

**Siderophortransport**  
**in *Escherichia coli* und *Salmonella enterica***

**Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
Dipl. Biol. Silke Isabell Müller-Heinz  
aus Böblingen

Tübingen

2012

Tag der mündlichen Qualifikation:

03.07.2012

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Klaus Hantke

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. Volkmar Braun

KEEP RIGHT ON TO THE END OF THE ROAD.

-HARRY LAUDER



# Danksagung

Diese Dissertation wurde betreut von Prof. Dr. Klaus Hantke, am Lehrstuhl für Mikrobiologie in der Abteilung Membranphysiologie von Prof. Dr. Volkmar Braun und später, im Interfakultären Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin in der Abteilung Organismische Interaktionen von Prof. Dr. Karl Forchhammer an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Mein aufrichtiger Dank gilt allen, die mich während der letzten Jahre unterstützt und begleitet haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus Hantke für die exzellente fachliche Betreuung meiner Arbeit, sein Interesse an deren Fortschritt sowie die ständige Gesprächsbereitschaft und eine Vielzahl kompetenter fachlicher Tipps und Ratschläge.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Braun möchte ich mich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens, seine Hilfsbereitschaft und wertvollen Anregungen während der Zeit in der Membranphysiologie bedanken.

Bei Frau PD Dr. Iris Maldener und Herr Prof. Dr. Friedrich Götz möchte ich mich für ihre Bereitschaft, als Prüfer in der Disputation zu fungieren, bedanken.

Herr Prof. Dr. Forchhammer danke ich für die freundliche Aufnahme und Integrierung in seine neue Arbeitsgruppe und die Bereitstellung eines großzügigen Arbeitsplatzes.

Herr Prof. Dr. Wolfgang Wohlleben und Herr Prof. Dr. Hans-Peter Fiedler danke ich für die Möglichkeit der Nutzung der notwendigen Geräte und Materialien, der French Press, der Fermenter und weiterer Geräte. Bei Andreas Kulik möchte ich mich besonders für die Durchführung der Fermentationen bedanken.

Herrn Prof. Dr. Winkelmann danke ich für die Möglichkeit der Nutzung der HPLC sowie für zahlreiche Ratschläge und Hilfe bei allen HPLC-Problemen. Außerdem bedanke ich mich für die Bereitstellung verschiedener Siderophorproben.

Bei Dr. Kornelius Zeth und Dr. Verena Schünemann bedanke ich mich für die Möglichkeit und Durchführung der ITC-Messungen am Max Planck Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen.

Ein besonderer Dank gilt dem Graduiertenkolleg 685 für Infektionsbiologie der DFG und seinen Mitgliedern für die Finanzierung des dreijährigen Stipendiums sowie die Möglichkeiten von Weiterbildungs- und Seminarteilnahmen, die einen Blick über den eigenen „Forschtellerrand“ hinaus ermöglicht haben.

Bei allen Mitgliedern der beiden Tübinger Arbeitsgruppen, die mich während der Zeit begleitet haben, möchte ich mich für ihre Kollegialität, ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Für die gute Zusammenarbeit möchte ich mich besonders bei Frau Dr. Marianne Valdebenito und Yvonne Sauermann bedanken. Die beiden haben mir bei vielen Gelegenheiten mit Rat und Tat zur Seite gestanden, vor allem zu Beginn meiner Doktorarbeit bei der Einführung in die HPLC-Technik und die mikrobiologischen Methoden.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Beate Rudo, Dr. Stefanie Krambeer, Dr. Thomas Gwinner, Dr. Klaus Eisele, Dr. Julia Hullmann, Dr. Silke Patzer, Janina Donisi, Christina Herrmann und Claudia Menzel für wertvolle Ratschläge, für all die Kleinigkeiten und Hilfen und viele heitere Momente.

Vielen Dank an Helmut Schunack und Michaela Kopp für ihre Unterstützung bei allem rund um die vielen Verwaltungsangelegenheiten und dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Zu guter Letzt gilt mein herzlichster und größter Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mich aus vollem Herzen unterstützt und mir geholfen haben und ohne deren Hilfe sich vieles schwieriger gestaltet hätte.

Und J. L. danke ich für sein wunderbares Lächeln jeden Morgen...

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Escherichia coli</i> als Modellorganismus.....	1
1.2	Die Bedeutung von Eisen als essentielles Spurenelement.....	1
1.3	Siderophore und ihre Funktion im bakteriellen Organismus.....	2
1.4	Bakterielle Eisenaufnahme bei <i>Escherichia coli</i> und <i>Salmonella spec.</i> .....	7
1.4.1	Enterobactinaufnahme: Das Fep-System .....	8
1.4.2	Salmochelinaufnahme: Das Iro-System.....	9
1.5	Virulenz und wirtsspezifische Abwehr.....	9
1.6	Das Protein Siderocalin: Struktur und Funktion .....	10
1.7	Bakterielle Zell-Zell-Kommunikation: <i>Quorum sensing</i> .....	12
1.8	Bakterielle Signaltransduktionswege .....	12
1.8.1	Zweikomponenten-Histidinkinasesysteme.....	13
1.8.2	Das System QseBC.....	13
1.8.3	Das Protein YgiW .....	14
1.8.4	Die Wirtshormone Adrenalin und Noradrenalin .....	14
1.9	Ziele der vorliegenden Arbeit.....	15
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>17</b>
2.1	<b>Material .....</b>	<b>17</b>
2.1.1	Geräte .....	17
2.1.2	Verbrauchs- und Kleinmaterialien.....	18
2.1.3	Chemikalien .....	18
2.1.4	Elektrophoresemarker.....	19
2.1.5	Enzyme .....	20
2.1.6	<i>Ready-to-use Kits</i> .....	20
2.1.7	Nähr- und Kulturmedien .....	21
2.1.8	Medienzusätze.....	22
2.1.9	Lösungen und Puffer .....	23
2.1.10	Bakterienstämme und Phagen .....	27

2.1.11 Klonierungsvektoren, Plasmide und Plasmidkonstruktionen .....	29
2.1.12 Synthetische Oligonukleotide (Primer) und Affinitätstags .....	30
2.1.13 Hardware .....	31
2.1.14 Software und Datenquellen.....	31
<b>2.2 Methoden.....</b>	<b>33</b>
2.2.1 Mikrobiologische Arbeitsmethoden .....	33
2.2.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden.....	36
2.2.3 Proteinbiochemische Arbeitsmethoden .....	40
2.2.4 Analytische Methoden.....	47
2.2.5 Sonstige Methoden.....	49
2.2.6 Sicherheit.....	50
2.2.7 Statistische Auswertung .....	50
<b>3 ERGEBNISSE .....</b>	<b>51</b>
<b>3.1 Allgemeine Bemerkungen .....</b>	<b>51</b>
<b>3.2 Siderophoraufreinigung.....</b>	<b>51</b>
3.2.1 Enterobactin und seine Derivate .....	52
3.2.2 Salmocheline .....	54
<b>3.3 Siderocalin und seine Liganden .....</b>	<b>56</b>
3.3.1 Produktion und Aufreinigung von Siderocalin .....	56
3.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Siderocalin) .....	57
3.3.3 HPLC-Analyse von Siderocalin.....	58
3.3.4 Ligandenkonkurrenzversuch: Enterobactin und Salmochelin .....	59
3.3.5 Proteinmengenbestimmung von Siderocalin.....	59
3.3.6 Siderophormengenbestimmung via Arnow-Reaktion und HPLC von Siderocalin .....	60
3.3.7 Wachstumstests zum Bindungsverhalten von Salmochelin an Siderocalin .....	61
3.3.8 Siderocalin und Desferal® .....	63
3.3.9 Siderocalin und Dextran .....	64
3.3.10 Siderocalin, Adrenalin / Noradrenalin und Transferrin .....	64
<b>3.4 Das Zweikomponentensystem QseBC und das Protein YgiW.....</b>	<b>65</b>
3.4.1 Herstellung von LacZ-Operonfusionen .....	66
3.4.1.1 $\beta$ -Galaktosidase als Reporterenzym für eisenregulierte Gene .....	67
3.4.1.2 Siderophorsysteme: Enterobactin und Salmochelin .....	69
3.4.1.3 Das Protein YgiW.....	85
3.4.1.4 $\beta$ -Galaktosidase-Assays in TY-Medium.....	97
3.4.1.5 Vergleich von $\Delta$ entC und $\Delta$ aroB.....	101
3.4.2 Enterobactinproduktion .....	103



3.4.2.1	Eisenarme Bedingungen .....	104
3.4.2.2	Eisenreiche Bedingungen .....	105
3.4.3	Analysen von YgiW .....	107
3.4.3.1	Produktion und Aufreinigung von YgiW.....	108
3.4.3.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (YgiW) .....	108
3.4.3.3	HPLC-Analyse von YgiW .....	109
3.4.3.4	Proteinmengen-Bestimmung (YgiW).....	110
3.4.3.5	Arnou-Reaktion (YgiW).....	111
3.4.3.6	<i>Isothermal titration calorimetry</i> (YgiW).....	111
3.4.4	Biofilmbildung.....	113
3.4.5	Motilität .....	114
<b>3.5</b>	<b>Vergleich verschiedener Wildtypenlinien .....</b>	<b>118</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>123</b>
<b>4.1</b>	<b>Siderophoraufreinigung .....</b>	<b>123</b>
<b>4.2</b>	<b>Siderocalin.....</b>	<b>123</b>
4.2.1	Siderocalin bindet Enterobactin und seine Derivate .....	124
4.2.2	Siderocalin bindet Salmochelin S4 unter bestimmten Voraussetzungen.....	125
4.2.3	Siderocalin bindet kein Yersiniabactin .....	126
4.2.4	Siderocalin hemmt das Wachstum von <i>Escherichia coli</i> K-12.....	127
4.2.5	Siderocalin beeinflusst das Wachstum von Salmochelinproduzenten nicht.....	127
4.2.6	Desferal® und Dextran entfernen kein Eisen oder Enterobactin aus dem Fe(III)-Siderophor-Siderocalin-Komplex.....	130
4.2.7	Adrenalin und Noradrenalin sind keine Bindungspartner von Siderocalin .....	130
<b>4.3</b>	<b>Das Zweikomponentensystem QseBC und das Protein YgiW .....</b>	<b>131</b>
4.3.1	Das Zweikomponentensystem nimmt Einfluss auf das Enterobactinsystem .....	132
4.3.2	Die Einflussnahme des Zweikomponentensystems auf das Salmochelinsystem .....	134
4.3.3	YgiW bindet Enterobactin und seine Derivate .....	134
4.3.4	Das periplasmatische Protein YgiW spielt eine Rolle im QseBC- und Eisenmetabolismus .....	135
4.3.5	QseBC und YgiW wirken sich auf Biofilmbildung und Motilität von <i>Escherichia coli</i> aus.....	136
4.3.6	Arbeitsmodell der Fes-, FepA- und Iron-Regulation durch QseB, QseC und YgiW .....	137
<b>4.4</b>	<b>Vergleich von <i>Escherichia coli</i> K-12 Derivaten.....</b>	<b>139</b>
4.4.1	Unterschiede zwischen den <i>Escherichia coli</i> K-12 Stämmen MC4100 und MG1655.....	139
4.4.2	Die Proteine RelA und SpoT sind nicht die verantwortlichen Faktoren .....	141
<b>4.5</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>142</b>

<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>143</b>
5.1	Kurzfassung .....	143
5.2	Summary .....	144
<b>6</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>145</b>
6.1	Verzeichnisse .....	145
6.1.1	Abkürzungen .....	145
6.1.2	Abbildungen .....	150
6.1.3	Tabellen .....	157
6.2	Publikationen .....	158
6.3	Literatur .....	159

# 1 Einleitung

## 1.1 *Escherichia coli* als Modellorganismus

*Escherichia coli* (*E. coli*) ist ein typischer Vertreter der Familie der Enterobacteriaceae. Es handelt sich hierbei um Gram-negative, kurze stumpfe Stäbchenbakterien (ca.  $0,6 \times 1-2 \mu\text{m}$ ), unbeweglich oder mit peritricher Begeißelung. Sie sind sowohl zur aeroben Atmung, als auch zur anaeroben Fermentation (fakultativ) befähigt. Im wissenschaftlichen Forschungsbereich hat sich diese Bakterienart als weit verbreiteter und hochfrequent genutzter Modellorganismus etabliert, obwohl sie nur ungefähr 1 % der mikrobiellen Kommensalen in Ileum und Caecum von Warmblütern ausmacht. Diese Darmbakterien sind zwischenzeitlich genetisch sehr gut charakterisiert und zeichnen sich außerdem durch ihre einfache Handhabung, leichte Kultivierung sowie die geringe Virulenz der genutzten Laborstämme und seiner Derivate aus. Zudem existieren mehrere pathogene Stämme (DAEC, EAaggEC, EHEC, EIEC, EPEC, ETEC, NMEC, UPEC und weitere), die eine Reihe verschiedener Krankheitsbilder bedingen und so ein Studium von Pathogen-Wirt-Interaktionen ermöglichen.

In der Molekularbiologie hat *E. coli* eine herausragende Rolle. Sein Genom von ca.  $4,65 \times 10^6$  Basenpaaren wurde relativ früh vollständig sequenziert (Blattner *et al.*, 1997), ebenso gelang Jonathan Beckwith an diesem Organismus 1969 die erste Isolierung eines einzelnen Gens von ca. 5000 existierenden Genen. Die Nutzung von *E. coli* als Klonierungs- oder Expressionswirt sowie als Modellsystem zur Mutantengewinnung ist inzwischen in der Biologie und in anderen Fächern aus dem Laboralltag nicht mehr wegzudenken.

Dabei kommen i. d. R. verschiedene apathogene, etablierte K-12 Stämme zum Einsatz (wie beispielsweise MG1655 oder MC4100), da der ursprünglich isolierte *E. coli* K-12 nicht mehr existiert.

## 1.2 Die Bedeutung von Eisen als essentielles Spurenelement

Die biologische Bedeutung von Eisen (Fe) wird deutlich in seiner Funktion als essentielles Spurenelement für nahezu alle Lebewesen. Eisen spielt eine wichtige Rolle bei der Blutbildung, ebenso wie beim Sauerstofftransport und seiner Speicherung als zentrales Atom des Cofaktors Häm b im Hämoglobin und Myoglobin und in Cytochromen, der DNA- sowie Aminosäuresynthese (Earhart, 1996).

Im menschlichen Körper findet sich Eisen vorwiegend im Hämoglobin und als Depot-Eisen in Ferritin und Hämosiderin. In geringeren Mengen liegt Eisen vor in Myoglobin, in eisenhaltigen Enzymen und im Serum, wo Transferrin das Transportvehikel darstellt.

Eisen zählt als wichtigstes Spurenelement und ist besonders katalytisch wirksam. Eine Besonderheit ist die geringe Löslichkeit seiner Verbindungen (Fe(III)-Komplexe wie Oxidhydrat oder Carbonat) bei neutralem pH-Wert. Die Konzentration an freiem Eisen beträgt in natürlicher Umgebung lediglich ca.  $10^{-9}$  M (Chipperfield & Ratledge, 2000), im Blutserum von Säugern sogar nur  $10^{-26}$  M (Otto *et al.*, 1991). Die meisten Mikroorganismen, mit Ausnahme weniger Arten wie *Lactobacillus plantarum* (Archibald & Duong, 1984) oder *Borrelia burgdorferi* (Posey & Gherardini, 2000), benötigen für effizientes Wachstum Konzentrationen, die über  $10^{-7}$  M Fe(III) liegen (Braun, 2007; Ratledge & Dover, 2000). Unter sauren Bedingungen ist Fe(III) besser löslich. Das für bakterielles Wachstum auch verwendbare Fe(II) ist zwar besser löslich, aber unter aeroben Bedingungen nicht stabil. So wird die Verfügbarkeit von Eisen in natürlicher Umgebung, obwohl es eines der häufigsten Elemente auf der Erde ist, oft zu einem wachstumslimitierenden Faktor für bakterielle Populationen.

### 1.3 Siderophore und ihre Funktion im bakteriellen Organismus

Viele Mikroorganismen haben eine Lösung für die natürliche Eisenlimitation, in Form der Produktion von Siderophoren gefunden. Siderophore sind sogenannte Eisenchelatoren (griech. für „Eisenträger“). Es sind inzwischen über 300 solcher natürlicher eisenbindender niedermolekularer (400 Da bis 2000 Da) Chelatoren bekannt (Ratledge, 2007), die von Mikroorganismen produziert und ausgeschieden werden. Bei ausreichendem Eisenangebot liegen nur geringste Mengen der Eisenkomplexbildner vor, in Eisenmangelsituationen hingegen werden Konzentrationen von über 100 mg pro Liter gemessen (Braun, 1991). Sie binden Eisen und werden unter Energieverbrauch als dreiwertige Eisenkomplexe zurück in die Zelle transportiert, wo das Eisen freigesetzt und sofort verstoffwechselt oder gespeichert wird. Die Freisetzung erfolgt dabei durch Reduktion von Fe(III) zu Fe(II). In manchen Fällen wird der Komplexbildner hydrolysiert, bevor das Eisen durch Reduktion aus dem Komplexbildner entfernt werden kann (Hydrolyse von Fe(III)-Enterobactin). Siderophore weisen mit ca.  $10^{23}$  bis  $10^{50}$  l/mol bei pH 7 eine höhere Stabilitätskonstante auf, als die natürlichen unlöslichen Eisenkomplexe. Sie können aufgrund ihrer Struktur in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Zum einen die Catecholate, zu denen beispielsweise Enterobactin und Salmochelin gehören (Abbildung 1-1), dann die Gruppe der Hydroxamate mit Aerobactin, Desferrioxamin B (Desferal®) und Ferrichrom

als prominente Beispiele und schließlich Citrat sowie Yersiniabactin, als Vertreter der dritten Siderophorgruppe, die Carboxylate und Mischformen beinhaltet (Abbildung 1-2).

