4: *C. koseri* DSM 4570  
Spur 5: *C. amalonaticus* DSM 4593  
Spur 6: *C. freundii* DSM 30039  
Spur 7: *C. gillenbergii* DSM 13694  
Spur 8: *C. murliniae* DSM 13695  
Spur 2-8: P111/P21

Spur 9: *C. koseri* DSM 4595  
Spur 10: *C. koseri* DSM 4596  
Spur 11: *C. koseri* DSM 4570  
Spur 12: *C. amalonaticus* DSM 4593  
Spur 13: *C. freundii* DSM 30039  
Spur 14: *C. gillenbergii* DSM 13694  
Spur 15: *C. murliniae* DSM 13695  
Spur 9-15: P28/P7  
Spur 16: DNA-Längenstandards

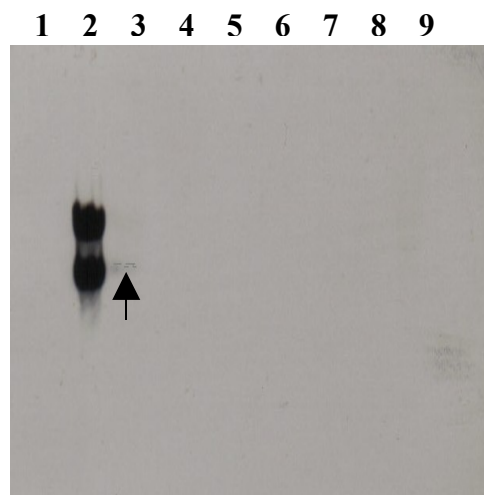
Pfeil: ~1,17 kb-Produkt der PCR *C. murliniae* 13695/P28/P7. Die Bande zeigt die erwartete Größe.

1% Agarosegel

Hier zeigten sich lediglich zahlreiche unspezifische Banden auf dem Agarosegel. Dies ließ vermuten, dass es sich bei der oben beschriebenen Bande um ein Artefakt handelt. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden Southern Blot-Analysen mit der oben beschriebenen *clyA*-Sonde durchgeführt (DNA-Transfer bei pH 7, Southern Blot-Variante mit Pufferreservoir). In den Stämmen *C. koseri* DSM 4596, *C. koseri* DSM 4570, *C. amalonaticus* DSM 4593, *C. freundii* DSM 30039, *C. gillenbergii* DSM 13694 und *C. murliniae* DSM 13695 konnten keine *clyA*-homologen Sequenzen nachgewiesen werden.

## Ergebnisse

Jedoch entstand auf dem ECL-Film bei sehr langer Expositionszeit (20 Minuten) auf der Spur des Stammes *C. koseri* DSM 4595 auf der Höhe der Positivkontrolle *E. coli* CC118 eine schwache Bande (Abb. 37). Der Stamm *C. koseri* DSM 4595 wurde deshalb weiter analysiert.



**Abb. 37: Southern Blot-Analyse von *Citrobacter*-Stämmen mit einer 712 bp-*clyA*-Sonde (entwickelter ECL-Film)**

Spur 1: DNA-Längenstandards  
Spur 2: *E. coli* CC118 (Positivkontrolle)  
Spur 3: *C. koseri* DSM 4595  
Spur 4: *C. koseri* DSM 4596  
Spur 5: *C. koseri* DSM 4570  
Spur 6: *C. amalonaticus* DSM 4593  
Spur 7: *C. freundii* DSM 30039  
Spur 8: *C. gillenii* DSM 13694  
Spur 9: *C. murlinae* DSM 13695  
Pfeil: schwache Reaktion bei *C. koseri* DSM 4595 mit der *clyA*-Sonde.  
Expositionszeit: 20 Min.

Ausgegangen wurde dabei von der Annahme, dass, falls dieser Stamm ein *clyA*-Gen enthält, die Überproduktion des Transkriptionsregulators SlyA wie im Fall von *E. coli* zu einer Induktion des *clyA*-Gens und somit zu einem hämolytischen Phänotyp führen könnte. In den Stamm *C. koseri* DSM 4595 wurden deshalb die Plasmide pAL107 (*slyA* von *S. enterica* Serovar Typhimurium) bzw. pAL108 (*slyA* von *E. coli* K-12) durch Elektroporation eingeführt. Die Kolonien von *C. koseri* DSM 4595/pAL107 und *C. koseri* DSM 4595/pAL108 zeigten jedoch nach Wachstum über Nacht bei 37°C einen absolut nichthämolytischen Phänotyp auf YT-Pferdeblutagar mit 30 µg/ml Cm. Auch nach Lagerung der Einzelkolonieausstriche für sieben Tage bei 4°C war keinerlei Hämolyse zu erkennen. Daraus wurde gefolgert, dass *C. koseri* DSM 4595 höchstwahrscheinlich kein *clyA*-homologes Gen besitzt und dass die schwache Bande auf dem Southern Blot-Film ein Artefakt darstellte (möglicherweise verursacht durch Kontamination der Spur durch die Positivkontrolle [DNA von *E. coli* CC118], die in der unmittelbar danebenliegenden Spur aufgetragen war).

## V. Diskussion

Die Verwandtschaftsverhältnisse von Bakterien sind schwierig zu verfolgen, da sie sich natürlicherweise asexuell vermehren und sich ungerichtet durch Gentransfer rekombinieren. Beispielsweise ist *E. coli* normalerweise ein harmloses Bakterium des menschlichen Körpers, manche Stämme sind jedoch durch Aquirierung bestimmter Gene pathogen. Schätzungsweise 18% des Genoms von *E. coli* K-12 ist Fremd-DNA, welche durch horizontalen Transfer erworben wurde [28].

Von den geschätzten 100 Millionen Bakterien sind primär nur etwa 1500 Arten als pathogen einzustufen. Bakterielle Toxine sind Faktoren, welche maßgeblich zur Pathogenität von Bakterien beitragen. Toxine können aufgrund ihrer Struktur, ihrer Wirkungsmechanismen, ihrer Regulationsmechanismen und ihrer genetischen Verwandtschaftsverhältnisse zu Toxin-Familien zusammengefasst werden.

