

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
der Universität Tübingen

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. I. B. Autenrieth

Screening differentiell hochregulierter Gene in *Escherichia coli* mpk mittels Differentieller Fluoreszenz-Induktion

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Andreas Krieb

aus

Gießen

2009

Dekan:

Prof. Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichtstatter:

Prof. Dr. I. B. Autenrieth

2. Berichtstatter:

Prof. Dr. S. Stevanović

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED).....	1
1.1.1	Epidemiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.....	1
1.1.2	Ätiologie und Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.....	1
1.1.3	Klinisches Bild und Behandlungsoptionen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.....	3
1.2	Die Bedeutung der natürlichen Darmflora am Beispiel der Kolitisentstehung im <i>in vivo</i>-Modell	4
1.3	Differentielle Fluoreszenz-Induktion (DFI).....	5
1.3.1	DFI und IVET: Einführung	5
1.3.2	Prinzip der Differentiellen Fluoreszenz-Induktion	6
1.3.3	Bisherige Arbeiten mit Differentieller Fluoreszenz-Induktion	7
1.4	Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	9
2	MATERIAL UND METHODEN.....	11
2.1	Material.....	11
2.1.1	Geräte	11
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	12
2.1.3	Bakterienstämme und Plasmide.....	13
2.1.4	Medien für Bakterienkulturen.....	14
2.1.5	Puffer und Lösungen	14
2.1.6	Kommerzielle Kits.....	15
2.1.7	Antibiotika.....	15
2.1.8	Enzyme, Polymerasen und Ligasen	15
2.1.9	Oligonukleotide.....	15
2.1.10	Größenstandards	15

2.1.11	Sonstiges	16
2.2	Methoden	17
2.2.1	Arbeiten mit Bakterien	17
2.2.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> -Stämmen	17
2.2.1.2	Erstellung von Gefrierkulturen.....	17
2.2.1.3	Verdünnungsreihen.....	17
2.2.2	Erstellung der DFI- <i>promotor trap library</i>	17
2.2.2.1	DNA-Verdau mittels Restriktionsendonukleasen	17
2.2.2.2	Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	18
2.2.2.3	Ligation von DNA-Fragmenten.....	18
2.2.2.4	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> -Stämme	18
2.2.2.5	Transformation elektrokompenter <i>E. coli</i> -Stämme	19
2.2.2.6	Klonierung der DFI- <i>promotor trap library</i>	19
2.2.3	Induktionen der DFI- <i>promotor trap library</i>	19
2.2.3.1	Prinzip der Durchflusszytometrie	19
2.2.3.2	Selektion unterschiedlicher Bakterien mittels FACS	20
2.2.3.3	Selektion GFP-negativer DFI-Klone.....	21
2.2.3.4	Induktion der DFI- <i>promotor trap library</i>	21
2.2.3.5	Selektion GFP-positiver DFI-Klone nach Induktion.....	22
2.2.4	Analyse der hochregulierten Gene	22
2.2.4.1	Isolation bakterieller Plasmid-DNA.....	22
2.2.4.2	Genamplifikation mittels <i>Colony-PCR</i>	23
2.2.4.3	Agarose-Gelelektrophorese	24
2.2.4.4	Sequenzierung.....	24
2.2.4.5	Alignment.....	25
2.2.4.6	Statistik	25
3	ERGEBNISSE.....	27
3.1	Klonierung der DFI-<i>promotor trap library</i>	27
3.2	Nachweis der Selektionierbarkeit GFP-positiver bzw. GFP-negativer Bakterien-Subpopulationen mittels FACS	27

3.3	Selektion einer GFP-negativen DFI-Subpopulation.....	30
3.4	Induktionen: Hitzestress, pH-Stress.....	34
3.4.1	Induktion: Hitzestress	35
3.4.2	Induktion: pH-Stress.....	38
3.5	Induktionen: Ko-Kultur mit <i>B. vulgatus</i>.....	40
3.5.1	Induktion: Anaerobes Wachstum.....	40
3.5.2	Induktion: Ko-Kultur mit <i>B. vulgatus</i> mpk.....	44
3.5.3	Induktion: Wachstum im Überstand von <i>B. vulgatus</i> mpk	46
3.6	Profile der Genexpression aller durchgeführten Induktionen....	48
4	DISKUSSION.....	51
4.1	Induktionen, die Stressbedingungen simulieren.....	51
4.2	Induktionen, die unter Ko-Kultur mit <i>B. vulgatus</i> auftreten.....	54
4.3	DFI: Vorteile und Nachteile.....	57
4.4	Ausblick	59
5	ZUSAMMENFASSUNG	61
6	LITERATURVERZEICHNIS	63
7	ABKÜRZUNGEN	75
8	DANKSAGUNGEN	78
9	LEBENS LAUF	79

1 Einleitung

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)

1.1.1 Epidemiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Morbus Crohn (MC) und Colitis Ulcerosa (CU) sind die Hauptmanifestationsformen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED). In beiden Fällen liegt dem Krankheitsgeschehen eine chronisch rezidivierende Entzündung der gastrointestinalen Schleimhaut zugrunde.

In den USA liegt die Prävalenz chronisch entzündlicher Darmerkrankungen bei 1 Million Erkrankten; Jeder 300. Einwohner ist betroffen. Die Inzidenz beträgt 30.000 neue Fälle pro Jahr, hierbei liegt eine Gleichverteilung zwischen MC und CU vor (Hanauer, 2006). In der Altersverteilung beider Krankheiten zeigt sich ein erster Gipfel im Alter zwischen 15 und 30 Jahren, ein zweiter, kleinerer Gipfel tritt im Alter zwischen 50 und 70 Jahren auf (Andres and Friedman, 1999) (Hanauer, 2006). Bei der Betrachtung der weltweiten Prävalenz von CED fällt auf, dass diese in den industrialisierten Gesellschaften am größten ist. Die höchste Prävalenz findet sich in den USA, England und den skandinavischen Ländern (Loftus, Jr. and Sandborn, 2002).

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Die Ätiologie der CED ist bis heute ungeklärt. Ihre Entstehung scheint von vier Faktoren abhängig zu sein. Dies sind i) krankheitsfördernde Umweltfaktoren, ii) eine genetische Prädisposition, iii) ein immuno-regulatorischer Defekt (Hanauer, 2006) und iv) die individuenspezifische mikrobiotische Besiedlung des Darmes (Rawls *et al.*, 2006;Ley *et al.*, 2005).

Zu den bisher bekannten Umweltfaktoren gehören Ernährung (Persson *et al.*, 1992), der ausgeübte Beruf (Sonnenberg, 1990a;Sonnenberg, 1990b) sowie Zigarettenkonsum (Lindberg *et al.*, 1988). Den größten umweltbedingten

Einfluss auf die Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen scheint die physiologische Mikroflora des Darmes zu haben (**siehe Kapitel 1.2**).

Die Relevanz der genetischen Beteiligung bei CED wird dadurch unterstrichen, dass das relative Risiko für eine Erkrankung bei erstgradigen Verwandten von Patienten um das 15-fache höher ist als in der Normalbevölkerung (Binder, 1998). Ogura, Hugot et al. konnten 2001 den Zusammenhang zwischen einem bestimmten Gen und der Anfälligkeit für CED nachweisen (Hugot *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001). Hierbei handelt es sich um das auf Chromosom 16 gelegene Gen für die *nucleotide-binding oligomerization domain 2* (NOD2). Bei dem Genprodukt handelt es sich um einen Modulator der Caspase-Aktivität. NOD2 fungiert als Aktivator von NF- κ B, einem Transkriptionsfaktor für Prozesse der zellulären Immunität, welcher die Expression zahlreicher proinflammatorischer Mediatoren bewirkt (Zytokine, Wachstumsfaktoren). NOD2 ist an der Apoptose von Makrophagen beteiligt (Satsangi *et al.*, 2003). Als Bindeglied zwischen genetischer Disposition und Umwelteinflüssen kann ein Defekt im Prozess der Immunregulation angesehen werden. Hierfür werden drei Hypothesen angeführt:

- i. Es kommt im Rahmen einer Störung der oralen Toleranz (s. u.) zu einer überschießenden Immunantwort, die sich gegen ein physiologisches luminales Antigen richtet (Colletti, 2004).
- ii. Es existiert eine echte Infektion mit einem spezifischen Antigen (Colletti, 2004).
- iii. Die natürliche Barrierefunktion des Darmes ist gestört, die erhöhte Permeabilität des gastrointestinalen Epithels führt zu einer Dauerstimulation des Immunsystems (Bouma and Strober, 2003; Farrell and LaMont, 2002).

Obwohl die Ätiologie der CED ungeklärt ist, sind die Prozesse gut erforscht, die im Rahmen ihrer Pathogenese in Erscheinung treten. Am Anfang des intestinalen Entzündungsgeschehens stehen in das Darmgewebe eindringende Neutrophile, welche ihrerseits über proinflammatorische Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8) andere Entzündungszellen (Makrophagen, NK-Zellen) anlocken.

Ebenso produzieren Neutrophile antimikrobielle Peptide, welche für die Gewebsschädigung verantwortlich gemacht werden (Cassatella, 1995). Überwiegt innerhalb des adaptiven Immunsystems die TH1-gerichtete Antwort, so kommt es häufiger zur Entstehung eines MC; Ist die TH2-gerichtete Immunantwort dominierend, wird überwiegend CU beobachtet (Bouma and Strober, 2003;Fuss *et al.*, 2004).

1.1.3 Klinisches Bild und Behandlungsoptionen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Bei Morbus Crohn kann der gesamte Gastrointestinaltrakt befallen sein. Das Entzündungsgeschehen ist transmural, betrifft also alle Wandungsschichten des Darmes. Als typisch gelten verkäsende Granulome und Fistelbildung sowie ein segmentaler Befall (sog. *skip lesions*). In der Therapie des Morbus Crohn kommen Sulfalazin, Mesalamin, Metronidazol und Kortikosteroide zum Einsatz, neuerdings auch Infliximab, ein monoklonaler Antikörper gegen TNF- α .

Im Gegensatz zu Morbus Crohn ist das Entzündungsgeschehen bei Colitis Ulcerosa nicht transmural, sondern betrifft ausschließlich *Tunica mucosa* und *Tela submucosa* des Kolon. Ferner verläuft die Erkrankung nicht segmental, sondern kontinuierlich und beginnt meist aboral mit einer nachfolgenden Ausbreitung nach oral. Die Therapie der Colitis Ulcerosa erfolgt angepasst an das jeweilige Krankheitsstadium, berücksichtigt also Faktoren wie Ausbreitung, Intensität und Dauer der Entzündung. Zum Einsatz kommen in der klassischen Therapie Aminosalicylate (5-ASA), Kortikosteroide und Cyclosporin. Kommt es zur Bildung von Fisteln oder Abszessen, ist eine chirurgische Therapie oft unumgänglich (Isaacs *et al.*, 2005).

1.2 Die Bedeutung der natürlichen Darmflora am Beispiel der Kolitisentstehung im *in vivo*-Modell

Die natürliche Darmflora des gesunden Erwachsenen beinhaltet über 400 verschiedene Spezies, von denen nur wenige kultivierbar sind (Simon and Gorbach, 1984). Zu über 99% handelt es sich hierbei um obligat anaerobe Bakterien (Berg, 1996). Das Immunsystem des Darms besitzt verschiedene Möglichkeiten, diese Bakterien zu registrieren. Auf pathogene Keime muss das Immunsystem mit einer Entzündung reagieren, um den Wirt zu schützen. Den Großteil der natürlichen Darmflora bilden jedoch apathogene Keime, sog. Kommensale. Eine Immunantwort auf solche Keime würde zu einer chronischen Entzündung führen und wäre schädlich für den Wirt. Das Ausbleiben einer Immunantwort auf Bakterien, die vom Immunsystem toleriert werden, nennt man „orale Toleranz“ (OT).

Um den Einfluss einzelner Komponenten der mukosalen Mikroflora auf die Induktion einer Kolitis zu untersuchen, stehen verschiedene Tiermodelle zur Verfügung (Schultz *et al.*, 1999b) (Sellon *et al.*, 1998). In Vorarbeiten wurde die Rolle der mukosalen Mikroflora bei der Kolitisentstehung in IL-2^{-/-}-Mäusen (sprich: IL-2 *double knock out* Mäusen) untersucht.

Es ist bekannt, dass IL-2^{-/-}-Mäuse unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen (SPF) eine Kolitis entwickeln. Werden die Mäuse unter keimfreien Bedingungen gehalten, so entsteht keine Kolitis (Sadlack *et al.*, 1993) (Schultz *et al.*, 1999a). Durch Monokolonisierung der IL-2^{-/-}-Mäuse konnte die Kolutogenität ausgewählter kommensaler Bakterienstämme untersucht werden. Hierzu wurden keimfreie IL-2^{-/-}-Mäuse mit *Escherichia coli* mpk oder mit *Bacteroides vulgatus* mpk monokolonisiert (Waidmann *et al.*, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass die Mäuse, die mit *E. coli* mpk monokolonisiert wurden, eine Kolitis entwickelten. Mit *B. vulgatus* mpk monokolonisierte Mäuse zeigten keine Kolitis. Wurden Mäuse mit *E. coli* mpk und *B. vulgatus* mpk ko-kolonisiert, so verhinderte *B. vulgatus* die Entstehung einer *E. coli*-induzierten Kolitis.

DNA-Untersuchungen von *E. coli* mpk konnten keines der gängigen Virulenzgene bekannter pathogener *E. coli*-Stämme nachweisen (enterohämorrhagische, enteroinvasive, enteropathogene, enterotoxische oder

enteroaggregative Stämme). Bei *E. coli* mpk handelt es sich also um einen apathogenen kommensalen Keim, dennoch vermag er im genetisch prädisponierten Individuum eine Kolitis auszulösen (Waidmann *et al.*, 2003). Diese im Tiermodell gewonnenen Erkenntnisse unterstreichen die Bedeutung der natürlichen Mikroflora des Darms für die Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.

1.3 Differentielle Fluoreszenz-Induktion (DFI)

1.3.1 DFI und IVET: Einführung

Der immense Fortschritt, der in den letzten Jahrzehnten innerhalb der Mikrobiologie zu beobachten ist, beruht größtenteils auf *in vitro*-Experimenten, also unter experimentellen Bedingungen, die versuchen, die Realität so gut wie möglich abzubilden. Eine übliche Vorgehensweise dabei ist die *bottom up*-Strategie. Nach Inaktivierung einzelner Gene werden veränderte phänotypische Eigenschaften, Veränderungen in Signalkaskaden, Schwankungen von mRNA-Mengen (Hybridisierungstechniken), Veränderungen auf Protein-Niveau (*Western-Blot*) etc. analysiert (Lenski and Sniegowski, 1995). So essentiell diese Forschungen auch sind, vermögen sie doch die Komplexität ökologischer Systeme nur in begrenztem Maße zu erfassen (Rediers *et al.*, 2005).

Daher wurden in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts Systeme entwickelt, die sich an *in vivo*-Bedingungen orientieren. Die beiden wichtigsten unter ihnen sind IVET (*in vivo expression technology*) und DFI (Differentielle Fluoreszenz-Induktion). DFI wurde in dieser Arbeit verwendet und wird im folgenden Abschnitt erläutert. Bei IVET werden Fragmente der DNA eines Bakteriums vor ein promotorloses Hybridoperon aus den Genen *purA* (Purinbiosynthese) und *lacZ* (Reportergen, Teil des Glukosestoffwechsels) fusioniert. Mittels homologer Rekombination werden diese Fusionsgene in einen *purA*-negativen Bakterienstamm eingefügt. Infiziert man nun Versuchstiere mit diesen Bakterien, so werden nur diejenigen Bakterien überleben, bei denen sich vor dem *purA*-Gen ein aktiver Promotor befindet. Durch Isolierung dieser Subpopulation und Erfassung ihrer *lacZ*-Aktivität lassen sich die hochregulierten

Gene identifizieren. Im Vergleich mit DFI birgt diese Methode jedoch zwei Nachteile: erstens sind intermittierende Substratzugaben notwendig, und zweitens ist sie nicht automatisiert durchführbar (Rediers *et al.*, 2005).

1.3.2 Prinzip der Differentiellen Fluoreszenz-Induktion

Das System, das sich zunehmender Beachtung erfreut, ist das von Valdivia und Falkow 1996 erstmals vorgestellte Prinzip der Differentiellen Fluoreszenz-Induktion (DFI) (Valdivia and Falkow, 1996). Diese Methode kombiniert ein molekulares Reportersystem mit der Durchflußzytometrie (*FACS, fluorescence activated cell sorter*) und ermöglicht so die Genexpressionsanalyse eines Bakteriums. Grundlage unseres molekularen Reportersystems ist das Plasmid pANT3, das als Vektor für ein promotorloses *gfp*-Gen (*green fluorescent protein*) fungiert. GFP kommt natürlicherweise in *Aequorea victoria* vor und ist ein Chromophor. Wird es mit Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt, emittiert es grünes Licht. Nach mehreren Optimierungen im *gfp*-Gen konnten die Stabilität des Proteins erhöht und die Toxizität vermindert werden, außerdem bietet die optimierte Mutante GFPmut3 eine 45-fach erhöhte Fluoreszenz im Vergleich zum Wildtyp-GFP (Cormack *et al.*, 1996) (Suarez *et al.*, 1997).

Zur Erstellung einer sog. Promotoren-Bank wurden DNA-Fragmente mit Längen zwischen 200 und 500 bp aus dem chromosomalen Genom von *E. coli* mpk direkt *upstream* des promotorlosen *gfp*-Gens in den Vektor kloniert. Durch die geringe Länge dieser Fragmente kann davon ausgegangen werden, dass sie lediglich eine Funktion als Promotor tragen können. Prokaryotische Gene sind wesentlich länger. Auf diese Weise entstehen Tausende unterschiedlicher Klone des pANT3-Vektors: Alle sind mit dem *gfp*-Gen versehen, das jedoch in jedem Klon unter der Kontrolle eines anderen Promotors steht. Überführt man all diese Vektoren in jeweils ein Bakterium, wird daraufhin unter verschiedenen Umweltbedingungen das Protein GFP differentiell exprimiert. Steht in einem bestimmten Bakterium das vektorielle *gfp*-Gen unter der Kontrolle von Promotor A, und die aktuellen Umweltgegebenheiten bedingen eine Expression des dazugehörigen Gens A, so wird zum einen dieses Gen im chromosomalen Genom ganz regulär abgelesen. Zum anderen wird auch das episomale GFP

exprimiert, da es unter der Kontrolle desselben Promotors steht. Setzt man nun dieses Bakterium einem Licht der Wellenlänge 488 nm aus, so lässt sich eine grüne Fluoreszenz beobachten. Durch Sequenzierung des vektoriiellen *inserts* und anschließendes *alignment* lässt sich leicht das aktivierte Gen identifizieren (siehe **Kap. 2.2.4**). Diese Vorgänge werden unter dem Begriff „Differentielle Fluoreszenz-Induktion“ subsumiert, die Gesamtheit der verschiedenen bakteriellen Klone heißt DFI-Bank, engl. *promotor trap library* (Valdivia and Falkow, 1996).

1.3.3 Bisherige Arbeiten mit Differentieller Fluoreszenz-Induktion

Die Erstbeschreiber der DFI-Methode, R. H. Valdivia und S. Falkow, konstruierten 1996 eine *promotor trap library* mit *Salmonella typhimurium*, einem Gastroenteritis-Erreger. Die Fähigkeit von *S. typhimurium*, in Makrophagen und insbesondere im sauren Milieu von Phagosomen zu überleben, ist ein wichtiger Pathogenitätsmechanismus dieses Erregers. Um die Pathogenitätsmechanismen von *S. typhimurium* besser zu verstehen, wurden mittels DFI acht Klone isoliert, die unter sauren Wachstumsbedingungen (pH 4,5) eine besonders hohe Fluoreszenz aufwiesen. Im Anschluss an die Isolierung der pH-sensitiven Klone wurden diese zur Infektion von Makrophagen benutzt. Bei der mikroskopischen Auswertung der Fluoreszenz zeigte sich, dass zwei der acht benutzten Klone auch innerhalb von Makrophagen eine hohe Fluoreszenz aufwiesen: die Konstrukte *aas-gfpmut* und *pagA-gfpmut*. Somit konnten zwei Gene identifiziert werden, die für die Pathogenität des Erregers von Bedeutung sind (Valdivia and Falkow, 1996).

In einer weiteren Arbeit gelang es denselben Autoren, die Anwendung von DFI in einem murinen *in vivo*-System zu etablieren. Hierzu wurden erneut Makrophagen mit einer DFI-*promotor trap library* von *S. typhimurium* infiziert und mittels Selektion auf hoch-fluoreszente Makrophagen im FACS vierzehn verschiedene DFI-Klone isoliert. Diese wurden zur peritonealen Infektion von BALB/c-Mäusen verwendet. Nach drei Tagen wurden Homogenisate von Milz und Leber im FACS erneut auf Fluoreszenz analysiert. Es gelang, einzelne

Erreger im Verlauf des Infektionsprozesses in Mäusen nachzuverfolgen (Valdivia and Falkow, 1997).

M. Bartilson, A. Marra et al. adaptierten DFI an den Organismus *Streptococcus pneumoniae*, einen häufigen Pneumonie-Erreger. Sie untersuchten den Einfluss von *competence stimulatory peptide* (CSP) auf die Genexpression von *S. pneumoniae*. Unter Kompetenz versteht man hierbei den Zustand, der es einem Bakterium ermöglicht, mittels diverser DNA-Prozessierungen eine genetische Transformation durchzumachen (Hui and Morrison, 1991). Es gelang den Autoren, unter den isolierten 12 DFI-Klonen 6 bereits bekannte und 3 noch unbekannte CSP-Promotoren zu identifizieren. Ferner konnten sie in 2 unterschiedlichen murinen Infektionsmodellen (systemische Infektion, Atemwegsinfektion) einen Zusammenhang zwischen diesen Kompetenz vermittelnden Peptiden und der Pathogenität des Erregers herstellen (Bartilson et al., 2001).