Unter den Siderophoren ist Enterobactin der stärkste bekannte Fe(III)-Chelator mit einer Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) von ca.  $10^{-49}$  M ( $10^{-35}$  unter physiologischen pH Bedingungen) (Harris W. R., 1979). Es ist zusammengesetzt aus drei Einheiten 2,3-Dihydroxybenzoylserin (DHBS) (Abbildung 1-1). Seine Bildung erfolgt mit Hilfe des *ent*-Genclusters (Elkins & Earhart, 1989; Liu *et al.*, 1990) über Chorisminsäure, die durch die Proteine EntA, EntB und EntC zu 2,3-Dihydroxybenzoesäure (DHB) konvertiert wird. Katalysiert durch EntD, EntE, EntF und EntB wird L-Serin an DHB gekoppelt. Drei solcher Moleküle bilden nach intermolekularer Zyklisierung schließlich Enterobactin. Es wurde 1970 zeitgleich von zwei Arbeitsgruppen in *Salmonella typhimurium* („Enterobactin“ (Pollack & Neilands, 1970)) und *E. coli* („Enterochelin“ (O'Brien & Gibson, 1970)) entdeckt. Die Produktion von Enterobactin wurde lange einzig den Gram-negativen Mikroorganismen der Familie der Enterobacteriaceae zugeordnet. Im Jahr 2001 wurde jedoch gezeigt, dass die Enterobactinisolierung aus zwei Gram-positiven Streptomyces-Vertretern gelang (Fiedler *et al.*, 2001).

Salmochelin kann seiner Struktur nach als zweifach glycosyliertes Enterobactin betrachtet werden (Abbildung 1-1). Es wird von allen Serogruppen von *Salmonella enterica* mit Ausnahme der Subspecies IIIb, von uro- und vogelpathogenen *E. coli* Stämmen, *Shigella dysenteriae* und *Klebsiella pneumoniae* (plasmidcodiert) produziert und wird als potentielle Reaktion auf Abwehrmaßnahmen des Wirtes angesehen. Die Basis des Moleküls bildet 2,3-Dihydroxybenzoylserin mit einem Glucoserest C-glycosidisch an C5 der Catecholstruktur gebunden (Bister *et al.*, 2004). Die Bezeichnung für dieses Molekül, das Monomer von Salmochelin, lautet in früheren Arbeiten Pazifarinsäure (Wawszkiewicz & Schneider, 1975) oder Salmochelin SX (Zhu *et al.*, 2005). Das Dimer wird als S1, das lineare Trimer als S2 und das zyklische, zweifach glycosylierte Trimer („Salmochelin“) als S4 bezeichnet. Es existiert zudem ein Salmochelin-Siliciumkomplex S0; Salmochelin und Enterobactin sind die ersten bekannten Naturstoffe, die stabile Komplexe dieser Art bilden (Schmiederer *et al.*, 2011).

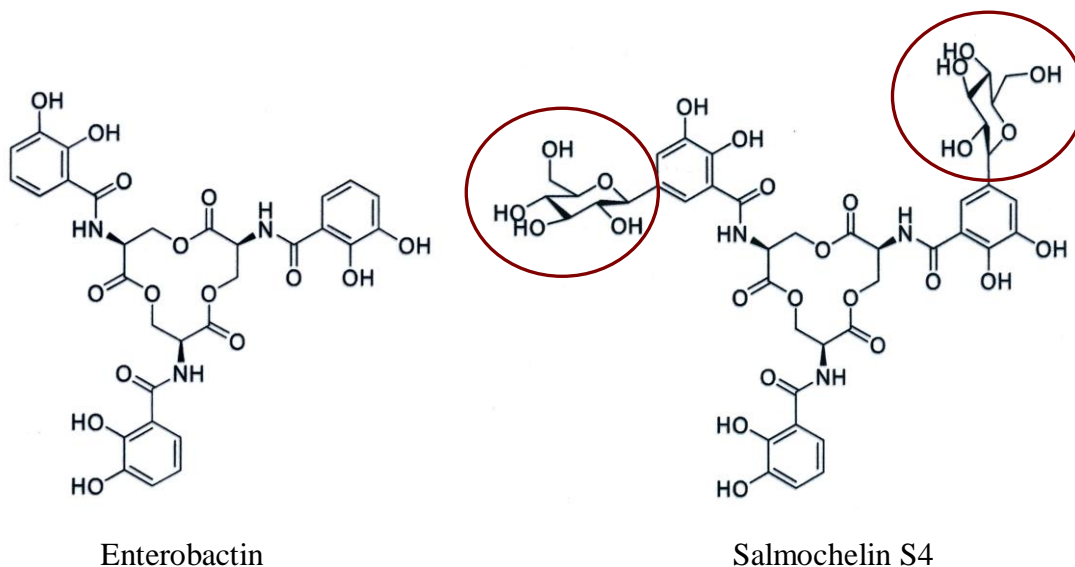
Verantwortlich für die Salmochelinproduktion ist das *iroBCDEN* Gencluster sowie das Enterobactin Biosynthese- und Verwertungssystem. IroB ist eine Glycosyltransferase und somit für den elementaren Unterschied zu Enterobactin verantwortlich. IroC ist ein ABC-Exporter, IroD hat Ähnlichkeit zur Enterobactin Esterase Fes und kann Salmochelin spalten, IroE ist eine

## 1 Einleitung

---

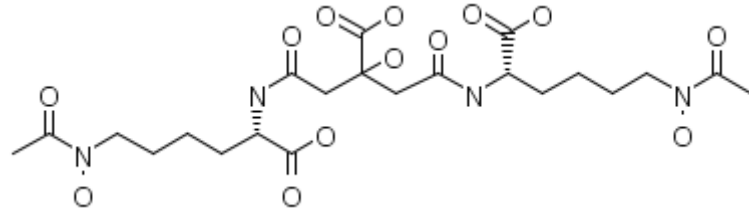
periplasmatische Salmochelinesterase und IroN ist der Salmochelinrezeptor der äußeren Membran sowie ein Adhäsion für die Bindung an Epithelzellen (Sorsa *et al.*, 2003).

Yersiniabactin ist ein Siderophor, das natürlicherweise von *Yersinia*, aber auch beispielsweise von *E. coli* Nissle 1917 unter Eisenmangelbedingungen produziert wird (Abbildung 1-2). Das von Yersiniabactin abhängige Eisentransportsystem ist dabei auf einem *high-pathogenicity island* (HPI) codiert, wobei für neun der Genprodukte eine Funktion bei der Synthese oder dem Transport des Siderophors nachgewiesen wurde (Bobrov *et al.*, 2002). Yersiniabactin wird als Virulenzfaktor betrachtet, der unter Eisenmangel wachstumsfördernd wirkt (Haag *et al.*, 1993). Dies ist abhängig von TonB und Irp65 (*iron-repressible outer membrane receptor* Irp). Irp65 funktioniert demnach als der Yersiniabactinrezeptor und wird als FyuA bezeichnet (Heesemann *et al.*, 1993).



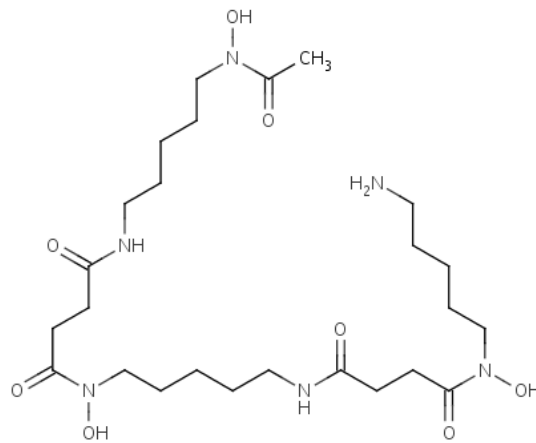
**Abbildung 1-1: Darstellung der Strukturformeln verschiedener Catechol-Siderophore: Enterobactin und Salmochelin S4 mit den zwei Glycosylresten (rot markiert) (Hider & Kong, 2010).**

Die Kompetenz verschiedene Siderophore und insbesondere ihre Aufnahmesysteme zu produzieren, verleiht diesen Organismen einen Selektionsvorteil und ist oft ein virulenzassoziierter Pathogenitätsfaktor.



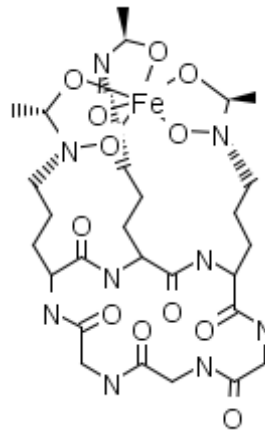
#### Aerobactin

(GenomeNet [http://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bfind\\_sub?mode=bfind&max\\_hit=1000&dbkey=all&keywords=aerobactin](http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bfind_sub?mode=bfind&max_hit=1000&dbkey=all&keywords=aerobactin))



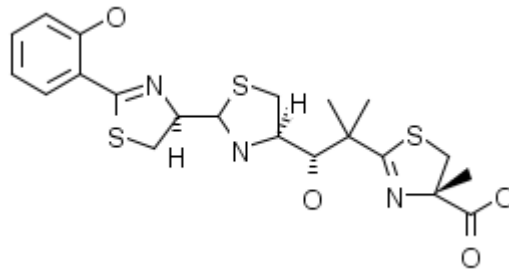
#### Desferrioxamin B

(EMBL-EBI European Bioinformatics Institute <http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:4356>)



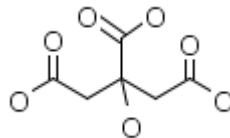
#### Fe-Ferrichrom

(GenomeNet [http://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bfind\\_sub?mode=bfind&max\\_hit=1000&dbkey=all&keywords=ferrichrome](http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bfind_sub?mode=bfind&max_hit=1000&dbkey=all&keywords=ferrichrome))



### Yersiniabactin

(GenomeNet [http://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bfind\\_sub?mode=bfind&max\\_hit=1000&dbkey=all&keywords=yersiniabactin](http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bfind_sub?mode=bfind&max_hit=1000&dbkey=all&keywords=yersiniabactin))



### Citrat

(GenomeNet [http://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bfind\\_sub?mode=bfind&max\\_hit=1000&dbkey=all&keywords=citrate](http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bfind_sub?mode=bfind&max_hit=1000&dbkey=all&keywords=citrate))

**Abbildung 1-2: Darstellung der Strukturformeln verschiedener Siderophore: Aerobactin, Desferrioxamin B und Ferrichrom (Hydroxamate) sowie Yersiniabactin und Citrat (Carboxylate / Mischformen).**

Das globale Eisenregulationsprotein ist der Fur-Repressor (*ferric uptake regulator*), der in vielen Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien gefunden wurde. Das entsprechende Gen *fur* liegt bei 15,5 Minuten auf dem *E. coli* Chromosom und reguliert alle unter Eisenkontrolle stehenden bekannten Gene (ca. 70). Wird Eisen von Fur gebunden, agiert das Protein als transkriptionaler Repressor. Deletionen des entsprechenden *fur*-Gens führen zu konstitutiver Expression der eisenregulierten Gene.

Bei Gram-positiven Bakterien mit hohem GC-Gehalt wird die Regulation von Proteinen der IdeR-DtxR-Familie (*iron dependent regulatory protein / diphtheria toxin repressor / regulator*) als Eisenrepressor übernommen (Boland & Meijer, 2000). Die regulierten Gene entsprechen weitgehend den von Fur regulierten (z. B. Siderophorbiosynthesegene oder Gene, die wichtig für die Eisenaufnahme sind). Die Sequenzen der Regulatorproteine sind zwar verschieden, allerdings existieren einige strukturelle Gemeinsamkeiten, wie die Tatsache, dass die aminoterminalen Domäne die DNA-Bindestelle mit einem Helix-turn-Helix Motiv enthält oder das Vorhandensein von zwei Metallbindestellen (Hantke, 2001).



### 1.4 Bakterielle Eisenaufnahme bei *Escherichia coli* und *Salmonella spec.*

Um bakterielles Wachstum zu gewährleisten, muss genügend Eisen verfügbar sein oder verfügbar gemacht werden. Die Produktion und das Ausschleusen von Siderophoren ist der eine Teil der Maßnahmen der Mikroorganismen. Ein weiterer Teil ist das Ausbilden geeigneter Aufnahmekomplexe mit Rezeptoren für das jeweilige Substrat, das durch die vorhandene Eisenkonzentration reguliert wird. So können auch beladene Fremdsiderophore genutzt werden, ohne eigene Energie für die Produktion dieser Moleküle aufzuwenden. Die entsprechenden Rezeptoren sitzen in der äußeren Membran und binden ihr passendes Siderophor. Allerdings erfolgt diese Bindung nicht immer sehr spezifisch, sondern häufig redundant. Einige erkennen nicht nur eine Art Siderophor, sondern mehrere strukturähnliche Moleküle, bei anderen werden nicht nur Siderophore gebunden, sondern beispielsweise auch Bakteriophagen, Colicine oder Antibiotika. Beispiele für Siderophorrezeptoren und eine Auswahl ihrer Liganden sind: FepA, das Fe-Enterobactin, 2,3-Dihydroxybenzoylserin (DHBS), Fe-Salmochelin und die Colicine B und D (Guterman, 1973; Wayne *et al.*, 1976) bindet, Fiu erkennt DHBS und Dihydroxybenzoat, Cir bindet ebenfalls DHBS und Colicin Ia, IronN erkennt Fe-Salmochelin, aber auch Fe-Enterobactin, DHBS und Corynebactin, FyuA bindet Fe-Yersiniabactin und Pesticin, FhuA bindet das Fe-Ferrichrom der Pilze, Albomycin, Colicin M und die Phagen T5, T1 und  $\Phi 80$  und Iut bindet Fe-Aerobactin und Cloacin DF13, um nur eine kurze Auswahl der zahlreichen Rezeptoren zu nennen. Nach Bindung des Komplexes an den spezifischen Kanal erfolgt die energieabhängige Freisetzung mit Hilfe eines transmembranen TonB-Proteinkomplexes, der sich von der Cytoplasmamembran bis zum Kanal erstreckt (Hantke & Braun, 1978). Anschließend erfolgt die Freisetzung des Eisenmoleküls über Hydrolyse oder Reduktion und der sofortige Einbau in Zielmoleküle wie Häm oder FeS-Zentren oder in Fe-Speicherproteine; Denn freies Fe(II) reagiert mit  $H_2O_2$  und bildet das schädliche OH-Radikal. Infolgedessen darf es nur in geringsten Mengen in der Zelle vorkommen. Die Grundstruktur der Eisen(III)-Aufnahmesysteme setzt sich aus einem porinähnlichen Rezeptorprotein, das die äußere Membran durchdringt ( $\beta$ -barrel-Struktur), einem periplasmatischen Bindeprotein und einem ABC-Transporter in der Cytoplasmamembran zusammen. Die Energieversorgung für den Transport durch die äußere Membran liefert der TonB-Komplex der cytoplasmatischen Membran, bestehend aus den Proteinen TonB, ExbB und ExbD (1 : 7 : 2), der so die Funktion mehrerer Eisen- und Vitamin B12-Transportsysteme wie Fhu, Fec, Fep und BtuB sichert (Bassford *et al.*, 1977; Cadieux & Kadner, 1999; Chimento *et al.*, 2003), aber auch dem Transport der Colicine der

B-Gruppe und rezeptorabhängiger infektiöser Bakteriophagen dient (Braun, 1995; Lazdunski *et al.*, 1998). Die Energetisierung funktioniert über den Protonengradienten der Cytoplasmamembran. TonB erstreckt sich bis ins Periplasma und kann so über seinen C-Terminus mit der TonB-Box der äußeren Membranrezeptoren wechselwirken (Kadner, 1990; Pawelek *et al.*, 2006; Postle, 1993; Shultis *et al.*, 2006). Ein korrekt gefaltetes TonB-Protein ist für die Funktion der Energieübertragung auf die äußere Membran essentiell, ExbB und ExbD können von TolQR zum Teil ersetzt werden (Braun & Herrmann, 1993). Der Mechanismus der Energieübertragung auf die Membranrezeptoren ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Zur Diskussion stehen zwei Modelle: Das „Propellermodell“, bei dem postuliert wird, dass sich der TonBC-Terminus propellerartig dreht, bis er schließlich an den äußeren Membranrezeptor bindet, der N-Terminus aber verankert bleibt (Chang *et al.*, 2001) und das „Shuttlemodell“, das von der Annahme ausgeht, dass sich TonB komplett von der Cytoplasmamembran löst (Larsen *et al.*, 2003; Peacock *et al.*, 2006; Postle & Kadner, 2003). Die Energieübertragung erfolgt schließlich über eine Reihe an Konformationsänderungen von TonB (Letain & Postle, 1997). Für *E. coli* K-12 sind bislang sechs von TonB abhängige Eisentransportsysteme nachgewiesen worden. Dazu zählen die Hydroxamat-Siderophorrezeptoren FhuA (Ferrichrom) (Fecker & Braun, 1983) und FhuE (Coprogen) (Sauer *et al.*, 1987), die Catechol-Siderophorrezeptoren FepA (Enterobactin), FiuA und CirA (beide für DHB und DHBS) (Lundrigan & Kadner, 1986; Nau & Konisky, 1989) und der Carboxylat-Siderophorrezeptor FecA (Citrat) (Pressler *et al.*, 1988). BtuB, der Vitamin B12 Rezeptor, ist ebenfalls abhängig von TonB (Bassford *et al.*, 1976; Heller & Kadner, 1985). Wie bereits erwähnt, werden einige dieser Transportsysteme als Eintrittspforte von Bakteriophagen (Luria *et al.*, 1943; Matsushiro, 1963) oder für das Einschleusen von Colicinen genutzt (Lazdunski *et al.*, 1998). Diese hochaffinen Transportsysteme finden sich in großer Zahl und weit verbreitet in den verschiedenen Bakterienarten wieder.

### 1.4.1 Enterobactinaufnahme: Das Fep-System

Enterobactin ist ein Catechol-Siderophor (Raymond *et al.*, 2003) und wird von Enterobakterien produziert. Es wird als Eisen(III)-Komplex von FepA, dem Rezeptor in der äußeren Membran erkannt und gebunden. So gelangt es in den periplasmatischen Raum, wo FepB als Bindeprotein des Systems dient (Sprenkel *et al.*, 2000). Die cytoplasmatischen Transmembranproteine FepD und FepG vermitteln den Transport durch die Cytoplasmamembran, katalysiert durch Hydrolyse von ATP von FepC als ATP-Bindeprotein (Raymond *et al.*, 2003). Liegt der Ferri-Enterobactinkomplex im Cytoplasma vor, wird  $\text{Fe}^{3+}$  durch hydrolytische Spaltung,

vermittelt von der Enterobactin Esterase Fes, für eine noch unbekannte Reduktase zugänglich, und  $\text{Fe}^{2+}$  steht zur weiteren Verwendung zur Verfügung (Brickman & McIntosh, 1992; Greenwood & Luke, 1978; Raymond *et al.*, 2003).