Bei ClyA handelt es sich um ein relativ neu entdecktes Toxin. Es ist aufgrund seiner Eigenschaften keiner bereits beschriebenen Toxinfamilie zuzuordnen. ClyA unterscheidet sich von anderen porenbildenden Toxinen, z.B. auch von den RTX-Toxinen, da ClyA keine posttranslatorische Aktivierung erfordert und  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig Poren bildet. Weiterhin weist ClyA keine Glycin-Aspartat-reiche Repeat-Sequenz auf, bei *clyA* fehlt auch die typische Anordnung im CABD-Operon.

Das porenbildende Sh1A-Hämolyysin von *S. marcescens* ist ebenfalls  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig und oligomerisiert bei der Porenformation. Allerdings ist Sh1A von einem Co-Protein abhängig, wodurch es sich wiederum von ClyA stark unterscheidet.

ClyA lässt sich auch nicht in die Familie der Cholesterol-bindenden-Toxine (CBTs) einordnen, obwohl auch einige Gemeinsamkeiten bekannt sind: beide Toxinarten binden als Monomere an die Zielzelle und bilden dann durch Oligomerisierung Poren. Allerdings unterscheiden sich die Poren durch CBTs und ClyA erheblich in ihrer Größe, die durch CBTs gebildeten Poren sind um das 10-fache größer. Mit einer Größe von 50-60 kDa sind CBTs auch wesentlich größer als ClyA (34 kDa). Darüber hinaus konnten CBTs bisher nur in grampositiven Bakterien nachgewiesen werden. Entscheidend ist jedoch, dass ClyA keinerlei Sequenzhomologien zu anderen Toxinfamilien aufweist.

Die hier durchgeführten Experimente lassen vermuten, dass *clyA* lediglich in *E. coli*, *Salmonella* und *Shigella* vorkommt. Die Ähnlichkeit von *clyA*<sub>*E. coli* K-12</sub> zu *clyA* von anderen,

verschieden pathogenen *E. coli* (z.B. STEC, EIEC) beträgt 99-100%, die Ähnlichkeit zu *clyA*<sub>avian *E. coli*</sub> ungefähr 74% [68]. Weiterhin beträgt die Ähnlichkeit zu *clyA*<sub>*Sh. flexneri*</sub> ca. 98% [19], zu *clyA*<sub>*S. enterica* Serovar Typhi</sub> bzw. *clyA*<sub>*S. enterica* Serovar Paratyphi A</sub> 86-87%.

Hier wurde in einem weiteren *S. enterica* Serovar Paratyphi A-Stamm (Stamm FR1/99) das *clyA*-Gen nachgewiesen. Beachtlich ist, dass das *clyA*-Gen dieses Stammes einschließlich der flankierenden Sequenz 100% identisch zum *clyA*-Gen des *S. enterica* Paratyphi A-Stammes ATCC 9150 ist. Dies lässt vermuten, dass diese Variante des *clyA*-Gens in vielen – möglicherweise sogar allen – *S. enterica* Serovar Paratyphi A-Stämmen vorhanden ist. Bakteriengenome sind keine statischen Einheiten, sondern variable Strukturen. Durch Addition von Genen, deren Verlust oder Mutation eines vorhandenen Gens kann eine Species neue Eigenschaften entwickeln. Hierbei spielen Plasmide, Bakteriophagen und sog. Pathogenitätsinseln eine große Rolle [12,27,33], aber auch Transposons und Genkassetten [55]. Diese Veränderungen können natürlich auch Promotoren oder Repressoren eines Gens betreffen, wodurch ein Gen an- oder abgeschaltet werden kann. Im Falle eines Toxin-Gens kann dies entscheidenden Einfluss auf die Virulenz eines Bakteriums haben. Besonders interessant ist dies im Falle von *clyA*, da die Synthese von ClyA unter normalen in vitro-Kulturbedingungen reprimiert wird. Verantwortlich hierfür sind verschiedene Regulationsfaktoren. Fraglich ist, unter welchen natürlichen Bedingungen ClyA exprimiert wird.

Noch unklar ist, welche Rolle ClyA bei Infektionen spielt und inwiefern das Vorhandensein von *clyA* die Virulenz eines Bakteriums erhöht.

In dieser Hinsicht ist auch die hämolytische Potenz verschiedener Konstrukte von *S. enterica* Serovar Paratyphi A FR1/99 interessant: Ein Klonierungsprodukt mit 454 bp vor dem ATG-Startcodon zeigte eine geringere hämolytische Aktivität als Konstrukte mit 204 bzw. 88 bp vor dem Startcodon. Dies macht deutlich, wie entscheidend das genetische Umfeld eines Gens für seine Expression ist.

Es muss berücksichtigt werden, dass die Virulenz eines *clyA*-tragenden Bakteriums durch Wegfall der Negativ-Regulatoren bzw. durch Zugewinn von Positiv-Regulatoren stark zunehmen könnte und somit zu einer ernstzunehmenden Gefahr für einen infizierten Patienten werden könnte.

Die Frage nach der Virulenz eines Bakteriums durch Vorhandensein von *clyA* ist besonders bei *Shigella* interessant. Hier scheint *clyA* generell vorhanden, jedoch stets durch verschiedene Ursachen defekt zu sein. Dabei stellt sich die Frage, in wie weit *Shigella* durch ein intaktes *clyA*-Gen noch an Pathogenität hinzugewinnen könnte. Unklar ist auch, wann und

durch welchen Mechanismus *clyA* in das Genom von *Shigella* gelangt ist, zumal es in allen *Shigella*-Species vorhanden ist. Nicht nur das Auftreten von Isoformen des Shiga-Toxins bei *E. coli* weist auf eine nahe Verwandtschaft von *Shigella* und *Escherichia* hin [46].

Möglicherweise war *clyA* schon in einem gemeinsamen Vorfahren von *Shigella* und *Escherichia* vorhanden.