Durch unterschiedliche *in vitro*-Induktionsbedingungen (Unterschiede in Osmolarität, Temperatur, Sauerstoff- und Eisenangebot) führten dieselben Autoren in darauffolgenden Experimenten ein Screening auf hochregulierte Gene innerhalb der *S. pneumoniae* DFI-promotor trap library durch. Ferner wurden ausgewählte Klone bzw. deren Deletionsmutanten weiterbenutzt, um die Bedeutung der jeweiligen Gene für die Pathogenität in verschiedenen *in vivo*-Modellen zu untersuchen. So konnten wiederum einige bis dahin unbekannte Pathogenitätsfaktoren von *S. pneumoniae* bestimmt werden, insbesondere ein Zusammenhang zwischen dem *psaBCA*-Operon und der Erregervirulenz wurde deutlich (Marra et al., 2002a; Marra et al., 2002b).

W. P. Schneider, A. Marra et al. konstruierten ferner eine DFI- *promotor trap library* für *Staphylococcus aureus* und konnten mit ähnlichen Methoden wie bei *S. pneumoniae* 61 Gene identifizieren, von denen sich im Mausexperiment (systemische Infektion, Atemwegsinfektion) ca. 40% als wichtig für den Pathogenitätsmechanismus herausstellten (Schneider et al., 2002).

L. P. Barker et al. wandten das Prinzip der DFI auf *Mycobacterium marinum* an und verfolgten mit Infektionen von Makrophagen die gleiche Strategie wie vorher Valdivia und Falkow (s. o.) mit einer Änderung: Anstatt intakte

Makrophagen im FACS auf deren Fluoreszenz zu analysieren, isolierten Barker et al. zuerst die in den Makrophagen enthaltenen Phagosomen mit den intrazellulären Bakterien. Sie konnten so 12 DFI-Klone von *M. marinum* identifizieren, die eine differentielle Genexpression aufwiesen (Barker et al., 1998).

R. L. Wilson et al. wandten das DFI-System auf *Listeria monocytogenes* an, ein Erreger, der unter anderem Enzephalomeningitis und Septikämie verursachen kann. Auch sie konnten mehrere in Makrophagen differentiell exprimierte Gene identifizieren und mittels eines murinen Infektionsmodells in Zusammenhang mit der Virulenz des Erregers bringen (Wilson et al., 2001).

Alle Studien führten somit zu wichtigen Informationen und neuen Erkenntnissen über bakterielle Pathogenität und bakterielle Adaptation an unterschiedliche Umweltbedingungen. Ebenso wurde DFI von allen Autoren als eine potente Herangehensweise bewertet, die vor allem durch ihre Einsatzmöglichkeit unter *in vivo*-Bedingungen die gängigen Methoden der bakteriellen Genetik bereichern könne und in Zukunft zahlreiche neue Erkenntnisse auf dem Gebiet der Regulation bakterieller Genexpression bringen könne, vor allem in der Infektionsbiologie.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Ausgehend von der Tatsache, dass *E. coli* mpk im Tierversuch kolitogen ist, eine Doppelbesiedlung des Tierdarmes mit *E. coli* mpk und *B. vulgatus* jedoch die Kolitogenität von *E. coli* mpk hemmt, lässt sich folgende Hypothese formulieren:

E. coli mpk weist im Darm *in vivo* eine bestimmte Genexpression auf, und diese Genexpression trägt zur Entstehung einer Kolitis bei. Die kolitogenen bakteriellen Faktoren werden bei einer Doppelbesiedlung offensichtlich nicht mehr produziert, es entsteht keine Kolitis. Somit besteht die Notwendigkeit, eine Methodik zu finden, die die Genexpression von *E. coli* mpk *in vivo* zu erfassen vermag.

Um Aufschluss über die bakteriellen Mechanismen zu erhalten, die die Kolitogenität von *E. coli* mpk bedingen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine

promotor trap library von *E. coli* mpk konstruiert und deren Anwendung etabliert.

In *in vitro*-Experimenten mit definierten Bedingungen wie z. B. Hitzeschock wurde die DFI- *promotor trap library* induziert. Anschließend wurden mittels FACS die aktivierten GFP-exprimierenden Klone angereichert. Dies ermöglichte das Isolieren einzelner DFI-Klone mit hoher Fluoreszenz und die Analyse ihres episomalen Promotors mittels genetischer Verfahren.

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer Technik, die weiterführenden Forschungen im *in vivo*-Mausmodell ein *screening* auf bakterielle Pathogenitätsmechanismen ermöglichen kann. Letztlich könnten Ergebnisse aus diesen Versuchen Aufschluss darüber geben, welcher Faktor des kolitogenen Kommensalen *E. coli* mpk für die Induktion chronisch entzündlicher Darmerkrankungen in der IL-2^{-/-}-Maus verantwortlich ist.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Anaerobier-Beutel	Oxoid, Hants, UK
Anaerobier-Topf	E. Merck, Darmstadt
Anaerotest-Indikatorstäbchen	E. Merck, Darmstadt
Analysewaage	Sartorius, Göttingen
Ausschwingrotor-Zentrifuge Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Ausschwingrotor-Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau
Brutschrank B20	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Elektrophoresekämme	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Elektrophoresekammer	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Elektrophoreseschlitten	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Gleichspannungsquelle (Bio-Rad PowerPac 200)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Heizblock (Thermomixer comfort)	Eppendorf, Hamburg
PCR-Thermocycler T3	Whatman Biometra, Göttingen
Photometer Ultrospec 3000 pro	Amersham Pharmacia, Freiburg
Pipetten: Eppendorf Research (1, 10, 20, 50, 100, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettier-Hilfen	Eppendorf, Hamburg
Schüttelinkubatoren	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Steril-Arbeitsbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Tisch-Zentrifuge Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
UV Transluminator FLX-20 M	Biometra, Göttingen
Videodokumentationssystem	Whatman Biometra, Göttingen

BioDoc Analyze

Vortexer REAX Top

Wasserbad

Heidolph Instruments, Schwabach

Memmert, Schwabach

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Ampuwa, steriles Wasser

Aqua ad iniectabilia (10 ml)

Einmalküvetten

Einmalpipetten

(Stripette 5, 10, 25, 50 ml)

Glaskolben und -flaschen

Impfschlingen (1, 10 µl)

Kanülen, Microlance

Parafilm

Pasteurpipetten

PCR Softstrips 0,2 ml

pH-Indikatorpapier (pH 0,5 – 5,5)

Pipettenspitzen (10 µl)

Pipettenspitzen (1000µl)

Pipettenspitzen (200 µl)

Reaktionsgefäße (1,5 und 2,0 ml)

Rundboden-Röhrchen (14 ml)

Spitzboden-Röhrchen (15 ml)

Spitzboden-Röhrchen (50 ml)

Spritzen, Injekt

Wattestäbchen, steril

Fresenius Kabi, Bad Homburg

B. Braun, Melsungen

Sarstedt, Berlin

Corning Inc., Corning, NY, USA

Schott Duran, Mainz

Sarstedt, Berlin

Becton-Dickinson S.A., Fraga, Spanien

Pechiney Plastic Packaging, Menasha,
WI, USA

WU, Mainz

Biozym, Hess. Oldendorf

Macherey-Nagel, Düren

Brand, Wertheim

Greiner, Nürtingen

Sarstedt, Berlin

Eppendorf, Hamburg

Falcon/Becton-Dickinson, Heidelberg

Greiner, Nürtingen

Falcon/Becton-Dickinson, Heidelberg

Braun, Melsungen

MSP Schmeiser, Horb

2.1.3 Bakterienstämme und Plasmide

Tab. 2.1: Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

Bakterienstämme	
<i>B. vulgatus</i> mpk	(Waidmann <i>et al.</i> , 2003)
<i>E. coli</i> Nissle 1917	Deutsche Stammsammlung (DSM) 6601
<i>E. coli</i> Nissle 1917 pMUT2-KM	Deutsche Stammsammlung (DSM) 6601 <i>gfp</i> Kan ^R
<i>E. coli</i> mpk	(Waidmann <i>et al.</i> , 2003)
<i>E. coli</i> mpk pANT3	diese Arbeit: <i>promotor trap library</i> von <i>E. coli</i> mpk, Kan ^R , enthält pANT3 (s.u.)
<i>E. coli</i> DH5 α	(Lee and Falkow, 1998)
Plasmide	
pANT3	<i>low-copy</i> Plasmid, promotorloser GFPmut3- Vektor, Kan ^R (Lee and Falkow, 1998)

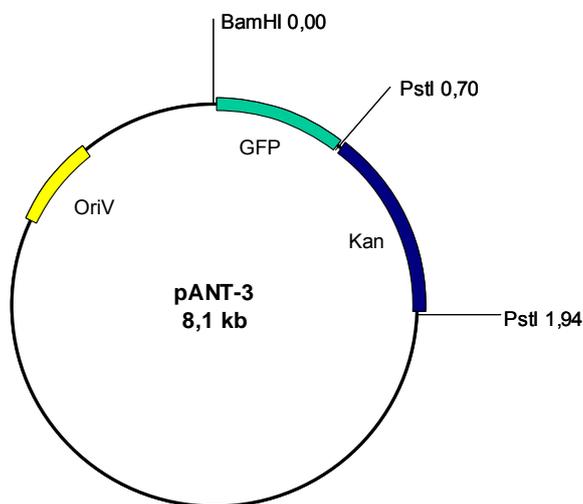


Abb. 2.1: Plasmidkarte von pANT3

Das Plasmid trägt das promotorlose Reportergen GFP und eine Kanamycin-Resistenz (Kan). *Bam*HI und *Pst*I bezeichnen Schnittstellen für Restriktionsenzyme. Die Zahlen sind Größenangaben der Gene, Einheit: kb (Kilobasen). OriV: *origin of replication*. Einzelheiten siehe Kap. 2.2.2 und Lee et al. (Lee and Falkow, 1998).

2.1.6 Kommerzielle Kits

Plasmid-Präparationskit

Macherey-Nagel, Düren

NucleoSpin Plasmid (250)

QIAquick Gel Extraction Kit

Qiagen, Hilden

QIAGEN Genomic-Tip 100

Qiagen, Hilden

2.1.7 Antibiotika

Kanamycin

Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Endkonzentration 1:1000

2.1.8 Enzyme, Polymerasen und Ligasen

BamH I

New England Biolabs, Frankfurt

CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)

Gibco BRL, Eggenstein

T4 DNA Ligase

New England Biolabs, Frankfurt

Sau 3A

New England Biolabs, Frankfurt

*Taq DNA Polymerase, rekombinant, 500 U,
5 U/μl*

Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.9 Oligonukleotide

pANT3, *forward*:

Metabion, Martinsried

5'-ACA AAG GTC GTC TCT GTC AGC C-3'

pANT3, *reverse*:

Metabion, Martinsried

5'-ATG TTG CAT CAC CTT CAC CC-3'

Sequenzierprimer:

Metabion, Martinsried

5'-CAG CCG GAT CGT AGA AC-3'

2.1.10 Größenstandards

1 kb plus DNA ladder

Gibco BRL, Eggenstein

2.1.11 Sonstiges

Ethidiumbromidlösung 1%

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit Bakterien

2.2.1.1 Kultivierung von *E. coli*-Stämmen

Sämtliche *E. coli*-Kulturen wurden bei 37°C aerob in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Nährboden unter Zugabe des entsprechenden Antibiotikums angezüchtet. Aerobe Flüssigkulturen wurden bei 37°C und 200 rpm im Schüttelinkubator bebrütet.

2.2.1.2 Erstellung von Gefrierkulturen

Zur Erstellung von Gefrierkulturen wurden 5 ml einer Über-Nacht-Kultur 8 min bei 4000 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 1 bis 2 ml LB-Flüssigmedium/20 Vol% Glycerin resuspendiert und in 500 µl-Aliquots in Eppendorf-Einfriergefäße überführt. Diese wurden für die mittelfristige Aufbewahrung (einige Wochen) bei –20°C und für die langfristige Aufbewahrung (mehrere Monate) bei –80°C eingefroren und gelagert.

2.2.1.3 Verdünnungsreihen

Zur Keimzahlbestimmung wurden serielle Verdünnungsreihen angelegt. Von den Verdünnungsstufen 10^{-5} bis 10^{-10} wurden jeweils 100 µl ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Am Folgetag wurde die Anzahl der *colony forming units* (CFU) bestimmt.

2.2.2 Erstellung der DFI-promotor trap library

2.2.2.1 DNA-Verdau mittels Restriktionsendonukleasen

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen können bestimmte, palindromisch konfigurierte DNA-Sequenzen gezielt geschnitten werden.

Zum enzymatischen Verdau des Vektors pANT3 wurde das Enzym *BamH* I nach Herstellerangaben benutzt.

Zur Gewinnung der *inserts* für die Klonierung der *DFI-promotor trap library* wurde die genomische DNA von *E. coli* mpk mit dem Enzym *Sau* 3A partiell verdaut. *Sau* 3A schneidet die Sequenz GATC, so dass Restriktionsfragmente

von ca. 200 bis 500 bp Länge entstanden. Die Herstellerangaben wurden befolgt.

2.2.2.2 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Um bakterielle DNA aus Agarosegelen zu extrahieren, wurden die gewünschten Banden auf einem Transluminator ausgeschnitten. Die anschließende gewichtsadaptierte Aufreinigung der DNA erfolgte unter Zuhilfenahme des *QIAquick Gel Extraction Kit* (Quiagen) nach Herstellerangaben (*Handbook 03/2001*).

2.2.2.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Mit Hilfe der T4-Ligase können kompatible DNA-Enden miteinander verknüpft werden. In dieser Arbeit wurden etwa 50 ng *insert*-DNA und die ca. 5-fache Menge Vektor-DNA in einem Reaktionsvolumen von 20 µl pro Ansatz ligiert, die Reaktionspuffer und die benötigte Enzymmenge wurden nach Herstellerangaben gewählt.

2.2.2.4 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Stämme

Um eine Transformation durchführen zu können, werden kompetente Bakterien benötigt. Zur Herstellung solcher Bakterien wurden 90 ml LB-Bouillon mit 10 ml einer bewachsenen Über-Nacht-Flüssigkultur überimpft und bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte zwischen 0,5 und 1,0 inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkultur 15 min bei 4°C und 4000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 4°C kaltem Aqua dest. gewaschen und in 4 ml kaltem Aqua dest./10 Vol% Glycerin resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 4°C, 6000 rpm) und erneuter Resuspension in 600 µl kaltem Aqua dest./10Vol.% Glycerin wurden die so behandelten Bakterien in Aliquots zu jeweils 40 µl schockgefroren und anschließend bei –80°C gelagert.

2.2.2.5 Transformation elektrokompetenter *E. coli*-Stämme

Elektroporation ist eine Methode, um Fremd-DNA in Bakterien einzuschleusen. Dabei wird durch einen sehr kurzen Stromstoß die Bakterienwand permeabilisiert und somit eine Internalisierung von z. B. Plasmiden ermöglicht. Für die Durchführung der Elektroporation wurde ein Aliquot elektrokompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut, mit 1 bis 2 µl Plasmid-DNA versetzt und 1 min inkubiert. Das Gemisch wurde in eine vorgekühlte 0,2 cm-Elektroporationsküvette überführt. Die eigentliche Elektroporation wurde bei einer Feldstärke von 12,5 kV/cm und einer Dauer von 5 ms durchgeführt. Anschließend wurden die Bakterien in 1 ml SOCS-Flüssigmedium resuspendiert, bei 37°C und 200 rpm 30 min unter Schütteln inkubiert und anschließend auf entsprechendem Selektivagar ausplattiert.

2.2.2.6 Klonierung der DFI-promotor trap library

Zur Klonierung der *promotor trap library* wurde zunächst das reportergentragende Plasmid pANT3gfp_{m3} aus *E. coli* DH5α isoliert und mit Hilfe des Restriktionsenzym *Bam*HI direkt *upstream* des GFP-Codes geschnitten (s.o.). Die linearisierten Plasmide wurden nach Herstellerangaben mit CIAP behandelt, um eine Religation zu verhindern.

Nach Isolierung der chromosomalen DNA aus *E. coli* mpk und partiellem enzymatischem Verdau der DNA mit *Sau* 3A (s.o.) wurden die entstandenen Fragmente in einem Agarosegel nach Größe getrennt, Fragmente mit einer Länge zwischen ca. 200 und 600 bp extrahiert (s.o.) und in die Schnittstelle *Bam*HI kloniert, also *upstream* von GFP. Die so entstandenen Plasmide wurden mittels Elektroporation in *E. coli* mpk überführt (s.o.) und die Klone auf entsprechendem Selektivagar kultiviert. Am Folgetag wurden Gefrierkulturen erstellt (s.o.).

2.2.3 Induktionen der DFI-promotor trap library

2.2.3.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Mit Hilfe des Durchflusszytometers (FACS; *fluorescence activated cell sorter*) lassen sich optische Eigenschaften von Zellen bzw. Bakterien analysieren.

Anhand dieser Eigenschaften kann außerdem eine Selektion z. B. besonders fluoreszenter Zellen erfolgen. Die Durchflusszytometrie stellt somit in gewisser Weise eine Weiterentwicklung der Fluoreszenzmikroskopie dar.

Kernstück des Durchflusszytometers ist ein Laser, der Licht mit einer Wellenlänge von z. B. 488 nm emittiert. An diesem Laser wird unter Zuhilfenahme eines Hüllstroms der eigentliche Probenstrom einer Zell- bzw. Bakteriensuspension vorbeigeführt. Dabei können bis zu 3000 Zellen pro Sekunde analysiert werden. Das von der Zelle in Richtung des Laserstrahls gebeugte Licht wird von einem Detektor erfasst, dieser sog. *forward scatter* verhält sich dabei proportional zur Zellgröße. Ein zweiter Detektor befindet sich 90° versetzt zum Laser und misst den sog. *side scatter*, welcher ein Maß für die Granularität der Zelle ist und durch Lichtbrechung und -reflexion entsteht. Auch dieser Messgröße liegt Proportionalität zugrunde. Dieser zweite Detektor misst außerdem die Fluoreszenz der Zelle bzw. des Bakteriums. Häufig werden fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet, die dann auf der Oberfläche von Zellen an bestimmte Antigene binden. In dieser Arbeit wurde jedoch die Fluoreszenz des zytosolisch gelegenen Reportermoleküls GFP gemessen.

Die Auswertung der optischen Eigenschaften der *DFI-promotor trap library* erfolgte mit der Software CELLQUEST PRO (Becton Dickinson) anhand von Punktwolkendiagrammen („*dot plots*“) und Fluoreszenz-Histogrammen.

2.2.3.2 Selektion unterschiedlicher Bakterien mittels FACS

Um zu überprüfen, ob sich mittels FACS hochfluoreszente Klone der *DFI-promotor trap library* anreichern lassen, wurde ein definierter Bakterien-Mix von *E. coli* Nissle (keine bzw. geringe Fluoreszenz) und *E. coli* Nissle GFP (konstitutive GFP-Expression, hohe Fluoreszenz) einer dreifachen Selektion unterworfen. Über Bestimmung der optischen Dichte und anschließende Kontrolle anhand von Verdünnungsreihen wurden die Stämme *E. coli* Nissle GFP und *E. coli* Nissle im Verhältnis 1:10 in 500 µl PBS suspendiert. Aus dieser Misch-Suspension wurden daraufhin mittels FACS einerseits die GFP-positiven Bakterien aussortiert (relative Fluoreszenz im Histogramm $> 0,4 \times 10^1$, siehe **Abb. 3.1 A und B**), andererseits wurden die GFP-negativen Bakterien

heraussortiert (relative Fluoreszenz $< 0,4 \times 10^1$) und auf Agarplatten ausgesät. Die Aussaat erfolgte sowohl auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum als auch auf Agarplatten ohne Antibiotikum. Alle Platten wurden über Nacht bei 37°C aerob bebrütet, am Folgetag wurden die bewachsenen antibiotikafreien Platten mit sterilen Wattestäbchen abgeerntet und die Bakterien einer erneuten fluoreszenzabhängigen Selektion unterworfen. Auf diese Weise wurden drei Sortierschritte durchgeführt, die entweder die GFP-positiven Bakterien oder die GFP-negativen Bakterien anreichern sollten.

2.2.3.3 Selektion GFP-negativer DFI-Klone

Bevor die *DFI-promotor trap library* durch verschiedene Umweltbedingungen induziert wurde, wurden GFP-negative Klone mittels FACS angereichert. Auf diese Weise sollte die Rate der DFI-Klone, die eine konstitutive GFP-Expression zeigen, möglichst gering gehalten werden.

Hierfür wurde ein Aliquot der ursprünglichen *DFI-promotor trap library* in LB-Flüssigmedium angeimpft und 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension bei 4300 rpm abzentrifugiert, das Pellet wurde mit PBS gewaschen und schließlich in 10 ml PBS aufgenommen, so dass eine leicht trübe Suspension entstand. Die *DFI-promotor trap library* wurde daraufhin im FACS auf Fluoreszenz analysiert, die GFP-negativen DFI-Klone wurden herausselektioniert, die übrigen verworfen. Die so gewonnenen DFI-Klone wurden auf Agarplatten ausgesät und erneut zur FACS-Selektion vorbereitet. Auf diese Weise wurden drei Sortiervorgänge durchgeführt.

2.2.3.4 Induktion der *DFI-promotor trap library*

Zur Etablierung der Methodik DFI wurden *in vitro*-Bedingungen gewählt, welche die Umweltbedingungen Stress und Konkurrenz mit anderen Bakterien simulieren sollten.

Dazu wurden Hitzeschockbedingungen und pH-Stress benutzt. Wurde die *DFI-promotor trap library* unter Hitzeschockbedingungen induziert, so wurden GFP-negative DFI-Klone (siehe **Kap. 2.2.3.3**) 2 h bei 42°C inkubiert. Bei der

Induktion „pH-Stress“ wurden GFP-negative DFI-Klone bei einem pH-Wert von 4,5 inkubiert.

