

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin der
Universität Tübingen

BamB, BamC und BamE und ihre
Bedeutung für die Biogenese der
Autotransporter-Adhäsine
YadA, Invasin und Intimin

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Bräutigam, Cornelia
2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. I. B. Autenrieth

2. Berichterstatter: Professor Dr. K. Hantke

Tag der Disputation: 10.04.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
1. Einleitung	9
1.1 <i>Yersinia</i> und <i>Escherichia coli</i>	9
1.1.1 <i>Yersinia</i>	9
1.1.2 <i>Escherichia coli</i>	9
1.1.3 <i>Yersinia enterocolitica</i> und enteropathogene <i>Escherichia coli</i>	9
1.1.4 Infektionen mit <i>Yersinia enterocolitica</i>	10
1.1.4.1 Symptome	10
1.1.4.2 Pathomechanismus der Infektion	11
1.1.5 Pathomechanismus der EPEC-Infektion.....	12
1.2 Äußere Membranproteine Gram-negativer Bakterien	13
1.2.1 Bakterielle Sekretionssysteme.....	13
1.2.2 Klassische Autotransporter	14
1.2.3 Das Typ V Sekretionssystem	15
1.2.4 Bakterielle Adhäsine.....	15
1.3 Die Autotransporter-Adhäsine YadA, Invasin und Intimin	16
1.3.1 Adhäsine von <i>Yersinia enterocolitica</i>	16
1.3.1.1 YadA (<i>Yersinia</i> Adhäsine A)	16
1.3.1.2 Die Struktur von YadA.....	17
1.3.1.3 Invasin	18
1.3.2 Intimin als Adhäsine von EPEC und EHEC.....	19
1.3.3 Die Struktur von Invasin und Intimin	19
1.4 Die Biogenese äußerer Membranproteine	21
1.4.1 Synthese im Zytoplasma, zytoplasmatische Chaperone	21
1.4.2 Transport durch das Periplasma, periplasmatische Chaperone.....	22
1.5 Die β -Barrel Assembly Machinery	23

1.6	Modellvorstellungen zum Mechanismus der Membraninsertion bei Autotransportern	29
1.6.1	Faltung des β -Barrels von Autotransportern und Einbau der Transmembrandomäne in die äußere Bakterienmembran	29
1.6.2	Translokation der Effektor-domäne in den Extrazellulär-raum.....	31
1.6.2.1	Das Hairpin-Modell	31
1.6.2.2	Das BamA-Modell	32
1.7	Zielsetzung	35
2.	Material und Methoden.....	36
2.1	Material	36
2.1.1	Geräte.....	36
2.1.2	Mess- und Reaktionsgefäße	37
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	38
2.1.4	Chemikalien	39
2.1.5	Puffer und Lösungen.....	40
2.1.5.1	Puffer für mikrobiologische Methoden	40
2.1.5.2	Puffer für molekularbiologische Methoden.....	41
2.1.5.3	Puffer für proteinbiochemische Methoden	41
2.1.6	Nährmedien	43
2.1.7	Arzneimittel und für Forschung oder Diagnostik hergestellte Antibiotika	44
2.1.8	Bakterienstämme	45
2.1.9	Plasmide	47
2.1.10	Primer.....	48
2.1.11	Antikörper und Antiseren	48
2.1.12	Enzyme und Nukleotide.....	50
2.1.13	Kommerzielle Kits.....	50
2.1.14	Größenstandards	51
2.1.15	Software	51

2.2	Methoden.....	52
2.2.1	Mikrobiologische Methoden	52
2.2.1.1	Anzüchten von Bakterien	52
2.2.1.2	Herstellung von Glycerin-Kryokulturen für die Bakterienstammsammlung	52
2.2.1.3	Erstellen von Wachstumskurven.....	53
2.2.1.4	Antibiotika-Sensitivitätstests	53
2.2.1.5	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	54
2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	54
2.2.2.1	Isolation von Plasmid-DNA	54
2.2.2.2	Isolation chromosomaler DNA	55
2.2.2.3	Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente Zellen.....	55
2.2.2.4	Transformation von Plasmid-DNA in elektrokompetente <i>E.coli</i> DH5 α -Zellen	56
2.2.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	56
2.2.2.6	Kolonie-PCR.....	57
2.2.2.7	Agarosegelelektrophorese	58
2.2.2.8	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	59
2.2.2.9	Klonierung von <i>bamB</i> aus <i>E.coli</i> HB101 in pBAD28	59
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	64
2.2.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	64
2.2.3.2	Coomassie-Färbung.....	65
2.2.3.3	Immunoblot.....	66
2.2.3.4	Nachweis von Proteinen durch Enhanced Chemilumi- nescence (ECL).....	66
2.2.3.5	Färbung von Proteinen zur Detektion mit dem Licor- System	68
2.2.3.6	Herstellung von Gesamtzelllysaten.....	68

2.2.3.7	Präabsorption von Antikörpern.....	69
2.2.3.8	Proteinbestimmung mit dem Pierce BCA Protein Assay	69
2.2.3.9	Präparation äußerer Membranen Gram-negativer Bakterien	70
2.2.3.10	Harnstoffextraktion	71
2.2.3.11	Proteinfällung mit Methanol und Chloroform.....	72
3.	Ergebnisse	74
3.1	Einfluss der Deletion der Lipoprotein-Gene <i>bamB</i> , <i>bamC</i> und <i>bamE</i> auf Wachstumsverhalten und Integrität der äußeren Membran von <i>E. coli</i> HB101	74
3.1.1	Vergleich des Wachstumsverhaltens von <i>E. coli</i> HB101 Wildtyp mit <i>E. coli</i> HB101 Δ BamB, Δ BamC und Δ BamE	74
3.1.2	Integrität der äußeren Bakterienmembran von <i>E. coli</i> HB101 Wildtyp, Δ BamB, Δ BamC und Δ BamE.....	78
3.2	Untersuchungen zu den Autotransporter-Adhäsinen YadA, Invasin und Intimin und den Porinen OmpC/OmpF in äußeren Bakterienmembranen von <i>E. coli</i> HB101 Δ BamB, Δ BamC und Δ BamE	82
3.2.1	Coomassie-Färbung äußerer Membranfraktionen.....	82
3.2.2	Die Porine OmpC und OmpF in äußeren Membranfraktionen	85
3.2.3	Einfluss der Deletion von <i>bamB</i> , <i>bamC</i> und <i>bamE</i> auf die Expression und Membraninsertion der Autotransporter-Adhäsine YadA, Invasin und Intimin.....	86
3.2.3.1	Darstellung und Quantifizierung von YadA in Gesamtzelllysaten und äußeren Membranfraktionen.....	87
3.2.3.2	Harnstoffextraktion äußerer Membranfraktionen von <i>E. coli</i> HB101 pASK-IBA2-YadA.....	93
3.2.3.3	Darstellung und Quantifizierung von Invasin in Gesamt- zelllysaten und äußeren Membranfraktionen.....	97
3.2.3.4	Harnstoffextraktion äußerer Membranfraktionen von <i>E. coli</i> HB101 pASK-IBA2-Inv.....	102

3.2.3.5	Darstellung und Quantifizierung von Intimin in Gesamtzelllysaten und äußeren Membranfraktionen.....	106
3.2.3.6	Harnstoffextraktion äußerer Membranfraktionen von <i>E. coli</i> HB101 pASK-IBA2-Int	111
3.2.4	Klonierung von <i>bamB</i> in den Vektor pBAD28 und Transformation von pBAD28_ <i>bamB</i> in <i>E. coli</i> HB101 Δ BamB pASK-IBA2-Inv	114
3.3	Deletion periplasmatischer und zytoplasmatischer Chaperone und ihr Einfluss auf die Biogenese von Invasin in <i>E. coli</i> BW25113	117
3.4	Untersuchungen zu der Expression von Invasin in <i>Yersinia enterocolitica</i> O:8.....	120
4.	Diskussion	122
5.	Zusammenfassung	137
6.	Anhang	140
6.1	Literaturverzeichnis	140
6.2	Abkürzungsverzeichnis	151
6.3	Daten zu den Wachstumskurven von <i>E. coli</i> HB101 Wildtyp, Δ BamB, Δ BamC und Δ BamE	153
7.	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	155
8.	Veröffentlichung und Kongressbeitrag.....	156
9.	Danksagung.....	157
10.	Lebenslauf.....	159

1. Einleitung

1.1 *Yersinia* und *Escherichia coli*

1.1.1 *Yersinia*

Yersinien gehören zur Gattung Gram-negativer Stäbchenbakterien und zur Familie der *Enterobacteriaceae* (Pschyrembel, 260. Auflage). Sie können fakultativ anaerob wachsen und vermehren sich bevorzugt intrazellulär (Devenish & Schiemann, 1981). Es sind elf verschiedene Yersinien-Spezies bekannt, von denen neben *Yersinia pestis*, dem Erreger der Pest, noch *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia enterocolitica* für den Menschen pathogen sein können (Bottone, 1999).

1.1.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli sind wie Yersinien Gram-negative Stäbchenbakterien, die zu den fakultativ-anaeroben *Enterobacteriaceae* gehören. Sie sind „peritrich begeißelt [...]“ und haben „geringe [...] Nährbodenansprüche“ (Pschyrembel, 260. Auflage). Beim Gesunden kommen *Escherichia coli*-Spezies als Kommensale vor allem im Colon vor. Es gibt jedoch auch pathogene Spezies, wie enteropathogene *E. coli* (EPEC) und enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) (Torres et al, 2005).

Infektionen mit **enteropathogenen *E. coli*** können insbesondere bei Kleinkindern zu schweren wässrigen Durchfällen führen, die tödlich enden können (Nataro & Kaper, 1998). In Entwicklungsländern haben EPEC-Infektionen einen erheblichen Anteil an der Säuglingssterblichkeit, wobei in der Regel eine fäkal-orale Übertragung zu Grunde liegt (Nataro & Kaper, 1998).

1.1.3 *Yersinia enterocolitica* und enteropathogene *Escherichia coli*

Sowohl *Yersinia enterocolitica* als auch enteropathogene *E. coli*-Pathovaren können Durchfallerkrankungen auslösen. Sie tragen in ihrem Genom den Kode für verschiedene Adhäsine und Pathogenitätsfaktoren, die eine Anheftung an das Darmepithel ermöglichen und das Gewebe schädigen, sodass es zu den Symptomen einer Enteritis

mit Flüssigkeitsverlust des Körpers kommt. Ein Ziel mikrobiologischer Grundlagenforschung ist es daher, Mechanismen zu entschlüsseln, die zur Insertion bakterieller Adhäsine in die äußere Membran beitragen und so mögliche Ansatzpunkte für antibiotisch oder antiinfektiv wirksame Substanzen zu identifizieren.

Voraussetzung für die Wirkung bakterieller Adhäsine ist zunächst ihr Einbau in die äußere Bakterienmembran. Hierfür spielt die β -Barrel Assembly Machinery (kurz: Bam) eine entscheidende Rolle. Sie besteht aus dem äußeren Membranprotein BamA und den vier Lipoproteinen BamB-E (Bakelar et al, 2016, Leyton et al, 2012). In dieser Arbeit sollte unter anderem die Rolle der Lipoproteine BamB, C und E für die Biogenese und Membraninsertion der bakteriellen Adhäsine YadA, Invasin und Intimin näher untersucht werden.

1.1.4 Infektionen mit *Yersinia enterocolitica*

1.1.4.1 Symptome

Yersinia enterocolitica kann eine Enteritis mit wässrigen, zum Teil blutigen Durchfällen, „krampfartige[n] Bauch[schmerzen] [und Fieber]“ (Pschyrembel, 260. Auflage) hervorrufen. Vor allem im Kindesalter treten gelegentlich Entzündungen des terminalen Ileums und der mesenterialen Lymphknoten der Iliozökalregion auf, was zum Bild einer Pseudoappendizitis führen kann (Bottone, 1977, Pschyrembel, 260. Auflage). In der Regel verläuft die Infektion selbstlimitierend und die Entzündungsreaktion klingt nach ein bis zwei Wochen ab. Bei manchen Patienten treten jedoch auch immunologische Folgeerkrankungen wie reaktive Arthritiden, Iritiden oder Erythema nodosa auf (Cover & Aber, 1989). Auch schwere Verläufe mit Endokarditiden und Meningitiden bis hin zu Todesfällen sind beschrieben (Bradford et al, 1974). In diesen Fällen werden häufig *Yersinia enterocolitica*-Serotypen O:8 in Patientenisolaten gefunden (Bottone, 1997). Auch die Serotypen O:3 und O:9 können symptomatische Infektionen auslösen (Aleksic & Bockemuhl, 1990), die aber in der Regel milder verlaufen.

In den meisten Fällen wird eine Infektion mit *Yersinia enterocolitica* fäkal-oral erworben. So kann der Erreger durch kontaminiertes Trinkwasser, den Verzehr von unzureichend erhitztem Fleisch -häufig Schweinefleisch- oder Kontakt mit besiedelten Haustieren aufgenommen werden (Ostroff et al, 1994). Dabei ist der Erreger in der Lage, bei einer Temperatur zwischen vier bis 42°C zu wachsen. Er wird daher auch als psychrotolerant (kältetolerant) bezeichnet. Die optimale Wachstumstemperatur liegt dabei zwischen 27°C-30°C. In dieser Temperaturspanne besitzt *Yersinia enterocolitica* Geißeln, mit denen es sich fortbewegen kann. Bei höheren Temperaturen ist das Bakterium unbeweglich (Bottone, 1997).

1.1.4.2 Pathomechanismus der Infektion

Nach ihrer Aufnahme in den Verdauungstrakt heften sich die Bakterien mit ihren Adhäsinen YadA und Invasin an die M-Zellen des Dünndarms an. Diese „Microfold“- oder M-Zellen sind Epithelzellen, die über den Lymphfollikeln liegen. Die Lymphfollikel in diesem Bereich werden als Peyersche Plaques bezeichnet. *Yersinia enterocolitica* kann die M-Zellen durchdringen, sich in den Peyerschen Plaques vermehren und Abszesse bilden (Autenrieth & Firsching, 1996). Von dort kann es weiter in mesenterische Lymphknoten, Milz, Leber und Lunge disseminieren (Autenrieth et al, 1993; Carter, 1975).

Nach Anheftung an die Wirtszelle ist das Bakterium in der Lage, verschiedene pathogene Effektorproteine, die sogenannten Yersinia outer proteins (Yops), direkt in das Zytoplasma der Zelle zu injizieren. Dazu besitzt es einen nadelähnlichen Apparat, der als Type Three Secretion System (TTSS) bezeichnet wird (Galan & Wolf-Watz, 2006) und vermutlich eine direkte Verbindung zwischen dem bakteriellen Zytoplasma und der Plasmamembran der eukaryontischen Wirtszelle herstellen kann (Cornelis, 2002). Die Yops können immunologische Abwehrmechanismen der Zellen stören, indem sie beispielsweise die Freisetzung von TNF- α , die Sauerstoff-Produktion und Phagozytose hemmen. Sie ermöglichen damit die weitere extrazelluläre Vermehrung des Bakteriums (Aepfelbacher et al, 2007). Zudem können sie das Aktinzytoskelett der eukaryontischen Wirtszelle zerstören (Aepfelbacher et al, 2007).

1.1.5 Pathomechanismus der EPEC-Infektion

Eine durch enteropathogene *E. coli* verursachte Enteritis löst im Darm ein typisches histopathologisches Bild aus. Der Pathomechanismus dieser Infektion wird mit „Attaching and Effacing (A/E)“, also mit „Anheftung und Zerstörung“ beschrieben (Torres et al, 2005). So heften sich enteropathogene *E. coli* zunächst an die Darmepithelzellen an. Dazu besitzen sie bakterielle Adhäsine wie das Protein Intimin, das auf einer 35 kbp großen Pathogenitätsinsel (PAI) im Genom der EPEC kodiert ist (Kaper et al, 1997). Diese Pathogenitätsinsel wird auch als Locus of Enterocyte Effacement (LEE) bezeichnet, da auf ihr neben Intimin der genetische Code für ein Type Three Secretionssystem (TTSS) und verschiedene Effektorproteine enthalten ist (McDaniel & Kaper, 1997), die über das TTSS in das Zytosol der Wirtszelle übertragen werden können. Eines dieser Effektorproteine ist der Translocated Intimin Rezeptor Tir, der in die Wirtszellmembran integriert wird und Intimin binden kann. Damit liefert EPEC den Rezeptor für sein eigenes Adhäsin gleich mit und verstärkt dadurch seine Bindung an die Wirtszelle (Frankel et al, 1998, Schmidt, 2010). Tir und weitere in die Darmepithelzelle injizierte Effektorproteine lösen anschließend eine intrazelluläre Reaktionskaskade aus, in deren Folge es zu massiven Veränderungen des eukaryontischen Zytoskeletts bis hin zur Apoptose der Zellen kommt. So akkumulieren verschiedene zytoskelettale Proteine, insbesondere Aktinpolymere, im Zytoplasma der Wirtszelle direkt unterhalb der Bindungsstelle des Bakteriums und bilden einen sogenannten Pedestal-Komplex aus (Kenny et al, 2001). Auch die Mikrovilli des Darms, die durch Aktinfilamente stabilisiert worden sind, werden zerstört, wodurch ein großer Anteil der intestinalen Resorptionsfläche verloren geht (Kenny et al, 1997).

Ferner sind die Erreger in der Lage, die Zellpolarität der Wirtszelle aufzuheben, indem sie die Tight Junctions, die benachbarte Zellen fest miteinander verbinden, schädigen. Dadurch können sonst basolateral gelegene Proteine wie β_1 -Integrine zur apikalen Seite der Darmepithelzelle gelangen. In der Folge wird die Permeabilität der Zellmembran erhöht. β_1 -Integrine können auch das bakterielle Intimin binden (Muza-Moons et al, 2003) und somit die Bindung von EPEC weiter stabilisieren.

Überdies kommt es zur Aktivierung von Nuclear Factor κ B (NF κ B) und Entzündungsfaktoren (Nataro & Kaper et al, 1998). Polymorphkernige Leukozyten

(PMNs) gelangen an die Darmschleimhaut und die Darmepithelzellen werden zur Sekretion angeregt. Dies führt zu wässrigen Durchfällen mit Elektrolytverlusten des Körpers (Nataro & Kaper et al, 1998).

1.2 Äußere Membranproteine Gram-negativer Bakterien

Die äußere Membran Gram-negativer Bakterien enthält eine große Anzahl und Vielfalt von Membranproteinen. Sie erfüllen zahlreiche wichtige Funktionen für die Zelle. Beispielsweise werden Nährstoffe, Wasser und Elektrolyte über Porine und Transporter in die Zelle aufgenommen oder aus der Zelle heraustransportiert, um die intrazelluläre Homöostase aufrechtzuerhalten (Bakelar et al, 2016, Tommassen, 2010).

Die äußeren Membranproteine werden im bakteriellen Zytoplasma translatiert, müssen anschließend mit einer Translokase über die innere Bakterienmembran transportiert werden, das Periplasma durchqueren und schließlich in die äußere Bakterienmembran inseriert werden (Knowles et al, 2009).

1.2.1 Bakterielle Sekretionssysteme

Zusätzlich zu diesem Insertionsprozess gibt es sechs verschiedene bakterielle Sekretionssysteme Gram-negativer Bakterien, mit denen die Bakterienzelle Proteine, Protein-DNA-Komplexe oder Protein-Untereinheiten äußerer Membranproteine nach außen transportieren kann (Dalbey & Kuhn, 2012). Bei einigen dieser Systeme gelangen die Proteine durch ein kontinuierliches Verbindungsstück direkt vom Zytoplasma in den extrazellulären Raum (Dalbey & Kuhn, 2012). Ein Beispiel für diese Art der Sekretion ist das bereits erwähnte Typ III Sekretionssystem, das nicht nur die innere Membran, das Periplasma und die äußere Membran der Bakterien durchspannt, sondern als Besonderheit auch die Membran der Wirtszelle. So können pathogene Effektorproteine direkt in eine eukaryontische Wirtszelle injiziert werden (Henderson et al, 2004).

Anstelle des direkten Sekretionsweges verfolgen das Typ II und das Typ V Sekretionssystem einen indirekten Weg. Ihre Substrate werden zunächst wie äußere

Membranproteine über die innere Bakterienmembran transloziert und gelangen nach ihrem Transit durch das Periplasma in die äußere Membran. Dort kann anschließend der Sekretionsvorgang stattfinden (Dalbey & Kuhn, 2012). Die Einteilung in die verschiedenen Systeme beruht auf strukturellen Unterschieden der Transportkanäle und der transportierten Substrate. Dabei ist das Typ V Sekretionssystem (T5SS) von besonderer Bedeutung für die Adhäsion von *Yersinia enterocolitica* und enteropathogenen *E. coli* an Wirtszellen, da es unter anderem die Sekretion der Autotransporter-Adhäsine YadA, Invasin und Intimin ermöglicht (Cornelis, 2002, Kenny et al, 1997).

1.2.2 Klassische Autotransporter

Klassische Autotransporter haben einen gemeinsamen Aufbau. Am N-Terminus befindet sich eine Signalsequenz für die Sec-Translokase. Zentral liegt die Aminosäuresequenz für die transportierte Passenger Domäne, die auch als Effektor-domäne bezeichnet wird. Diese wird von einer C-terminalen Sequenz gefolgt, die sich zu einem mehrsträngigen β -Barrel faltet und als solches die äußere Membran durchspannt (Henderson et al, 1998).

Die Sec-Translokase ist ein Proteinkomplex, der die Translokation der meisten äußeren Membranproteine über die innere Bakterienmembran vermittelt. Dabei wird die Sec-Signalsequenz des Membranproteins abgespalten (Driessen et al, 1998). Die sich daran anschließende Effektor-domäne wird im Laufe der weiteren Biogenese des Proteins an die bakterielle Zelloberfläche und schließlich in den extrazellulären Raum sekretiert. Sie enthält in der Regel viele β -Faltblattstrukturen (Kajava & Steven, 2006).

Der Begriff Autotransporter beruht auf der Annahme, dass diese Proteingruppe alle funktionellen Elemente enthält, die für ihre Biogenese und insbesondere die Sekretion der Effektor-domäne benötigt werden (Henderson et al, 1998, Leo et al, 2012, Leyton et al, 2012).

1.2.3 Das Typ V Sekretionssystem

Das Typ V Sekretionssystem, mit dem der Mechanismus des Autotransports beschrieben wird, lässt sich in fünf untergeordnete Kategorien unterteilen (die Typen Va-e) (Leo et al, 2012, Oberhettinger & Schütz et al, 2012). Das Sekretionssystem klassischer monomerer Autotransporter wird als Typ Va bezeichnet. Der Typ Vb steht für ein Zwei-Partner-Sekretionssystem, das aus zwei eigenständigen Proteinen besteht: einem großen, sekretierten Protein und einem Membranprotein, das eine Pore in der äußeren Membran bildet. Mit dem Typ Vc-Sekretionssystem werden trimere Autotransporter zusammengefasst (Henderson et al, 2004). Ein typischer Vertreter dieser Gruppe ist das Homotrimer YadA aus *Yersinia enterocolitica*. Neben einem Vd-Sekretionssystem, bei dem die Autotransporter strukturelle Besonderheiten aufweisen, wird von Leo et al. (2012) und Oberhettinger & Schütz et al. (2012) die Einführung eines Typ Ve Sekretionssystems vorgeschlagen. Letzteres umfasst sogenannte inverse Autotransporter, bei denen die Transmembrandomäne im Gegensatz zu klassischen Autotransportern N-terminal und die Effektordomäne C-terminal gelegen ist (Newman & Stathopoulos, 2004). Diesem Typ Ve-Sekretionssystem und damit auch der Gruppe der inversen Autotransporter gehören Invasin aus *Yersinia enterocolitica* und Intimin aus enteropathogenen *E. coli* an.

1.2.4 Bakterielle Adhäsine

Um ihre pathogene Wirkung auf einen eukaryontischen Wirt ausüben zu können, müssen sich die Gram-negativen Bakterien zunächst mit Adhäsinen an der Wirtszelle anheften. Viele Gram-negative Bakterien besitzen dazu sogenannte Fimbrien, die ihnen die Anheftung an Oberflächen ermöglichen. Bei Fimbrien handelt es sich um haarähnliche Proteinanhängsel der Bakterien, die aus dem filamentösen Protein Pilin aufgebaut sind (Soto & Hultgren, 1999) und in der äußeren Membran der Bakterien verankert sind. An der nach extrazellulär gerichteten Spitze der Fimbrien befindet sich eine Untereinheit mit adhäsiven Eigenschaften (Pizarro-Cerda & Cossart, 2006). Alle anderen bakteriellen Adhäsine werden als nicht-fimbrielle Adhäsine bezeichnet- so auch die Autotransporter-Adhäsine YadA, Invasin und Intimin.

1.3 Die Autotransporter-Adhäsine YadA, Invasin und Intimin

1.3.1 Adhäsine von *Yersinia enterocolitica*

1.3.1.1 YadA (*Yersinia* Adhäsine A)

Yersinia Adhäsine A ist auf einem 70 kb großen Virulenzplasmid kodiert (El Tahir & Skurnik, 2001). Es spielt eine entscheidende Rolle für die Adhäsion und Virulenz von *Yersinia enterocolitica*. Beispielsweise rufen Infektionen mit *Yersinia enterocolitica*, bei denen das *yadA*-Gen ausgeschaltet wurde, bei oral oder intraperitoneal infizierten Mäusen keine Krankheitssymptome hervor und die Peyerschen Plaques weisen bei einer histologischen Untersuchung nur minimale Entzündungsreaktionen auf (Pepe et al, 1995).

YadA-Proteine bedecken die gesamte Oberfläche von *Yersinia enterocolitica* und verleihen dem Bakterium hydrophobe Eigenschaften (El Tahir & Skurnik, 2001). Bakterien, die YadA exprimieren, können an verschiedene Proteine der extrazellulären Matrix wie Kollagen (Schulze-Koops et al, 1992), Laminin und Fibronectin (El Tahir & Skurnik, 2001) sowie an Epithelzellen und neutrophile Granulozyten binden (Heesemann et al, 1987) und dadurch eine Anheftung des Bakteriums an Wirtszellen vermitteln. In den Epithelzellen entsteht daraufhin eine Entzündungsreaktion, indem unter anderem die Produktion von Interleukin 8 induziert wird (Schmid et al, 2004).

YadA ist auch für die Persistenz der Bakterien in den Peyerschen Plaques von Mäusen bedeutsam. So konnte einige Stunden nach einer Infektion mit *Yersinia enterocolitica*-Wildtypstämmen eine deutlich höhere Erregerlast in den Peyerschen Plaques nachgewiesen werden als bei einer Infektion mit *yadA*-deletierten Stämmen, obwohl die anfängliche Infektionsdosis gleich hoch war (Pepe et al, 1995).

Neben diesen adhäsiven Eigenschaften schützt YadA das Bakterium auch vor dem Immunsystem des Wirts. Es hemmt die Aktivierung des klassischen Weges des Komplementsystems, der in der Bildung eines Komplexes zur Abtötung der Bakterienzelle münden würde. Diese Hemmung wird erreicht, indem YadA direkt oder indirekt an die Komplementfaktoren H, C3b und iC3b bindet (Biedzka-Sarek et al, 2008; Schindler et al, 2012; Schütz et al, 2010), welche den Reaktionsablauf dieses Abwehrsystems regulieren. Darüber hinaus kann YadA auch die Phagozytose von

Yersinia enterocolitica inhibieren, indem es an phagozytierende neutrophile Granulozyten bindet und diese Bindung die Injektion von Yops über das Typ III Sekretionssystem in die Abwehrzellen ermöglicht (Lian & Pai, 1985; Ruckdeschel et al, 1996). YadA kann nicht nur die Bindung an Wirtszellen, sondern auch die Autoagglutination der Bakterien vermitteln (Balligand et al, 1985; Kapperud et al, 1987; Skurnik et al, 1984), was den Zugang des Immunsystems an die Bakterien erschweren kann.

Die maximale Expression von YadA tritt bevorzugt bei einer Temperatur von 37°C auf (Bolin et al, 1982) und wird erst einige Stunden nach der Infektion maximal. Die Invasin-Expression ist dagegen in der Frühphase einer Infektion und bei der Standarduntersuchungstemperatur von 26°C (Grassl et al, 2003) maximal.

1.3.1.2 Die Struktur von YadA

Analog zum Aufbau klassischer Autotransporter ist die nach extrazellulär gerichtete Effektor-domäne N-terminal kodiert, während die transmembrane Domäne vom C-terminalen Anteil des Proteins gebildet wird. Die Struktur von YadA wird von drei gleichen Molekülen gebildet, die sich zu einem Homotrimer zusammenlagern (Nummelin et al, 2004). Die extrazelluläre Domäne ragt etwa 30 nm über die äußere Membran hinaus (Hoicyk et al, 2000) und hat eine Struktur, die bildhaft mit der eines „Lollipop“ oder einer Stecknadel verglichen wird. Sie besteht aus einer Kopf-, Hals- und Stiel-domäne. Die Kopfdomäne befindet sich am N-terminalen Ende des YadA-Moleküls. Sie hat im Vergleich zum Stiel und Hals einen breiteren Durchmesser und vermittelt die Autoagglutination der Bakterien und die Bindung von YadA an extrazelluläre Matrixproteine. Strukturell besteht die Kopfdomäne vorwiegend aus β -Faltblättern, die sich zu einer helikalen Struktur anordnen. Die Halsdomäne verbindet den Stiel mit der Kopfdomäne (Koretke et al, 2006). Der Stiel hat eine coiled-coil Struktur, das heißt, er besteht aus drei Einzelhelices, die sich wiederum zu einer größeren Helix umeinander winden. Der C-terminale Transmembrananker, der in Form einer β -Barrel-Pore in der äußeren Membran verankert ist, wird von insgesamt 12 β -Strängen gebildet, zu denen jedes Monomer vier Stränge beiträgt (Koretke et al, 2006).

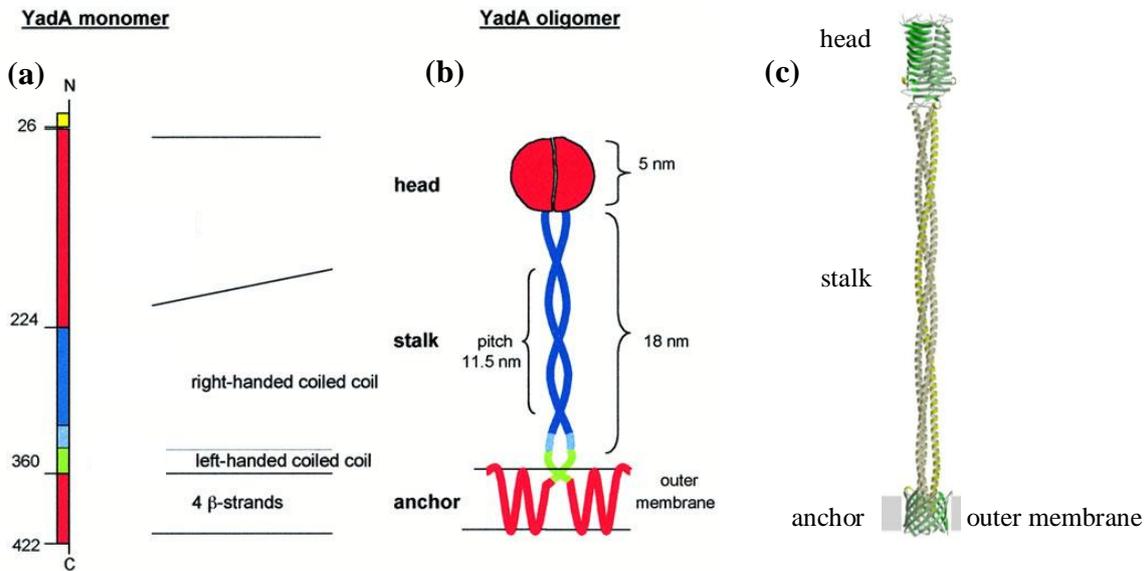


Abb. 1: YadA-Struktur: Das YadA-Monomer besteht aus bis zu 422 Aminosäuren (a). Drei YadA-Monomere lagern sich zu einem YadA-Trimer zusammen und bilden eine N-terminal gelegene Kopfdomäne (head) und eine Halsdomäne, die den Kopf mit der Stieldomäne (stalk) verbindet. Die Stieldomäne reicht bis zur β -Barrel-Pore am C-Terminus, die das YadA-Trimer in der äußeren Bakterienmembran verankert (b), (c).

Abb.1(a) und (b): modifiziert nach Hoiczky et al, (2000); Abb.1(c): modifiziert nach Koretke et al, (2006).

1.3.1.3 Invasin

Ein weiteres wichtiges Adhäsion von *Yersinia enterocolitica* ist das äußere Membranprotein Invasin. Invasin ist auf dem bakteriellen Chromosom kodiert (Grassl et al, 2003). Es ermöglicht dem Bakterium vor allem in der Frühphase einer Infektion, das Darmepithel zu durchdringen und sich in den Peyerschen Plaques anzusiedeln (Pepe et al, 1995). Dazu bindet Invasin spezifisch an Transmembranproteine der eukaryontischen Zelle, die sogenannten Integrine (Grassl et al, 2003; Isberg & Leong, 1990). Integrine sind heterodimere Rezeptoren, die aus einer α - und einer β -Untereinheit aufgebaut sind und unter anderem die Weiterleitung von Signalen zwischen dem Intra- und dem Extrazellulärraum vermitteln können. Invasin bindet an die $\beta 1$ -Untereinheit und weist dabei eine zum Teil 100-fach höhere Affinität zum Rezeptor auf als der natürliche Ligand Fibronectin (Hamburger et al, 1999). Die Invasinbindung führt schließlich dazu, dass sich das Zytoskelett in der Wirtszelle

umordnet und vermutlich eine Art Pseudopodien ausbildet, die zur Aufnahme des Bakteriums in die Zelle beitragen (Hamburger et al, 1999). Zudem wird eine intrazelluläre Signalkaskade in der Wirtszelle in Gang gesetzt, die zur Produktion proinflammatorischer Zytokine und damit zu einer Entzündungsreaktion im Darmepithel führt (Grassl et al, 2003).

In vivo zeigen Invasin-defiziente Stämme eine deutlich eingeschränkte und um 3-4 Tage verzögerte Invasion durch das Darmepithel bevor sie sich in den Peyerschen Plaques ansiedeln können. Daher wird angenommen, dass Invasin eine entscheidende Rolle in der Frühphase der intestinalen Infektion mit *Yersinia enterocolitica* zukommt (Pepe & Miller, 1993; Pepe et al, 1995).

1.3.2 Intimin als Adhäsion in EPEC und EHEC

Intimin ist ein äußeres Membranprotein und Adhäsion, das auf der LEE-Pathogenitätsinsel im Chromosom von enteropathogenen (EPEC) und enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) kodiert ist (Kaper et al, 1997). Das Intimin-Gen wird auch als *eae*-Gen bezeichnet. Intimin bindet an den Tir-Rezeptor, der von der Bakterienzelle selbst synthetisiert und in die Wirtszelle injiziert wird. Durch diese Bindung trägt es entscheidend zur Virulenz von EHEC und EPEC bei. Intimin weist zahlreiche strukturelle Ähnlichkeiten zu Invasin auf, weshalb die beiden Adhäsine einer gemeinsamen Proteinfamilie zugeordnet werden (Oberhettinger et al, 2012; Tsai et al, 2011).

1.3.3 Die Struktur von Invasin und Intimin

Die inversen Autotransporter Invasin und Intimin haben eine konservierte Struktur mit einer N-terminalen Signalsequenz für die Sec-Translokase. Daran schließt sich bei Intimin eine Lysin-Motiv Domäne (Lys-M) an, die Peptidoglykan binden kann und über einen Spacer mit zwei α -Helices verbunden ist (Leo et al, 2014). Die so strukturierte periplasmatische Domäne kann die Dimerisation von zwei Intimin-Molekülen vermitteln (Leo et al, 2014). Die periplasmatische Domäne von Invasin ist dagegen kürzer als die von Intimin, enthält keine Lys-M-Domäne (siehe Abb. 2, Seite 20) und hat damit weder die Fähigkeit zur Dimerisation noch kann es in der Zellkultur

Peptidoglykan binden (Leo et al, 2014). Sie enthält jedoch ebenfalls zwei α -Helices, von denen angenommen wird, dass sie die transmembrane β -Barrel-Pore gegenüber dem periplasmatischen Raum zu verschließen vermögen (Fairman et al, 2012).

Die beiden α -Helices, die sowohl bei Intimin als auch bei Invasin enthalten sind, sind mit einem transmembranen β -Barrel verbunden, das -wie bei allen monomeren Autotransportern mit bekannter Struktur- aus 12 antiparallel angeordneten β -Faltblättern besteht (Barnard et al, 2012) und eine Art Pore in der äußeren Membran bildet. Über einen α -helikalen Linker ist das β -Barrel von Invasin und Intimin mit der Effektor-domäne verbunden, die durch diese Pore nach außen transloziert wird. Die Effektor-domäne vermittelt die Zelladhäsion und bindet an Integrine (Dersch & Isberg, 2000). Sie besteht bei beiden Autotransportern aus sich wiederholenden „Bakteriellen Immunoglobulin-like (BIG)“ Untereinheiten und einer C-Typ Lectin-like-Subdomain (CTLD) (Fairman et al, 2012). Invasin hat vier solcher BIG-Untereinheiten, die in Abbildung 2 mit D1 bis D4 bezeichnet sind. Die Untereinheit D5 hat die Struktur einer C-Typ Lectin-like Subdomäne. Die Effektor-domäne von Intimin besteht aus einer in Abbildung 2 mit D00 gekennzeichneten Untereinheit. Bioinformatische Analysen legen nahe, dass diese D00-Domäne die Funktion eines Autochaperons haben könnte (Tsai et al, 2010). Zudem enthält es die BIG-Untereinheiten D1 und D2 und eine mit D3 gekennzeichneten CTL-Domäne (Fairman et al, 2012).

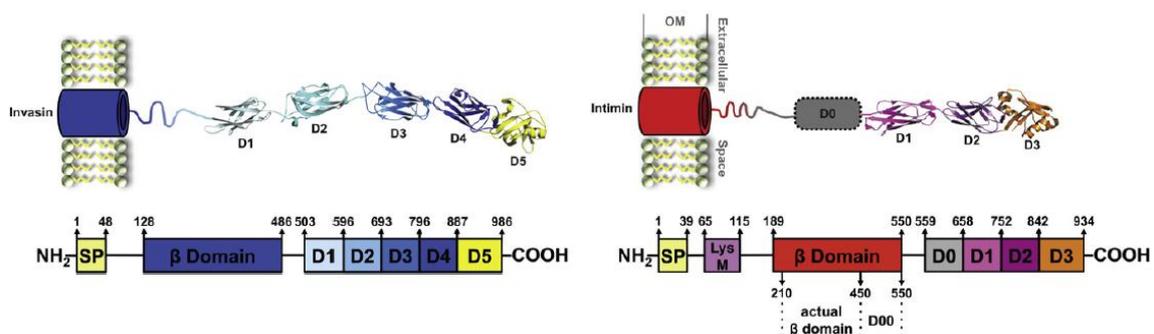


Abb. 2: Struktur der inversen Autotransporter Invasin und Intimin: Die N-terminale periplasmatische Domäne besteht aus einem Signalpeptid für die Sec-Translokase (SP), die in Intimin von einer Lys-M Domäne gefolgt wird. Die Lys-M Domäne fehlt bei Invasin. Daran schließen sich bei Invasin und Intimin zwei α -Helices (nicht abgebildet) und die β -Domäne, die das transmembrane β -Barrel bildet, an. Die periplasmatische Domäne besteht bei Invasin aus vier BIG-Untereinheiten (D1-D4) und einer CTL-Domäne (D5). Bei Intimin besteht sie aus der Untereinheit D00 mit unbekannter Funktion, den BIG-Untereinheiten D1 und D2 und einer CTLD (D3) (modifiziert nach Fairman et al, 2012).

1.4 Die Biogenese äußerer Membranproteine

1.4.1 Synthese im Zytoplasma, zytoplasmatische Chaperone

Bakterielle Proteine werden zunächst im Zytoplasma transkribiert und translatiert. Proteine, die zu äußeren Membranproteinen in Gram-negativen Bakterien bestimmt sind, müssen nach ihrer Translation über verschiedene Transportsysteme die innere und die äußere Bakterienmembran sowie das zwischen den Membranen liegende Periplasma durchdringen. Dabei werden sie in ungefaltetem Zustand gehalten, um schließlich durch einen hochkonservierten Komplex, die β -Barrel Assembly Machinery (Bam), in die äußere Membran eingebaut zu werden. Ihre funktionelle Faltung erlangen sie auf bisher ungeklärte Weise (Hagan et al, 2011, Knowles et al, 2009).

Die durch die Translation entstandene Polypeptidkette enthält eine Signalsequenz für das SecYEG-Translokon, einen Membrantunnel, der den Transport des ungefalteten Proteins durch die innere Bakterienmembran vermittelt (Pohlschroder et al, 1997).

Die spätere funktionelle Faltung von Proteinen kann jedoch schon im Zytoplasma gestört werden. So kann es zur Aggregation von Proteinen mit Aminosäureketten anderer Proteine kommen. Auch nach außen gerichtete hydrophobe Aminosäuren, falsch angeordnete Peptidyl-Propyl-Bindungen und Disulfidbrücken können die Aggregation von Proteinen begünstigen (Mogk et al, 2002). Um dies zu verhindern, gibt es in Zellen Hilfsproteine, die neben ihrer antiaggregativen Aktivität auch an der korrekten Faltung von Proteinen beteiligt sind (Gething & Sambrook, 1992). Sie werden als molekulare Chaperone bezeichnet (Hartl & Hayer-Hartl, 2002). Viele dieser Hilfsproteine sind während der Evolution hoch konserviert worden (Gething & Sambrook, 1992) und werden von den Zellen konstitutiv exprimiert. Unter Stressbedingungen, zum Beispiel einer erhöhten Umgebungstemperatur, kann die Expression jedoch verstärkt werden. Das ist auch für die Expression der Hitzeschockproteine Hsp60 mit ihrem wichtigsten Vertreter **GroEL** (so bezeichnet in *E. coli*) und der Hitzeschockproteine Hsp70 mit **DnaK** (in *E. coli*) der Fall. DnaK ist dabei nicht nur in der Lage, Proteine ungefaltet zu halten, sondern kann zudem falsch gefaltete Proteine wieder entfalten (Dougan et al, 2002).

Entscheidend für die Sekretion eines Proteins, das aus dem Zytosol heraustransportiert werden soll, ist auch das zytoplasmatische Chaperon **SecB**. Neben den oben genannten klassischen Aufgaben eines Chaperons bindet SecB nach der Translation des zu sekretierenden Proteins an die Sec-Signalsequenz dieses Proteins (Randall & Hardy, 2002). Anschließend transportiert es das noch ungefaltete Protein zum **SecYEG-Translokon** in der inneren Bakterienmembran. Dieser Transportvorgang ist ATP-abhängig. Der SecB-Proteinkomplex kann an die ATPase SecA binden, die den Energieträger ATP spaltet (Randall & Hardy, 2002). In Folge dessen wird so viel Energie freigesetzt, dass das Protein durch das Sec YEG-Translokon ins Periplasma transportiert wird. Das Sec-Signalpeptid wird dabei durch eine Signalpeptidase abgespalten (Zimmer et al, 2008).