Interessant ist auch, dass es stets defekt zu sein scheint, wenn auch durch jeweils unterschiedliche Ursachen. Der Befund, dass *Sh. sonnei* ST2757/01 ein *clyA*-Gen besitzt, welches durch zweifache Insertion von IS1 inaktiviert ist, zeigt, dass das *clyA*-Gen in verschiedenen *Sh. sonnei*-Stämmen auf unterschiedliche Weise zerstört sein kann. In einem anderen *Sh. sonnei*-Stamm (ST3112/01) war bereits zuvor ein *clyA*-Gen mit nur einer der beiden IS1-Insertionen gefunden worden. Weitere *Sh. sonnei*-Stämme müssen untersucht werden, um zu klären, ob ein oder zwei IS1-Insertionen typisch für das *clyA*-Gen von *Sh. sonnei* sind. Weiterhin wäre interessant, ob in anderen Stämmen andere Mutationen des *clyA*-Gens vorliegen oder ob sogar intakte *clyA*-Gene vorliegen können. Bisher lässt die aktuelle Datenlage jedoch nur den Schluss zu, dass *clyA* in *Shigella* stets defekt zu sein scheint.

Um einen Überblick über die Verbreitung des *clyA*-Gens innerhalb der Familie der *Enterobacteriaceae* zu erhalten, wurden in der vorliegenden Arbeit Bakterienstämme verschiedener *Enterobacteriaceae*-Gattungen und -Species durch PCR- und Southern Blot-Analysen auf den Besitz *clyA*-homologer DNA-Sequenzen hin untersucht. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Gattung *Citrobacter* gelegt, da sie besonders nah mit den Gattungen *Escherichia*, *Shigella* und *Salmonella* verwandt ist. Es konnten jedoch weder in *C. freundii*-Stämmen, noch in Stämmen der Species *C. koseri*, *C. amalonaticus*, *C. gillenii*, *C. murlinae* und *C. braakii* *clyA*-homologe Sequenzen nachgewiesen werden. Auch in Stämmen der Species *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, *H. alvei*, *Y. enterocolitica*, *P. mirabilis* und *M. morgani* wurden keine solchen Sequenzen entdeckt. Diesen Ergebnissen zufolge scheint das Zytolysingen *clyA* innerhalb der Familie der *Enterobacteriaceae* tatsächlich nur in den Gattungen *Escherichia*, *Shigella* und *Salmonella* vorzukommen. Diese Vermutung sollte durch die Analyse weiterer *Enterobacteriaceae*-Species untermauert werden. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um zu klären, ob *clyA*-homologe Gene auch in Bakterien vorkommen, die nicht zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehören. Interessant wäre es nun, grampositive Bakterien sowie weitere tier- bzw. pflanzenpathogene Erreger auf das Vorkommen von *clyA* zu untersuchen. Eventuell finden sich zukünftig weitere Toxine, welche aufgrund ihrer Eigenschaften der ClyA-Familie zuzuordnen sind. Dies könnte weiterhin helfen, Verwandtschaftsverhältnisse unter Bakterien aufzudecken.

Als „Screening-Methode“ zur Detektion von *clyA* wurde in dieser Arbeit die PCR eingesetzt. Hierbei muss eingeräumt werden, dass die PCR in ihrer Methodik einige Nachteile hat: Die Primer decken nur Homologien im Bereich der Primerbindungsstellen auf, wobei die Sequenzen, an die die Primer binden, nicht oder nur wenig verändert sein dürfen. Finden sich gerade hier Mutationen, Deletionen oder Diskontinuitäten, wird der Primer nicht binden. Demgegenüber binden Primer aber auch unspezifisch und produzieren so Artefakte. Nicht zuletzt kann das gesuchte Gen durch Insertionselemente und größere Deletionen erheblich von seiner erwarteten Größe abweichen und somit nicht als das solche erkannt werden. Um diese Fehlerquellen auszuschalten, wurde jeder zu untersuchende Stamm mit vielen verschiedenen Primerkombinationen untersucht. Darüber hinaus wurde mit allen Stämmen, deren PCR-Ergebnisse negativ waren, ein Southern Blot durchgeführt. Der Vorteil hierbei war, dass mit der verwendeten *clyA*-Gensonde ein Großteil des *clyA*-Gens abgedeckt wurde.

Abzuwarten ist, inwiefern *clyA* in der Lage ist, durch die verschiedenen Mechanismen des Gentransfers andere Bakterienarten zu invadieren, bzw. welche Auswirkungen dies für die Virulenz eines Erregers hat. Durch z.B. Antibiotika-Resistenzen werden, besonders auf Intensivstationen, Mischinfektionen begünstigt. Damit wird es Erregern erleichtert, ihre Pathogenitätsfaktoren auszutauschen. Dadurch könnten Species, welche bisher als nicht pathogen eingestuft wurden, zu pathogenen Erregern werden bzw. können innerhalb einer Species pathogene und völlig harmlose Stämme nebeneinander existieren. Daher ist es sinnvoll, fortlaufend klinische Isolate auf Virulenzfaktoren zu untersuchen, z.B. mit PCR-Analysen. Zytolysine lassen sich leicht durch hämolytische Aktivität screenen [58]. Auch wenn *clyA* bisher lediglich in *E. coli*, *Salmonella* und *Shigella* nachzuweisen ist, ist nicht auszuschließen, dass es in absehbarer Zeit auch in anderen *Enterobacteriaceae* nachgewiesen werden kann.