### 1.4.2 Salmochelinaufnahme: Das Iro-System

Salmochelin ist seiner Struktur nach ein zweifach glycosyliertes Enterobactin und reagiert deshalb hydrophiler. Produzenten sind vorwiegend *Salmonella*, aber auch einige pathogene Bakterienarten (s. o.). Die Biosynthese von Salmochelin verläuft wie bei Enterobactin. In einem weiteren Schritt werden anschließend durch die Glycosyltransferase IroB zwei Zuckerreste übertragen, wie in *in vivo* (Bister *et al.*, 2004) und *in vitro* Studien (Fischbach *et al.*, 2005) nachgewiesen wurde. Der Exportmechanismus von Salmochelin S4 in das umgebende Medium wird von IroC katalysiert (Hantke *et al.*, 2003). Nach Komplexbildung mit  $\text{Fe}^{3+}$  wird dieser Komplex dann von IroN, dem äußeren Membranrezeptor, erkannt und gebunden (Hantke *et al.*, 2003). Im Periplasma wird der zyklische Tri-Ester, vermutlich von IroE, linearisiert (Lin *et al.*, 2005; Zhu, 2005; Zhu *et al.*, 2005). Der grundsätzliche Aufnahmemechanismus basiert auf dem ABC-Transporter FepBCDG wie auch für Enterobactin. Im Cytoplasma erfolgt vermutlich eine weitere Spaltung von Salmochelin durch IroD in seine Derivate (Dimer, Monomer), und damit erfolgt auch die Freisetzung des eingeführten Eisens (Zhu *et al.*, 2005). Die Abbauprodukte werden wieder sekretiert (Zhu, 2005).

## 1.5 Virulenz und wirtsspezifische Abwehr

Der Kampf um Eisen spielt eine herausragende Rolle in der Auseinandersetzung von Wirt und Bakterien. Derjenige, der den Chelatbildner mit höherer Bindungsstärke aufweist, trägt den großen Vorteil davon. So gehört das Schaffen eines Milieus, das nahezu frei von ungebundenem Eisen ist, zu den natürlichen Abwehrmechanismen höherer Organismen. Der menschliche Organismus reduziert die Serumeisenkonzentration gar aktiv, im Falle einer bakteriellen Infektion (Braun, 1991). Dies geschieht durch eine verminderte Resorption aus dem Darm, eine Erhöhung der Transferrinmenge, eine erhöhte Speicherung von Eisen in Ferritin und eine vermehrte Lactoferrinmenge an den Orten erhöhter Bakterienzahl. Die eisenbindenden Proteine mit hoher Bindungsstärke reduzieren freies Eisen und machen es für die Mikroorganismen nicht mehr bzw. schwer zugänglich. Lactoferrin in Milch, Tränen- und Speichelflüssigkeit ist ein Beispiel, ebenso wie Transferrin im Blutserum. Der menschliche Organismus produziert

des Weiteren ein Protein mit Namen Siderocalin, das in der Lage ist, Enterobactin zu binden und diese Eisenquelle für Bakterien zu blockieren.

Bakterien hingegen haben ihrerseits Strategien entwickelt, um diesen Mechanismen zu entgehen. Zu der Produktion verschiedener Siderophore und Aufnahmemechanismen (Braun, 2001) kommen strukturelle Veränderungen bereits vorhandener Siderophore wie die Glycosylierung von Enterobactin zu Salmochelin, das infolge dessen von Siderocalin nicht mehr gebunden werden kann (Valdebenito *et al.*, 2007; Strong, 2006). Andere pathogene Mikroorganismen betreiben Hämolyse, um an das Eisen im Hämoglobin der Erythrocyten zu gelangen oder besetzen intrazelluläre Nischen bzw. nutzen andere Eisenquellen des Wirtes (Wooldridge & Williams, 1993).

Es sind weitere Virulenzfaktoren bekannt, für die eine eisenregulierte Synthese gezeigt werden konnte. Zum einen das Tetanustoxin, das Hämolysin von *Clostridium perfringens* und *Listeria monocytogenes* und das Toxin A oder auch die alkalische Protease von *Pseudomonas aeruginosa*. Diese Toxine werden unter Eisenmangelbedingungen synthetisiert und können den Bakterien Zugang zu den intrazellulären Fe-Depots von Hämoglobin, Ferritin und Hämosiderin via Zellschädigung verschaffen (Braun, 1991).

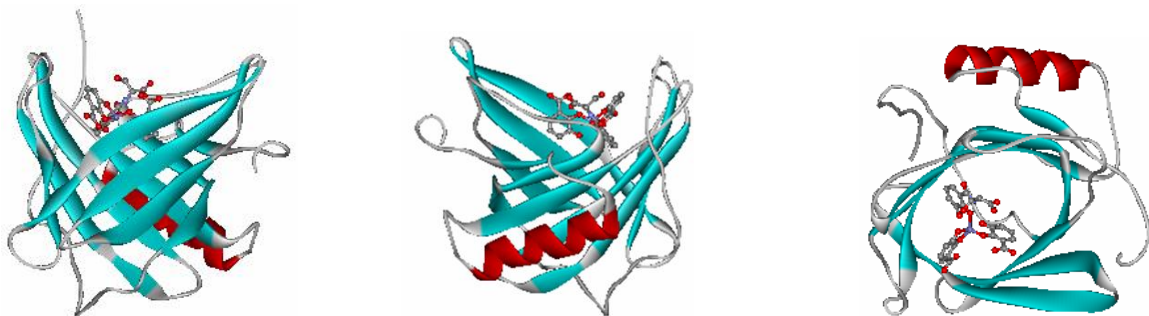
### 1.6 Das Protein Siderocalin: Struktur und Funktion

In der Literatur sind für Siderocalin verschiedene Namen und Homologe zu finden: *neutrophil-gelatinase-associated lipocalin* (NGAL), *neutrophil lipocalin* (HNL), *human superinducible protein 24 kD* (SIP24), Lipocalin 2 (Lcn2); bei der Ratte: *neu-related Lipocalin* (NRL) oder  *$\alpha_2$ -microglobulin related protein*; bei der Maus 24p3 oder Uterocalin (Kjeldsen *et al.*, 2000). Die Auswahl differiert, je nachdem welche Arbeitsgruppe, in welchem Kontext auf dieses Protein gestoßen ist. Es handelt sich hierbei um ein 25 kDa großes Protein der Familie der Lipocaline, zu der eine Reihe an kleinen sekretierten Proteinen gezählt wird, die bei Eukaryoten und zwischenzeitlich auch bei Bakterien nachgewiesen wurden. Charakteristisch ist hierbei deren Fähigkeit kleine hydrophobe Moleküle zu binden, die Bindung an spezifische Rezeptoren der Zelloberfläche und die Ausbildung makromolekularer Komplexe.

Humanes Siderocalin findet sich als Monomer, Dimer (Axelsson *et al.*, 1995), Trimer und als Komplex mit humaner neutrophiler Gelatinase (Kjeldsen *et al.*, 1993). Es wird während der frühen Phase von Entzündungsreaktionen in verschiedenen Geweben, die häufig Pathogenen exponiert sind, exkretiert. Es sind viele produzierende Zelltypen bekannt. Einige wichtige sind Endothel- (Liu & Nilsen-Hamilton, 1995) und Epithelzellen (Cowland *et al.*, 2003),

Hepatozyten, Makrophagen, aber auch Pneumozyten (Sunil *et al.*, 2007). Siderocalin ist Teil der angeborenen Immunantwort und seine Bildung wird durch bakterielle Infektionen induziert. Nachgewiesen wurde die Induktion beispielsweise durch LPS (Sunil *et al.*, 2007), IGF-1, IL6 und TNF- $\alpha$  (Liu *et al.*, 2003), aber auch Leptin (Shen *et al.*, 2006) und weitere Faktoren. Toll-like Rezeptoren auf Immunzellen stimulieren die Transkription, Translation und Sekretion von Siderocalin. Gespeichert und konstitutiv expremiert wird das Protein vorwiegend in sekundären Granula neutrophiler Granulozyten bis zu seiner Freisetzung (Axelsson *et al.*, 1995; Sev us *et al.*, 1997). Siderocalinmolek ule binden nach ihrer Exkretion effektiv vorhandenes Apo- und Ferri-Enterobactin und verhindern so den Zugang von potentiellen Pathogenen zu ihrer Eisenquelle bzw. ihren Eisenchelatoren (Goetz *et al.*, 2002) (Abbildung 1-3). Die Bindungsaffinität entspricht dabei nahezu der von FepA, dem regulären Enterobactinrezeptor der Bakterien. Der Siderocalin-Eisen-Enterobactin-Komplex kann von polarisierten Epithelzellen mittels des endocytischen Megalinrezeptors aufgenommen werden (Hvidberg *et al.*, 2005). Es kommt zu einer Wachstumsinhibition der bakteriellen Population. Siderocalin wirkt somit unter Eisenmangelbedingungen bakteriostatisch und unterstützt die weiteren antibakteriellen Maßnahmen des Wirtes (Goetz *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2003). In Experimenten mit Siderocalin Knock-out-Mäusen wurde gezeigt, dass diese zu 80 % von einer definierten Inokulationsmenge eines klinischen *E. coli* Stammes ( $2 \times 10^8$  CFU) getötet wurden, die den Wildtypmäusen keinen Schaden zugefügt hat (Flo *et al.*, 2004).

Inzwischen wurde für Siderocalin auch die Bindung weiterer hydrophober Eisen-Catecholat-Siderophore wie beispielsweise von Carboxymycobactin der Mycobakterien nachgewiesen (Holmes *et al.*, 2005) oder dem Bacillibactin der Bacilli-Spezies (Abergel *et al.*, 2006b).



**Abbildung 1-3: Siderocalin komplexiert mit Ferri-2,3-Dihydroxybenzoylserin (links und mittig: Ansicht von der Seite; rechts: Ansicht von oben) (Goetz *et al.*, 2002).**

### 1.7 Bakterielle Zell-Zell-Kommunikation: *Quorum sensing*

*Quorum sensing* bezeichnet die bakterielle Fähigkeit zur Kommunikation untereinander. Die Zellen einer Population können so Prozesse koordinieren, die Zelldichteabhängig sind und damit sowohl ihre Effizienz steigern, als auch angepasst reagieren. Davon beeinflusst sind beispielsweise die Biolumineszenz (Nealson & Hastings, 1979; Nealson & Markovitz, 1970; Nealson *et al.*, 1970), die Sekretion von Antibiotika, Pathogenitätsfaktoren oder Siderophoren, die Kompetenz, die Motilität oder die Ausbildung von Biofilmen (Miller & Bassler, 2001). Bakterien können auf diese Weise „sinnvoll“ auf Signale ihrer Umwelt reagieren und ihre Genexpression entsprechend anpassen. Die Kommunikation funktioniert dabei mit Hilfe von Signalmolekülen, so genannten Autoinduktoren bzw. *autoinducern* (AI), die hormonähnlich funktionieren. Überschreiten sie eine bestimmte Konzentrationsgrenze, reagieren die einzelnen Bakterien darauf. Der kritische intra- und extrazelluläre Schwellenwert liegt zwischen  $10^{-6}$  und  $10^{-9}$  M. Im Bakterium bindet der AI entweder direkt an den entsprechenden Regulator oder geht einen Umweg über ein Signalsystem, so dass infolge dessen die Zelldichteabhängigen Gene induziert oder reprimiert werden können. Bakterien nutzen verschiedene Signalmoleküle, die sich zum Teil nur in der Länge ihrer Seitenketten unterscheiden. Es sind vier Hauptgruppen bekannt: das LuxR/I-Typ System, das hauptsächlich von Gram-negativen Bakterien genutzt wird mit AI-1, dem Acyl-Homoserinlacton als Signalmolekül, das Peptidsignalsystem der Gram-positiven Bakterien mit modifizierten kurzen Peptiden als Pheromon, das *luxS*/AI-2-Signalmolekül, ein zyklischer Furanosyl-Borat-Diester, der zur Kommunikation zwischen den Bakterienarten dient und das AI-3- / Epinephrin- / Norepinephrinsystem mit noch nicht identifizierter Struktur, um zwischen den Arten und Reichen zu vermitteln (Reading & Sperandio, 2006).

### 1.8 Bakterielle Signaltransduktionswege

Die Signaltransduktion dient dem bakteriellen Organismus zur Reaktion auf äußere Reize, die umgewandelt und ins Zellinnere weitergeleitet werden. Zunächst erfolgt die Signalaufnahme durch verschiedene Rezeptortypen, bevor es zur Weiterleitung über Proteinnetzwerke bzw. Signalkaskaden wie beispielsweise Zweikomponentensensoren kommt, um die Transkription der aktuellen Situation entsprechend anzupassen. Zweikomponentensysteme sind für Bakterien die wichtigsten Systeme, um Umweltreize zu registrieren und zu verarbeiten. Allein in *E. coli* findet man über 30 verschiedene.

### 1.8.1 Zweikomponenten-Histidinkinasesysteme

Das Zweikomponentensystem ist eine Form der Signalweiterleitung in der Zelle, das den Bakterien eine Anpassung an verschiedene Stimuli ihrer Umgebung erlaubt. Es besteht aus zwei Proteinkomponenten, in der Regel aus einem Transmembranmolekül, das als Sensor funktioniert und einem zytoplasmatischen Protein, das als Regulationsprotein bzw. Antwortregulator dient. Der Sensor ist seiner Funktion nach eine Histidinkinase, die ein Homodimer mit drei funktionellen Domänen ausbildet: die Sensor-, Phosphotransfer- und ATP-Bindedomäne. Die Kinase reagiert auf ein Signal im periplasmatischen Raum mit Hydrolyse von ATP zu ADP und Autophosphorylierung von Histidin (Hakenbeck & Stock, 1996). Das phosphorylierte Histidin hat ein hohes Phosphorylgruppenübertragungspotential, so dass es in einem nächsten Schritt leicht zum Phosphotransfer auf ein spezifisches Aspartat in der Phosphoakzeptordomäne des Regulatorproteins kommt (Parkinson, 1993). Dieses Protein trägt noch eine weitere Domäne: die Regulatordomäne. Durch Konformationsänderung, bedingt durch die Phosphorylierung, wird das aktive Zentrum des Regulatorproteins frei, so dass es schließlich zur Bindung an den Zielpromotor kommt und die Transkription der Zielgene geändert werden kann.

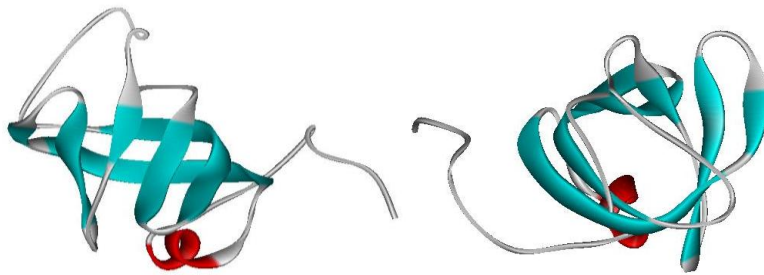
### 1.8.2 Das System QseBC

Die Proteine QseB und QseC bilden ein funktionelles Zweikomponenten-Histidinkinasesystem. Erstmals beschrieben wurde es in enterohämorrhagischen *E. coli* Stämmen (EHEC), inzwischen wurde es in zahlreichen Pathogenen nachgewiesen, aber beispielsweise auch in kommensalen *E. coli* Stämmen und anderen harmlosen Bewohnern des Gastrointestinaltraktes. QseC entspricht der Sensorkinase und QseB dem entsprechenden Response-Regulator. Die Histidinkinase QseC reagiert als Sensor für drei nachgewiesene Reizmoleküle: AI-3, das prokaryontische *Quorum sensing* Pheromon und Adrenalin sowie Noradrenalin als eukaryontische Wirtshormone. Als Reaktion auf den Reiz von außen wird QseC autophosphoryliert und überträgt den Phosphatrest autokatalytisch auf den Aspartatrest von QseB. QseB aktiviert mehrere Gene von einigen virulenzrelevanten bzw. direkten Virulenzfaktoren wie Shiga-Toxin, Stx1 und Stx2 und das Eae Protein (Intimin) (Dowd, 2007). Es bindet als Folge seiner Phosphorylierung beispielsweise an den Promotor von *flhDC*, der die Flagellensynthese aktiviert. Es aktiviert Gene, welche die Motilität betreffen und bindet schließlich auch an seinen eigenen Promotor, mit dem Ergebnis einer positiven Autoregulation der eigenen Transkription. Insgesamt betrachtet kann QseC als Virulenzregulator bezeichnet werden, der eine Rolle in der bakteriellen Pathogenese durch Regulation verschiedener Virulenzgene spielt. Aufgrund dessen

wird es als potentiell *drug target* angesehen, das in vielen Gram-negativen, pathogenen Bakterien zu finden ist, im Wirt hingegen nicht. Über erste positive Forschungsergebnisse wurde berichtet (Rasko *et al.*, 2008).

### 1.8.3 Das Protein YgiW

YgiW ist ein konserviertes Protein weitgehend unbekannter Funktion von 130 Aminosäuren, einem Molekulargewicht von 14 kDa und einem theoretisch ermittelten isoelektrischen Punkt von pI 5,08. Es wird von *E. coli* produziert und in den periplasmatischen Raum sezerniert. Das entsprechende codierende Gen liegt in unmittelbarer Nachbarschaft, aber in entgegengesetzter Richtung zum *qseBC*-Operon an der Position 3.157.898 bis 3.177.106 bp (*E. coli* K-12 MG1655). Seine Sekundärstruktur ist der Abbildung 1-4 zu entnehmen.