1.4.2 Transport durch das Periplasma, periplasmatische Chaperone

Die äußeren Membranproteine interagieren auch bei ihrem Transport durch das Periplasma mit Chaperonen (Leyton et al, 2012).

Es gibt beispielsweise verschiedene Peptidyl-Propyl-Isomerasen (PPIasen), die eine Peptidbindung zwischen einem Prolin und einer anderen Aminosäure isomerisieren können und somit die korrekte Faltung eines Proteins beschleunigen (Fischer et al, 1984). Dazu gehören auch die Chaperone PpiA, PpiD, FkpA und SurA (Justice et al, 2005).

Es wird vermutet, dass vor allem die drei Chaperone SurA, Skp und DegP eine entscheidende Rolle für den Transport der äußeren Membranproteine zum Bam-Komplex spielen (Ruiz et al, 2006), da ihre Deletion Auswirkungen auf die Proteinlevels von Membranproteinen haben kann (Weirich et al, accepted 2016). Zudem sind die Gene dieser drei Chaperone alle auf dem σ E-Regulon kodiert, dessen Expression durch die Anwesenheit ungefalteter Membranproteine induziert wird.

Das Chaperon **Skp** hat eine trimere Struktur und enthält einen zentralen Hohlraum, um den helikale Fortsätze wie Tentakel angeordnet sind. Es ähnelt damit in seiner Kristallstruktur dem Erscheinungsbild einer Qualle (Walton et al, 2009). Walton et al. haben für das Porin OmpA gezeigt, dass dessen β -Barrel im Hohlraum von Skp gebunden und vermutlich dadurch ungefaltet gehalten wird. Die Deletion von Skp führt

zu reduzierten Levels verschiedener äußerer Membranproteine wie OmpA, C, F und LamB (Chen & Henning, 1996).

DegP fungiert nicht nur als Chaperon, sondern auch als Protease, die falsch gefaltete Proteine abbauen kann. Bei niedrigen Temperaturen überwiegt dabei die Chaperonaktivität, bei hohen Temperaturen die Aktivität als Protease (Spiess et al, 1999).

Bakterien mit einer Deletion des Chaperons **SurA** haben sehr stark reduzierte Levels äußerer Membranproteine in der Membran (Rizzitello et al, 2001, Weirich et al, accepted 2016), was die besondere Bedeutung von SurA für die Biogenese dieser Proteine zeigt. Wird zusätzlich zu SurA auch noch das Chaperon DegP oder Skp deletiert, ist die Bakterienzelle nicht mehr lebensfähig und stirbt ab. Werden dagegen DegP und Skp gleichzeitig deletiert, überlebt das Bakterium, sofern SurA noch funktionsfähig ist. Sklar et al. (2007b) schließen daraus, dass SurA eine Art Hauptchaperon für die meisten äußeren Membranproteine darstellt. Sie folgern, dass SurA die ungefaltete Peptidkette vom Sec-YEG-Translocon übernimmt und sie zum Bam-Komplex in der äußeren Membran liefert, wo sie schließlich eingebaut wird. Skp und DegP könnten zusammen einen alternativen Weg zum SurA-Pathway darstellen (Sklar et al, 2007b).

1.5 Die β -Barrel Assembly Machinery

Die β -Barrel Assembly Machinery (Bam) bildet einen hochkonservierten Komplex an der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien mit einer molekularen Masse von circa 200 kDa (Bakelar et al, 2016). Dieser Komplex ist entscheidend an der Faltung und Membraninsertion der meisten äußeren Membranproteine beteiligt, die die äußere Membran mit ihrer β -Barrel-Struktur durchspannen (Wu et al, 2005).

In *E. coli* besteht der Bam-Komplex aus fünf Komponenten: BamA bis BamE, die in Abbildung 3 schematisch dargestellt sind (Walther et al, 2009).

BamA stellt selbst ein äußeres Membranprotein mit einer β -Barrel-Struktur dar. BamB, C, D und E sind Lipoproteine, die über ihren Lipidanker am N-Terminus an die Innenseite der äußeren Membran gebunden sind (Bakelar et al, 2016; Wu et al, 2005).

Die beiden Komponenten BamA und BamD sind essentiell für die Membraninsertion äußerer Membranproteine und die Lebensfähigkeit Gram-negativer Bakterien. Werden also BamA und BamD deletiert, sterben die Bakterien ab. Die Deletion eines Lipoproteins BamB, C oder E ist zwar mit dem bakteriellen Überleben vereinbar, die Faltung äußerer Membranproteine ist jedoch in solchen Deletionsstämmen gestört. BamB, C oder E werden daher auch als nicht-essentielle Komponenten des Bam-Komplexes bezeichnet (Bakelar et al, 2016, Kim et al, 2012, Sklar et al, 2007a). Die kristalline Struktur der einzelnen Bam-Komponenten (Jansen et al, 2015, Noinaj et al, 2011) sowie des gesamten Bam-Komplexes (Bakelar et al, 2016) wurde bereits entschlüsselt.

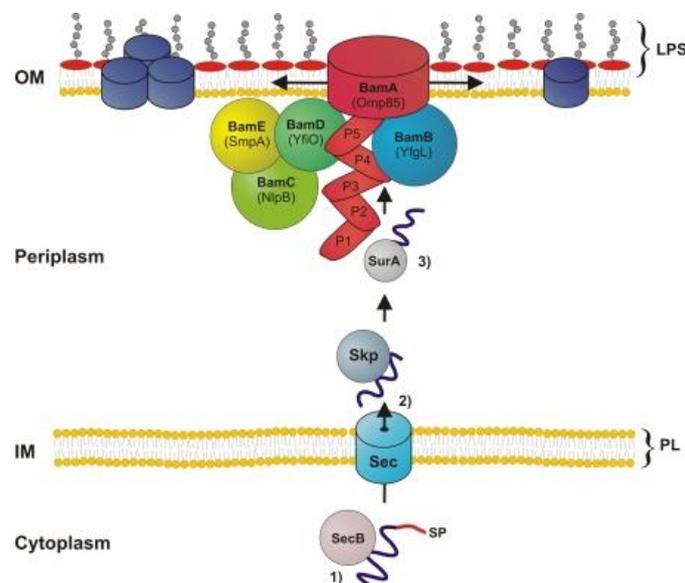


Abb.3: Die Biogenese äußerer Membranproteine (Walther et al, 2009): Äußere Membranproteine werden im bakteriellen Zytoplasma translatiert, durch die Sec-Translokase in den periplasmatischen Raum transportiert (2) und dort durch Chaperone wie Skp und SurA zum Bam-Komplex geleitet (3). Dieser besteht in *E. coli* aus dem äußeren Membranprotein BamA mit seinen POTRA-Domänen P1-P5 und den ins Periplasma ragenden Lipoproteinen BamB-E.

BamA gilt als zentrale Komponente des Bam-Komplexes. Zu BamA homologe Proteine kommen in den äußeren Membranen aller bisher untersuchten Gram-negativen Bakterien vor. Auch in der Membran von Mitochondrien und den Chloroplasten von Pflanzenzellen wurden solche Proteine gefunden (Paschen et al, 2003; Schleiff & Soll, 2005; Voulhoux et al, 2003; Wiedemann et al, 2003). Diese zu BamA homologen

Proteine werden in der sogenannten Omp85-Superfamilie zusammengefasst und sind alle an der Insertion und Translokation von β -Barrel-Proteinen in die Membran beteiligt (Voulhoux et al, 2003). Omp85-Proteine bestehen aus zwei Komponenten: aus N-terminal gelegenen „polypeptide transport associated domains“ (POTRA-Domänen) und einer C-terminalen Transmembrandomäne. Die POTRA-Domänen ragen von der Innenseite der Membran ins Periplasma (Misra, 2007). In *E. coli* hat ein BamA-Molekül fünf solcher POTRA-Domänen. Die Struktur von BamA ist bereits für *Neisseria gonorrhoe* und *Haemophilus ducreyi* (Noinaj et al, 2013) sowie für *E. coli* beschrieben (Albrecht et al, 2014, Bakelar et al, 2016). Die Transmembrandomäne von BamA ist aus einem β -Barrel aufgebaut, das aus 16 antiparallelen β -Einzelsträngen besteht. Der erste und der sechzehnte Strang sind so miteinander verbunden, dass sie das Barrel schließen. Im Inneren enthält das Barrel einen Hohlraum. Gegenüber dem Extrazellulärraum wird es von extrazellulären Loops verschlossen, die sich wie ein Dach auf den Hohlraum legen (Albrecht et al, 2014; Noinaj et al, 2013).

Die **POTRA-Domänen von BamA** sind bedeutsam für die Interaktion mit anderen Proteinen. Bennion et al. konnten in *E. coli* eine Interaktion zwischen der POTRA-Domäne 1 und dem periplasmatischen Chaperon SurA nachweisen (Bennion et al, 2010). Ferner haben Mutationsanalysen bereits vor einigen Jahren gezeigt, dass die POTRA-Domänen 2-5 entscheidend für die Interaktion zwischen BamA und BamB sind. So ist nach einer Deletion einer der POTRA-Domänen 2-5 keine Interaktion mit BamB mehr nachweisbar (Kim et al, 2007). Jansen et al (2015) konnten später in Kristallstrukturanalysen eine Interaktion zwischen BamB und den POTRA-Domänen 3-5 nachweisen. Es kommt zur Bildung eines BamAB-Subkomplexes (Bakelar et al, 2016). Die POTRA-Domäne 5 ist zudem wichtig für die Assoziation mit BamC, D und E, da diese Lipoproteine bei Deletion einer POTRA-Domäne 1-4 noch mit BamA interagieren können. Wird die POTRA-Domäne 5 deletiert, ist dies nicht mehr möglich (Kim et al, 2007). Bakelar et al (2016) konnten zudem zeigen, dass BamE über zahlreiche Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen mit der POTRA Domäne 5 von BamA interagiert. Da BamE eng mit BamC und BamD verbunden ist, wird neben dem bereits beschriebenen BamAB-Subkomplex ein BamACDE-Subkomplex unterschieden (Bakelar et al, 2016).

BamB (früher YfgL) ist mit 42 kDa das größte der vier Lipoproteine des Bam-Komplexes (Noinaj et al, 2011). Seine Aminosäuresequenz ist in vielen Gram-negativen Bakterien hochkonserviert. Es gibt jedoch zwei Bakterienspezies, die in ihrem Genom kein *bamB* kodiert haben. Dies sind *Neisseria meningitidis* und *Neisseria gonorrhoeae* (Knowles et al, 2009).

In den anderen Gram-negativen Bakterienspezies ist BamB zwar nicht essentiell für das bakterielle Überleben, nimmt aber dennoch wichtige Funktionen innerhalb des Bam-Komplexes wahr. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Gram-negative Bakterien mit einer Deletion von *bamB* eine erhöhte Sensitivität gegenüber den antibiotisch wirksamen Substanzen Rifampicin und Novobiocin sowie gegenüber SDS aufweisen (Onufryk et al, 2005, Weirich et al, accepted 2016). Dies kann als Hinweis auf eine gesteigerte Membranpermeabilität gelten, die einen Durchtritt der Substanzen in das Innere der Bakterienzelle ermöglicht.

Für einen adhären-invasiven *E. coli*-Stamm sowie für *Yersinia enterocolitica* wurde zudem nachgewiesen, dass die Deletion von *bamB* die Pathogenität und Fähigkeit des Erregers zur Invasion abschwächt (Rolhion et al, 2005, Weirich et al, accepted 2016).

Noinaj et al (2011) haben die kristalline Struktur von BamB entschlüsselt (Noinaj et al, 2011). In Abbildung 4 ist der Aufbau von BamB schematisch dargestellt. BamB besteht aus einem β -Propeller-Fold, der aus acht Untereinheiten aufgebaut ist. Diese Untereinheiten sind ringförmig um eine zentrale Achse angeordnet und bestehen aus jeweils vier antiparallel zueinander angeordneten β -Faltblättern. Sie sind durch Interconnecting loops (IL) miteinander verbunden. Es wird vermutet, dass BamB mit seinen β -Faltblattstrukturen als eine Art Faltungsvorlage für die entstehenden β -Faltblattstrukturen von Substratproteinen darstellt (Heuck et al, 2011) und diese stabilisiert (Knowles et al, 2009). Durch seine Verbindung mit den POTRA-

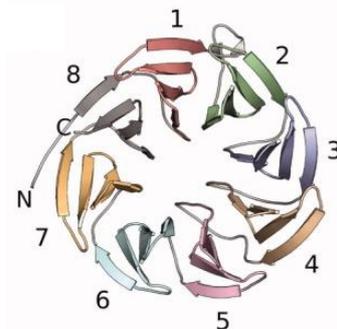


Abb. 4: BamB-Strukturmodell nach (Kim et al, 2012). BamB hat die Struktur eines β -Propeller-Fold aus 8 ringförmig angeordneten Untereinheiten (1-8). Jede Untereinheit besteht aus vier antiparallel angeordneten β -Faltblättern, welche durch IL miteinander verbunden sind.

Domänen von BamA (Bakelar et al, 2016), könnte es diese optimal für eine Interaktion mit den anderen Komponenten des Bam-Komplexes und den periplasmatischen Chaperonen ausrichten (Noinaj et al, 2011).

Die Bedeutung von **BamC** (früher NlpB) in der Biogenese äußerer Membranproteine ist noch unklar (Knowles et al, 2009). Es wurde bereits gezeigt, dass *E. coli* Stämme mit einer Deletion von *bamC* eine erhöhte Sensitivität gegenüber Rifampicin und damit eine möglicherweise erhöhte Membranpermeabilität aufweisen (Onufryk et al, 2005). Die Proteinlevels äußerer Membranproteine können bei solchen Deletionsstämmen leicht reduziert sein (Wu et al, 2005). Ferner wird der BamCDE-Subkomplex durch das Fehlen von BamC destabilisiert. BamB und Bam D weisen dann eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Proteasen auf (Bakelar et al, 2016, Webb et al, 2012). BamC ist jedoch nicht in allen Gram-negativen Bakterien vertreten. So konnte in den α -Proteobakterien mit bereits entschlüsseltem Genom kein zu BamC homologes Protein gefunden werden (Knowles et al, 2009).

BamC hat ein Molekulargewicht von 38 kDa und besteht aus drei Domänen, die sich unabhängig voneinander falten: einer Domäne am N-Terminus, die keine Sekundärstruktur einnimmt (Kim et al, 2011) und zwei weiteren Untereinheiten mit einer überwiegend helikalen Struktur (Kim et al, 2012; Warner et al, 2011). Dabei ist die Aminosäuresequenz der ungeordneten N-terminalen Domäne am höchsten konserviert. Diese konservierte Region bindet an BamD und ermöglicht damit die Ausbildung eines BamCD-Subkomplexes, der in Abbildung 5 schematisch dargestellt ist (Kim et al, 2011). Kim et al. vermuten eine regulierende Wirkung von BamC, die die Interaktion von BamD mit Substratmolekülen moduliert (Albrecht & Zeth, 2011).

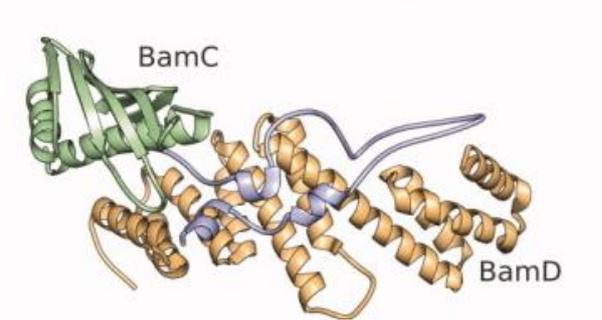


Abb. 5: Strukturmodelle von BamC und BamD (Kim et al, 2012). BamC besteht aus einer N-terminalen, eher unstrukturierten Region (in blau dargestellt). Diese bildet einen langen Loop, welcher mit BamD (in beige) interagiert, wie Co-Kristallisationsversuche gezeigt haben. Die beiden anderen Untereinheiten von BamC nehmen eine überwiegend helikale Struktur ein (Kim et al, 2012).

BamD (früher YfiO) ist als einziges essentielles Lipoprotein des Bam-Komplexes ubiquitär in allen untersuchten Gram-negativen Bakterienspezies vertreten (Malinverni et al, 2006). Seine Struktur ist -verglichen mit den anderen vier Lipoproteinen- am höchsten konserviert.

Neben der Interaktion mit der POTRA-Domäne 5 von BamA (Bakelar et al, 2016, Kim et al, 2007) konnte auch eine Interaktion von BamD mit BamC und BamE nachgewiesen werden (Bakelar et al, 2016, Malinverni et al, 2006).

BamD enthält mehrere sogenannte Tetratricopeptide-Repeats (TPR), die aus sich wiederholenden Sequenzen mit 34 Aminosäuren aufgebaut sind. TPR-Motive sind dafür bekannt, Protein-Protein-Interaktionen zu vermitteln (Blatch & Lassle, 1999; D'Andrea & Regan, 2003). Es wird vermutet, dass diese nicht nur eine Rolle für die Bindung der anderen Bam-Komponenten, sondern auch für die Bindung von Substratproteinen an BamD spielen (Kim et al, 2007).

BamE (früher SmpA) ist mit einem Molekulargewicht von 11 kDa der kleinste Bestandteil des Bam-Komplexes. Alle Alpha-, Beta- und Gamma-Proteobakterien haben ein Gen für BamE. BamE bindet spezifisch an Phosphatidylglycerol, welches den Einbau von äußeren Membranproteinen in Lipiddoppelschichten erhöhen kann (Gatsos et al, 2008). Eine Deletion von *bamE* verringert die Stabilität des Bam-Komplexes (Sklar et al, 2007a). Daher wird vermutet, dass dieses Lipoprotein eine besondere

Funktion für die strukturelle Integrität des Bam-Komplexes besitzt. Zudem ist bei seiner Deletion die Sensitivität der betroffenen Bakterienstämme gegenüber SDS und Rifampicin erhöht (Sklar et al, 2007a), was für eine Beeinträchtigung der Barrierefunktion der äußeren Bakterienmembran spricht.

Die Struktur von BamE ähnelt der Sekundärstruktur der POTRA-Domänen des BamA-Moleküls. Es ist daher denkbar, dass BamE -ebenso wie die POTRA-Domänen von BamA- andere Komponenten des Bam-Komplexes und ungefaltete äußere Membranproteine binden kann und eventuell deren Faltung zu einer β -Barrel-Struktur unterstützt (Knowles et al, 2011).

1.6 Modellvorstellungen zum Mechanismus der Membraninsertion bei Autotransportern

1.6.1 Faltung des β -Barrels von Autotransportern und Einbau der Transmembrandomäne in die äußere Bakterienmembran

Der genaue Mechanismus, mit welchem Autotransporter in die äußere Bakterienmembran inserieren, ist bislang nicht bekannt. Es existieren jedoch Modelle, die beschreiben, wie sich die β -Barrel-Struktur des C-terminal gelegenen Transmembrananker der Autotransporter formen und deren N-terminale Effektordomäne in den Extrazellulärraum verlagert werden könnte. Im Gegensatz zur Translokation über die innere Bakterienmembran liegt hier ein energieunabhängiger Vorgang vor (Knowles et al, 2009).

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass der Bam-Komplex -insbesondere BamA- für die Membraninsertion verschiedener Autotransporter notwendig ist. Ebenso wurde gezeigt, dass die Effektordomänen von Autotransportern nach Deletion von BamA nicht mehr in den Extrazellulärraum sekretiert werden können (Leyton et al, 2012). Aufgrund der nachgewiesenen Interaktion zwischen BamA in *E. coli* und SurA (Bennion et al, 2010) wird vermutet, dass ein noch ungefalteter Autotransporter mit Hilfe des periplasmatischen Chaperons SurA zu BamA transportiert wird (Leyton et al, 2012).

Ausgehend von der Strukturähnlichkeit zwischen dem β -Barrel von BamA und dem noch nicht eingebauten äußeren Membranprotein wurde das sogenannte „Pore-Folding“-Modell entwickelt. Dieses Modell geht davon aus, dass die noch ungefalteten Membranproteine zum Bam-Komplex geliefert und dort in die Pore eingefädelt werden, die durch das β -Barrel von BamA gebildet wird. Das β -Barrel von BamA könnte dabei als eine Art Faltungsvorlage für den Transmembrananker der Membranproteine dienen. Diese könnten in der Pore von BamA ihre β -Barrel-Struktur annehmen und anschließend aus der Pore in die Lipiddoppelschicht der äußeren Bakterienmembran entlassen werden (Knowles et al, 2009). Diese Vorstellung wird durch Strukturanalysen von BamA in *Neisseria gonorrhoeae* und *Haemophilus ducreyi* gestützt (Noinaj et al, 2013). BamA ist laut diesen Analysen in der Lage, zwei verschiedene Konformationen anzunehmen: eine offene Struktur, bei der das β -Barrel von BamA in seinem Inneren nahezu leer und vom Periplasma aus zugänglich ist und eine zweite Konformation, bei der das β -Barrel gegenüber dem Periplasma unter anderem durch die POTRA-Domäne 5 verschlossen wird. Damit könnte ein Mechanismus gefunden worden sein, mit dem ungefaltete Autotransporter einen Zugang in die β -Barrel-Pore von BamA erhalten. Die POTRA-Domäne 5 könnte diesen Zugang öffnen und verschließen und somit regulieren (siehe Abb. 6) (Albrecht et al, 2014).

Ferner konnten Noinaj et al. (2013) in Moleküldynamik-Simulationen zeigen, dass sich die Pore im Inneren des β -Barrels von BamA lateral öffnen kann, indem der erste und der 16. Strang, die das Barrel zirkulär verschließen, auseinanderweichen (Noinaj et al, 2013). Entsprechend des Modells könnte sich eine Art BamA-/Substrat-Hybridbarrel bilden, von dem sich das Substratbarrel schließlich lösen und auf diesem Wege in die äußere Bakterienmembran entlassen werden. Dieser Vorgang würde noch durch die Tatsache erleichtert werden, dass das C-terminale Ende des β -Barrels von BamA im Vergleich zum weiter N-terminal gelegenen Ende des Barrels eine weniger hydrophobe Oberfläche aufweist. Dadurch kann die äußere Bakterienmembran in der unmittelbaren Umgebung des C-terminalen β -Barrels destabilisiert werden (Noinaj et al, 2013).

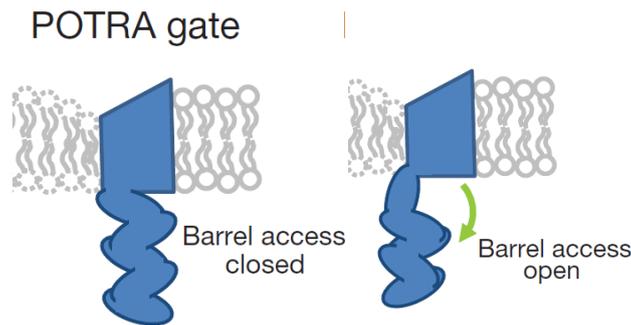


Abb. 6: geöffnete und geschlossene Konformation des β -Barrels von BamA durch Anordnung der POTRA-Domänen (Noinaj et al., 2013)

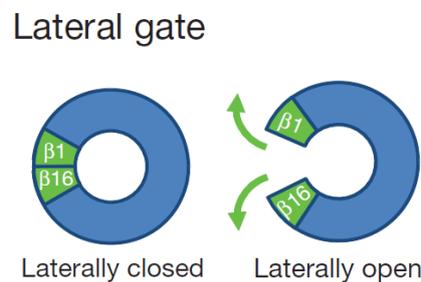


Abb. 7: Darstellung der seitlichen Öffnung des β -Barrels von BamA durch Auseinanderweichen des ersten und 16. Stranges (modifiziert nach Noinaj et al. (2013)).

1.6.2 Translokation der Effektor-domäne in den Extrazellulär-raum

Zusätzlich zu dem Einbau des β -Barrels in die äußere Bakterienmembran muss die Effektor-domäne des Autotransporters nach extrazellulär transloziert werden. Auch dieser Vorgang ist noch nicht vollständig geklärt. Bisher haben sich jedoch zwei mögliche Modelle durchgesetzt, die den Vorgang der Translokation beschreiben könnten: das sogenannte „Hairpin-Modell“ und das BamA-Modell (Leyton et al, 2012).

1.6.2.1 Das Hairpin-Modell

Das „**Hairpin-**“ (deutsch: „Haarnadel-“) „**Modell**“ geht davon aus, dass die Effektor-domäne in das Innere der β -Barrel-Pore des Autotransporters eingefädelt und durch diese vom Periplasma an die Zelloberfläche geführt wird.

Dieses Modell beruht auf Untersuchungen an Autotransporter mit nicht abgeschlossener Translokation ihrer Effektor-domäne (Junker et al, 2009; Oberhettinger et al, 2015). Junker et al. (2009) konnten zeigen, dass diese Autotransporter mit unvollständiger

Translokation das C-terminale Ende der Effektor-domäne an der bakteriellen Zelloberfläche exprimieren. Dies hat zu der Vermutung geführt, dass dieses C-terminale Ende das Innere der β -Barrel-Pore des Autotransporters zu Beginn der Translokation durchspannt, im Extrazellulär-raum eine Art Haarnadelkurve vollzieht und ein zweites Mal durch das Innere der Pore bis in das bakterielle Periplasma zieht, wo sich das N-terminale Ende der Effektor-domäne befindet. Tatsächlich ist es kürzlich gelungen, die Bildung eines Hairpins bei der Translokation der Effektor-domäne des inversen Autotransporters Intimin experimentell nachzuweisen (Oberhettinger et al, 2015).

Nach dem Hairpin-Modell würde das C-terminale Ende im weiteren Verlauf der Translokation als statischer Strang in der β -Barrel-Pore verbleiben. Das N-terminale Ende würde durch die Pore in den Extrazellulär-raum gleiten und könnte dort beispielsweise sekretiert werden.

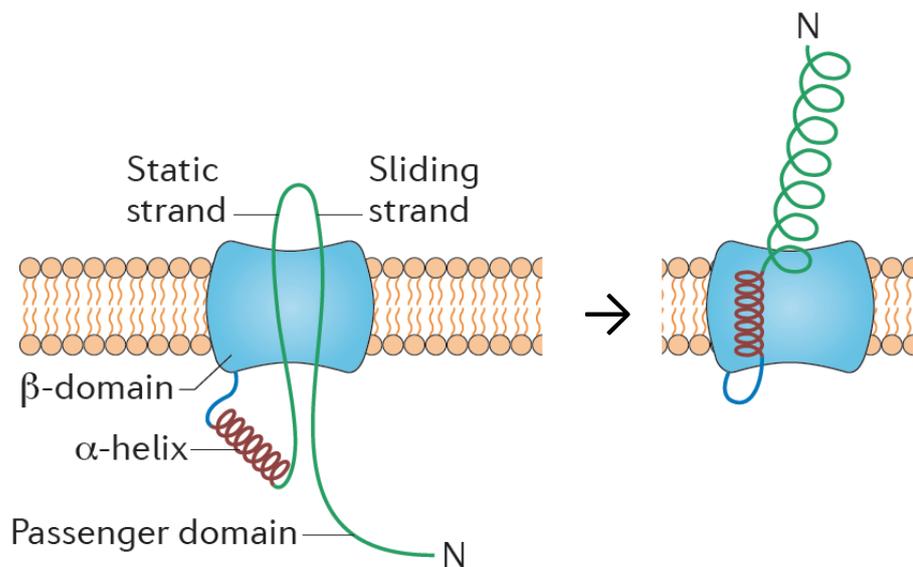


Abb. 8: Das Hairpin-Modell für die Translokation der Effektor-domäne von Autotransportern (modifiziert nach Leyton et al. (2012): Entsprechend dieses Modells wird die Effektor-domäne durch das Innere der β -Barrel-Pore des Autotransporters in den Extrazellulär-raum transloziert.

1.6.2.2 Das BamA-Modell

Während die Effektor-domäne nach dem klassischen „Hairpin-Modell“ ohne Beteiligung weiterer Hilfsproteine transloziert wird, erfolgt die Translokation nach dem „**BamA-Modell**“ an oder in der Pore des β -Barrels von BamA. Crosslinking-Experimente an

dem inversen Autotransporter Intimin mit unvollständig translozierter Effektor-domäne aber vollständig gefaltetem β -Barrel haben gezeigt, dass diese Autotransporter eine stärkere Interaktion mit BamA und SurA aufweisen als Intiminmoleküle, die ihre Effektor-domäne vollständig translozieren können (Oberhettinger et al, 2015). Die Interaktion mit SurA könnte darauf hindeuten, dass die Effektor-domäne während der Ausbildung der Hairpin-Struktur noch nicht vollständig gefaltet ist und von SurA in dieser Konformation gehalten beziehungsweise in seiner korrekten Faltung unterstützt wird. Ferner lässt sich aufgrund der nachgewiesenen Interaktion schließen, dass BamA an der Translokation der Effektor-domäne des untersuchten Autotransporters beteiligt ist. Daher ist eine Kombination aus „BamA“- und „Hairpin-Modell“ wahrscheinlich (Leyton et al, 2012; Oberhettinger et al, 2015).

Leyton et al. (2012) haben verschiedene Möglichkeiten beschrieben, nach denen „BamA“- und „Hairpin-Modell“ miteinander vereinbar wären. Zum einen ist denkbar, dass BamA und der Autotransporter eine Art Hybridbarrel in der äußeren Membran bilden (Noinaj et al, 2013). Anschließend könnte die Effektor-domäne des Autotransporters innerhalb der Pore des Hybridbarrels mittels Hairpin-Mechanismus in den Extrazellulärraum verbracht und der gefaltete Autotransporter nach lateral in die äußere Membran entlassen werden (Abb. 9(a); Leyton et al. 2012). Diese Vorstellung ist zudem mit dem „Pore-Folding-Modell“ (Knowles et al, 2009) -wie unter 1.6.1 beschrieben- vereinbar.

Ferner ist eine Interaktion des Autotransporters mit der Außenseite des β -Barrels von BamA möglich. Die Effektor-domäne des Autotransporters könnte hier ebenfalls mittels Hairpin-Mechanismus transloziert werden, während dessen β -Barrel an der Außenseite von BamA in unvollständig gefaltetem Zustand gehalten wird (Abb. 9(b), Leyton et al, 2012).

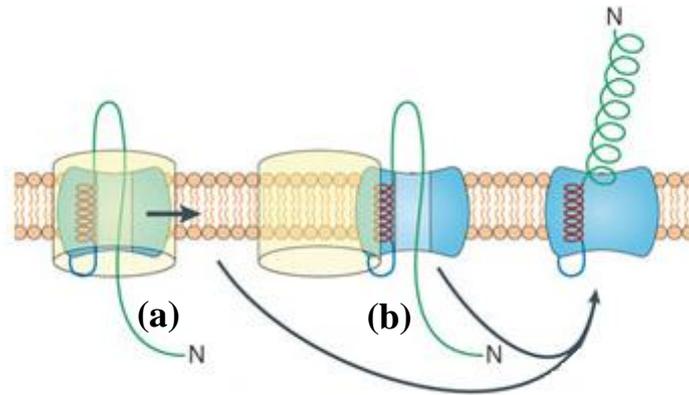


Abb 9: „BamA“- und „Hairpin-Modelle“ für die Translokation der Effektor-domäne von Autotransportern (modifiziert nach Leyton et al. 2012): (a) Möglichkeit 1: Die Membraninsertion des β -Barrel eines Autotransporters könnte durch Hybridbildung mit dem β -Barrel von BamA erfolgen. Innerhalb der Pore des Hybridbarrels könnte die Effektor-domäne mittels Hairpin-Mechanismus transloziert werden. (b) Möglichkeit 2: Die Translokation der Effektor-domäne eines Autotransporters erfolgt nach diesem Modell an der Außenseite des β -Barrels von BamA.

1.7 Zielsetzung

Die Autotransporter-Adhäsine YadA und Invasin aus *Yersinia enterocolitica* und Intimin aus EHEC und EPEC sind äußere Membranproteine und bedeutende Pathogenitätsfaktoren dieser Gram-negativen Bakterien, die unter anderem schwere Durchfälle auslösen können.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Vorgang der Biogenese und Membraninsertion von YadA, Invasin und Intimin in die äußere Bakterienmembran genauer zu untersuchen und insbesondere die Bedeutung der β -Barrel Assembly Machinery Komponenten BamB, BamC und BamE für deren Biogenese zu ermitteln. BamB, BamC und BamE sind für das bakterielle Überleben nicht-essentielle Komponenten des Bam-Komplexes in *E. coli* und *Yersinia enterocolitica*.

In dieser Arbeit sollten *E. coli* HB101 Δ BamB, Δ BamC und Δ BamE-Stämme zunächst phänotypisch charakterisiert werden und dazu in Bezug auf ihr Wachstumsverhalten unter günstigen Wachstumsbedingungen und unter Stressbedingungen untersucht werden. Auch die Sensibilität der verschiedenen Stämme gegenüber ausgewählten antimikrobiellen Substanzen sollte verglichen werden.

Es ist bereits bekannt, dass die Deletion einer dieser nicht-essentiellen Komponenten zu reduzierten Konzentrationen von Porinen und bestimmten äußeren Membranproteinen wie FimD und LamB führen kann.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, ob BamB, BamC und BamE auch bedeutsam für die Biogenese von YadA als Prototyp der trimeren Autotransporter und Invasin und Intimin als Vertreter der inversen Autotransporter sind. Dazu sollte die Menge an stabil inseriertem YadA, Invasin und Intimin in äußeren Membranen von *E. coli* HB101 mit Deletion einer dieser nicht-essentiellen Komponenten bestimmt werden. Ferner sollte untersucht werden, ob neben SurA, DegP und Skp noch weitere Chaperone entscheidend an der Biogenese von Invasin beteiligt sind.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Agarose-Gel-Elektrophoresekammer	BioRad Laboratories GmbH, München
Analysenwaage (R160P, PT 1200)	Sartorius AG, Göttingen
Bakterienbrutschrank (B20)	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Bio Photometer 6131	Eppendorf AG, Hamburg
Easypet Pipettierhilfe	Eppendorf AG, Hamburg
Eismaschine AF 20	Scotsman Ice Systems, Frimont S.P.A, Mailand
Elektroporationsapparatur	BioRad Laboratories GmbH, München
ELISA Reader	Tecan Group AG, Crailsheim
Entwicklermaschine Curix 60	AGFA Graphics GmbH & Co KG, Düsseldorf
Exzenter-Mischer	Greiner GmbH, Nürtingen
Gefrierschrank (-20°C)	Philipp Kirsch GmbH, Offenburg
Gefriertruhe (-80°C)	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Gelelektrophoreseapparatur Power Pac 1000	BioRad Laboratories GmbH, München
Gelschüttler Unimax 2010	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Kelheim
Immunoblotting-Apparaturen Mini-Protean III und Mini-Trans-Blot Cell	BioRad Laboratories GmbH, München
Inkubationsschüttler für Bakterienkulturen	Infors AG, Bottmingen
Laminar-Flow Sicherheitswerkbank (BDK-S 1800)	BDK Luft-und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen

Licor Odyssey 3191	Licor Biosciences GmbH, Bad Homburg
Magnetrührer Ika RCT basic	Ika Labor Technik GmbH & Co KG, Staufen
Micromat Mikrowellenherd	AEG, Frankfurt a.M.
PCR-Thermocycler T3	Biometra GmbH, Göttingen
pH-Meter inoLab Level 2	WTW GmbH, Weilheim i.OB
Pipetten Eppendorf Reference (0,5 – 10 µl, 2 – 20 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Mehrkanalpipette Research (50 µl -200 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Spannungsquellen Power Pac 200, Power Pac 300	BioRad Laboratories GmbH, München
Sunrise Plattenphotometer	Tecan Group AG, Crailsheim
Tecan Rader Infinite 200 Pro	Tecan Group AG, Crailsheim
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Ultrazentrifuge Optima LE-80K mit Rotor SW41TE	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Ultrazentrifuge Optima Max E mit Rotor TLA 100.3	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
UV-Transluminator (Bio Doc Analyse)	Biometra, Göttingen
Vakuumpumpe CVC 2000	Vacuubrand GmbH & Co KG, Wertheim
Vortexer	Multimed Wicker GmbH, Kirchheim u. Teck
Zentrifuge Eppendorf 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Multifuge 3S-R	Heraeus GmbH, Hanau

2.1.2 Mess- und Reaktionsgefäße

Tabelle 2: Mess- und Reaktionsgefäße

Glasflaschen	Schott AG, Mainz
Glaskolben	Schott AG, Mainz

Messzylinder	Schott AG, Mainz
Reaktionsgefäße 50 ml und 14 ml Falcon	Becton Dickinson Benelux N.V., Heidelberg
Reaktionsgefäße, 1,5 ml und 2 ml	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster
Reaktionsgefäße 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Ultrazentrifugenröhrchen 15 ml und 3 ml	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Blottingpapier	Munktell & Filtrak GmbH, Bärenstein
Einwegpipetten (1, 2, 5, 10, 25 und 50 ml)	Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam
Elektroporationsküvetten	BioRad Laboratories GmbH, München
Impfösen	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Küvette, halbmikro	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Nitrocellulosemembran Protran, 45 µm	Whatman GmbH, Dassel
Pipettenspitzen (weiß, blau, gelb)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Röntgenfilme	Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn
Skalpelle	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
24-well-Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
96-well-Platten	Nunc A/S, Roskilde

2.1.4 Chemikalien

Tabelle 4: Chemikalien

Acrylamid Stocklösung 30% mit 0,8% Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Agarose, LE	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck KGaA, Darmstadt
Anhydrotetracyclin (AHTC)	IBA GmbH, Göttingen
Arabinose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
BSA (Bovine Serum Albumin)	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Bradford-Reagenz	BioRad Laboratories GmbH, München
Bromphenolblau	AppliChem GmbH, Darmstadt
Coumarinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt
Harnstoff	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Isopropanol 10% Lösung	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumacetat (KAc)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Luminol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Magermilchpulver, Sucofin	TSI GmbH & Co. KG, Zeven
Manganchlorid (MnCl ₂)	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	VWR Int. GmbH, Fontenay-Sous-Bois (Frankreich)
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt
OrangeG	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phosphatgepufferte Saline (PBS)	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Ponceau S	AppliChem GmbH, Darmstadt
Salzsäure (HCl) 32% Lösung	Merck KGaA, Darmstadt
Sucrose	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tetraethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trishydroxymethylaminomethan (Trizma-Base)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Triton X-100	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tween 20	Merck KGaA, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30% Lösung	Merck KGaA, Darmstadt

2.1.5 Puffer und Lösungen

2.1.5.1 Puffer für mikrobiologische Methoden

Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Tabelle 5: Reaktionslösungen zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Reaktionslösung I	30 mM KAc, 100 mM KCl, 10 mM CaCl ₂ , 50 mM MnCl ₂ , Essigsäure, H ₂ O, pH-Wert 5,8, sterilfiltriert
Reaktionslösung II	10 mM MOPS, 15 mM CaCl ₂ , 10 mM KCl, 15 % Glycerin, H ₂ O, autoklaviert

2.1.5.2 Puffer für molekularbiologische Methoden

Agarosegelelektrophorese

Tabelle 6: Puffer für die Agarosegelelektrophorese

OrangeG Ladepuffer	Für 100 ml: 43,5 ml Glycerin, 200 mg OrangeG, Milipore-H ₂ O
5×TBE-Puffer	54 g/l Tris-Base, 27,5 g/l Borsäure, 10 mM EDTA, Essigsäure, H ₂ O, pH-Wert 8,3 Als Laufpuffer wurde 0,5×TBE-Puffer verwendet.

Kommerzielle Puffer für Restriktionsenzyme

(Hersteller: Fermentas Thermo Scientific, St.Leon-Rot)

Puffer Blue, Puffer Tango, Puffer Red

Plasmidisolierung

Tabelle 7: Lösungen für die Plasmidisolierung

Lösung 1	25 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 50 µg/ml RNase A; Milipore-H ₂ O Lagerung bei 4°C
Lösung 2	0,2 M NaOH; 1% SDS; H ₂ O
Lösung 3	3 M Kaliumacetat; Essigsäure; Milipore-H ₂ O pH 4,8

2.1.5.3 Puffer für proteinbiochemische Methoden

SDS-Page, Immunoblotting

Tabelle 8: Lösungen, Inkubationsmedien und Puffer für SDS-Page und Immunoblotting

10% Ammoniumpersulfatlösung	10% APS in H ₂ Odest (w/v)
Coomassie Blue Färbelösung	0,25% (w/v) Brilliant Blue R; 8% Essigsäure; 40% Methanol; Milipore-H ₂ O

Material und Methoden

Coomassie Blue Entfärbelösung	40% Methanol (v/v); 10% Eisessig (v/v); 50% Milipore-H ₂ O
Coumarinsäurelösung	0,15 g Coumarinsäure mit DMSO auf 10 ml auffüllen
ECL-Lösung A	250 µl Luminollösung; 220 µl Coumarinsäurelösung; 24,53 ml 100 mM Tris HCl (pH 8,5)
ECL-Lösung B	H ₂ O ₂ 30% 25 µl, 24,975 ml 100 mM Tris HCl (pH 8,5)
Inkubationsmedium für anti-Kaninchen IgG (H+L) DyLight™ 800 Conjugated-Antikörper	PBS mit 0,1% Tween, 0,01% SDS und 3% BSA
Luminollösung	0,22 g Luminol mit DMSO auf 5 ml auffüllen
Ponceau Rouge	10 g Ponceau S; 15 ml Trichloressigsäure; 150 g Sulfosalicylsäure; aqua ad 500 ml
Rezept für 4-6 12% Gele	Trenngel: 8,2 ml H ₂ O; 6,3 ml 1,5M Tris/HCl (pH8,8); 0,25 ml 10% SDS Lösung; 10 ml Acrylamid-Stocklösung 30%; 0,25 ml 10% APS-Lösung; 0,01 ml TEMED Sammelgel: 4,1 ml H ₂ O; 0,75 ml 1,0M Tris/HCl (pH6,8); 0,06 ml 10% SDS Lösung; 1 ml Acrylamid-Stocklösung 30%; 0,06 ml 10% APS-Lösung; 0,006 ml TEMED
SDS-Laufpuffer (5x)	60,55 g Trizma-Base; 288,15 g Glycin; 100 ml 10% SDS (w/v); aqua ad 2 l
10% SDS-Lösung	10% SDS in H ₂ Odest (w/v)
SDS-Probenpuffer (5x) (Laemmli Puffer)	2,5 ml 1 M TrisHCl (pH 6,8); 5 ml Glycerin; 1 g SDS; 0,77 g DTT; 0,5% Bromphenolblau; aqua ad 10 ml H ₂ Odest
Western Blot-Puffer (10x)	60 g Trizma-Base; 288,8 g Glycin; aqua ad 2 l
Western Blot Waschpuffer (10x)	180 g NaCl; 24,2 g Trizma-Base; 100 ml Tween 20; aqua ad 2 l

Präparation äußerer Membranen und Harnstoffextraktion

Tabelle 9: Puffer zur Präparation äußerer Membranen und zur Harnstoffextraktion

Lysepuffer	0,5 M Trizma-Base; 1M Sucrose; 1mM EDTA; HCl; H ₂ O; pH8
Extraktionspuffer für die Präparation äußerer Membranen	2% Triton X-100; 50 mM Trizma; 10mM MgCl ₂ ; HCl; H ₂ O; pH8
Harnstoffextraktionspuffer	6 M Harnstoff; 100 mM Glycin; 15 mM TrisHCl (pH 7,4)

2.1.6 Nährmedien

Tabelle 10: Nährmedien

LB-Agar	15g Agar/l LB-Medium
LB-Medium (Luria Bertani)	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl und destilliertes Wasser, NaOH, pH-Wert 7,0, autoklaviert
LB-Medium mit 20% Glycerin	Zum LB-Medium wurden 20% Glycerin gegeben.
LB-Softagar	Für 1 l: 20 g LB-Medium, 8 g Agar, 800 ml destilliertes Wasser
SOC-Medium	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO ₄ , 10 mM MgCl ₂ und destilliertes Wasser, autoklaviert

2.1.7 Arzneimittel und für Forschung oder mikrobiologische Diagnostik hergestellte Antibiotika

Tabelle 11: Arzenimittel und Antibiotika

Bezeichnung	Kommentar	Hersteller
Ampicillin (Amp.)	Konzentration der Stockösung in Ampuwa: 100 mg/ml Verdünnung der Stocklösung in Bakterienkulturen: 1:1.000	ICN Biomedicals, Eschwege
Ampuwa		Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H.
Aqua ad injectabilia		B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Chloramphenicol (Cm.)	Konzentration der Stocklösung in 100% Ethanol: 50 mg/ml Verdünnung der Stocklösung in Bakterienflüssigkulturenkulturen: 1:2.000; Verdünnung in Agar: 1:1.000	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kanamycinsulfat (Kana.)	Konzentration der Stocklösung in Ampuwa: 50 mg/ml Verdünnung der Stocklösung in Bakterienkulturen: 1:1.000	AppliChem GmbH, Darmstadt
Spectinomycin (Spec.)	„	„
Sensi-Disc™ Testblättchen: Bacitracin 10 IE; Erythromycin 15 µg; Rifampicin 5 µg; Vancomycin 30 µg		BD Biosciences Deutschland, Heidelberg

Die Antibiotika Ampicillin, und Kanamycinsulfat lagen in Pulverform vor. Ampicillin und Kanamycin wurden in Ampuwa, Chloramphenicol in Ethanol gelöst und zunächst bei -20°C, nach erstmaligem Gebrauch bei 4°C gelagert. Diese Lösungen konnten zur Selektion resistenter Stämme in Bakterienkulturen zugegeben werden.