## Anhang

**Anhang 1: Sequenz von *clyA*<sub>*E.coli* K-12</sub> mit flankierender Sequenz.**

Die Aminosäuresequenz des ClyA-Proteins ist unter der Nukleotidsequenz des *clyA*-Gens angegeben. Das ATG-Startcodon und das Stopcodon sind fettgedruckt und unterstrichen.

```

1                                     AGATCTTTTTTGTT
14  TGAACCAGGGATCGCCCATTTTAACGCCAAGCGCCTTTGCCTCAGCGTTTCGGGCGATAA
74  CGCAACCGTCATTATTCGATAGCACAAACCACCGGTTTACCCCATAAATCAGGGCGAAACA
134 CCGTCTCACAGCTGGCATAAAAACGCGTTTACATCACAGAGGGCAAACATCAGCGCATCGC
194 CTTAACGACGTGGATCACCACACCAAAGACATCCAGCGTATCTTCACTACTGATGGTAAT
254 GGGCGAGTACGCGCTGTTTCATGGGAATAAGCTGTACCGTCGGGCGTAGTTGCAATTTTTT
314 CACCGTAAACTCGCCGTCAACAGCAGCGATGACAATATCACCATGGCTGGCGGTAATAGC
374 GCTATCGACAATCAGTAAATCACCGTCACTAATTCCACCATCAATCATAGAATCACCACT
434 TGCTTTGACGAAGTAAGTCGCGCTGGGATGCTGGATCAACAGTTGATTCAGATCGATGCG
494 CTGTTCAACGTAATCTGCTGCCGGTGAAGGAAAGCCACACTGAACAAGATCGCTAAATAG
554 CGGAAAAGTCACAATTTTCGCGGAGATCCGCAGGCTTGATAAACAAACATAAATAATCTGCCT
614 GAAGTTATACTGTTTTTATATACAGTAGTCTGTTCTTGCCAGCAGATCAATACTGATTCA
674 GGCTATCAATATTTGTCGCTGCATAGGCTGCTGATTTTTTCGTTCTCTTATCTTGTGCTCA
734 CGTGGCCTTCTGGCGACGACGCTCATCCAGCAGAAATGAAAAATATCACCCGGCTAAAAA
794 ATAGAATAGAAGCATTTCGCCATAATGACATTAAACATTGTTTGATATTTATCATATTAAT

```

## Anhang

854 AGAAATAAAGACATTGACGCATCCCGCCCGCTAACTATGAATTAGATGAAGTAAAATTT  
914 ATTAATAGTTGTAAAACAGGAGTTTCATTACAATTTATATATTTAAAGAGGCGAATGATT  
974 **ATG**ACTGAAATCGTTGCAGATAAAACGGTAGAAGTAGTTAAAAACGCAATCGAAACCGCA  
M T E I V A D K T V E V V K N A I E T A  
1034 GATGGAGCATTAGATCTTTATAATAAATATCTCGATCAGGTCATCCCCTGGCAGACCTTT  
D G A L D L Y N K Y L D Q V I P W Q T F  
1094 GATGAAACCATAAAAGAGTTAAGTCGCTTTAAACAGGAGTATTCACAGGCAGCCTCCGTT  
D E T I K E L S R F K Q E Y S Q A A S V  
1154 TTAGTCGGCGATATTA AACCTTACTTATGGATAGCCAGGATAAGTATTTTGAAGCAACC  
L V G D I K T L L M D S Q D K Y F E A T  
1214 CAAACAGTGTATGAATGGTGTGGTGTGCGACGCAATTGCTCGCAGCGTATATTTTGCTA  
Q T V Y E W C G V A T Q L L A A Y I L L  
1274 TTTGATGAGTACAATGAGAAGAAAGCATCCGCCAGAAAGACATTCTCATTAAAGGTACTG  
F D E Y N E K K A S A Q K D I L I K V L  
1334 GATGACGGCATCACGAAGCTGAATGAAGCGCAAAAATCCCTGCTGGTAAGCTCACAAAGT  
D D G I T K L N E A Q K S L L V S S Q S  
1394 TTCAACAACGCTTCCGGGAAACTGCTGGCGTTAGATAGCCAGTTAACCAATGATTTTTTCA  
F N N A S G K L L A L D S Q L T N D F S  
1454 GAAAAAAGCAGCTATTTCCAGTCACAGGTAGATAAAATCAGGAAGGAAGCATATGCCGGT  
E K S S Y F Q S Q V D K I R K E A Y A G  
1514 GCCGCAGCCGGTGTCTGTCGCCGGTCCATTTGGATTAATCATTTCCTATTCTATTGCTGCG  
A A A G V V A G P F G L I I S Y S I A A  
1574 GGCGTAGTTGAAGGAAAACCTGATTCCAGAATTGAAGAACAAGTTAAAAATCTGTGCAGAAT  
G V V E G K L I P E L K N K L K S V Q N  
1634 TTCTTTACCACCCTGTCTAACACGGTTAAACAAGCGAATAAAGATATCGATGCCGCCAAA  
F E T T L S N T V K Q A N K D I D A A K  
1694 TTGAAATTAACCACCGAAATAGCCGCCATCGGTGAGATAAAAACGGAAACTGAAACAACC  
L K L T T E I A A I G E I K T E T E T T  
1754 AGATTCTACGTTGATTATGATGATTTAATGCTTTTCTTTGCTAAAAGAAGCGGCCAAAAAAA  
R F Y V D Y D D L M L S L L K E A A K K  
1814 ATGATTAACACCTGTAATGAGTATCAGAAAAGACACGGTAAAAAGACACTCTTTGAGGTA  
M I N T C N E Y Q K R H G K K T L F E V  
1874 CCTGAAGTC**TGA**TAAGCGATTATTCTCTCCATGTA CTACTCAAGGTATAAGGTTTATCACATT  
P E V  
1934 TAAAAACACAGACGTTTTTTAAAGATTGAGAGTTACCTGTTGATAATAAGGTATCGGGTA  
1994 ACTCTCATTATGACAGAGCGCTTTTCAAAAACAGGGCTACGAAATGGCGAGCATCCAGACG

## Anhang

```
2054  TATATTAAGAAAGCCCCCATCAGCATCTATTAAATTTATCACTGCGCCCAGTCAGGTTTA
2114  TTTAAGATATGATCCTGCCAGTCAATCACTTCTGATTCTTTCACTGCGATATGACGCACA
2174  GAGATACGTTCCACCATG
```

### Anhang 2: Vergleich von *clyA*<sub>*E.coli* K-12</sub> mit den *clyA*-Genen von *Sh. sonnei*-, *Sh. flexneri*-, und *Sh. dysenteriae*-Stämmen.