Um Wettbewerbsbedingungen, denen *E. coli* im Darm ausgesetzt ist, *in vitro* zu simulieren, wurde die DFI-*promotor trap library* einerseits im Überstand von *B. vulgatus* inkubiert, andererseits zusammen mit *B. vulgatus* ko-inkubiert. Um Überstand von *B. vulgatus* zu gewinnen, wurde *B. vulgatus* in BHI-Flüssigmedium angeimpft und 48 h anaerob bei 37°C bebrütet. Die Suspension wurde bei 4000 g zentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert. In diesem Überstand wurde die DFI-*promotor trap library* angeimpft und 2 h bei 37°C induziert.

Zur Ko-Inkubation wurde die DFI-*promotor trap library* mit *B. vulgatus* zusammen im selben Reaktionsansatz für 2 h anaerob bei 37°C bebrütet.

2.2.3.5 Selektion GFP-positiver DFI-Klone nach Induktion

Um die GFP-positiven DFI-Klone anzureichern, wurde die Kombination von Induktion und Sortieren mittels FACS (s.o.) pro Versuch 3 mal wiederholt.

2.2.4 Analyse der hochregulierten Gene

2.2.4.1 Isolation bakterieller Plasmid-DNA

Zur Isolation der bakteriellen Plasmide wurde das Plasmidpräparationskit NucleoSpin Plasmid (250) von Macherey-Nagel benutzt. Die Plasmid-DNA wird mit Hilfe dieses Kits nach dem Prinzip der selektiven alkalischen Denaturation und anschließender Anionenaustausch-Chromatographie gewonnen (Birnboim and Doly, 1979). Die Präparation der Plasmide erfolgte nach Angaben des Herstellers. Das Kulturvolumen von 6 ml wurde auf zwei Reaktionsansätze verteilt und im letzten Arbeitsschritt (Elution der DNA) wieder zusammengeführt. Zur Elution wurde *Aqua ad iniectabilia* benutzt (auf 70°C vorgewärmt).

Sollte die so gewonnene Plasmid-DNA zur weiteren Sequenzierung verwendet werden, wurde eine photometrische Reinheitskontrolle und DNA-Quantifizierung vorgenommen. Hierzu wurde die Extinktion_{260/280} der eluierten DNA gemessen. Bei einem Quotienten zwischen 1,7 und 1,9 und bei einer

DNA-Menge von über 20 µg/ml wurden die Anforderungen an eine Sequenzierung als erfüllt betrachtet.

2.2.4.2 Genamplifikation mittels *Colony-PCR*

Zur Überprüfung der Länge der *Inserts* unterschiedlicher Klone aus der DFI-*promotor trap library* wurde eine *Colony-PCR* gewählt, die eine Genamplifikation ohne vorangehende DNA-Präparation ermöglicht. Mittels PCR lassen sich definierte, zwischen zwei *Primern* gelegene DNA-Abschnitte exponentiell vervielfältigen (Saiki *et al.*, 1988). Die Reaktionsfolge besteht aus wiederholtem hitzeinduzierten Auftrennen des DNA-Doppelstrangs (Denaturierung), *Primer-Hybridisierung (Annealing)* und letztlich DNA-Polymerisierung mittels thermostabiler Taq-Polymerase (Elongation).

Tab. 2.3: Pro Reaktionsansatz verwendete Reagenzien für *PCR-Master-Mix*

Reagenz	verwendete Menge
pANT 3 <i>forward Primer</i> (10 pmol/µl)	2,50 µl
pANT 3 <i>reverse Primer</i> (10 pmol/µl)	2,50 µl
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,03 µl
Nukleotid-Mix (10 mM)	0,50 µl
10-fach Puffer (KCl-haltig)	2,50 µl
MgCl ₂ (25mM)	1,50 µl
Aqua ad iniectabilia	ad 25 µl

Tab. 2.4: Temperaturprofil der *Colony-PCR*

Temperatur [°C]	Dauer [s]	Zyklen
94	120	1
94	30	30
55	30	
72	60	
72	300	1

Jedes PCR-Reaktionsgefäß wurde mit 25 µl des Master-Mix beschickt. Anschließend wurde etwas Koloniematerial einer Einzelkolonie mit einer kleinen Impfschlinge aufgenommen und im PCR-Ansatz suspendiert. Da die jeweiligen Klone zur späteren Sequenzierung noch benötigt wurden, wurde parallel eine Subkultur auf Agarplatten angefertigt.

2.2.4.3 Agarose-Gelelektrophorese

Für alle Gelelektrophoresen wurde ein 1%-iges Agarosegel verwendet. Dazu wurde eine 1%-ige Agaroselösung in 0,5x TBE aufgekocht, unter Rühren abgekühlt und in einen Schlitten mit Kamm gegossen. Die Geltaschen wurden mit OrangeG-Ladepuffer und DNA-Lösung im Verhältnis 1:10 beschickt, als Referenz wurden pro Gel ein bis zwei Geltaschen mit 5 µl der *1kb plus ladder* beschickt. Zur elektrophoretischen Auftrennung wurde 35 min lang eine Spannung von 100 V angelegt. Anschließend wurden die Gele 10 min in einer 10 µg/ml Ethidiumbromidlösung gefärbt und daraufhin 10 min in aqua dest. gewaschen. Die Dokumentation der Fluoreszenz, die durch die Interkalierung des Ethidiumbromids mit der DNA entstand, erfolgte digital-photographisch bei einer Durchleuchtung des Gels mit 254 nm UV-Licht.

2.2.4.4 Sequenzierung

Im Anschluss an die drei durchflusszytometrischen Sortiervorgänge wurden die erhaltenen GFP-positiven DFI-Klone auf LB-Nährboden kultiviert. Anschließend wurde die Länge des *Inserts* mittels *Colony-PCR* analysiert. Von denjenigen DFI-Klonen, die im Agarosegel *Inserts* von unterschiedlicher Länge zeigten,

wurde das Plasmid wie in **Kap. 2.2.4.1** beschrieben isoliert. Die Sequenzierung wurde von der Firma GATC Biotech AG, Konstanz durchgeführt. Sie erfolgte dort im Programm „*Run24 Smart Barcode Sequencing*“ mit dem Primer 5'-CAG CCG GAT CGT AGA AC-3' in Phred20-Qualität, unter 100 abgelesenen Basen durfte also höchstens eine Base falsch sein.

2.2.4.5 Alignment

Um die sequenzierten *Inserts* zu analysieren, wurden zwei der *BLAST*-Algorithmen der *NCBI-Homepage* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) benutzt. Die *BLAST*-Algorithmen erlauben dem Benutzer, zwei gegebene Nukleotidsequenzen hinsichtlich ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu vergleichen. Hierfür wird ein sog. *Alignment* durchgeführt. Dabei werden lange Übereinstimmungen in den Nukleotidsequenzen und das Einfügen von Lücken in eine der Sequenzen bewertet. Beide Informationen fließen letztlich in den sog. *E-Value* ein, der ein Maß für die Signifikanz einer gefundenen Übereinstimmung ist. Er spiegelt quasi die Rate der falsch-positiven Ergebnisse wider: Je niedriger der *E-Value*, desto signifikanter das Ergebnis (Altschul *et al.*, 1990).

In dieser Arbeit kam einerseits der *blastx*-Algorithmus zum Einsatz, anhand dessen das Vorhandensein des GFP-Codes auf der ansequenzierten Nukleotidsequenz überprüft werden konnte, und andererseits der Algorithmus „*BLAST with microbial genomes*“, der mit dem *E. coli* K12-Genom als Vorlage für das *alignment* durchgeführt wurde. Es wurden ausschließlich *BLAST*-Ergebnisse in diese Arbeit aufgenommen, die einen *identity*-Wert von über 96% und eine Fragmentlänge von mindestens 80 Basen aufwiesen. Der entsprechende *E-Value* lag hierbei meist weit unter 10^{-50} , es lagen also stets hochsignifikante Übereinstimmungen der Nukleotidsequenzen vor.

2.2.4.6 Statistik

Bei der Konstruktion der *DFI-promotor trap library* wurde auf die vollständige Repräsentanz des gesamten *E. coli*-Genoms geachtet. Bei einer Genomgröße von 4,64 Mbp und einer durchschnittlichen Fragmentlänge nach partiellem Verdau

des Genoms mit *Sau 3a* von ca. 450 bp ergibt sich hieraus eine Mindestanforderung an die *DFI-promotor trap library* von ca. 10.000 Klonen. In dieser Arbeit wurde mit einer *promotor trap library* gearbeitet, welche ca. 15.000 Klone umfasste: Das Genom von *E. coli* war also 1,5-fach überrepräsentiert.

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung der DFI-promotor trap library

Im ersten Schritt der Etablierung der DFI-Technik wurde die DFI-promotor trap library erstellt. Hierzu wurde der Vektor pANT3 mittels Restriktionsenzym *Bam*HI direkt *upstream* des *gfp*-Gens geschnitten. Gleichzeitig wurde das chromosomale Genom von *E. coli* mpk mit dem Enzym *Sau* 3A partiell verdaut, so dass zufällige Fragmente mit Größen zwischen 200 und 800 bp entstanden. Diese wurden *upstream* des promotorlosen *gfp*-Gens in den aufgeschnittenen Vektor pANT3 kloniert. Anschließend wurde das Plasmid mittels Elektroporation in *E. coli* mpk transformiert.

Um später bei der Anwendung der DFI-Technik valide und reproduzierbare Ergebnisse zu bekommen, war es wichtig, dass das gesamte Genom von *E. coli* innerhalb der o.g. Fragmente abgebildet war. Hierzu wurde ermittelt, wie viele Klone nach Elektroporation mit pANT3 transfiziert waren. Nach dem letzten Arbeitsschritt konnten ca. 15.000 einzelne DFI-Klone gezählt werden, was einer 1,5-fachen Überrepräsentierung des Genoms von *E. coli* entsprach. Somit war die Bedingung, dass jedes Stück des Genoms von *E. coli* in der DFI-promotor trap library statistisch mindestens einmal vorkommt, erfüllt.

3.2 Nachweis der Selektionierbarkeit GFP-positiver bzw. GFP-negativer Bakterien-Subpopulationen mittels FACS

Die Methodik DFI bedient sich der Auftrennbarkeit unterschiedlich fluoreszenter Subpopulationen innerhalb der *promotor trap library* mittels FACS. Um zu zeigen, dass die Auftrennung GFP-positiver bzw. GFP-negativer Bakterien am FACS prinzipiell möglich ist, wurde eine Mischkultur aus GFP-positiven und GFP-negativen *E. coli*-Klonen verwendet. Hierzu wurden *E. coli* Nissle GFP (GFP-positiv, hohe Fluoreszenz) und *E. coli* Nissle (GFP-negativ, keine Fluoreszenz) im Verhältnis 1:20 analysiert. Anschließend wurden im ersten Versuch die GFP-negativen Bakterien, im zweiten Versuch die GFP-positiven Bakterien angereichert.

Die Ergebnisse der Auftrennung unterschiedlich fluoreszenter Bakterien mittels FACS sind in **Abb. 3.1** dargestellt. Bei der Anreicherung der GFP-negativen Bakterien war eine Abnahme der GFP-positiven Klone von ca. 10% auf <1% zu beobachten. Gleichzeitig stieg bei der Anreicherung der GFP-positiven Bakterien der Anteil GFP-positiver Klone von ca. 11% auf >30%.

Durch Kultivierung auf entsprechenden Selektivmedien konnte das Verhältnis GFP-positive : GFP-negative Bakterien nach jedem Sortierschritt unabhängig vom FACS bestimmt werden. Lag der Anteil GFP-positiver Bakterien zu Beginn beider Versuchsreihen noch bei 5%, so betrug er am Ende der Anreicherung GFP-negativer Bakterien nur ca. 0,1% und nach Anreicherung GFP-positiver Bakterien ca. 86%.

Somit ist das Analysieren und Sortieren mittels FACS ein geeignetes Verfahren, um Bakterien-Subpopulationen mit unterschiedlicher Fluoreszenz voneinander zu trennen.

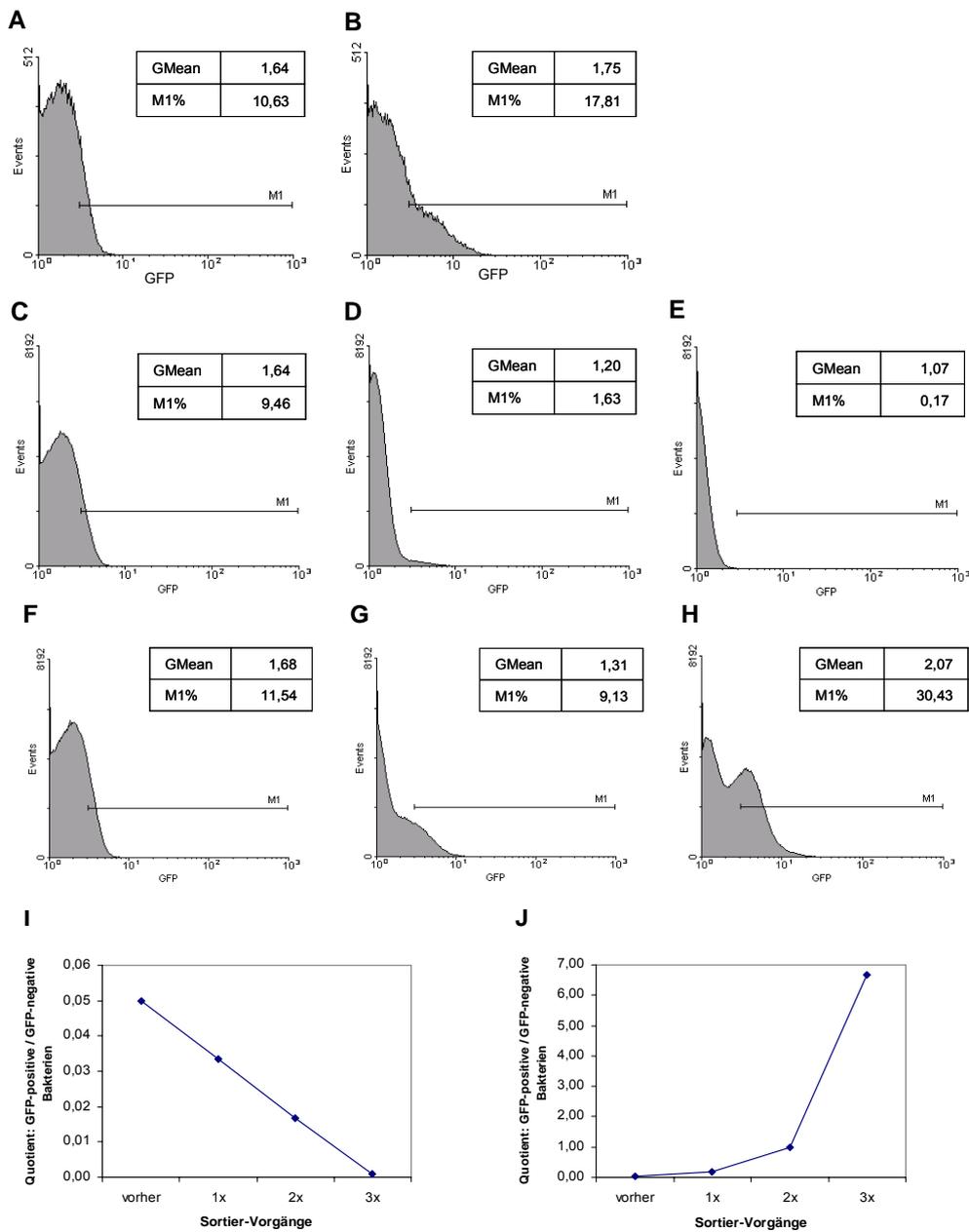


Abb. 3.1.: Auftrennung unterschiedlicher Bakterien-Subpopulationen hinsichtlich Fluoreszenz am FACS. Histogramme: x-Achse: Fluoreszenz (GFP), y-Achse: Anzahl detektierter *events* (=Bakterien). Diagramm A: *E. coli* Nissle, Diagramm B: *E. coli* Nissle GFP. *GMean* = mittlere Fluoreszenz, *M1%* = Verhältnis der *events* im Gate M1 zu allen *events*. Die Diagramme C, D und E zeigen die Anreicherung GFP-negativer Bakterien, der Anteil der GFP-positiven Bakterien sinkt von 9% auf <1%. Die Diagramme F, G und H zeigen die Anreicherung GFP-positiver Bakterien, ihr Anteil steigt von 12% auf 30%. Die Diagramme I und J zeigen das Verhältnis von GFP-positiven zu GFP-negativen Bakterien im zeitlichen Verlauf; I: Selektion GFP-negativer Bakterien, J: Selektion GFP-positiver Bakterien.

3.3 Selektion einer GFP-negativen DFI-Subpopulation

Vor Induktion der *promotor trap library* wurde eine GFP-negative DFI-Subpopulation isoliert. Dies erfolgte analog zu **Kap. 3.2** in drei aufeinanderfolgenden Sortierschritten mittels FACS. Ziel war es, durch Aussortieren der konstitutionell GFP-exprimierenden Klone die Rate der falsch-positiven Ergebnisse so gering wie möglich zu halten, und somit differentiell hochregulierte Gene zu identifizieren. Hierbei war jedoch wichtig, dass die Heterogenität der *promotor trap library* erhalten blieb, da ansonsten die Rate der falsch-negativen Ergebnisse angestiegen wäre.

Zur Überprüfung der Heterogenität wurden daher DFI-Klone mittels *Colony-PCR* auf die Fragmentlänge ihres *inserts* überprüft. **Abb. 3.2** zeigt die Kontrolle dieser Heterogenität mittels gelelektrophoretischer Analyse der *insert*-Längen. Die *inserts* aller so überprüften DFI-Klone wurden sequenziert und mittels BLAST-Algorithmus der NCBI-Homepage (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) identifiziert. Die Ergebnisse dieser Gen-Identifizierung sind in **Tab. 3.1** dargestellt.

Die Heterogenität der GFP-negativen Population konnte bestätigt werden. Von 46 identifizierten Genen waren nur 2 identisch.

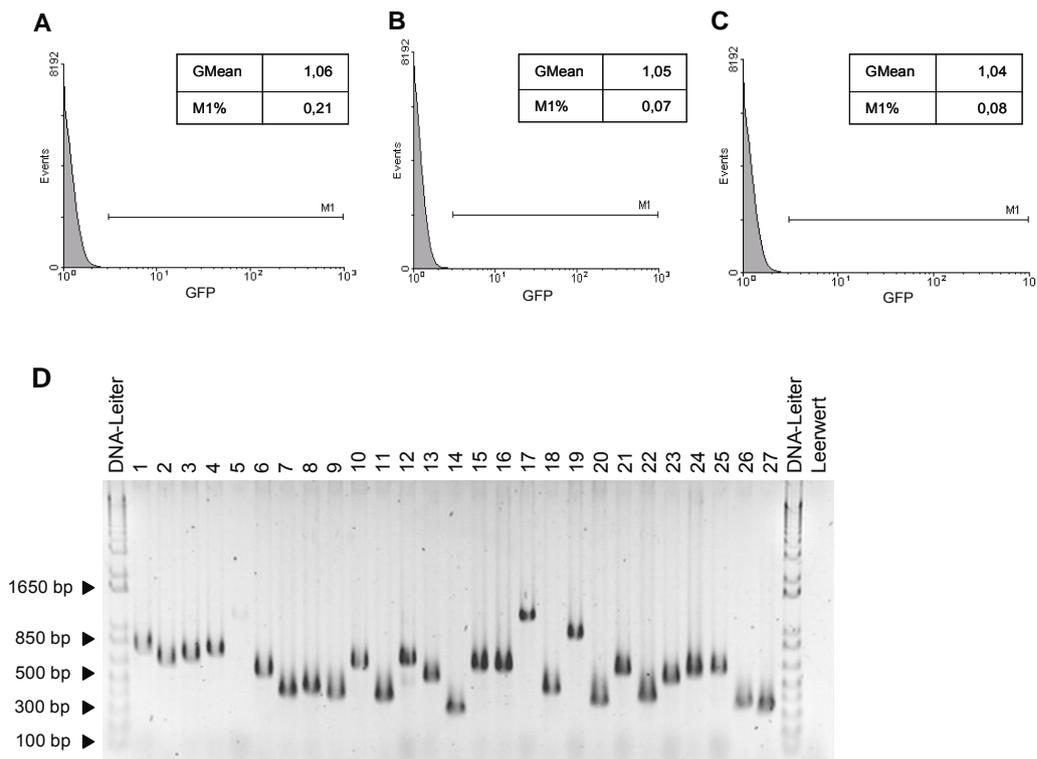


Abb. 3.2: Selektion einer GFP-negativen DFI-Subpopulation mittels FACS. Histogramme: x-Achse: Fluoreszenz (GFP), y-Achse: Anzahl detektierter *events* (=Bakterien). GMean = mittlere Fluoreszenz, M1% = Verhältnis der *events* in Gate M1 zu allen *events*. Die Diagramme A, B und C zeigen die Reduktion der GFP-positiven Bakterien von 0,21% auf 0,08%. Diagramm D zeigt die *Colony-PCR* über das insert des jeweiligen DFI-Klones. Die einzelnen Fragmente variieren deutlich in ihrer Länge. Einzelheiten siehe Text.

Tab. 3.1.: Liste der identifizierten Gene in der GFP-negativen DFI-Subpopulation. Im Folgenden sind alle Gene gelistet, die nach Sequenzierung des *inserts* und anschließendem *alignment* gegen das Genom von *E. coli* K12 mittels BLAST-Algorithmus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) identifiziert werden konnten. Klasseneinteilung:

1) Chemotaxis und Motilität; 2) Nährstoff-Aufnahme; 3) zentraler Metabolismus; 4) Anpassung an umweltbedingten Stress; 5) Regulation; 6) Zellwand und Zellhülle; 7) Virulenz; 8) Nukleinsäure-Metabolismus; FUN) Funktion unbekannt. Einzelheiten siehe **Kap. 3.6** und Text.