**Abbildung 1-4: YgiW (links: Ansicht von der Seite, rechts: Ansicht von oben).** (Basierend auf Daten der RCSB Protein Data Bank: PDI-ID: 1NNX, Lehmann, C., Galkin, A., Pullalarevu, S., Sarikaya, E., Krajewski, W., Lim, K., Howard, A., Herzberg, O. Structure of the hypothetical protein ygiW from *E. coli*. Unveröffentlicht. Bearbeitet mit PyMOL von Prof. Dr. Hantke (Lehmann C. *et al.*, 2004)).

Die Position des Gens in direkter Nachbarschaft zu *qseBC* und die Tatsache, dass sowohl YgiW, als auch QseBC konservierte Proteine in verschiedenen Gram-negativen Bakterien sind, lassen einen potentiellen Zusammenhang in ihrer Funktion vermuten bzw. eine mögliche Beteiligung des Proteins am Informationstransfer oder eine Rolle bei der Signalübertragung. Zusätzlich wurde ein YgiW-Homolog in Shiga-Toxin codierenden Phagen entdeckt, was weitere Fragen diesbezüglich aufwirft.

### 1.8.4 Die Wirtshormone Adrenalin und Noradrenalin

Adrenalin und Noradrenalin bzw. Epinephrin und Norepinephrin sind ihrer Struktur nach Catecholamine (Abbildung 1-5) und funktionieren im menschlichen Körper, dem Wirt vieler Mikroorganismen, als Neurotransmitter und Hormone. Gebildet werden sie aus Tyrosin über



DOPA, Dopamin und Adrenalin schließlich aus Noradrenalin in chromaffinem Gewebe, dem Nebennierenmark und den Paraganglien des Sympathikus. Noradrenalin unterscheidet sich von Adrenalin in seiner Struktur durch das Fehlen einer Methylgruppe an der Aminogruppe und physiologisch durch z. T. schwächere, aber teilweise auch gegensätzliche Wirkungen. Als so genanntes Stresshormon bedingt Adrenalin u. a. eine Steigerung von Herzfrequenz, während Noradrenalin die Pulsfrequenz senkt. Beide steigern den Blutdruck und erweitern die Bronchien, vermindern die Darmperistaltik und bewirken eine Grundumsatzsteigerung durch Förderung des Sauerstoffverbrauchs. Ihre Wirkungen vermitteln sie über adrenerge Rezeptoren des sympathischen Systems. Sie weisen beide eine Catecholstruktur auf wie Enterobactin oder Salmochelin auch. Außerdem haben Clarke *et al.* (Clarke *et al.*, 2006) gezeigt, dass das bakterielle Zweikomponentensystem QseBC als adrenerger Rezeptor fungiert und beide Hormone als Signalmoleküle erkennt, so dass weitere Untersuchungen bezüglich deren Rolle und Funktion in Bakterien durchgeführt wurden.

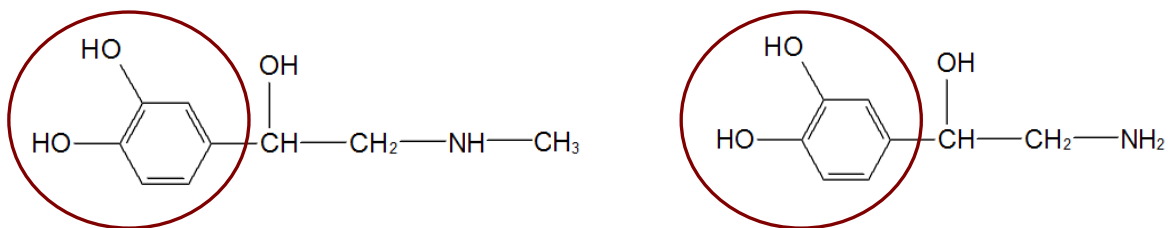


Abbildung 1-5: Darstellung der Strukturformeln von Adrenalin / Epinephrin (links) und Noradrenalin / Norepinephrin (rechts), beides Catecholamine (erstellt mit: Formeleditor). Die Catecholstruktur ist rot markiert.

## 1.9 Ziele der vorliegenden Arbeit

Die Interaktion des Säugerproteins Siderocalin mit Enterobactin ist zwischenzeitlich gut untersucht. Bei dem strukturähnlichen, aber hydrophileren Siderophor Salmochelin S4 hingegen war unklar, ob es von Siderocalin gebunden werden kann, oder ob die zwei Zuckerreste eine Bindung in der tassenartigen Struktur verhindern. Auch die Frage, ob Nicht-Catecholsiderophore wie Yersiniabactin gebunden werden, war nicht geklärt. Eine weitere interessante Frage war, ob die wirtseigenen Hormone wie Adrenalin oder Noradrenalin, die strukturelle Ähnlichkeit mit Catechol-Siderophoren aufweisen, von Siderocalin gebunden werden. Es besteht die Möglichkeit, dass relativ labile, aus drei Catecholmonomeren gebildete Eisenkomplexe durch eine Bindung an Siderocalin stabilisiert werden.

In einem zweiten Teil der Arbeit sollte die Funktion des Zweikomponentensystems QseBC untersucht werden. In pathogenen Bakterien soll dieses Regulationssystem die Hormone des Wirtes, Adrenalin und Noradrenalin, sowie ein noch unbekanntes *Quorum sensing*-Signal von Bakterien erkennen. Die Funktion von QseBC in Kommensalen ist noch unbekannt. Dazu sollte der Einfluss von Deletionen in den Genen *qseBC* und *ygiW* auf die eisenregulierten Systeme Fes, FepA und IroN untersucht werden. Die Analysen sollten außerdem den Einfluss dieser Mutationen auf die Enterobactinproduktion, die Motilität und die Biofilmbildung näher beleuchten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Verwendete Geräte, ihre Typbezeichnung und Herkunft sind den folgenden Auflistungen zu entnehmen.

Gerät	Typ und Herkunft
BBL GasPak™ System	Gefäß zur Anaerobieranzucht 100, Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, D.)
Fermenter	Biostat E (10 l Arbeitsvolumen), Blattrührfermenter, B. Braun Biotech International GmbH (Melsungen, D.); Giovanola b20 (20 l Arbeitsvolumen), Schlaufenreaktor, Umwerfffermenter, Giovanola AG für Verfahrenstechnik, Giovanola Fères (Monthey, Schweiz)
French Press, Zelle	French® Pressure Cell Press, Cell Type 40 K, 20 K, Mini Cell, French Pressure Cell Thermo Spectronic, FA-031 (klein), 4-339 (groß) SLM-Aminco® Spectronic Instruments Inc. (Rochester, NY, USA und Maryland, Silver Spring, USA)
HPLC	<p>analytisch: analytische HPLC (Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, D.):            Shimadzu Liquid Chromatograph LC-10 AT            Systemkontrolle: System Controller SCL-10 A            Detektor: UV-VIS Spectrophotometric Detector SPD-10 AV            Fluorescence Detector RF-10 A<sub>XL</sub>            Pumpen: LC-10 AT            Injektor: Auto Injektor SIL-10 A<sub>XL</sub></p> <p>präparativ: präparative HPLC (Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, D.):            Shimadzu preparative Liquid Chromatograph LC-8 A            Systemkontrolle: System Controller SCL-6 B            Detektor: UV-VIS Spectrophotometric Detector SPD-6 AV            Pumpen: LC-8A            Injektor: manuelle Injektion            Kollektor: Fraktionierer Pharmacia Biotech fraction collector Frac-100 (Uppsala, Schweden), GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg, D.)</p>
Säulen und Säulenmaterial:	<p>Säule: ReproSil-Pur C18 (Ultrapure HPLC-Phases), 5 µm, 250 x 4 mm (reversed phase column) (analytisch) mit Vorsäulen: ReproSil-Pur ODS-3,5 µm, 10 x 4mm;            Säule: Nucleosil 100 C18, 7 µm, 250 x 20 mm (reversed phase column) (präparativ)            Alle von Dr. Maisch GmbH (Ammerbuch, D.)</p>
Spectro-Photometer	Novaspec II (Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg, D.), GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg, D.)
Thermocycler	TPersonalCycler P, Biometra GmbH (Göttingen, D.)

## 2 Material und Methoden

Ultraschall-Kompaktgerät	Entgasungsanlage (Fließmittel HPLC), Branson Bransonic 8200, G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik (Schwäbisch Gmünd, D.)
UV-Gerät	Mighty Bright, Hoefer Scientific Instruments (San Francisco, USA), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, D.)
Wasserreinigungsanlage	TKA-GenPure Reinstwassersystem, Water purification systems, TKA GmbH Wasseraufbereitungssysteme (Niederelbert, D.); Millipore GmbH (Schwalbach, D.)

Nicht Aufgeführtes stammt von diversen Anbietern für Laborzubehör.

### 2.1.2 Verbrauchs- und Kleinmaterialien

Verwendete Verbrauchs- und Kleinmaterialien, ihre Typbezeichnung und Herkunft sind der folgenden Auflistung zu entnehmen.

Bezeichnung	Typ und Herkunft
Dialysier-Schlauchmembran / -halter	ZelluTrans aus regenerierter Cellulose, 3,5, 19 mm Breite, MWCo: 4.000-6.000, Wandstärke 25 µm, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D.)
GSTrap Säule	1 ml, 5 ml, Glutathione Sepharose™, Amersham Biosciences, GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg, D.)
HiTrap Desalting Säule	5 ml, Amersham Biosciences, GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg, D.)
Zellkultur Multiwell Platten	Cellstar®, Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, D.); Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D.)
Zentrifugationsfilter-Röhrchen	Centriprep®, Ultracel YM-10/30 Membran (10.000/30.000 Nominal Molecular Weight Limit), Amicon® Bioseparations, Millipore Corporation (Billerica, MA, USA), Millipore GmbH (Schwalbach, D.)

Nicht Aufgeführtes stammt von diversen Anbietern für Laborzubehör.

### 2.1.3 Chemikalien

Standardchemikalien analytischen Reinheitsgrades wurden von Applichem (Darmstadt, D.), Boehringer Mannheim bzw. Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D.), Difco Laboratories (Detroit, MI, USA), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, D.), Merck KGaA (Darmstadt, D.), Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D.), Sarstedt AG (Nümbrecht, D.), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, D.) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D.) (mit Riedel-de-Haën AG (Seelze, D.) und Fluka AG (Buchs, Schweiz)) bezogen. Spezielle Chemi-

kalien für verschiedene Experimente werden nachfolgend unter Angabe ihrer Bezugsquelle aufgeführt.

<b>Chemikalie</b>	<b>Typ und Herkunft</b>
2,3-Dihydroxybenzoic acid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D.)
2,3-Dihydroxybenzoylserin	EMC microcollections GmbH (Tübingen, D.)
Acetonitril	J.T. Baker, Mallinckrodt Baker B.V. (Deventer, Niederlande)
Adrenalin / (-)-Epinephrine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D.)
Bio-Gel <sup>®</sup> P-2 Polyacrylamide Gel	Bio-Rad Laboratories (München, D.)
Desferal <sup>®</sup> , Desferrioxamin B, Deferoxamine mesylate salt	Novartis Pharma (Basel, Schweiz), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D.)
EDDHA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D.)
Enterobactin	EMC microcollections GmbH (Tübingen, D.)
FBS	Gibco BRL, Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D.)
Hydroxyalkoxypropyl-Dextran Type VI (Lipidex)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D.)
L-Glutathion reduziert	Fluka AG (Buchs, Schweiz) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D.))
MacConkey-Agar	Difco Laboratories (Detroit, MI, USA), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, D.)
Noradrenalin / DL-Norepinephrine hydrochloride	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D.)
RPMI 1640 + L-Glutamin	Gibco BRL, Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D.)
Transferrin (T.; Holo-T., Apo-T.)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D.)
Trifluoressigsäure	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, D.), Merck KGaA (Darmstadt, D.)
X-Gal	Genaxxon BioScience GmbH (Ulm, D.)

### 2.1.4 Elektrophoresemarker

<b>Marker</b>	<b>Eigenschaften und Herkunft</b>
1 kb DNA Ladder	0,5-10 kb, New England BioLabs GmbH (Frankfurt a. M., D.)
DNA Ladder	1 kb Größenstandard Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D.)
GeneRuler <sup>™</sup> 1 kb DNA Leiter	0,25-10 kb, Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, D.)
PageRuler <sup>™</sup> Prestained Protein Ladder Plus	10-250 kDa, Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, D.)
Prestained Protein Ladder	11-170 kDa, Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, D.)
Roti <sup>®</sup> -Mark Prestained	17-245 kDa, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D.)
Unstained Protein Molecular Weight Marker	14,4-116 kDa, Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, D.)

### 2.1.5 Enzyme

Enzyme analytischen Reinheitsgrades wurden von New England BioLabs GmbH (Frankfurt a. M., D.), Boehringer Mannheim bzw. Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D.), Merck KGaA (Darmstadt, D.), Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D.), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, D.) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D.) (mit Riedel-de-Haën AG (Seelze, D.) und Fluka AG (Buchs, Schweiz)) bezogen. Weitere Bezugsquellen werden neben dem entsprechenden Stoff aufgeführt.

Für Reaktionen mit diesen Enzymen wurden die vom entsprechenden Hersteller empfohlenen Puffer bzw. Protokolle eingesetzt und eingehalten.

<b>Enzym</b>	<b>Herkunft</b>
DNA Polymerase	New England BioLabs GmbH (Frankfurt a. M., D.)
DNase I	Genaxxon BioScience GmbH (Ulm, D.)
FastStart Taq DNA Polymerase	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D.)
High Fidelity	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D.)
Lysozym	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D.)
Proteinase K	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D.)
Pwo SuperYield DNA Polymerase + dNTPack (10mM)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D.)
Restriktionsendonucleasen	New England BioLabs GmbH (Frankfurt a. M., D.), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D.), Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, D.)
T4 DNA Ligase	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D.)
Taq DNA Polymerase	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, D.), peqlab Biotechnology GmbH (Erlangen, D.)

### 2.1.6 Ready-to-use Kits

Bezugsquellen verwendeter Kits sind nachfolgend aufgeführt.

<b>Kit</b>	<b>Herkunft</b>
Anaerocult <sup>®</sup> P und A und Anaeroclip	Anaerobier Kit, Merck KGaA (Darmstadt, D.)
BCA <sup>™</sup> Protein Assay Kit	Pierce (Rockford, IL, USA), Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
Easy-DNA Extraction Kit	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D.)
Expand High Fidelity PCR-Kit	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D.)
Ni-NTA Purification Kit	His-Tag-Aufreinigung, Qiagen GmbH (Hilden, D.)
Nucleobond <sup>®</sup> Xtra Midi	Macherey-Nagel GmbH (Düren, D.)

NucleoSpin® Extract II Kit	PCR clean-up Gel extraction, Macherey-Nagel GmbH (Düren, D.)
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, D.)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH (Hilden, D.)
Thrombin Cleavage Capture Kit	Novagen®, WI, USA, Merck KGaA (Darmstadt, D.)

### 2.1.7 Nähr- und Kulturmedien

Nähr- und Kulturmedien wurden mit deionisiertem Wasser (VE-H<sub>2</sub>O) angesetzt und sofern nicht anders gekennzeichnet, durch Autoklavieren sterilisiert. Verwendete Chemikalien entsprechen p. a. Qualität.

Medium	Zusammensetzung				
M63 Minimal-Medium	pH 5,6	pH 7,0	pH 7,4	pH 7,6	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	12,9 g	5,3 g	2,6 g	1,8 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *3H <sub>2</sub> O	1,1 g	3,9 g	18,5 g	19,8 g
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g	2 g	2 g	2 g
	autoklavieren				
	1 M MgSO <sub>4</sub>	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
	0,1 M CaCl <sub>2</sub>	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
	eventuell mit C-Quelle:				
	60 % Glycerol	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
	eventuell mit Eisenzusatz				
VE-H <sub>2</sub> O	<i>ad 1 l</i>	<i>ad 1 l</i>	<i>ad 1 l</i>	<i>ad 1 l</i>	
MacConkey-Laktose	MacConkey Agarbase	40 g			
	Laktose	10 g			
	VE-H <sub>2</sub> O	<i>ad 1 l</i>			
NB	Nutrient Broth	8 g			
	NaCl	5 g			
	VE-H <sub>2</sub> O	<i>ad 1 l</i>			
NBD	Nutrient Broth	8 g			
	NaCl	5 g			
	VE-H <sub>2</sub> O	<i>ad 1 l</i>			
	autoklavieren				
Schwärm- / Motility-Medium	Dipyridyl	0,2 mM			
	Trypton	10 g			
	NaCl	2,5 g			
VE-H <sub>2</sub> O	<i>ad 1 l</i>				

## 2 Material und Methoden

SOC	Trypton	2 g
	Hefe Extrakt	0,5 g
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	VE-H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 100 ml
	autoklavieren	
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
	MgSO <sub>4</sub>	10 mM
	Glucose	20 mM
	pH 7	
TA	Trypton	8 g
	NaCl	5 g
	VE-H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 1 l
	autoklavieren	
	Dipyridyl	0,2 mM
	EDDHA	5 mM
TY	Bacto Trypton	8 g
	Hefe Extrakt	5 g
	NaCl	5 g
	VE-H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 1 l
$\lambda$ -Phagen-Medium	Trypton	10 g
	NaCl	2,5 g
	VE-H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 1 l

### 2.1.8 Medienzusätze

Je nach Versuchsansatz wurden den verwendeten Medien weitere Bestandteile zugefügt. Für Festmedien / Platten Agar, zur Selektion Antibiotika, X-Gal etc. sowie weiteres Spezifisches, je nach Versuchsansatz. Die Zugaben und deren Arbeitskonzentrationen usw. sind nachfolgend aufgelistet.

#### Agar

Agar-Agar Kobe I wurde je nach Einsatz in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt.

Verwendung	Konzentration
Platten	15 g/l
Schwärm- / <i>Motility</i> -Agar	3 g/l
TA-Agar	5 g/l
Topagar	6 g/l
$\lambda$ -Agar	10 g/l



### Antibiotika

Durch Zugabe eines Antibiotikums zu Kulturmedien, wurde ein Selektionsdruck geschaffen, der zur selektiven Bakterienanzucht genutzt wurde. Das Antibiotikum wurde jeweils nach Sterilfiltration und Abkühlen des Nährmediums auf unter 50°C diesem zugegeben. Für diese Arbeit verwendete Antibiotika und deren Einsatz sind nachfolgend aufgeführt.