2.1.8 Bakterienstämme

Tabelle 12: verwendete Bakterienstämme

Stamm	Beschreibung / Insertion / Deletion	Resi- stanz	Herkunft / Referenz
<i>E. coli</i> HB101 wildtype	hsd 20 (r _B ⁻ , m _B ⁻ , recA13, rps L20, leu, proA2)	---	(Rossiter et al, 2011)
<i>E. coli</i> HB101 ΔBamB (ΔyfgL)	<i>bamB</i> :: kan	Kana.	"
<i>E. coli</i> HB101 ΔBamC (ΔnlpB)	<i>bamC</i> :: kan	"	"
<i>E. coli</i> HB101 ΔBamE (ΔsmpA)	<i>bamE</i> :: kan	"	"
<i>E. coli</i> DH5α	<i>endA1 hsdR17</i> (r k-mk+) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA</i> <i>relA1Δ</i> (<i>lacZYA-argF</i>)U169 (Φ80lacZΔM15)		(Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i> BW25113 wildtype C-12	rrn B3 ΔlacZ4787 hsd R514 Δ(<i>araBAD</i>) 567 Δ(<i>rhaBAD</i>)568 rph-1	---	Keio Collection, (Baba et al, 2006)
<i>E. coli</i> BW25113 ΔdegP	degP :: kan	Kana.	"
<i>E. coli</i> BW25113 ΔsurA	surA :: kan	"	"
<i>E. coli</i> BW25113 Δskp (ΔhlpA)	skp :: kan	"	"
<i>E. coli</i> BW25113 ΔppiA	ppiA :: kan	"	"
<i>E. coli</i> BW25113 ΔppiD	ppiD :: kan	"	"
<i>E. coli</i> BW25113 ΔfkpA	fkpA :: kan	"	"

<i>E. coli</i> BW25113 Δ clpP	clpP :: kan	"	"
<i>E. coli</i> BW25113 Δ dnaK	dnaK :: kan	"	"
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:8 WA-314 wildtype	mit pYV-Plasmid YadA wt	Nal. Spec. Kana.	(Schütz et al, 2010, Weirich et al, accepted 2016)
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:8 WA-314 Δ Inv		Nal. Spec. Kana.	(Weirich et al, accepted 2016)
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:8 WA-314 Δ BamB		"	Johanna Weirich (Weirich et al, accepted 2016)
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:8 WA-314 Δ BamC		"	"
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:8 WA-314 Δ BamE		"	"
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:8 WA-314 Δ SurA		"	"
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:8 WA-314 Δ DegP		"	"
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:8 WA-314 Δ Skp		"	"

2.1.9 Plasmide

Tabelle 13: verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Resistenz	Herkunft / Referenz
pASK-IBA2	Expressionsvektor durch AHTC induzierbarer Promotor	Amp.	IBA Technologies GmbH, Göttingen
pASK-IBA2_invA	<i>invA</i> -Gen zwischen den Xba I-Hind III-Schnittstellen des paSK-IBA2-Plasmids	"	(Oberhettinger et al, 2012)
pASK-IBA2_yadA	<i>yadA</i> -Gen zwischen den Xba I-Hind III-Schnittstellen des paSK-IBA2-Plasmids	"	(Grosskinsky et al, 2007)
pASK-IBA2_int	<i>int</i> -Gen zwischen den Xba I-Hind III-Schnittstellen des paSK-IBA2-Plasmids	"	(Oberhettinger et al, 2012)
pBAD28	Klonierungsvektor durch Arabinose induzierbarer Promotor	Amp., Cm.	(Guzman et al, 1995)
pBAD28_bamB	bamB Gen zwischen den Xba I-Hind III-Schnittstellen des pBAD28-Plasmids	"	diese Arbeit
pACYC_bamB		Cm.	Johanna Weirich (Weirich et al, accepted 2016)
pACYC_surA		"	"
pACYC_skp		"	"

2.1.10 Primer

Tabelle 14: Primer

Primer Bezeichnung	Sequenz vom 5'-Ende zum 3'-Ende
bamB_XbaI_f	CGCTCTAGAATGCAATTGCGTAAATTACTG
bamB_HindIII_r	GGCGAAGCTTTTAACGTGTAATAGAGTACAC
pASK-IBA2_f	GAGTTATTTTACCACTCCCT
pASK-IBA2_r	CGCAGTAGCGGTAAACG

2.1.11 Antikörper und Antiseren

Primärantikörper

Tabelle 15: Primärantikörper

Antigen	Klon / Isotyp	Wirt	Verdünnung zur Visualisierung von Proteinen im Western Blot	Herkunft / Referenz
Invasin	polyklonal	Kaninchen	1:5.000	AG Autenrieth
YadA	"	"	1:5.000	"
Intimin	"	"	1:1.000	Frankel G. (Imperial College, London)
BamA (YaeT)	"	"	1:5.000	Lehr, Schütz and Oberhettinger et al. (2010)
BamB (YfgL)	"	"	1:5.000	Rossiter et al. (2011)
BamC (nlpB)	"	"	1:5.000	"
BamD (yfiO)	"	"	1:5.000	"
BamE (smpA)	"	"	1:5.000	"

SurA	poly- klonal	Kaninchen	1:10.000	Rapaport, D. (Interfaculty Institute of Biochemistry, Tübingen) Oberhettinger and Schütz et al. (2012)
Skp / =HlpA	"	"	1:5.000	Henderson, I. (School of Immunity and Infection, Birmingham)
DegP	"	Meer- schweinchen	1:5.000	Oberhettinger and Schütz et al. (2012)
RNA- Polymerase I	"	Maus	1:1.000	(Weirich et al, accepted 2016)
OmpC/F	"	Kaninchen	1:5.000	AG Schütz

Sekundärantikörper

Tabelle 16: Sekundärantikörper

Bezeichnung	Wirt	Verdünnung zur Visualisierung von Proteinen im Western Blot/ Kommentar	Hersteller
anti-Kaninchen IgG (H+L) DyLight™ 800 Conjugated	Ziege	1:10.000 Zur Detektion von Proteinen mit Licor Odyssey 3191	Fermentas Thermo Scientific, St.Leon-Rot
anti-Maus IgG (H+L) DyLight™ 600 Conjugated	"	"	"
Peroxidase- konjugierter anti-Kaninchen IgG	Ziege	1:10.000 Chemolumineszenz nach Zugabe von ECL	Dianova GmbH, Hamburg

Peroxidase-konjugierter anti-Meerschweinchen IgG	Esel	1:1.000 Chemolumineszenz nach Zugabe von ECL	Dianova GmbH, Hamburg
--	------	---	--------------------------

2.1.12 Enzyme und Nukleotide

Tabelle 17: Enzyme und Nukleotide

DNase I (10mg/ml)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
dNTPs (50mM)	Fermentas Thermo Scientific, St.Leon-Rot
HindIII	Fermentas Thermo Scientific, St.Leon-Rot
Lysozym	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Polymerase Pfu-Ultra 2	Stratagene, Amsterdam (NL)
<i>Taq</i> -Polymerase	Fermentas Thermo Scientific, St.Leon-Rot
T4 DNA Ligase	Fermentas Thermo Scientific, St.Leon-Rot
XbaI	Fermentas Thermo Scientific, St.Leon-Rot

2.1.13 Kommerzielle Kits

Tabelle18: Kommerzielle Kits

PeqGOLDPlasmid Miniprep Kit	PEQLAB-Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pierce BCA Protein Assay	Fermentas Thermo Scientific, St.Leon-Rot
Wizard [®] SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega, Mannheim
Quiamp DNA Mini and Blood Mini Kit	Quiagen AG, Basel (Schweiz)

2.1.14 Größenstandards

Tabelle 19: Größenstandards

GeneRuler™ 1 kb DNA-Ladder	Fermentas Thermo Scientific, St.Leon-Rot
GeneRuler™ 1 kb DNA-Ladder Plus	Invitrogen, Karlsruhe
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas Thermo Scientific, St.Leon-Rot
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	Fermentas Thermo Scientific, St.Leon-Rot

2.1.15 Software

Tabelle 20: Software

BioDoc Analyze	Biometra GmbH, Göttingen
CloneManager Suite 7	Scientific & Educational Software, Cary (USA)
Endnote X6	Thomson Reuters Corporation, New York (USA)
Excel 2007	Microsoft Corporation, Redmont (USA)
GraphPad Prism 4	GraphPad Software, Inc., La Jolla (USA)
ImageJ	National Institute of Health, Bethesda (USA)
Magellan™	Tecan Group Ltd., Männedorf
Photoshop CS	Adobe Systems, Inc., San Jose (USA)
Powerpoint 2007	Microsoft Corporation, Redmont (USA)
Word 2007	Microsoft Corporation, Redmont (USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Anzüchten von Bakterien

Aus Glycerin-Kryokulturen, die dauerhaft bei -80°C gelagert werden, wurden mit einer Impföse wenige Bakterien abgenommen und in Luria Bertani-, Soja- oder Leber-Medium überführt. In Ampuwa, EtOH oder MetOH gelöste Antibiotika, gegen die der anzuzüchtende Bakterienstamm resistent ist, wurden in geeigneter Verdünnung zum Anzuchtmedium gegeben (siehe Tabelle 11). Bakterienkulturen wurden bei 37°C für 12-16 h als sogenannte Übernachtskulturen inkubiert und auf dem Schütteltisch mit einer Drehzahl von 200 rpm geschüttelt. Bakterienstämme, bei denen Chaperone depletiert wurden, wurden bei 27°C und gleicher Inkubationszeit und mit gleichem Schüttelintervall kultiviert.

Von den so erhaltenen Bakterienkulturen wurden Subkulturen mit einer optischen Dichte von 0,05 bei 600 nm erstellt und für weitere 4 h inkubiert, um die Bakterien wieder in die exponentielle Wachstumsphase zu bringen. Sollte ein auf einem pASK-IBA2 Plasmid kodiertes Protein exprimiert werden, wurde nach 2 h Wachstum der Induktor AHTC aus einer Stocklösung mit der Konzentration von 2 mg/ml in einer 1:10.000 Verdünnung zur Subkultur gegeben. Die Subkultur enthielt somit eine AHTC-Konzentration von 200 ng/ml und wurde für weitere 2 h bei 37°C geschüttelt.

2.2.1.2 Herstellung von Glycerin-Kryokulturen für die Bakterienstammsammlung

Glycerin-Kryokulturen wurden zur dauerhaften Lagerung von Bakterien bei -80°C hergestellt. Dazu wurden 15 ml einer Bakterienkultur nach 12-16 h Wachstum für eine Dauer von 5 min bei Raumtemperatur mit einer Drehzahl von 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die im Pellet befindlichen Bakterienzellen in 3 ml mit 20% Glycerin versetztem LB-Medium resuspendiert. Diese Suspension wurde dann in Aliquots á 100 μl bei -80°C eingefroren und gelagert.

2.2.1.3 Erstellen von Wachstumskurven

Von Bakterienkulturen wurden nach 12-16 h Wachstum Subkulturen mit einer Start- OD_{600} von 0,01 angelegt. Um das Wachstumsverhalten der Bakterienstämme in der Subkultur zu quantifizieren, wurde jeweils ein Milliliter der Kultur entnommen und in je eine Vertiefung einer 24-well Kulturplatte der Firma Greiner gegeben. Da eine positive Korrelation zwischen der Zunahme der optischen Dichte einer Kultur und der Vermehrung der Bakterien besteht, wurde diese automatisiert bei einer Wellenlänge von 600 nm im Abstand von 15 min über einen Zeitraum von 12 h bestimmt und aufgezeichnet. Die Messung und Aufzeichnung erfolgte im *Tecan Reader Infinite 200 Pro* der *Tecan Group AG*.

Während der 12-stündigen Messung wurden die Subkulturen auf dem Schütteltisch mit einer Drehzahl von 200 rpm geschüttelt und bei einer Temperatur von 37°C bzw. 41,5°C inkubiert. Die graphische Darstellung der optischen Dichte-Werte in Abhängigkeit der Zeit erfolgte mit Hilfe der *GraphPad Prism 4* Software.

2.2.1.4 Antibiotika-Sensitivitätstests

Um die Sensitivität verschiedener Bakterienstämme gegenüber ausgewählten Antibiotika vergleichen zu können, wurden aus einer Subkultur $1,5 \times 10^8$ Bakterien entnommen, in 5 ml eines 37°C warmen, flüssigen Softagars gegeben und zur Durchmischung mehrfach invertiert. Dieser Softagar wurde dann in Petrischalen gegossen und bei Raumtemperatur verfestigt, sodass Antibiotika enthaltende Filterpapierblättchen aufgelegt werden konnten. Die weitere Inkubation der Agarplatten erfolgte dann über eine Dauer von 17,5 h bei 37°C im Brutschrank. Es zeigte sich ein dichtes Bakterienwachstum in Form runder, zum Teil konfluierender Bakterienkolonien. Bildete sich um ein Antibiotikaplättchen ein Hemmhof, also eine Aussparung des Bakterienwachstums, wurde dessen Durchmesser zur Quantifizierung der Sensitivität bestimmt (Ruiz et al, 2005, Weirich et al, accepted 2016).

2.2.1.5 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Viele Bakterienzellen besitzen die Fähigkeit, geringe Mengen DNA aus ihrer Umgebung aufzunehmen. Um die Effizienz dieses Vorganges zu erhöhen, wurden die Bakterien mit Calciumchlorid behandelt. Dadurch änderte sich die Permeabilität der Zellmembran und die Bakterien erwarben die Kompetenz, Fremd-DNA, z. B. in Form eines Plasmids aufzunehmen.

Zunächst wurden 20 ml einer Bakterienkultur über eine Dauer von 12-16 h bei 37°C kultiviert. Eine daraus erstellte Subkultur, bestehend aus 300 ml LB-Medium und 3 ml der Ursprungskultur, wurde ebenfalls bei 37°C inkubiert bis die optische Dichte der Kultur bei 600 nm zwischen 0,4 und 0,6 a.u. lag. Diese Subkultur wurde 10 min lang auf Eis inkubiert und daraufhin für 10 min mit einer Drehzahl von 4600 rpm zentrifugiert. Die im Pellet befindlichen Zellen wurden in 90 ml einer sterilen Lösung aus 30 mM KAc, 100 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, Milipore-Wasser und Essigsäure zur Einstellung des pH-Wertes der Lösung bei 5,8, Wasser und einem pH-Wert von 5,8 resuspendiert und wiederum für 10 min bei 4600 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, während das Pellet in 12 ml einer zweiten sterilen Lösung resuspendiert wurde. Diese bestand aus 10 mM MOPS, 15 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 15 % Glycerol und Wasser. Die entstandene Suspension wurde 15 min auf Eis inkubiert und jeweils 250 µl davon in gekühlte Eppendorf-Cups überführt. Diese wurden in Flüssigstickstoff eingefroren und dann bei -80°C gelagert.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Isolation von Plasmid-DNA

Zur Präparation und Isolation von Plasmid DNA wurde das *Plasmid Miniprep Kit I* der Firma *PEQLAB* verwendet. Dazu wurde eine 5 ml Bakterienkultur desjenigen Bakterienstammes verwendet, der das zu isolierende Plasmid trägt. Das Kit basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse von Bakterienzellen und der Fähigkeit von HiBind[®]-Silikamembranen, DNA zu binden. Laut Angaben des Herstellers können dabei 3 µg-5 µg eines High-Copy Plasmids pro Milliliter Kultur isoliert werden.

Die Präparation der Plasmid DNA wurde entsprechend den dem Kit beiliegenden Anwendungsempfehlungen der Firma *PEQLAB* durchgeführt. Dabei wurden die Bakterien zunächst lysiert. Durch Vermeidung von starkem Vortexen oder Schütteln sollte ein Scheren chromosomaler DNA möglichst vermieden und dadurch die Reinheit der Plasmid-DNA erhöht werden. Das Lysat wurde in eine HiBind[®]-Minipräp-Zentrifugensäule gegeben. Durch Zentrifugation kam das Zelllysat mit der Oberfläche der in der Säule befindlichen Silikamembran in Kontakt und konnte daran binden. Der Säulendurchfluss wurde dagegen verworfen. Nach mehrmaligem Waschen der Säule wurde die DNA mit Elutionspuffer oder sterilem Wasser eluiert. Die Konzentration der gewonnenen DNA konnte photometrisch bestimmt werden.

2.2.2.2 Isolation chromosomaler DNA

Um chromosomale DNA aus Bakterien gewinnen zu können, wurde das *QiAmp DNA Mini* Kit der Firma *Qiagen* verwendet. Die Isolation der DNA erfolgte aus 5 ml einer Bakterienkultur. Die Bakterien wurden zunächst mittels Zentrifugation pelletiert und entsprechend den Empfehlungen des Herstellers in Pufferlösungen resuspendiert. Die Zellproteine wurden für etwa 10 min mit Proteinase K abgebaut. Die Proteinase K-behandelte Probe wurde in Silikamembran-Säulen gegeben. Durch Zentrifugation konnte die isolierte DNA an die Membran gebunden und nach Waschen der Säule in sterilem Wasser eluiert werden.

2.2.2.3 Transformation von Plasmid-DNA in chemisch-kompetente Zellen

Zuvor hergestellte, bei -80°C gelagerte Calcium-kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Zu 250 µl dieser Zellsuspension wurden etwa 100 ng Plasmid-DNA gegeben, durch Rühren mit den Bakterien vermischt und für eine Dauer von 20 - 60 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Bakterien für 30 Sekunden einer Temperatur von 42°C ausgesetzt und anschließend wiederum eine Minute lang auf Eis inkubiert. Nun wurden 500 µl SOC-Medium zu jedem Ansatz gegeben. Die so entstandenen Zellsuspensionen wurden für 90 min bei 37°C bzw. die verwendeten Chaperonmutanten bei 27°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Transformationsansätze auf

Agarplatten ausplattiert und wiederum für eine Dauer von 12 - 16 h bei 37°C inkubiert. Die entstandenen Bakterienkolonien konnten abgeimpft und weiter verwendet werden.

2.2.2.4 Transformation von Plasmid-DNA in elektrokompetente *E.coli* DH5 α -Zellen

Zur Aufnahme von Plasmid-DNA in *E.coli* DH5 α -Zellen hat sich die Elektroporation elektrisch kompetenter Bakterien bewährt. Bereits im Labor vorhandene elektrokompetente *E.coli* DH5 α -Zellen wurden bei -80°C gelagert und auf Eis aufgetaut. Zu 40 μ l dieser Zellen wurde in 5 μ l sterilem Braun-Wasser gelöste Plasmid-DNA gegeben und 5 min lang auf Eis inkubiert. Dieser Ansatz wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette mit 0,2 cm Elektrodenabstand gegeben und in die Elektroporationsapparatur der Firma *BioRad* platziert. In letzterer wurde kurzzeitig ein elektrisches Feld erzeugt, welches die Permeabilität der Zellmembran und damit die Fähigkeit, Fremd-DNA aufzunehmen, erhöht. Die Elektroporation erfolgte bei einer Spannung von 2,5 kV, einer Kapazität von 25 μ F und einem Widerstand zwischen 200-600 Ω . Der Zellansatz wurde unmittelbar nach der Elektroporation mit 500 μ l SOC-Medium versehen und bei 37°C auf dem Schütteltisch mit einer Drehzahl von 200 rpm inkubiert. Anschließend konnten die Zellen auf mit Antibiotika versehenen Selektionsagarplatten ausgestrichen werden und wiederum bei 37°C 12-16 h lang im Brutschrank inkubieren.

2.2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (kurz: PCR) bietet die Möglichkeit, vorher definierte DNA-Abschnitte spezifisch zu vervielfältigen. Dabei wird zunächst der DNA-Doppelstrang durch Erhöhung der Temperatur in zwei Einzelstränge zerlegt. Dieser Vorgang wird als Denaturierung bezeichnet. Die Zugabe einer thermostabilen Polymerase, von Primern und Nukleotiden (dNTPs) ermöglicht es, viele Kopien des DNA-Einzelstrangs zu erstellen. Nach der Denaturierung erfolgt das Anlagern der Primer an Anfang und Ende des gewünschten DNA-Abschnittes, das sogenannte Annealing. Um eine möglichst spezifische Anlagerung der Primer zu ermöglichen,

wurde eine Annealing-Temperatur gewählt, die etwa 5°C unterhalb der Schmelztemperatur der Primer lag. Es folgt die Vervielfältigung des von den Primern begrenzten DNA-Abschnitts durch die DNA-Polymerase, die sogenannte Elongation. Die Temperatur während der Elongation wurde an das Temperaturoptimum der DNA-Polymerase angepasst. Die benötigte Elongationszeit betrug bei der verwendeten *Taq*-Polymerase der Firma *Fermentas Thermo Scientific* 1 min pro 1 kbp zu amplifizierender DNA, bei der Polymerase *Pfu-Ultra2* der Firma *Stratagene* dagegen 15 s pro 1 kbp DNA. Daher wurde die Elongationszeit an die Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts angepasst. Die einzelnen Arbeitsschritte der PCR mit jeweils benötigter Temperatur und Zeitdauer konnten im *PCR-Thermocycler* der Firma *Biometra* voreingestellt werden und erfolgten anschließend automatisiert.

2.2.2.6 Kolonie-PCR

Mit Hilfe der Kolonie-PCR konnte der Erfolg einer Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA überprüft werden. Nach der Transformation wurde dazu ein Teil der auf einer Agarplatte gewachsenen Bakterien mit einer sterilen Pipettenspitze entnommen und in destilliertem Wasser resuspendiert.

Anschließend wurden die für die PCR benötigten Reagenzien dazugegeben, sodass die aus einer Kolonie entnommenen Bakterien jeweils in einem Gesamtvolumen von 50 µl gelöst waren. In der PCR wurde das auf dem pASK-IBA2-Plasmid enthaltene Gen für *YadA*, *Invasin* oder *Intimin* amplifiziert. Das für *YadA* kodierende Gen besteht aus circa 1.300 bp. Das *Invasin*-kodierende Gen besteht aus ca. 2.500 bp und das *Intimin*-kodierende Gen aus ca. 2.800 bp. Die Elongationszeit musste also für *YadA* mindestens 1,3 min betragen, für *Invasin* und *Intimin* waren es mindestens 2,5 bzw. 2,8 min. Hier wurde eine etwas längere Elongationszeit von jeweils 4 min gewählt, um eine vollständige Amplifikation der drei Genloci sicherzustellen.

Tabelle 21: Reaktionsansatz für die Kolonie-PCR

Reagens	Volumen pro Ansatz	
Taq-Puffer (10x)	5	µl
Taq-Polymerase (5 units/µl)	0,5	µl
dNTPs (50mM)	2	µl
Primer pASK-IBA2- fwd (10 µM)	1	µl
Primer pASK-IBA2- rev (10 µM)	1	µl
H ₂ O	40,5	µl

Tabelle 22: PCR-Programm der Kolonie-PCR

PCR-Programm

Initiale Denaturierung	94°C	2 min	} 30x
Denaturierung	94°C	30 s	
Annealing	48°C	30 s	
Elongation	72°C	4 min	
Ende	4°C	∞	

2.2.2.7 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ermöglicht es, DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen und diese anhand eines mit aufgetragenen Größenmarkers abzuschätzen. Wird DNA in die Taschen eines Agarosegels gegeben und eine elektrische Spannung angelegt, wandert die DNA aufgrund ihrer negativen Ladung zu der Anode. Kleinere DNA-Fragmente legen dabei in der gleichen Zeit eine größere Strecke zurück als größere DNA-Fragmente.

Agarosegele wurden aus Agarosepulver und 0,5 % TBE-Puffer hergestellt. Die Agarosekonzentration betrug dabei je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente zwischen 0,8 % und 1 %. Nach Aufkochen und Lösen der Agarose und nachfolgendem Abkühlen der Suspension auf ca. 50 °C wurde diese in eine Gießapparatur der Firma *BioRad* gegeben. Durch das Einführen eines Kammes entstanden Geltaschen, in die später die aufzutrennende DNA gegeben werden konnte. Nach Polymerisation des Gels wurde dieses in eine mit 0,5 % TBE-Puffer gefüllte Elektrophoreseapparatur überführt. Die DNA-Proben wurden in einem 1:1-Verhältnis mit glycerinhaltiger OrangeG-Lösung gemischt und in die Taschen gegeben. Die angelegte elektrische Spannung betrug 100 V. Nachdem die Lauffront der Proben das Agarosegel passiert hatte, wurde das Gel in einem Ethidiumbromidbad (10 mg/ml in VE-Wasser) 10-15 min lang eingefärbt. Anschließend wurde das überschüssige Ethidiumbromid durch ein Wasserbad von 10 min Dauer entfernt. Danach konnte die im Gel aufgetrennte DNA mittels UV-Licht in Form von Banden sichtbar gemacht werden.

2.2.2.8 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die aufgetrennte DNA konnte wieder aus dem Gel gelöst und weiterverwendet werden. Dazu wurde die gewünschte DNA-Bande unter UV-Licht mit dem Skalpell ausgeschnitten und die DNA mit dem Kit „*Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System*“ der Firma *Promega* nach Herstellerprotokoll aus dem Gel extrahiert.

2.2.2.9 Klonierung von *bamB* aus *E. coli* HB101 in pBAD28

Das Gen für *bamB* wurde von genomischer DNA aus *E. coli* HB101 amplifiziert und in den Expressionsvektor pBAD 28 kloniert. Dazu wurde zunächst die chromosomale DNA aus 5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* HB101 mit dem Quiamp DNA Mini and Blood Mini Kit der Firma *Quiagen* präpariert, auf welcher sich auch das Gen für *bamB* befand. Dieses Gen wurde mittels PCR amplifiziert. An das 5'- und 3'-Ende wurden über die Primer Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen XbaI und HindIII angefügt. Dazu diente der folgende Reaktionsansatz:

Tabelle 23: Reaktionsansatz für die Amplifikation von *bamB*

Reagenz	Volumen pro Ansatz	
PCR-Puffer Pfu-Ultra-Buffer (10x)	5	μl
Chromosomale DNA (Qualität und Effizienz der Präparation wurde mittels PCR überprüft)	2	μl
dNTPs 50mM	1,2	μl
Primer bamB_XbaI_f (10μM)	1	μl
Primer bamB_HindIII_r (10μM)	1	μl
Polymerase pFU-Ultra 2 (2,5 units/μl)	1	μl
H ₂ O	38,8	μl

Tabelle 24: PCR-Programm für die Amplifikation von *bamB*

PCR-Programm

Initiale Denaturierung	95°C	2 min	} 30×
Denaturierung	95°C	20 s	
Annealing	61°C	30 s	
Elongation	72°C	18 s	
Finale Elongation	72°C	3 min	
Ende	4°C	∞	

Das Plasmid pBAD28 wurde aus 50 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* DH5α pBAD28 präpariert. pBAD28 enthält eine sogenannte Multiple Cloning Site, in die Gene eingebracht werden können. Innerhalb dieser Multiple Cloning Site befinden sich Basensequenzen, an denen verschiedene Restriktionsendonukleasen spezifisch schneiden können und so das zirkuläre Plasmid eröffnen. Für die Klonierung von *bamB* wurden die beiden Restriktionsendonukleasen XbaI und HindIII gewählt, da die Multiple Cloning Site von pBAD28 Schnittstellen für beide Enzyme enthält, das Gen

für *bamB* jedoch keine entsprechenden Schnittstellen enthält. Beide Enzyme erzeugen bei dem Schneiden des Plasmids sogenannte „Sticky Ends“, das heißt überhängende DNA-Enden.

Da zuvor mittels PCR zu den Schnittstellen komplementäre Basensequenzen an die kodierende Sequenz von *bamB* eingefügt wurden, konnte dieses Gen später durch Ligation in pBAD28 inseriert werden.

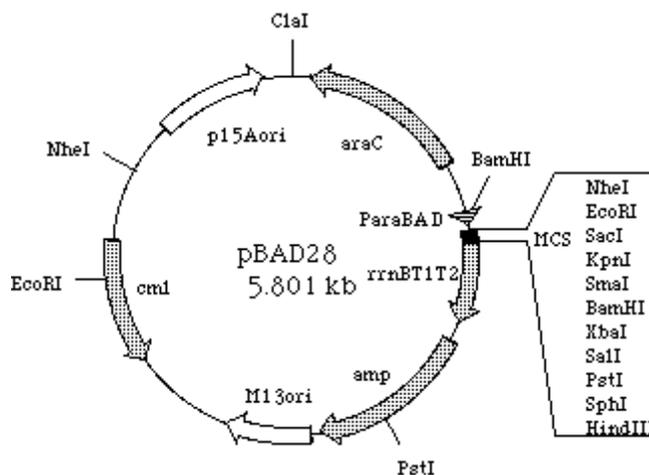


Abb. 10: Klonierungsvektor pBAD28 mit Schnittstellen für Restriktionsenzyme;

MCS=Multiple Cloning Side (Japan National BioResource Project (NBRP) Cloning Vector Collection;

<http://www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/strain/cvector/map/pBAD28.gif;jsessionid=3FFA5705E498946C799DB715BDA81FC7>)

Restriktionsverdau von pBAD28 mit *XbaI* und *HindIII*

Das präparierte Plasmid wurde zunächst mit dem Kit „Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System“ der Firma Promega gereinigt und in 50 µl sterilem Braun-Wasser eluiert. Von dieser Plasmidlösung wurden zum Restriktionsverdau zwei Ansätze mit eluierter Plasmid-DNA erstellt, da *XbaI* und *HindIII* in einer jeweils anderen Pufferlösung optimale Arbeitsbedingungen finden. Daher wurde der Verdau der beiden Enzyme nacheinander mit dem jeweils optimalen Puffer durchgeführt.

Tabelle 25: Ansätze für die Restriktion von pBAD28 mit XbaI und HindIII

Ansatz 1:			Ansatz 2:		
Reagenz	Volumen		Reagenz	Volumen	
Plasmid-DNA	20	µl	Plasmid-DNA	20	µl
Enzym XbaI	3	µl	Enzym HindIII	3	µl
Puffer Tango	3	µl	Puffer Red	3	µl
<i>Braun</i> -H ₂ O	4	µl	<i>Braun</i> -H ₂ O	4	µl

Beide Ansätze wurden für 2 h bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde die DNA in jedem der beiden Ansätze mit dem oben genannten Kit aufgereinigt und in 30 µl sterilem *Braun*-Wasser eluiert. Es folgte der Verdau mit dem jeweils anderen Enzym. So wurde Ansatz 1 mit HindIII in Puffer Red und Ansatz 2 mit XbaI in Puffer Tango verdaut. Die Probenvolumina und Inkubationsbedingungen wurden beibehalten.

Schließlich wurde die in beiden Ansätzen enthaltene DNA erneut aufgereinigt und nach Elution in sterilem *Braun*-Wasser vereint. Das auf diese Weise hergestellte linearisierte, mit XbaI und HindIII verdaute Plasmid konnte in einem Agarosegel dargestellt und aus diesem extrahiert werden.

Restriktionsverdau des PCR-Produkts der kodierenden Sequenz von bamB mit XbaI und HindIII

Die durch PCR amplifizierte kodierende Sequenz von *bamB* war von Schnittstellen für XbaI und HindIII flankiert. Hier wurde wie bei der Restriktion von pBAD28 vorgegangen, bei der ein Ansatz zunächst mit einem der beiden Enzyme und dem entsprechenden Puffer inkubiert wurde. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem jeweils anderen Enzym und Puffer. Probenvolumina und Inkubationsbedingungen entsprachen den Restriktionsbedingungen von pBAD28. Nach jedem Inkubationsschritt erfolgte die Reinigung der DNA aus der jeweiligen Reaktionslösung mit dem Kit „Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System“ und die Elution in 30 µl sterilem *Braun*-Wasser.

Ligation von bamB in pBAD28

bamB konnte nun in die Multiple Cloning Site des linearisierten Plasmids pBAD 28 eingefügt werden. Dazu wurde folgender Ligationsansatz erstellt:

Tabelle 26: Reaktionsansatz für die Ligation von *bamB* in pBAD28

Reagens	Volumen pro Ansatz	
Vektor pBAD28 (0,3-1,17µg/µl)	4	µl
Insert <i>bamB</i>	8	µl
Ligasepuffer	2	µl
Ligase	1	µl
H ₂ O	5	µl

Dieser Ansatz wurde zunächst für 1 h bei 22°C und anschließend für 12 h bis 16 h bei 16°C inkubiert. Es folgte die Aufreinigung und Elution der DNA in 30 µl sterilem Braun-Wasser.

Transformation von pBAD28_bamB

Das erhaltene Plasmid mit inseriertem *bamB*-Gen wurde mittels Elektroporation in elektrisch kompetente *E. coli* DH5α-Zellen transformiert. Die Transformanten wurden auf Selektionsagarplatten mit dem Antibiotikum Chloramphenicol ausgestrichen und für 12 h bis 16 h bei 37°C inkubiert. Gewachsene Kolonien konnten abgeimpft und in flüssigem LB-Medium kultiviert werden.

Sequenzierung von pBAD28_bamB

Um den Erfolg der Klonierung zu überprüfen, wurde das Plasmid aus Kulturen von *E. coli* DH5α pBAD28_ *bamB* mit jeweils 5 ml Volumen erneut präpariert und in 30 µl sterilem Braun-Wasser eluiert. Ertrag und Qualität der erhaltenen Plasmid-DNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung bestimmt. Mit 15 µl dieser Probe wurde von der Firma *4base lab* GmbH, Reutlingen das in pBAD28 befindliche Insert sequenziert. Dazu wurden die Primer *bamB_XbaI_f* und Primer *bamB_HindIII_r* verwendet.

pBAD28_ *bamB* mit korrekter Basensequenz konnte daraufhin in den gewünschten Bakterienstamm transformiert werden.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen anhand ihrer molekularen Masse.

Vorbereitung der Proben vor Durchführung der SDS-PAGE

Zu wässrigen Proteinlösungen wurde ein SDS-haltiger Laemmli-Puffer entsprechend dem Protokoll von Laemmli et al. (1970) gegeben.

SDS (Natriumdodecylsulfat) bindet als anionisches Detergenz an die Peptidketten von Proteinen und verleiht ihnen eine negative Ladung. Dies ermöglicht die Auftrennung der Proteine anhand ihrer molekularen Masse unabhängig von ihrer ursprünglichen Eigenladung. Ferner enthält der hier verwendete Laemmli-Puffer Dithiothreitol (DTT), der von Laemmli et al. beschriebene Puffer beta-Mercaptoethanol, welche die Disulfidbrücken innerhalb der Proteine durch Reduktion aufspaltet (Laemmli, 1970). Vor Durchführung der SDS-Page wurden die Proben für 10 min bei 95°C gekocht. Die auf diese Weise erzeugten Lösungen mit denaturierten und mit SDS-beladenen Proteine wurden in die Taschen des Sammelgels eines diskontinuierlichen Polyacrylamidgels gegeben.

Herstellung diskontinuierlicher Polyacrylamidgele

Diskontinuierliche Polyacrylamidgele bestehen aus einem schmalen Sammelgel (pH 6,8) und einem breiteren, darunterliegenden Trenngel (pH 8,8).

Zur Herstellung der Gele wurden Gießsysteme der Firma *BioRad Laboratories* verwendet. Zunächst wurde das Trenngel gegossen, das aus Milipore-Wasser, 30% Acrylamid Mix, 1,5 ml Tris/HCl pH 8,8, 10% SDS, 10% Ammoniumpersulfat und TEMED bestand und im Gießsystem mit 70% Isopropanol überschichtet. Dieses Polyacrylamidgel polymerisiert bei Raumtemperatur und enthält feine Poren, deren

Größe je nach zugegebenem Acrylamidvolumen variiert. Nach Polymerisation wurde das Isopropanol wieder abgegossen und die Sammelgellösung darüber gegossen, dessen Poren größer als die des Trenngels sind und das die Proteinlösungen in einer gemeinsamen Lauffront konzentrieren soll. In dieses Sammelgel wurde ein Kamm zur Ausbildung von Taschen eingeführt.

Durchführung der SDS- Page

Das entstandene Polyacrylamidgel wurde in die dafür vorgesehene Steckvorrichtungen der Firma *BioRad Laboratories* eingebracht und in eine Kammer mit SDS-Laufpuffer platziert. Anschließend wurden die Proteinlösungen in die Taschen des Gels überführt, wobei das im Laemmli-Puffer enthaltene Glycerin zu einem Absinken der Proben innerhalb der Geltasche führte. Durch Anlegen elektrischer Spannung entstand in der Kammer ein elektrisches Feld. Die durch das SDS negativ geladenen Proteine wanderten zur Anode. Dabei waren Proteine mit höherer molekularer Masse durch die Poren im Acrylamidgel weniger mobil und wanderten langsamer. Proteine mit geringerer molekularer Masse konnten die Poren hingegen leichter passieren und wanderten schneller.

Die so aufgetrennten Proteine konnten nun weiter analysiert werden, indem das Gel aus der Steckvorrichtung entnommen und die darin enthaltenen Proteine einer Färbemethode unterzogen wurden.

2.2.3.2 Coomassie- Färbung

Zur unspezifischen Färbung aller aufgetrennten Proteine wurde das Gel für mehrere Stunden in eine Coomassie Blue Färbelösung gelegt. Der Farbstoff Coomassie R-250 lagert sich in saurem Medium an basische und aromatische Aminosäuren wie Arginin, Lysin oder Histidin an, sodass es zu einer Blaufärbung der aufgetrennten Proteine kommt.

Die Intensität dieser Färbung ist damit bedingt abhängig von der Proteinkonzentration, was eine semiquantitative Proteinanalyse erlaubt.

Limitiert wird die Methode durch ihre eingeschränkte Sensitivität. So muss ein Protein eine Masse von mindestens 100 ng aufweisen, um als blaue Bande detektiert werden zu können.

2.2.3.3 Immunoblot

Der Immunoblot dient dem spezifischen Nachweis einzelner Proteine. Dazu werden Antikörper eingesetzt, die gegen bestimmte Epitope eines Proteins gerichtet sind. Kommt es zu einer Bindung zwischen Protein und Antikörper, kann diese sichtbar gemacht werden.

Western Blotting nach dem Tank Blot System

Zur Durchführung des Immunoblots wurden die auf dem Gel enthaltenen negativ geladenen Proteine mittels Elektrophorese auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Das Trenngel wurde auf die Membran gelegt und von beiden Seiten mit je einem Filterpapier der Firma *Whatman* und einem Schwamm bedeckt. Diese Anordnung wurde in *Mini Protean III*- Apparaturen der Firma *BioRad* in eine Wanne mit Western Blot Puffer verbracht. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes mit einer Stromstärke von 400 mA für eine Stunde wanderten die negativ geladenen Proteine vom Gel in Richtung Anode und wurden so auf die Nitrocellulosemembran übertragen.

2.2.3.4 Nachweis von Proteinen durch Enhanced Chemiluminescence (ECL)

Ponceau-Rouge- Färbung

Nach einer Stunde wurde die Nitrocellulosemembran aus der *Mini Protean III*- Blotting-Apparatur entnommen und wenige Minuten in einem Farbbad mit dem wasserlöslichen Farbstoff Ponceau Rouge S inkubiert. Ponceau Rouge bindet reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen in Proteinen. So konnten nach dem Blotten die durch die aufgetrennten Proteine entstandenen Banden sichtbar gemacht werden und die Markerbanden mittels eines Bleistifts gekennzeichnet werden.

Spezifische Färbung einzelner Proteinbanden

Vor der Antikörperinkubation müssen die noch nicht besetzten Proteinbindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran abgesättigt werden. Dazu wurde die Nitrocellulosemembran für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in einer Lösung aus 5 % Magermilchpulver in 1x Western Waschpuffer inkubiert. Anschließend wurde ein Antikörper in 5 % Magermilchpulver in 1x Western Waschpuffer (M-WWP) verdünnt, der an das zu detektierende Protein binden konnte. In dieser Lösung wurde die Membran ebenfalls für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in einem 50 ml Falcon-Röhrchen rollend inkubiert.

Der danach nicht oder unspezifisch gebundene Antikörper wurde in drei jeweils ca. 10 min andauernden Waschvorgängen mit M-WWP entfernt.

Um den gebundenen Antikörper detektieren zu können, wurde dessen Fc-Fragment wiederum von einem sekundären, mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörper gebunden, der 1:10.000 verdünnt in M-WWP zur Membran gegeben wurde. Diese Bindungsreaktion fand unter Rollen bei Raumtemperatur über eine Dauer von 45-60 min statt. Nach einem weiteren Waschvorgang mit M-WWP und drei sich daran anschließenden Waschschritten mit 1x WWP konnten die gesuchten Proteine detektiert werden.