Gen	Kopien	Klasse	Funktion/Bemerkung	Referenz
<i>agaS</i>	1	2	Phosphotransferase; Aufnahme und Metabolisierung von N-Acetyl-Galactosamin	(Ray and Larson, 2004)
<i>carB</i>	1	3	Carbamoyl-Phosphat-Synthetase; Arginin und Pyrimidin Biosynthese	(Nyunoya and Lusty, 1983)
<i>cpdB</i>	1	3 und 8	Bifunktionales Enzym: 1) 2'-3' zyklische Phosphodiesterase; 2) 3'-Nukleosidase	(Trulzsch <i>et al.</i> , 2001)
<i>dadX</i>	1	3	Alanin-Racemase; intermediärer Katabolismus	(Lobocka <i>et al.</i> , 1994)
<i>dapF</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	

<i>dppB</i>	1	1	Permease-Protein 1; Transport-System für Dipeptide; Chemorezeptorfunktion	(Abouhamad and Manson, 1994)
<i>dsbG</i>	1	3	<i>Disulfid bond formation</i> Protein G, periplasmatische Oxido-Reduktase	(Hiniker and Bardwell, 2004)
<i>ego</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>ftsW</i>	2	6	membranständiges Protein, wird für die Zellteilung benötigt (stabilisiert FtsZ-Ring)	(Mercer and Weiss, 2002)
<i>gppA</i>	1	5	Dephosphorylierung von Guanosinpentaphosphat zu Guanosintetraphosphat, involviert in Stoffwechsel von anorganischem Polyphosphat	(Kuroda <i>et al.</i> , 1997)
<i>hrpB</i>	1	8	RNA Helicase	(Moriya <i>et al.</i> , 1995)
<i>hrsA</i>	1	4	<i>heat-responsive element</i> A, induziert Expression der <i>outer membrane</i> <i>porins</i> OmpC und OmpF	(Utsumi <i>et al.</i> , 1996)
<i>hyfR</i>	1	5	Format-abhängiger Transkriptionsfaktor	(Andrews <i>et al.</i> , 1997)
<i>Int</i>	1	6	Apolipoprotein N-Acetyltransferase, Synthese der Lipoproteine der äusseren Membran	(Robichon <i>et al.</i> , 2005)
<i>malK</i>	1	2	ABC-Untereinheit des Maltose/Maltodextrin Transporters	(Schlegel <i>et al.</i> , 2002)
<i>mscK</i>	1	2	mechanosensitiver Kanal, involviert in Osmoregulation	(Li <i>et al.</i> , 2002)
<i>murD</i>	1	6	periplasmatisches Enzym, benötigt für Peptidoglykan-Biosynthese (Murein)	(El Sherbeini <i>et al.</i> , 1998)
<i>nrfA</i>	1	3	periplasmatisches Cytochrom c, Nitritreductase	(Pooock <i>et al.</i> , 2002)
<i>parE</i>	1	8	DNA-Topoisomerase IV, ATP-bindende Untereinheit	(Lavasani and Hiasa, 2001)
<i>phoH</i>	1	2	zum Phosphat-Regulon gehörig, Transport von freiem und komplexem Phosphat	(Kim <i>et al.</i> , 1993)
<i>ponB</i>	1	6	Penicillin Bindeprotein 1B, Mureinbiosynthese	(Pla <i>et al.</i> , 1990)
<i>pmbA</i>	1	3	benötigt für Biosynthese von Microcin B17	(Allali <i>et al.</i> , 2002)
<i>rbn</i>	1	8	RNA-Abbau	(Osorio <i>et al.</i> , 2005)
<i>ribF</i>	1	3	bifunktionell: Flavokinase, FAD Synthetase	(Gerdes <i>et al.</i> , 2002)
<i>rnfD</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	(Gifford and Wallace, 2000)
<i>rstB</i>	1	5	Histidin-Kinase	(Hagiwara <i>et al.</i> , 2004)
<i>slyD</i>	1	3	Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase	(Hottenrott <i>et al.</i> , 1997)
<i>treF</i>	1	3	Cytoplasmatische Trehalase, Kohlenhydrat-Katabolismus	(Uhland <i>et al.</i> , 2000)
<i>trkH</i>	1	2	Kalium-Transportprotein	(Bossemeyer <i>et al.</i> , 1989)
<i>tsr</i>	1	1	gehört zum Chemotaxis-System	(Burkart <i>et al.</i> , 1998)
<i>valV</i>	1	8	Valyl-tRNA-Synthetase	(Hountondji <i>et al.</i> , 2000)
<i>ybfE</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>ycdZ</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>yciR</i>	1	3	Enzym für Isoprenoid-Biosynthese	(Kollas <i>et al.</i> , 2002)
<i>ydeY</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>ydeZ</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>yeaG</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>yfeZ</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>yfhK</i>	1	5	Histidin-Kinase	(Hagiwara <i>et al.</i> , 2004)
<i>ygbL</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>ygiM</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>yigA</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>yihL</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	

<i>ykfJ</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>ypeA</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>yrbE</i>	2	FUN	Funktion unbekannt	

Um eine bessere Übersicht über das jeweilige Genexpressionsprofil von *E. coli* zu bekommen, wurden die hochregulierten Gene in verschiedene Gruppen eingeteilt (Rediers *et al.*, 2005) : 1) Chemotaxis und Motilität; 2) Nährstoff-Aufnahme; 3) zentraler Metabolismus; 4) Anpassung an umweltbedingten Stress; 5) Regulation; 6) Zellwand und Zellhülle; 7) Virulenz; 8) Nukleinsäure-Metabolismus; FUN) Funktion unbekannt. Das Genexpressionsprofil der GFP-negativen DFI-Subpopulation ist in **Abb. 3.3** dargestellt.

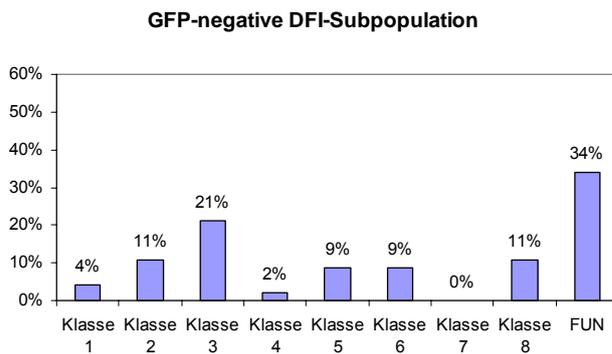


Abb. 3.3: Profil der Genexpression der GFP-negativen DFI-Subpopulation

Insgesamt wurden 46 Gene klassifiziert. Klasseneinteilung: 1) Chemotaxis und Motilität; 2) Nährstoff-Aufnahme; 3) zentraler Metabolismus; 4) Anpassung an umweltbedingten Stress; 5) Regulation; 6) Zellwand und Zellhülle; 7) Virulenz; 8) Nukleinsäure-Metabolismus; FUN) Funktion unbekannt. Einzelheiten siehe Text und **Kap. 3.6**.

Die meisten Gene gehörten zur Klasse FUN, das heißt dass ihre Funktion zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit noch unbekannt war. Dieses Ergebnis stimmt überein mit Rediers et al., die ebenfalls 33% der Gene der Gruppe FUN zuordneten.

3.4 Induktionen: Hitzestress, pH-Stress

Um zu untersuchen, ob sich die Genexpression von *E. coli* unter Umweltstress ändert und ob diese veränderte Genexpression mittels DFI erfasst werden kann, wurde die GFP-negative Subpopulation der *promotor trap library* einerseits Hitzestress und andererseits pH-Stress ausgesetzt und anschliessend im FACS analysiert. In drei aufeinanderfolgenden Schritten wurden GFP-positive DFI-Klone angereichert und *inserts* dieser Klone sequenziert.

3.4.1 Induktion: Hitzestress

Abb. 3.4 zeigt die FACS-Histogramme der *promotor trap library* (A - C) und Fragmentlängen des *inserts* einzelner DFI-Klone (D, E) nach Hitzestress-Induktion.

Die Fluoreszenzverteilung der Histogramme zeigte hierbei eine deutliche Rechtsverschiebung, was für eine Anreicherung GFP-positiver DFI-Klone spricht. Der Anteil GFP-positiver Klone stieg von 1% auf 54%. Gleichzeitig nahm die Heterogenität der *promotor trap library* ab: Die *inserts* der einzelnen DFI-Klone zeigten oftmals dieselbe Fragmentlänge. Dies war zu erwarten, da unter einem bestimmten Wachstumsstimulus nur einige bakterielle Gene differentiell reguliert werden.

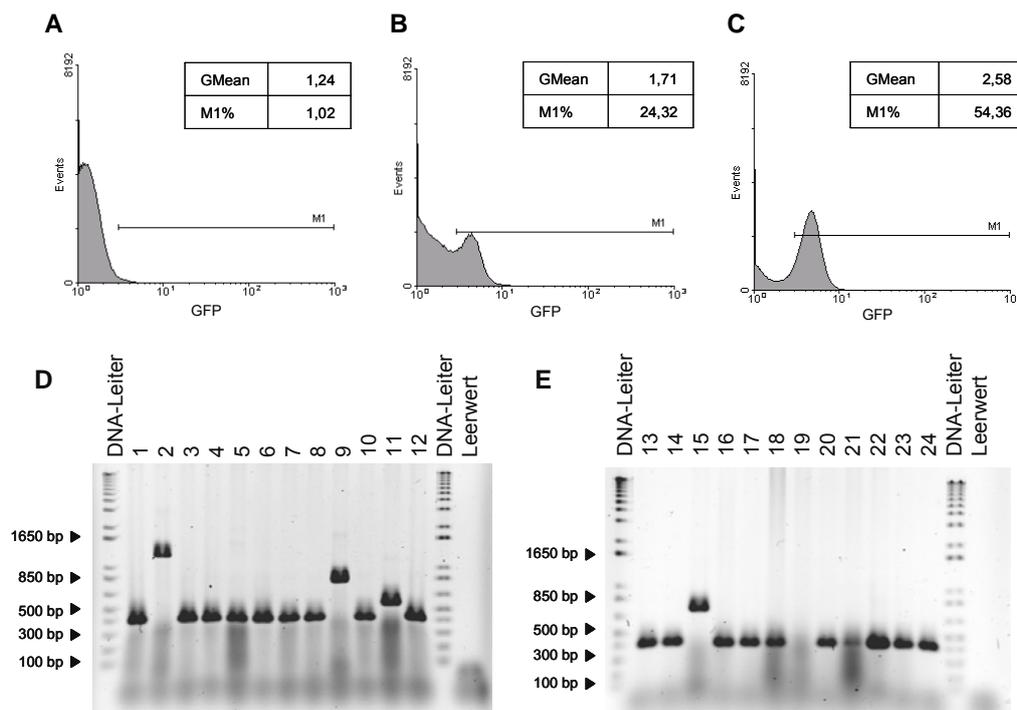


Abb. 3.4: Selektion GFP-positiver DFI-Klone unter Hitzestress-Bedingungen.

Histogramme: x-Achse: Fluoreszenz (GFP), y-Achse: Anzahl detektierter *events* (=Bakterien). GMean = mittlere Fluoreszenz, M1% = Verhältnis der *events* in *Gate* M1 zu allen *events*. Diagramme A, B und C: Anstieg der GFP-positiven Klone von 1% auf 54%. Diagramme D und E: *Colony-PCR*: Fragmentlängen der *inserts* einzelner DFI-Klone nach Hitzestress-Induktion. Erkennbar ist eine deutliche Abnahme der Heterogenität der *promotor trap library*, zahlreiche DFI-Klone verfügen über dieselbe Fragmentlänge des *inserts*.

Im Anschluss an die Fragmentlängen-Überprüfung via Colony-PCR wurden die *inserts* der Plasmide sequenziert und mittels BLAST-Algorithmus identifiziert. Insgesamt konnten 21 Gene ermittelt werden. **Tab. 3.2** zeigt die Liste der unter Hitzestress differentiell regulierten Gene. Hierbei ist ein deutlicher Anstieg der Gene aus Klasse 4 von 2% auf 29% zu beobachten, also der Gene, die in eine Stress-Antwort involviert sind. Die Zusammenfassung aller ermittelten Genprofile findet sich in **Kap. 3.6**.

Tab. 3.2: Liste der differentiell hochregulierten Gene unter Hitzestress-Induktion. Einzelheiten siehe **Kap. 3.6**, **Kap. 4.1** und Text. Klasseneinteilung: 1) Chemotaxis und Motilität; 2) Nährstoff-Aufnahme; 3) zentraler Metabolismus; 4) Anpassung an umweltbedingten Stress; 5) Regulation; 6) Zellwand und Zellhülle; 7) Virulenz; 8) Nukleinsäure-Metabolismus; FUN) Funktion unbekannt.

Gen	Kopien	Klasse	Funktion/Bemerkung	Referenz
<i>aroF</i>	1	3	DAHP-Synthetase	(Garner and Herrmann, 1985)
<i>cpsG</i>	2	6	Phosphomannomutase, benötigt für Colansäure-Biosynthese der kapsulären Polysaccharide	(Almiron-Roig <i>et al.</i> , 2000)
<i>cydC</i>	4	4	ATP-abhängiger Transport: Cytochrom <i>bd</i> Biosynthese, benötigt für Wachstum bei hohen Temperaturen	(Goldman <i>et al.</i> , 1996)
<i>fkpA</i>	2	4	Peptidyl-Prolyl-Cis/Trans-Isomerase (PPlase)	(Arie <i>et al.</i> , 2001)
<i>ispA</i>	1	3	Farnesyl-Pyrophosphat-Synthetase, Carotinoid-Biosynthese	(Ku <i>et al.</i> , 2005)
<i>lon</i>	1	4	Hitzeschock-Protease, gehört zum Hitzeschock-Regulon	(Fredriksson <i>et al.</i> , 2005)
<i>mtlA</i>	1	3	PTS-System, Kohlenhydrat-Katabolismus	(Honeyman and Curtiss, III, 2000)
<i>otsA</i>	1	4	Trehalose-Synthetase: Antwort auf osmotischen Stress	(Heithoff <i>et al.</i> , 1997)
<i>pflD</i>	1	3	Pyruvat-Format-Lyase, Kohlenhydrat-Katabolismus	(Zhu and Shimizu, 2004)
<i>ruvA</i>	1	8	Holliday-Junction-Helicase, DNA-Reparatur	(Beam <i>et al.</i> , 2002)
<i>slyD</i>	1	3	Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase	(Hottenrott <i>et al.</i> , 1997)
<i>xasA</i>	4	4	Glutamat-abhängige Säureresistenz	(Hersh <i>et al.</i> , 1996)
<i>yahK</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>ybdA</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	(Christoffersen <i>et al.</i> , 2001)
<i>ybhL</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>yciL</i>	2	8	Pseudouridin-Synthetase	(Del Campo <i>et al.</i> , 2001)
<i>ykfJ</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>ykgG</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	

<i>ynaF</i>	1	4	universelles Stress-Protein	(Rediers <i>et al.</i> , 2005)
<i>yggE</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>yraI</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	

3.4.2 Induktion: pH-Stress

Analog zu **Kap. 3.4.1** wurde die GFP-negative *sub-library* einem zweiten Stress-Stimulus unterzogen, nämlich pH-Stress (Wachstum bei pH=4,5).

Die Ergebnisse sind in **Abb. 3.5** dargestellt. Im Laufe der Versuchsreihe stieg der Anteil GFP-positiver Bakterien von ca. 7% auf ca. 43%.

Im Anschluss an die Anreicherung GFP-positiver Klone wurden diese sequenziert und mittels BLAST analysiert (s.o.). Hieraus ergaben sich verschiedene hochregulierte Gene, siehe **Tab. 3.3**. Auch im Laufe dieser Induktion war eine deutliche Abnahme der Heterogenität der *promotor trap library* zu beobachten. Einige DFI-Klone kamen mehrfach vor, hatten sich also während der FACS-Selektion durchgesetzt. Innerhalb der Klasseneinteilung konnte erneut eine Zunahme der Gene aus Klasse 4 (Stress-Antwort) von 2% auf 24% beobachtet werden.

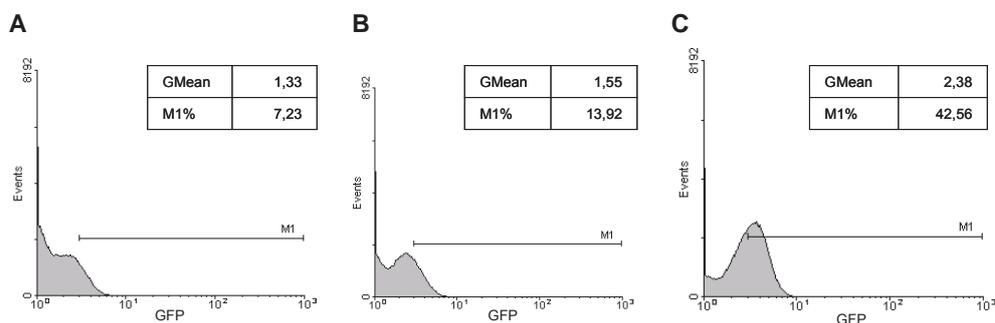


Abb. 3.5: Selektion GFP-positiver DFI-Klone unter pH-Stress-Induktion.

Fortsetzung nächste Seite.

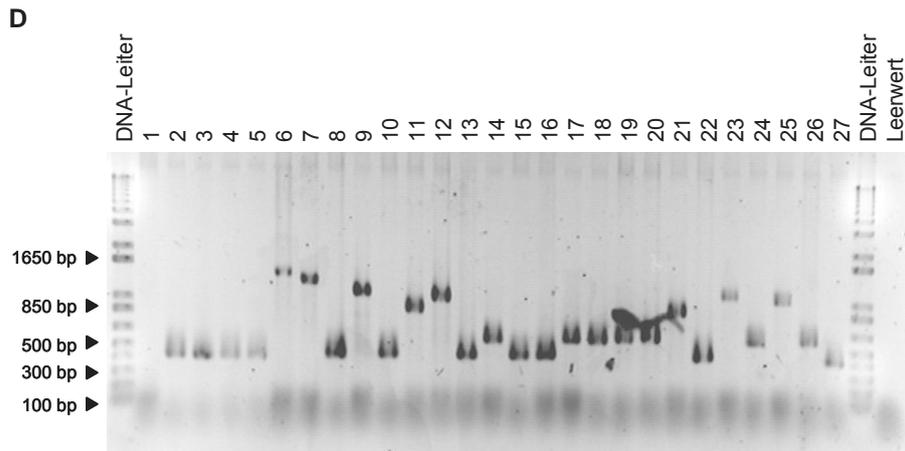


Abb. 3.5: Selektion GFP-positiver DFI-Klone unter pH-Stress-Induktion. Histogramme: x-Achse: Fluoreszenz (GFP), y-Achse: Anzahl detektierter *events* (=Bakterien). GMean = mittlere Fluoreszenz, M1% = Verhältnis der *events* in Gate M1 zu allen *events*. Diagramme A, B und C: Anstieg der GFP-positiven Klone von 7% auf 43%. Diagramm D: *Colony-PCR*: Fragmentlängen der *inserts* einzelner DFI-Klone nach pH-Induktion. Die Abnahme der Heterogenität der DFI-Klone ist schwächer als bei der Hitzestress-Induktion, dennoch finden sich mehrere *inserts* gleicher Länge.

Tab. 3.3: Liste der differentiell hochregulierten Gene unter pH-Stress-Induktion. Einzelheiten siehe **Kap. 3.6**, **Kap. 4.1** und Text. Klasseneinteilung: 1) Chemotaxis und Motilität; 2) Nährstoff-Aufnahme; 3) zentraler Metabolismus; 4) Anpassung an umweltbedingten Stress; 5) Regulation; 6) Zellwand und Zellhülle; 7) Virulenz; 8) Nukleinsäure-Metabolismus; FUN) Funktion unbekannt.

Gen	Kopien	Klasse	Funktion/Bemerkung	Referenz
<i>aroF</i>	3	3	DAHP-Synthetase	(Garner and Herrmann, 1985)
<i>cpsG</i>	3	6	Phosphomannomutase, benötigt für Colansäure-Biosynthese der kapsulären Polysaccharide	(Almiron-Roig <i>et al.</i> , 2000)
<i>cydC</i>	12	4	ATP-abhängiger Transport: Cytochrom <i>bd</i> Biosynthese, benötigt für Wachstum bei hohen Temperaturen	(Goldman <i>et al.</i> , 1996)
<i>fadH</i>	1	3	2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase, Fettsäure-Oxidation	(You <i>et al.</i> , 1989)
<i>fkpA</i>	3	4	Peptidyl-Prolyl-Cis/Trans-Isomerase (PPIase)	(Arie <i>et al.</i> , 2001)
<i>ispA</i>	3	3	Farnesyl-Pyrophosphat-Synthetase	(Ku <i>et al.</i> , 2005)
<i>lon</i>	5	4	Hitzeschock-K-Protein, gehört zum Hitzeschock-Regulon	(Fredriksson <i>et al.</i> , 2005)
<i>mtlA</i>	3	3	PTS-System, Kohlenhydrat-Kalabolismus	(Honeymann and Curtiss, III, 2000)
<i>otsA</i>	5	4	Trehalose-Synthetase: Antwort auf osmotischen Stress	(Heithoff <i>et al.</i> , 1997)

<i>parC</i>	1	8	DNA Topoisomerase IV, Untereinheit A	(Pfeiffer and Hiasa, 2004)
<i>pflD</i>	1	3	Pyruvat-Format-Lyase, Kohlenhydrat-Kalabolismus	(Zhu and Shimizu, 2004)
<i>rnd</i>	1	8	RNAse D, Exoribonuklease	(Zhang and Deutscher, 1989)
<i>xasA</i>	8	4	Glutamat-abhängige Säureresistenz	(Hersh <i>et al.</i> , 1996)
<i>yaeQ</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>yciL</i>	1	8	Pseudouridin-Synthetase	(Del Campo <i>et al.</i> , 2001)
<i>ybdA</i>	3	FUN		(Christoffersen <i>et al.</i> , 2001)
<i>yeaV</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>yfhK</i>	1	5	Histidin-Kinase	(Hagiwara <i>et al.</i> , 2004)
<i>ygeQ</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>yiaV</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>yqgF</i>	3	FUN	Funktion unbekannt	

Beim Vergleich der unter Hitzestress-Bedingungen hochregulierten Gene mit den unter pH-Stress hochregulierten Genen fällt auf, dass 12 der jeweils 21 identifizierten Gene identisch sind. Dies sind die Gene *aroF*, *cpsG*, *cydC*, *fkpA*, *ispA*, *lon*, *mtIA*, *otsA*, *pflD*, *xasA*, *yciL* und *ybdA*.