Antibiotikum	Stammlösung	Arbeitskonzentration	Lösungsmittel
Ampicillin ( $\beta$ -Lactame)	5 mg/ml	50 $\mu$ g/ml	VE-H <sub>2</sub> O
Chloramphenicol (Benzolderivat)	40 mg/ml	40 $\mu$ g/ml	70 % Ethanol
Kanamycin (Aminoglycosid)	50 mg/ml	50 $\mu$ g/ml	VE-H <sub>2</sub> O
Neomycin (Aminoglycosid)	5 mg/ml	50 $\mu$ g/ml	VE-H <sub>2</sub> O
Tetracyclin (Tetracyclin)	12,5 mg/ml	15 $\mu$ g/ml	70 % Ethanol

### Sonstiges

Weitere Zusätze und deren Einsatz sind nachfolgend aufgeführt.

Zusatz	Stammlösung / Arbeitskonzentration
Desferal <sup>®</sup>	10 mM / 1 mM, 10 $\mu$ M oder 50 $\mu$ M
DHB	10 mM / 100 $\mu$ M
Dipyridyl	100 mM / 150 $\mu$ M oder 200 $\mu$ M
EDDHA	5 mM / 150 $\mu$ M
FeSO <sub>4</sub>	40 $\mu$ M / 0,2 mM
Glucose	40 % / 0,1 % oder 0,2 %
Glycerol	60 % / 0,6 %
IPTG	100 mM / 0,3 mM
X-Gal	20 mg/ml in N-N-Dimethylformamid / 0,2 mg/ml

### 2.1.9 Lösungen und Puffer

In dieser Arbeit verwendete Lösungen und Puffer, deren Zusammensetzung und die Art der Anwendung sind nachfolgend, sortiert nach Verwendung, aufgeführt. Lösungen und Puffer wurden mit deionisiertem Wasser (VE-H<sub>2</sub>O) oder Reinstwasser angesetzt und sofern nicht anders gekennzeichnet, durch Autoklavieren sterilisiert. Verwendete Chemikalien entsprechen p. a. Qualität.

## 2 Material und Methoden

Verwendung / Bezeichnung	Stammlösung	Zusammensetzung	
<b>Agarose-Gelelektrophorese</b>			
Agarosegel	0,8 %	Agarose TAE-Puffer	0,4 g 50 ml
Höher- bzw. niedriger-prozentige Gele wurden in ihrem Agarosegehalt entsprechend angepasst.			
Ethidiumbromid-Färbegrad		10 mg/ml Ethidiumbromid TAE-Puffer	100 µl 500 ml
Gelladepuffer	10-fach	Bromphenolblau gelöst in 150 mM Tris pH 7,6 Glycerol VE-H <sub>2</sub> O	250 mg 33 ml 60 ml <i>ad</i> 100 ml
Stoppmix	10-fach	Ficoll EDTA pH 8 SDS Bromphenolblau VE-H <sub>2</sub> O	20 % 0,1 M 1 % 0,25/0,5 % <i>ad</i> 100 ml
TAE-Puffer	50-fach	Tris Essigsäure 0,5 M EDTA pH 8,0 VE-H <sub>2</sub> O	121 g 28,55 ml 50 ml <i>ad</i> 500 ml
<b>SDS-PAGE</b>			
Elektrophorese-Laufpuffer	10-fach	Glycin SDS Tris VE-H <sub>2</sub> O	144 g 10 g 30 g <i>ad</i> 1 l
Entfärbelösung		Essigsäure Ethanol VE-H <sub>2</sub> O	75 ml 50 ml 875 ml
Färbelösung		Ethanol Essigsäure Coomassie Brillant Blue R-250 VE-H <sub>2</sub> O	450 ml 100 ml  2,5 g 450 ml
Sammelgel	4,2 %	Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30 VE-H <sub>2</sub> O Sammelgelpuffer (0,25 M Tris/HCl, pH 6,8) 10 % SDS 100 mg/ml APS TEMED	1,72 ml 4 ml  6,3 ml 120 µl 80 µl 30 µl

SDS-Probenauftragspuffer	2-fach	Tris/HCl pH 6,8	100 mM
		SDS	4 %
		Glycerol	20 %
		Bromphenolblau	0,02 %
		β-Mercaptoethanol	10 %
		VE-H <sub>2</sub> O	
Trenngel	11 %	Rotiphorese® Gel 30	7,3 ml
		VE-H <sub>2</sub> O	7 ml
		Trenngelpuffer (1,5 M	
		Tris/HCl, pH 8,8)	5 ml
		10 % SDS	400 µl
		100 mg/ml APS	100 µl
		TEMED	50 µl

### Lösungen für Arbeiten mit Phagen

P1-Phage: Adsorptionpuffer	MgSO <sub>4</sub>	0,1 M
	CaCl <sub>2</sub>	0,005 M
	VE-H <sub>2</sub> O	
λ-Phage: λ-dil (TMG Puffer)	Tris base	1,21 g
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,2 g
	Gelatine	0,1 g
	VE-H <sub>2</sub> O	ad 1 l
	mit HCL pH auf 7,4 einstellen	

### Proteinaufreinigung

Elutionspuffer (GST-Tag)	Glutathion TSED	5 mM	
Elutionspuffer (His-Tag)	Imidazol	200 mM	
	Complete, EDTA-free Puffer A	1 Tabl./50 ml	
Frenchpresspuffer (GST-Tag)	Lysozym	0,3 mg/ml	
	DNase	0,05 mg/ml	
	PBS		
Frenchpresspuffer (His-Tag)	Dnase	0,05 mg/ml	
	Complete, EDTA-free	1 Tabl./50 ml	
	Puffer A		
Ni-NTA-Spin-Säule (His-Tag)	Nickel-Chelat- Agarose-Suspension, Qiagen GmbH (Hil- den, D.)		
PBS (GST-Tag)	10-fach	NaCl	80 g
		KCl	2 g
		Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	7,6 g
		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
		VE-H <sub>2</sub> O	ad 1 l

## 2 Material und Methoden

Puffer A (His-Tag)	K-Phosphatpuffer	20 mM
	MgCl <sub>2</sub>	0,5 mM
	NaCl	150 mM
	Mercaptoethanol	2 mM
	VE-H <sub>2</sub> O	
TSED Waschpuffer (GST-Tag)	Tris/HCl	50 mM
	NaCl	100 mM
	EDTA	1 mM
	DTT	1 mM
	VE-H <sub>2</sub> O	
		pH 8
Waschpuffer (His-Tag)	Imidazol	20 mM
	Complete, EDTA-free	1 Tabl./50 ml
	Puffer A	

### β-Galaktosidase-Assay

β-Galaktosidase-Puffer	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	1,07 g
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	0,55 g
	Reinstwasser autoklavieren	ad 100 µl
	1 M MgSO <sub>4</sub>	100 µl
	DTT	5 mM
ONPG-Lösung	ONPG in β-Galaktosidase- Puffer	5 mg/ml

### Herstellung kompetenter Zellen und Transformation

Chemisch		CaCl <sub>2</sub>	
Elektroporation	GYT	Glycerol	10 %
		Hefe Extrakt	0,125 %
		Trypton	0,25 %
		VE-H <sub>2</sub> O	
SOC	SOC	Trypton	2 %
		Hefe Extrakt	0,5 %
		NaCl	10 mM
		MgSO <sub>4</sub>	10 mM
		MgCl <sub>2</sub>	10 mM
		VE-H <sub>2</sub> O	

### Glycerolkultur

		TY	1 ml
		60 % Glycerollösung	500 µl

**HPLC**

Fließmittel 1	Acetonitril	6 %
	TFA	0,1 %
	Reinstwasser	
Fließmittel 2	Acetonitril	
	TFA	0,1 %

Vor Verwendung wurden die Fließmittel vollständig entgast.

**Arnou-Test**

Arnou-Reagenz	Natriumnitrit	NaNO <sub>2</sub>	10 g
	Natriummolybdat	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	10 g
		Reinstwasser	ad 50 ml
HCl		6 M	
NaOH		6 M	

**2.1.10 Bakterienstämme und Phagen**

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Phagen, jeweils mit ihrer Charakteristik und Quellenangabe, sind nachfolgend aufgeführt.

Stamm / [Nr.]	Elter	Genotyp / relevante Eigenschaften	Referenz
<b>Bakterienstämme</b>			
<i>E. coli</i> A0 34/86 [5741]		kommensaler <i>E. coli</i> , Colinfant, O83 : K24 : H31, Einsatz als Probiotikum	Dobrindt, U. (2005)
<i>E. coli</i> ABU 83972 [5814]		apathogener Bakteriurie Stamm, produziert Enterobactin, Aerobactin und Yersiniabactin, <i>iut</i> <sup>+</sup> , <i>iro</i> <sup>+</sup> , <i>sitABCD</i> <sup>+</sup> , <i>chuA</i> <sup>+</sup>	Dobrindt, U. (2006)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) [2173]		Expressionsstamm mit T7 RNA-Polymerase unter <i>lac</i> -Kontrolle, F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	Studier & Moffatt (1986)
<i>E. coli</i> mpk 2 [5916]		<i>met</i> , langes LPS (glatt)	Frick (2007)
<i>E. coli</i> Nissle 1917 [5603]		Mutaflor®; Einsatz als Probiotikum; Produktion der Siderophore Enterobactin, Salmochelin, Aerobactin und Yersiniabactin	Dobrindt, U. (2003)
<i>E. coli</i> UTI [5684]		UTI; ähnlich <i>E. coli</i> Nissle 1917	Dobrindt, U. (2003)
<i>E. coli</i> UTI [5685]		UTI; ähnlich <i>E. coli</i> Nissle 1917	Dobrindt, U. (2003)
<i>Salmonella enterica</i> ssp. Typhimurium TA2167 [205]		<i>hisC3076 galE506</i>	Ames <i>et al.</i> (1974)
<i>Salmonella</i> r AIR 50 [5544]		Salmochelinproduktion ( <i>aroA</i> ::Tn10 revertiert) <i>iroD</i> ::kan	Bäumler (2002)
<b><i>E. coli</i> K-12 Stämme</b>			
81 Mutante	B14	Δ <i>ygiW</i> ::cat	dieses Institut
82 Mutante	AW405	Δ <i>ygiW</i> ::cat	dieses Institut

## 2 Material und Methoden

AB2847 [86]		<i>aroB, tsx, malT, thi</i>	Pittard & Wallace (1966)
AW405 [82]		Chemotaxis Teststamm, T5 sensitiv, $\Delta thr1(am)$ $\Delta ara-14 \Delta leuB6 \Delta lac-41 \Delta gal? \Delta his-4 \Delta rpsL136$ $\Delta xyl-1 \Delta metF159(am) \Delta mil-1 \Delta fhuA31? \Delta tsx-78$ $\Delta thi-1$	Adler, J. (1990)
B14 [81]		Chemotaxis Teststamm, $\Delta rpsL, \Delta fhuA$	Adler, J. (1990)
BW25113 [5863]		F- $\Delta(araD-araB)567, \Delta lacZ4787(::rrnB-3), \lambda, rph-1, \Delta(rhaD-rhaB)568, hsdR514$	Datsenko & Wanner (2000)
DH5 $\alpha$ [5074]		Allgemeiner Klonierungsstamm, F' endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG $\Phi 80dlacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K^- m_K^+), \lambda^-$	Hanahan, D. (1985)
H0456 [456]	AB2847	<i>aroB lac</i>	dieses Institut
H1443 [1443]	MC4100	<i>aroB, \Delta lac</i>	dieses Institut (1982)
H5687 [5687]	MC4100	<i>\Delta entC</i>	dieses Institut (2004)
H5711 [5711]	MG1655	<i>\Delta entF::kan</i>	dieses Institut (2005)
H5716 [5716]	H5711	<i>\Delta entF::kan</i>	dieses Institut (2005)
H5730 [5730]	H5716	<i>\Delta entF::kan</i>	dieses Institut (2005)
H5737 [5737]	BW25113	<i>\Delta ygiW::cat \Delta lac</i>	dieses Institut (2005)
H5738 [5738]	H5730	<i>\Delta entF \Delta ygiW::cat</i>	dieses Institut (2005)
H5751 [5751]	H5730	<i>\Delta entF \lambda piroN-lacZ</i>	dieses Institut (2005)
H5753 [5753]	H5738	<i>\Delta entF \Delta ygiW::cat \lambda piroN-lacZ</i>	dieses Institut (2005)
H5757 [5757]	H5751	<i>\lambda piroN-lacZ</i>	dieses Institut (2005)
H5780 [5780]	H5687	<i>\Delta entC \Delta qseC::kan</i>	dieses Institut (2005)
H5781 [5781]	H5687	<i>\Delta entC \Delta ygiW::cat</i>	dieses Institut (2005)
H5784 [5784]	H5781	<i>\Delta entC \Delta ygiW::cat \lambda piroN-lacZ</i>	dieses Institut (2005)
H5787 [5787]	H5687	<i>\Delta entC \Delta qseC::kan \lambda piroN-lacZ</i>	dieses Institut (2005)
H5820 [5820]	H5687	<i>\Delta entC \lambda piroN-lacZ</i>	dieses Institut (2006)
H5831 [5831]	MC4100	<i>\lambda piroN-lacZ</i>	dieses Institut (2006)
H5881 [5881]	JW2994	<i>\Delta qseC::kan \lambda pfes-lacZ</i>	diese Arbeit (2007)
H5882 [5882]	H5737	<i>\Delta ygiW::cat \Delta lac \lambda pfes-lacZ</i>	diese Arbeit (2007)
H5885 [5885]	BW25113	<i>\lambda pfes-lacZ</i>	diese Arbeit (2007)
H5886 [5886]	H5687	<i>\Delta entC \lambda pfes-lacZ</i>	diese Arbeit (2007)
H5905 [5905]	JW2994	<i>\Delta qseC::kan \lambda pfepA-lacZ</i>	diese Arbeit (2007)
H5906 [5906]	H5737	<i>\Delta ygiW::cat \Delta lac \lambda pfepA-lacZ</i>	diese Arbeit (2007)
H5907 [5907]	H5780	<i>\Delta entC \Delta qseC::kan \lambda pfepA-lacZ</i>	diese Arbeit (2007)
H5908 [5908]	H5781	<i>\Delta entC \Delta ygiW \lambda pfepA-lacZ</i>	diese Arbeit (2007)
H5909 [5909]	BW25113	<i>\lambda pfepA-lacZ</i>	diese Arbeit (2007)
H5910 [5910]	H5687	<i>\Delta entC \lambda pfepA-lacZ</i>	diese Arbeit (2007)
H5936 [5936]	CF1648; MG1655 Cashel, M.	<i>\Delta lacZ rrnB P1' kan \lambda piroN-lacZ</i>	diese Arbeit (2008)
H5937 [5937]	CF1651	<i>\Delta relA::kan \Delta lacZ rrnB P1' \lambda piroN-lacZ</i>	diese Arbeit (2008)
H5938 [5938]	CF1693	<i>\Delta relA::kan \Delta spoT::cat \Delta lacZ rrnB \lambda piroN-lacZ</i>	diese Arbeit (2008)
H5964 [5964]	WL311	<i>\Delta lacU169 \lambda piroN-lacZ</i>	diese Arbeit (2008)
H5965 [5965]	W3110	<i>\lambda piroN-lacZ</i>	diese Arbeit (2008)
H5972 [5972]	W3110	<i>\lambda pfepA-lacZ</i>	diese Arbeit (2008)
H5978 [5978]	BW25113	<i>\Delta qseB::kan</i>	Baba <i>et al.</i> (2006)
H5983 [5983]	H5796	<i>\Delta qseB \lambda pfepA-lacZ</i>	diese Arbeit (2008)
H5987 [5987]	H5978	<i>\Delta qseB \lambda pfepA-lacZ</i>	diese Arbeit (2008)
H5988 [5988]	MG1655	<i>\lambda pfepA-lacZ</i>	diese Arbeit (2008)
H5989 [5989]	MC4100	<i>\lambda pfepA-lacZ</i>	diese Arbeit (2008)
H5992 [5992]	H1443	<i>aroB, \Delta lac, \lambda pfes-lacZ</i>	diese Arbeit (2008)
H5993 [5993]	H1443	<i>aroB, \Delta lac, \lambda pfepA-lacZ</i>	diese Arbeit (2008)
H5994 [5994]	H1443	<i>aroB, \Delta lac, \lambda piroN-lacZ</i>	diese Arbeit (2008)

JW 2992-1 [5946]	BW25113	<i>ΔygiW::kan Δlac</i>	Baba <i>et al.</i> (2006)
JW2994 [5722]	BW25113	<i>qseC::kan</i>	Blattner, F. (2005)
MC4100 [443]		F- [ <i>araD139</i> ] <sub>B/r</sub> , <i>Δ(argF-lac)169, λ<sup>-</sup>, e14<sup>-</sup>, flhD5301, Δ(fruK-yeiR)725(fruA25), relA1, rpsL150(strR), rbsR22, Δ(fimB-fimE)632(::IS1), deoC1</i>	Casadaban, M. J. (1976)
MG1655 [5538]		F- <i>λ<sup>-</sup>, rph-1</i>	Guyer <i>et al.</i> (1981)
TOP 10 [10431]		F- <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZ ΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL endA1 λ<sup>-</sup></i>	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D.)
W3110 [16]		F- <i>λ<sup>-</sup>, IN(rrnD-rrnE)1, rph-1</i>	Bachmann, B. J. (1972)
WL311 [5454]	W3110	<i>ΔlacUI69</i>	Howard, P. (2000)
Wood [5796]	MG1655 Wood	<i>ΔqseB::kan</i>	Gonzalez Barrios <i>et al.</i> (2006)
<b>Phagen</b>			
P1vir		Zur Herstellung der P1-Lysate für P1-Transduktionen	dieses Institut
λRS45		<i>imm21 ind1 bla9-lacZSC 24</i> Herstellung von <i>lacZ</i> -Promotorfusionen	Simons <i>et al.</i> (1987)

### 2.1.11 Klonierungsvektoren, Plasmide und Plasmidkonstruktionen

Verwendete Plasmide und Konstrukte sowie deren Eigenschaften und Referenzen sind nachfolgend aufgeführt.