Dazu wurden hauseigene ECL Westernblot Detektionslösungen auf die Membran gegeben. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (HRP) oxidierte das in der ECL-Lösung enthaltene Luminol. Diese Reaktion ging mit der Abgabe von Lichtenergie einher. Das emittierte Licht wurde durch Auflage eines Röntgenfilms auf die Nitrocellulosemembran nachgewiesen. Je nach Expositionszeit des Röntgenfilms konnte ein stärkeres oder schwächeres Signal detektiert werden. Die Röntgenfilme wurden mit dem Photo-Entwickler Curix60 entwickelt, wobei sich die spezifisch von Erst- und Zweit-Antikörper gebundenen Proteine als schwarze Banden darstellten.

2.2.3.5 Färbung von Proteinen zur Detektion mit dem Licor-System

Nach Blotting der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde die Membran ohne vorherige Ponceau-Rouge-Färbung in 5 % Magermilchpulver in PBS abgesättigt. Vor Inkubation des Primärantikörpers wurde die Milch mit vollentsalztem Wasser von der Nitrocellulosemembran ab gespült. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte in PBS mit 0,1 % Tween. Überschüssiger Antikörper wurde danach durch dreimaliges Waschen mit 1x WWP entfernt. Die Dauer der Antikörperinkubation und der Waschschritte entsprach dabei denen der Proteindetektion nach dem ECL-System.

Die hier verwendeten Sekundärantikörper waren mit dem Fluochrom DyLight 800 gekoppelt. Sie wurden im Verhältnis 1:10.000 in einer Lösung aus PBS mit 0,1 % Tween, 0,01 % SDS und 3 % BSA verdünnt und in einem lichtundurchlässigen Gefäß 2 h lang mit der Membran inkubiert. Daraufhin wurden überschüssige Antikörper durch Waschen mit WWP bei 4°C und für mindestens 2 h (maximal bis zu 48 h lang) mit PBS entfernt. Diese Waschschritte wurden ebenfalls in einem lichtundurchlässigen Gefäß durchgeführt.

Durch die Fluoreszenz der Sekundärantikörper konnten die zu detektierenden Proteine mit Hilfe des Gerätes *Licor Odyssey 3191* sichtbar gemacht werden (Weirich et al, accepted 2016).

2.2.3.6 Herstellung von Gesamtzellysaten

Zum Nachweis der Expression eines Proteins in Bakterien wurden Gesamtzellysate hergestellt, die auf SDS-Gele aufgetragen werden konnten. Dazu wurde die optische Dichte einer Bakteriensubkultur bei 600 nm bestimmt. 1 ml dieser Subkultur wurde durch Zentrifugation geerntet und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde im Verhältnis 1:1 in Millipore-Wasser und 5-fach konzentriertem Laemmli-Puffer resuspendiert und für 10 min bei 95°C gekocht. Das Volumen der hinzugegebenen Resuspensionsflüssigkeit in µl entsprach dabei dem Zahlenwert der zuvor bestimmten optischen Dichte.

2.2.3.7 Präabsorption von Antikörpern

Standardmäßig gereinigte IgG-Fractionen aus polyklonalen Antiseren enthalten in der Regel viele verschiedene Antikörper, die nicht nur das erwünschte Antigen, welches initial zur Immunisierung verwendet wurde, sondern auch andere bakterielle Antigene erkennen können. Um diese unerwünschten Antikörper abzusättigen und damit die Spezifität der Antikörperpräparation zu erhöhen, wurden Antikörper vor ihrer weiteren Verwendung zunächst mit fixierten, permeabilisierten Bakterien inkubiert, die das eigentliche Immunogen nicht exprimieren. Um solche Lysate herzustellen, wurde zunächst eine Übernachtskultur und daraus eine Subkultur eines Bakterienstammes hergestellt, der das Zielprotein des Antikörpers nicht exprimiert. Nach drei bis vier Stunden Wachstum wurde die Subkultur für 5 min mit einer Drehzahl von 4.500 rpm zentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Das entstandene Pellet wurde 30 min lang in einem Reaktionsgefäß mit 4 % PFA/PBS bei Raumtemperatur gerollt. Anschließend wurde die Suspension erneut bei gleicher Drehzahl zentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen.

Danach wurde das Pellet mit 0,1 % Triton-X-100 in PBS resuspendiert und für 10 min rollend inkubiert, um die Membranen der Zellen zu permeabilisieren und auch periplasmatische Antigene als Zielepitope freizulegen. Die Zellen wurden ein weiteres Mal mit PBS gewaschen und das Pellet in 400 µl PBS resuspendiert, wobei 100 µl des zu präabsorbierenden Serums bzw. Antikörpers zugegeben wurden. Es wurde bis zu 16 h lang bei 4°C rollend inkubiert.

Abschließend wurde die Probe 5 min lang mit 5.000 x g zentrifugiert. Der entstandene Überstand enthielt den Anteil an Antikörpern, die nicht unspezifisch an das Bakterienlysate gebunden waren und damit zur weiteren Analyse verwendet wurden.

Der Pierce BCA Protein Assay diente zur Bestimmung der Protein-Konzentration der entstandenen präabsorbierten Antikörperpräparation.

2.2.3.8 Proteinbestimmung mit dem Pierce BCA Protein Assay

Der Pierce BCA Protein Assay wurde 1985 von Smith et al eingeführt und basiert auf einem Farbumschlag einer Proteinlösung, dessen Intensität abhängig von der Anzahl der vorhandenen Peptidbindungen in einer Lösung ist (Smith et al, 1985).

Das verwendete Reaktionskit der Firma *Thermo Scientific* enthält unter anderem zweiwertige Kupferionen, die von den Peptidbindungen in Proteinen zu einwertigen Kupferionen reduziert werden. Dieser Vorgang wird auch als Biuret-Reaktion bezeichnet. Das ebenfalls hinzugegebene BCA (= Bicinchoninsäure) bildet mit den einwertigen Kupferionen in alkalischem Medium einen violetten wasserlöslichen Chelatkomplex. Bei einer Wellenlänge zwischen 540 nm und 590 nm weist dieser Chelatkomplex eine Absorption auf, die nahezu linear mit der Proteinkonzentration ansteigt. Um den Proteinkonzentrationen Zahlenwerte zuordnen zu können, wird die Absorption der gelösten Membranen mit denen von Standardproteinlösungen aus in PBS gelöstem Rinderserumalbumin (BSA) verglichen.

Dazu wurden je 10 µl von Lösungen mit 1.000, 800, 600, 400, 200, 100 und 0 µg BSA/ml PBS erstellt und auf eine 96-well Platte aufgetragen. Von den zu bestimmenden Proteinlösungen wurde ebenfalls eine Verdünnungsreihe erstellt und jeweils 10 µl der Proteinproben aufgetragen. Dazu wurden jeweils 190 µl Pierce-Lösung zu jeder Probe gegeben, die frisch aus Lösung A und Lösung B des Reaktionskits im Verhältnis 50:1 hergestellt wurde. Anschließend wurde die 96-well Platte 30 min lang bei 37°C inkubiert. Daraufhin konnte die Absorption bei 562 nm mit dem *Sunrise Plattenphotometer* gemessen und die Proteinkonzentrationen mit Hilfe der Software *Magellan* berechnet werden.

2.2.3.9 Präparation äußerer Membranen Gram-negativer Bakterien

Wie bei Weirich et al (accepted 2016) beschrieben, wurden 50 ml Subkulturen des gewünschten Bakterienstammes für 10 min mit einer Drehzahl von 4.500 rpm zentrifugiert. Die entstandenen Pellets wurden nach Entfernung des Überstandes mit je 500 µl Lysepuffer (0,2 M Tris, 1 M Sucrose, 1 mM EDTA, pH 8) resuspendiert. Anschließend wurde zu jeder Subkultur 500 µg gelöstes Lysozym hinzugegeben, welches zuvor in 25 µl Braun-Wasser gelöst worden war. Dieser Ansatz wurde 5 min lang inkubiert, um die Membran der Bakterien anzugreifen. Durch die Zugabe von 3,2 ml Milipore-Wasser pro Probe wurden die Zellen schließlich zum Platzen gebracht. Die Proben wurden mehrmals invertiert und 20 min lang durch Rollen inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden 5 ml Extraktionspuffer (2% Triton X-100, 50 mM Tris, 10 mM MgCl₂, pH 8) und 5 µl DNase- Lösung (10 mg/ml) zugegeben, invertiert und wiederum 10 min rollend inkubiert.

Die Ansätze wurden in 10 ml Ultrazentrifugenröhrchen bei 4°C für 45 min mit dem *SW41Ti* Rotor und der Ultrazentrifuge der Firma *Beckmann-Coulter* mit einer Drehzahl von 26.500 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen. Das entstandenen Pellet wurde danach dreimal mit Milipore-Wasser gewaschen, um den Extraktionspuffer wieder zu entfernen. Dazu wurden sie jeweils 15 min lang mit einer Drehzahl von 85.000 rpm zentrifugiert und der dabei entstehende Überstand verworfen. Für diese Waschschrte wurde der Rotor TLA 100.3 der Ultrazentrifuge *Optima Max E* verwendet. Im Anschluss daran wurden die erhaltenen Pellets mit den präparierten äußeren Membranen in 1 ml Milipore-Wasser resuspendiert (Oberhettinger et al, 2012). Um den Proteingehalt der erzeugten Lösungen zu bestimmen, wurde der Pierce BCA Protein Assay durchgeführt.

2.2.3.10 Harnstoffextraktion

Harnstoff kann hydrophobe Membranproteine aus der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien extrahieren. Dabei werden bevorzugt diejenigen Proteine gelöst, die nicht vollständig in der äußeren Membran inseriert sind. Um herauszufinden, inwiefern die zuvor detektierten Membranproteine nur membranassoziiert oder tatsächlich in der äußeren Membran inseriert sind, wurden die äußeren Membranfraktionen einer sogenannten Harnstoffextraktion unterzogen (Oberhettinger et al, 2012).

Hierbei wurde wie folgt vorgegangen:

Nach der Präparation äußerer Membranen wurden jeweils 500 µl aus jeder der dabei erhaltenen wässrigen Proteinlösungen entnommen und in je ein 3 ml Ultrazentrifugationsröhrchen mit einem Nennvolumen von jeweils 3 ml überführt. Aufgrund der erforderlichen hohen Zentrifugationsgeschwindigkeit war es notwendig, das nicht von der Proteinlösung eingenommene Restvolumen der Ultrazentrifugationsröhrchen restlos mit Milipore-Wasser aufzufüllen. Nach dieser Vorbereitung wurde die Lösung eine Stunde lang mit einer Geschwindigkeit von 90.000 rpm und 4°C ultrazentrifugiert. In jedem der Ultrazentrifugationsröhrchen

entstand dadurch ein Pellet. Diese Pellets wurden in je 1 ml sogenanntem Harnstoffextraktionspuffer resuspendiert und für eine Stunde bei 37°C inkubiert, während der Überstand verworfen wurde. Anschließend wurden die in Extraktionspuffer gelösten Proteine für 90 min mit einer Geschwindigkeit von 90.000 rpm zentrifugiert und so die Membranen erneut isoliert. Um die notwendige Füllhöhe der Zentrifugationsröhrchen wiederum zu erreichen, wurden diese mit Harnstoffextraktionspuffer aufgefüllt. Während der Zentrifugation wurde eine Temperatur von 25°C gewählt, um eine Aggregation des Harnstoffs zu verhindern. Durch die Zentrifugation wurde in jedem Ultrazentrifugationsröhrchen ein Pellet erzeugt, in dem sich die äußeren Membranen mit den in sie fest inserierten Proteinen wiederfanden. Im Überstand waren alle anderen, nur membranassoziierten Proteine gelöst.

2.2.3.11 Proteinfällung mit Methanol und Chloroform

Vor Durchführung von SDS-Page und Western Blot wurden die nach Harnstoffextraktion gelösten Proteine in den resuspendierten Pellets und in den Überständen präzipitiert und anschließend in einem kleineren Flüssigkeitsvolumen wieder gelöst. Hierdurch konnten höher konzentrierte Lösungen erzeugt werden.

Proteine bilden in wässrigen Lösungen eine Hydrathülle aus, indem die an der Oberfläche angeordneten hydrophilen Aminosäuren mit Wassermolekülen interagieren. Organische Lösungsmittel wechselwirken mit der Hydrathülle der gelösten Proteine. Dadurch entsteht ein hydrophobes Milieu um die Proteine, was ihre Löslichkeit in wässrigen Lösungen reduziert.

Hier wurde ein Fällungsverfahren mit Methanol und Chloroform gewählt. Dieses Verfahren ist an ein Protokoll von Wessel und Flügge angelehnt (Wessel & Flügge, 1984) und eignet sich beispielsweise auch zur Entfernung von Salz und Detergenzien aus Proteinlösungen.

Nach der Harnstoffextraktion waren pro eingesetzter Membranfraktion 3 ml Überstand und ein Pellet entstanden. Jedes Pellet wurde in 3 ml Milipore-Wasser gelöst, um solubilisierte und gebundene Proteine in vergleichbaren Volumina zu erhalten. Sowohl die Proteine in den resuspendierten Pellets als auch die Proteine in den Überständen sollten ausgefällt werden. Aus jeder dieser 3 ml umfassenden Proteinfractionen wurden

600 µl wässrige Proteinlösungen entnommen und jeweils 600 µl Methanol und 450 µl Chloroform hinzugegeben. Anschließend wurde jede Probe invertiert und 5 min lang mit der Tischzentrifuge der Firma *Eppendorf* mit einer Drehzahl von 13.000 rpm zentrifugiert. Es entstanden drei Phasen, wobei das hydrophobe Chloroform die oberste Phase, die präzipitierten Proteine die mittlere Phase und das hydrophile Methanol die unterste Phase bildete. Das Chloroform wurde entfernt, zu mittlerer und unterer Phase wurden weitere 450 µl Methanol hinzugegeben, durch Schütteln gemischt und anschließend 10 min lang bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die präzipitierten Proteine setzten sich als weißliche Flocken am Boden des Reaktionsgefäßes ab. Der Methanol-Überstand wurde entfernt. Um die Proteine nun mittels SDS-Page und Western Blot analysieren zu können, wurden sie in Harnstoffpuffer gelöst, mit 1×Lämmli- Puffer versehen und 10 min lang bei 95°C gekocht.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss der Deletion der Lipoprotein-Gene *bamB*, *bamC* und *bamE* auf Wachstumsverhalten und Integrität der äußeren Membran von *E. coli* HB101

3.1.1 Vergleich des Wachstumsverhaltens von *E. coli* HB101 Wildtyp mit *E. coli* HB101 Δ BamB, Δ BamC und Δ BamE

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte überprüft werden, ob eine Deletion der nicht-essentiellen Bestandteile des Bam-Komplexes einen Einfluss auf die Biogenese der Autotransporter-Adhäsine YadA, Invasin und Intimin hat. Dazu sollten die entsprechenden K.O.-Stämme in einem ersten Schritt phänotypisch charakterisiert werden. Es wurden zunächst Wachstumskurven angefertigt. So sollte ermittelt werden, ob die Deletion von *bamB*, *bamC* oder *bamE* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen Wachstumsdefekte verursacht.

Die Gene für die nicht-essentiellen Komponenten der β -Barrel Assembly Machinery BamB, BamC und BamE können aus der chromosomalen DNA der Bakterien deletiert werden, wobei deren Lebensfähigkeit erhalten bleibt.

E. coli HB101-Stämme mit Deletion eines Gens für jeweils eine dieser Bam-Komponenten wurden uns freundlicherweise von Professor Ian R. Henderson der Universität Birmingham zur Verfügung gestellt.

Um das Wachstumsverhalten der so veränderten Bakterienstämme mit dem des Wildtyps vergleichen zu können, wurden von *E. coli* HB101 Wildtyp und *E. coli* HB101 Δ BamB, Δ BamC und Δ BamE jeweils drei voneinander unabhängige Übernachtkulturen und daraus Subkulturen hergestellt. Die Zunahme der Bakterienzahl beim Wachstum in der Kultur weist eine positive Korrelation mit der optischen Dichte auf. Der Grad der Zunahme der optischen Dichte gilt daher als Maß für die Zunahme der Bakterienzellzahl.

Wachstumsverhalten bei 37°C

Die optische Dichte von *E. coli* HB101 Wildtyp nahm in den ersten vier Stunden der Messung nahezu exponentiell zu (vgl. Abb. 11). Anschließend erfolgte eine stetige, aber langsamere Zunahme der optischen Dichte. Nach etwa 9,5 h nahm die optische Dichte

nur noch um wenige Hundertstel a.u. zu, sodass der Wildtyp-Stamm die stationäre Phase bei einer OD_{600} zwischen 0,83 und 0,88 erreichte.

Die Bakterienstämme mit Deletion einer Bam-Komponente zeigten eine stetige, aber im Vergleich zum Wildtyp langsamere Zunahme der optischen Dichte. Bei *E. coli* HB101 Δ BamB verlief die Wachstumskurve zunächst flacher als bei den anderen gemessenen Stämmen und erreichte die stationäre Phase erst nach etwa 11 h. Die Wachstumskurve von *E. coli* HB101 Δ BamE wies in den ersten Stunden des Wachstums eine höhere Steigung auf als die von *E. coli* HB101 Δ BamB und erreichte bereits nach 9,5 h die stationäre Phase. Nach 12 h betrug die optische Dichte bei 600 nm bei den Stämmen mit einer Deletion von *bamB* beziehungsweise von *bamE* zwischen 0,62 und 0,66. Die Subkulturen von *E. coli* HB101 Δ BamC zeigten ebenfalls eine flachere Wachstumskurve als der Wildtyp und verhielten sich ähnlich wie die beiden anderen bereits beschriebenen Deletionsstämme. Sie hatten nach 12 h eine OD_{600} mit einem arithmetischen Mittelwert von 0,73 erreicht.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sich bei 37°C alle Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp-Stamm durch ein langsames Wachstum auszeichneten und die optische Dichte nach 12 h Wachstum deutlich unter der des Wildtyp-Stammes lag (vgl. Abb. 11). Der stärkste Phänotyp war bei *E. coli* HB101 Δ BamB festzustellen.

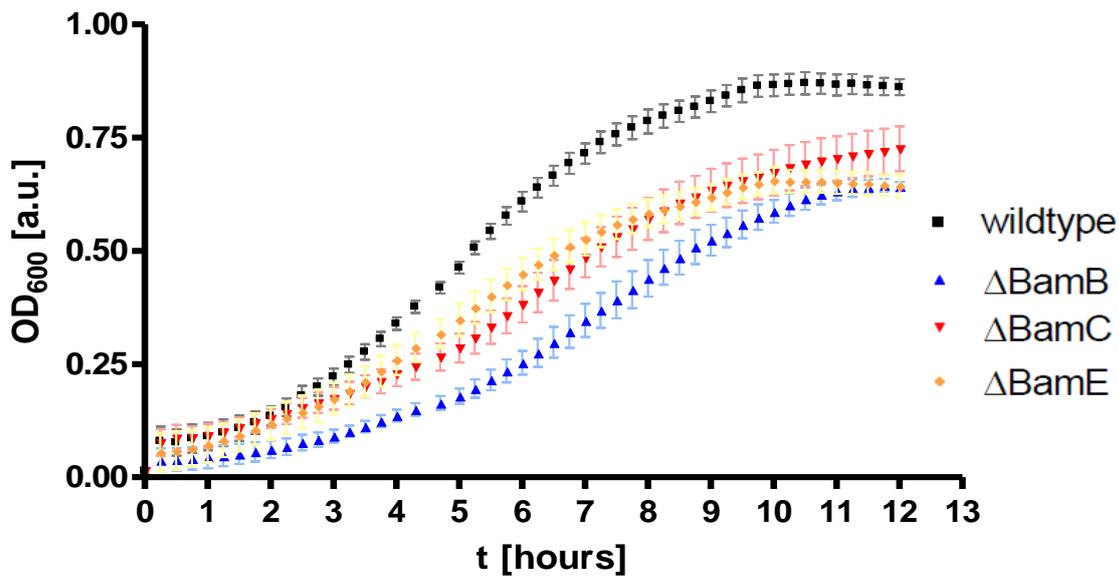


Abb. 11: Graphische Darstellung des Wachstumsverhaltens von *E. coli* HB101 Wildtyp, Δ BamB, Δ BamC und Δ BamE Subkulturen bei 37°C. Für jeden Stamm wurden drei voneinander unabhängige Subkulturen erstellt und gemessen. Dadurch entstanden die dargestellten Balken mit symbolmarkiertem arithmetischem Mittelwert der drei ermittelten OD₆₀₀-Werte pro Zeitpunkt. Auf der x-Achse ist die Dauer des Wachstums in Stunden angegeben, auf der y-Achse ist die optische Dichte bei 600 nm in Absorption Units (a.u.) verzeichnet.

Wachstumsverhalten bei 41,5°C

Die optimale Wachstumstemperatur für *E. coli* liegt bei 37°C. Wird die Wachstumstemperatur erhöht, sind die Bakterien Stressbedingungen ausgesetzt. Bei höheren Temperaturen kommt es zu einer vermehrten Degeneration bakterieller Proteine, was zu Störungen des bakteriellen Stoffwechsels und damit auch des Wachstums führen kann. Um die Widerstandsfähigkeit der Deletionsmutanten und letztlich auch die Stabilität ihrer Proteine mit denen des Wildtyp-Stammes zu vergleichen, wurden Wachstumskurven bei einer Temperatur von 41,5 °C hergestellt (vgl. Abb. 12).

Bei Inkubation bei 41,5°C verliefen die Wachstumskurven aller gemessenen Bakterienstämme flacher als bei 37°C. Die Unterschiede in der optischen Dichte zwischen den gemessenen Deletionsstämmen traten bei der höheren Temperatur deutlicher hervor als bei 37°C.

Wie bei 37°C hatte die Wachstumskurve von *E. coli* HB101 Wildtyp durchschnittlich die höchste optische Dichte bei 600 nm im Vergleich zu den gemessenen Deletionsstämmen. Die sogenannte log-Phase des Bakterienwachstums, in der sich die Zellen am schnellsten vermehren, war bei dem Wildtyp nach etwa 7,5 h beendet. Danach erfolgte der Übergang in die stationäre Phase. In der stationären Phase blieb die optische Dichte nahezu konstant bei etwa 0,73.

E. coli HB101 Δ BamB hatte in der log-Phase die niedrigste optische Dichte aller gemessenen Stämme. Die Bakterien vermehrten sich deutlich langsamer als bei 37°C, sichtbar an der flachen Steigung der Wachstumskurve. Nach circa 9 h erreichte die OD₆₀₀ zwischen 0,30 bis 0,377 ihr Maximum. Daran schloss sich die Absterbephase an. Die optische Dichte nahm kontinuierlich ab und lag nach 12 h bei etwa 0,24.

Die Wachstumskurve von *E. coli* HB101 Δ BamC verhielt sich gegenüber der des Wildtyps am ähnlichsten. Sie verlief zunächst flacher als die des Wildtyps, erreichte die stationäre Phase jedoch erst nach 10,5 h und hatte nach 12 h eine OD₆₀₀ von durchschnittlich 0,67. Damit lag die Differenz zur durchschnittlichen optischen Dichte bei 37°C nach 12 h bei circa 0,05 und war damit geringer als bei den übrigen Bakterienstämmen. Die optische Dichte von *E. coli* HB101 Δ BamE lag nach 12 h zwischen der von *E. coli* HB101 Δ BamB und Δ BamC. Die Bakterienkulturen befanden sich in der stationären Phase und hatten eine OD₆₀₀ von durchschnittlich 0,50.

Insgesamt waren die Deletionsmutanten bei 41,5°C stärker in ihrem Wachstum eingeschränkt als bei 37°C. Auch hier war *E. coli* HB101 Δ BamB am stärksten betroffen.

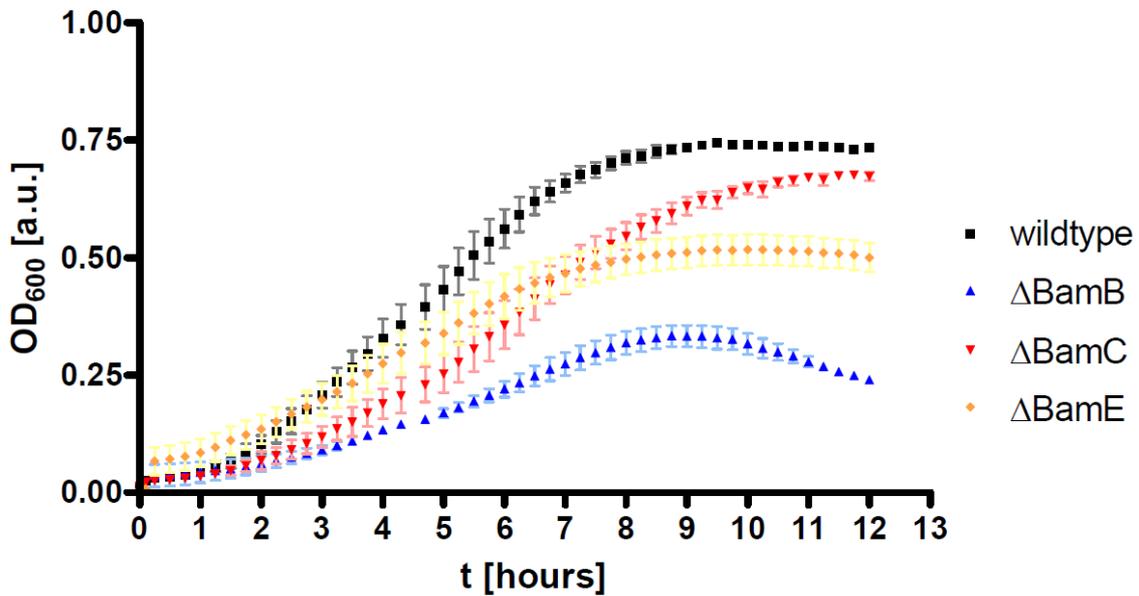


Abb. 12: Graphische Darstellung des Wachstumsverhaltens von *E. coli* HB101 Wildtyp, Δ BamB, Δ BamC und Δ BamE Subkulturen bei 41,5°C. Achsbeschriftung: x-Achse: Dauer des Wachstums in Stunden, y-Achse: optische Dichte bei 60 nm in Absorption Units (a.u.).

3.1.2 Integrität der äußeren Bakterienmembran von *E. coli* HB101 Wildtyp, Δ BamB, Δ BamC und Δ BamE

Es ist bekannt, dass Mutanten mit fehlender Expression einer oder mehrerer Bam-Komponenten empfindlicher gegenüber antibiotisch wirksamen Substanzen sein können (Namdari et al, 2012; Onufryk et al, 2005; Ruiz et al, 2005). Dies sollte auch für die hier verwendeten *E. coli* HB101 Wildtyp, Δ BamB, Δ BamC und Δ BamE -Stämme verifiziert werden. Für die Sensibilitätsstestungen wurden vier Antibiotika gewählt, für die Namdari et al, (2012) gezeigt hatten, dass *Salmonella Enteritidis* Δ BamB-Stämme eine erhöhte Empfindlichkeit als *Salmonella Enteritidis* Wildtyp-Stämme aufweisen.

Hierzu wurden Sensi-DiscTM Testblättchen mit den Antibiotika Erythromycin 15 μ g, Rifampicin 5 μ g, Bacitracin 10 IE und Vancomycin 30 μ g verwendet. Diese genannten Wirkstoffe werden in der Medizin vorwiegend zur Behandlung von Infektionskrankheiten mit Gram-positiven Erregern und einzelnen, wenigen Gram-negativen Erregern eingesetzt. Rifampicin wird beispielsweise gegen Gram-negative

Legionella pneumophila, Bacitracin gegen Gram-negative *Neisseria meningitidis*-Stämme eingesetzt.

Nach 17,5 h Inkubation der Softagarplatten mit den Bakterien und Auflage der Antibiotikablättchen bei 37°C wurde der Durchmesser der Hemmhöfe in Millimeter um die Testblättchen bestimmt.

Antibiotikum	V	wildtype	Δ BamB	Δ BamC	Δ BamE
		<i>Durchmesser des Hemmhofs in mm</i>			
Erythromycin	1	9,5	11,5	7,25	7,25
	2	8,5	11,5	7,5	7,25
	3	8,5	11,5	7,25	8,5
Rifampicin	1	7,5	16,0	7,5	9,5
	2	7,5	16,5	7,25	10,0
	3	8,0	15,5	7,5	9,5
Bacitracin	1	0	11,0	0	0
	2	0	12,5	0	0
	3	0	14,0	0	0
Vancomycin	1	8,5	17,5	7,25	9,25
	2	9,0	17,25	7,5	10,0
	3	8,5	18,0	7,25	10,5

Tabelle 27: Durchmesser der Hemmhöfe auf Softagarplatten nach 17,5 h Inkubation bei 37°C in Millimeter. Der Versuch wurde jeweils dreimal durchgeführt. V 1, V2 und V3 stehen für Versuch Nummer 1, 2 und 3.

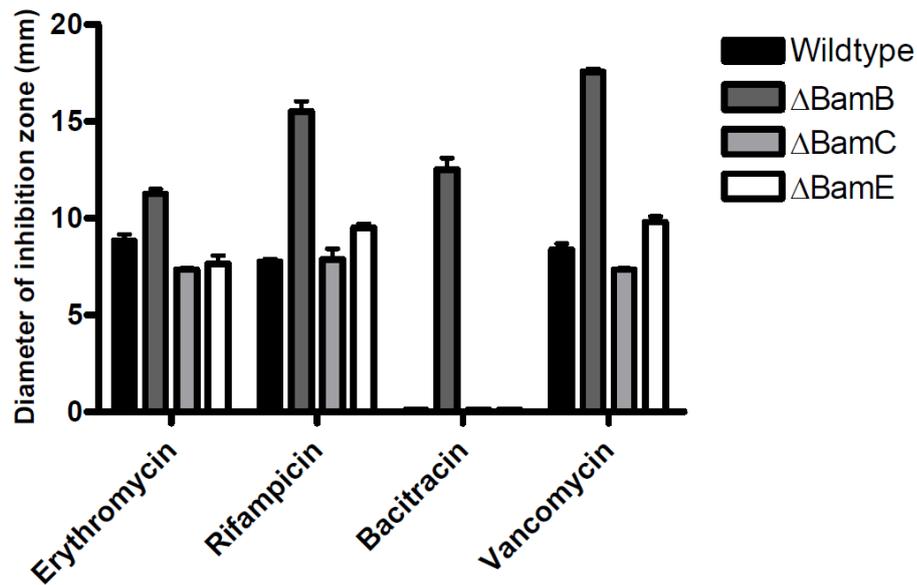


Abb. 13: Darstellung der in Tabelle 27 aufgeführten Hemmhofdurchmesser als Balkendiagramm.

Die Hemmhofdurchmesser um die Antibiotikablättchen unterschieden sich bei den Bakterienstämmen *E. coli* HB101 Wildtyp Δ BamC und Δ BamE nur um wenige Millimeter. Für die Wirkstoffe **Erythromycin**, **Rifampicin** und **Vancomycin** betragen die gemessenen Hemmhöfe bei diesen Stämmen zwischen 7,25 mm und 10,5 mm. Gegen **Bacitracin** waren die drei Bakterienstämme resistent und wiesen keinen Hemmhof auf.

Dagegen hatte *E. coli* HB101 Δ BamB bei den verwendeten Antibiotika stets den größten Hemmhofdurchmesser. Die Unterschiede zu den anderen drei Bakterienstämmen waren bei Deletion von *bamB* für den Wirkstoff **Erythromycin** am kleinsten. Der Durchmesser betrug hier 11,5 mm. Dieses Makrolidantibiotikum war das kleinste hier eingesetzte Wirkstoffmolekül mit einer molekularen Masse von circa 0,75 kDa.

Rifampicin hemmt die bakterielle Transkription und hat ebenfalls eine vergleichbar geringe molekulare Masse von 0,8 kDa. Der Hemmhofdurchmesser betrug bei *E. coli* HB101 Δ BamB im Mittel 16 mm und unterschied sich damit etwas deutlicher von den anderen Bakterienstämmen als bei Zugabe von Erythromycin.

Bei den Wirkstoffen **Bacitracin** und **Vancomycin** waren die Unterschiede von *E. coli* HB101 Δ BamB zu den anderen Stämmen am ausgeprägtesten. Diese Antibiotika sind mit einer molekularen Masse von circa 1,4 kDa größer als Erythromycin und Rifampicin. Während die anderen verwendeten Stämme um das Bacitracin enthaltende Blättchen keinen Hemmhof aufwiesen, war der Stamm mit Deletion von *bamB* sensibel gegenüber der aufgetragenen Wirkstoffkonzentration und bildete einen Hemmhof mit einem Durchmesser von 11-14 mm.

Für **Vancomycin** lag der Hemmhofdurchmesser von *E. coli* HB101 Δ BamB bei 17,25 - 18,0 mm. Um das Vancomycin-haltige Blättchen bildeten auch die anderen Stämme einen Hemmhof. Dieser war für *E. coli* HB101 Δ BamE mit rund 10 mm etwas größer als bei dem Wildtypstamm mit circa 8,7 mm und bei *E. coli* HB101 Δ BamC mit circa 7,3 mm.

Während also *E. coli* HB101 Δ BamC und Δ BamE-Stämme eine ähnliche Empfindlichkeit gegenüber den getesteten Substanzen aufwiesen wie *E. coli* HB101 Wildtyp, war *E. coli* HB101 Δ BamB stets sensibler. Die Sensibilitätserhöhung war für Wirkstoffe mit höherer Molekülmasse stärker ausgeprägt.

3.2 Untersuchungen zu den Autotransporter-Adhäsinen YadA, Invasin und Intimin und den Porinen OmpC/OmpF in äußeren Bakterienmembranen von *E. coli* HB101 Wildtyp, Δ BamB, Δ BamC und Δ BamE

Die β -Barrel Assembly Machinery ermöglicht den Einbau von Membranproteinen in die äußere Membran Gram-negativer Bakterien (Walther et al, 2009). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Deletion eines der Lipoproteine BamB, C oder E zu einer reduzierten Menge von Porinen, dem Maltoporin LamB oder der Fimbrie FimD in der äußeren Bakterienmembran führen kann (Namdari et al, 2012; Charlson et al, 2006; Onufryk et al, 2005; Sklar et al, 2007a, Weirich et al, accepted 2016).

Für die Porine OmpC und OmpF sollte das auch für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *E. coli* HB101-Stämme verifiziert werden. Ferner wurde neu untersucht, ob BamB, C oder E auch für die Biogenese der Autotransporter-Adhäsine YadA, Invasin und Intimin bedeutsam sind.

3.2.1 Coomassie-Färbung äußerer Membranfraktionen

Zunächst wurden äußere Bakterienmembranen aus Subkulturen von *E. coli* HB101 Wildtyp, Δ BamB, Δ BamC und Δ BamE mit durch AHTC induziertem pASK-IBA2-YadA-Plasmid präpariert. Die so gewonnenen äußeren Membranproteine wurden durch eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt, mit einer Coomassie-Färbelösung eingefärbt und so sichtbar gemacht. Dieses Vorgehen ermöglichte es, einen Überblick darüber zu erhalten, wie sich die Proteinzusammensetzung in den verwendeten Stämmen unterschied.

Die Auswertung der Proteinfärbung erfolgte unter der Annahme, dass die Intensität, mit der die Proteinbanden sichtbar waren, proportional zu der Konzentration des jeweiligen Proteins in der Probe war. Bei insgesamt gleichen Proteinkonzentrationen unterschieden sich die abgebildeten äußeren Membranfraktionen in Bezug auf die Proteinzusammensetzung.

Einige Proteine waren in den präparierten Membranen des Wildtyps höher konzentriert als bei einzelnen Deletionsstämmen. Dies war beispielsweise bei der obersten Proteinbande zwischen 150 kDa bis 200 kDa zu sehen, bei der es sich möglicherweise um YadA handeln könnte. Die Proteinbande hatte beim Wildtypstamm die stärkste Intensität, bei Deletion von *bamC* oder *bamE* war die Bandenintensität dagegen etwas schwächer als beim Wildtyp. In der Membranfraktion von *E. coli* HB101 Δ BamB war das Protein am geringsten konzentriert. Ähnlich verhielt es sich bei den Proteinbanden zwischen 30 kDa bis 40 kDa auf Höhe der äußeren Membranproteine OmpA (35 kDa), OmpF (36 kDa) und OmpC (37 kDa). Diese wurden bei Deletion von *bamB* ebenfalls etwas schwächer exprimiert als beim Wildtyp. Bei den äußeren Membranfraktionen von *E. coli* HB101 Δ BamC und *E. coli* HB101 Δ BamE unterschied sich die Konzentration der genannten Proteine dagegen nur wenig von der des Wildtyps.

Andere Proteine waren in äußeren Membranen von *E. coli* HB101 Δ BamB höher konzentriert als in denen der anderen untersuchten Stämme. Dabei könnte es sich um Proteine der bakteriellen Stressantwort, wie zum Beispiel Proteasen, handeln, die bei Deletion von *bamB* vermehrt exprimiert werden könnten und im Periplasma akkumulierte Proteine degradieren, die sich bei fehlerhafter Faltung oder unzureichendem Einbau in die äußere Membran ansammeln können. Dies war für die Proteine auf einer Höhe von etwa 80 kDa, 45 kDa und 20 kDa der Fall, wobei die meisten dieser Proteine in den äußeren Membranen des Stammes mit Deletion von *bamB* detektiert wurden.

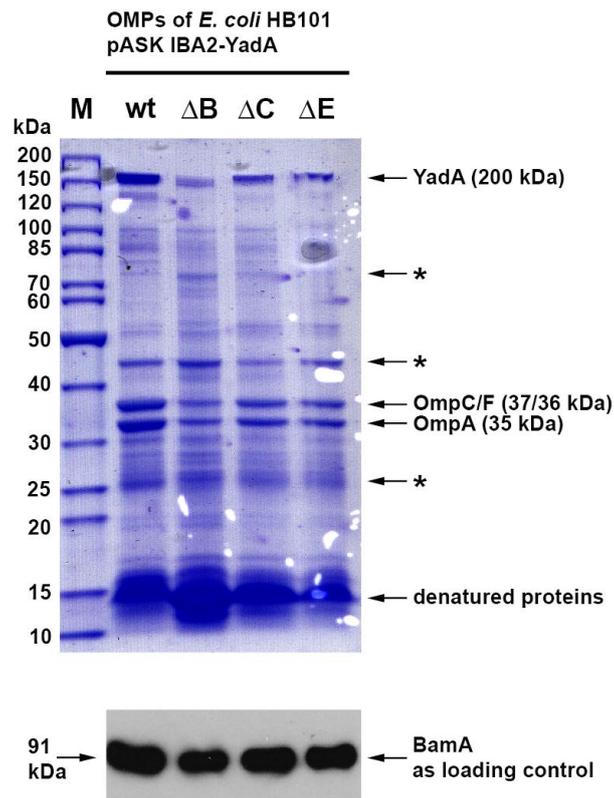


Abb. 14: Coomassie-Färbung äußerer Membranfraktionen von *E. coli* HB101 pASK IBA2-YadA Wildtyp, Δ BamB, Δ BamC und Δ BamE. (M=Marker; OMPs=outer membrane proteins; wt=Wildtyp; Δ B= Δ BamB; Δ C= Δ BamC; Δ E= Δ BamE). Proteine auf Höhe von YadA und der äußeren Membranproteine OmpC, OmpF und OmpA sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Bei den mit einem Stern (*) gekennzeichneten Proteinen handelt es sich vermutlich um Bestandteile der bakteriellen Stressantwort. Mit den äußeren Membranfraktionen wurde zusätzlich ein Immunoblot mit BamA-Färbung als Ladekontrolle durchgeführt.

Mittels Coomassie-Färbung konnte daher gezeigt werden, dass manche Proteine in äußeren Membranfraktionen von *E. coli* HB101 Δ BamB geringer konzentriert sind als in äußeren Membranen des Wildtyps. Andere Proteine waren höher konzentriert, wobei es sich dabei um Proteine der bakteriellen Stressantwort handeln könnte. Die Proteinzusammensetzung von *E. coli* HB101 Δ BamC und Δ BamE unterschied sich weniger stark von der des Wildtyps.

3.2.2 Die Porine OmpC und OmpF in äußeren Membranfraktionen

Nach der unspezifischen Proteinfärbung mit Coomassie-Färbelösung wurden die Porine OmpC und OmpF in präparierten äußeren Membranen von *E. coli* HB101 Wildtyp, Δ BamB, Δ BamC und Δ BamE spezifischer mittels Immunoblot visualisiert. Der verwendete Primärantikörper erkannte dabei beide Porine.

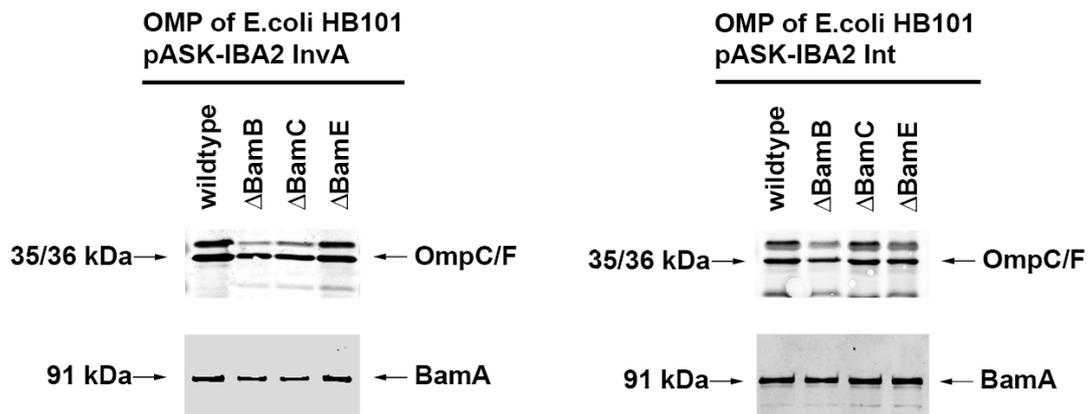


Abb. 15: Western-Blots äußerer Membranfraktionen von *E. coli* HB101 pASK-IBA2-Inv und -Int (mit ACTH induziertem Plasmid) mit OmpC/F-Färbung. Jede Probe enthielt die gleiche Proteinmenge. Die Färbung mit BamA-Antikörpern diente als Ladekontrolle.

Mit dem verwendeten Antikörper wurde bei etwa 35 kDa bis 36 kDa eine Doppelbande detektiert. Für OmpF (die weiter unten gelegene Bande) zeigten sich bei den verschiedenen Stämmen eher geringe Intensitätsunterschiede für die Porine. Die Intensität der Bande bei *E. coli* HB101 Δ BamB war dabei nur minimal schwächer als die der anderen Stämme.

Die Konzentration von OmpC (die weiter oben liegende Bande) unterschied sich dagegen stärker zwischen den verschiedenen Stämmen. Bei den äußeren Membranfraktionen von *E. coli* HB101 pASK-IBA2-Inv war die OmpC-Bande bei Deletion von *bamB* und *bamC* von geringerer Intensität als die bei Deletion von *bamE* oder beim Wildtyp. OmpF von *E. coli* HB101 pASK-IBA2-Int war beim Wildtyp und bei Deletion von *bamC* von vergleichbarer Intensität. Bei Deletion von *bamB* und *bamE* stellte sich OmpF dagegen schwächer konzentriert dar.