3.5 Induktionen: Ko-Kultur mit *B. vulgatus*

Mit der GFP-negativen Subpopulation der DFI- *promotor trap library* wurden drei *in-vitro*-Induktionen durchgeführt, die bei Ko-Inkubation mit *B. vulgatus* mpk vorhanden sind. Dies waren 1) Anaerobes Wachstum, 2) Ko-Kultur mit *B. vulgatus* mpk und 3) Wachstum im zuvor gewonnenen Überstand von *B. vulgatus* mpk.

3.5.1 Induktion: Anaerobes Wachstum

Abb. 3.6 zeigt die im Laufe der Anreicherung GFP-positiver DFI-Klone ermittelten Histogramme. Es konnte ein Anstieg der GFP-positiven Klone von <1% auf >7% beobachtet werden.

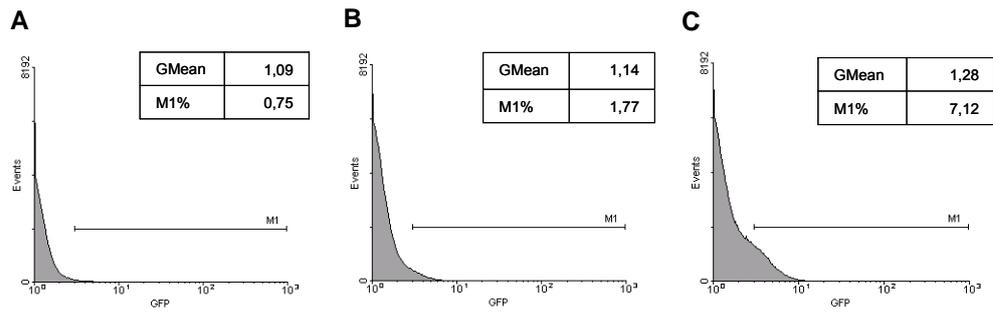


Abb. 3.6: Selektion GFP-positiver DFI-Klone unter anaeroben Wachstumsbedingungen.

Fortsetzung nächste Seite.

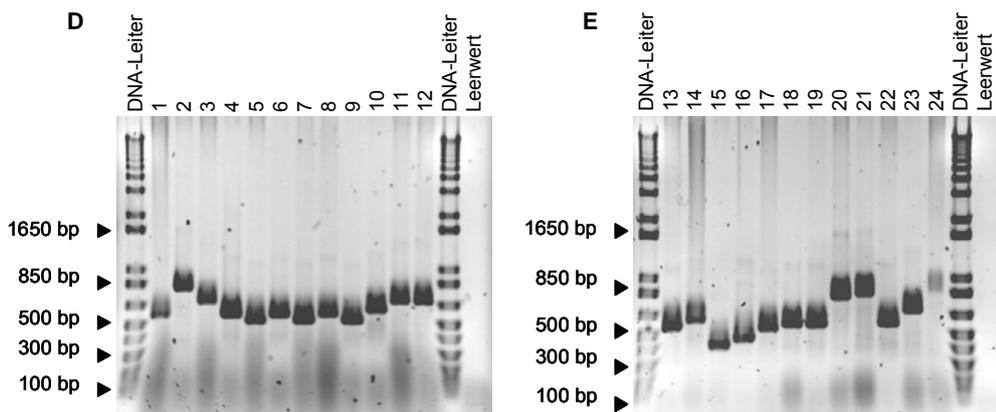


Abb. 3.6: Selektion GFP-positiver DFI-Klone unter anaeroben Wachstumsbedingungen.

Histogramme: x-Achse: Fluoreszenz (GFP), y-Achse: Anzahl detektierter *events* (=Bakterien). GMean = mittlere Fluoreszenz, M1% = Verhältnis der *events* in *Gate* M1 zu allen *events*. Diagramme A, B und C: Anstieg der GFP-positiven Klone von <1% auf 7%. Diagramme D und E: *Colony-PCR*: Fragmentlängen der *inserts* einzelner DFI-Klone nach Induktion.

Im Anschluss an die Amplifizierung GFP-positiver Klone wurden diese sequenziert und mittels BLAST-Algorithmus analysiert (s.o.). Die hierbei hochregulierten Gene sind in **Tab. 3.4** gelistet.

Tab. 3.4: Liste der differentiell hochregulierten Gene unter anaeroben Wachstumsbedingungen. Einzelheiten siehe **Kap. 3.6**, **Kap. 4.2** und Text. Klasseneinteilung: 1) Chemotaxis und Motilität; 2) Nährstoff-Aufnahme; 3) zentraler Metabolismus; 4) Anpassung an umweltbedingten Stress; 5) Regulation; 6) Zellwand und Zellhülle; 7) Virulenz; 8) Nukleinsäure-Metabolismus; FUN) Funktion unbekannt.

Gen	Kopien	Klasse	Funktion/Bemerkung	Referenz
<i>araJ</i>	2	3	Arabinose-induzierbares Gen, Kohlenhydrat-Stoffwechsel	(Lucht <i>et al.</i> , 1992)
<i>brnQ</i>	1	3	Leucin-Biosynthese	(Tauch <i>et al.</i> , 1998)
<i>fumB</i>	2	3	Fumarase B, anaerober Kohlenhydrat-Stoffwechsel	(Tseng <i>et al.</i> , 2001)
<i>hyfR</i>	1	5	Transkriptions-Aktivator für Format-Dehydrogenase, anaerober Stoffwechsel	(Self <i>et al.</i> , 2004)
<i>nrdB</i>	3	8	Ribonucleotid-Reduktase 1, β -Untereinheit	(Gallardo-Madueno <i>et al.</i> , 1998)
<i>oraA</i>	1	5	Inhibitor der RecA-Aktivität (RecA: DNA-Reparatur)	(Drees <i>et al.</i> , 2004)
<i>prsA</i>	3	3	Phosphoribosyl-Pyrophosphat Synthetase, Purin-Biosynthese	(Bower <i>et al.</i> , 1988)
<i>uup</i>	2	2	ABC (<i>ATP-binding cassette</i>)-Transportsystem	(Lai <i>et al.</i> , 2001)
<i>ybiT</i>	2	FUN	Funktion unbekannt	
<i>yejE</i>	2	FUN	Funktion unbekannt	

<i>yhgA</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>yjcQ</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>yneE</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>ypdG</i>	2	FUN	Funktion unbekannt	
<i>ypfG</i>	5	FUN	Funktion unbekannt	

3.5.2 Induktion: Ko-Kultur mit *B. vulgatus* mpk

Analog zu vorangegangenen Induktionen ist der Verlauf der Fluoreszenz der *promotor trap library* während dieser Induktion in **Abb. 3.7** dargestellt. Die Fraktion GFP-positiver Klone stieg von 2% auf >8% an.

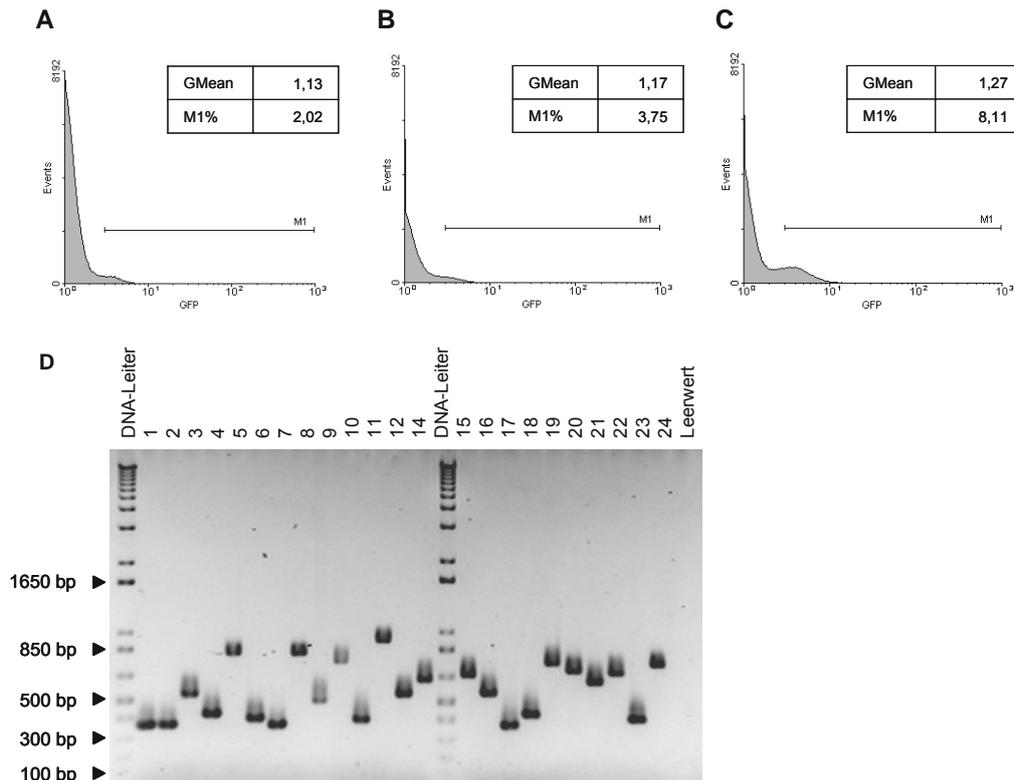


Abb. 3.7: Selektion GFP-positiver DFI-Klone während der Induktion „Ko-Kultur“. Histogramme: x-Achse: Fluoreszenz (GFP), y-Achse: Anzahl detektierter *events* (=Bakterien). GMean = mittlere Fluoreszenz, M1% = Verhältnis der *events* in *Gate* M1 zu allen *events*. Diagramme A, B und C: Anstieg der GFP-positiven Klone von 2% auf 8%. Diagramm D: *Colony-PCR*: Fragmentlängen der *inserts* einzelner DFI-Klone nach Induktion.

Im Anschluss an die Anreicherung GFP-positiver DFI-Klone wurden 90 DFI-Klone sequenziert (s.o.) und verschiedene regulierte Gene bestimmt. Die Liste dieser Gene findet sich in **Tab. 3.5**.

Tab. 3.5: Liste der differentiell hochregulierten Gene während der Induktion „Ko-Kultur“.

Einzelheiten siehe **Kap. 3.6**, **Kap. 4.2** und Text. Klasseneinteilung: 1) Chemotaxis und Motilität; 2) Nährstoff-Aufnahme; 3) zentraler Metabolismus; 4) Anpassung an umweltbedingten Stress; 5) Regulation; 6) Zellwand und Zellhülle; 7) Virulenz; 8) Nukleinsäure-Metabolismus; FUN) Funktion unbekannt.

Gen	Kopien	Klasse	Funktion/Bemerkung	Referenz
<i>acrR</i>	2	5	Regulator: Repressor des <i>acrAB</i> Operons	(Young and Miller, 1997)
<i>amyA</i>	1	3	Cytoplasmatische α -Amylase; Polysaccharid-Katabolismus	(Raha <i>et al.</i> , 1993)
<i>argD</i>	1	3	Arginin-Synthetase	(Weerasinghe <i>et al.</i> , 2006)
<i>asmA</i>	2	6	Lipopolysaccharid (LPS)-Biosynthese	(Deng and Misra, 1996)
<i>cpdB</i>	4	3 und 8	Bifunktionales Enzym: 1) 2'-3' zyklische Phosphodiesterase; 2) 3'-Nukleosidase	(Trulzsch <i>et al.</i> , 2001)
<i>csiE</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>cytR</i>	2	5	Repressor-Protein für Nukleosid- und Nukleotidstoffwechsel	(Kallipolitis and Valentin-Hansen, 2004)
<i>dacA</i>	4	6	D-Alanyl-D-Alanin-Carboxypeptidase, involviert in Biosynthese von Penicillin-Bindeprotein 5; Mureinbiosynthese	(Santos <i>et al.</i> , 2002)
<i>dapB</i>	4	3	Dihydrodipicolinat-Reduktase; Aminosäure-Biosynthese (Lysin)	(Maringanti and Imlay, 1999)
<i>dgt</i>	3	8	Desoxy-Guanosin-Triphosphat (dGTP) – Hydrolase	(Wurgler and Richardson, 1993)
<i>dcd</i>	10	8	Desoxy-Cytidin-Triphosphat (dCTP) – Deaminase	(Weiss and Wang, 1994)
<i>endA</i>	1	8	DNA-spezifische Endonuklease I	(Jekel and Wackernagel, 1994)
<i>fdoH</i>	1	3	β -Untereinheit der Format-Dehydrogenase; Nitrat-Stoffwechsel	(Benoit <i>et al.</i> , 1998)
<i>folX</i>	2	3	D-Erythro-7,8-Dihydroneopterin-Triphosphat-Epimerase; Tetrahydrofolat-Biosynthese	(Hausmann <i>et al.</i> , 1998)
<i>frwC</i>	3	FUN	Funktion unbekannt	
<i>ftsW</i>	2	6	membranständiges Protein, wird für die Zellteilung benötigt (stabilisiert FtsZ-Ring)	(Mercer and Weiss, 2002)
<i>glcC</i>	2	5	Transkriptionsfaktor für <i>glc</i> -Operon, Kohlenhydrat-Stoffwechsel	(Nunez <i>et al.</i> , 2001)
<i>gltB</i>	1	3	Glutamat-Synthetase, grosse Untereinheit	(Osorio <i>et al.</i> , 2005)
<i>groES</i>	4	3	Chaperon-Aktivität, Peptid- und Proteinfaltung	(Ranson <i>et al.</i> , 1998)
<i>hcaT</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>hipA</i>	4	4	vermittelt MDT (<i>multidrug tolerance</i>)	(Lewis, 2005)
<i>hypA</i>	2	3	[NiFe]-Hydrogenase	(Atanassova and Zamble, 2005)
<i>infB</i>	1	3	Initiationsfaktor IF2, benötigt für Translation	(Laursen <i>et al.</i> , 2002)
<i>mscK</i>	2	2	Mechanosensitiver Kanal, involviert in Osmoregulation	(Li <i>et al.</i> , 2002)

<i>miaB</i>	1	8	vermittelt Thiolierung von Adenin in tRNA	(Esberg <i>et al.</i> , 1999)
<i>mukB</i>	3	8	Condensin, B-Untereinheit; benötigt für Segregation	(Petrushenko <i>et al.</i> , 2006)
<i>murD</i>	5	6	periplasmatisches Enzym, benötigt für Peptidoglykan-Biosynthese (Murein)	(El Sherbeini <i>et al.</i> , 1998)
<i>nusG</i>	1	5	Transkriptionsfaktor; moduliert Elongation	(Richardson and Richardson, 2005)
<i>oraA</i>	1	5	Inhibitor der RecA-Aktivität (RecA: DNA-Reparatur)	(Drees <i>et al.</i> , 2004)
<i>paaF</i>	2	3	Enoyl-CoA-Hydratase, Phenylacetat-Katabolismus	(Ismail <i>et al.</i> , 2003)
<i>pepQ</i>	3	3	Prolin Dipeptidase	(Park <i>et al.</i> , 2004)
<i>pta</i>	2	3	Phosphat-Acetyltransferase, Intermediärstoffwechsel	(El Mansi <i>et al.</i> , 2006)
<i>ptsA</i>	4	3	PEP-protein phosphotransferase system enzyme I, involviert in Quorum Sensing	(Ren <i>et al.</i> , 2004)
<i>ribB</i>	2	3	FAD Synthetase	(Gerdes <i>et al.</i> , 2002)
<i>rne</i>	7	8	RNase E, RNA Katabolismus	(Zhan <i>et al.</i> , 2004)
<i>sdhB</i>	3	3	Succinat-Dehydrogenase, katalytische Untereinheit ; Anaerober Energie-Metabolismus	(Nam <i>et al.</i> , 2005)
<i>sodC</i>	3	4 und 7	Superoxid Dismutase, involviert in Abwehrmechanismus gegen oxidativen <i>burst</i> des Wirtes im Rahmen einer Infektion	(Uzzau <i>et al.</i> , 2002)
<i>ssuB</i>	3	2	ABC (<i>ATP-binding cassette</i>)-Transportsystem	(van, Jr. <i>et al.</i> , 1999)
<i>tolC</i>	3	4 und 7	Bifunktionales membranständiges Protein: 1) allgemeine Efflux-Pumpe für Antibiotika; 2) α -Hämolysin-Sekretion	(Husain <i>et al.</i> , 2004)
<i>ubiF</i>	1	3	Ubichinon-Biosynthese ; Atmungsketten-Protein	(Kwon <i>et al.</i> , 2000)
<i>uspE</i>	4	4	<i>universal stress protein E</i>	(Nachin <i>et al.</i> , 2005)
<i>ybiW</i>	2	FUN	Funktion unbekannt	
<i>ycfD</i>	3	FUN	Funktion unbekannt	
<i>ycfV</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>ydqD</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>ydqE</i>	4	FUN	Funktion unbekannt	
<i>ydiQ</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>yeeJ</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>yeiA</i>	3	FUN	Funktion unbekannt	
<i>yfgC</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>ygaW</i>	2	FUN	Funktion unbekannt	
<i>ygbA</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>yghJ</i>	10	FUN	Funktion unbekannt	
<i>yhbU</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>yhcP</i>	2	4 und 7	allgemeine Efflux-Pumpe für Antibiotika	(Van Dyk <i>et al.</i> , 2004)
<i>yhhW</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>yhjJ</i>	2	FUN	Funktion unbekannt	
<i>yigN</i>	2	FUN	Funktion unbekannt	
<i>yjfC</i>	2	FUN	Funktion unbekannt	
<i>yndD</i>	4	FUN	Funktion unbekannt	

3.5.3 Induktion: Wachstum im Überstand von *B. vulgatus* mpk

Die dritte durchgeführte Induktion war das Wachstum der DFI-promotor *trap library* im zuvor gewonnenen Überstand von *B. vulgatus* mpk. Die entstandenen

FACS-Histogramme zeigen einen Anstieg der GFP-positiven Klone von <1% auf >7%, die unterschiedlich langen Plasmid-*inserts* einzelner Klone sind in

Abb. 3.8 dargestellt.

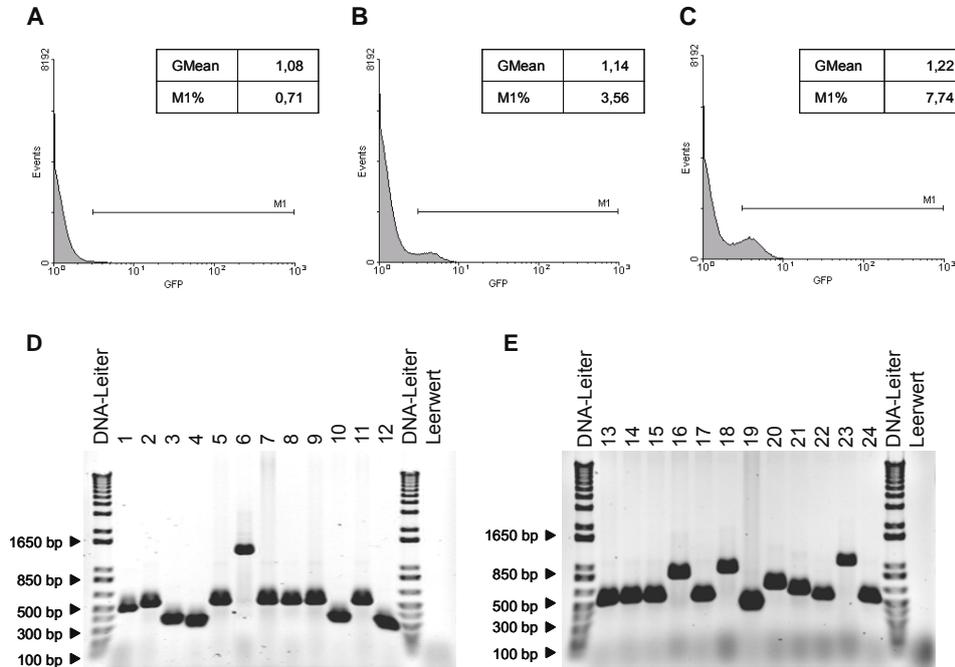


Abb. 3.8: Selektion GFP-positiver DFI-Klone während der Induktion „Wachstum im Überstand von *B. vulgatus* mpk“. Histogramme: x-Achse: Fluoreszenz (GFP), y-Achse: Anzahl detektierter *events* (=Bakterien). *GMean* = mittlere Fluoreszenz, *M1%* = Verhältnis der *events* in *Gate* M1 zu allen *events*. Diagramme A, B und C: Anstieg der GFP-positiven Klone von <1% auf 8%. Diagramme D und E: *Colony-PCR*: Fragmentlängen der *inserts* einzelner DFI-Klone nach Induktion.

Auch nach dieser Induktion wurden GFP-positive Klone sequenziert und mittels BLAST-Algorithmus identifiziert. Dabei konnten verschiedene differentiell hochregulierte Gene identifiziert werden, die in **Tab. 3.6** aufgelistet sind.

Tab. 3.6: Liste der differentiell hochregulierten Gene während des Wachstums im Überstand von *B. vulgatus* mpk. Einzelheiten siehe **Kap. 3.6**, **Kap. 4.2** und Text. Klasseneinteilung: 1) Chemotaxis und Motilität; 2) Nährstoff-Aufnahme; 3) zentraler Metabolismus; 4) Anpassung an umweltbedingten Stress; 5) Regulation; 6) Zellwand und Zellhülle; 7) Virulenz; 8) Nukleinsäure-Metabolismus; FUN) Funktion unbekannt.