Eingezeichnet sind Nukleotidaustausche in *clyA*<sub>*Sh.sonnei* ST2757/01</sub> (orange), *clyA*<sub>*Sh.sonnei* ST3112/01</sub> (rot), *clyA*<sub>*Sh.flexneri* M90T</sub> (grün) und *clyA*<sub>*Sh.dysenteriae* 60R</sub> (blau). In *clyA*<sub>*Sh.dysenteriae* 60R</sub> ist die DNA-Sequenz von Nukleotidposition 233 bis einschließlich 864 deletiert und durch das Insertionselement iso-IS1 ersetzt. Die mit + markierten Basen sind in *clyA*<sub>*Sh.flexneri* M90T</sub> deletiert.

```

      .   A   .       .   G   .       .
1    ATGACTGAAATCGTTGCAGATAAAAACGGTAGAAGTAGTTAAAAACGCAATCGAAACCGCA
61   .   G   .       .   G   C   G   .       .   C   .   C   .       .   G   .       .   C   .
    GATGGAGCATTAGATCTTTATAATAAATATCTCGATCAGGTCATCCCCTGGCAGACCTTT
121  .   GG   .       .       .       .       .       .       .       .
    GATGAAACCATAAAAGAGTTAAGTCGCTTTAAACAGGAGTATTCACAGGCAGCCTCCGTT
181  T   .       .       .       .       .       .       .       .       .
    TTAGTCGGCGATATTAAAACCTTACTTATGGATAGCCAGGATAAGTATTTTGAAGCAACC
241  .       .       .       .       .       .       .       .       .       .
    CAAACAGTGTATGAATGGTGTGGTGTGCGACGCAATTGCTCGCAGCGTATATTTTGCTA
301  .       .       .       .       .       .       .       .       .       .
    TTTGATGAGTACAATGAGAAGAAAGCATCCGCCAGAAAGACATTCTCATTAAAGGTACTG
361  .       .       .       .       .       .       .       .       .       .
    GATGACGGCATCACGAAGCTGAATGAAGCGCAAAAATCCCTGCTGGTAAGCTCACAAAGT
```



## Anhang

Glutamat (Glu; E)

Glycin (Gly; G)

Histidin (His; H)

Isoleucin (Ile; I)

Threonin (Thr; T)

Tryptophan (Try; Trp; W)

Tyrosin (Tyr; Y)

Valin (Val; V)

3. Das Startcodon ist fettgedruckt und unterstrichen.
4. Jede 10. Base ist mit einem Punkt markiert.
5. Das Stopcodon ist fettgedruckt und unterstrichen.

**Literaturverzeichnis**

- [1] **Abrami L., Fivaz M., van der Groot F.G.** 2000. Adventures of a pore-forming toxin at the target cell surface. *Trends Microbiol.* 8, 168-172.
- [2] **Alouf J.E.** 2000. Cholesterol-binding cytolytic protein toxins. *Int. J. Med. Microbiol.* 290, 351-356.
- [3] **Atkins A., Wyborn N.R., Wallace A.J., Stillman T.J., Black L.K., Fielding A.B., Hisakado M., Artymiuk P.J., Green J.** 2000. Structure-Function relationship of a novel bacterial toxin, Hemolysin E. *J. Biol. Chem.* 275, 41150-41155.
- [4] **Bauer M.E., Welch R.A.** 1996. Association of RTX toxins with erythrocytes. *Infect. Immun.* 64, 4665-4672.
- [5] **Bauer M.E., Welch R.A.** 1996. Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* 64, 167-175.
- [6] **Bejerano M., Nisan I., Ludwig A., Goebel W., Hanski E.** 1999. Characterization of the C-terminal domain essential for toxic activity of adenylate cyclase toxin. *Mol. Microbiol.* 31, 381-392.
- [7] **Bell A.I., Gaston K.L., Cole J.A., Busby S.J.** 1989. Cloning of binding sequences for the *Escherichia coli* transcription activators, FNR and CRP: location of bases involved in discrimination between FNR and CRP. *Nucl. Acids Res.* 17, 3865-3874
- [8] **Beveridge T.J.** 1999. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 181, 4725-4733.
- [9] **Bhakdi S., Trantum-Jensen J.** 1991. Alpha-Toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Rev.* 55, 733-751.
- [10] **Boehm D.F., Welch R.A., Snyder I.S.** 1990. Domains of *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) involved in binding of calcium and erythrocyte membranes. *Infect. Immun.* 58, 1959-1964
- [11] **Braun V., Schönherr R., Hobbie S.** 1993. Enterobacterial hemolysins: activation, secretion and pore formation. *Trends Microbiol.* 1, 211-216.
- [12] **Brunder W., Karch H.** 2000. Genome plasticity in *Enterobacteriaceae*. *Int. J. Med. Microbiol.* 290, 153-165.
- [13] **Buchmeier N., Bossie S., Chen C.Y., Fang F.C., Guiney D.G., Libby S.J.** 1997. SlyA, a transcriptional regulator of *Salmonella typhimurium*, is required for resistance to oxidative stress and is expressed in the intracellular environment of macrophages. *Infect. Immun.* 65, 3725-3730.