Folglich war die Biogenese des Porins OmpF durch Deletion einer nicht-essentiellen Bam-Komponente kaum beeinträchtigt. Die Konzentration von OmpC war dagegen in den äußeren Membranfraktionen der untersuchten Deletionsmutanten im Vergleich zu denen des Wildtyps leicht reduziert.

3.2.3 Einfluss der Deletion von *bamB*, *bamC* und *bamE* auf die Expression und Membraninsertion der Autotransporter-Adhäsine YadA, Invasin und Intimin

YadA und Invasin sind Pathogenitätsfaktoren des Durchfallerregers *Yersinia enterocolitica*, Intimin ist ein Pathogenitätsfaktor von *EHEC* und *EPEC*. YadA, Invasin und Intimin vermitteln unter anderem die Adhäsion dieser Erreger am Darmepithel des Wirtes. In den folgenden Versuchen wurde näher untersucht, ob ein Fehlen von BamB, C und E, als Bestandteile der Biogenesemaschinerie für alle 3 Proteine, die Biogenese und Membraninsertion dieser Pathogenitätsfaktoren beeinflussen.

Dazu wurden zunächst *E. coli* HB101 Wildtyp, Δ BamB, Δ BamC und Δ BamE-Stämme mit dem pASK-IBA2-YadA, -Inv, oder -Int-Plasmid transformiert. Dieses Plasmid wurde jeweils mit AHTC induziert. Aus Bakteriensubkulturen der genannten Stämme wurden sowohl Gesamtzelllysate hergestellt als auch die äußeren Bakterienmembranen präpariert. So sollte überprüft werden, ob sich die in den Gesamtzelllysaten detektierten Proteine auch tatsächlich in der äußeren Membran befanden oder nur im Periplasma akkumulierten und damit durch die Membranpräparation abgetrennt werden konnten.

Mit gleichen absoluten Proteinmengen dieser Proben wurde eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt und je nach enthaltenem Plasmid ein Western Blot zur Färbung von YadA, Invasin oder Intimin durchgeführt. Je höher die Intensität der entsprechenden Proteinbande war, umso höher war die enthaltene Proteinkonzentration in der Probe.

3.2.3.1 Darstellung und Quantifizierung von YadA in Gesamtzelllysaten und äußeren Membranfraktionen

Bei den Stämmen mit Deletion einer Bam-Komponente waren sowohl bei den Gesamtzelllysaten als auch den präparierten äußeren Membranen (Outer Membrane Proteins = OMPs) meist geringere Mengen des YadA-Trimers festzustellen als bei den Proben des Wildtyps. In den präparierten äußeren Membranen, in denen nur in die Membran inserierte oder an der Membran befindliche YadA-Proteine detektiert wurden, traten diese Unterschiede in der Regel deutlicher hervor. Im Vergleich zum Wildtyp war die Konzentration des YadA-Trimers vor allem bei den äußeren Membranen (OMPs) des Stammes mit Deletion von *bamB* deutlich geringer, was sich in einer reduzierten Bandenintensität zeigte.

Ferner wurden in den äußeren Membranfraktionen des Wildtyp-Stammes und der Stämme mit Deletion von *bamC* und *bamE* ähnliche Konzentrationen von YadA-Monomeren detektiert. In dem Stamm mit Deletion von *bamB* waren dagegen neben einer geringen YadA-Trimer-Konzentration auch kaum YadA-Monomere vorhanden.

Die periplasmatische Protease DegP, die in einer bakteriellen Stress-Response nicht korrekt gefaltete Proteine im Periplasma degradieren kann, wurde, wie in allen Gesamtzelllysaten der Deletionsstämmen nachgewiesen, gegenüber dem Wildtyp etwas hochreguliert.

Der Versuch zur Detektion von YadA in Gesamtzelllysaten und äußeren Membranfraktionen wurde insgesamt zweimal durchgeführt und das repräsentative Ergebnis eines Versuches in Abbildung 16 dargestellt.

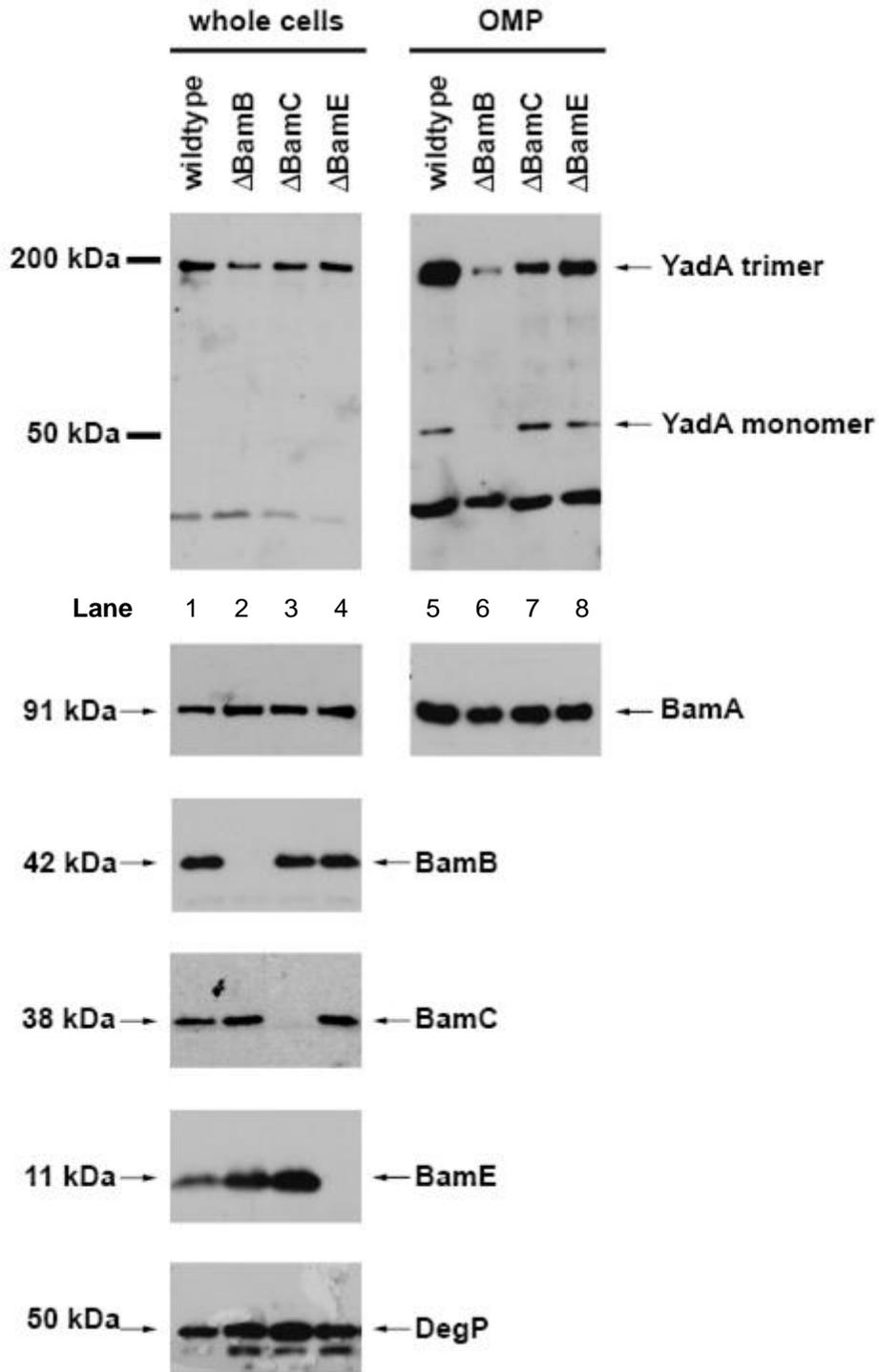


Abb. 16: Western-Blot von Gesamtzelllysaten (GZL/whole cells) und äußeren Membranproteinen (OMP) von *E. coli* HB101 Wildtyp, Δ BamB, Δ BamC und Δ BamE.

YadA-Färbung: YadA-Trimer bei etwa 200 kDa; YadA-Monomer bei etwa 50 kD; **BamA**-Färbung als Ladekontrolle; **BamB**, **BamC** und **BamE**-Färbungen der GZL zur Verifikation der verwendeten Deletionsstämme. Western-Blot mit Darstellung von **DegP** in GZL.

Quantifizierung der YadA- und BamA-Banden

Mit Hilfe der *BioDoc Analyze*-Software der Firma *Biometra* konnten die Intensitäten der dem YadA-Trimer entsprechenden Banden quantifiziert werden. Um die Unterschiede in der Intensität der Proteinbanden besser miteinander vergleichen zu können, wurden diese in Prozent der YadA-Trimer-Bande des Wildtyps angegeben, wobei die Intensität der Bande im Wildtyp auf 100 % gesetzt wurde..

Die Intensität der Proteinbande der Ladekontrolle BamA wurde ebenfalls bestimmt. Auch hier wurden die BamA-Banden der verschiedenen Proben in Prozent der BamA-Bande des Wildtyps angegeben (Tab. 28a). Dabei kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch die Konzentration von BamA, welches selbst ein äußeres Membranprotein ist, durch Deletion einer Bam-Komponente beeinflusst werden kann.

Tabelle 28a: Quantifizierung der Proteinbanden des YadA-Trimers und der Ladekontrolle BamA in zwei Versuchen für die Gesamtzelllysate und einem Versuch für die äußeren Membranfraktionen

YadA-Trimer in GZL					YadA-Trimer in OMP-Fraktionen				
	Lane	Vers.-nr.	Area	Area in % of wt		Lane	Vers.-nr.	Area	Area in % of wt
wildtype	1	1	11.729	100	wildtype	5	1	31.695	100
		2	35.891	100					
ΔBamB	2	1	5.513	47	ΔBamB	6	1	3.991	13
		2	5.406	15					
ΔBamC	3	1	7.976	68	ΔBamC	7	1	11.564	36
		2	28.455	79					
ΔBamE	4	1	8.650	74	ΔBamE	8	1	17.411	55
		2	30.247	84					
BamA in GZL					BamA in OMP-Fraktionen				
	Lane	Vers.-nr.	Area	Area in % of wt		Lane	Vers.-nr.	Area	Area in % of wt
wildtype	1	1	7.453	100	wildtype	5	1	6.257	100
		2	29.803	100					
ΔBamB	2	1	10.243	137	ΔBamB	6	1	16.939	76
		2	25.981	87					
ΔBamC	3	1	9.466	127	ΔBamC	7	1	18.946	85
		2	22.333	75					
ΔBamE	4	1	11.616	156	ΔBamE	8	1	16.150	72
		2	21.884	73					

Area = dimensionsloser Wert als Maß für die Pixeldichte durch Färbung einer Proteinbande in einer definierten Fläche. Diese Pixeldichte wurde mit Hilfe der *BioDoc Analyze*-Software der Firma *Biometra* ermittelt. **Lane**=Laufspur einer Probe, von links nach rechts mit 1 bis 8 beziffert. Die von den Proteinbanden der Deletionsstämmen eingenommenen Flächen wurden in Prozent der vom Wildtyp-Stamm gefärbten Fläche angegeben (**Area in % of wt**).

Um die Konzentration des YadA-Trimers in den Proteinbanden der Membranfraktionen möglichst genau miteinander vergleichen zu können, wurden die in Relation zum Wildtyp bestimmten Intensitäten der YadA-Trimer-Banden in das Verhältnis zu denen der zugehörigen BamA-Bande gesetzt. Dazu wurde für jede Probe der Quotient des YadA-Trimers in Prozent des Wildtyps durch BamA in Prozent des Wildtyps gebildet (Tab. 28b). So sollten versuchstechnisch bedingte Beladungsunterschiede möglichst

ausgeglichen und damit ein möglichst exakter Vergleich der Bandenintensität einer Probe mit der des Wildtyps erreicht werden.

Tabelle 28b: Verhältnis des YadA-Trimer (in % des Wildtyps) zur BamA-Ladekontrolle (in % des Wildtyps) in zwei Versuchen für die Gesamtzelllysate (GZL) und in einem Versuch für die äußeren Membranfraktionen (OMP=outer membrane protein-Fractionen)

Relative Intensität der YadA-Trimer-Bande im Verhältnis zu BamA in OMP-Fractionen			Relative Intensität der YadA-Trimer-Bande im Verhältnis zu BamA in OMP-Fractionen		
	Vers.-nr	$\left[\frac{\text{YadA-T.in \% of wt}}{\text{BamA in \% of wt}} \right]$		Vers.-nr	$\left[\frac{\text{YadA-T.in \% of wt}}{\text{BamA in \% of wt}} \right]$
wildtype	1	1	wildtype	1	1
	2	1		Δ BamB	1
Δ BamB	1	0,343	Δ BamC		1
	2	0,172		Δ BamE	1
Δ BamC	1	0,535			
	2	1,053			
Δ BamE	1	0,474			
	2	1,151			

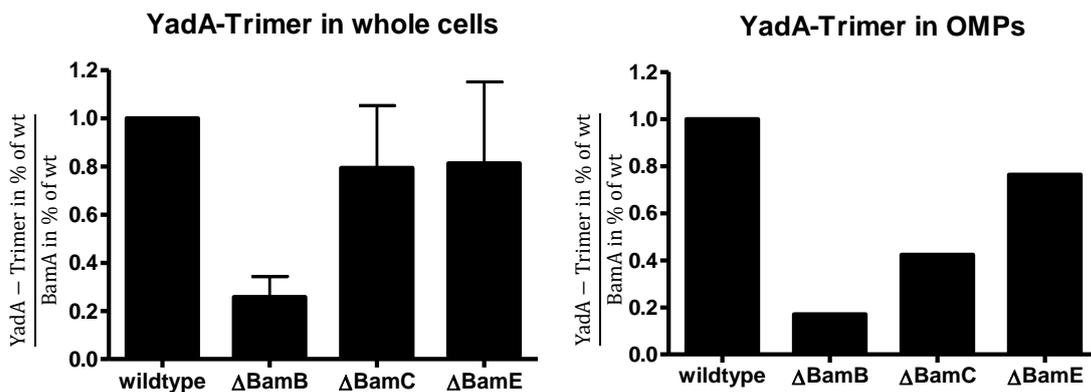


Abb. 17: Die relative Intensität der YadA-Trimer-Bande im Verhältnis zu BamA in Gesamtzelllysaten (whole cells) und präparierten äußeren Membranen (OMPs).

Auf der y-Achse ist das Ergebnis des Quotienten $\frac{\text{YadA-Trimer in \% of wt}}{\text{BamA in \% of wt}}$ angegeben;

die x-Achse ist mit der Bezeichnung der untersuchten Stämme *E. coli* HB101 Wildtyp, Δ BamB, Δ BamC und Δ BamE pASK-IBA2-YadA beschriftet.

Definitionsgemäß betrug der Quotient des **Wildtyps** 1. Die Intensität der YadA-Trimer-Bande von *E. coli* **HB101** Δ **BamB** war im Vergleich zu den anderen Proben stets am geringsten. Dies zeigte sich an den absoluten, dimensionslosen Werten für die Bandenintensität (in Tabelle 28a im Feld „Area“ angegeben) und an dem unter Berücksichtigung der Intensität der Ladekontrolle gebildeten Quotienten. Für die Gesamtzelllysate lag dieser zwischen 0,172 und 0,343 und bei den präparierten äußeren Membranfraktionen bei 0,171. Damit war die Konzentration des YadA-Trimers bei Deletion von *bamB* gegenüber dem Wildtyp um den Faktor 2,9 bis 5,8 reduziert.

Bei Deletion von *bamC* und *bamE* war die Intensität der Proteinbande des YadA-Trimers in Relation zum Wildtyp und der BamA-Ladekontrolle höher als bei Deletion von *bamB* und in einem Versuch in Gesamtzelllysaten sogar auf Wildtypniveau. In einem weiteren Versuch war die YadA-Konzentration in Gesamtzelllysaten und äußeren Membranfraktionen im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 1,3 bis 2,4 reduziert. So lag der gebildete Quotient bei *E. coli* **HB101** Δ **BamC** bei 0,535 für die Gesamtzelllysate und bei 0,424 für die präparierten äußeren Membranen. Bei *E. coli* **HB101** Δ **BamE** betrug der Quotient 0,474 für die Gesamtzelllysate und 0,764 für die präparierten äußeren Membranen (Tabelle 28b).

Folglich war die Menge an YadA sowohl bei Deletion von *bamB*, als auch tendentiell in den präparierten äußeren Membranen der Stämme mit Deletion von *bamC* und *bamE* gegenüber dem Wildtyp reduziert. Bei Deletion von *bamB* war der Unterschied zum Wildtyp-Stamm am größten.

Ob ein Membranprotein tatsächlich stabil in die äußere Membran inseriert ist, lässt sich mit den bisher angewandten Methoden nicht klären. Um nun zu testen, ob das in den Western Blots mit OMP-Fractionen detektierte YadA nicht nur lose adhärent, sondern tatsächlich stabil in der OM inseriert wurde, wurde eine Harnstoffextraktion durchgeführt.

3.2.3.2 Harnstoffextraktion äußerer Membranfraktionen von *E. coli* HB101 pASK-IBA2-YadA

Die präparierten äußeren Membranen von *E. coli* HB101 Wildtyp, Δ BamB, Δ BamC und Δ BamE pASK-IBA2-YadA wurden einer Harnstoffextraktion mit anschließender Proteinausfällung unterzogen. Dabei wurde wie in den Abschnitten 2.2.3.10 und 2.2.3.11 beschrieben, vorgegangen. Durch den Harnstoff sollten die nur membranassoziierten, nicht effektiv in die äußere Bakterienmembran inserierten Membranproteine solubilisiert werden. Es wurde davon ausgegangen, dass sich diese nach Einwirkung des Harnstoffes und anschließender Ultrazentrifugation im Überstand (engl.: supernatant (S)) der Probe lösen. Die ordentlich inserierten äußeren Membranproteine würden sich dagegen im Pellet befinden (Oberhettinger et al, 2012).

Mit den erhaltenen Überstand- und Pelletfraktionen wurde ein Western Blot zur Färbung von YadA durchgeführt, der in Abbildung 18 dargestellt ist.

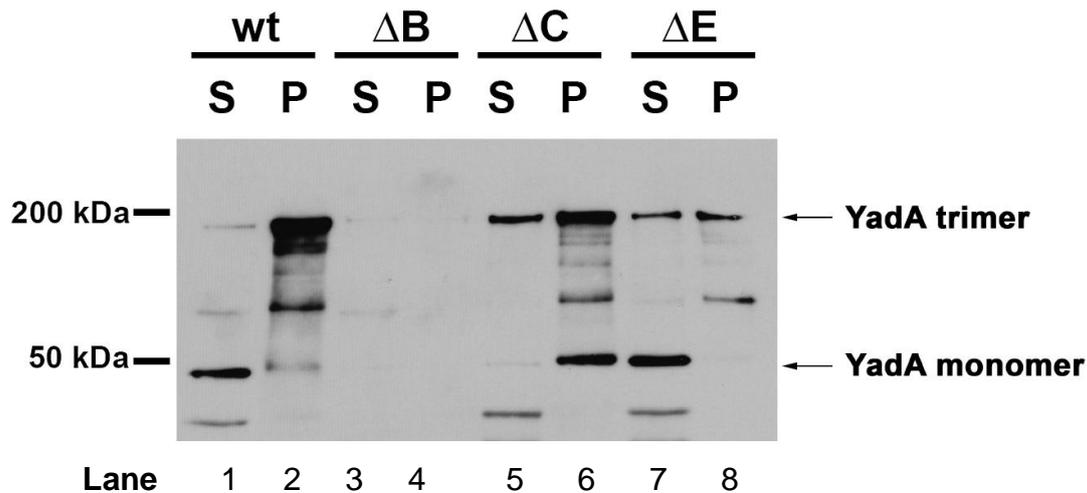


Abb. 18: Western Blot mit YadA-Färbung nach Harnstoffextraktion präparierter äußerer Membranen von *E. coli* HB101 Wildtyp (**wt**), Δ BamB (**Δ B**), Δ BamC (**Δ C**) und Δ BamE (**Δ E**) pASK-IBA2-YadA. Im Überstand (S) waren nicht effektiv in die äußere Bakterienmembran inserierte Membranproteine gelöst, im Pellet (P) befanden sich stabil in die äußere Membran inserierte Proteine. Repräsentatives Ergebnis eines von zwei Versuchen, im Folgenden als Versuch 1 bezeichnet.

Mit der *BioDoc Analyze*-Software wurden nun die Intensitäten der YadA-Trimer-Banden bestimmt. Dabei wurden jeweils die Banden von Überstand und Pellet eines

Bakterienstammes miteinander verglichen. Die Intensitäten der YadA-Trimer-Banden von Überstand und Pellet eines Stammes wurden zudem addiert. Dieser Wert wurde als jeweils 100 % der YadA-Trimer-Menge der beiden aufgetragenen Proben dieses Stammes definiert. Anschließend wurde der prozentuale Anteil bestimmt, den die Banden von Überstand und Pellet des Stammes an diesem Gesamtwert bildeten.

So sollte ermittelt werden, welcher prozentuale Anteil des YadA-Trimers in dem überprüften Stamm durch den Harnstoff solubilisiert wurde und welcher fest in der äußeren Bakterienmembran verankert war.

Tab. 29a: Quantifizierung der Farbeintensität der YadA-Trimer-Banden in Überstand (S)- und Pellet- (P) Fraktionen präparierter äußerer Bakterienmembranen nach Harnstoffextraktion in Versuch 1

Intensität des YadA-Trimers in Überstand (S) und Pellet (P) nach Harnstoffextraktion (Versuch 1)					
		Lane	Area	Total Sign of YadA-Trimer (sum of Area S + Area P)	Intensity of YadA-Trimer in % of total sign
wildtype	S	1	893,0	18.324,9	5
	P	2	17.431,9		95
ΔBamB	S	3	194,6	304,7	64
	P	4	110,1		36
ΔBamC	S	5	6.414,5	19.793,9	32
	P	6	13.379,3		68
ΔBamE	S	7	4.058,5	8.044,1	50
	P	8	3.985,6		50

Tab. 29b: Quantifizierung der YadA-Trimer-Bandenintensität in Überstand (S)- und Pellet- (P-) Fraktionen präparierter äußerer Bakterienmembranen nach Harnstoffextraktion in Versuch 2

Intensität des YadA-Trimers in Überstand (S) und Pellet (P) nach Harnstoffextraktion (Versuch 2)					
		Lane	Area	Total Sign of YadA-Trimer (sum of Area S + Area P)	Intensity of YadA-Trimer in % of total sign
wildtype	S	1	10.847	62.406	17
	P	2	51.559		83
Δ BamB	S	3	1.351	3.129	43
	P	4	1.778		57
Δ BamC	S	5	1.267	8.588	15
	P	6	7.321		85
Δ BamE	S	7	3.088	4.614	67
	P	8	1.526		33

Area = dimensionsloses Maß für die Pixeldichte durch Färbung der Proteinbande in einer definierten Fläche. Dieser Wert wurde mit Hilfe der *BioDoc Analyze*-Software ermittelt.
Lane = Laufspur einer Probe, von links nach rechts mit 1 bis 8 beziffert.

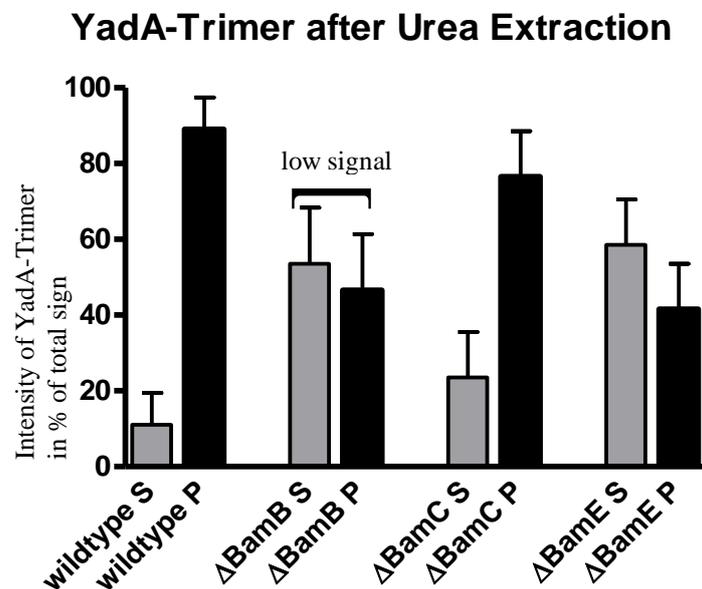


Abb. 19: Relative der Färbeintensität der YadA-TrimerBanden in Überstand (S)- und Pellet- (P-) Fraktionen nach Harnstoffextraktion.

y-Achse: Prozentualer Anteil der Bandenintensität in Bezug auf das Gesamtsignal in Pellet und Überstand eines untersuchten Stammes zusammen.

x-Achse: Benennung der verwendeten Probe.

Bei der Harnstoffextraktion äußerer Membranen von *E. coli* **HB101 Wildtyp** wurde ein größerer Anteil des YadA-Trimer-Signals in der Pelletfraktion detektiert. Dieser lag im ersten Versuch bei 95 % und im zweiten Versuch bei 83 %. Der kleinere Anteil von 5 % beziehungsweise 17 % wurde im Überstand detektiert. Dagegen war auf Höhe des YadA-Monomers im Überstand ein deutliches Signal zu erkennen. Im Pellet des Wildtyps war dieses Signal deutlich schwächer ausgeprägt.

Bei *E. coli* **HB101 Δ BamB** war in beiden Fraktionen die Signalstärke sowohl auf Höhe des YadA-Trimers als auch auf Höhe des YadA-Monomers sehr gering, da die Menge an YadA in den äußeren Membranen dieses Stammes deutlich reduziert war (siehe Abb. 16). Daher kann die Analyse der Bandenintensitäten in Pellet- und Überstandfraktionen nur eingeschränkt beurteilt werden. Bei der unter Vorbehalt durchgeführten Quantifizierung wurden in einem Versuch 64 % und in einem zweiten Versuch 43 % des YadA-Trimers im Überstand detektiert. 36 % beziehungsweise 57 % des Signals verblieben im Pellet.

In den Proben von *E. coli* **HB101 Δ BamC** waren 32 % beziehungsweise 15 % des YadA-Trimer-Signals im Überstand und 68 % bis 85 % im Pellet. In der Lauffront der Pelletfraktion war zudem eine intensive Bande auf Höhe des YadA-Monomers zu erkennen. Beim Überstand war diese nur schwach vorhanden.

Bei *E. coli* **HB101 Δ BamE** waren die Intensitäten der YadA-Trimer-Bande im Überstand und Pellet mit jeweils rund 50 % Anteil am Gesamtsignal in einem ersten Versuch in etwa gleich hoch. In einem zweiten Versuch wurden 67 % des Gesamtsignals im Überstand und 33 % in der Pelletfraktion detektiert. Die YadA-Monomer-Konzentration unterschied sich jedoch deutlicher zwischen Überstand- und Pelletfraktionen. Im Überstand wurde ein deutliches Signal auf Höhe des YadA-Monomers detektiert und erschien kräftiger als die YadA-Trimer-Bande. In der Lauffront des Pellets war die YadA-Monomer-Bande dagegen nicht sichtbar.

Somit verblieb beim Wildtyp der größte Anteil des YadA-Trimers nach Harnstoffextraktion im Pellet. Im Überstand befanden sich vor allem YadA-Monomere. Bei den Deletionsmutanten war der Anteil der YadA-Trimer Moleküle, die durch die Harnstoffextraktion aus der äußeren Bakterienmembran gelöst werden konnte, tendenziell höher als beim Wildtyp-Stamm. Dies war vor allem bei

E. coli HB101 Δ BamB und Δ BamE zu beobachten, bei denen ein durchschnittlich höherer Anteil des YadA-Trimers im Überstand detektiert wurde. In der Überstandfraktion von *E. coli* HB101 Δ BamE trat zudem ein hoher Anteil des YadA-Monomers auf. Bei *E. coli* HB101 Δ BamC verblieb dagegen ein höherer Anteil des YadA-Trimer-Signals im Pellet. Zudem war in der Lauffront der Pelletfraktion ein deutliches Signal auf Höhe des YadA-Monomers zu erkennen, welches von vergleichbarer Intensität zur YadA-Trimer-Bande dieser Probe war.

3.2.3.3 Darstellung und Quantifizierung von Invasin in Gesamtzelllysaten und äußeren Membranfraktionen

Invasin ist ein Autotransporter-Adhäsion von *Yersinia enterocolitica*. Analog zu dem Versuchsaufbau mit den YadA-exprimierenden Stämmen wurden aus *E. coli* HB101 pASK-IBA2-Inv Wildtyp, Δ BamB, Δ BamC und Δ BamE-Stämmen Gesamtzelllysate hergestellt und äußere Membranen präpariert, um zu ermitteln, ob sich das in den Gesamtzelllysaten befindliche Invasin auch in oder an der äußeren Membran befand. Das in den Proben enthaltene Invasin wurde nach Durchführung einer SDS-Page mittels Western Blot sichtbar gemacht.

Für den *E. coli* HB101 Wildtyp-Stamm war das Signal für Invasin sowohl bei den Gesamtzelllysaten als auch bei den äußeren Membranfraktionen im Vergleich zu den anderen im SDS-Gel aufgetragenen Proben am stärksten. Bei Proben der Stämme mit Deletion einer Bam-Komponente war die Signalstärke dagegen in verschiedenem Maße abgeschwächt. Diese Abschwächung war vor allem bei Deletion von *bamB* und zum Teil auch bei Deletion von *bamE* am ausgeprägtesten.

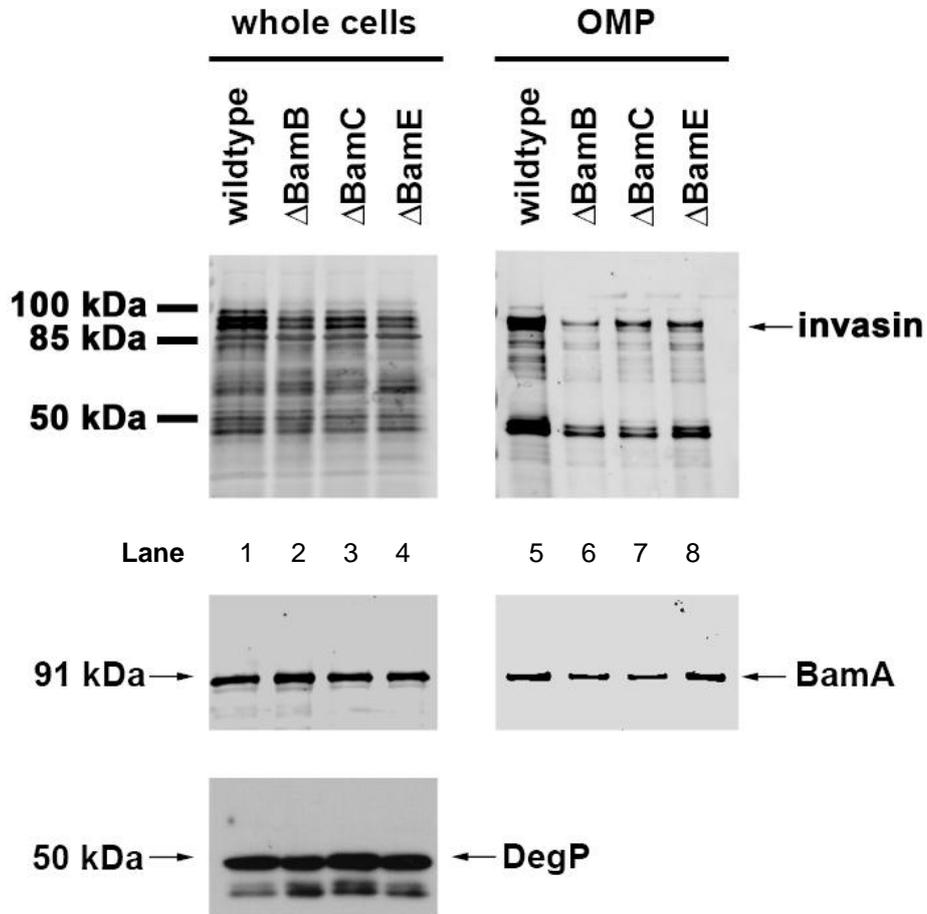


Abb. 20a: Western-Blots mit Färbungen von **Invasin** und von **BamA** als Ladekontrolle in Gesamtzelllysaten (GZL) und präparierten äußeren Membranen von *E. coli* HB101 Wildtyp, Δ BamB, Δ BamC und Δ BamE; Färbung der Protease **DegP** in GZL.

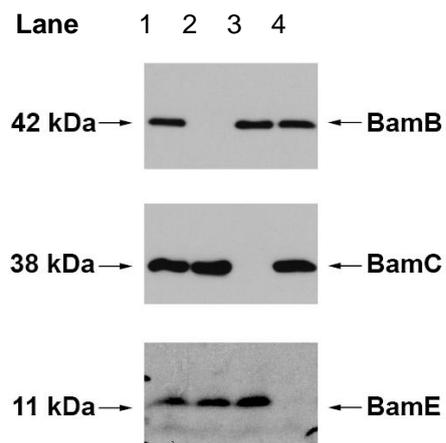


Abb. 20b: Western Blots mit **BamB**, **BamC** und **BamE**-Färbungen der GZL zur Verifikation der für Abb. 20a verwendeten Deletionsstämme.

Die Banden von Invasin und BamA wurden mit der *BioDoc Analyze*-Software quantifiziert. Für die Quantifizierung der Signalstärke von Invasin wurde stets die oberste Proteinbande des Immunoblots von Invasin herangezogen, da sich diese auf der Höhe des vollständigen Invasin-Proteins mit einer Größe von etwa 92 kDa befand. In Bezug auf die Ladekontrolle BamA muss auch hier beachtet werden, dass ein Einfluss von BamB, BamC und BamE auf die Biogenese von BamA nicht ausgeschlossen werden kann. Aufgrund der ähnlichen Bandenintensität der BamA-Bande in den verschiedenen Proben mit gleichen Proteinmengen wurde BamA trotz dieser Einschränkung als Ladekontrolle gewählt.

Tabelle 30a: Quantifizierung der Proteinbanden von Invasin und der Ladekontrolle BamA in zwei Versuchen

Invasin in GZL					Invasin in OMP-Fractionen				
	Lane	Vers.-nr.	Area	Area in % of wt		Lane	Vers.-nr.	Area	Area in % of wt
wildtype	1	1	7.548	100	wildtype	5	1	13.381	100
		2	10.095	100					
ΔBamB	2	1	3.541	47	ΔBamB	6	1	3.082	23
		2	3.281	33					
ΔBamC	3	1	4.752	63	ΔBamC	7	1	5.516	41
		2	7.194	71					
ΔBamE	4	1	3.373	45	ΔBamE	8	1	5.773	43
		2	2.102	21					
BamA in GZL					BamA in OMP-Fractionen				
	Lane	Vers.-nr.	Area	Area in % of wt		Lane	Vers.-nr.	Area	Area in % of wt
wildtype	1	1	8.813	100	wildtype	5	1	6.257	100
		2	16.381	100					
ΔBamB	2	1	8.999	102	ΔBamB	6	1	4.188	67
		2	17.017	104					
ΔBamC	3	1	8.012	91	ΔBamC	7	1	3.634	58
		2	16.668	102					
ΔBamE	4	1	9.747	124	ΔBamE	8	1	5.712	91
		2	16.321	100					

Area = dimensionsloses Maß für die Färbungsintensität einer Proteinbande durch Bestimmung der Pixeldichte.

Lane = Laufspur der Probe von 1 bis 8.

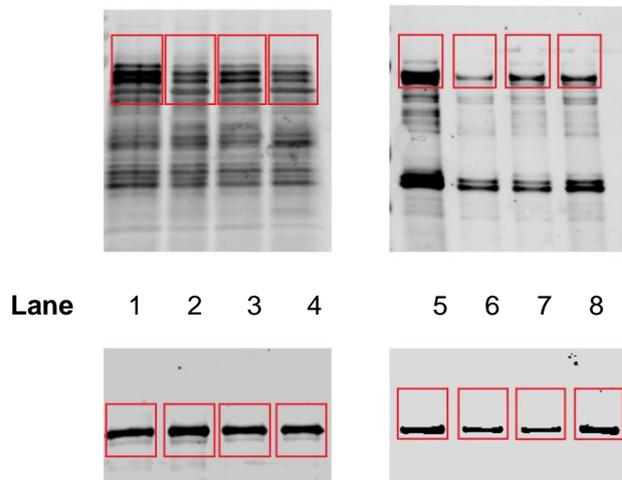


Abb. 21: Auszug aus Abb. 20a zur Invasinexpression: Invasin- und BamA-Färbung der Gesamtzellslysate und der äußeren Membranfraktionen.

Bereiche, in denen die Bandenintensität quantifiziert wurde, wurden mit einem Rahmen markiert.

Tabelle 31: Verhältnis der Invasinbande (in % des Wildtyps) zur BamA-Ladekontrolle (in % des Wildtyps) in Gesamtzellslysaten (GZL) und in äußeren Membranfraktionen (OMP = outer membrane protein-Fraktionen)

Relative Intensität von Invasin im Verhältnis zu BamA in GZL			Relative Intensität von Invasin im Verhältnis zu BamA in OMP-Fraktionen		
	Vers.-nr.	$\left[\frac{\text{Invasin in \% of wt}}{\text{BamA in \% of wt}} \right]$		Vers.-nr.	$\left[\frac{\text{Invasin in \% of wt}}{\text{BamA in \% of wt}} \right]$
wildtype	1	1	wildtype	1	1
	2	1			
ΔBamB	1	0,461	ΔBamB	1	0,343
	2	0,317			
ΔBamC	1	0,692	ΔBamC	1	0,706
	2	0,696			
ΔBamE	1	0,363	ΔBamE	1	0,473
	2	0,210			

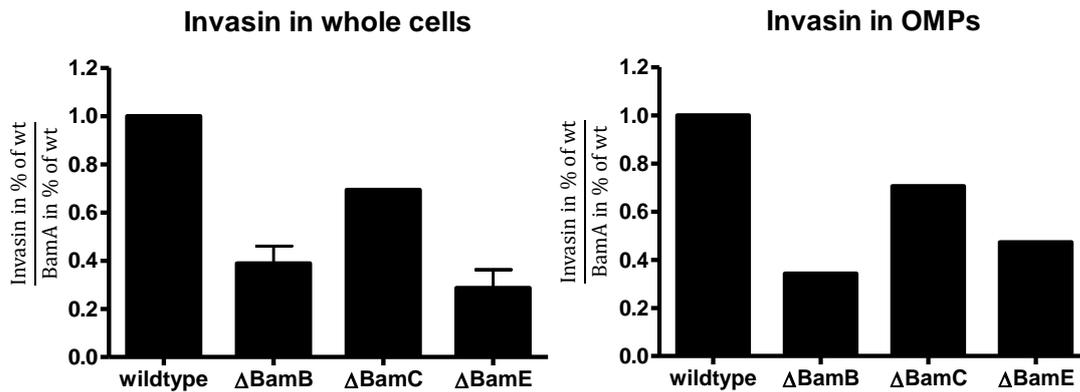


Abb. 22: Die relative Intensität der Invasin-Bande im Verhältnis zu BamA in Gesamtzelllysaten und präparierten äußeren Membranen (OMPs)

(y-Achse: Ergebnis des Quotienten $\frac{\text{Invasin in \% of wt}}{\text{BamA in \% of wt}}$;

x-Achse: Bezeichnung der untersuchten Stämme *E. coli* HB101 Wildtyp, ΔBamB, ΔBamC und ΔBamE pASK-IBA2-Inv beschriftet.)

Auch für Invasin wurde die relative Bandenintensität in Abhängigkeit zur Ladekontrolle BamA berechnet. Dazu wurde die Intensität der Invasinbande in der Probe eines Deletionsstammes in Prozent der Invasin-Bandenintensität des Wildtyp-Stammes angegeben. Dieser Wert wurde ins Verhältnis zur Intensität der BamA-Ladekontrolle derselben Probe gesetzt, welche ebenfalls in Prozent der BamA-Bande des Wildtyp-Stammes angegeben wurde. Die Ergebnisse des so gebildeten Quotienten sind in Tabelle 31 angegeben.

Bei Stämmen mit Deletion von *bamB* und *bamE* war der gebildete Quotient am kleinsten. Im Vergleich zum Wildtyp-Stamm, dessen relative Bandenintensität 1 betrug, lag diese bei Deletion von *bamB* in einem Versuch bei 0,461 und in einem zweiten Versuch bei 0,317 in Gesamtzelllysaten (GZL) und bei 0,343 in den äußeren Membranfraktionen. Damit war die Invasinkonzentration im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 2,2 bis 3,15 reduziert. Bei Deletion von *bamE* betrug der Quotient im ersten Versuch 0,363 und im zweiten Versuch 0,210 bei Gesamtzelllysaten (GZL) und 0,473 in den präparierten äußeren Membranen. Die Invasinkonzentration war somit um den Faktor 2,1 bis 4,8 reduziert.

Für *E. coli* HB101 Δ BamC war die relative Bandenintensität im Vergleich zu den anderen Deletionsstämmen mit 0,692 beziehungsweise 0,696 in GZL und mit 0,706 in äußeren Membranfraktionen am höchsten. Somit war die Invasinkonzentration gegenüber dem Wildtyp um den Faktor 1,42 bis 1,44 reduziert.

In Abbildung 20a ist auch ein Western Blot mit Färbung der Protease **DegP** dargestellt. Wie bei den Stämmen mit dem pASK-IBA2-YadA-Plasmid (Abb. 16) unterschied sich auch hier die Expression von DegP zwischen den aufgetragenen Proben geringfügig. Es erschien eine Doppelbande, wobei eine Bande bei etwa 50 kDa und eine zweite Bande etwas unterhalb von 50 kDa lag. Dabei war vor allem die weiter unten liegende Bande bei Deletion einer Bam-Komponente etwas intensiver. Die Bande auf Höhe von 50 kDa war bei den verschiedenen Stämmen von vergleichbarer Intensität.

3.2.3.4 Harnstoffextraktion äußerer Membranfraktionen von *E. coli* HB101 pASK-IBA2-Inv

Mit den präparierten äußeren Membranen von *E. coli* HB101 Wildtyp, Δ BamB, Δ BamC und Δ BamE pASK-IBA2-Inv wurden wie unter 3.2.3.2 Harnstoffextraktionen mit anschließender Proteinausfällung durchgeführt, um nicht stabil in die Membran inserierte Invasin-Moleküle in den Überstand (S) zu lösen. Fest in die Membran inserierte Proteine waren im Pellet (P). Von Überstand und Pellet jeder Probe wurden gleiche Volumina auf ein SDS-Gel aufgetragen und ein Western Blot mit Invasin-Färbung durchgeführt. Die Färbeintensität der Invasin-Banden auf Höhe von ca. 92 kDa wurde mit der *BioDoc Analyze*-Software quantifiziert. Anschließend wurde der prozentuale Anteil berechnet, den die Invasinbanden in Überstand- und Pelletfraktion eines Stammes hatten.