Gen	Kopien	Klasse	Funktion/Bemerkung	Referenz
<i>cydC</i>	1	4	ATP-abhängiger Transport: Cytochrom <i>bd</i> Biosynthese, benötigt für Wachstum bei hohen Temperaturen	(Goldman <i>et al.</i> , 1996)
<i>malT</i>	1	5	Positiver Regulator des mal-Regulons; Maltose/Maltodextrin Transporter	(Dippel and Boos, 2005)
<i>mfd</i>	1	4	Mfd-Protein: <i>transcription repair coupling factor</i> ; DNA-Reparatur v.a. nach UV-Schaden	(Wrzesinski <i>et al.</i> , 2005)
<i>nei</i>	1	8	Endonuclease V	(Golan <i>et al.</i> , 2005)
<i>oraA</i>	4	5	Inhibitor der RecA-Aktivität (RecA: DNA-Reparatur)	(Drees <i>et al.</i> , 2004)
<i>pepQ</i>	1	3	Prolin Dipeptidase	(Park <i>et al.</i> , 2004)
<i>sgaH</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>treB</i>	1	2	Trehalose-spezifischer Transporter	(Uhland <i>et al.</i> , 2000)
<i>yabK</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>yaiP</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>ygaA</i>	1	5	Transkriptions-Regulator; anaerobe NO-Reduktion	(Gardner <i>et al.</i> , 2002)
<i>yhfV</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>yhgA</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>yhhZ</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>yidP</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>yjcQ</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>yneB</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	
<i>yqeB</i>	1	FUN	Funktion unbekannt	

3.6 Profile der Genexpression aller durchgeführten Induktionen

Abb. 3.9 zeigt die Einteilung der Gene aller durchgeführten Induktionen in die 9 Gruppen (Rediers *et al.*, 2005).

Auffällig ist, dass bei jedem Versuch die Fraktion der Gene am größten war, deren Funktion zur Erstellung dieser Arbeit noch unbekannt war (FUN-Gene). Dieses Phänomen ist auch von Rediers *et al.* (Rediers *et al.*, 2005) beschrieben, die ebenfalls bis zu 35% Gene der FUN-Klasse fanden.

In den Stress-Induktionen stellen die Klasse-4-Gene (Stressantwort) die zweitgrößte Fraktion dar. Es erfolgte ein Anstieg von 2% auf 29% (Hitzestress) bzw. 24% (pH-Stress).

Bei Ko-Inkubation mit *B. vulgatus* oder bei anaeroben Bedingungen bildete jeweils die Klasse 3 (zentraler Metabolismus) die zahlenmäßig zweitgrößte Gruppe. Es wurde jeweils ein Anstieg von 21% auf 27% verzeichnet.

Weiterhin stieg der Anteil an Klasse-5-Gene (Regulation) in der Induktion „Anaerobes Wachstum“ von 9% auf 13%. Während der Induktion „Wachstum im Überstand“ stieg dieser Anteil von 9% auf 17%. Diese Anstiege verdeutlichen die Anpassung von *E. coli* an das Vorhandensein eines Konkurrenten und veränderte metabolische Bedingungen.

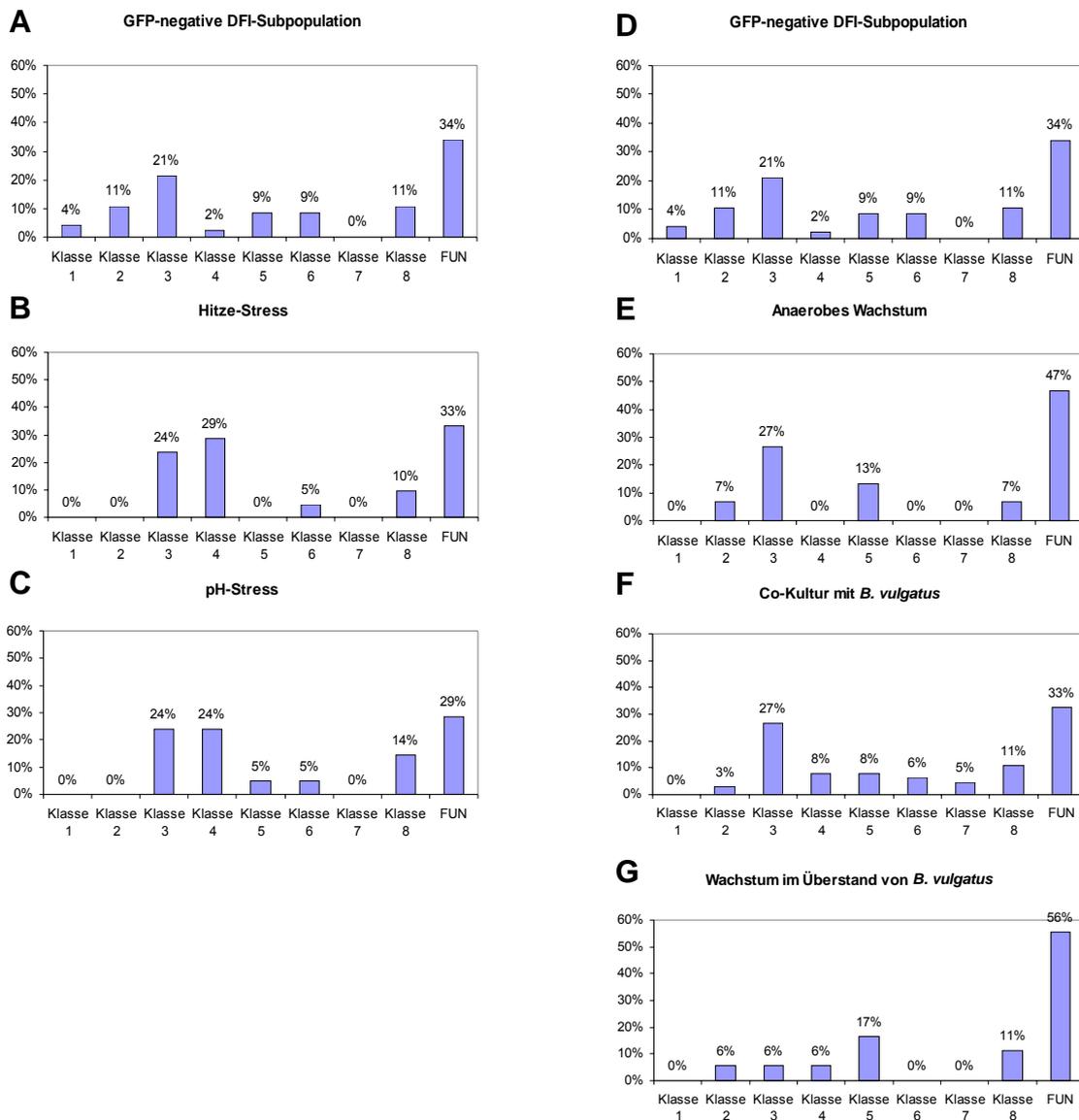


Abb. 3.9: Genexpressionsprofile aller durchgeführten DFI-Induktionen. Prozentuale Verteilung der hochregulierten Gene im Kategoriensystem. Klasseneinteilung: 1) Chemotaxis und Motilität; 2) Nährstoff-Aufnahme; 3) zentraler Metabolismus; 4) Anpassung an umweltbedingten Stress; 5) Regulation; 6) Zellwand und Zellhülle; 7) Virulenz; 8) Nukleinsäure-Metabolismus; FUN) Funktion unbekannt.

Diag. A: GFP-negative DFI-Subpopulation; 46 Gene wurden kategorisiert. Diag. B: Induktion „Hitze-Stress“; 21 Gene wurden kategorisiert. Diag. C: „pH-Stress“; 21 Gene wurden kategorisiert. Beachte den hohen Anteil an Klasse-4-Genen in B und C (29% bzw. 24%) Diag. D: GFP-negative DFI-Subpopulation; 46 Gene wurden kategorisiert. Diag. E: Induktion „Anaerobes Wachstum“, 15 Gene wurden kategorisiert. Diag. F: Induktion „Ko-Kultur“, 60 Gene wurden kategorisiert. Diag. G: Induktion „Wachstum im Überstand“; 18 Gene wurden kategorisiert.

4 Diskussion

Vor dem Hintergrund der bisher ungeklärten Ätiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen erscheint eine Intensivierung der Forschungsbemühungen, die sich mit der Entstehung dieser Krankheiten beschäftigen, sinnvoll. Da aus Sicht der medizinischen Mikrobiologie der Mikroflora des Darmes eine besondere Bedeutung bei der Krankheitsentstehung zukommt, sind tiefergehende Einblicke in die genetische Regulation potentiell pathogener Keime von besonderem Interesse. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte eine Methodik etabliert werden, die zum besseren Verständnis der Genregulation von *E. coli* mpk beitragen soll, einem im Modell der IL2^{-/-}-Maus kolitogenen Keim. Es handelte sich hierbei um Differentielle Fluoreszenz-Induktion (DFI), eine Methode, mit deren Hilfe sich *in vivo* differentiell hochregulierte Gene identifizieren lassen.

Nach der Klonierung der DFI-*promotor trap library* wurden verschiedene *in vitro*-Induktionen durchgeführt, um die Anwendung der Methodik zu etablieren und die Funktionsfähigkeit der *promotor trap library* zu validieren. Dabei wurden zum einen Induktionen durchgeführt, die Stressbedingungen für das Bakterium darstellten und zum anderen Induktionen, die während der Ko-Kultur mit *B. vulgatus* auftreten.

4.1 Induktionen, die Stressbedingungen simulieren

Um zu überprüfen, ob definierte Umweltbedingungen (Hitze-/pH-Stress) auch tatsächlich Gene induzieren, von denen bekannt ist, dass sie in die bakterielle Anpassung an Stress involviert sind, wurde die *promotor trap library* „Hitzeschock“ und „pH-Stress“ ausgesetzt. Diese Induktionen führten zur Hochregulation bekannter *stress response*-Gene wie z. B. *cydC*, *fkpA* und *lon*. Im Vergleich zum Ausgangswert konnte eine Zunahme dieser *stress response*-Gene um den Faktor 13 beobachtet werden (von 2% auf 24% bzw. 29%).

Interessanterweise waren in diesen voneinander unabhängig durchgeführten Versuchsreihen 12 der jeweils 21 Gene identisch. Dies waren *aroF*, *cpsG*, *cydC*, *fkpA*, *ispA*, *lon*, *mtlA*, *otsA*, *pflD*, *xasA*, *ybdA* und *yciL*.

Diejenigen *stress response*-Gene, die bei der Hitzestress-Induktion hochreguliert wurden, lauteten *cydC*, *fkpA*, *lon*, *otsA*, *xasA* und *ynaF*. Für die Induktion „pH-Stress“ waren dies *cydC*, *fkpA*, *lon*, *otsA*, *xasA*. Nur das Stress-Antwortgen *ynaF* wurde nicht bei „pH-Stress“ erfasst.

Die Gene *aroF*, *cpsG*, *ispA*, *mtlA*, *pflD*, *ybdA* und *yciL* wurden ebenfalls in beiden Versuchsreihen hochreguliert, von diesen Genen ist jedoch bisher nicht bekannt, dass sie direkt an einer Anpassung an Umweltstress-Bedingungen beteiligt sind.

Im folgenden sollen diese oben genannten Gene noch einmal im einzelnen besprochen werden, bevor eine zusammenfassende Beurteilung der Stress-Induktionen erfolgt (vgl. **Tab. 3.2** und **Tab. 3.3**).

Bekannte Stress-Antwort-Gene:

cydC kodiert für einen ATP-abhängigen Transporter, der für die Cytochrom-Synthese benötigt wird. Goldman et al. konnten zeigen, dass *knockout*-Mutanten von *E. coli* K12, die nicht über dieses Gen verfügten, eine Überempfindlichkeit gegenüber Wachstum bei hohen Temperaturen zeigten (Goldman et al., 1996).

Das Genprodukt von *fkpA* ist eine periplasmatische Hitzeschock-Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase mit bekannter Chaperon-Aktivität, FkpA ist also an der Proteinfaltung beteiligt (Arie et al., 2001).

lon kodiert für eine Protease des *heat shock regulons*, das Protein Lon vermittelt eine Abwehr von durch Karbonylierungsreaktionen entstehenden Zellschaden (Fredriksson et al., 2005).

otsA ist das Gen für die osmoregulatorische Trehalose Synthetase (*ots*), die an der Anpassungsreaktion auf osmotischen Stress beteiligt ist (Heithoff et al., 1997).

Die Abkürzung des Gens *xasA* steht für *extreme acid sensitivity*, das Genprodukt von *xasA* verhindert die cytoplasmatische Acidifizierung von *E. coli* (Hersh *et al.*, 1996).

ynaF wurde nur bei der Hitzestress-Induktion gefunden, nicht jedoch bei der pH-Stress-Induktion. *ynaF* wurde von Rediers *et al.* als universelles Hitzestress-Protein klassifiziert (Rediers *et al.*, 2005).

Fasst man die Ergebnisse der Differentiellen Fluoreszenz-Induktion unter Stress-Bedingungen zusammen, so lassen sich folgende Aussagen treffen:

- (i) In Anlehnung an das Kategoriensystem von Rediers *et al.* zur Klassifizierung hochregulierter Gene wurden die in den Stress-Induktionen identifizierten Gene in neun Klassen eingeteilt (Rediers *et al.*, 2005). Von besonderem Interesse war hierbei die Fraktion der Klasse-4-Gene (*stress response*-Gene). Es zeigte sich, dass ihr Anteil bei der Hitzestress-Induktion ca. 29% (6 von 21 Genen) und bei der pH-Stress-Induktion ca. 24% (5 von 21 Genen) betrug (siehe **Abb. 3.9**), was im Vergleich zum Ausgangswert (2%) einen Anstieg um den Faktor 13 bedeutet. Ein solch hoher Anteil an *stress response*-Genen wurde in keiner anderen Versuchsanordnung beobachtet und wird als Erfolg hinsichtlich der Durchführbarkeit von DFI gewertet.

Eine Ausbeute von ca. 30% richtig-positiver Ergebnisse scheint zwar auf den ersten Blick wenig zu sein, im Vergleich zu anderen Autoren, die mit DFI arbeiteten, liegt dies jedoch im üblichen Rahmen (Valdivia and Falkow, 1996; Valdivia and Falkow, 1997; Bartilson *et al.*, 2001; Marra *et al.*, 2002b; Schneider *et al.*, 2002; Barker *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 2001). Nicht zu vergessen ist, dass sich gerade unter den Genen der FUN-Klasse noch einige interessante Gene befinden könnten (siehe **Kap. 4.3**).

- (ii) Von 21 hochregulierten Genen waren in den beiden Stress-Induktionen 12 identisch. 5 dieser 12 identischen Gene sind bekanntermassen in die bakterielle Adaptation an Stress involviert und

wurden in beiden Versuchsreihen identifiziert. Einige sind zwar nur im Zusammenhang mit Säureresistenz beschrieben (*xasA*), werden jedoch auch unter Hitzestress-Bedingungen hochreguliert. Andere Gene sind eher assoziiert mit Hitzestress (*cydC*, *lon*), werden aber genauso unter pH-Stress vermehrt exprimiert. Dies ist durchaus verständlich, da eine Adaptation an einen Stress-Stimulus oftmals ein ganzes *set* von Genen aktiviert.

Auch die Tatsache, dass die 5 Stress-Gene, die jeweils in beiden Versuchen hochreguliert wurden, identisch waren, unterstreicht die Validität der *promotor trap library*.

- (iii) In beiden Versuchsansätzen wurden weitere Gene bestimmt, von denen jedoch bisher nicht bekannt ist, dass sie im Rahmen einer Stress-Adaptation hochreguliert werden. Die meisten dieser Gene gehören zu den Klasse-3-Genen, sind also im zentralen Metabolismus involviert. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass sich auch hinter diesen Genen noch einige der bakteriellen Stressantwort befinden, dies könnte in weitergehenden Experimenten untersucht werden.
- (iv) Die jeweils größte Fraktion wurde in beiden Versuchsansätzen von den Genen der Klasse FUN gestellt (33% bzw. 29%), ihre Funktion war zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit noch unbekannt (siehe **Abb. 3.9**). Auch diese Beobachtung wurde von den oben genannten Autoren gemacht. Gerade unter diesen Genen können sich jedoch noch einige Gene der Stress-Anpassung verbergen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die erfolgreiche Identifizierung bekannter bakterieller *stress response*-Gene die Anwendbarkeit der Methodik DFI und die Validität der *promotor trap library* gezeigt werden konnte.

4.2 Induktionen, die unter Ko-Kultur mit *B. vulgatus* auftreten

Nach der Identifizierung mehrerer Stress-Gene wurden mit der DFI-*promotor-trap-library* 3 *in vitro*-Induktionen durchgeführt, die die Bedingungen bei Ko-

Inkubation mit *B. vulgatus* darstellten. Dies waren i) anaerobes Wachstum, ii) Ko-Kultur mit *B. vulgatus* und iii) Wachstum im Überstand von *B. vulgatus*. Diese Kolonisierungs-Induktionen orientierten sich an Bedingungen, die ein Bakterium in Ko-Kultur, also z. B. bei der Besiedlung des Darmes vorfindet.

Beim Vergleich der Genexpressionsprofile von *E. coli* mpk in Ko-Kultur mit *B. vulgatus* mit den unter Umweltstress-Bedingungen induzierten Genen (siehe **Abb. 3.9**) ist der größte Unterschied der geringere Anteil an Klasse-4-Genen (Stress-Gene). Dies war zu erwarten, da der Kolonisierungsprozess im Darm eine andere Adaptation erfordert als die Anpassung an Umweltstress. Dies wird bestätigt durch die Aktivierung von Genen des zentralen Stoffwechsels, die für die Anpassung von *E. coli* mpk in Ko-Kultur mit *B. vulgatus* benötigt werden.

Die Erwartung an die Induktion unter anaeroben Bedingungen war, dass Gene erfasst würden, die am anaeroben Stoffwechsel beteiligt sind. Diese Erwartung konnte leider nicht erfüllt werden: Von den 15 identifizierten Genen waren nur 2 unmittelbar beschrieben als Gene mit Funktion im anaeroben Bereich (*fumB* und *hyfR*, siehe **Tab. 3.4**). Ein ähnlich großer Anteil konnte während allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Induktionen beobachtet werden. Der Anteil an Genen mit bisher unbekanntem Funktionen (FUN-Gene) betrug ca. 47% (7 von 15 Genen), war also relativ hoch. Außerdem fiel während der Induktion „anaerobes Wachstum“ die Identifizierung des Gens *oraA* auf. Dieses Gen wurde ebenfalls bei Ko-Inkubation mit *B. vulgatus* bzw. Kultur im Überstand von *B. vulgatus* hochreguliert. *OraA* dient als Regulator der *recA*-Aktivität. Das bakterielle RecA-Protein trägt die Funktion, die Integrität des Genoms aufrechtzuerhalten (Drees *et al.*, 2004). Die Tatsache, dass die Genaktivität von *oraA* in allen 3 *in vitro*-Kolonisierungsversuchen vorgefunden wurde, weist darauf hin, dass *OraA* bzw. *RecA* eine wichtige Rolle bei der Adaptation von *E. coli* mpk bei Ko-Inkubation mit *B. vulgatus* spielen könnte.

Beim Vergleich des Genexpressionsprofils der Induktion „Ko-Kultur“ mit dem der Negativkontrolle fällt ebenso auf den ersten Blick kein bedeutender Unterschied auf. Auch in diesem Versuch stellte die Gruppe der FUN-Gene den größten Anteil (ca. 33%), gefolgt von Genen der Klasse 3 (27%, zentraler Metabolismus).

Neben dem oben genannten Gen *oraA* wurde noch ein zweites Gen identifiziert, das in mehreren Versuchen hochreguliert wurde. Hierbei handelt es sich um *pepQ*. Dieses Gen konnte sowohl bei Ko-Inkubation mit *B. vulgatus* als auch bei

Kultur im Überstand von *B. vulgatus* erfasst werden. *PepQ* kodiert das Enzym Prolin-Dipeptidase (Park *et al.*, 2004), ist also am zentralen Stoffwechsel beteiligt.

Ein weiteres interessantes hochreguliertes Gen während der Ko-Inkubation mit *B. vulgatus* ist *ptsA*. Sein Genprodukt ist das PEP-Protein-Phosphotransferase-System-Enzym I, von dem bekannt ist, dass es in den Prozess des *Quorum Sensing* involviert ist (Ren *et al.*, 2004). *Quorum Sensing* beschreibt die Fähigkeit von Bakterien, innerhalb einer Spezies miteinander zu kommunizieren. Dies geschieht über hormon-ähnliche organische Komponenten, die auch *auto-inducers* genannt werden (Reading and Sperandio, 2006). Auch die Genaktivität von *ptsA* könnte bei der Besetzung einer Wachstumsnische von Bedeutung sein.

Das Genexpressionsprofil der Kultivierung im Überstand von *B. vulgatus* weist mit 56% erneut einen sehr großen Anteil bisher unbekannter Gene (FUN-Gene) auf.

Fasst man die Ergebnisse der *in vitro*-Versuche zusammen, die die Genregulation von *E. coli* mpk bei Ko-Inkubation mit *B. vulgatus* untersuchten, so muss man feststellen, dass die Ergebnisse dieser Versuche nicht in dem Maße richtungsweisend waren, wie es bei den Stress-Induktionen der Fall war. Bei der Betrachtung der Genexpressionsprofile (9 Gen-Klassen) zeigte sich jedoch eine Verschiebung hin zu Klasse-3-Genen (zentraler Metabolismus) und zu Klasse-5-Genen (Regulation).

Es konnten auch während der Ko-Inkubation mit *B. vulgatus* mehrere Gene von großem Interesse identifiziert werden (*fumB*, *hyfR*, *oraA* bzw. *recA*, *pepQ* und insbesondere *ptsA*).

4.3 DFI: Vorteile und Nachteile

Vor dem Hintergrund der Notwendigkeit, die Genexpression von Bakterien nicht nur unter definierten Laborbedingungen, sondern auch unter komplexen ökologischen Nischen-Bedingungen zu analysieren, wurde die Methodik DFI

entwickelt. Von Interesse dabei kann zum Beispiel die *in vivo*-Genexpression bei bakterieller Kolonisierung eines Darmabschnittes sein, aber auch bei Infektion anderer Organe (Lunge, Milz etc.). Somit existiert mit DFI nun eine relativ neue genetische Technik, mit deren Hilfe Erkenntnisse auf dem Bereich bakterieller funktioneller Genomik gewonnen werden können.