- [14] **Chow K.H., Ng T.K., Yuen K.Y., Yam W.C.** 2001. Detection of RTX toxin gene in *Vibrio cholerae* by PCR. J. Clin. Microbiol. 39, 2594-2597.
- [15] **Coote J.G.** 1992. Structural and functional relationships among the RTX toxin determinants of gram-negative bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 8, 137-162.
- [16] **Cowell S., Aschauer W., Gruber H.J., Nelson K.L., Buckley J.T.** 1997. The erythrocyte receptor for the channel-forming toxin aerolysin is a novel glycosyl phosphatidylinositol-anchored protein. Mol. Microbiol. 25, 343-350.
- [17] **Daniels J., Autenrieth I.B., Ludwig A., Goebel W.** 1996. The gene *slyA* of *Salmonella typhimurium* is required for destruction of M cells and intracellular survival but not for invasion or colonization of the murine small intestine. Infect. Immun. 64, 5075-5084.
- [18] **Del Castillo F.J., Leal S.C., Moreno F., del Castillo I.** 1997. The *Escherichia coli* K-12 *sheA* gene encodes a 34 kDa secreted haemolysin. Mol. Microbiol. 25, 107-155.
- [19] **Del Castillo F.J., Moreno F., del Castillo I.** 1999. Characterization of the genes encoding the SheA haemolysin in *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella flexneri* 2a. Res. Microbiol. 151, 229-230.
- [20] **Deng W., Liou S.R., Plunkett G., Mayhew G.F., Rose D.J., Burland V., Kodoyianni V., Schwartz D.C., Blattner F.R.** 2003. Comparative genomics of *Salmonella enterica* Serovar Typhi strains Ty2 and CT18. J. Bacteriol. 185, 2330-2337.
- [21] **Elliott S.J., Srinivas S., Albert M.J., Khorshed A., Robins-Browne R.M., Gunzburg S.T., Mee B.J., Chang B.J.** 1998. Characterization of the roles of hemolysin and other toxins in enteropathy caused by alpha-hemolytic *Escherichia coli* linked to human diarrhea. Infect. Immun. 66, 2040-2051.
- [22] **Gentschev I., Dietrich G., Mollenkopf H.J., Sokolovic Z., Hess J., Kaufmann S.H., Goebel W.** 1997. The *Escherichia coli* hemolysin secretion apparatus – a versatile antigen delivery system in attenuated *Salmonella*. Behring Inst. Mitt. 98, 103-113.
- [23] **Gilbert R.J.C., Jimenez J.L., Chen S., Andrew P.W., Saibil H.R.** 2000. Structural basis of pore formation by cholesterol-binding toxins. Int. J. Med. Microbiol. 290, 389-394.
- [24] **Goebel W., Gentschev I., Ludwig A., Benz R.** 2000. Bakterieller Giftstoff führte zu neuem Impfkonzzept, Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften.
- [25] **Green J., Baldwin M.L.** 1997. The molecular basis for the differential regulation of the *hlyE*-encoded haemolysin of *Escherichia coli* by FNR and HlyX lies in the improved activating region 1 contact of HlyX. Microbiology. 143, 3785-3793.
- [26] **Groisman E.A., Ochman H.** 1997. How *Salmonella* became a pathogen. Trends Microbiol. 5, 343-349.
- [27] **Hacker J., Blum-Oehler G., Mühldorfer I., Tschäpe H.** 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. Mol. Microbiol. 23, 1089-1097.

- [28] **Herbelin C.J., Chirillo S.C., Melnick K.A., Whittam T.S.** 2000. Gene conservation and loss in the *mutS-rpoS* genomic region of pathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 182, 5381-5390.
- [29] **Hotze E.M., Wilson-Kubalek E.M., Rossjohn J., Parker M.W., Johnson A.E., Tweten R.K.** 2001. Arresting pore formation of a cholesterol-dependent cytolysin by disulfide trapping synchronizes the insertion of the transmembrane  $\beta$ -sheet from a prepore intermediate. *J. Biol. Chem.* 276, 8261-8268.
- [30] **Kerényi M., Allison H.E., Bártai I., Sonnevend Á., Emödy L., Plaveczyk N., Pál T.** 2005. Occurrence of *hlyA* and *sheA* Genes in Extraintestinal *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2965-2968.
- [31] **Kuhnert P., Heyberger-Meyer B., Burnens A.P., Nicolet J., Frey J.** 1997. Detection of RTX toxin genes in gram-negative bacteria with a set of specific probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2258-2265.
- [32] **Lai X.H., Arencibia I., Johansson A., Wai Nyunt S., Oscarsson J., Kalfas S., Sundqvist K.G., Mizunoe Y., Sjöstedt A., Uhlin B.E.** 2000. Cytocidal and apoptotic effects of the ClyA protein from *Escherichia coli* on primary and cultured monocytes and macrophages. *Infect. Immun.* 68, 4363-4367.
- [33] **Lawrence J.G.** 1999. Gene transfer, speciation and the evolution of bacterial genomes. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 519-522.
- [34] **Lesieur C., Vecsey-Semjen B., Abrami L., Fivaz M., van der Groot F.G.** 1997. Membrane insertion: The strategies of toxins (review). *Mol. Membr. Biol.* 14, 45-64.
- [35] **Libby S.J., Goebel W., Ludwig A., Buchmeier N., Bowe F., Fang F.C., Guiney D.G., Glenn Songer J., Heffron F.** 1994. A cytolysin encoded by *Salmonella* is required for survival within macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 489-493.
- [36] **Lim K.B., Bazemore Walker C.R., Guo L., Pellett S., Shabanowitz J., Hunt D.F., Hewlett E.L., Ludwig A., Goebel W., Welch R.A., Hackett M.** 2000. *Escherichia coli*  $\alpha$ -hemolysin (HlyA) is heterogeneously acylated in vivo with 14-, 15-, and 17-carbon fatty acids. *J. Biol. Chem.* 275, 36698-36702.
- [37] **Ludwig A.** 1996. Cytolytic toxins from gram-negative bacteria. *Microbiologia Sem.* 12, 281-296.
- [38] **Ludwig A., Goebel W.** 1999. The family of the multigenic encoded RTX toxins. P. 330-348. In J.E. Alouf and J.H. Freer (ed.): *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press, London, UK.
- [39] **Ludwig A., Bauer S., Benz R., Bergmann B., Goebel W.** 1999. Analysis of the SlyA-controlled expression, subcellular localization and pore-forming activity of a 34 kDa haemolysin (ClyA) from *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* 31, 557-567.