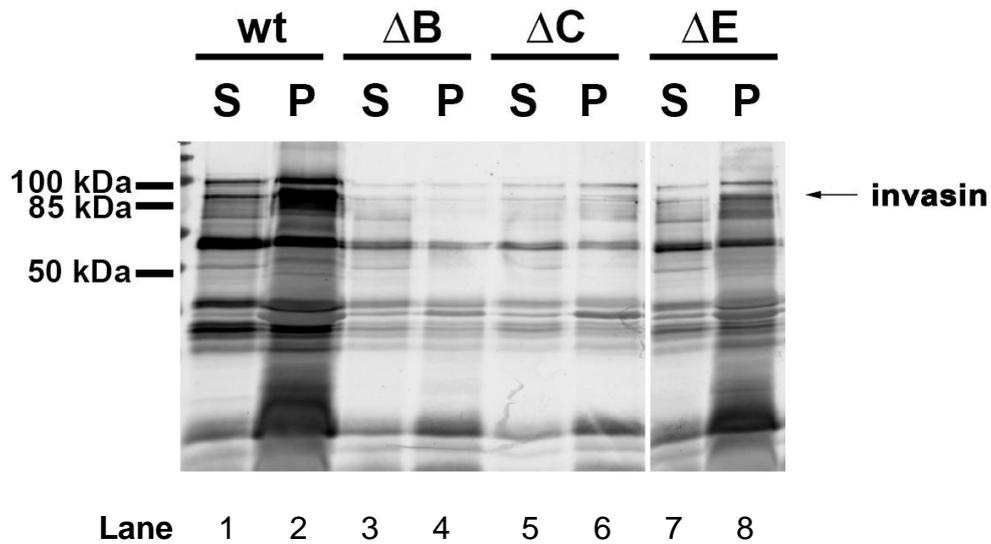


Abb. 23a: Western Blot mit Invasinfärbung nach Harnstoffextraktion von präparierten äußeren Membranen von *E. coli* HB101 Wildtyp (**wt**), Δ BamB (**ΔB**), Δ BamC (**ΔC**) und Δ BamE (**ΔE**) pASK-IBA2-Inv (im Folgenden als Versuch 1 bezeichnet).

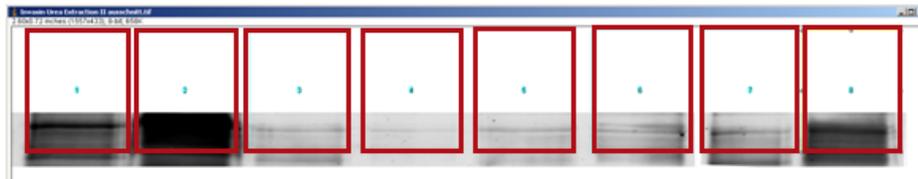


Abb. 23b: Ausschnitt aus Abb. 23a. In den umrandeten Bereichen wurde die Pixeldichte mit Hilfe der *BioDoc Analyze*-Software quantifiziert. In den markierten Bereichen befand sich jeweils die als Invasin identifizierte Proteinbande.

Tab. 32: Quantifizierung der Färbeintensität der Invasin-Banden in Überstand (S)- und Pellet- (P) Fraktionen präparierter äußerer Bakterienmembranen

Versuch 1: Intensität von Invasin in Überstand (S) und Pellet (P) nach Harnstoffextraktion (Versuch 1, siehe Abbildungen 23 a und b)					
		Lane	Area	Total Sign of Invasin (sum of Area S + Area P)	Intensity of Invasin in % of total sign
wildtype	S	1	8.403	22.395	38
	P	2	13.992		62
ΔBamB	S	3	830	1.206	69
	P	4	376		31
ΔBamC	S	5	564	1.552	36
	P	6	988		64
ΔBamE	S	7	1.308	6.039	22
	P	8	4.731		78

Versuch 2: Intensität von Invasin in Überstand (S) und Pellet (P) nach Harnstoffextraktion (Versuch 2)					
		Lane	Area	Total Sign of Invasin (sum of Area S + Area P)	Intensity of Invasin in % of total sign
wildtype	S	1	5.587	18.547	30
	P	2	12.960		70
ΔBamB	S	3	444	727	61
	P	4	283		39
ΔBamC	S	5	3.938	13.371	29
	P	6	9.433		71
ΔBamE	S	7	2.544	8.338	31
	P	8	5.794		69

Area = dimensionsloses Maß für die Pixeldichte durch Färbung der Proteinbande in einer definierten Fläche. Der Wert wurde mit Hilfe der *BioDoc Analyze*-Software ermittelt.

Lane = Laufspur einer Probe, von links nach rechts mit 1 bis 8 beziffert.

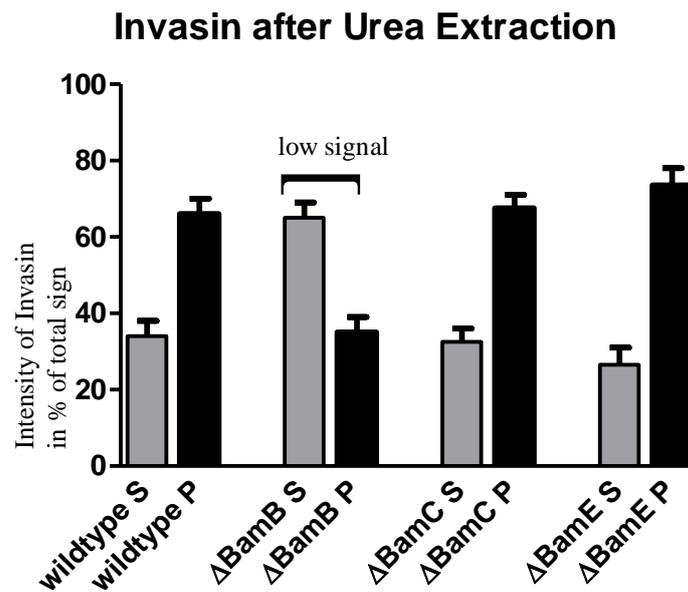


Abb. 24: Relative der Intensität der Invasin-Banden in Überstand (S)- und Pellet- (P) Fraktionen nach Harnstoffextraktion. y-Achse: Prozentualer Anteil der Bandenintensität in Bezug auf das Gesamtsignal in Pellet und Überstand eines untersuchten Stammes zusammen; x-Achse: Benennung der verwendeten Probe.

Bei den Proben des **Wildtyp**-Stammes wurde mehr Invasin in der Pelletfraktion detektiert als im Überstand. Der Anteil der Bandenintensität in der Pelletfraktion am Gesamtsignal lag bei 62 % in einem ersten Versuch und bei 70 % in einem zweiten Versuch. Entsprechend betrug der Anteil des Signals der Invasinbande im Überstand 38 % beziehungsweise 30 %. Nach Harnstoffextraktion äußerer Membranen von *E. coli* **HB101 ΔBamB** war die Intensität der Invasinbande im Überstand mit 69 % beziehungsweise 61 % Anteil am Gesamtsignal höher als in der Pelletfraktion mit 31 bis 39 %. Allerdings war die Signalstärke der Invasinbande in beiden Fraktionen gering, sodass deren Quantifizierung unter Vorbehalt beurteilt werden muss.

Bei den Proben von *E. coli* **HB101 ΔBamC bzw. E** wurde dagegen ein höherer Anteil von Invasin in der Pelletfraktion detektiert. Bei *E. coli* HB101 ΔBamC waren 64 bis 71 % des Gesamtsignals in der Pelletfraktion zu finden. Bei Deletion von *bamE* befanden sich 78 % beziehungsweise 69 % des Signals in der unlöslichen Pelletfraktion.

Auch nach Harnstoffextraktion der Invasin-exprimierenden Stämme nahmen die Proben von *E. coli* HB101 Δ BamB eine Sonderstellung ein. Der prozentual höhere Anteil des Invasin-Signals wurde hier im Überstand detektiert, wobei die Signalintensität in beiden Fraktionen gering war. Bei den anderen Proben war die Signalstärke in der Pelletfraktion dagegen höher als im Überstand.

3.2.3.5 Darstellung und Quantifizierung von Intimin in Gesamtzelllysaten und äußeren Membranfraktionen

Wie unter 3.2.3.3 beschrieben, wurden aus Subkulturen von *E. coli* HB101 Wildtyp, Δ BamB, Δ BamC und Δ BamE-Stämme mit dem pASK-IBA2-Int (=Intimin)-Plasmid Gesamtzelllysate hergestellt und die äußeren Bakterienmembranen präpariert. Mittels SDS-Gel und anschließendem Western Blot wurden die Proteinbanden von Intimin und BamA visualisiert. BamA diente dabei als Ladekontrolle. Auch hier kann ein möglicher Einfluss der Deletion von *bamB*, *bamC* oder *bamE* auf die Biogenese von BamA nicht ausgeschlossen werden. BamA wurde dennoch aufgrund seiner ähnlichen Proteinkonzentrationen in den verwendeten Proben mit gleichen Proteinmengen als Ladekontrolle gewählt.

Des Weiteren wurde aus einem SDS-Gel mit Proben der Gesamtzelllysate ein Western Blot mit DegP-Färbung durchgeführt. Wie in den Abbildungen 16 und 20a (Seite 88 und Seite 98) wurde DegP in den Deletionsstämmen im Vergleich zum Wildtyp leicht hochreguliert.

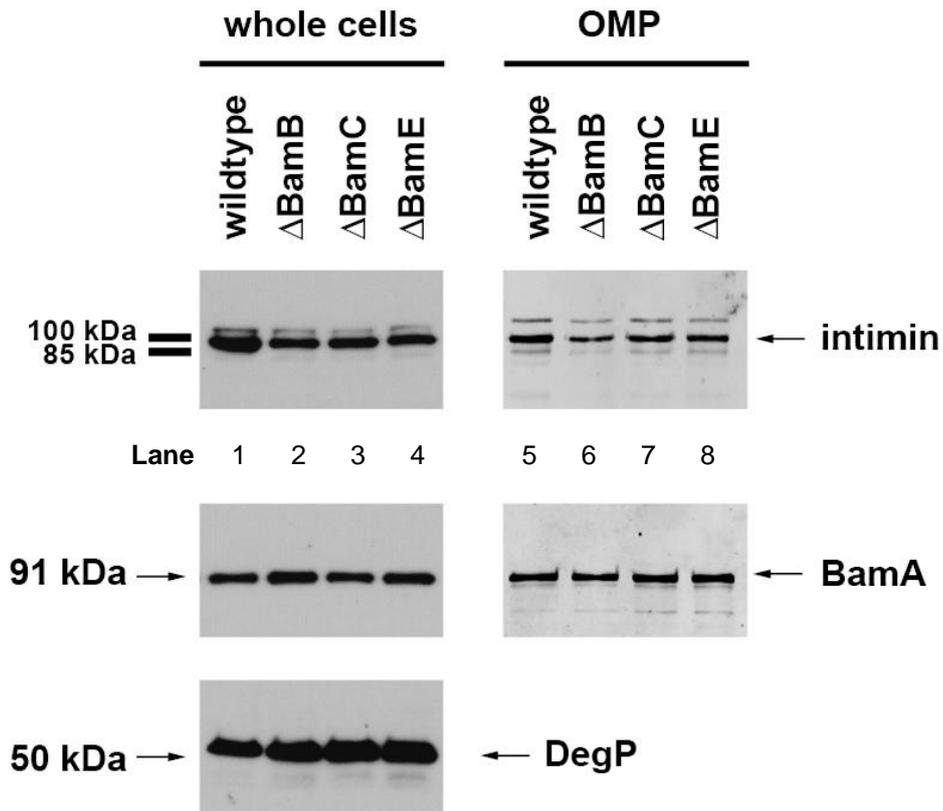


Abb. 25a: Western-Blot von Gesamtzelllysaten (GZL/whole cells) und äußeren Membranproteinen (OMP) von *E. coli* HB101 Wildtyp, Δ BamB, Δ BamC und Δ BamE pASK-IBA2-Int. Färbungen von **Intimin** und **BamA** als Ladekontrolle. Western-Blot mit Darstellung von **DegP** in GZL. Repräsentatives Ergebnis eines von insgesamt zwei durchgeführten Versuchen (im Folgenden als Versuch 1 bezeichnet)

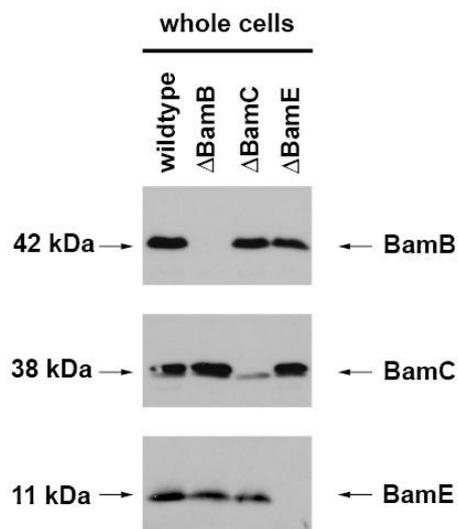


Abb. 25b: Western Blots mit **BamB**, **BamC** und **BamE**-Färbungen der GZL zur Verifikation der für Abb. 25a verwendeten Deletionsstämme mit transformiertem Intimin-kodierendem Plasmid.

Die Intensitäten der Proteinbanden von Intimin und BamA, wurden mit der *BioDoc Analyze*-Software quantifiziert. Der erhaltene, dimensionslose Wert als Maß für die Pixeldichte in der jeweiligen Proteinbande ist in der Spalte „Area“ angegeben (Tab. 33a). Des Weiteren wurde der unter „Area“ aufgeführte Wert eines Deletionsstammes in Prozent des Wertes für den Wildtyp-Stamm angegeben („Area in % of Wildtype“).

Tabelle 33a: Quantifizierung der Proteinbanden von Intimin und der Ladekontrolle BamA aus Versuch 1 (Vers.nr.1 in Abb. 25a dargestellt) und Versuch 2 (Vers.nr.2, nicht abgebildet).

Intimin in GZL					Intimin in OMP-Fraktionen				
	Lane	Vers.-nr.	Area	Area in % of wt		Lane	Vers.-nr.	Area	Area in % of wt
wildtype	1	1	14.575	100	wildtype	5	1	7.408	100
		2	8.852	100			2	22.763	100
ΔBamB	2	1	10.115	69	ΔBamB	6	1	4.457	60
		2	6.946	78			2	8.114	36
ΔBamC	3	1	10.415	71	ΔBamC	7	1	6.163	83
		2	3.855	44			2	21.788	96
ΔBamE	4	1	8.852	61	ΔBamE	8	1	5.443	73
		2	6.570	74			2	19.639	86
BamA in GZL					BamA in OMP-Fraktionen				
	Lane	Vers.-nr.	Area	Area in % of wt		Lane	Vers.-nr.	Area	Area in % of wt
wildtype	1	1	7.881	100	wildtype	5	1	7.514	100
		2	11.396	100			2	24.319	100
ΔBamB	2	1	9.785	124	ΔBamB	6	1	6.529	87
		2	13.582	119			2	19.162	79
ΔBamC	3	1	7.767	99	ΔBamC	7	1	7.314	97
		2	12.920	113			2	20.087	83
ΔBamE	4	1	9.747	124	ΔBamE	8	1	7.236	96
		2	12.376	109			2	17.709	73

Lane = Laufspur einer Probe, von links nach rechts mit 1 bis 8 beziffert.

Area = dimensionsloser Wert für die Bandenintensität

Anschließend wurde das Verhältnis der relativen Färbeintensität einer Proteinbande von Intimin mit der relativen Intensität der Bande von BamA derselben Probe bestimmt, um den Intiminingehalt der Proben direkt vergleichen zu können.

Tab. 33b: Verhältnis von Intimin (in % of wt) zur BamA-Ladekontrolle (in % of wt)

Relative Intensität von Intimin im Verhältnis zu BamA in GZL			Relative Intensität von Intimin im Verhältnis zu BamA in OMP-Fractionen		
	Vers.-nr.	$\left[\frac{\text{Intimin in \% of wt}}{\text{BamA in \% of wt}} \right]$		Vers.-nr.	$\left[\frac{\text{Intimin in \% of wt}}{\text{BamA in \% of wt}} \right]$
wildtype	1	1	wildtype	1	1
	2	1		2	1
ΔBamB	1	0,556	ΔBamB	1	0,690
	2	0,655		2	0,456
ΔBamC	1	0,717	ΔBamC	1	0,649
	2	0,389		2	1,157
ΔBamE	1	0,492	ΔBamE	1	0,760
	2	0,679		2	1,178

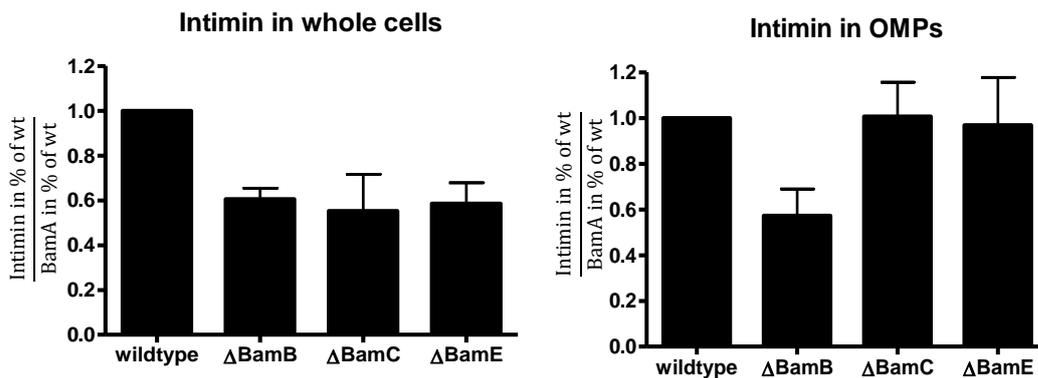


Abb. 26: Die relative Intensität der Intimin-Bande im Verhältnis zu BamA in Gesamtzelllysaten und präparierten äußeren Membranen (OMPs)

(y-Achse: Ergebnis des Quotienten $\frac{\text{Intimin in \% of wt}}{\text{BamA in \% of wt}}$;

x-Achse: Bezeichnung der untersuchten Stämme *E. coli* HB101 Wildtyp, Δ BamB, Δ BamC und Δ BamE pASK-IBA2-Int beschriftet.)

Für *E. coli* **HB101 Wildtyp** betrug der errechnete Quotient stets 1. Bei den untersuchten Deletionsstämmen war der durchschnittliche Quotient gegenüber dem Wildtyp kleiner. Bei *E. coli* **HB101 Δ BamB** lag dieser bei den Proben der Gesamtzelllysate in einem Versuch 0,556 und in einem zweiten Versuch 0,655 und bei den äußeren Membranfraktionen im ersten Versuch 0,690 und im zweiten Versuch

0,456. Die Intiminkonzentration war somit in beiden Fraktionen um den Faktor 1,4 bis 2,1 reduziert. Der Quotient von *E. coli* **HB101** Δ **BamC** lag bei 0,717 beziehungsweise 0,389 für die Gesamtzelllysate und bei 0,649 und 1,157 für die präparierten äußeren Membranen. Damit war die Intiminkonzentration in den beiden Fraktionen durchschnittlich um den Faktor 1,6 reduziert. Für die Gesamtzelllysate von *E. coli* **HB101** Δ **BamE** wurde ein Quotient von 0,492 (Versuch 1) und von 0,679 (Versuch 2) errechnet. Für die äußeren Membranfraktionen dieses Stammes lag er bei 0,760 beziehungsweise 1,178. Folglich war die Intiminkonzentration durchschnittlich um den Faktor 1,41 verringert.

Intimin lag also bei den Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp tendenziell in reduzierter Konzentration vor. Die einzelnen Deletionsmutanten unterschieden sich dabei nicht signifikant voneinander.

3.2.3.6 Harnstoffextraktion äußerer Membranfraktionen von *E. coli* HB101 pASK-IBA2-Int

Wie in den Abschnitten 3.2.3.2 und 3.2.3.4 wurde auch mit den präparierten äußeren Membranen von *E. coli* HB101 Wildtyp, Δ BamB, Δ BamC und Δ BamE pASK-IBA2-Int eine Harnstoffextraktion und Proteinausfällung durchgeführt. Das in Überstand und resuspendierten Pellets befindliche Intimin wurde mittels Western Blot sichtbar gemacht und die entstandenen Proteinbanden quantifiziert.

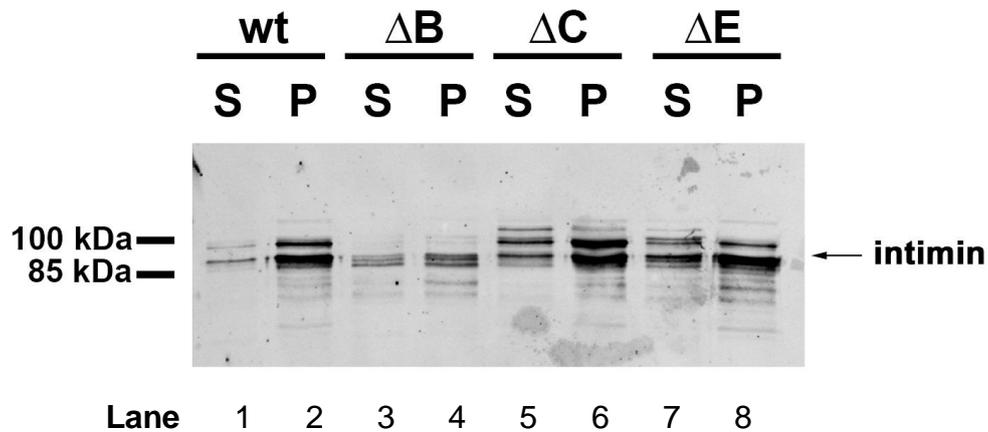


Abb. 27a: Western Blot mit Intiminfärbung nach Harnstoffextraktion von präparierten äußeren Membranen von *E. coli* HB101 Wildtyp (**wt**), Δ BamB (**Δ B**), Δ BamC (**Δ C**) und Δ BamE (**Δ E**) pASK-IBA2-Int. Abgebildet ist das repräsentative Ergebnis aus insgesamt zwei durchgeführten Versuchen.

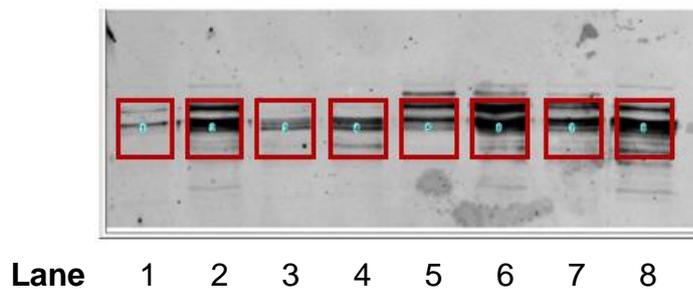


Abb. 27b: Ausschnitt aus Abb. 27a. Die Pixeldichte für die Quantifizierung der Intimin-Banden wurde in den umrandeten Bereichen bestimmt.

Tab. 34: Quantifizierung der Färbeintensität der Intimin-Banden in Überstand (S)- und Pellet-(P) Fraktionen präparierter äußerer Bakterienmembranen

Versuch 1: Intensität von Intimin in Überstand (S) und Pellet (P) nach Harnstoffextraktion (Versuch 1, Abbildung 27 a und b)					
		Lane	Area	Total Sign of Invasin (sum of Area S + Area P)	Intensity of Intimin in % of total sign
wildtype	S	1	2.368	14.308	17
	P	2	11.940		83
ΔBamB	S	3	1.165	5.177	23
	P	4	4.012		77
ΔBamC	S	5	5.808	19.934	29
	P	6	14.126		71
ΔBamE	S	7	6.279	23.450	27
	P	8	17.171		73

Versuch 2: Intensität von Intimin in Überstand (S) und Pellet (P) nach Harnstoffextraktion (Versuch 2)					
		Lane	Area	Total Sign of Invasin (sum of Area S + Area P)	Intensity of Intimin in % of total sign
wildtype	S	1	1.272	43.533	3
	P	2	42.261		97
ΔBamB	S	3	1.203	15.170	8
	P	4	13.967		92
ΔBamC	S	5	5.885	38.313	15
	P	6	32.428		85
ΔBamE	S	7	808	24.682	3
	P	8	23.874		97

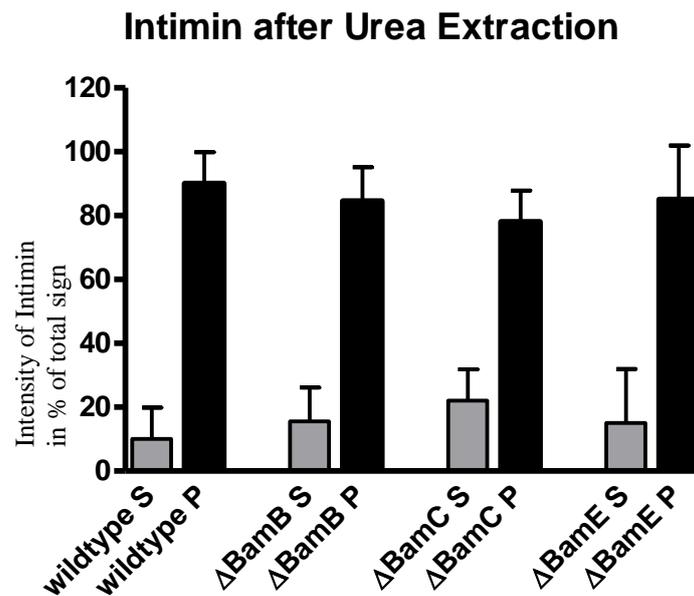


Abb. 28: Relative der Färbeintensität der Intimin-Banden in Überstand (S)- und Pellet- (P) Fraktionen nach Harnstoffextraktion mit Werten aus zwei Versuchen

y-Achse: Prozentualer Anteil der Bandenintensität in Bezug auf das Gesamtsignal in Pellet und Überstand eines untersuchten Stammes zusammen.

x-Achse: Benennung der verwendeten Probe.

Nach Harnstoffextraktion und Ultrazentrifugation der äußeren Membranen war das Signal für Intimin in der Pelletfraktion der untersuchten Stämme stets stärker als in den Überständen. Bei den Proben von *E. coli* HB101 **Wildtyp** pASK-IBA2-Int wurden in der unlöslichen Pelletfraktion 83 % des Signals im ersten Versuch und 97 % des Signals im zweiten Versuch detektiert. 17 % bzw. 3 % befanden sich im Überstand. Bei den Proben der Deletionsstämmen trat eine ähnliche Verteilung auf. In den Proben des Stammes mit Deletion von *bamB* wurden 77 % (Versuch 1) bzw. 92 % (Versuch 2) des Intiminsignals in der Pelletfraktion detektiert, im Überstand waren es entsprechend 23 % bzw. 8 %. In den äußeren Membranen des Stammes mit Deletion von *bamC* wurden nach Harnstoffextraktion 71-85 % des Signals in der Probe der Pelletfraktion und 29 % bzw. 15 % im Überstand detektiert. Für *E. coli* HB101 **ΔBamE** lag der Anteil des Intiminsignals in der Pelletfraktion bei 73 % (Versuch 1) und 97 % (Versuch 2) und im Überstand bei 27 % (Versuch 1) und 3 % (Versuch 2) des Gesamtwertes.

Das Intiminsignal in der Pelletfraktion war folglich für alle Stämme höher als im Überstand. Der Anteil, den das Signal im Überstand am Gesamtsignal ausmachte, war bei keiner der Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp signifikant verändert.

3.2.4 Klonierung von *bamB* in den Vektor pBAD28 und Transformation von pBAD28_ *bamB* in *E. coli* HB101 Δ BamB pASK-IBA2-Inv

In Gesamtzelllysaten und präparierten äußeren Membranen von *E. coli* HB101 Δ BamB war die Konzentration des im Western Blot detektierten Invasins gegenüber dem Wildtyp reduziert (siehe Abb. 20a). Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob dieses Phänomen auf der fehlenden Expression von BamB beruhte und ob sich die Expression von Invasin erhöhen würde, wenn der Deletionsstamm wieder in der Lage wäre, BamB zu exprimieren.

Dazu wurde das Gen für *bamB* aus der chromosomalen DNA von *E. coli* HB101 Wildtyp amplifiziert und in den Klonierungsvektor pBAD28 eingebracht. Schließlich konnte das Konstrukt pBAD28_ *bamB* in chemisch kompetente *E. coli* HB101 Δ BamB pASK-IBA2-Inv transformiert werden. Der so entstandene Bakterienstamm enthielt nun zwei Plasmide: pASK-IBA2-Inv, das mit AHTC induziert wurde und pBAD28_ *bamB*, das mit Arabinose induziert werden konnte.

Von diesem Stamm wurden zwei separate Übernachtskulturen und davon Subkulturen hergestellt. Zu einer dieser Übernacht- und Subkulturen wurde Arabinose gegeben, welches das Plasmid pBAD28_ *bamB* induzieren sollte. Die andere Kultur wurde ohne Zusatz von Arabinose weiterkultiviert. Das pASK-IBA2-Inv-Plasmid wurde dagegen in beiden Ansätzen durch Zugabe von AHTC induziert.

Anschließend sollte die Expression von Invasin zwischen *E. coli* HB101 Wildtyp, *E. coli* HB101 Δ BamB mit nicht-induziertem pBAD28_ *bamB* und *E. coli* HB101 Δ BamB mit induziertem pBAD28_ *bamB* verglichen werden. Aus Subkulturen der genannten Stämme wurden Gesamtzelllysate hergestellt und äußere Membranen präpariert. Gleiche Proteinkonzentrationen dieser Proben wurden auf ein SDS-Gel geladen und eine SDS-PAGE durchgeführt. Im Western Blot konnte Invasin mit spezifischen Antikörpern detektiert werden. Eine Färbung mit BamA diente als

Ladekontrolle. Ein Blot mit Färbung von BamB mit den Proben der Gesamtzelllysate demonstrierte die Expression von BamB in *E. coli* HB101 Δ BamB mit induziertem pBAD28_ *bamB*-Plasmid. Diese blieb bei fehlender pBAD28_ *bamB*-Induktion aus.

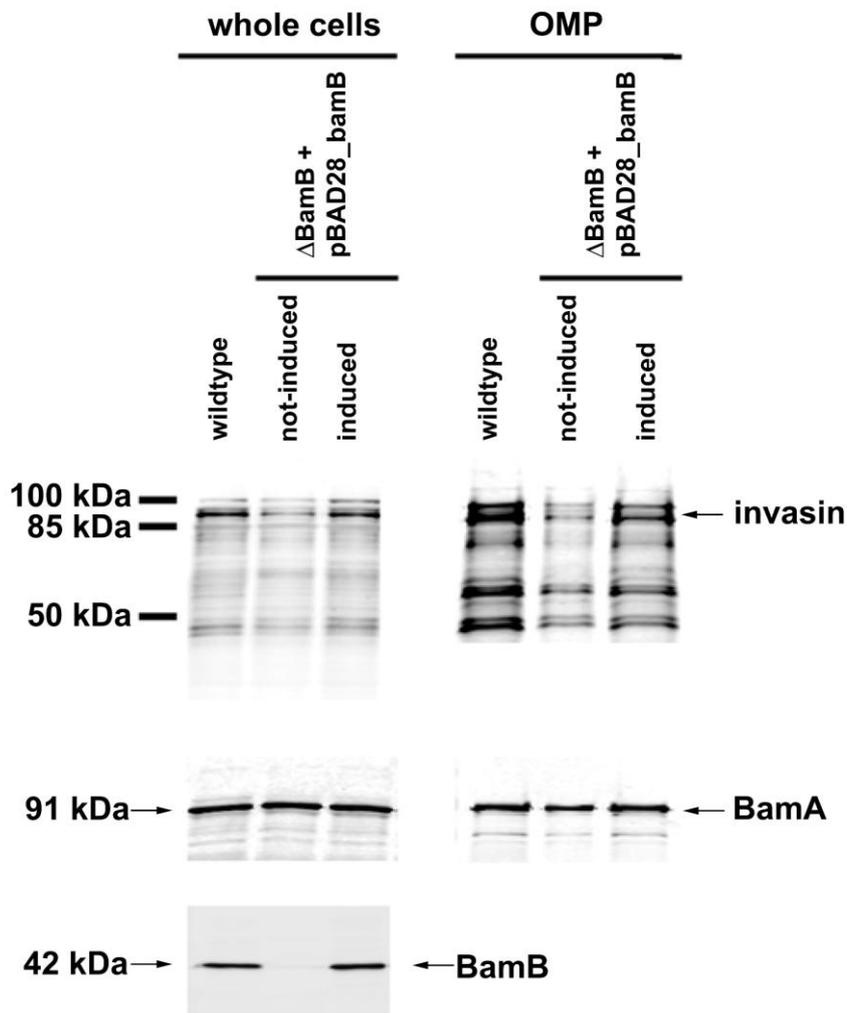


Abb. 29: Gesamtzelllysate (whole cells) und präparierte äußere Membranen (OMP) von *E. coli* HB101 Wildtyp pASK-IBA2-Inv, *E. coli* HB101 Δ BamB pASK-IBA2-Inv mit nicht-induziertem pBAD28_ *bamB* (not-induced) und *E. coli* HB101 Δ BamB pASK-IBA2-Inv mit durch Arabinose induziertem pBAD28_ *bamB* (induced). Western Blot mit Färbungen von **Invasin**, **BamA** als Ladekontrolle. **BamB**-Färbung zum Nachweis der BamB-Expression.

Bei *E. coli* HB101 Δ BamB mit nicht-induziertem pBAD28_ *bamB* war die Invasinbande in den Proben der Gesamtzellysate und in den äußeren Membranfraktionen gegenüber dem Wildtyp reduziert. Wurde das pBAD28_ *bamB*-Plasmid dagegen mit Arabinose induziert, konnte der Bakterienstamm wieder BamB exprimieren. Die Proteinbande für Invasin erschien stärker und erreichte nahezu das Niveau des Wildtyp-Stammes.

3.3 Deletion periplasmatischer und zytoplasmatischer Chaperone und ihr Einfluss auf die Biogenese von Invasin in *E. coli* BW25113

Bevor äußere Membranproteine unter Mitwirkung der β -Barrel Assembly Machinery gefaltet und in die äußere Bakterienmembran eingebaut werden, können sie nach ihrer Translation im Zytoplasma mit zytoplasmatischen Chaperonen interagieren. Die Chaperone können eine Aggregation und inkorrekte Faltung dieser Proteine verhindern (Gething & Sambrook, 1992). Ferner interagieren die äußeren Membranproteine bei ihrem Transport durch das Periplasma mit periplasmatischen Chaperonen wie SurA, DegP und Skp (Leyton et al, 2012). Es wird vermutet, dass diese Chaperone die noch ungefalteten Membranproteine ähnlich wie die zytoplasmatischen Chaperone vor einer fehlerhaften Faltung bewahren (Leyton et al, 2012) oder die Proteine sogar in ihrer Faltung unterstützen können. Peptidyl-Propyl-Transferasen (PPIasen) wie PpiA, PpiD und FkpA können dabei als solche Faltungshelfer fungieren (Fischer et al, 1984; Justice et al, 2005).

Um zu untersuchen, inwieweit eine Auswahl zytoplasmatischer und periplasmatischer Chaperone die Biogenese von Autotransportern beeinflussen kann, wurden *E. coli* BW25113-Stämme mit Deletion jeweils eines dieser Chaperone aus der Keio Collection (Baba et al, 2006) verwendet. Am Beispiel von Invasin sollte untersucht werden, ob sich die Proteinlevels dieses Autotransporters bei Deletion eines Chaperons verändern. Dazu wurden Gesamtzelllysate der untersuchten Stämme *E. coli* BW25113 Wildtyp und *E. coli* BW25113 mit Deletion des Gens für eines der periplasmatischen Chaperone DegP, SurA, Skp, PpiA, PpiD oder FkpA, sowie *E. coli* BW25113 mit Deletion des Gens eines zytoplasmatischen Chaperons ClpP oder DnaK hergestellt. Mit gleichen Proteinmengen dieser Proben wurde eine SDS-PAGE und ein Western Blot mit Invasin-Färbung durchgeführt.

Als Ladekontrolle diente eine Western Blot-Färbung mit Gyrase A-Antikörpern und die Färbung der mittels SDS-Page aufgetrennten Proteinbanden der Gesamtzelllysate mit Ponceau-Rouge.

Der Versuch wurde zweimal durchgeführt, wobei das Ergebnis eines repräsentativen Versuchs in Abbildung 30 dargestellt ist.

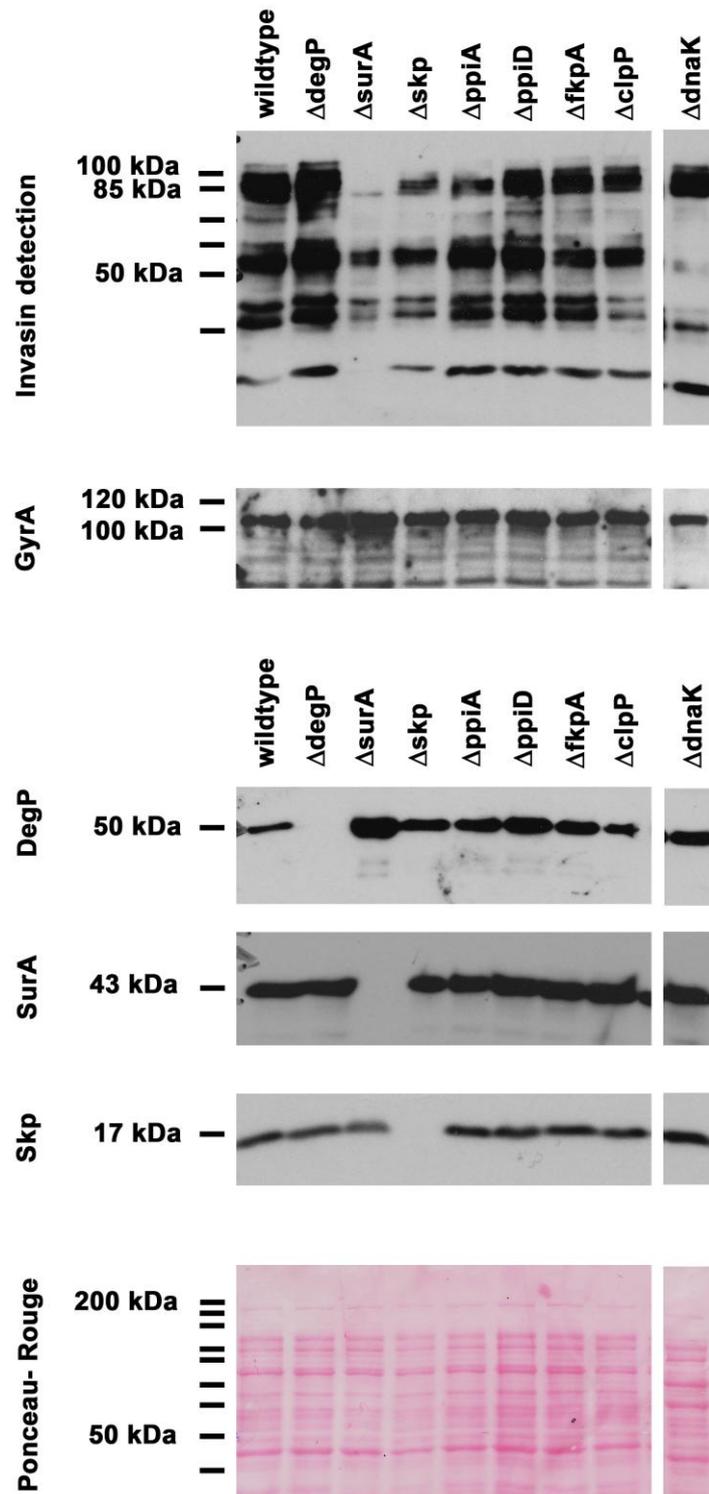


Abb. 30: Western-Blots der Gesamtzellysate von *E. coli* BW25113 mit Deletion eines periplasmatischen oder zytoplasmatischen Chaperons. Färbung von Invasin, Gyrase A (GyrA) als Ladekontrolle, DegP, SurA und Skp zur Verifikation der Stämme *E. coli* BW25113 $\Delta DegP$, $\Delta SurA$ und ΔSkp . Ponceau-Rouge-Färbung der Nitrocellulosemembran nach Western Blotting zur Visualisierung der mittels SDS-Page aufgetrennten Proteinbanden.

Für die Auswertung der Färbung mit Invasin wurde die obere Proteinbande zwischen 85 kDa und 100 kDa auf Höhe des gesamten Invasinproteins herangezogen. Bei *E. coli* BW25113 Δ DegP war die Invasinbande stärker als bei *E. coli* BW25113 Wildtyp. Dagegen war bei *E. coli* BW25113 Δ SurA kaum Invasin nachweisbar und es erschien nur eine schwach gefärbte Invasinbande. Gleichzeitig kam es bei Deletion des *surA*-Gens zu einer erhöhten Konzentration von DegP. Bei Deletion der Gene für die periplasmatischen Chaperone Skp und PpiA war die Invasinbande ebenfalls schwächer als beim Wildtyp. Es konnte jedoch mehr Invasin detektiert werden als in Gesamtzelllysaten von *E. coli* BW25113 Δ SurA.

Bei Deletion der Gene der anderen periplasmatischen PPIasen PpiD und FkpA, sowie bei Deletion der Gene der zytoplasmatischen Chaperone ClpP und DnaK konnten dagegen keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Intensität der Invasinbande festgestellt werden.

Folglich führten die fehlenden Expressionen der periplasmatischen Chaperone DegP und SurA und in geringerem Ausmaß auch von Skp und PpiA in *E. coli* BW25113 zu einer erkennbaren Änderung der Invasinkonzentration in Gesamtzelllysaten. Dabei kam es nur bei Deletion des Gens von DegP zu einer Zunahme der Invasinkonzentration, bei Deletion der Gene der anderen drei Chaperone nahm die Invasinkonzentration dagegen ab.

3.4 Untersuchungen zu der Expression von Invasin in *Yersinia enterocolitica* O:8

In einem Folgeprojekt der AG Schütz wurde der Einfluss der drei nicht-essentiellen Bam-Komponenten und der drei periplasmatischen Chaperone SurA, Skp und DegP auf die Expression von Invasin und YadA in ihrem ursprünglichen Organismus *Yersinia enterocolitica* untersucht. Dazu deletierte Johanna Weirich die für diese Proteine kodierenden Gene aus *Yersinia enterocolitica* O:8 und verglich anschließend unter anderem die Konzentration von YadA und Invasin in Gesamtzelllysaten dieser Stämme mit denen des Wildtyps (Weirich et al, accepted 2016). Der in Abb. 31a und 31b dargestellte Versuch entstand in Zusammenarbeit mit Frau Weirich. Die Invasinkonzentration in Gesamtzelllysaten der mutierten Stämme und von *Y. enterocolitica* Wildtyp wurde mittels Western Blot Analyse bestimmt. Eine Färbung mit einem Antikörper gegen die RNA-Polymerase diente als Ladekontrolle. Vergleichbar zu den gezeigten Versuchen mit *E. coli* HB101 und *E. coli* BW25113 war auch in den Gesamtzelllysaten von *Y. enterocolitica* O:8 Δ BamB und Δ SurA die Invasinkonzentration am stärksten eingeschränkt. Bei Komplementierung des *bamB*-Gens auf dem pACYC-Vektor konnte die Invasinkonzentration in diesem Versuch nur minimal gesteigert werden. Ein BamB-Blot in Abbildung 31b zeigt jedoch, dass es bei dieser Komplementierung zu einer BamB-Überexpression kommt. Möglicherweise hat sich diese Überexpression ebenfalls nachteilig auf die Effizienz der Invasin-Biogenese ausgewirkt.