Ein grosser Vorteil von DFI ist das sehr schnelle, mit dem FACS durchführbare *screening* großer Bakterienpopulationen auf hochregulierte Gene unter definierten Induktionsbedingungen (Strauss and Falkow, 1997). Das Festlegen einer bestimmten Fluoreszenzschwelle am FACS ermöglicht außerdem die Vermeidung von Beurteilungsfehlern durch den Experimentator, wie sie zum Beispiel bei der Fluoreszenzmikroskopie stattfinden können (Rediers *et al.*, 2005).

Die große Stärke von DFI liegt zweifelsfrei in der Möglichkeit, diese Technologie auch unter komplexesten *in vivo*-Bedingungen anwenden zu können. Gerade die Infektion einzelner Organe im Mausmodell konnte einige bisher unbekannte Virulenzgene aufzeigen (Valdivia and Falkow, 1996) (Valdivia and Falkow, 1997) (Bartilson *et al.*, 2001) (Marra *et al.*, 2002a) (Marra *et al.*, 2002b) (Barker *et al.*, 1998) (Wilson *et al.*, 2001).

In der Tatsache, dass DFI einige wenige potentielle Kandidaten-Gene liefert, liegt sowohl eine Stärke als auch eine Schwäche. Vor allem im Vergleich mit *microarrays*, die auf RNA-Ebene eine Hoch- bzw. Herunterregulation jedes einzelnen Gens eines Organismus liefern, ist das Ergebnis eines DFI-Versuches wesentlich überschaubarer. Gleichzeitig birgt diese höhere Übersichtlichkeit jedoch das Risiko, dass einige hochregulierte Gene übersehen werden können (Rediers *et al.*, 2005).

Ebenso werden herunterregulierte Gene nicht erfasst, das Reportermolekül GFP reagiert nur auf Hochregulation. Auch post-transkriptionale Regulationen in der Genexpression werden von DFI nicht erkannt.

Der hohe Anteil an Genen, deren Funktion bisher noch unbekannt ist, erscheint ernüchternd. Doch gerade in diesen Genen (Klasse FUN) steckt großes Potential. Unter diesen Genen könnten sich bakterielle Faktoren befinden, die bei der Adaptation an pH, Hitze *etc.* eine bisher unbekannte Rolle spielen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass DFI trotz einiger Nachteile großes Potential zur Identifizierung differentiell regulierter Gene bietet, und zwar insbesondere im *in vivo*-Bereich. Bisher konnten auf diese Weise bereits einige Virulenzgene entdeckt werden. Die steigende Anzahl von Veröffentlichungen, die DFI anwenden, lässt hoffen, dass auf diese Weise das Verständnis bakterieller Pathogenitätsmechanismen weiter steigen wird.

4.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass DFI eine einfach anwendbare und funktionierende Methodik zur Analyse differentieller Genexpression in *E. coli* mpk ist. Unter unterschiedlichen *in vitro*-Bedingungen konnten zahlreiche differentiell hochregulierte bakterielle Gene identifiziert werden.

Jedoch lassen sich die komplexen Bedingungen, denen Bakterien bei der Besiedlung von Körperoberflächen bzw. bei der Infektion von Organen ausgesetzt sind, mit Hilfe von *in vitro*-Versuchen, wie z. B. Zellkulturen, nur unzureichend nachahmen. Genau hierin liegt die Stärke von DFI, denn prinzipiell ist diese Methodik ohne größere Modifikationen auch unter *in vivo*-Bedingungen anwendbar.

Für die Forschung im Bereich der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen heißt dies konkret, dass die DFI-*promotor trap library* zur oralen Infektion von Mäusen verwendet werden kann. Die Induktion der *promotor trap library* durch diese *in vivo*-Bedingungen kann zur Identifizierung bakterieller Faktoren führen, die zur Anpassung des Bakteriums an Umweltbedingungen benötigt werden. Im Anschluss an die Darmpassage können die DFI-Klone aus den Faeces wiedergewonnen und daraufhin im FACS analysiert und hinsichtlich GFP-

positiver Subpopulationen amplifiziert werden, analog zu den in dieser Arbeit durchgeführten Induktionen. Diesbezügliche Vorarbeiten werden zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit innerhalb der Arbeitsgruppe bereits durchgeführt. Diese Versuchsanordnung ist denkbar mit Mäusen, die komplett unter keimfreien Bedingungen gezüchtet werden und somit über keinerlei Darmflora verfügen. Ferner wäre auch denkbar, dass man mit *B. vulgatus* mpk monokolonisierte Mäuse mit DFI-Bakterien oral infiziert. In dieser Versuchsanordnung wäre nicht nur die Besiedlung des Darmes abgedeckt, sondern auch die kompetitiven Bedingungen, die sich aus der Ko-Existenz mehrerer Bakterien im selben Lebensraum ergeben. In jedem Fall bietet sich das in der Einleitung (**Kap. 1.2**) erwähnte IL2^{-/-}-Mausmodell an, in dem die *E. coli* mpk-vermittelte Kolitisinduktion gut erforscht ist (Waidmann *et al.*, 2003). Die *in vivo*-Induktion der DFI- *promotor trap library* im Mausmodell lässt hoffen, dass sich unter den hochregulierten Genen einige befinden, die als an der Kolitsentstehung beteiligt identifiziert werden können. Somit könnten neue Einblicke in die Ätiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen gewonnen werden. Eventuell ließe sich sogar ein bakterieller Faktor identifizieren, der im genetisch prädisponierten Individuum zur Induktion einer Kolitis beiträgt.

5 Zusammenfassung

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Etablierung der Methodik DFI (Differenzielle Fluoreszenz-Induktion). Hierbei handelt es sich um eine Technik der funktionellen Genomik, die Einblicke in die bakterielle Genregulation unter jeweils definierten äußeren Bedingungen ermöglicht.

Im ersten Schritt wurde die *DFI-promotor trap library* kloniert, hierbei entstanden 15.000 DFI-Klone mit jeweils unterschiedlichen Promotor-Fusionen direkt *upstream* des in dieser Technik verwendeten Reportermoleküls GFP (*green fluorescent protein*).

Bevor die eigentlichen Induktionen durchgeführt wurden, wurde mittels FACS eine GFP-negative DFI-Subpopulation erstellt, um die konstitutionell GFP-exprimierenden Klone gleich zu Beginn der Versuche auszusortieren und somit die Rate der falsch-positiven Ergebnisse zu minimieren.

In sämtlichen sich daran anschließenden Induktionen wurden die GFP-positiven DFI-Klone mittels FACS amplifiziert, insgesamt wurde die Kombination von Induktion / Amplifikation pro Versuch dreimal wiederholt, um die GFP-positiven Klone anzureichern.

Zur eigentlichen Überprüfung der Methodik wurden zwei verschiedene Stress-Induktionen gewählt (Hitzestress und pH-Stress). Die Erwartung der erfolgreichen Identifizierung mehrerer bekannter Stress-Gene konnte hierbei erfüllt werden. Bei der Klassifizierung der identifizierten hochregulierten Gene war ein deutlicher Anstieg der Gruppe von Genen zu beobachten, die in die Anpassung an Umweltstress involviert sind (Klasse-4-Gene), und zwar von 2% auf 24% bzw. 29%. Insbesondere konnten folgende Gene der bakteriellen Stress-Antwort identifiziert werden: *cydC*, *fkpA*, *lon*, *otsA*, *xasA* und *ynaF*.

In weiterführenden Versuchen wurden Umweltbedingungen während der Ko-Kultur mit *B. vulgatus* untersucht (anaerobes Wachstum, Ko-Kultur mit *B. vulgatus*, Wachstum im Überstand von *B. vulgatus*). Während dieser Versuche wurden folgende Gene erfolgreich identifiziert: *fumB*, *hyfR*, *oraA* bzw. *recA*, *pepQ* und *ptsA*.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass DFI die Möglichkeit bietet, einen Überblick über die Genexpression eines Bakteriums unter definierten äußeren Bedingungen zu gewinnen. Insbesondere die Anwendbarkeit der Methodik im *in vivo*-Bereich erscheint sehr vielversprechend, da die komplexen Zusammenhänge der Genregulation im Rahmen von Infektionen oder Kolonisierungsprozessen nicht komplett im Labor nachgeahmt werden können.

Fortführende Forschungsbemühungen, die auf diese Arbeit aufbauen, sollen zum besseren Verständnis der bakteriellen Mechanismen führen, die zur Kollitogenität von *Escherichia coli* mpk beitragen und somit ein größeres Verständnis chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ermöglichen.

6 Literaturverzeichnis

1. Abouhamad,W.N., Manson,M.D., 1994. The dipeptide permease of *Escherichia coli* closely resembles other bacterial transport systems and shows growth-phase-dependent expression. *Mol. Microbiol.* 14, 1077-1092.
2. Allali,N., Afif,H., Couturier,M., Van Melderen,L., 2002. The highly conserved TldD and TldE proteins of *Escherichia coli* are involved in microcin B17 processing and in CcdA degradation. *J Bacteriol* 184, 3224-3231.
3. Almiron-Roig,E., Mulholland,F., Gasson,M.J., Griffin,A.M., 2000. The complete *cps* gene cluster from *Streptococcus thermophilus* NCFB 2393 involved in the biosynthesis of a new exopolysaccharide. *Microbiology* 146 (Pt 11), 2793-2802.
4. Altschul,S.F., Gish,W., Miller,W., Myers,E.W., Lipman,D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol. Biol.* 215, 403-410.
5. Andres,P.G., Friedman,L.S., 1999. Epidemiology and the natural course of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 28, 255-81, vii.
6. Andrews,S.C., Berks,B.C., McClay,J., Ambler,A., Quail,M.A., Golby,P., Guest,J.R., 1997. A 12-cistron *Escherichia coli* operon (*hyf*) encoding a putative proton-translocating formate hydrogenlyase system. *Microbiology* 143 (Pt 11), 3633-3647.
7. Arie,J.P., Sassoon,N., Betton,J.M., 2001. Chaperone function of FkpA, a heat shock prolyl isomerase, in the periplasm of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 39, 199-210.
8. Atanassova,A., Zamble,D.B., 2005. *Escherichia coli* HypA is a zinc metalloprotein with a weak affinity for nickel. *J Bacteriol* 187, 4689-4697.
9. Barker,L.P., Brooks,D.M., Small,P.L., 1998. The identification of *Mycobacterium marinum* genes differentially expressed in macrophage phagosomes using promoter fusions to green fluorescent protein. *Mol. Microbiol.* 29, 1167-1177.
10. Bartilson,M., Marra,A., Christine,J., Asundi,J.S., Schneider,W.P., Hromockyj,A.E., 2001. Differential fluorescence induction reveals

- Streptococcus pneumoniae loci regulated by competence stimulatory peptide. *Mol. Microbiol.* 39, 126-135.
11. Beam, C.E., Saveson, C.J., Lovett, S.T., 2002. Role for radA/sms in recombination intermediate processing in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184, 6836-6844.
 12. Benoit, S., Abaibou, H., Mandrand-Berthelot, M.A., 1998. Topological analysis of the aerobic membrane-bound formate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180, 6625-6634.
 13. Berg, R.D., 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* 4, 430-435.
 14. Binder, V., 1998. Genetic epidemiology in inflammatory bowel disease. *Dig. Dis.* 16, 351-355.
 15. Birnboim, H.C., Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.
 16. Bossemeyer, D., Borchard, A., Dosch, D.C., Helmer, G.C., Epstein, W., Booth, I.R., Bakker, E.P., 1989. K⁺-transport protein TrkA of *Escherichia coli* is a peripheral membrane protein that requires other trk gene products for attachment to the cytoplasmic membrane. *J Biol. Chem.* 264, 16403-16410.
 17. Bouma, G., Strober, W., 2003. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 521-533.
 18. Bower, S.G., Hove-Jensen, B., Switzer, R.L., 1988. Structure of the gene encoding phosphoribosylpyrophosphate synthetase (prsA) in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 170, 3243-3248.
 19. Burkart, M., Toguchi, A., Harshey, R.M., 1998. The chemotaxis system, but not chemotaxis, is essential for swarming motility in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 2568-2573.
 20. Cassatella, M.A., 1995. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol. Today* 16, 21-26.
 21. Christoffersen, C.A., Brickman, T.J., Hook-Barnard, I., McIntosh, M.A., 2001. Regulatory architecture of the iron-regulated fepD-ybdA bidirectional promoter region in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183, 2059-2070.
 22. Colletti, T., 2004. IBD--recognition, diagnosis, therapeutics. *JAAPA.* 17, 16-4.

23. Cormack,B.P., Valdivia,R.H., Falkow,S., 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173, 33-38.
24. Del Campo,M., Kaya,Y., Ofengand,J., 2001. Identification and site of action of the remaining four putative pseudouridine synthases in *Escherichia coli*. *RNA*. 7, 1603-1615.
25. Deng,M., Misra,R., 1996. Examination of AsmA and its effect on the assembly of *Escherichia coli* outer membrane proteins. *Mol. Microbiol.* 21, 605-612.
26. Dippel,R., Boos,W., 2005. The maltodextrin system of *Escherichia coli*: metabolism and transport. *J Bacteriol* 187, 8322-8331.
27. Drees,J.C., Lusetti,S.L., Cox,M.M., 2004. Inhibition of RecA protein by the *Escherichia coli* RecX protein: modulation by the RecA C terminus and filament functional state. *J Biol. Chem.* 279, 52991-52997.
28. El Mansi,M., Cozzone,A.J., Shiloach,J., Eikmanns,B.J., 2006. Control of carbon flux through enzymes of central and intermediary metabolism during growth of *Escherichia coli* on acetate. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 173-179.
29. El Sherbeini,M., Geissler,W.M., Pittman,J., Yuan,X., Wong,K.K., Pompliano,D.L., 1998. Cloning and expression of *Staphylococcus aureus* and *Treptococcus pyogenes* murD genes encoding uridine diphosphate N-acetylmuramoyl-L-alanine:D-glutamate ligases. *Gene* 210, 117-125.
30. Esberg,B., Leung,H.C., Tsui,H.C., Bjork,G.R., Winkler,M.E., 1999. Identification of the miaB gene, involved in methylthiolation of isopentenylated A37 derivatives in the tRNA of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181, 7256-7265.
31. Farrell,R.J., LaMont,J.T., 2002. Microbial factors in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 31, 41-62.
32. Fredriksson,A., Ballesteros,M., Dukan,S., Nystrom,T., 2005. Defense against protein carbonylation by DnaK/DnaJ and proteases of the heat shock regulon. *J Bacteriol* 187, 4207-4213.
33. Fuss,I.J., Heller,F., Boirivant,M., Leon,F., Yoshida,M., Fichtner-Feigl,S., Yang,Z., Exley,M., Kitani,A., Blumberg,R.S., Mannon,P., Strober,W., 2004. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin. Invest* 113, 1490-1497.
34. Gallardo-Madueno,R., Leal,J.F., Dorado,G., Holmgren,A., Lopez-Barea,J., Pueyo,C., 1998. In vivo transcription of nrdAB operon and of grxA and fpg genes is triggered in *Escherichia coli* lacking both

- thioredoxin and glutaredoxin 1 or thioredoxin and glutathione, respectively. *J Biol. Chem.* 273, 18382-18388.
35. Gardner,A.M., Helmick,R.A., Gardner,P.R., 2002. Flavorubredoxin, an inducible catalyst for nitric oxide reduction and detoxification in *Escherichia coli*. *J Biol. Chem.* 277, 8172-8177.
 36. Garner,C.C., Herrmann,K.M., 1985. Operator mutations of the *Escherichia coli* *aroF* gene. *J Biol. Chem.* 260, 3820-3825.
 37. Gerdes,S.Y., Scholle,M.D., D'Souza,M., Bernal,A., Baev,M.V., Farrell,M., Kurnasov,O.V., Daugherty,M.D., Mseeh,F., Polanuyer,B.M., Campbell,J.W., Anantha,S., Shatalin,K.Y., Chowdhury,S.A., Fonstein,M.Y., Osterman,A.L., 2002. From genetic footprinting to antimicrobial drug targets: examples in cofactor biosynthetic pathways. *J Bacteriol* 184, 4555-4572.
 38. Gifford,C.M., Wallace,S.S., 2000. The genes encoding endonuclease VIII and endonuclease III in *Escherichia coli* are transcribed as the terminal genes in operons. *Nucleic Acids Res.* 28, 762-769.
 39. Golan,G., Zharkov,D.O., Feinberg,H., Fernandes,A.S., Zaika,E.I., Kycia,J.H., Grollman,A.P., Shoham,G., 2005. Structure of the uncomplexed DNA repair enzyme endonuclease VIII indicates significant interdomain flexibility. *Nucleic Acids Res.* 33, 5006-5016.
 40. Goldman,B.S., Gabbert,K.K., Kranz,R.G., 1996. The temperature-sensitive growth and survival phenotypes of *Escherichia coli* *cydDC* and *cydAB* strains are due to deficiencies in cytochrome *bd* and are corrected by exogenous catalase and reducing agents. *J Bacteriol* 178, 6348-6351.
 41. Hagiwara,D., Yamashino,T., Mizuno,T., 2004. A Genome-wide view of the *Escherichia coli* BasS-BasR two-component system implicated in iron-responses. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 1758-1767.
 42. Hanauer,S.B., 2006. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm. Bowel. Dis.* 12 Suppl 1, S3-S9.
 43. Haussmann,C., Rohdich,F., Schmidt,E., Bacher,A., Richter,G., 1998. Biosynthesis of pteridines in *Escherichia coli*. Structural and mechanistic similarity of dihydroneopterin-triphosphate epimerase and dihydroneopterin aldolase. *J Biol. Chem.* 273, 17418-17424.
 44. Heithoff,D.M., Conner,C.P., Hanna,P.C., Julio,S.M., Hentschel,U., Mahan,M.J., 1997. Bacterial infection as assessed by in vivo gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 934-939.

45. Hersh,B.M., Farooq,F.T., Barstad,D.N., Blankenhorn,D.L., Slonczewski,J.L., 1996. A glutamate-dependent acid resistance gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 178, 3978-3981.
46. Hiniker,A., Bardwell,J.C., 2004. In vivo substrate specificity of periplasmic disulfide oxidoreductases. *J Biol. Chem.* 279, 12967-12973.
47. Honeyman,A.L., Curtiss,R., III, 2000. The mannitol-specific enzyme II (*mtlA*) gene and the *mtlR* gene of the PTS of *Streptococcus mutans*. *Microbiology* 146 (Pt 7), 1565-1572.
48. Hottenrott,S., Schumann,T., Pluckthun,A., Fischer,G., Rahfeld,J.U., 1997. The *Escherichia coli* SlyD is a metal ion-regulated peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase. *J Biol. Chem.* 272, 15697-15701.
49. Hountondji,C., Beauvallet,C., Dessen,P., Hoang-Naudin,C., Schmitter,J.M., Pernollet,J.C., Blanquet,S., 2000. Valyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli* MALDI-MS identification of the binding sites for L-valine or for noncognate amino acids upon qualitative comparative labeling with reactive amino-acid analogs. *Eur. J Biochem.* 267, 4789-4798.
50. Hugot,J.P., Chamaillard,M., Zouali,H., Lesage,S., Cezard,J.P., Belaiche,J., Almer,S., Tysk,C., O'Morain,C.A., Gassull,M., Binder,V., Finkel,Y., Cortot,A., Modigliani,R., Laurent-Puig,P., Gower-Rousseau,C., Macry,J., Colombel,J.F., Sahbatou,M., Thomas,G., 2001. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 599-603.
51. Hui,F.M., Morrison,D.A., 1991. Genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: nucleotide sequence analysis shows *comA*, a gene required for competence induction, to be a member of the bacterial ATP-dependent transport protein family. *J Bacteriol* 173, 372-381.
52. Husain,F., Humbard,M., Misra,R., 2004. Interaction between the TolC and AcrA proteins of a multidrug efflux system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186, 8533-8536.
53. Isaacs,K.L., Lewis,J.D., Sandborn,W.J., Sands,B.E., Targan,S.R., 2005. State of the art: IBD therapy and clinical trials in IBD. *Inflamm. Bowel. Dis.* 11 Suppl 1, S3-12.
54. Ismail,W., El Said,M.M., Wanner,B.L., Datsenko,K.A., Eisenreich,W., Rohdich,F., Bacher,A., Fuchs,G., 2003. Functional genomics by NMR spectroscopy. Phenylacetate catabolism in *Escherichia coli*. *Eur. J Biochem.* 270, 3047-3054.

55. Jekel,M., Wackernagel,W., 1994. Location of the endA gene coding for endonuclease I on the physical map of the Escherichia coli K-12 chromosome. *J Bacteriol* 176, 1550-1551.
56. Kallipolitis,B.H., Valentin-Hansen,P., 2004. A role for the interdomain linker region of the Escherichia coli CytR regulator in repression complex formation. *J Mol. Biol.* 342, 1-7.
57. Kim,S.K., Makino,K., Amemura,M., Shinagawa,H., Nakata,A., 1993. Molecular analysis of the phoH gene, belonging to the phosphate regulon in Escherichia coli. *J Bacteriol* 175, 1316-1324.
58. Kollas,A.K., Duin,E.C., Eberl,M., Altincicek,B., Hintz,M., Reichenberg,A., Henschker,D., Henne,A., Steinbrecher,I., Ostrovsky,D.N., Hedderich,R., Beck,E., Jomaa,H., Wiesner,J., 2002. Functional characterization of GcpE, an essential enzyme of the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *FEBS Lett* 532, 432-436.
59. Ku,B., Jeong,J.C., Mijts,B.N., Schmidt-Dannert,C., Dordick,J.S., 2005. Preparation, characterization, and optimization of an in vitro C30 carotenoid pathway. *Appl Environ. Microbiol.* 71, 6578-6583.
60. Kuroda,A., Murphy,H., Cashel,M., Kornberg,A., 1997. Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in Escherichia coli. *J Biol. Chem.* 272, 21240-21243.
61. Kwon,O., Kotsakis,A., Meganathan,R., 2000. Ubiquinone (coenzyme Q) biosynthesis in Escherichia coli: identification of the ubiF gene. *FEMS Microbiol. Lett* 186, 157-161.
62. Lai,Y.C., Peng,H.L., Chang,H.Y., 2001. Identification of genes induced in vivo during Klebsiella pneumoniae CG43 infection. *Infect. Immun.* 69, 7140-7145.
63. Laursen,B.S., de,A.S.S., Hedegaard,J., Moreno,J.M., Mortensen,K.K., Sperling-Petersen,H.U., 2002. Structural requirements of the mRNA for intracistronic translation initiation of the enterobacterial infB gene. *Genes Cells* 7, 901-910.
64. Lavasani,L.S., Hiasa,H., 2001. A ParE-ParC fusion protein is a functional topoisomerase. *Biochemistry* 40, 8438-8443.
65. Lee,A.K., Falkow,S., 1998. Constitutive and inducible green fluorescent protein expression in Bartonella henselae. *Infect. Immun.* 66, 3964-3967.
66. Lenski,R.E., Sniegowski,P.D., 1995. "Adaptive mutation": the debate goes on. *Science* 269, 285-288.