Plasmid	Eigenschaften	Quelle / Referenz
pBAD/His B Vector	<i>araBAD</i> Promotor, N-terminaler His-Tag, Arabinose Induktion, Amp <sup>r</sup> , MCS	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D.)
pBAD/Myc-His B C	<i>araBAD</i> Promotor, C-terminaler His-Tag, Arabinose Induktion, Amp <sup>r</sup> , MCS	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D.)
pGEX-4T-3	T7 Promotor, N-terminaler GST-Tag, IPTG-Induktion, Amp <sup>r</sup> , Thrombin Schnittstelle, MCS	Amersham Biosciences, GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg, D.)
pGEX-4T-3-NGAL	GST-NGAL-Fusion, Vektor pGEX-4T-3	Bundgaard <i>et al.</i> (1994)
pGP1-2	T7 RNA-Polymerase reguliert von <i>λcl857</i> , Neo <sup>r</sup>	Tabor & Richardson (1985)
pKHI18	<i>iroBCDEN</i> , Amp <sup>r</sup> , Vektor pWSK29	Zhu <i>et al.</i> (2005)
pKHI23	<i>iroDEN</i> , Amp <sup>r</sup> , Vektor pWSK29	Zhu <i>et al.</i> (2005)
pRS414	Klonierung von <i>lacZ</i> -Promotor-Fusionen, Amp <sup>r</sup>	Simons <i>et al.</i> (1987)

## 2 Material und Methoden

pRS415	Klonierung von <i>lacZ</i> -Promotor-Fusionen, Amp <sup>r</sup>	Simons <i>et al.</i> (1987)
pYH21	His-YgiW-Fusion, Vektor pBAD/His B	dieses Institut (2007)
pYH9	GST-YgiW-Fusion, Vektor pGEX-4T-3	dieses Institut (2007)

### 2.1.12 Synthetische Oligonukleotide (Primer) und Affinitätstags

Zum Zwecke der DNA-Sequenzierung und der -Amplifikation mittels PCR wurden nachfolgend aufgelistete Oligonukleotide der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, D.) eingesetzt. Deren Beschreibung sowie die Darstellung der Affinitätstags sind nachfolgend aufgeführt. Primer wurden immer in Konzentrationen von 100 pM/μl eingesetzt und aufbewahrt. Eingesetzt wurden die Primer zur Herstellung der Promotorfusionen und zur Überprüfung von Stämmen, Transduktionen und Klonierungen.

Primer	La- bor- Nr.	DNA-Sequenz in 5`-3`-Richtung	GC %
CygiW	143	ATT CCC GGG AAC GCG TCC CGG GAG CGG TAA CAA TTA CGG CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG	52,5
entC_BamHI	205	GGA GGA TCC CCT CCA CAA AAT GAT AAA GGC	50
ENTC_ECORI	203	GGA GAA TTC CCT CCA CAA AAT GAT AAA GGC	43,3
fepA_BamHI	207	GGA GGA TCC TGT TTT ATT CCT GCA TTT TTG CCA CG	45,7
FEPA_ECORI	201	GGA GAA TTC TGT TTT ATT CCT GCA TTT TTG CCA CG	40
FEPB_BAMHI	202	GGA GGA TCC GTC TCA CAA ATC AGC TTC CTG	53,3
fepB_EcoRI	204	GGA GAA TTC GTC TCA CAA ATC AGC TTC CTG	46,7
FES_BAMHI	200	CGA GGA TCC TTC GTC ATT CAG ACG CTG CC	58,6
fes_EcoRI	206	CGA GAA TTC TTC GTC ATT CAG ACG CTG CCA TTC C	50
FesBamHI	156	CCG GAT CCA ACA TTT CGT CAT TCA GAC GC	51,7
NEOFOR	197	AGA CAA TCG GCT GCT CTG AT	50
NGAL_BGL2	163	GCA GAG ATC TCA GGA CTC CAC CTC AGA CCT GAT CC	57,1
NGAL-EcoRI	164	CGG AAT TCT CAG CCG TCG ATA CAC TGG TCG ATT GGG	55,6
QseCEND	196	CTT TAT GCG GGA AAT GTT CG	45
ygiHind	195	GGA AGC TTA CGG ATT TAC TTT GCG GAT CTG	46,7
ygiV	144	AGC AAT TCA GGG CTA CAG CGG TG	56,5
ygiW_BamHI	170	GGT TCC GCG TGG ATC CGC AGA GCA GGG CGG TTT TTC TGG	64,1



YgiW_XhoI	169	GAG CTC GAG TCG ACT TAC GGA TTT ACT TTG CGG ATC	50
ygiW2xhoI	213	GAC TCG AGC GCA GAG CAG GGC GGT TTT TCT GG	62,5
ygiWHind4	226	GGA AGC TTG AGC GGT AAC AAT TAC GG	50
ygiWint	145	TAA GGC CCG TTT TGA TGC CGT CG	56,5
ygiWprombam	221	GAC AGG ATC CAG GGC CAT TAC TGC GAT TAC T	51,6
ygiWpromeco	222	GTG TGA ATT CTT GAT GCC GTC GCC AAT CAG C	51,6
YgiWxhoI	194	GAG AGC TCA GCA GAG CAG GGC GGT TTT TCT GG	59,4
ygiWXhoI3	225	AGT CTC GAG GGA GTA ATA AAC ATG AAA AAA TTC GC	37,1
ygiWXhoI4	227	GGT CTC GAG CGT TAA ATG CTC GGA AAC AG	51,7
ygiXint	146	AGG TCA CCA GTA ATG CCG TTG	52,4
ygiYint	147	TGC CCG GCA ACA ATC GCC AGC	66,7

Bezeichnung	Kennzeichen / Größe
+	
GST-Tag	Glutathion S-Transferase, Protein, ca. 23 kDa
His-Tag	Poly-His, HHHHHH, 2-10 (meist 6), 0,84 kDa

### 2.1.13 Hardware

Die Auswertung und Dokumentation von Daten und Ergebnissen erfolgte mit Windows PCs (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, D.) mit Intel Pentium III Prozessoren bzw. einem Intel(R) Core(TM)2 Duo CPU Prozessor (Intel GmbH Munich, Feldkirchen bei München, D.), dem Epson-Scanner Perfection 2400 Photo (Epson Deutschland GmbH, Meerbusch, D.), der Canon EOS 400D (Canon Deutschland GmbH, Krefeld, D.) und Pentax K-10 SLR-Digitalkamera (Pentax Europe GmbH, Hamburg, D.), dem Tintenstrahldrucker Canon Pixma iP 3300 (HPLC) (Canon Deutschland GmbH, Krefeld, D.), dem HP Laser Jet P2015dn (Imager) und dem Farblaserdrucker HP ColorJet 4650DN PS (Hewlett-Packard GmbH, Böblingen, D.).

### 2.1.14 Software und Datenquellen

Verwendete Computerprogramme und elektronische Informationsquellen werden nachfolgend aufgeführt.

## 2 Material und Methoden

Name	Hersteller / Information	Quelle / Referenz
Adobe Reader 9	Adobe Systems GmbH, München, D.	<a href="http://www.adobe.com/de/products/reader.html">http://www.adobe.com/de/products/reader.html</a>
BioCyc / EcoCyc	Pathway / Genome Databases, Menlo Park, CA, USA	<a href="http://biocyc.org/">http://biocyc.org/</a>
Canon Photo	Photo Programm, Amstelveen, Niederlande	<a href="http://de.software.canon-europe.com/">http://de.software.canon-europe.com/</a>
Clone Manager	Sci Ed Central, Cary, NC, USA	<a href="http://www.scied.com/index.htm">http://www.scied.com/index.htm</a>
EMBL-EBI	European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK	<a href="http://www.ebi.ac.uk/">http://www.ebi.ac.uk/</a>
EndNote X1	Literaturverwaltung, Carlsbad, CA, USA	<a href="http://www.endnote.com/enhome.asp">http://www.endnote.com/enhome.asp</a>
ENTREZ / Genbank	NCBI (National Center for Biotechnology Information), Daten- und Methodenzentrum, Literaturdatenbank, Bethesda, MD, USA	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/gquery">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/gquery</a>
Formeleditor	Strukturformelerstellung, Herausgeber: SimpleSoft, Buchholz Wengst GbR	<a href="http://www.strukturformeleditor.de/">http://www.strukturformeleditor.de/</a>
GenomeNet	Bioinformatics Center, Institute for Chemical Research, Kyoto University, Kyoto, Japan	<a href="http://www.genome.jp/">http://www.genome.jp/</a>
IrfanView 4.10	Grafik Programm, Wiener Neustadt, Österreich	<a href="http://www.irfanview.de/">http://www.irfanview.de/</a>
JMP <sup>®</sup> 7.0/8.0	Statistik Programm, SAS Campus Drive, Cary, NC, USA	<a href="http://www.jmp.com/">http://www.jmp.com/</a>
Kodak	Geldokumentation, Molecular Imaging Systems, Rochester, New York, USA	<a href="http://www.kodak.com/eknec/PageQuerier.jhtml?pq-path=2/6868&amp;pq-locale=en_US&amp;_requestid=361">http://www.kodak.com/eknec/PageQuerier.jhtml?pq-path=2/6868&amp;pq-locale=en_US&amp;_requestid=361</a>
MS-Office XP	Microsoft <sup>®</sup> Corporation, Unterschleißheim, D.	<a href="http://www.microsoft.com/en/us/default.aspx">http://www.microsoft.com/en/us/default.aspx</a>
OpenWetWare	Informationen, OpenWetWare contributors, Page Version ID: 290994	<a href="http://openwetware.org/wiki/Main_Page">http://openwetware.org/wiki/Main_Page</a>
PDB (Protein Data Bank)	3D-Proteinstruktur-Datenbank	<a href="http://www.rcsb.org/pdb/">http://www.rcsb.org/pdb/</a>
PyMOL	Visualisierung von Molekülen in 3D	<a href="http://www.pymol.org/">http://www.pymol.org/</a>
SWISS-PROT	Protein Sequenz-Datenbank, SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Lausanne, Schweiz	<a href="http://www.expasy.org/">http://www.expasy.org/</a>
The Coli Genetic Stock Center	<i>E. coli</i> Genetic Resources at Yale CGSC, Department of Molecular, Cellular, and Developmental Biology, Yale University, New Haven, CT, USA	<a href="http://cgsc2.biology.yale.edu/index.php">http://cgsc2.biology.yale.edu/index.php</a>
UniProt	Universal Protein Resource, Protein Informationen, Cambridge, UK	<a href="http://www.uniprot.org/">http://www.uniprot.org/</a>

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

#### Anzucht und Kultur (Bakterien und Phagen)

Die Arbeiten mit Bakterien und Phagen erfolgten stets unter sterilen Bedingungen mit sterilem Arbeitsmaterial (autoklaviert (Standardprogramm: 20 min, 121°C, 1 bar) / steril filtriert (0,22 µm Filter)). Als Standardmedium bzw. Standardagar diente TY bzw. λ-Phagen-Medium und -Agar. Die Inkubationstemperatur lag bei 37°C, falls nicht anders angegeben; Die Kulturen wurden stets aerob angezogen, d. h. Flüssigkulturen unter Schütteln mit Schikane, wenn kein anaerobes Wachstum erwünscht war. Für Übernachtskulturen wurde Medium mit wenig Zellmaterial beimpft und für mindestens 12 h inkubiert. Zelldichten wurden über die optische Dichte bei 578 nm im Photometer bestimmt ( $OD_{578nm} = 1$  entspricht ca.  $0,8 \times 10^9$  Zellen pro ml). Wachstum in eisenarmem Medium wurde durch Variation des Mediums (NB- oder M63-Medium) und / oder Zugabe von Eisenchelatoren (Desferal<sup>®</sup>, Dipyridyl, EDDHA) zum Medium erreicht.

#### Lagerung (Bakterien und Phagen)

Stämme und Mutanten wurden zeitnah nach Erhalt oder Herstellung für eine dauerhafte Lagerung der Stammsammlung hinzugefügt, um eventuellen genetischen Veränderungen vorzubeugen (bei -80°C). Das verwendete Medium wies letztlich einen Glycerolgehalt von 20 % auf. Der mit Phagen infizierte Wirt wurde bei -80°C gelagert. Chloroform behandelte P1-Lysate konnten über längere Zeit bei 4°C aufbewahrt werden.

#### P1-Transduktion

Die P1-Transduktion ist ein chromosomaler DNA-Transfer mittels genereller Transduktion. Transduzierende Phagen verpacken zufällig bakterielle DNA anstatt ihrer eigenen in der Phagenhülle (ca. 100 kb); Sie sind noch infektiös, aber nicht mehr vermehrungsfähig. Infizierte Rezipientenzellen können diese DNA im Chromosom durch ein Rekombinationsereignis integrieren und so die ursprüngliche DNA ersetzen.

Die Herstellung und Anwendung der P1-Lysate erfolgte nach der Methode von Miller (Miller, 1972). Mit dem entsprechenden Stamm mit dem zu transduzierenden Merkmal wurde 1 ml TY Medium beimpft und bei 37°C unter Schütteln zu einer  $OD_{578nm}$  von  $> 1$  angezogen. 2,5 ml Top-Agar wurden mit 50 µl 0,1 M  $CaCl_2$ , 100 µl beliebiges P1-Phagenlysat und 100 µl Zellsuspension vermischt und auf eine TY-Platte gegeben. Nach ca. 15 h Inkubation (37°C) wurde

## 2 Material und Methoden

---

konfluente Lyse beobachtet. Mit 2 ml TY-Medium wurde der Top-Agar vermischt, diese Suspension zentrifugiert (10 min/4000 upm/Heraeus), der Überstand mit 300 µl Chloroform versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert mit zwischenzeitlichem manuellen Schütteln. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgegossen. Das entstandene Phagenlysat war bei 4°C über Monate infektiös.

Für die Transduktion wurde vom entsprechenden Rezipientenstamm eine 10 ml Übernachtskultur angezogen und abzentrifugiert (10 min/4000 upm/Heraeus) und das Pellet in 5 ml Adsorptionpuffer resuspendiert. Je 100 µl Zellen wurden mit 100 µl P1-Lysat sowie  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  und  $10^{-3}$  Verdünnungen vermischt. Als Kontrolle dienten ein Ansatz, der nur Zellen enthielt und einer nur mit Lysat. Die Ansätze wurden für 20 min bei 37°C belassen (Adsorption der Phagen), dann 0,2 ml 1 M Natriumcitrat zugegeben. Bei schwierigen Transduktionen wurden zusätzlich 2 Waschschrte durchgeführt (2 ml TY-Medium mit 20 µl 1 M Natriumcitrat) und 3 h Wachstum unter nicht-selektiven Bedingungen bei 37°C in 1 ml TY-Medium mit 10 µl 1 M Natriumcitrat unter Schütteln. Je 200 µl wurden auf Platten mit entsprechendem Selektivmedium und Natriumcitrat ausgestrichen.

Selektion auf TY/Amp-, TY/Neo- oder TY/Amp/Neo-Platten (+ 200 µl 1M Natriumcitrat), Überprüfung von Einzelkolonien auf MacConkey-Platten mit je einem Querstreifen getränkt mit Dipyrindyl (20 mM) und einem mit FeSO<sub>4</sub> (1 mM).

Ein Milliliter der entsprechenden Zellkultur in TY (OD<sub>578nm</sub> ca. 1) wurde mit 10 mM CaCl<sub>2</sub> und 50 µl P1-Phagensuspension für 20 Minuten bei 37°C inkubiert.

### Wachstumskurven

Zur Erstellung von Wachstumskurven wurde i. d. R. Medium mit definierter Inokulationsmenge einer Übernachtskultur auf eine Start OD<sub>578nm</sub> von 0,05 angeimpft. Das Wachstum erfolgte bei 37°C unter Schütteln in Flüssigkultur. In regelmäßigen Abständen (alle 0,5 h oder 1 h) wurden Proben zur Absorptionsmessung genommen und die OD<sub>578nm</sub> im Photometer bestimmt.

### Wachstumstests in Gegenwart von Siderocalin

Zur Durchführung der Wachstumstests wurden die entsprechenden Stämme in TY bei 37°C aerob bis zu einer OD<sub>578nm</sub> > 1 angezogen. Damit wurde RPMI/10 % FBS beimpft und Ansätze mit ansteigendem Gehalt an Siderocalin vorbereitet (0-2 µM). 100 µl wurden jeweils in 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben und unter für 16 h inkubiert. Die Kulturen wurden pro

Verdünnungsstufe zweifach ausplattiert (TY-Platten), ü. N. inkubiert (37°C) und am nächsten Tag ausgezählt (CFU-Bestimmung).

### **Plattendiffusionstest**

Hierfür wurden 100 µl Bakteriensuspension einer Übernachtskultur oder frisch angezogener Zellen zu 2,5 ml Top-Agar gegeben und auf die entsprechende Platte gebracht. Alternativ wurden auf entsprechenden Platten (z. B. MacConkey) Bakterien-Querstriche aufgetragen. Die zu testende Substanz (Antibiotika, Siderophor, Dipyrityl, ...) wurde entweder direkt aufgetropft (10 µl) oder auf einem damit getränkten und getrockneten Plättchen (15 µl) oder Filterpapierstreifen (50 µl) aufgebracht. Die so präparierten Agarplatten wurden i. d. R. bei 37°C ü. N. inkubiert.