Die Komplementierung von SurA führte wieder zu einer Invasinkonzentration auf Wildtyp-Niveau. BamB und SurA waren also auch für die Biogenese von Invasin in *Y. enterocolitica* O:8 am bedeutsamsten. Bei Deletion des *skp*-Gens war die Invasinkonzentration nur gering reduziert. Durch Komplementation des *skp*-Gens mittels Transformation des pACYC-Vektors konnte dieser Effekt aufgehoben werden, sodass auch Skp eine, wenn auch untergeordnete, Bedeutung in der Biogenese von Invasin zuzukommen scheint.

Dagegen hatte die Deletion der Gene für BamC, BamE oder DegP hier keine sichtbare Auswirkung auf die Invasinkonzentration.

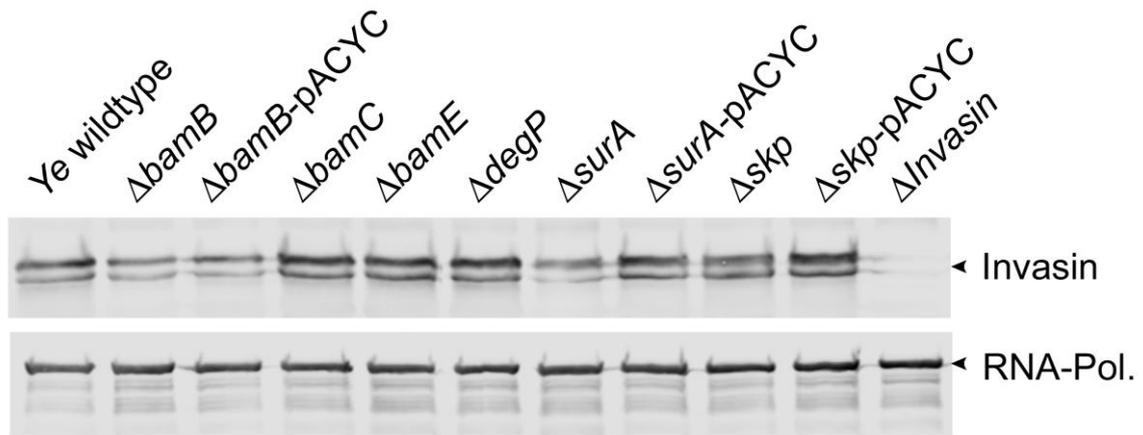


Abb. 31a: Western Blot der Gesamtzelllysate von *Y. enterocolitica* O:8 mit Deletion eines Gens einer der nicht-essentiellen Bam-Komponenten (BamB, BamC oder BamE) oder eines Gens für ein periplasmatisches Chaperon (DegP, SurA oder Skp). Komplementierung von *bamB* oder *surA* durch Transformation des induzierten Vektors pACYC_bamB bzw. pACYC_surA (entspricht Abb. 4 in Weirich et al, accepted 2016).

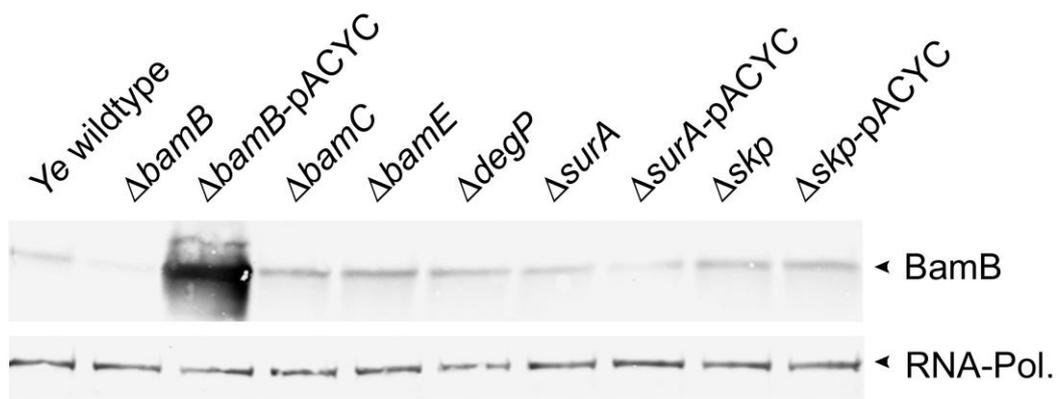


Abb. 31b: Western Blot der Gesamtzelllysate von *Y. enterocolitica* O:8 mit Färbung von BamB. Überexpression von BamB in GZL mit induziertem pACYC_bamB-Plasmid (Daten Johanna Weirich).

4. Diskussion

Äußere Membranproteine Gram-negativer Bakterien haben eine β -Barrel-Struktur, mit der sie die äußere Bakterienmembran durchspannen. Zu der Gruppe dieser äußeren Membranproteine gehören auch wichtige Pathogenitätsfaktoren enteropathogener Bakterien wie die hier näher untersuchten Membranproteine YadA und Invasin, die die Adhäsion und Invasion von *Yersinia enterocolitica* am Darmepithel des Wirtes vermitteln können (Pepe et al, 1995) und Intimin, welches als Adhäsion in enterohämorrhagischen (EHEC) und enteropathogenen *E. coli* (EPEC) fungieren kann (Kaper et al, 1997). Damit sind YadA, Invasin und Intimin von großer Bedeutung für die Virulenz der genannten Durchfallerreger.

Das Ziel zahlreicher Arbeitsgruppen ist es, den Mechanismus der Biogenese solcher Pathogenitätsfaktoren genauer zu untersuchen und mögliche molekulare Targets für antimikrobielle Substanzen zu finden, die eines Tages vielleicht sogar zu Therapie und Prophylaxe von Durchfallerkrankungen eingesetzt werden könnten.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche sollten einen Einblick ermöglichen, inwiefern die für das bakterielle Überleben nicht-essentiellen Komponenten der β -Barrel Assembly Machinery BamB, C und E sowie eine Auswahl an periplasmatischen und zytoplasmatischen Chaperonen bedeutsam für die Biogenese von YadA, Invasin und Intimin sind.

Äußere Membranproteine Gram-negativer Bakterien wie die Autotransporter-Adhäsine YadA, Invasin und Intimin werden nach ihrer Translation im Zytoplasma durch das Chaperon SecB zu der Sec-Translokase an der inneren Bakterienmembran geleitet (Randall & Hardy, 2002). Dort erfolgt die Translokation des Membranproteins in das Periplasma. Dieser Vorgang erfolgt energieabhängig unter Spaltung von ATP (Randall & Hardy, 2002). Im Periplasma interagieren die äußeren Membranproteine mit periplasmatischen Chaperonen. Dabei scheinen insbesondere die Chaperone SurA, DegP und Skp bedeutsam zu sein (Palomino et al, 2011; Ruiz et al, 2006; Sklar et al, 2007b). Oberhettinger & Schütz et al. (2012) haben bereits gezeigt, dass SurA eine zentrale Bedeutung für die Biogenese von Invasin zukommt, was an stark reduzierten Invasinlevels bei Deletion von *surA* erkennbar war. Sie konnten ebenfalls zeigen, dass es bei Deletion des Gens für das periplasmatische Chaperon DegP zu einer

Akkumulation von Invasin kommt. DegP würde in seiner Funktion als Protease falsch gefaltete äußere Membranproteine degradieren. Bei Deletion von *degP* fiel diese Funktion aus, was zu einer Erhöhung der Invasinmenge im Periplasma führte. Skp war dagegen weniger bedeutsam für die Biogenese von Invasin. Diese Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit bestätigt und erweitert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass es bei Deletion von *surA* in *E. coli* zu einer erhöhten Konzentration von DegP in den Gesamtzelllysaten kommt. Es ist bekannt, dass die Akkumulation fehlgefalteter Membranproteine im Periplasma zu einer Aktivierung der periplasmatischen Stressantwort der Bakterien führt, was eine vermehrte Transkription der Gene des sogenannten σ^E -Regulons bewirkt (Walsh et al, 2003). Auf diesem Regulon sind unter anderem die Gene von SurA und DegP kodiert. Es ist anzunehmen, dass bei Deletion von *surA* nicht nur die Biogenese von Invasin, sondern von zahlreichen anderen äußeren Membranproteinen deutlich beeinträchtigt war. So sammelten sich vermutlich hohe Mengen an unreifen und fehlgefalteten Membranproteinen im periplasmatischen Raum an. DegP wurde vermehrt exprimiert und konnte als Protease diese akkumulierten Proteine degradieren. Daher konnte DegP hier im Western Blot in höherer Konzentration nachgewiesen werden.

Neben den drei genannten Chaperonen wurden in dieser Arbeit noch weitere Chaperone untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Konzentration von Invasin bei Deletion des Gens für das periplasmatische Chaperon PpiA im Vergleich zum Wildtyp leicht reduziert war. Es ist also möglich, dass PpiA als *cis/trans* Isomerase zu der Faltung des Invasinmoleküls beiträgt. PpiA kommt dabei jedoch eine geringere Bedeutung zu als SurA, welches neben seiner Funktion als klassisches Chaperon auch als *cis/trans* Isomerase fungieren kann (Behrens et al, 2001). Einschränkend muss angemerkt werden, dass der Stamm mit Deletion von *ppiA* nicht selbst verifiziert wurde, sodass noch weitere Untersuchungen zu der Bedeutung von PpiA für die Biogenese von Invasin ausstehen.

Für die anderen hier untersuchten periplasmatischen Chaperone und PPIasen PpiD und FkpA konnte kein Einfluss auf die Biogenese von Invasin gezeigt werden. Bei Deletion dieser Faktoren blieb die Invasinmenge in Gesamtzelllysaten auf Wildtypniveau. Gleiches galt für die zytoplasmatischen Chaperone ClpP und DnaK.

SurA, Skp und DegP wurden also in ihrer Rolle als wichtige Chaperone für die Biogenese von Invasin bestätigt.

Ähnlich verhielt es sich für den Autotransporter Intimin. Hier haben Bodelón et al. (2009) gezeigt, dass SurA auch das bedeutendste Chaperon für die Biogenese von Intimin ist und neben seiner Funktion als Chaperon an der Faltung des N-Terminus von Intimin beteiligt ist. Skp und DegP sind dagegen als Chaperone von eher untergeordneter Bedeutung für die Biogenese von Intimin (Bodelon et al, 2009).

Für YadA scheint SurA in dem hier verwendeten *E. coli*-Expressionssystem im Gegensatz zu Invasin und Intimin als Chaperon eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. So konnten in einem *E. coli* BW25113 mit Deletion von *surA* und Inkubation bei 27°C und in einem *Y. enterocolitica*-Stamm mit Deletion von *surA* und Inkubation bei 37°C in Gesamtzelllysaten keine Unterschiede in der YadA-Expression festgestellt werden (Johanna Weirich, Weirich et al, accepted 2016). Es wird davon ausgegangen, dass sich Skp und SurA bei der Biogenese von YadA jeweils in ihrer Funktion ersetzen können. Bei einer Einzeldelation von *surA* oder *skp* zeigten sich keine nachweisbaren Unterschiede in der YadA-Expression in *Y. enterocolitica* O:8. Eine gleichzeitige Deletion von *surA* und *skp* war dagegen letal für diesen Stamm (Weirich et al, accepted 2016).

Nach ihrem Transport durch das Periplasma ist die β -Barrel Assembly Machinery entscheidend an der Faltung und Membraninsertion äußerer Membranproteine beteiligt. Über den genauen Mechanismus dieses Prozesses ist jedoch nur wenig bekannt. In *E. coli* und *Y. enterocolitica* besteht die β -Barrel Assembly Machinery aus den fünf bisher identifizierten Komponenten BamA-BamE (Knowles et al, 2009; Sklar et al, 2007a; Wu et al, 2005). BamA ist selbst ein äußeres Membranprotein mit einer β -Barrel-Struktur und ist als zentrale Komponente des Bam-Komplexes essentiell für das bakterielle Überleben und den Einbau äußerer Membranproteine in die Membran (Knowles et al, 2009).

Die Lipoproteine BamB, C, D und E sind über einen N-terminalen Lipidanker in der äußeren Bakterienmembran verankert und ragen in das Periplasma (Hagan et al, 2011). Sie interagieren mit BamA über dessen POTRA-Domänen (Kim et al, 2007).

Die Strukturen von BamA, B, C, D und E (Albrecht & Zeth, 2011, Dong et al, 2011, Heuck et al, 2011, Kim et al, 2012; Knowles et al, 2011, Noinaj et al, 2014, Noinaj et al, 2011, Sandoval et al, 2011, Warner et al, 2011) sowie des Bam-Komplexes im Ganzen (Bakelar et al, 2016) sind bereits entschlüsselt. Bisher gibt es jedoch nur Mutmaßungen über das Zusammenspiel der einzelnen Bam-Komponenten und die Funktion der nicht-essentiellen Bam-Komponenten (Noinaj et al, 2014).

In dieser Arbeit wurden *E. coli* HB101-Stämme verwendet, bei denen das Gen für jeweils eine dieser nicht-essentiellen Komponenten deletiert war. Diese Stämme wurden in Bezug auf Wachstumsverhalten und Sensibilität gegenüber ausgewählten Antibiotika mit dem Wildtyp-Stamm verglichen. Ferner wurde untersucht, inwiefern der Einbau von YadA, Invasin und Intimin in die äußere Membran durch Deletion von *bamB*, *C* oder *E* beeinträchtigt war.

Es wurde bereits für verschiedene äußere Membranproteine ermittelt, dass es bei einer Deletion von *bamB*, *C* oder *E* zu einer Reduktion dieser Proteine in der äußeren Bakterienmembran kommen kann. Dies wurde für FimD von *E. coli* (Palomino et al, 2011), die äußeren Membranproteine OmpA, OmpC und OmpF von *E. coli* und *S. Enteritidis* (Charlson et al, 2006; Namdari et al, 2012; Onufryk et al, 2005, Sklar et al, 2007a) und das Maltoporin LamB in *E. coli* (Sklar et al, 2007a) untersucht. Meist war die Membraninsertion des jeweiligen Proteins bei fehlender Expression von BamB stärker eingeschränkt als bei fehlender Expression von BamC oder BamE.

Andere Komponenten der äußeren Membran wurden dagegen bei *E. coli* Δ BamB in höherer Konzentration detektiert als beim Wildtyp. Dies traf für die Lipopolysaccharide (LPS) und die Effluxpumpe TolC zu (Charlson et al, 2006). TolC durchspannt sowohl die innere als auch die äußere Bakterienmembran, stellt somit eine Verbindung zwischen dem Zytoplasma und dem Extrazellulärraum her und kann antimikrobielle Substanzen aus dem Zytoplasma ausschleusen (Fralick, 1996). Diese Effluxpumpe ist ein Genprodukt des sogenannten Bae-Signaltransduktionsweg, der neben σ^E und Cpx bei extrazytoplasmatischem Stress hochreguliert wird (Raffa & Raivio, 2002). Die Deletion von *bamB* führt also zu einer bakteriellen Stresssituation.

Es ist anzunehmen, dass die veränderte Zusammensetzung der äußeren Membran der Deletionsmutanten auch die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Unterschiede in Wachstumsverhalten und Antibiotikasensibilität der Mutanten gegenüber dem Wildtyp hervorrief.

Palomino et al. (2011) haben das Wachstumsverhalten von *E. coli* UT5600-Stämmen mit Deletion einer nicht-essentiellen Bam-Komponente untersucht. Sie kultivierten die entsprechenden Stämme in flüssigem Brain-Heart-Infusion Medium (BHI) bei jeweils 37 °C und stellten keine wesentliche Einschränkung des Wachstumsverhaltens der Deletionsstämme im Vergleich zum Wildtyp-Stamm fest (Palomino et al, 2011).

Entgegen dieser Beobachtung wurden bei den in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* HB101 Wildtyp- und Deletionsstämmen bei Inkubation in LB-Medium mit einer Temperatur von 37°C Unterschiede in Bezug auf das Wachstumsverhalten festgestellt. Die Wachstumskurven der Stämme mit Deletion von *bamB*, *C* oder *E* verliefen etwas flacher als die des Wildtyps, die Bakterienzellen vermehrten sich also etwas langsamer. Nach 12 h unterschied sich die optische Dichte bei 600 nm von den Kulturen der Deletionsstämme um maximal 0,26 a.u. von den Kulturen des Wildtyp-Stammes.

Bei höherer Wachstumstemperatur zwischen 41 bis 42°C und sonst gleichen Bedingungen waren diese Unterschiede deutlicher sichtbar. Wie stark sich die Deletionsstämme in ihrem Wachstum vom Wildtyp unterscheiden, schien somit abhängig von den Umgebungsbedingungen zu sein. Bei ungünstigeren Inkubationsbedingungen waren die Deletionsmutanten in ihrem Wachstum stärker eingeschränkt als der Wildtyp. So konnten sich die Deletionsstämme in den Versuchen von Palomino et al. (2011) in nährstoffreicherem BHI-Medium auf Wildtyp-Niveau vermehren. Dagegen waren sie möglicherweise in dem nährstoffärmeren LB-Medium im Vergleich zum Wildtyp stärker in ihrem Wachstum eingeschränkt. Ebenso verhielt es sich bei einer für *E. coli* ungünstigeren Umgebungstemperatur von 41,5°C.

Bei höheren Temperaturen kommt es zu einem vermehrten Abbau bakterieller Proteine, was zu Störungen des bakteriellen Stoffwechsels und schließlich zum Absterben der Bakterien führt. Die Akkumulation degradiertes Proteins führt zudem zu einer Aktivierung der bakteriellen Stressantwort, die bei den Deletionsmutanten durch die eingeschränkte Membraninsertion zahlreicher äußerer Membranproteine vermutlich

noch verstärkt wurde. Durch die erhöhte Temperatur kam es beispielsweise zu einer vermehrten Transkription der Proteine des σ^E -Regulons (Walsh et al, 2003), was den bakteriellen Basisstoffwechsel weiter verlangsamte. Stämme mit Deletion einer nicht-essentiellen Bam-Komponente waren von diesen Vorgängen offenbar stärker betroffen als der Wildtyp. Da der Bam-Komplex für die Assemblierung äußerer Membranproteine mit β -Barrel-Struktur verantwortlich ist, lag die Erklärung nahe, dass für den bakteriellen Stoffwechsel wichtige äußere Membranproteine bei höherer Umgebungstemperatur und Deletion einer dieser Bam-Komponenten weniger in die äußere Bakterienmembran eingebaut und schneller im Periplasma abgebaut wurden. Subkulturen von *E. coli* HB101 Δ BamB konnten sich im Vergleich zu den anderen untersuchten Stämmen am schlechtesten vermehren und starben bei 41,5°C nach 9 h Wachstum ab. Bei Deletion von *bamE* war das bakterielle Wachstum im Vergleich zum Wildtyp weniger reduziert und bei Deletion von *bamC* am wenigsten eingeschränkt. Daher schien BamB für die Biogenese und Membraninsertion der bakteriellen Proteine entscheidender zu sein als BamE. BamC erschien im Vergleich zu BamB und BamE am wenigsten bedeutsam für das Bakterienwachstum und die Biogenese äußerer Membranproteine zu sein, da das Wachstumsverhalten der Bakterienkulturen mit Deletion von *bamC* dem des Wildtyp-Stammes am ähnlichsten war.

Diese unterschiedlich starke Bedeutung der Bam-Komponenten für den bakteriellen Stoffwechsel lässt sich mit den mutmaßlichen Funktionen dieser Komponenten erklären, die aus Strukturanalysen abgeleitet wurden. Die Kristallstruktur und Mutationsanalysen von BamB legen nahe, dass BamB sowohl mit BamA als auch mit unvollständig gefalteten äußeren Membranproteinen interagiert (Heuck et al, 2011). BamB kann so vermutlich die Effizienz erhöhen, mit der BamA äußere Membranproteine in die Bakterienmembran inseriert und möglicherweise sogar selbst zur Faltung der äußeren Membranproteine beitragen. BamB ist hauptsächlich aus β -Faltblättern aufgebaut. Aufgrund dieser Struktur ist es denkbar, dass BamB auch direkt als eine Art Faltungsvorlage an der Faltung der β -Barrel-Pore äußerer Membranproteine beteiligt ist (Kim et al, 2012; Palomino et al, 2011).

Dagegen wird vermutet, dass BamC und BamE eine eher untergeordnete, rein regulierende Funktion für die Biogenese der Membranproteine haben (Kim et al, 2012) und nicht direkt an deren Faltung mitwirken. Dieser Umstand würde erklären, warum

die Deletion von *bamC* oder *bamE* geringere phänotypische Auswirkungen hat als die Deletion von *bamB*. Ferner sind die Bakterien bei gleichzeitiger Deletion von *bamC* und *bamE*, aber auch bei gleichzeitiger Deletion von *bamB* und *bamC* in *E. coli* weiterhin lebensfähig. Bei gleichzeitiger Deletion von *bamB* und *bamE* sterben sie dagegen ab (Palomino et al, 2011). Dieser Umstand gibt einen weiteren Hinweis auf die größere Bedeutung von BamB und nachrangig auch von BamE für den bakteriellen Stoffwechsel. Zudem weist es auf die untergeordnete Bedeutung von BamC hin.

BamC interagiert direkt mit BamD. Eine direkte Interaktion zwischen BamC und BamA konnte jedoch noch nicht nachgewiesen werden (Bakelar et al, 2016, Malinverni et al, 2006, Webb et al, 2012). Der ungeordnete N-Terminus von BamC, der keine Sekundärstruktur einnimmt und somit eine hohe Flexibilität in seiner Konformation aufweist, interagiert mit der mutmaßlichen Substratbindungsstelle am N-Terminus von BamD (Kim et al, 2011). Diese Substratbindungsstelle ist vermutlich auch für die Erkennung der Signalsequenz unreifer äußerer Membranproteine verantwortlich (Sandoval et al, 2011) und kann im Zustand fehlender Substratbindung durch BamC verschlossen werden (Kim et al, 2012). Somit könnte BamC die Bindung unreifer Membranproteine an BamD regulieren.

BamE kann zum einen die Stabilität des Bam-Komplexes erhöhen, indem es die Interaktion zwischen BamC und BamD verstärkt (Sklar et al, 2007a). Zum anderen ist BamE über zahlreiche Wasserstoffbrücken und hydrophobe Interaktionen mit der POTRA-Domäne 5 von BamA verbunden (Bakelar et al, 2016). Es wird vermutet, dass BamE den BamCDE-Subkomplex optimal für die Interaktion mit BamA ausrichtet (Bakelar et al, 2016) und die Bindung zwischen BamA und BamD stabilisiert (Bakelar et al, 2016, Ni et al, 2014).

Ferner bindet BamE spezifisch Phosphatidylglycerol, von dem bekannt ist, dass es den Einbau von Membranproteinen in Lipiddoppelschichten erleichtern kann (Endo et al, 2011). Es ist also denkbar, dass BamE durch seine Bindung an Bereiche der äußeren Bakterienmembran mit hoher Phosphatidylglyceroldichte optimale Bedingungen für die Membraninsertion der Proteine schafft, indem es eine räumliche Nähe des Bam-Komplexes zu diesen Bereichen herstellt (Endo et al, 2011).

Auch in Bezug auf die Antibiotikasensitivität unterschied sich der *E. coli* HB101 Δ BamB-Stamm deutlich von *E. coli* HB101 Wildtyp. Dies konnte für die Stämme mit Deletion von *bamC* oder *bamE* nicht in diesem Ausmaß beobachtet werden. Mehrere Arbeitsgruppen hatten bereits ermittelt, dass Mutanten mit fehlender Expression einer oder mehrerer Bam-Komponenten empfindlicher gegenüber antibiotisch wirksamen Substanzen sein können (Namdari et al, 2012; Onufryk et al, 2005; Ruiz et al, 2005). Dies wurde durch eine erhöhte Membranpermeabilität bei gestörter Integrität der äußeren Bakterienmembran erklärt, die bei eingeschränkter Biogenese äußerer Membranproteine auftreten kann (Namdari et al, 2012). Auch bei den in dieser Arbeit verwendeten Stämmen wurde mittels Agardiffusionstest eine erhöhte Sensibilität von *E. coli* HB101 Δ BamB gegenüber den untersuchten Wirkstoffen Erythromycin, Rifampicin, Bacitracin und Vancomycin bestätigt. Dieselbe Beobachtung wurde auch im Anschlussprojekt von Frau Weirich für *Y. enterocolitica* O:8 (Weirich et al, accepted 2016), sowie von Namdari und Kollegen (2012) gemacht. Letztere hatten die Sensibilitätstestungen für *Salmonella Enteritidis* Wildtyp und *S. Enteritidis* Δ BamB mit denselben hier verwendeten Antibiotika durchgeführt.

Vermutlich war die Membran durch die fehlende Expression von BamB durchlässiger für die vier genannten Antibiotika. Die Sensibilitätserhöhung war in *E. coli* vor allem für die beiden größeren Moleküle Bacitracin und Vancomycin mit jeweils circa 1,4 kDa ausgeprägt. Erythromycin und Rifampicin haben dagegen eine molekulare Masse von 0,75 bzw. 0,8 kDa. Daher wurde zunächst vermutet, dass die beiden größeren Moleküle, die bei funktionalem BamB nur in geringer oder nicht wirksamer Menge an ihren Zielort in der Bakterienzelle gelangten, bei Deletion von *bamB* die durchlässiger gewordene Membran leichter passierten und stärker antibiotisch wirksam waren.

Durch den erhöhten Lipopolysaccharidgehalt in der äußeren Bakterienmembran von *E. coli* Δ BamB nimmt zudem die Konzentration der Phospholipide in der Membran ab (Ruiz et al, 2005). Es ist daher denkbar, dass die eher hydrophilen Moleküle Bacitracin und Vancomycin leichter durch die so veränderte äußere Membran diffundieren konnten als die eher hydrophoben Moleküle Erythromycin und Rifampicin (Ruiz et al, 2005). Die Polarität der Antibiotika könnte demnach möglicherweise eine noch größere Rolle für das Ausmaß der Sensitivität gegenüber diesen Substanzen spielen als deren molekulare Masse.

Zwar konnte in *E. coli* Δ BamB eine verstärkte Expression der Effluxpumpe TolC nachgewiesen werden, die gegenüber dem Wildtyp um den Faktor 1,84 gesteigert war (Charlson et al, 2006). Die Transportkapazität von TolC war aber offenbar nicht ausreichend, um die Menge der in die Zelle eingedrungenen Antibiotika wieder in den Extrazellulärraum zu schleusen.

Im Gegensatz zur Deletion von *bamB*, die zu einer messbaren Sensibilitätserhöhung von *E. coli* HB101 gegenüber den untersuchten Substanzen führte, hatte die Deletion von *bamC* oder *bamE* geringe Auswirkungen auf die Antibiotikasensibilität von *E. coli* HB101. Die Hemmhofdurchmesser um die verwendeten Antibiotikablättchen wichen bei diesen Stämmen im Agardiffusionstest nur um wenige Millimeter von denen des Wildtyp-Stammes ab, sodass hier keine signifikanten, sondern möglicherweise nur versuchstechnisch bedingten Abweichungen auftraten.

Entgegen den hier beschriebenen Beobachtungen stellten Onufryk et al. (2005) für einen *E. coli* CAG Δ BamC-Stamm eine selektive Sensibilitätserhöhung gegenüber Rifampicin, nicht jedoch gegenüber anderen untersuchten Antibiotika fest, indem sie definierte Konzentrationen von Erregern auf wirkstoffhaltige LB-Platten ausplattierten und anschließend das Wachstum auf diesen Platten beurteilten. *E. coli* CAG Δ BamC bildete weniger Colony Forming Units auf einer 5 μ g Rifampicin pro ml LB-Agar haltigen Kulturplatte als der Wildtyp.

Diese selektive Sensibilitätserhöhung konnten wir im Agardiffusionstest nicht nachweisen. Die Hemmhofdurchmesser von *E. coli* HB101 Wildtyp und Δ BamC um ein Blättchen mit 5 μ g Rifampicin waren sogar gleich groß. Vermutlich war die Diffusion von Rifampicin aus dem Blättchen nicht so effizient wie der Direktzusatz von Rifampicin zu LB-Agar und konnte die Erreger mit Deletion von *bamC* nicht so stark hemmen.

Folglich wiesen auch die Ergebnisse der Sensibilitätstestungen darauf hin, dass die Deletion von *bamB* zu einer größeren Veränderung der Zusammensetzung der äußeren Membran führt als die Deletion von *bamC* oder *bamE*.

Eine Deletion von *bamB*, *C* oder *E* führt zu einer reduzierten Menge der Porine OmpC und OmpF in *E. coli* (Onufryk et al, 2005, Sklar et al, 2007a). Dies wurde für die hier

verwendeten *E. coli* HB101-Stämme bestätigt. Insgesamt waren die Porinkonzentrationen in den äußeren Membranfraktionen der Stämme mit Deletion einer nicht-essentiellen Bam-Komponenten reduziert, wichen aber insgesamt nicht stark von denen des Wildtyps ab. Bei OmpC waren stärkere Unterschiede zwischen den einzelnen Proben zu erkennen. Die Signalintensität von OmpF unterschied sich nur geringfügig zwischen den verschiedenen Proben. Wie bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben, waren auch hier die Konzentrationen der Proteine bei Deletion von *bamB* in Bezug auf den Wildtyp etwas stärker reduziert. Die Deletionen von *bamC* und *bamE* führten zu leicht reduzierten Proteinlevels.

Die Bedeutung von BamB, BamC und BamE für die Biogenese eines Proteins unterschied sich offensichtlich für verschiedene Membranproteine.

In den darauf folgenden Versuchen wurde ermittelt, inwiefern die Biogenese des trimeren Autotransporter-Adhäsins YadA und der inversen Autotransporter-Adhäsine Invasin und Intimin bei Deletion von *bamB*, *bamC* oder *bamE* in *E. coli* beeinträchtigt sind und ob es Unterschiede zwischen diesen Autotransportern gibt.

Auch für die Biogenese dieser Autotransporter ist BamB bedeutsamer als BamC und BamE, da die Proteinkonzentrationen bei Deletion von *bamB* im Vergleich zum Wildtyp stärker reduziert waren als bei Deletion von *bamC* oder *bamE*. Zudem war die Biogenese der drei Autotransporter bei fehlender Expression von BamB stärker eingeschränkt als die Biogenese der Porine OmpC und OmpF.

In Gesamtzellysaten und äußeren Membranfraktionen von *E. coli* HB101 Δ BamB kam es zu einer 2,9- bis 5,8-fachen Reduktion der Konzentration des YadA-Trimers im Vergleich zum Wildtyp. Zudem waren die in den äußeren Membranfraktionen von *E. coli* HB101 Δ BamB detektierte YadA-Trimer- und Invasinmoleküle instabiler in der äußeren Membran inseriert als in den Membranen des Wildtyps, da ein hoher Anteil dieser Proteine mittels Harnstoffextraktion aus der Membran gelöst werden konnte. Während bei dem Wildtyp-Stamm nur 5-17 % der detektierten YadA-Trimere durch Harnstoff aus der äußeren Membran gelöst werden konnte, waren es bei *E. coli* Δ BamB 43-64 %. Ein hoher Anteil des YadA-Signals war also vermutlich nur membranassoziiert und nicht stabil in die äußere Membran inseriert. Ähnlich verhielt es sich für Invasin. Hier war die Konzentration in Gesamtzellysaten und äußeren

Membranfraktionen bei Deletion von *bamB* gegenüber dem Wildtyp um den Faktor 2,2 bis 3,1 reduziert. Zwar konnten mittels Harnstoffextraktion auch aus den Membranen des Wildtyp-Stammes 30-31 % der Invasinmoleküle gelöst werden, bei *E. coli* Δ BamB lag der gelöste Anteil mit über 60 % jedoch deutlich höher.

Daher ist anzunehmen, dass BamB nicht nur zu der Assemblierung dieser Membranproteine beiträgt, sondern auch maßgeblich die Stabilität der Membraninsertion dieser Autotransporter beeinflusst.

Am Beispiel von Invasin konnte zudem gezeigt werden, dass die Komplementierung von *E. coli* Δ BamB mit einem *bamB*-kodierenden Plasmid dazu führt, dass dieses Adhäsिन wieder auf Wildtyp-Niveau in die äußere Membran inseriert werden kann.

Heuck et al. (2011) verglichen die Struktur von BamB mit der eines flachen Zylinders, wobei die acht Untereinheiten aus antiparallelen β -Faltblättern um eine zentrale Kerbe auf der Oberseite und eine tiefe Öffnung auf der Unterseite angeordnet sind. Die Interconnecting Loops, die die einzelnen Untereinheiten miteinander verbinden, ragen über die obere Öffnung hinaus. In den Loops T3 und T4 wurden mittels Mutationsanalysen Aminosäuren identifiziert, die für die Interaktion mit BamA wichtig sind (Heuck et al, 2011). Heuck et al. (2010) vermuten, dass BamB neben seiner Interaktion mit BamA an seiner Oberseite gleichzeitig über seine β -Faltblätter mit ungefalteten äußeren Membranproteinen an seiner Unterseite interagieren kann. BamB könnte mit seiner β -Faltblattstruktur zusammen mit BamA als eine Art Faltungsvorlage zur Faltung des β -Barrels von Membranproteinen beitragen (Palomino et al, 2011). War dies bei Deletion von *bamB* nicht mehr möglich, kam es zu einer beeinträchtigten Biogenese zahlreicher äußerer Membranproteine, einem reduzierten Wachstum der Bakterien unter ungünstigeren Wachstumsbedingungen wie z. B. einer erhöhten Temperatur, einer erhöhten Sensibilität gegenüber Antibiotika und einer verringerten Pathogenität im Tierversuch (Fardini et al, 2009, Weirich et al, accepted 2016).

Das Ausmaß, mit dem die Biogenese äußerer Membranproteine bei Deletion von *bamB* beeinträchtigt war, unterschied sich jedoch für verschiedene Proteine. Während die Konzentration von Porinen wie OmpC und OmpF im Vergleich zum Wildtyp nur leicht reduziert war, war die Membraninsertion von YadA in *E. coli* und Invasin in *E. coli* und *Y. enterocolitica* deutlich gestört. Palomino et. al (2011) vermuten, dass die

Biogenese eines äußeren Membranproteins umso mehr von BamB abhängig ist, je größer die Anzahl der β -Faltblätter in seinem β -Barrel ist. So war die Konzentration von FimD, dessen β -Barrel aus 24 β -Faltblättern besteht, bei Deletion von *bamB* im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 5 reduziert. LamB mit 18 β -Faltblättern war um den Faktor 3 und OmpA mit 8 β -Faltblättern um den Faktor 1,4 reduziert. Dieses Modell scheint jedoch nicht für alle äußeren Membranproteine zutreffend zu sein. Die Konzentration von BamA, welches selbst ein äußeres Membranprotein mit einem β -Barrel bestehend aus 16 β -Faltblättern ist, war in dieser Arbeit durch die Deletion von *bamB*, *bamC* oder *bamE* nicht reduziert, sodass BamA als Ladekontrolle eingesetzt werden konnte. Die Konzentration der Effluxpumpe TolC (Koronakis et al, 2004), stieg durch Deletion von *bamB* sogar an. Für die Biogenese von TolC scheinen daher andere, bisher unbekannte Faktoren entscheidend zu sein, welche bei Abwesenheit von BamB effektiver an der Assemblierung von TolC mitwirken können oder um die TolC mit anderen äußeren Membranproteinen wie OmpF konkurrieren könnte (Charlson et al, 2006).

Bislang konnte also keine generelle Gesetzmäßigkeit gefunden werden, die die Auswirkungen einer Deletion von *bamB* auf die Biogenese bisher nicht untersuchter äußerer Membranproteine vorhersagen konnte.

BamC und BamE schienen für die Biogenese von YadA und Invasin weniger bedeutsam zu sein als BamB. Bei Deletion von *bamC* und *bamE* war die Konzentration von YadA weniger stark herabgesetzt und in Gesamtzelllysaten zum Teil sogar auf Wildtyp-Niveau. In präparierten äußeren Membranen wurde im *bamC*-Deletionsstamm weniger YadA detektiert als im *bamE*-Deletionsstamm. Dagegen war nach Harnstoffextraktion der größere Anteil der YadA-Trimere in den äußeren Membranen von *E. coli* Δ BamC gebunden. Bei *E. coli* Δ BamE wurden jedoch 50-67 % in den Überstand gelöst. Ein höherer Anteil des in *E. coli* Δ BamE detektierten YadAs war folglich nicht stabil in die Membran inseriert.

Die Konzentration von Invasin war in Gesamtzelllysaten und äußeren Membranfraktionen von *E. coli* Δ BamE schon deutlicher, um den Faktor 2,1 bis 4,8, gegenüber dem Wildtyp reduziert. Die Deletion von *bamC* führte zu geringeren

phänotypischen Abweichungen vom Wildtyp. Hier war die Invasinkonzentration im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 1,4 gemindert.

Die vorliegenden Ergebnisse stützen die Vermutung, dass BamC eher eine regulierende und stabilisierende Funktion innerhalb des Bam-Komplexes einnimmt, da die Deletion von *bamC* eher geringe phänotypische Auswirkungen auf die Bakterien hat (Kim et al, 2012). Als eigenständiger Faktor hat es für die Biogenese äußerer Membranproteine vermutlich eine eher untergeordnete Bedeutung.

BamE kommt hierbei wahrscheinlich eine größere Bedeutung zu als BamC, da die Membraninsertion von YadA bei Deletion von *bamE* deutlich instabiler war und sich ein Großteil der Proteine durch Harnstoffextraktion wieder aus der Membran lösten. Die Konzentration von Invasin war bei *E. coli* Δ BamE stärker reduziert als bei *E. coli* Δ BamC. Ferner war *E. coli* Δ BamE unter ungünstigen Wachstumsbedingungen stärker in seinem Wachstum eingeschränkt als *E. coli* Δ BamC.

BamC kann möglicherweise innerhalb des BamCD-Subkomplexes die Aktivität der für die Biogenese von Membranproteinen essentiellen Komponente BamD regulieren. Aufgrund der Struktur von BamD wird vermutet, dass dessen N-Terminus die C-terminale Signalsequenz unreifer Membranproteine erkennen kann (Sandoval et al, 2011) und sie von dort zu BamA weiterleitet (Kim et al, 2012), wo sie unter Mitwirkung von BamB ihre Faltung erfahren.

Auch BamE bindet an BamD. Bei Deletion von *bamE* war zudem die Interaktion zwischen BamD und BamA schwächer ausgeprägt (Sklar et al, 2007a). Daher wird vermutet, dass BamE diese Interaktion stabilisiert und somit zu einem optimalen Zusammenwirken der beiden essentiellen Bam-Komponenten beiträgt.

Neben dieser stabilisierenden Funktion innerhalb des Bam-Komplexes kann BamE vermutlich auch direkt den Einbau äußerer Membranproteine in die Membran erleichtern, indem es parallel zu der Interaktion mit BamD eine direkte Interaktion mit BamA (Bakelar et al, 2016; submitted) und mit Phosphatidylglycerol aufweist, welche die Membraninsertion der Proteine erleichtert (Endo et al, 2011).

Für Intimin schienen die Unterschiede zwischen den untersuchten Stämmen weniger groß zu sein, wobei auch hier die Biogenese von Intimin bei *E. coli* Δ BamB mit einer Reduktion der Intiminkonzentration um den Faktor 1,4 bis 2,2 im Vergleich zu dem

Wildtyp-Stamm am stärksten beeinträchtigt war. Bei Deletion von *bamC* und *bamE* waren die Intiminlevels dagegen nur leicht reduziert oder sogar auf Wildtyp-Niveau. Auch nach Harnstoffextraktion der Membranfraktionen aller untersuchter Deletionsmutanten verblieb stets der höchste Anteil des Intiminsignals in der äußeren Membran der Bakterien und nur ein geringer Anteil wurde gelöst.

Zwar sind die Strukturen von Invasin und Intimin nahezu identisch, sodass es zunächst wahrscheinlich erscheint, dass die Biogenese beider Proteine von denselben Faktoren abhängig ist. So gehören beide Proteine zu der Gruppe der inversen Autotransporter mit einer N-terminal gelegenen β -Barrel Pore aus 12 antiparallel angeordneten β -Faltblättern in der bakteriellen äußeren Membran. Überdies haben beide eine ähnliche molekulare Masse und einen ähnlichen Aufbau ihrer extrazellulären Effektor-domänen (Oberhettinger et al, 2012; Oberhettinger et al, 2015; Fairman et al., 2012).

Jedoch ist zu beachten, dass Intimin als Adhäsion in *enterohämorrhagischen* (EHEC) und *enteropathogenen E. coli* (EPEC) natürlicherweise exprimiert wird und damit ein speziesspezifisches Protein von *E. coli* sein kann. YadA und Invasin kommen dagegen natürlicherweise in *Yersinia enterocolitica* vor. Es ist also denkbar, dass der Bam-Komplex in dem hier verwendeten *E. coli*-Expressionssystem auf die Biogenese speziesspezifischer Proteine wie Intimin optimiert war. Dies könnte erklären, warum die Deletion einer nicht-essentiellen Bam-Komponente geringere phänotypische Auswirkungen auf die Intiminkonzentration in der äußeren Membran hatte als auf die Invasin- und YadA-Konzentration.

Untersuchungen mit *Y. enterocolitica* haben gezeigt, dass die Biogenese von Invasin auch hier in deutlichem Maße durch die Deletion von *bamB* oder *surA* beeinträchtigt ist (Weirich et al, accepted 2016). Die Menge von in die äußere Bakterienmembran inseriertem YadA in *Y. enterocolitica* mit Deletion des *bamB*- oder des *surA*-Gens war in der Anschlussstudie mit *Y. enterocolitica* jedoch kaum beeinträchtigt (Weirich et al, 2016;accepted). In dem Ursprungsmechanismus von YadA schienen also andere Faktoren das Fehlen von BamB bzw. von SurA bei der Assemblierung dieses trimeren Autotransporters ausgleichen zu können. Welche Faktoren dies sind und warum sie in *E. coli* den Verlust von BamB bzw. SurA nicht ausgleichen konnten, ist bislang noch ungeklärt.

Insgesamt lässt sich jedoch sagen, dass BamB unter den drei nicht-essentiellen Komponenten des Bam-Komplexes die größte Bedeutung für die Biogenese und stabile Membraninsertion aller drei Autotransporter in *E. coli* hatte. BamE war ebenfalls von Bedeutung für die Stabilität der Membraninsertion der Autotransporter. Die Deletion von *bamC* führte zu geringeren phänotypischen Abweichungen vom Wildtyp.