- [40] Ludwig A., Tengel C., Bauer S., Bubert A., Benz R., Mollenkopf H.J., Goebel W. 1995. SlyA, a regulatory protein from *Salmonella typhimurium*, induces a haemolytic and pore-forming protein in *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 249, 474-486.
- [41] Ludwig A., Goebel W. 2000. Dangerous signals from *E. coli* toxin. Nature Med. 6, 741-742
- [42] Ludwig A., von Rhein C., Bauer S., Hüttinger C., Goebel W. 2004. Molecular analysis of cytolysin A (ClyA) in pathogenic *Escherichia coli* strains. J. Bacteriol. 186, 5311-5320.
- [43] Mc Clelland M., Sanderson K.E., Spieth J., Clifton S.W., Latreille P., Courtney L., Porwollik S., Ali J., Dante M., Du F., Hou S., Layman D., Leonard S., Nguyen C., Scott K., Holmes A., Grewal N., Mulvaney E., Ryan E., Sun H., Florea L., Miller W., Stoneking T., Nhan M., Waterston R., Wilson R.K. 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. Nature, 413, 852-856.
- [44] Nelson, K.L., Buckley J.T. 2000. Channel formation by the glycosylphosphatidylinositol-anchored protein binding toxin Aerolysin is not promoted by lipid rafts. J. Biol. Chem. 275, 19839-19843.
- [45] Nielson K.B., Cline J., Bai F., McMullan D., McGowan, Hogrefe H. 2002. High-Fidelity PCR with a Novel Polymerase Mixture. Stratagene.
- [46] Obrig T.G. 1997. Shiga toxin mode of action in *Escherichia coli* O157:H7 Disease. Front. Bioscience. 2, 635-642.
- [47] Olsnes S.1990. Protein toxins with intracellular targets. Microb. Pathogen. 8,163-186.
- [48] Oscarsson J., Mizunoe Y., Li L., Lai X.H., Wieslander A., Uhlin B.E. 1999. Molecular analysis of the cytolytic protein ClyA (SheA) from *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 32, 1226-1238.
- [49] Oscarsson J., Mizunoe Y., Uhlin B.E., Haydon D.J. 1996. Induction of haemolytic activity in *Escherichia coli* by the *slyA* gene product. Mol. Microbiol. 20, 191-199.
- [50] Oscarsson J., Westermark M., Löfdahl S., Olsen B., Palmgren H., Mizunoe Y., Wai S.N., Uhlin B.E. 2002. Characterization of a pore-forming cytotoxin expressed by *Salmonella enterica* Serovars Typhi and Paratyphi A. Infect. Immun. 70, 5759-5769.
- [51] Parkhill J., Dougan G., James K.D., Thomson N.R., Pickard D., Wain J., Churcher C., Mungall K.L., Bentley S.D., Holden M.T.G., Sebaihia M., Baker S., Basham D., Brooks K., Chillingworth T., Connerton P., Cronin A., Davis P., Davies R.M., Dowd L., White N., Farrar J., Feltwell T., Hamlin N., Haque A., Hien T.T., Holroyd S., Jagels K., Krogh A., Larsen T.S., Leather S., Moule S., O'Gaora P., Parry C., Quail M., Barrell B.G. 2001. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhi CT18. Nature, 413, 848-852.

- [52] **Paton J.C., Paton A.W.** 1996. *Enterobacter cloacae* producing a shiga-like toxin II-related cytotoxin associated with a case of hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 34, 463-465.
- [53] **Ralph E.T., Guest J.R., Green J.** 1998. Altering the anaerobic transcription factor FNR confers a hemolytic phenotype on *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 10449-10452.
- [54] **Read R.J., Stein P.E.** 1993. Toxins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 853-860.
- [55] **Recchia G.D., Hall R.M.** 1995. Gene cassettes: a new class of elements. *Microbiology*, 141, 3015-3027.
- [56] **Reid S.D., Herbelin C.J., Bumbaugh A.C., Selander R.K., Whittam T.S.** 2000. Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature*, 406, 64-67.
- [57] **Rossjohn J., Feil S.C., McKinstry W.J., Tweten R.K., Parker M.W.** 1997. Structure of a cholesterol-binding, thiol-activated cytolysin and model of its membrane form. *Cell*, 89, 685-692.
- [58] **Rowe G.E., Welch R.A.** 1994. Assays of hemolytic toxins. *Methods Enzymol.* 235, 657-667.
- [59] **Shatursky O., Heuck A.P., Shepard L.A., Rossjohn J., Parker M.W., Johnson A.E., Tweten K.** 1999. The Mechanism of membrane insertion for a cholesterol-dependent cytolysin: a novel paradigm for pore-forming toxins. *Cell*, 99, 293-299.
- [60] **Shimada Y., Nakamura M., Naito Y., Nomura K., Ohno-Iwashita Y.** 1999. C-terminal amino acid residues are required for the folding and cholesterol binding property of Perfringolysin O, a poreforming cytolysin. *J. Biol. Chem.* 274, 18536-18542.
- [61] **Soloaga A., Pilar Veiga M., Garcia-Segura L.M., Ostolaza H., Brasseur R., Goni F.M.** 1999. Insertion of *Escherichia coli*  $\alpha$ -hemolysin in lipid bilayers as a non-transmembrane integral protein: prediction and experiment. *Mol. Microbiol.* 31, 1013-1024.
- [62] **Spory A., Bosserhoff A., von Rhein C., Goebel W., Ludwig A.** 2002. Differential regulation of multiple proteins of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium by the transcriptional regulator SlyA. *J. Bacteriol.* 184, 3549-3559.
- [63] **Spreng S., Dietrich G., Goebel W., Gentschev I.** 1999. The *Escherichia coli* haemolysin secretion apparatus: a potential universal antigen delivery system in gram-negative bacterial vaccine carriers. *Mol. Microbiol.* 31, 1596-1598.
- [64] **Thomson N.R., Cox A., Bycroft B.W., Stewart G.S., Williams P., Salmond G.P.** 1997. The rap and hor proteins of *Erwinia*, *Serratia* and *Yersinia*: a novel subgroup in a growing superfamily of proteins regulating diverse physiological processes in bacterial pathogens. *Mol. Microbiol.* 26, 531-544.