### **Biofilm-Assay**

Übernachtskulturen verschiedener Stämme in TY-Medium wurden 1 : 50 in M63 mit Glycerol (pH 7,6) verdünnt. Jeweils ein Ansatz wurde mit 50 µM Noradrenalin versetzt, der andere diente der Kontrolle. Pro *well* wurden 200 µl einpipettiert (sterile 96 *well* Mikrotiterplatte, flacher Boden). Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C wurde der Überstand entfernt, mit 0,9 % Saline gespült und der Biofilm mit Kristallviolett (15 min/200 µl 1 %ige Lösung) angefärbt. Ungebundene Farbe wurde durch mehrmaliges Spülen mit VE-H<sub>2</sub>O entfernt. Gebundene Farbe wurde durch zweimalige Extraktion mit jeweils 200 µl Ethanol gelöst und mit 600 µl Reinstwasser vermennt (Endvolumen: 1 ml). Die Absorption wurde anschließend bei 540 nm bestimmt und der photometrisch ermittelte Wert als Maß der Biofilmbildung genommen. Die untersuchten Stämme waren: K-12 [81], K-12 [81] *ΔygiW*, K-12 [82], K-12 [82] *ΔygiW*, K-12 BW25113, K-12 BW25113 *ΔygiW*, Colinfant [5741], UTI [5684], UTI [5685].

### **Motilitäts-Assay**

Schwärmagarplatten wurden mit und ohne den Zusatz von Adrenalin oder Noradrenalin als Attraktantien gegossen (je 50 µM). TY-Übernachtskulturen wurden 1 : 100 mit TY-Medium verdünnt, für 2 h bis zur exponentiellen Phase aerob angezogen, je 10 µl davon auf die entsprechende Platte getropft und erschütterungsfrei bei 37°C bebrütet. Beim aeroben Ansatz wurden die Platten im Brutraum inkubiert, für den Ansatz mit anaerobem Schock wurden die Zellen nach 2 h Anzucht für 30 min ohne Schütteln bei 37°C stehen gelassen und das anaerobe Milieu für den anaeroben Ansatz wurde mit dem Anaerobier-Kit Anaerocult<sup>®</sup> A (für Gefäß für Anaerobieranzucht, Inhalt: 2,5 l) und P (für einzelne Petrischalen) nach Anleitung geschaffen.

## 2 Material und Methoden

---

Die Bebrütung erfolgte jeweils für 24 h bei 37°C bevor die Wachstumshöfe vermessen wurden. Die untersuchten Stämme waren: K-12 [81], K-12 [81]  $\Delta ygiW$ , K-12 [82], K-12 [82]  $\Delta ygiW$ , K-12 BW25113, K-12 BW25113  $\Delta ygiW$ , Colinfant [5741], ABU [5814], mpk 2 [5916], UTI [5684], UTI [5685].

### 2.2.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

#### Klonierungstechniken

Die Klonierung fasst in der Molekularbiologie mehrere Schritte von *in vitro* Modifikationen von Nukleinsäuren zusammen. Ziel ist dabei die Konstruktion und Vervielfältigung eines gewünschten DNA-Moleküls mittels PCR, Restriktionsverdau, Ligation in den geeigneten Vektor und Transformation in einen geeigneten Wirt, mit Agarosegelen zur Kontrolle bzw. als Hilfschritt zwischen den einzelnen Vorgängen.

#### Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente genutzt (Mullis *et al.*, 1986). Die Ansätze umfassten jeweils 50  $\mu$ l und wurden wie folgt zusammengesetzt:

Taq	Taq	Pwo	Pwo	
0,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l	Primer A (100 pM/ $\mu$ l)
0,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l	Primer B (100 pM/ $\mu$ l)
1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	dNTP (10 mM)
5 $\mu$ l				Puffer 10 x + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> oder KCl
	5 $\mu$ l			Puffer Y/S
		5 $\mu$ l		Puffer 10 x + MgSO <sub>4</sub>
			5 $\mu$ l	Puffer 10 x P
4 $\mu$ l				MgCl <sub>2</sub> (2 mM in 50 $\mu$ l)
1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l	DNA-Template
37,5 $\mu$ l	41,5 $\mu$ l	41,5 $\mu$ l	42 $\mu$ l	Reinstwasser
0,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l			Taq-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)
		0,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l	Pwo-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)

Die Pwo-Polymerase weist eine höhere Temperaturstabilität und eine 3`-5`-Exonuclease-Aktivität (*proofreading*) auf und wurde deshalb für Experimente eingesetzt, die eine geringe Fehlerrate (bei niedrigerer Syntheserate) erfordern.

Das DNA-*Template* für Kolonie-PCRs wurde hergestellt indem 5-10 Einzelkolonien eines Stammes (als WT i. d. R. *E.coli* MG1655) in 500 µl Reinstwasser aufgenommen und suspendiert wurden. Anschließend wurden sie bei 99°C für 5 min erhitzt, abzentrifugiert und der Überstand als *Template* genutzt.

Als Standardeinstellung für die PCR wurde ein *Touchdown*-Programm, bei dem während des Laufes die *annealing*-Temperatur schrittweise reduziert wird, verwendet:

95°C		4 min
95°C	} 35 Zyklen	30 s
65-48°C		1 min
72°C		1,5 min
72°C		10 min
4°C		10 min

### DNA-Agarose-Gelelektrophorese und Bestimmung der DNA-Konzentration

Die analytische und präparative DNA-Auftrennung erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Standardmäßig wurden 0,8 %ige Gele zur Auftrennung von ca. 10 kb großen Fragmenten eingesetzt. Für größere Fragmentlängen wurden niedrigere Agarosekonzentrationen benötigt (bis 0,5 %), für kleinere wurden höher-prozentige Gele verwendet (bis 2 %). Die Agarose wurde in TAE-Puffer gekocht, bis zur vollständigen Lösung. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wurde das Gel in die Gelkammer gegossen und ein entsprechender Probenkamm eingesetzt. Nach Festwerden des Geles wurde es mit TAE-Puffer überschichtet und bei 80 V (kleines Gel, Horizon® 18 cm) bzw. 120 V (großes Gel, Horizon® 25 cm) in Flachbettgelapparaturen gefahren.

Die Färbung des Gele erfolgte im Ethidiumbromidbad für 10 min. Anschließend wurden die Gele in im VE-H<sub>2</sub>O-Bad entfärbt (15 min). Die Geldokumentation wurde unter UV-Licht bei 254 nm mittels Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids durchgeführt.

Die Abschätzung der vorhandenen DNA-Menge wurde anhand von Intensitätsvergleichen der entsprechenden Banden mit definierten Markerbanden und den dazugehörigen Angaben der Hersteller gemacht. So konnten auch geringe Mengen an DNA quantifiziert werden (Nachweisgrenze von ca. 5 ng DNA pro Bande), ohne einen Großteil davon der Messung zu opfern.

## 2 Material und Methoden

---

### Aufreinigung von PCR-Produkten

Siehe unten (Aufreinigung von DNA; PCR-Produkte).

### Restriktionsverdau

Verdaue wurden nachfolgendem Schema entsprechend angesetzt.

0,5/1 µl	1 µl	5/18 µl	5 µl	Vektor / Eluat
0,3 µl	0,3 µl	1,5 µl	1 µl	Restriktionsenzym A
0,3 µl	0,3 µl	1,5 µl	1 µl	Restriktionsenzym B
1 µl	1 µl	5 µl	5 µl	Puffer
	1 µl		5 µl	BSA (1 mg/ml)
<i>ad</i> 10 µl	<i>ad</i> 10 µl	<i>ad</i> 50 µl	<i>ad</i> 50 µl	Reinstwasser

Für Einzelverdaue wurde ein Restriktionsenzym weggelassen und entsprechend mehr Wasser eingesetzt.

Die Verdaue wurden anschließend für 2 h bei 37°C inkubiert.

### Ligation

Ligationen wurden, je nach Versuchsansatz nach folgenden Schemata durchgeführt:

5 µl	6 µl	Vektor
12 µl	11 µl	Insert
2 µl	2 µl	10 x Ligationspuffer
1 µl	1 µl	T4 DNA Ligase (1 U/µl)

Der Ansatz wurde jeweils für 1 h bei 37°C inkubiert und danach vollständig für die chemische Transformation eingesetzt (mit 100 µl kompetenten Zellen).

### Aufreinigung von DNA

#### Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde jeweils aus einer Übernachtskultur des entsprechenden Stammes mit Hilfe des peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I (kleinere Mengen) oder NucleoBond® Xtra Midi (größere Mengen) nach Herstellerangaben isoliert.

#### PCR-Produkte

Die Aufreinigung der PCR-Produkte oder Verdaue aus TAE-Agarose-Gelen erfolgte nach Ausschneiden des entsprechenden Gelstückes unter UV-Licht (254 nm) mittels NucleoSpin® Extract II Kit und entsprechend den Herstellerangaben.



### DNA-Sequenzierung

Für Sequenzierungen wurde bei Plasmid-DNA eine Konzentration von 30-100 ng/μl und bei PCR-Produkten 10-50 ng/μl mit einem Volumen von mindestens 30 μl (DNA in Reinstwasser) benötigt. Die Proben wurden bei der GATC Biotech AG in Konstanz (D.) eingesandt und dort sequenziert.

### Herstellung kompetenter Zellen und Transformation

Chemisch

Gewinnung kompetenter Zellen

40 ml TY wurden mit 0,4 ml einer Übernachtskultur des gewünschten Stammes angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>578nm</sub> von 0,3 angezogen. Danach wurden die Zellen für 10 min auf Eis gestellt und anschließend bei 4°C für 10 min abzentrifugiert (4300 upm/Heraeus Megafuge 1.0R) und der Überstand verworfen. Nach Zugabe von 20 ml eiskalter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung und Resuspension wurde der Ansatz für 30 min auf Eis gestellt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min/4300 upm, Heraeus Megafuge 1.0R), Verwerfen des Überstandes und Resuspension in 0,5 ml eiskalter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung wurden die Zellen erneut 30 min auf Eis belassen und anschließend mit Glycerol bei -80°C bis zur Verwendung eingefroren.

Transformation (CaCl<sub>2</sub>)

Die bei -80°C eingefrorenen kompetenten Zellen (100 μl) wurden für ca. 10 min auf Eis ange-taut. Nach Zugabe von 1 μl Plasmid-DNA wurden sie 5 min auf Eis stehen gelassen, danach für 5 min bei 37°C inkubiert und erneut auf Eis gestellt (10 min). Nach Zugabe von 1 ml TY wurde für 1 h bei 37°C geschüttelt.

Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt (2 min/14.000/min, Eppendorf 5415 C). Der Überstand wurde bis auf ca. 200 μl verworfen, das Zellpellet darin resuspendiert und die Suspension komplett auf einer TY/Antibiotikaplatte ausgestrichen. Zur Kontrolle wurden auf zwei weiteren Platten einmal nur kompetente Zellen und nur DNA ausplattiert. Alle Ansätze wurden ü. N. bei 37°C inkubiert. Auf den Kontrollplatten sollte kein Wachstum erfolgen, der Ansatz sollte nur erfolgreiche Transformantenkolonien zeigen.

Elektroporation

Für eine hohe Transformationsausbeute wurde die Methode der Elektroporation angewandt. Gewünschte Zellen wurden in 100 ml TY bis zu einer OD<sub>578nm</sub> von 0,5 bis 0,6 angezogen, dann für 30 min auf Eis gestellt und 10 min abzentrifugiert (4°C/4300 upm/Heraeus Megafuge 1.0R).

Die Zellen wurden zweimal in 50 ml eiskalter 10 %iger Glycerollösung gewaschen und schließlich in 0,2 ml Elektroporationspuffer GYT resuspendiert (Einfrieren der Zellen als Aliquot bei -80°C in Glycerolkultur möglich). In einer gekühlten Elektroporationsküvette wurden die Zellen mit 1 µl Plasmid-DNA gemischt und elektroporiert (Feldstärke: 12,5 kV/cm; Parallelwiderstand: 200 Ω; Spannung: 2,5 kV; Kondensator 25 µF; Zeitkonstante: 2,5). Die Zugabe von 1 ml SOC erfolgte direkt nach dem Spannungsstoß, um anschließend die Zellen bei 37°C für 1 h zu schütteln. Danach wurden 200 µl auf Selektivplatten ausplattiert.

### **Konstruktion chromosomaler *lacZ*-Fusionen für Promotorstudien (Reportergen zur Quantifizierung von Promotorstärken)**

Das hier angewandte Prinzip beruht auf der einmaligen Insertion der gewünschten Operonfusion mittels  $\lambda$ -Phagen in das Chromosom des Rezipientenstammes, so dass schließlich das zu untersuchende Gen in nur einer Kopie in der Zelle vorliegt. Hierfür wurde zunächst die gewünschte Promotorsequenz (*pfes*, *pfepA*) in den Multicopy-Vektor pRS415 vor *lacZ*<sup>+</sup> kloniert (*lacZ* ohne transkriptionelle und translationale Startsignale). Für *piroN* wurde entsprechend pRS414 verwendet (Zhu, 2005). Die so entstandenen *lacZ*-Fusionen auf den resultierenden Plasmiden wurden zunächst mittels Sequenzierung verifiziert und in einen Wirt transformiert; dann wie bei Simons *et al.* beschrieben (Simons *et al.*, 1987), über homologe Rekombination *in vivo* in den Phagen  $\lambda$ RS45 übertragen und in den gewünschten  $\Delta$ lac-Stamm eingeführt. Nach Lysogenisierung der Bakterien enthielten die Zellen im Idealfall eine Kopie der gewünschten Operonfusion als Fusionsprotein im Genom. Entsprechende Kolonien wurden mit Hilfe von X-Gal und Desferal<sup>®</sup> auf  $\lambda$ -Platten qualitativ ausgewählt. X-Gal ist ein artifizielles chromogenes Substrat für die  $\beta$ -Galaktosidase und zeigt durch Blaufärbung (Blau-Weiß-Screening) das Vorhandensein eines funktionierenden  $\beta$ -Galaktosidase-Enzyms an. Die Überprüfung der Insertion erfolgte mit Hilfe von MacConkey-Platten und Dipyriddy-Streifen als Indikator. Rotfärbung in Umgebung des Dipyriddy-Gradienten zeigt dabei den verstärkten Laktoseabbau durch eine funktionstüchtige  $\beta$ -Galaktosidase unter Eisenmangel an.

### **2.2.3 Proteinbiochemische Arbeitsmethoden**

#### **Überexpression / -produktion von Proteinen**

Rekombinante Proteine wurden als Fusionsproteine konzipiert, die mittels Affinitätstags spezifisch aufgereinigt wurden (versehen mit einem His- oder einem GST-Tag).

Sie wurden mit Hilfe des T7-Expressionssystems überexprimiert. Erst nach Infektion mit T7 Phagen oder durch die Induktion der T7 RNA Polymerase liegt die T7 RNA Polymerase in der Zelle vor und kann den T7 Promotor und damit die Transkription der gewünschten Gene induzieren.

### GST-Tag

Alle Stämme wurden für die Überexpression frisch transformiert und angezogen.

Für die Siderocalinproduktion in *E. coli* K-12 MC4100  $\Delta$ entC [5687] und *E. coli* Nissle 1917 waren zwei Transformationen nötig: mit pGEX-4T3-NGAL (Siderocalin) und pGP1-2 (codierte T7-RNA-Polymerase, die unter Kontrolle eines temperatursensitiven  $\lambda$ -Repressors steht und durch Hitze (42°C) induziert wird). Selektiert wurde auf Amp bei 37°C und Amp/Neo bei 30°C. Die Vorkultur wurde ü. N. bei 30°C angezogen. Für die Hauptkultur von jeweils 400 ml TY/Amp/Neo gepuffert mit 100 mM Phosphat (pH 8) wurde diese mit 20 ml Vorkultur angeimpft und bei 30°C bis zu einer OD<sub>578nm</sub> von 0,5 angezogen. Es erfolgte ein Temperaturshift auf 42°C für 1 h und anschließend Wachstum für 3 h bei 37°C.

Alternativ erfolgte die Hauptkultur inokuliert mit den zweifach transformierten Zellen in M63-Medium bei 30°C bis zu einer OD<sub>578nm</sub> von 0,4, einem Temperaturshift auf 42°C für 2 h und weiterer Inkubation für 15 h bei 37°C.

Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (25 min/4300 upm, Heraeus Megafuge 1.0R) und das Pellet entweder gleich weiterverarbeitet oder vor der weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

Für die Gewinnung größerer Mengen an Siderocalin (mit pGEX-4T3-NGAL) und YgiW (mit pYH9) wurde der *E. coli* Stamm BL21 und das GST-Tag-System eingesetzt. Die Vorkultur wurde mit frischen Transformanten angeimpft (TY-Medium + Amp) und ü. N. bei 37°C angezogen. Die Hauptkultur wurde in 400 ml Einheiten desselben Mediums mit jeweils 20 ml Vorkultur angeimpft und bei 37°C zu einer OD<sub>578nm</sub> von 0,7 bis 0,8 geschüttelt. Anschließend erfolgte die Induktion mit 0,3 mM IPTG (Derepression des *lac*-Repressors führte zur Induktion der Expression der chromosomalcodierten T7-RNA-Polymerase). Nach 3 h wurden die Zellen zentrifugiert (25 min/4300 upm, Heraeus Megafuge 1.0R) und das Pellet entweder gleich weiterverarbeitet oder vor der weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

## 2 Material und Methoden

---

### Fermentation

Die Produktion von YgiW in größerem Maßstab wurde in der Forschungsgruppe „Antibiotika“ (Prof. Dr. Hans-Peter Fiedler) von Andreas Kulik durchgeführt.

Die Vorgänge bei der Fermentation waren äquivalent. Der Hauptkulturansatz umfasste dabei 10 l oder 20 l, die Inokulationsmenge der Vorkultur betrug 0,5 l oder 1 l.

### His-Tag

YgiW wurde ebenfalls als his-getagtes Protein gewonnen. Dazu wurden chemisch kompetente *E. coli* TOP 10 Zellen mit pYH21 transformiert, das die entsprechende Information trägt (pBAD/MycHisB Vektor mit Arabinose reguliertem Promotor und 6 x his-ygiW). Mit einer Übernachtskultur frischer Transformanten wurde die Hauptkultur beimpft (20 ml *ad* 400 ml TY/Amp). Diese wurde angezogen bis zu einer OD<sub>578nm</sub> von 0,5, mit 0,05 % Arabinose induziert und 4 h bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden zentrifugiert (20 min/4000 upm, Heraeus Megafuge 1.0R) und das Pellet entweder gleich weiterverarbeitet oder vor der weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

### Proteinaufreinigung und -aufbereitung

#### GST-Tag

Der Zellaufschluss erfolgte mittels French Press (hydraulische Hochdruckpresse). Hierzu wurden die entsprechenden Zellen zunächst in kaltem PBS-Puffer mit 0,3 mg/ml Lysozym und 0,05 mg/ml DNase resuspendiert und für 30 min inkubiert bevor sie in 5 Durchgängen mit 1000 psi geöffnet wurden. Nach Ultrazentrifugation bei 100.000 g für 1 h wurde das Pellet verworfen und der Überstand weiterverwendet. Nach Filtration wurde der Überstand auf eine mit PBS äquilibrierte Glutathionsäule aufgetragen und mit 10-fachem Säulenvolumen PBS und 5-fachem Säulenvolumen Waschpuffer TSED gewaschen. Die Elution erfolgte mit TSED/5 mM Glutathion. Alle Lösungen, die für die Säulenaufreinigung genutzt wurden, wurden zuvor zur Entfernung etwaiger Partikel filtriert.