67. Lewis, K., 2005. Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Mosc.)* 70, 267-274.
68. Ley, R.E., Backhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C.A., Knight, R.D., Gordon, J.I., 2005. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 11070-11075.
69. Li, Y., Moe, P.C., Chandrasekaran, S., Booth, I.R., Blount, P., 2002. Ionic regulation of MscK, a mechanosensitive channel from *Escherichia coli*. *EMBO J* 21, 5323-5330.
70. Lindberg, E., Tysk, C., Andersson, K., Jarnerot, G., 1988. Smoking and inflammatory bowel disease. A case control study. *Gut* 29, 352-357.
71. Lobočka, M., Hennig, J., Wild, J., Kłopotowski, T., 1994. Organization and expression of the *Escherichia coli* K-12 *dad* operon encoding the smaller subunit of D-amino acid dehydrogenase and the catabolic alanine racemase. *J Bacteriol* 176, 1500-1510.
72. Loftus, E.V., Jr., Sandborn, W.J., 2002. Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 31, 1-20.
73. Lucht, J.M., Boos, W., Bremer, E., 1992. Alignment of genes from the 9-minute region (*araJ* to *tsx*) of the *Escherichia coli* K-12 linkage map to the physical map. *J Bacteriol* 174, 1709-1710.
74. Maringanti, S., Imlay, J.A., 1999. An intracellular iron chelator pleiotropically suppresses enzymatic and growth defects of superoxide dismutase-deficient *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181, 3792-3802.
75. Marra, A., Asundi, J., Bartilson, M., Lawson, S., Fang, F., Christine, J., Wiesner, C., Brigham, D., Schneider, W.P., Hromockyj, A.E., 2002a. Differential fluorescence induction analysis of *Streptococcus pneumoniae* identifies genes involved in pathogenesis. *Infect. Immun.* 70, 1422-1433.
76. Marra, A., Lawson, S., Asundi, J.S., Brigham, D., Hromockyj, A.E., 2002b. In vivo characterization of the *psa* genes from *Streptococcus pneumoniae* in multiple models of infection. *Microbiology* 148, 1483-1491.
77. Mercer, K.L., Weiss, D.S., 2002. The *Escherichia coli* cell division protein FtsW is required to recruit its cognate transpeptidase, FtsI (PBP3), to the division site. *J Bacteriol* 184, 904-912.
78. Moriya, H., Kasai, H., Isono, K., 1995. Cloning and characterization of the *hrpA* gene in the *terC* region of *Escherichia coli* that is highly similar to the DEAH family RNA helicase genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 23, 595-598.

79. Nachin,L., Nannmark,U., Nystrom,T., 2005. Differential roles of the universal stress proteins of *Escherichia coli* in oxidative stress resistance, adhesion, and motility. *J Bacteriol* 187, 6265-6272.
80. Nam,T.W., Park,Y.H., Jeong,H.J., Ryu,S., Seok,Y.J., 2005. Glucose repression of the *Escherichia coli* *sdhCDAB* operon, revisited: regulation by the CRP*cAMP complex. *Nucleic Acids Res.* 33, 6712-6722.
81. Nunez,M.F., Pellicer,M.T., Badia,J., Aguilar,J., Baldoma,L., 2001. The gene *yghK* linked to the *glc* operon of *Escherichia coli* encodes a permease for glycolate that is structurally and functionally similar to L-lactate permease. *Microbiology* 147, 1069-1077.
82. Nyunoya,H., Lusty,C.J., 1983. The *carB* gene of *Escherichia coli*: a duplicated gene coding for the large subunit of carbamoyl-phosphate synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 80, 4629-4633.
83. Ogura,Y., Bonen,D.K., Inohara,N., Nicolae,D.L., Chen,F.F., Ramos,R., Britton,H., Moran,T., Karaliuskas,R., Duerr,R.H., Achkar,J.P., Brant,S.R., Bayless,T.M., Kirschner,B.S., Hanauer,S.B., Nunez,G., Cho,J.H., 2001. A frameshift mutation in *NOD2* associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 603-606.
84. Osorio,C.G., Crawford,J.A., Michalski,J., Martinez-Wilson,H., Kaper,J.B., Camilli,A., 2005. Second-generation recombination-based in vivo expression technology for large-scale screening for *Vibrio cholerae* genes induced during infection of the mouse small intestine. *Infect. Immun.* 73, 972-980.
85. Park,M.S., Hill,C.M., Li,Y., Hardy,R.K., Khanna,H., Khang,Y.H., Raushel,F.M., 2004. Catalytic properties of the *PepQ* prolidase from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 429, 224-230.
86. Persson,P.G., Ahlbom,A., Hellers,G., 1992. Diet and inflammatory bowel disease: a case-control study. *Epidemiology* 3, 47-52.
87. Petrushenko,Z.M., Lai,C.H., Rai,R., Rybenkov,V.V., 2006. DNA reshaping by *MukB*. Right-handed knotting, left-handed supercoiling. *J Biol. Chem.* 281, 4606-4615.
88. Pfeiffer,E.S., Hiasa,H., 2004. Replacement of *ParC* alpha4 helix with that of *GyrA* increases the stability and cytotoxicity of topoisomerase IV-quinolone-DNA ternary complexes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 608-611.
89. Pla,J., Rojo,F., de Pedro,M.A., Ayala,J.A., 1990. Cloning and expression of the *ponB* gene, encoding penicillin-binding protein 1B of *Escherichia coli*, in heterologous systems. *J Bacteriol* 172, 4448-4455.

90. Poock,S.R., Leach,E.R., Moir,J.W., Cole,J.A., Richardson,D.J., 2002. Respiratory detoxification of nitric oxide by the cytochrome c nitrite reductase of *Escherichia coli*. *J Biol. Chem.* 277, 23664-23669.
91. Raha,M., Kihara,M., Kawagishi,I., Macnab,R.M., 1993. Organization of the *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* chromosomes between flagellar regions IIIa and IIIb, including a large non-coding region. *J Gen. Microbiol.* 139, 1401-1407.
92. Ranson,N.A., White,H.E., Saibil,H.R., 1998. Chaperonins. *Biochem. J* 333 (Pt 2), 233-242.
93. Rawls,J.F., Mahowald,M.A., Ley,R.E., Gordon,J.I., 2006. Reciprocal gut microbiota transplants from zebrafish and mice to germ-free recipients reveal host habitat selection. *Cell* 127, 423-433.
94. Ray,W.K., Larson,T.J., 2004. Application of AgaR repressor and dominant repressor variants for verification of a gene cluster involved in N-acetylgalactosamine metabolism in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* 51, 813-826.
95. Reading,N.C., Sperandio,V., 2006. Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiol. Lett* 254, 1-11.
96. Rediers,H., Rainey,P.B., Vanderleyden,J., De Mot,R., 2005. Unraveling the secret lives of bacteria: use of in vivo expression technology and differential fluorescence induction promoter traps as tools for exploring niche-specific gene expression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69, 217-261.
97. Ren,D., Bedzyk,L.A., Ye,R.W., Thomas,S.M., Wood,T.K., 2004. Stationary-phase quorum-sensing signals affect autoinducer-2 and gene expression in *Escherichia coli*. *Appl Environ. Microbiol.* 70, 2038-2043.
98. Richardson,L.V., Richardson,J.P., 2005. Identification of a structural element that is essential for two functions of transcription factor NusG. *Biochim. Biophys. Acta* 1729, 135-140.
99. Robichon,C., Vidal-Ingigliardi,D., Pugsley,A.P., 2005. Depletion of apolipoprotein N-acyltransferase causes mislocalization of outer membrane lipoproteins in *Escherichia coli*. *J Biol. Chem.* 280, 974-983.
100. Sadlack,B., Merz,H., Schorle,H., Schimpl,A., Feller,A.C., Horak,I., 1993. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* 75, 253-261.
101. Saiki,R.K., Gelfand,D.H., Stoffel,S., Scharf,S.J., Higuchi,R., Horn,G.T., Mullis,K.B., Erlich,H.A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.

102. Santos, J.M., Lobo, M., Matos, A.P., de Pedro, M.A., Arraiano, C.M., 2002. The gene *bolA* regulates *dacA* (PBP5), *dacC* (PBP6) and *ampC* (AmpC), promoting normal morphology in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 45, 1729-1740.
103. Satsangi, J., Morecroft, J., Shah, N.B., Nimmo, E., 2003. Genetics of inflammatory bowel disease: scientific and clinical implications. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 17, 3-18.
104. Schlegel, A., Danot, O., Richet, E., Ferenci, T., Boos, W., 2002. The N terminus of the *Escherichia coli* transcription activator MalT is the domain of interaction with MalY. *J Bacteriol* 184, 3069-3077.
105. Schneider, W.P., Ho, S.K., Christine, J., Yao, M., Marra, A., Hromockyj, A.E., 2002. Virulence gene identification by differential fluorescence induction analysis of *Staphylococcus aureus* gene expression during infection-simulating culture. *Infect. Immun.* 70, 1326-1333.
106. Schultz, M., Tonkonogy, S.L., Sellon, R.K., Veltkamp, C., Godfrey, V.L., Kwon, J., Grenther, W.B., Balish, E., Horak, I., Sartor, R.B., 1999a. IL-2-deficient mice raised under germfree conditions develop delayed mild focal intestinal inflammation. *Am. J Physiol* 276, G1461-G1472.
107. Schultz, M., Tonkonogy, S.L., Sellon, R.K., Veltkamp, C., Godfrey, V.L., Kwon, J., Grenther, W.B., Balish, E., Horak, I., Sartor, R.B., 1999b. IL-2-deficient mice raised under germfree conditions develop delayed mild focal intestinal inflammation. *Am. J Physiol.* 276, G1461-G1472.
108. Self, W.T., Hasona, A., Shanmugam, K.T., 2004. Expression and regulation of a silent operon, *hyf*, coding for hydrogenase 4 isoenzyme in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186, 580-587.
109. Sellon, R.K., Tonkonogy, S., Schultz, M., Dieleman, L.A., Grenther, W., Balish, E., Rennick, D.M., Sartor, R.B., 1998. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect. Immun.* 66, 5224-5231.
110. Simon, G.L., Gorbach, S.L., 1984. Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology* 86, 174-193.
111. Sonnenberg, A., 1990a. Occupational distribution of inflammatory bowel disease among German employees. *Gut* 31, 1037-1040.
112. Sonnenberg, A., 1990b. Occupational mortality of inflammatory bowel disease. *Digestion* 46, 10-18.
113. Strauss, E.J., Falkow, S., 1997. Microbial pathogenesis: genomics and beyond. *Science* 276, 707-712.

114. Suarez,A., Guttler,A., Stratz,M., Staendner,L.H., Timmis,K.N., Guzman,C.A., 1997. Green fluorescent protein-based reporter systems for genetic analysis of bacteria including monocopy applications. *Gene* 196, 69-74.
115. Tauch,A., Hermann,T., Burkovski,A., Kramer,R., Puhler,A., Kalinowski,J., 1998. Isoleucine uptake in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 is directed by the *brnQ* gene product. *Arch. Microbiol.* 169, 303-312.
116. Trulzsch,K., Roggenkamp,A., Pelludat,C., Rakin,A., Jacobi,C., Heesemann,J., 2001. Cloning and characterization of the gene encoding periplasmic 2',3'-cyclic phosphodiesterase of *Yersinia enterocolitica* O:8. *Microbiology* 147, 203-213.
117. Tseng,C.P., Yu,C.C., Lin,H.H., Chang,C.Y., Kuo,J.T., 2001. Oxygen- and growth rate-dependent regulation of *Escherichia coli* fumarase (FumA, FumB, and FumC) activity. *J Bacteriol* 183, 461-467.
118. Uhland,K., Mondigler,M., Spiess,C., Prinz,W., Ehrmann,M., 2000. Determinants of translocation and folding of TreF, a trehalase of *Escherichia coli*. *J Biol. Chem.* 275, 23439-23445.
119. Utsumi,R., Horie,T., Katoh,A., Kaino,Y., Tanabe,H., Noda,M., 1996. Isolation and characterization of the heat-responsive genes in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60, 309-315.
120. Uzzau,S., Bossi,L., Figueroa-Bossi,N., 2002. Differential accumulation of *Salmonella*[Cu, Zn] superoxide dismutases SodCI and SodCII in intracellular bacteria: correlation with their relative contribution to pathogenicity. *Mol. Microbiol.* 46, 147-156.
121. Valdivia,R.H., Falkow,S., 1996. Bacterial genetics by flow cytometry: rapid isolation of *Salmonella typhimurium* acid-inducible promoters by differential fluorescence induction. *Mol. Microbiol.* 22, 367-378.
122. Valdivia,R.H., Falkow,S., 1997. Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells. *Science* 277, 2007-2011.
123. Van Dyk,T.K., Templeton,L.J., Cantera,K.A., Sharpe,P.L., Sariaslani,F.S., 2004. Characterization of the *Escherichia coli* AaeAB efflux pump: a metabolic relief valve? *J Bacteriol* 186, 7196-7204.
124. van,D.P., Jr., Iwanicka-Nowicka,R., Bykowski,T., Hryniewicz,M.M., Leisinger,T., 1999. The *Escherichia coli* *ssuEADCB* gene cluster is required for the utilization of sulfur from aliphatic sulfonates and is regulated by the transcriptional activator Cbl. *J Biol. Chem.* 274, 29358-29365.
125. Waidmann,M., Bechtold,O., Frick,J.S., Lehr,H.A., Schubert,S., Dobrindt,U., Loeffler,J., Bohn,E., Autenrieth,I.B., 2003. *Bacteroides*

- vulgatus protects against *Escherichia coli*-induced colitis in gnotobiotic interleukin-2-deficient mice. *Gastroenterology* 125, 162-177.
126. Weerasinghe, J.P., Dong, T., Schertzberg, M.R., Kirchhof, M.G., Sun, Y., Schellhorn, H.E., 2006. Stationary phase expression of the arginine biosynthetic operon *argCBH* in *Escherichia coli*. *BMC. Microbiol.* 6, 14.
 127. Weiss, B., Wang, L., 1994. De novo synthesis of thymidylate via deoxycytidine in *dcd* (dCTP deaminase) mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 176, 2194-2199.
 128. Wilson, R.L., Tvinnereim, A.R., Jones, B.D., Harty, J.T., 2001. Identification of *Listeria monocytogenes* in vivo-induced genes by fluorescence-activated cell sorting. *Infect. Immun.* 69, 5016-5024.
 129. Wrzesinski, M., Nowosielska, A., Nieminuszcz, J., Grzesiuk, E., 2005. Effect of SOS-induced Pol II, Pol IV, and Pol V DNA polymerases on UV-induced mutagenesis and MFD repair in *Escherichia coli* cells. *Acta Biochim. Pol.* 52, 139-147.
 130. Wurgler, S.M., Richardson, C.C., 1993. DNA binding properties of the deoxyguanosine triphosphate triphosphohydrolase of *Escherichia coli*. *J Biol. Chem.* 268, 20046-20054.
 131. You, S.Y., Cosloy, S., Schulz, H., 1989. Evidence for the essential function of 2,4-dienoyl-coenzyme A reductase in the beta-oxidation of unsaturated fatty acids in vivo. Isolation and characterization of an *Escherichia coli* mutant with a defective 2,4-dienoyl-coenzyme A reductase. *J Biol. Chem.* 264, 16489-16495.
 132. Young, G.M., Miller, V.L., 1997. Identification of novel chromosomal loci affecting *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 25, 319-328.
 133. Zhan, X., Gao, J., Jain, C., Cieslewicz, M.J., Swartz, J.R., Georgiou, G., 2004. Genetic analysis of disulfide isomerization in *Escherichia coli*: expression of DsbC is modulated by RNase E-dependent mRNA processing. *J Bacteriol* 186, 654-660.
 134. Zhang, J.R., Deutscher, M.P., 1989. Analysis of the upstream region of the *Escherichia coli* *rnd* gene encoding RNase D. Evidence for translational regulation of a putative tRNA processing enzyme. *J Biol. Chem.* 264, 18228-18233.
 135. Zhu, J., Shimizu, K., 2004. The effect of *pfl* gene knockout on the metabolism for optically pure D-lactate production by *Escherichia coli*. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 64, 367-375.

7 Abkürzungen

5-ASA	5-Aminosalicylsäure
Abb.	Abbildung
ABC	<i>Alkanesulfonate transport protein-binding cassette</i>
<i>B.</i>	<i>Bacteroides</i>
BALB/c	Mausstamm
<i>BamH</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H
BHI	<i>Brain-Heart-Infusion</i> (Medium)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	<i>circa</i>
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CFU	<i>Colony forming units</i> , koloniebildende Einheiten
chrom.	chromosomal
cm	Zentimeter
CoA	Ko-Enzym A
CSP	<i>competence stimulatory peptide</i>
CU	Colitis Ulcerosa
d.h.	das heißt
DAHP	3-Desoxy-D-Arabinohexulosonat-7-Phosphat
dCTP	Desoxy-Cytidin-Triphosphat
dest. (H ₂ O)	einfach destilliertes Wasser
DFI	Differentielle Fluoreszenz-Induktion
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , DNS Desoxyribonucleinsäure
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lateinisch: und andere)
E-Value	<i>Expect-Value</i> , Rate an falsch-positiven Ergebnissen
F	Farad
FACS	fluorescence activated cell sorter, Durchflusszytometer
FSC	<i>forward scatter</i>

g	Erdbeschleunigung, $g = 9,81 \text{ m/s}^2$
g	Gramm
GFP	Green fluorescent protein
IL	Interleukin
IVET	<i>in vivo expression technology</i>
k	kilo- ($=10^6$)
Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
Kap.	Kapitel
LB	Luria-Bertani-Medium
LPS	Lipopolysaccharid
m	molar
m	Meter
MC	Morbus Crohn
MDT	Multidrug Tolerance
mdt	<i>multidrug tolerance</i>
mfd	<i>mutation frequency decline</i>
min	Minute
ml	Milliliter (10^{-3} Liter)
mol	SI-Basiseinheit der Stoffmenge n; $6,022 \cdot 10^{23}$ Teilchen
mpk	Max von Pettenkofer
μl	Mikroliter (10^{-6} Liter)
NCBI	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA
NF-κB	<i>nuclear factor κB</i>
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NOD2	<i>nucleotide-binding oligomerization domain 2</i>
OD	Optische Dichte
Omp	<i>outer membrane porin</i>
ORF	Open reading frame
ori	Origin of replication
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase-Chain-Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat

PPIase	Peptidyl-Prolyl-Cis/Trans-Isomerase
PTS	Phosphoenolpyruvat-abhängiges Phosphotransferasesystem
ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies
rpm	rounds per minute
s	Sekunden
S.	<i>Streptococcus</i>
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
sog.	sogenannt
SPF	specific pathogen free
SSC	<i>side scatter</i>
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TH1, TH2	T-Helferzellen, Klasse 1 bzw. 2
TNF- α	(<i>Tumor necrosis factor</i>)- α
U	<i>Units</i> , Einheit für Enzymaktivität: 1 U = 1 μ mol Substratumsatz/min
ÜN-Kultur	Über-Nacht-Kultur
V	Volt
z.B.	zum Beispiel

8 Danksagungen

Frau Dr. Julia-Stefanie Frick danke ich herzlich für die außergewöhnlich gute und kontinuierliche Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. I. B. Autenrieth möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas und für die exzellenten Arbeitsbedingungen am Institut für Medizinische Mikrobiologie danken.

Für die Vorarbeiten, die die Erstellung der *promotor trap library* ermöglicht haben, gilt mein Dank Herrn PD Dr. Volkhard Kempf, Frau Dr. Tanja Rieß und Andrea Schäfer.

Bei Frauke Kahl möchte ich mich besonders für die geduldige Einarbeitung in die Techniken der Molekularbiologie und für ihre fortwährende Hilfe während der letzten Jahre bedanken, die diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben. Auch Juliane Krejci und Birgit Manncke sei an dieser Stelle gedankt.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe „Kolitis“ bedanke ich mich für das freundschaftliche, produktive und herzliche Arbeitsklima, das mich immer dann wieder aufgebaut hat, wenn die Versuchsdurchführung daran erinnern ließ, dass der Teufel im Detail steckt.

Und insbesondere danke ich Nadja Krieb, die mich während dieser Arbeit beständig ermutigt und unterstützt hat.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Andreas Krieb
Geburtsdatum: 12.08.1977
Geburtsort: Lahn-Gießen
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1984 – 1988 Wiesengrundschule, Linden
1988 – 1990 Ludwig-Uhland-Schule, Gießen
1990 – 1997 gymn. Zweig der Liebigschule, Gießen
1997 Abitur, Note „sehr gut“ (1,4)

Studium:

1998 – 2000 Humanmedizin
Justus-Liebig-Universität, Gießen
2000 – 2002 Medizinische Informatik
Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg
2002 – 2007 Humanmedizin
Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
08/2003 Physikum (alte Approbationsordnung)
23.11.2007 2. Staatsexamen (neue Approbationsordnung)

Promotion:

01/2006 – 12/2008 Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene,
Eberhard-Karls-Universität Tübingen,
Prof. Dr. I. B. Autenrieth

Beruf:

seit 1/2008 Assistenzarzt in der Augenklinik am Klinikum
Darmstadt, Prof. Dr. K.-H. Emmerich