- [65] **von Rhein C., Bauer S., López Sanjurjo E.J., Benz R., Goebel W., Ludwig A.** Genetic characterization and functional analysis of a pore-forming hemolysin from *Salmonella enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A. J. Bacteriol. Im Druck.
- [66] **Wai S.N., Lindmark B., Soderblom T., Takade A., Westermark M., Oscarsson J., Jass R., Richter-Dahlfors A., Mizunoe Y., Uhlin B.E.** 2003. Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin. Cell, 115, 25-35.
- [67] **Wai, S.N., Westermark M., Oscarsson J., Jass J., Maier E., Benz R., Uhlin B.E.** 2003. Characterization of dominantly negative mutant ClyA cytotoxin proteins in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 185, 5491-5499.
- [68] **Wallace A.J., Stillman T.J., Atkins A., Jamieson S.J., Bullough P.A., Green J., Artymiuk P.J.** 2000. *E. coli* hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA): X-Ray crystal structure of toxin and observation of membrane pores by electron microscopy. Cell, 100, 265-276.
- [69] **Welch R.A.** 2001. RTX toxin structure and function: a story of numerous anomalies and few analogies in toxin biology. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 257, 85-111.
- [70] **Welch R.A., Forestier C., Lobo A., Pellett S., Thomas W. Jr., Rowe G.** 1992. The synthesis and function of the *Escherichia coli* hemolysin and related RTX exotoxins. FEMS Microbiol. Immunol. 5, 29-36.
- [71] **Westermark M., Oscarsson J., Mizunoe Y., Urbonaviciene J., Uhlin B.E.** 2000. Silencing and activation of ClyA cytotoxin expression in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 182, 6347-6357.
- [72] **Wyborn N.R., Clark A., Roberts R.E., Jamieson S.J., Tzokov S., Bullough P.A., Stillman T.J., Artymiuk P.J., Galen J.E., Zhao L., Levine M.M., Green J.** 2004. Properties of hemolysin E (HlyE) from a pathogenic *Escherichia coli* avian isolate and studies of HlyE export. Microbiology, 150, 1495-1505.
- [73] **Wyborn N.R., Stapleton M.R., Norte V.A., Roberts R.E., Grafton J., Green J.** 2004. Regulation of *Escherichia coli* hemolysin E expression by H-NS and *Salmonella* SlyA. J. Bacteriol. 186, 1620-1628.

**Abkürzungen**

A.	Aqua
Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure(n)
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
CBT	Cholesterol-bindende Toxine
Cm	Chloramphenicol
CRP	cyclic-AMP-receptor protein
Da	Dalton
DAEC	diffus adhärenzte <i>E. coli</i>
dest.	destilliert
DIC	diffuse intravasale Gerinnung, diffuse intravasale Gerinnung
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DSM(Z)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (und Zellkulturen)
EAEC	enteroaggregative <i>E. coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EIEC	enteroinvasive <i>E. coli</i>
EPEC	enteropathogene <i>E. coli</i>
ETEC	enterotoxische <i>E. coli</i>
FNR	fumarate and nitrate reduction regulator
FR	Frankfurt
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
h	Stunde
H-NS	histone-like nucleoid structuring protein
HUS	hämolytisch-urämisches Syndrom
IfSG	Infektionsschutzgesetz

## Abkürzungen

IL	Interleukin
IS	insertion sequence, Insertionselement
IPCR	Inverse PCR
IPTG	Isopropyl-Thio- $\beta$ -D-Galacto-Pyranoside
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
konz.	konzentriert
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
MCS	multi-cloning-site
Min.	Minute(n)
mRNA	messenger RNA
MSD	Merck-Sharp-Dome
n.n.	nomen nescio
NMEC	Neugeborenen-Meningitis (auslösende) <i>E. coli</i>
OD	optische Dichte
OMP	outer membrane protein
OMV	outer membrane vesicle
ORF	open reading frame
P	Primer
p.a.	pro analysi, zur Analyse
PCR	polymerase chain reaction/Polymerase Kettenreaktion
PEG	Paul-Ehrlich-Gesellschaft
Pol.	Polymerase
r	resistent
RNase	Ribonuklease
RTX	Repeat-in-Toxin
RV	Ringversuch
SDS	sodium dodecyl sulfate
spp.	Species
STEC	shigatoxinproduzierende <i>E. coli</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
Tm	melting temperature, Schmelztemperatur von Oligonukleotidprimern

## Abkürzungen

TNE	Tris-NaCl-EDTA
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units, Enzymeinheit
UPEC	uropathogene <i>E. coli</i>
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
VTEC	verotoxinproduzierende <i>E. coli</i>
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galacto-Pyranoside
YT	Yeast-Trypton

## Lebenslauf

Name: Valeska Simon  
geboren am: 04.11.1978  
Geburtsort: Giessen

1985-1989 Grundschole Reichelsheim/Wetterau  
1989-1994 Dietrich-Bonhoeffer-Schole Lich  
1994-1998 Gesamtschole Giessen-Ost  
1998 Abitur (Note 1.0)  
1998-2000 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität Kiel  
2000 Ärztliche Vorprüfung (Gesamtnote „gut“)  
2000-2005 Studium der Humanmedizin an der Johann-Wolfgang-Goethe-  
Universität Frankfurt  
2001 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote „gut“)  
2001-2006 Anfertigung der vorliegenden Promotionsarbeit am Institut für  
Medizinische Mikrobiologie der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität  
Frankfurt/Main  
2004 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote „gut“)  
2004-2005 Praktisches Jahr (Chirurgie, Innere Medizin, Radiologie) an der Johann-  
Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt  
2005 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote „sehr gut“)  
Abschluss des Studiums der Humanmedizin an der Johann-Wolfgang-  
Goethe-Universität (Endnote „gut“ (1,66)).  
seit 2005 Assistenzärztin in der Medizinischen Mikrobiologie der  
Universitätsklinik Göttingen

**Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

**Analyse der molekularen Struktur und der Verbreitung *clyA*-homologer Zytolysingene in bakteriellen Krankheitserregern aus der Familie der *Enterobacteriaceae***

im  
**Institut für Medizinische Mikrobiologie**  
**(Direktor: Prof. Dr. V. Brade)**

unter Betreuung und Anleitung von  
**PD Dr. Albrecht Ludwig**

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt habe und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Frankfurt am Main, den 12.05.2006

Valeska Simon



## **Danksagung**

Ich danke Prof. Dr. V. Brade für die Möglichkeit, an seinem Institut wissenschaftlich zu arbeiten.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Albrecht Ludwig für die Überlassung dieses Themas und die hervorragende Betreuung in seinem Labor. Dr. Ludwig war stets für mich erreichbar, hilfsbereit und unterstützte meine Arbeit mit konstruktiver Kritik. Ich danke ihm vor allem für die Vermittlung seines umfassenden und vielseitigen Wissens.

Weiterhin danke ich Christine von Rhein für die Einführung in die Laborarbeit und für die umfassende praktische und theoretische Hilfe sowie für die angenehme und freundliche Zusammenarbeit.

Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung meines Studiums und bei dieser Dissertation.