Bezeichnenderweise war die Konzentration der Protease DegP, die fehlerhaft gefaltete Proteine im Periplasma denaturieren kann, in Gesamtzelllysaten von *E. coli* HB101 Δ BamB, Δ BamC oder Δ BamE gegenüber dem Wildtyp nur wenig erhöht. Möglicherweise gibt es also noch andere Mechanismen, durch die die akkumulierten Proteine, vor allem bei Deletion von *bamB* abgebaut werden. Es ist auch denkbar, dass die Menge der akkumulierten Proteine bei Deletion von nur einer der nicht-essentiellen Bam-Komponenten unzureichend ist, um DegP zu aktivieren, wie Palomino et al. (2011) vorschlagen. Die gleichzeitige Deletion von *bamB* und *bamE* führte dagegen zu einer deutlichen Erhöhung der DegP-Konzentration in *E. coli* (Palomino et al, 2011), was diese These stützt, da es bei Deletion dieser beiden Komponenten zu einer noch stärkeren Reduktion äußerer Membranproteine kommt.

Hieraus lässt sich folgern, dass unter den für das bakterielle Überleben nicht-essentiellen Faktoren neben dem bereits untersuchten SurA auch BamB bedeutsam für die Biogenese der Pathogenitätsfaktoren YadA und Intimin in *E. coli*, sowie Invasin in *E. coli* und *Y. enterocolitica* ist. Gegenstand weiterer Untersuchungen könnte sein, zu untersuchen, wie die noch ungefalteten Membranproteine im Periplasma zu BamB gelangen und ob eine Interaktion zwischen BamB und periplasmatischen Chaperonen besteht. Ferner ist von Interesse, ob es in Bakterienspezies wie *Neisseria meningitidis* und *Neisseria gonorrhoeae*, die kein BamB besitzen, andere, zu BamB ähnliche Komponenten zusammen mit BamA an der Membraninsertion äußerer Membranproteine mitwirken.

5. Zusammenfassung

Integrale Membranproteine der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien haben eine β -Barrel-Struktur aus β -Faltblättern, die zylinderförmig angeordnet sind und die äußere Membran durchspannen. Die Faltung und Membraninsertion dieser Proteine wird durch die β -Barrel Assembly Machinery (kurz: Bam) ermöglicht. In *E. coli* und *Yersinia enterocolitica* bildet die β -Barrel Assembly Machinery einen Komplex aus fünf Komponenten, BamA bis BamE. BamA ist selbst ein äußeres Membranprotein mit einer β -Barrel-Struktur und fünf sogenannten „Polypeptide Transport Associated Domains“ (POTRA), die in das Periplasma ragen und mit den anderen Bam-Komponenten interagieren. Diese sind die Lipoproteine BamB, BamC, BamD und BamE.

BamA und BamD sind essentiell für die Biogenese äußerer Membranproteine und damit für das bakterielle Überleben. Bei Deletion von *bamB*, *bamC* oder *bamE* sind die Bakterien noch lebensfähig, können aber reduzierte Konzentrationen von Proteinen in ihrer äußeren Membran aufweisen. Damit sind BamB, BamC und BamE nicht-essentielle Komponenten des Bam-Komplexes.

Zwar sind die Strukturen dieser nicht-essentiellen Bam-Komponenten in *E. coli* bereits bekannt, über ihre Funktion innerhalb des Bam-Komplexes existieren jedoch nur Mutmaßungen. So wird angenommen, dass BamB, das hauptsächlich aus β -Faltblättern aufgebaut ist, als Faltungsvorlage für die β -Barrel der äußeren Membranproteine dient und damit die bedeutendste Stellung unter den nicht-essentiellen Bam-Komponenten einnimmt. BamC und BamE wird eine regulierende und stabilisierende Funktion innerhalb des Bam-Komplexes zugeschrieben. Ferner kann BamE durch Bindung an Phosphatidylglycerol den Einbau von Membranproteinen in Lipiddoppelschichten erleichtern.

Die veränderte Zusammensetzung der äußeren Membran der Bakterienstämme mit Deletion von *bamB*, *bamC* oder *bamE* hat auch Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten und die Sensibilität gegenüber ausgewählten antibiotisch wirksamen Substanzen. Bei Deletion von *bamB* waren stets die größten phänotypischen Unterschiede zu dem Wildtyp-Stamm zu beobachten. Der *E. coli* HB101 Δ BamB-Stamm konnte sich bei 37°C in LB-Medium am langsamsten vermehren, bei 41,5°C kam es nach 9 h Wachstum sogar zu ihrem Absterben. Während *E. coli* HB101 Δ BamC im Vergleich zum Wildtyp kaum in seiner Vermehrung eingeschränkt war, verlief die

Wachstumskurve von *E. coli* HB101 Δ BamE vor allem bei der höheren Umgebungstemperatur von 41,5°C deutlich flacher als die des Wildtyps.

Ferner wies *E. coli* HB101 Δ BamB eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Sensibilität gegenüber einer Auswahl antibiotisch wirksamer Substanzen im Agardiffusionstest auf, was vermutlich mit einer erhöhten Membranpermeabilität dieses Stammes für die eingesetzten Substanzen zusammenhing. Die Stämme mit Deletion von *bamC* oder *bamE* zeigten dagegen eine ähnliche Antibiotikasensibilität wie der Wildtyp.

YadA, Invasin und Intimin sind wichtige Pathogenitätsfaktoren der Durchfallerreger *Yersinia enterocolitica* bzw. von EHEC und EPEC. Zur Klärung, ob die Biogenese dieser Autotransporter durch Deletion einer nicht-essentiellen Bam-Komponente beeinträchtigt ist, wurde das Gen für YadA, Invasin oder Intimin mit dem induzierbaren pASK-IBA2-Expressionsvektor in *E. coli* HB101 Wildtyp, Δ BamB, Δ BamC und Δ BamE-Stämme transformiert.

Mittels Western Blot Analyse von Gesamtzelllysaten und äußeren Bakterienmembranen der genannten Stämme wurde gezeigt, dass BamB auch für die Biogenese dieser Autotransporter bedeutsamer war als BamC oder BamE. In äußeren Bakterienmembranen von *E. coli* HB101 Δ BamB war die Konzentration von YadA und Invasin gegenüber dem Wildtyp erheblich reduziert. Auch die Biogenese von Intimin war bei Deletion von *bamB* deutlich eingeschränkt, allerdings in geringerem Ausmaß als bei YadA und Invasin. Da Intimin natürlicherweise als Adhäsine in *E. coli*-Pathovaren vorkommen kann, YadA und Invasin jedoch Adhäsine aus *Y. enterocolitica* sind, ist es denkbar, dass der Bam-Komplex in dem verwendeten *E. coli* HB101-Expressionssystem auf die Membraninsertion der spezieeigenen Proteine optimiert war. Bei Stämmen mit Deletion von *bamC* oder *bamE* waren die Konzentrationen der Adhäsine YadA, Invasin und Intimin in den äußeren Bakterienmembranen von *E. coli* HB101 weniger stark reduziert als bei Deletion von *bamB* und wurden teilweise sogar auf Wildtypniveau detektiert. Diese Beobachtung stützt die These, dass BamC und BamE eine untergeordnete, stabilisierende Funktion innerhalb des Bam-Komplexes haben und von nachrangiger Bedeutung für die Biogenese äußerer Membranproteine sind. Allerdings kam es bei Deletion von *bamE* zu einer weniger stabilen Membraninsertion von YadA, Invasin und Intimin, da durch Harnstoffextraktion ein meist hoher Anteil der Autotransporter aus den äußeren Membranen gelöst wurde.

Ziel der Arbeit war es, die Biogenese von Pathogenitätsfaktoren der untersuchten Bakterien besser zu verstehen, um die so gewonnenen Erkenntnisse eines Tages biotechnologisch und medizinisch nutzen zu können. Möglicherweise könnte BamB ein vielversprechendes antimikrobielles Target der Zukunft darstellen.

6. Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

Aepfelbacher M, Trasak C, Ruckdeschel K (2007) Effector functions of pathogenic *Yersinia* species. *Thrombosis and haemostasis* 98: 521-529

Albrecht R, Schütz M, Oberhettinger P, Faulstich M, Bermejo I, Rudel T, Diederichs K, Zeth K (2014) Structure of BamA, an essential factor in outer membrane protein biogenesis. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* 70: 1779-1789

Albrecht R, Zeth K (2012) Structural basis of outer membrane protein biogenesis in bacteria. *J Biol Chem*

Aleksic S, Bockemuhl J (1990) [Microbiology and epidemiology of *Yersinia* infections]. *Immunität und Infektion* 18: 178-185

Autenrieth IB, Firsching R (1996) Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study. *J Med Microbiol* 44: 285-294

Autenrieth IB, Vogel U, Preger S, Heymer B, Heesemann J (1993) Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in euthymic and T-cell-deficient athymic nude C57BL/6 mice: comparison of time course, histomorphology and immune response. *Infect Immun* 61: 2585-2595

Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL, Mori H (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular systems biology* 2: 2006 0008

Bakelar J, Buchanan S, Noinaj N (2016) The structure of the β -barrel assembly machinery complex. *Science* 351 Issue 6269

Balligand G, Laroche Y, Cornelis G (1985) Genetic analysis of virulence plasmid from a serogroup 9 *Yersinia enterocolitica* strain: role of outer membrane protein P1 in resistance to human serum and autoagglutination. *Infect Immun* 48: 782-786

Barnard TJ, Gumbart J, Peterson JH, Noinaj N, Easley NC, Dautin N, Kuszak AJ, Tajkhorshid E, Bernstein HD, Buchanan SK (2012) Molecular basis for the activation of a catalytic asparagine residue in a self-cleaving bacterial autotransporter. *Journal of molecular biology* 415: 128-142

Behrens S, Maier R, de Cock H, Schmid FX, Gross CA (2001) The SurA periplasmic PPIase lacking its parvulin domains functions in vivo and has chaperone activity. *EMBO J* 20: 285-294

Bennion D, Charlson ES, Coon E, Misra R (2010) Dissection of beta-barrel outer membrane protein assembly pathways through characterizing BamA POTRA 1 mutants of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 77: 1153-1171

Biedzka-Sarek M, Jarva H, Hyytiainen H, Meri S, Skurnik M (2008) Characterization of complement factor H binding to *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. *Infect Immun* 76: 4100-4109

Blatch GL, Lasse M (1999) The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 21: 932-939

Bodelon G, Marin E, Fernandez LA (2009) Role of periplasmic chaperones and BamA (YaeT/Omp85) in folding and secretion of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *J Bacteriol* 191: 5169-5179

Bolin I, Norlander L, Wolf-Watz H (1982) Temperature-inducible outer membrane protein of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* is associated with the virulence plasmid. *Infect Immun* 37: 506-512

Bottone EJ (1999) *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 1(4): 323-333

Bottone EJ (1997) *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clinical microbiology reviews* 10: 257-276

Bottone EJ (1977) *Yersinia enterocolitica*: a panoramic view of a charismatic microorganism. *CRC Crit Rev Microbiol* 5(2): 211-241

Bradford WD, Noce PS, Gutman LT (1974) Pathologic features of enteric infection with *Yersinia enterocolitica*. *Archives of pathology* 98: 17-22

Carter PB (1975) Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* for mice. *Infect Immun* 11: 164-170

Charlson ES, Werner JN, Misra R (2006) Differential effects of yfgL mutation on *Escherichia coli* outer membrane proteins and lipopolysaccharide. *J Bacteriol* 188: 7186-7194

Chen R, Henning U (1996) A periplasmic protein (Skp) of *Escherichia coli* selectively binds a class of outer membrane proteins. *Mol Microbiol* 19: 1287-1294

Cornelis GR (2002) The Yersinia Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nature reviews Molecular cell biology* 3: 742-752

Cover TL, Aber RC (1989) Yersinia enterocolitica. *N Engl J Med* 321: 16-24

D'Andrea LD, Regan L (2003) TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem Sci* 28: 655-662

Dalbey RE, Kuhn A (2012) Protein Traffic in Gram-negative bacteria - how exported and secreted proteins find their way. *FEMS microbiology reviews*

Dersch P, Isberg RR (2000) An immunoglobulin superfamily-like domain unique to the Yersinia pseudotuberculosis invasin protein is required for stimulation of bacterial uptake via integrin receptors. *Infect Immun* 68: 2930-2938

Devenish JA, Schiemann DA (1981) HeLa cell infection by Yersinia enterocolitica: evidence for lack of intracellular multiplication and development of a new procedure for quantitative expression of infectivity. *Infect Immun* 32: 48-55

Dong C, Hou HF, Yang X, Shen YQ, and Dong YH (2012) Structure of *Escherichia coli* BamD and its functional implications in outer membrane protein assembly. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 68,95-101

Dougan DA, Mogk A, Bukau B (2002) Protein folding and degradation in bacteria: to degrade or not to degrade? That is the question. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 59: 1607-1616

Driessen AJM, Fekkes P, van der Wolk JPW (1998) The sec system. *Curr Opin Microbiol* 1: 216-22

El Tahir Y, Skurnik M (2001) YadA, the multifaceted Yersinia adhesin. *Int J Med Microbiol* 291: 209-218

Endo T, Kawano S, Yamano K (2011) BamE structure: the assembly of beta-barrel proteins in the outer membranes of bacteria and mitochondria. *EMBO Rep* 12: 94-95

Fairman JW, Dautin N, Wojtowicz D, Liu W, Noinaj N, Barnard TJ, Udho E, Przytycka TM, Cherezov V, Buchanan SK (2012) Crystal structures of the outer membrane domain of intimin and invasin from enterohemorrhagic *E. coli* and enteropathogenic *Y. pseudotuberculosis*. *Structure* 20: 1233-1243

Fardini Y, Trotereau J, Bottreau E, Souchard C, Velge P, Virlogeux-Payant I (2009) Investigation of the role of the BAM complex and SurA chaperone in outer-membrane protein biogenesis and type III secretion system expression in *Salmonella*. *Microbiology* 155: 1613-1622

Fischer G, Bang H, Mech C (1984) Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides *Biomedica biochimica acta* 43: 1101-1111

Fralick, JA (1996) Evidence that TolC is required for functioning of the Mar/AcrAB efflux pump of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* 178: 5803–5805

Frankel G, Phillips AD, Rosenshine I, Dougan G, Kaper JB, et al. (1998) Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol Microbiol* 30: 911–921

Galan JE, Wolf-Watz H (2006) Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* 444: 567-573

Gatsos X, Perry AJ, Anwari K, Dolezal P, Wolyneć PP, Likic VA, Purcell AW, Buchanan SK, Lithgow T (2008) Protein secretion and outer membrane assembly in Alphaproteobacteria. *FEMS microbiology reviews* 32: 995-1009

Gething MJ, Sambrook J (1992) Protein folding in the cell. *Nature* 355: 33-45

Grassl GA, Bohn E, Müller Y, Bühler OT, Autenrieth IB (2003) Interaction of *Yersinia enterocolitica* with epithelial cells: invasin beyond invasion. *Int J Med Microbiol* 293: 41-54

Grosskinsky U, Schütz M, Fritz M, Schmid Y, Lamparter MC, Szczesny P, Lupas AN, Autenrieth IB, Linke D (2007) A conserved glycine residue of trimeric autotransporter domains plays a key role in *Yersinia* adhesin A autotransport. *Journal of bacteriology* 189: 9011-9019

Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* 177: 4121-4130

Hagan CL, Silhavy TJ, Kahne D (2011) beta-Barrel membrane protein assembly by the Bam complex. *Annu Rev Biochem* 80: 189-210

Hamburger ZA, Brown MS, Isberg RR, Bjorkman PJ (1999) Crystal structure of invasin: a bacterial integrin-binding protein. *Science* 286: 291-295

Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580

Hartl FU, Hayer-Hartl M (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295: 1852-1858

Heesemann J, Gross U, Gruter L (1987) Genetic manipulation of virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Contributions to microbiology and immunology* 9: 312-316

Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D (2004) Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 692-744

Henderson IR, Navarro-Garcia F, Nataro JP (1998) The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends in microbiology* 6: 370-378

Heuck A, Schleiffer A, Clausen T (2011) Augmenting beta-augmentation: structural basis of how BamB binds BamA and may support folding of outer membrane proteins. *J Mol Biol* 406: 659-666

Hoiczky E, Roggenkamp A, Reichenbecher M, Lupas A, Heesemann J (2000) Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J* 19: 5989-5999

<http://www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/strain/cvector/map/pBAD28.gif;jsessionid=3FFA5705E498946C799DB715BDA81FC7> (Zugriff: 06.04.2015)

Isberg RR, Leong JM (1990) Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* 60: 861-871

Junker M, Besingi RN, Clark PL (2009) Vectorial transport and folding of an autotransporter virulence protein during outer membrane secretion. *Mol Microbiol* 71: 1323-1332

Justice SS, Hunstad DA, Harper JR, Duguay AR, Pinkner JS, Bann J, Frieden C, Silhavy TJ, Hultgren SJ (2005) Periplasmic peptidyl prolyl cis-trans isomerases are not essential for viability, but SurA is required for pilus biogenesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187: 7680-7686

Kajava AV, Steven AC (2006) The turn of the screw: variations of the abundant beta-solenoid motif in passenger domains of Type V secretory proteins. *Journal of structural biology* 155: 306-315

Kaper JB, McDaniel TK, Jarvis KG, Gomez-Duarte O (1997) Genetics of virulence of enteropathogenic *E. coli*. *Advances in experimental medicine and biology* 412: 279-287

Kapperud G, Namork E, Skurnik M, Nesbakken T (1987) Plasmid-mediated surface fibrillae of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*: relationship to the outer membrane protein YOP1 and possible importance for pathogenesis. *Infect Immun* 55: 2247-2254

Kenny B, Warawa J, (2001) Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir Receptor Molecule does not undergo full modification when introduced into host cells by EPEC-independent mechanisms. *Infect Immun* 69: 1444-1453.

Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, Finlay BB (1997) Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* 91, 511-520.

Kim KH, Aulakh S, Paetzel M (2011) Crystal structure of beta-barrel assembly machinery BamCD protein complex. *J Biol Chem* 286: 39116-39121

Kim KH, Aulakh S, Paetzel M (2012) The bacterial outer membrane beta-barrel assembly machinery. *Protein Sci* 21: 751-768

Kim S, Malinverni JC, Sliz P, Silhavy TJ, Harrison SC, Kahne D (2007) Structure and function of an essential component of the outer membrane protein assembly machine. *Science* 317: 961-964

Knowles TJ, Browning DF, Jeeves M, Maderbocus R, Rajesh S, Sridhar P, Manoli E, Emery D, Sommer U, Spencer A, Leyton DL, Squire D, Chaudhuri RR, Viant MR, Cunningham AF, Henderson IR, Overduin M (2011) Structure and function of BamE within the outer membrane and the beta-barrel assembly machine. *EMBO Rep* 12: 123-128

Knowles TJ, Scott-Tucker A, Overduin M, Henderson IR (2009) Membrane protein architects: the role of the BAM complex in outer membrane protein assembly. *Nature reviews Microbiology* 7: 206-214

Koretke KK, Szczesny P, Gruber M, Lupas AN (2006) Model structure of the prototypical non-fimbrial adhesin YadA of *Yersinia enterocolitica*. *Journal of structural biology* 155: 154-161

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

Leo JC, Oberhettinger P, Chaubey M, Schütz M, Kuhner D, Bertsche U, Schwarz H, Gotz F, Autenrieth IB, Coles M, Linke D (2014) The Intimin periplasmic domain mediates dimerisation and binding to peptidoglycan. *Mol Microbiol* 95 (1): 80-100

Leyton DL, Rossiter AE, Henderson IR (2012) From self sufficiency to dependence: mechanisms and factors important for autotransporter biogenesis. *Nature reviews Microbiology* 10: 213-225

Lian CJ, Pai CH (1985) Inhibition of human neutrophil chemiluminescence by plasmid-mediated outer membrane proteins of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 49: 145-151

Malinverni JC, Werner J, Kim S, Sklar JG, Kahne D, Misra R, Silhavy TJ (2006) YfiO stabilizes the YaeT complex and is essential for outer membrane protein assembly in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 61: 151-164

McDaniel, T.K., and Kaper, J.B. (1997) A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Mol Microbiol* 23, 399-407.

Misra R (2007) First glimpse of the crystal structure of YaeT's POTRA domains. *ACS Chem Biol* 2: 649-651

Mogk A, Mayer MP, Deuerling E (2002) Mechanisms of protein folding: molecular chaperones and their application in biotechnology. *Chembiochem: an European journal of chemical biology* 3: 807-814

Muza-Moons MM, Koutsouris A, Hecht G (2003) Disruption of cell polarity by enteropathogenic *Escherichia coli* enables basolateral membrane proteins to migrate apically and to potentiate physiological consequences. *Infect Immun* 71: 7069-7078

Namdari F, Hurtado-Escobar GA, Abed N, Trotureau J, Fardini Y, Giraud E, Velge P, Virlogeux-Payant I (2012) Deciphering the roles of BamB and its interaction with BamA in outer membrane biogenesis, T3SS expression and virulence in *Salmonella*. *PLoS One* 7: e46050

Nataro JP, Kaper JB (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews* 11: 142-201

Newman CL, Stathopoulos C (2004) Autotransporter and two-partner secretion: delivery of large-size virulence factors by gram-negative bacterial pathogens. *Critical reviews in microbiology* 30: 275-286

Ni D, Wang Y, Yang X, Zhou H, Hou X, Cao B, Lu Z, Zhao X, Yang K, Huang Y (2014) Structural and functional analysis of the beta-barrel domain of BamA from *Escherichia coli*. *The FASEB Journal* 28: 2677-2685

Noinaj N, Fairman JW, Buchanan SK (2011) The crystal structure of BamB suggests interactions with BamA and its role within the BAM complex. *Journal of molecular biology* 407: 248-260

Noinaj N, Kuszak AJ, Balusek C, Gumbart JC, Buchanan SK (2014) Lateral opening and exit pore formation are required for BamA function. *Structure* 22: 1055-1062

Noinaj N, Kuszak AJ, Gumbart JC, Lukacik P, Chang H, Easley NC, Lithgow T, Buchanan SK (2013) Structural insight into the biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature* 501: 385-390

Nummelin H, Merckel MC, Leo JC, Lankinen H, Skurnik M, Goldman A (2004) The Yersinia adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel beta-roll. *EMBO J* 23: 701-711

Oberhettinger P, Leo JC, Linke D, Autenrieth IB, Schütz MS (2015) The Inverse Autotransporter Intimin Exports Its Passenger Domain via a Hairpin Intermediate. *J Biol Chem* 290: 1837-1849

Oberhettinger P, Schütz M, Leo JC, Heinz N, Berger J, Autenrieth IB, Linke D (2012) Intimin and invasin export their C-terminus to the bacterial cell surface using an inverse mechanism compared to classical autotransport. *PLoS One* 7: e47069

Onufryk C, Crouch ML, Fang FC, Gross CA (2005) Characterization of six lipoproteins in the sigmaE regulon. *J Bacteriol* 187: 4552-4561

Palomino C, Marin E, Fernandez LA (2011) The fimbrial usher FimD follows the SurA-BamB pathway for its assembly in the outer membrane of Escherichia coli. *J Bacteriol* 193: 5222-5230

Paschen SA, Waizenegger T, Stan T, Preuss M, Cyrklaff M, Hell K, Rapaport D, Neupert W (2003) Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature* 426: 862-866

Pepe JC, Miller VL (1993) Yersinia enterocolitica invasin: a primary role in the initiation of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 6473-6477

Pepe JC, Wachtel MR, Wagar E, Miller VL (1995) Pathogenesis of defined invasion mutants of Yersinia enterocolitica in a BALB/c mouse model of infection. *Infect Immun* 63: 4837-4848

Pizarro-Cerda J, Cossart P (2006) Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* 124: 715-727

Pohlschroder M, Prinz WA, Hartmann E, Beckwith J (1997) Protein translocation in the three domains of life: variations on a theme. *Cell* 91: 563-566

Pschyrembel W, Dornblüth O (2004) Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. 260. Auflage. De Gruyter Verlag, Berlin

Raffa RG, Raivio TL (2002) A third envelope stress signal transduction pathway in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 45: 1599-1611

Randall LL, Hardy SJ (2002) SecB, one small chaperone in the complex milieu of the cell. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 59: 1617-1623

Rizzitello AE, Harper JR, Silhavy TJ (2001) Genetic evidence for parallel pathways of chaperone activity in the periplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183: 6794-6800

Rolhion N, Barnich N, Claret L, Darfeuille-Michaud A (2005) Strong decrease in invasive ability and outer membrane vesicle release in Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 with the *yfgL* gene deleted. *J Bacteriol* 187: 2286-2296

Rossiter AE, Leyton DL, Tveen-Jensen K, Browning DF, Sevastyanovich Y, Knowles TJ, Nichols KB, Cunningham AF, Overduin M, Schembri MA, Henderson IR (2011) The essential beta-barrel assembly machinery complex components BamD and BamA are required for autotransporter biogenesis. *Journal of bacteriology* 193: 4250-4253

Ruckdeschel K, Roggenkamp A, Schubert S, Heesemann J (1996) Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. *Infect Immun* 64: 724-733

Ruiz N, Falcone B, Kahne D, Silhavy TJ (2005) Chemical conditionality: a genetic strategy to probe organelle assembly. *Cell* 121: 307-317

Ruiz N, Kahne D, Silhavy TJ (2006) Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis. *Nature reviews Microbiology* 4: 57-66

Sandoval CM, Baker SL, Jansen K, Metzner SI, Sousa MC (2011) Crystal structure of BamD: an essential component of the beta-Barrel assembly machinery of gram-negative bacteria. *J Mol Biol* 409: 348-357

Schindler MK, Schütz MS, Muhlenkamp MC, Rooijackers SH, Hallstrom T, Zipfel PF, Autenrieth IB (2012) *Yersinia enterocolitica* YadA mediates complement evasion by recruitment and inactivation of C3 products. *J Immunol* 189: 4900-4908

Schleiff E, Soll J (2005) Membrane protein insertion: mixing eukaryotic and prokaryotic concepts. *EMBO Rep* 6: 1023-1027

Schmidt, M.A. (2010) LEEways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. *Cell Microbiol* 12: 1544-1552.

Schmid Y, Grassl GA, Buhler OT, Skurnik M, Autenrieth IB, Bohn E (2004) *Yersinia enterocolitica* adhesin A induces production of interleukin-8 in epithelial cells. *Infection and immunity* 72: 6780-6789

Schulze-Koops H, Burkhardt H, Heesemann J, von der Mark K, Emmrich F (1992) Plasmid-encoded outer membrane protein YadA mediates specific binding of enteropathogenic yersiniae to various types of collagen. *Infect Immun* 60: 2153-2159

Schütz M, Weiss EM, Schindler M, Hallström T, Zipfel PF, Linke D, Autenrieth IB (2010) Trimer stability of YadA is critical for virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Infection and immunity* 78: 2677-2690

Sklar JG, Wu T, Gronenberg LS, Malinverni JC, Kahne D, Silhavy TJ (2007a) Lipoprotein SmpA is a component of the YaeT complex that assembles outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 6400-6405

Sklar JG, Wu T, Kahne D, Silhavy TJ (2007b) Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 21: 2473-2484

Skurnik M, Bolin I, Heikkinen H, Piha S, Wolf-Watz H (1984) Virulence plasmid-associated autoagglutination in *Yersinia* spp. *J Bacteriol* 158: 1033-1036

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85

Soto GE, Hultgren SJ (1999) Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J Bacteriol* 181: 1059-1071

Spiess C, Beil A, Ehrmann M (1999) A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* 97: 339-347

Tommassen J (2010) Assembly of outer-membrane proteins in bacteria and mitochondria. *Microbiology* 156: 2587-2596

Torres AG, Zhou X, Kaper JB (2005) Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infection and immunity* 73(1): 18-29

Tsai JC, Yen MR, Castillo R, Leyton DL, Henderson IR, Saier MH, Jr. (2010) The bacterial intimins and invasins: a large and novel family of secreted proteins. *PLoS One* 5: e14403

Tsai JC, Yen MR, Castillo R, Leyton DL, Henderson IR, Saier MH, Jr. (2011) The bacterial intimins and invasins: a large and novel family of secreted proteins. *PloS one* 5: e14403

- Ulrich T, Oberhettinger P, Schütz M, Holzer K, Ramms AS, Linke D, Autenrieth IB, Rapaport D (2014)** Evolutionary conservation in biogenesis of beta-barrel proteins allows mitochondria to assemble a functional bacterial trimeric autotransporter protein. *J Biol Chem* 289: 29457-29470
- Voulhoux R, Bos MP, Geurtsen J, Mols M, Tommassen J (2003)** Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science* 299: 262-265
- Walsh NP, Alba BM, Bose B, Gross CA, Sauer RT (2003)** OMP peptide signals initiate the envelope-stress response by activating DegS protease via relief of inhibition mediated by its PDZ domain. *Cell* 113: 61-71
- Walther DM, Rapaport D, Tommassen J (2009)** Biogenesis of beta-barrel membrane proteins in bacteria and eukaryotes: evolutionary conservation and divergence. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 66: 2789-2804
- Walton TA, Sandoval CM, Fowler CA, Pardi A, Sousa MC (2009)** The cavity-chaperone Skp protects its substrate from aggregation but allows independent folding of substrate domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 1772-1777
- Warner LR, Varga K, Lange OF, Baker SL, Baker D, Sousa MC, Pardi A (2011)** Structure of the BamC two-domain protein obtained by Rosetta with a limited NMR data set. *Journal of molecular biology* 411: 83-95
- Webb C, Selkrig J, Perry A, Noinaj N, Buchanan SK, Lithgow T (2012)** Dynamic association of BAM complex modules includes surface exposure of the lipoprotein BamC. *Journal of molecular biology* 422(4): 545-555.
- Wessel D, Flügge UI (1984)** A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138: 141-143
- Wiedemann N, Kozjak V, Chacinska A, Schonfisch B, Rospert S, Ryan MT, Pfanner N, Meisinger C (2003)** Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature* 424: 565-571
- Wu T, Malinverni J, Ruiz N, Kim S, Silhavy TJ, Kahne D (2005)** Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*. *Cell* 121: 235-245
- Zimmer J, Nam Y, Rapoport TA (2008)** Structure of a complex of the ATPase SecA and the protein-translocation channel. *Nature* 455: 936-943

6.2 Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AHTC	Anhydrotetrazyklin
Amp	Ampicillin
a.u.	Absorption Units (dimensionsloser Wert für die optische Dichte)
Bam	Beta-Barrel Assembly Machinery
BIG- Untereinheit	Bakterielle Immunoglobulin-like Untereinheit
bp	Basenpaare
bzw	beziehungsweise
Cm	Chloramphenicol
CTLD	C-Typ Lectin-like-Subdomain
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EHEC	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EPEC	Enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
GZL	Gesamtzelllysate
h	Stunde(n)
Ig	Immunglobulin
Int	Intimin
Inv	Invasin
Kana	Kanamycin
LB	Luria-Bertani
LEE	Locus of Enterocyte Effacement

LPS	Lipopolysaccharide
Lys-M-Domäne	Lysin-Motiv Domäne
M-Zellen	Mikrofold-Zellen
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
OMP	Outer Membrane Protein
PAGE	Plyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PPIasen	Peptidyl-Propyl <i>cis/trans</i> Isomerasen
POTRA	„Polypeptide Transport Associated Domains“
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
<i>S. Enteritidis</i>	<i>Salmonella Enteritidis</i>
Spec	Spectinomycin
SDS	Sodiumdodecylsulfat (deutsch: Natriumdodecylsulfat)
T5SS	Typ V Sekretionssystem
Tab	Tabelle
TEMED	Tetraethylendiamin
Tir	„Translocated“ Intimin Rezeptor
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TPR	Tetratricopeptide Repeats
TTSS	Type Three (III) Sekretionssystem
wt	Wildtyp
WWP	Western Wasch Puffer
YadA	Yersinia Adhäsion A
Δ	„Delta“/ fehlende Expression eines Proteins

6.3 Daten zu den Wachstumskurven von *E. coli* HB101 Wildtyp, ΔBamB, ΔBamC und ΔBamE

Wachstumsverhalten bei 37°C

Tabelle 35: Photometrisch bestimmte optische Dichte von Subkulturen der Stämme *E. coli* HB101 Wildtyp, ΔBamB, ΔBamC und ΔBamE bei einer Wellenlänge von 600 nm und einer Inkubationstemperatur von 37°C. Die verschiedenen Subkulturen eines Stammes erhielten eine Probennummer (Probe 1 bis 3). Spalten: OD₆₀₀-Werte der jeweiligen Probe (auf vier Dezimalen gerundet). Zeilen: Beobachtungszeitraum (t) in Stunden (h). Die graphische Darstellung und Beschreibung der Ergebnisse sind in Kapitel 3.1.1 (S. 72 ff.) aufgeführt.

t (h)	<i>E. coli</i> HB101 wildtype			<i>E. coli</i> HB101 ΔBamB			<i>E. coli</i> HB101 ΔBamC			<i>E. coli</i> HB101 ΔBamE	
	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 1	Probe 2
0	0.0117	0.0162	0.0147	0.0114	0.0159	0.0016	0.0188	0.0116	0.0131	0.0089	0.0089
1	0.0299	0.1217	0.1184	0.0253	0.0154	0.0925	0.0394	0.1181	0.1180	0.0324	0.1102
2	0.0947	0.1638	0.1479	0.0526	0.0330	0.0995	0.0903	0.1369	0.1626	0.0828	0.1548
3	0.1867	0.2471	0.2317	0.0956	0.0641	0.1137	0.1285	0.1805	0.2142	0.1389	0.2096
4	0.3118	0.3573	0.3488	0.1566	0.1120	0.1407	0.1837	0.2246	0.2787	0.2261	0.2928
5	0,4373	0,4796	0,4715	0,2127	0,1580	0,1667	0,2368	0,2742	0,3455	0,3123	0,3830
6	0,5658	0,6354	0,6255	0,3041	0,2384	0,2162	0,3215	0,3661	0,4579	0,4132	0,4851
7	0,6701	0,7427	0,7322	0,4126	0,3419	0,2847	0,4110	0,4827	0,5605	0,4897	0,5631
8	0,7335	0,8175	0,8064	0,5055	0,4460	0,3667	0,4868	0,5776	0,6476	0,5521	0,6141
9	0,7839	0,8618	0,8455	0,5749	0,5364	0,4598	0,5419	0,6590	0,7007	0,5902	0,6481
10	0,8188	0,8981	0,8798	0,6244	0,5974	0,5395	0,5728	0,7085	0,7372	0,6256	0,6857
11	0,8212	0,8984	0,8786	0,6613	0,6445	0,5917	0,6061	0,7457	0,7597	0,6261	0,6767
12	0,8263	0,8847	0,8727	0,6586	0,6434	0,6240	0,6273	0,7714	0,7779	0,6187	0,6674

Wachstumsverhalten bei 41,5°C

Tabelle 36: OD₆₀₀ von Subkulturen der Stämme *E. coli* HB101 Wildtyp, ΔBamB, ΔBamC und ΔBamE bei einer Inkubationstemperatur von 41,5°C. **Spalten:** auf vier Dezimalen gerundete OD₆₀₀-Werte einer Probe. **Zeilen:** Beobachtungszeitraum (t) in Stunden (h). Die graphische Darstellung und Beschreibung der Ergebnisse sind in Kapitel 3.1.1 (S. 74 ff.) aufgeführt.

t (h)	<i>E. coli</i> HB101 wildtype			<i>E. coli</i> HB101 ΔBamB			<i>E. coli</i> HB101 ΔBamC			<i>E. coli</i> HB101 ΔBamE		
	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 1	Probe 2	Probe 3
0	0,0180	0,0131	0,0109	0,0106	0,0081	0,0023	0,0124	0,0134	0,0128	0,0064	0,0080	0,0054
1	0,0531	0,0426	0,0412	0,0215	0,0206	0,0875	0,0391	0,0316	0,0331	0,0252	0,1173	0,1126
2	0,1408	0,0847	0,0830	0,0437	0,0463	0,0949	0,1071	0,0476	0,0516	0,0728	0,1694	0,1629
3	0,2629	0,1819	0,1780	0,0773	0,0849	0,1100	0,1643	0,0959	0,0959	0,1303	0,2354	0,2292
4	0,4101	0,2893	0,2860	0,1223	0,1439	0,1360	0,2516	0,1576	0,1574	0,1915	0,3195	0,3125
5	0,5293	0,3889	0,3793	0,1595	0,1881	0,1605	0,3334	0,2130	0,2126	0,2478	0,3867	0,3823
6	0,6451	0,5203	0,5198	0,2042	0,2534	0,2031	0,4594	0,3072	0,3053	0,3230	0,4659	0,4638
7	0,6956	0,6431	0,6377	0,2501	0,3236	0,2474	0,5409	0,4146	0,4338	0,3886	0,5032	0,5086
8	0,7498	0,7318	0,7225	0,3001	0,3771	0,3224	0,6474	0,5881	0,5940	0,4461	0,5388	0,5486
9	0,7498	0,7318	0,7225	0,3001	0,3771	0,3224	0,6474	0,5881	0,5940	0,4461	0,5388	0,5486
10	0,7468	0,7392	0,7373	0,2859	0,3601	0,3027	0,6723	0,6342	0,6388	0,4516	0,5468	0,5531
11	0,7410	0,7362	0,7386	0,2664	0,3014	0,2681	0,6840	0,6677	0,6617	0,4506	0,5378	0,5513
12	0,7412	0,7385	0,7214	0,2368	0,2474	0,2368	0,6882	0,6567	0,6739	0,4405	0,5219	0,5382

7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Tübingen unter Betreuung von Herrn Professor Dr. med. Ingo B. Autenrieth durchgeführt. Die Konzeption und Entwicklung des Themas der vorliegenden Arbeit entstand auf Anregung von Herrn Professor Dr. med. Ingo B. Autenrieth und Frau Dr. rer. nat. Monika Schütz.

Die untersuchten Bakterienstämme *E. coli* HB101 Wildtyp, Δ BamB, Δ BamC und Δ BamE wurden freundlicherweise von Herrn Professor Dr. Ian Henderson der Universität Birmingham zur Verfügung gestellt. Die Bakterienstämme *E. coli* BW25113 mit Deletion des Gens eines Chaperons wurden kommerziell aus der Keio Collection erworben.

Sämtliche in dieser Dissertation abgebildeten und beschriebenen Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Dr. rer. nat. Monika Schütz und Herrn Dr. rer. nat. Philipp Oberhettinger von mir eigenständig durchgeführt. Die Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte in Zusammenarbeit und unter Anleitung von Frau Dr. rer. nat. Monika Schütz.

Die in dieser Dissertation erarbeiteten Erkenntnisse zur Biogenese der Virulenzfaktoren von *Yersinia enterocolitica* wurden von Frau Johanna Weirich im Rahmen eines von der DFG geförderten Forschungsprojektes im SFB766 weitergeführt. Frau Weirich deletierte in *Yersinia enterocolitica*-Stämmen jeweils ein Gen, das für eine nicht-essentielle Bam-Komponenten oder ein periplasmatisches Chaperon kodierte.

Die in der Veröffentlichung „*Components of the OMP biogenesis machinery required for virulence – an approach to identify new targets for antivirulence therapy*“ dargestellten Versuche wurden von Frau Weirich durchgeführt, der abgebildete Blot zur Detektion von Invasin wurde von mir in Zusammenarbeit mit Frau Weirich angefertigt. Bei der Verfassung der Einleitung und der Durchführung der Versuche zur Darstellung von Wachstumskurven sowie der Herstellung von Western Blots habe ich mitgewirkt. Ich versichere, die vorliegende Dissertation selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen wurden als solche gekennzeichnet.

Stuttgart, den 24.07.2016 Cornelia Bräutigam

8. Veröffentlichung und Kongressbeitrag

Veröffentlichung (accepted):

Johanna Weirich, Cornelia Bräutigam, Melanie Mühlenkamp, Mirita Franz-Wachtel, Boris Macek, Ina Meuskens, Mikael Skurnik, Katarzyna Leskinen, Erwin Bohn, Ingo Autenrieth and Monika Schütz

„Identifying components required for OMP biogenesis as novel targets for antiinfective drugs ”

(submitted to “Virulence”, Date of Submission: 23-06-2016, revisions submitted: 07-12-2016; accepted 23-12-2016)

Kongressbeitrag:

Poster

Cornelia Bräutigam, Ian R. Henderson, I.B. Autenrieth, Monika Schütz

Elucidating the role of the β -barrel assembly machinery components BamB, C and E for the biogenesis of the pathogenicity factors YadA, intimin and invasin

3rd National Yersinia Meeting 13.-14.07.2012 in Tübingen

9. Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Ingo B. Autenrieth für die ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeit, die Bereitstellung eines so interessanten Themas und die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe bedanken. Mit hilfreichen Gesprächen und Ratschlägen hat er den Fortgang meiner Arbeit stets unterstützt und gefördert.

Herzlich bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. rer. nat. Klaus Hantke für die freundliche Bereitschaft, ein Gutachten meiner Arbeit zu erstellen.

Ebenso bedanke ich mich von Herzen bei Frau Dr. rer. nat. Monika Schütz, die mir unermüdlich mit Rat und Tat zur Seite stand, mich mit großem Engagement in die mikrobiologische Forschung eingeführt und während dem ganzen Verlauf meiner Arbeit herausragend unterstützt und ermutigt hat. Durch viele wertvolle und konstruktive Gespräche und ihre kompetente und warmherzige Anleitung hat sie mir die erfolgreiche Planung, Durchführung und Auswertung der durchgeführten Untersuchungen erst ermöglicht.

Herrn Professor Dr. Ian Henderson danke ich besonders für die Bereitstellung von Bakterienstämmen, die in meiner Arbeit phänotypisch charakterisiert und weiterverarbeitet wurden.

Herrn Dr. rer. nat. Philipp Oberhettinger danke ich herzlich für sein stets offenes Ohr für meine Fragen. Er ließ mich stets an seinem großen Erfahrungsschatz in der mikrobiologischen Forschung teilhaben und hat so maßgeblich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Frau Tanja Späth gebührt mein besonderer Dank für ihre tatkräftige Unterstützung und ihre geduldige und kompetente Hilfe beim Erlernen der angewendeten Methoden.

Herr PD Dr. rer. nat. Erwin Bohn danke ich für seine wertvollen, kompetenten und freundlichen Ratschläge und sein Interesse am Fortgang und Erfolg meiner Arbeit.

Frau Johanna Weirich danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit an der Publikation und die Bereitschaft, die von ihr gewonnenen Erkenntnisse mit mir zu teilen und die Versuche mit mir weiterzuführen.

Allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe *YadA* Magnus Schindler, Melanie Mühlenkamp, Michael Buhl, Katharina Burbach, Birgit Mannke, Birgit Keller, Eva Deuschle und Alexandra Siegfried danke ich für ihre stetige Hilfsbereitschaft und die angenehme und freundliche Atmosphäre im Labor.

Herrn Helmut Rausch danke ich für die stets freundliche Hilfe und die Zubereitung von zahlreichen Nährmedien und Agarplatten für meine Experimente.

Ich danke allen weiteren Mitarbeitern am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene in Tübingen für eine schöne Zeit als Doktorandin und während meines Praktischen Jahres im Rahmen des Medizinstudiums.

Meinen Freunden und meiner ganzen Familie, insbesondere meinen Eltern, möchte ich herzlich für ihre Liebe und bedingungslose Unterstützung in allen Lebenslagen danken.

Mein größter Dank gilt meinem Herrn Jesus Christus, der mich hält und durch den alle Dinge möglich sind.