Um das Probenvolumen zu konzentrieren, wurde das System von Centriprep<sup>®</sup> genutzt. Durch inverse Zentrifugation wurde die gewünschte Menge an PBS-Puffer entfernt und die Proteinlösung entsprechend konzentriert.

#### His-Tag

Der Zellaufschluss erfolgte ebenfalls mittels French Press (hydraulische Hochdruckpresse). Hierzu wurden die entsprechenden Zellen zunächst in kaltem Puffer A mit Complete, EDTA

free (1 Tablette/50 ml) und einer Spatelspitze DNase resuspendiert. Die Zellen wurden mit 1000 psi geöffnet und feste Bestandteile durch Zentrifugation entfernt (Sorvall, 1 h/18.000 rpm/4°C). Die Aufreinigung mittels His-Tag erfolgte affinitätschromatographisch nach Anleitung in „The QIAexpressionist™“ nach dem QIAexpress System (Protokoll für native Bedingungen) mit Ni-NTA Säulenmaterial (Nickel-Chelat) und Imidazol zur Elution. Diese Methode der Aufreinigung lieferte geringere Mengen an YgiW und nicht so reines Proteinmaterial wie GST-getagtes Protein (siehe 3.4.3.1).

### **SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Standardmäßig erfolgte die Auftrennung der Proteinlösungen mittels 11 %igen Gelen in Anlehnung an das Protokoll von Laemmli (Laemmli, 1970).

Die Proteinfractionen wurden mit 2-fach-SDS-Probenpuffer vermengt (20 µl + 20 µl) und 3 min bei 96°C inkubiert. Molekulargewichtsstandards wurden entsprechend 2.1.4 eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte für 30 min bei 15 mA, danach bei 20 bis 25 mA (je für 1 Gel) in einer Vertikalelektrophorese-Apparatur.

### **Coomassie-Blau-Färbung, Entfärbung und Geltrocknung / Gelkonservierung**

Die Färbung der Proteine erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue R 250 als Standard Methode. Dieser Farbstoff bindet in saurer Lösung an basische und aromatische Aminosäuren im Protein. Das Gel wurde jeweils für 45 min in der Färbelösung unter Schwenken belassen. Die Entfärbung erfolgte ü. N. unter mehrmaligem Auswechseln der Entfärbelösung. Das so präparierte Gel wurde zu Dokumentationszwecken gescannt und anschließend mittels Hitze und Vakuum getrocknet.

### **Bestimmung von Proteinkonzentrationen**

Bradford (Bradford, 1976)

Diese Methode basiert auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliant Blue G-250 von 465 nm zu 595 nm durch dessen Bindung an vorhandene Proteine. Durch den Wert der Absorption bei 595 nm lässt sich auf die Proteinkonzentration rückschließen. Die Proteinbestimmung erfolgte mit Hilfe von Roti®-Quant und nach der Anleitung für Proteinbestimmungen in Mikrotiterplatten des Herstellers mit Albumin (BSA) in einem Messbereich von 20-100 µg/ml als Standard. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 595 nm und jeweils als Dreifachbestimmung.

### BCA

Bei dieser Methodik formen Proteine einen Komplex mit Kupferionen und bilden dabei einen violetten Farbkomplex, was als Biuretreaktion bezeichnet wird. Die Proteinbestimmung erfolgte mit Hilfe des BCA Protein Assay Kits von Pierce und nach Anleitung des Herstellers mit Albumin (BSA) in einem Messbereich von 75-400  $\mu\text{g/ml}$  als Standard. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 555 nm und jeweils als Dreifachbestimmung.

### Proteinase K-Verdau

Für den Proteinase K-Verdau wurden 60  $\mu\text{l}$  Protein mit einer Konzentration von ca. 1 mg/ml eingesetzt, mit 4  $\mu\text{l}$  Proteinase K-Lösung (0,25 mg/ml) versetzt und nach Vortexen und Zentrifugieren für 30 min bei 50°C im Thermomixer inkubiert. Danach wurde die Lösung auf Eis gestellt. Vor dem Einsatz für die HPLC-Messung wurden feste Bestandteile abzentrifugiert und nur der Überstand eingesetzt.

### Spaltung des GST-Fusionsproteins mittels Thrombin

Eluate des GST-Proteins (Siderocalin) wurden mit verschiedenen Thrombinverdünnungen (1 : 25; 1 : 50; 1 : 100; 1 : 200) versetzt und für 5 h bei 4°C inkubiert. Die Überprüfung der Abspaltung des GST-Restes vom Protein wurde mittels SDS-PAGE durchgeführt (weitere Details siehe Thrombin-Kit Herstellerprotokoll).

### Ligandenkonkurrenzversuch

Gereinigtes Siderocalin mit partieller Enterobactinbeladung (ca. 30 %) wurde in gleichen Mengen (5 ml) auf mehrere GSTrap-Säulchen (1 ml) verteilt und für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Säulchen gewaschen (10 Säulenvolumen, mit PBS). Säule Nr. 1 blieb unbehandelt, auf Säule Nr. 2 wurden 2 ml 10  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{3+}$ -Enterobactin, auf Säule Nr. 3 2 ml 10  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{3+}$ -Salmochelin S4 und auf Säule Nr. 4 2 ml 10  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{3+}$ -Enterobactin /  $\text{Fe}^{3+}$ -Salmochelin S4 aufgetragen und jeweils für 30 min inkubiert. Siderocalin wurde dann nach Protokoll aufgereinigt, der Proteingehalt bestimmt (BCA-Test), eine SDS-PAGE gefahren, mit Proteinase K verdaut und in der analytischen HPLC auf Siderophorgehalte untersucht (qualitativ und quantitativ).

### Siderophormengenbestimmung

Siehe unten (Analytische Methoden; *high pressure liquid chromatography* (HPLC); analytische HPLC).

### **Siderocalin und Desferal<sup>®</sup>**

Um Siderocalin potentiell enterobactinfrei aus einem Siderophorproduzenten zu gewinnen, wurde es entsprechend dem Abschnitt „Überexpression / -produktion von Proteinen; im Stamm BL21; mit GST-Tag“ gewonnen. Verändert wurde der erste Waschschrift nach Auftrag des Überstandes: Es wurde nicht mit reinem PBS, sondern mit 10-fachem Säulenvolumen PBS / Desferal<sup>®</sup> (1 mM) mit der Geschwindigkeit 0,2 bis 1 ml/min gespült, um den Enterobactin-Eisen-Komplex nach Möglichkeit durch den Chelator Desferal<sup>®</sup> dem Siderocalin zu entziehen. Das Ergebnis wurde mittels HPLC untersucht.

### **Siderocalin und Dextran**

Alkoxypropyl Dextran wurde in Ethanol suspendiert. Nach dem Quellen (2 h) wurde eine Säule damit gefüllt und mit PBS gewaschen. Siderocalin wurde anschließend in PBS gelöst aufgetragen. Die aufgefangenen Fraktionen wurden auf ihren Proteingehalt untersucht, diese vereinigt, konzentriert und auf ihren Protein- und Enterobactingehalt hin untersucht (BCA-Test und analytische HPLC).

### **Siderocalin, Adrenalin / Noradrenalin und Transferrin**

Es wurden Wachstumsexperimente in *Multiwell*platten aerob unter Schütteln über 16 h durchgeführt. Versuchsmedium war das Zellkulturmedium RPMI mit Zusatz von 10 % FBS. Zugeetzt wurden außerdem ansteigende Mengen Adrenalin bzw. Noradrenalin von 0, 1, 50, 100 und 200  $\mu\text{M}$ . Die Inokulationszahl betrug 0, 200, 2.000, 20.000 und 200.000 Bakterien pro ml. In jedem Experiment wurde der gleiche Ansatz dreifach pipettiert. Es wurden 3 verschiedene Stämme untersucht: *E. coli* AB2847( $\Delta\text{aroB}$ ), *E. coli* [456] ( $\Delta\text{aroB}$   $\Delta\text{lac}$ ) und *E. coli* ABU mit und ohne 50  $\mu\text{M}$  Siderocalin. Die Auswertung erfolgte visuell und photometrisch bei 578 nm. Derselbe Versuchsansatz wurde mit einer weiteren Eisenquelle anstelle von FBS durchgeführt: Die Konzentration der eingesetzten Transferrinmischung betrug 3 g/l mit 30 %iger Eisenbeladung (Mischung von Apo- und Holo-Transferrin), entsprechend den Bedingungen im menschlichen Organismus. Es wurden ebenfalls die 3 Stämme getestet, allerdings nur mit einer Startmenge von 2.000 Bakterien pro ml und einer Zugabekonzentration von je 50  $\mu\text{M}$  (Noradrenalin, Siderocalin).

### **$\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsmessung**

Die Methode der Bestimmung erfolgte in Anlehnung an Miller (Miller, 1972).

Alle zu untersuchenden Stämme wurden jeweils am Vortag auf TY-Platten frisch ausgestrichen.

## 2 Material und Methoden

---

### Wachstumskurven und Probennahme

Einige Kolonien wurden im Querstrich von der Platte entnommen und in 1 ml TY- bzw. NB-Medium suspendiert. Es erfolgte eine 1 : 10 Verdünnung in TY- bzw. NB-Medium und die Bestimmung der OD<sub>578nm</sub>. 100 ml Kolben mit 18 ml TY- bzw. NB-Medium (+/- 50 µM Desferal<sup>®</sup>) wurden zu einer Start-OD<sub>578nm</sub> von 0,05 beimpft. Es erfolgte eine aerobe Anzucht bei 37°C unter Schütteln. OD<sub>578nm</sub>-Messungen wurden nach 1; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5 und 6 h durchgeführt. Ab einer Versuchsdauer von 2 h wurden Proben für die β-Galaktosidase-Bestimmung genommen: Bei einer OD<sub>578nm</sub> von 0,3 bis 0,6 jeweils 1 ml, bei einer OD<sub>578nm</sub> von über 0,6 je 0,5 ml. Diese wurden zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen bei -20°C eingefroren. Es folgte die Erstellung von Wachstumskurven.

### β-Galaktosidase-Bestimmung nach Miller

Die eingefrorenen Zellpellets wurden jeweils in 1 ml Puffer gelöst und je 10 µl 0,1 % SDS-Lösung sowie 20 µl Chloroform zugegeben. Nach 10-sekündigem vortexen erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei 28°C. Nach Zugabe von 200 µl Puffer mit ONPG (4 mg/ml) wurde die Zeit bis zur Gelbfärbung ermittelt und die Reaktion mit 0,5 ml 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> gestoppt. Die Proben wurden anschließend 6 min zentrifugiert und der Überstand im Photometer gemessen (OD<sub>405nm</sub>). Zur Auswertung wurde folgende Formel angewandt:  $OD_{405nm}/(t \cdot OD_{578nm} \cdot V \cdot 0,0045)$ ; Einheit (U): nmol (ONPG)/(10<sup>9</sup> Zellen\*min); (t= Zeit in min bis die Farbentwicklung abgeschlossen ist; V= abzentrifugiertes Volumen in ml, also 1 ml bzw. 0,5 ml). Die Höhe des Wertes war Maß für die Induktion.

### Entsalzung und Dialyse

Die Entsalzung wurde mittels HiTrap™ Desalting Säulen nach Anleitung und mit PBS als Puffer / Fließmittel durchgeführt.

Zur Dialyse wurde eine semipermeable Cellulosemembran genutzt und das Protein ü. N. mit zweimaligem Pufferwechsel, darin inkubiert. Die letzte Puffercharge wurde als Lösungsmittel für Ligandenbindungsstudien und die Referenzlösung an der ITC genutzt.

Diese Schritte dienen der Vorbereitung des Proteins für die Analysen mittels ITC.

### *Isothermal titration calorimetry (ITC)*

Siehe unten (Analytische Methoden)



## 2.2.4 Analytische Methoden

### *High pressure liquid chromatography (HPLC)*

#### Analytische HPLC

Standardmäßig wurden Proben in der analytischen *reversed-phase*-HPLC auf Reinheit getestet. Hierzu wurden jeweils 20 µl der Probe mit einem Injektor automatisiert in das System eingebracht. Als Standardsäule wurde eine *reversed-phase* ReproSil-Pur C18-Säule eingesetzt. Der Nachweis von Siderophoren erfolgte i. d. R. bei 220 nm, außer bei Fluoreszenznachweisen von beispielsweise Aerobactin oder Yersiniabactin (320-420 nm bzw. 330-450 nm). Der Gradient wurde durch ansteigende Mengen Acetonitril (6 % bis 100 %) erreicht. Die zwei Standardprogramme für Siderophore liefen über 20 min bzw. 35 min. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 ml/min.

Für die Siderophormengenbestimmung mittels HPLC wurden Eichgeraden der Peak-Area der entsprechenden Substanz mit definierten Siderophorkonzentrationen erstellt und im Vergleich der Gehalt einer unbekannt Probe ermittelt.

Die Ligandenanalyse erfolgte ebenfalls in der HPLC. Definierte Zeitpunkte und Referenzmessungen bekannter Siderophore ließen Rückschlüsse auf das gesuchte Siderophor zu. Die Bestimmung der Menge der Enterobactinproduktion wurde gleichfalls mit dieser Methode ermittelt.

#### Präparative HPLC

Die Messungen wurden ebenfalls bei einer Wellenlänge von 220 nm durchgeführt. Die Probeninjektion von 1 ml erfolgte manuell. Das Standardprogramm zur Siderophorpräparation lief über 50 min bei einer Fließgeschwindigkeit von 5 ml/min. Der Gradient wurde dabei durch ansteigende Mengen Acetonitril (6 % bis 100 %) erreicht. Die Reinheit der isolierten Substanzen wurde mittels analytischer HPLC überprüft.

### **Arnou-Reaktion (Arnou, 1937)**

Diese Methode zur Quantifizierung von Catechol-Siderophoren basiert auf der Reaktion mit salpetriger Säure, Molybdat und Lauge zu rötlichem Chromogen. Für die Arnou-Reaktion wurden Reaktionsgefäße (1,5 ml) mit der zu bestimmenden Proteinlösung vorbereitet (500 µl). Es wurden 42 µl 6 M HCl zugeben, gevortext und kurz gewartet bis zum Abbau des Proteins. Danach wurden 250 µl Arnou-Reagenz (Natriumnitrit, Natriummolybdat) zugesetzt und gevortext (Gelbfärbung bei Catecholgehalt). Nach Zugabe von 83 µl 6 M NaOH und Vortexen,

kommt es zu einer rötlichen Verfärbung. Anschließend wurde die Extinktion der Lösung bei 515 nm gegen eine Reinstwasser-Referenz gemessen und die Werte mit einer entsprechenden Eichgerade verglichen (DHB, Eb oder Salmochelin). Die Eichgeraden wurden aus Mittelwerten von mindestens 4 verschiedenen Konzentrationen und je dreifacher Messung bestimmt.

### ***Isothermal titration calorimetry (ITC)***

Die Messungen an der ITC wurden am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen in der Abteilung Proteinevolution in der Forschungsgruppe von Dr. Kornelius Zeth von Dr. Verena Schünemann durchgeführt.

Mit dieser biophysikalischen Methodik lassen sich thermodynamische Parameter, beeinflusst durch biochemische Interaktionen, bestimmen (Wärmeumsatz bei Bindung). Ihr Einsatz bietet sich an um exotherme oder endotherme Reaktionen zu charakterisieren, also Bindungsstudien z. B. von Ligand und Bindungspartner zu untersuchen.

Für die ITC wurden größere Proteinmengen von ca. 2 ml pro Messung benötigt. Während der Messungen wurden Temperaturunterschiede (hier: exotherm) bedingt durch die Protein- / YgiW-Liganden- / DHB-Reaktion in Microcalorien ermittelt. Die Versuchsdurchführung erfolgte bei 15°C, einer Drehgeschwindigkeit von 300, einem Spacing von 240 und PBS-Puffer als Referenz. Die Titration von DHB zu YgiW (beide in PBS) erfolgte in den verschiedenen Versuchen mit unterschiedlicher Konzentration. Alle Lösungen wurden vor ihrem Einsatz vollständig entgast und entsprechend temperiert, das Protein wurde ü. N. in PBS dialysiert und der Dialysepuffer als Lösungsmittel für den Liganden genutzt. Ermittelt werden sollten Bindungskonstanten und daraus resultierend Informationen über Standardenthalpie und -entropie.

### **Enterobactinproduktion**

Eisenarme Bedingungen

M63-Medium mit einem pH-Wert von 7,6 wurde jeweils mit *E. coli* K-12 (MG1655), einer  $\Delta qseB$ - und einer  $\Delta qseC$ -Mutante beimpft (Start-OD<sub>578nm</sub> = 0,05). Die Probennahme erfolgte über einen Zeitraum von 14 h, wobei die Stämme aerob bei 37°C angezogen wurden. Die Enterobactinproduktion wurde mittels analytischer HPLC überprüft. Hierzu wurden nach 0, 6, 9, 11, 13 und 14 h Proben aller 3 Ansätze entnommen, untersucht und ausgewertet. Zusätzlich erfolgte jeweils die Bestimmung der optischen Dichte.

### Eisenreiche Bedingungen

Für die Produktion unter eisenreichen Bedingungen wurde statt M63- eisenreiches TY-Medium eingesetzt. Die Versuchsdauer betrug 11 h, wobei die Enterobactinbestimmung nach 0; 0,5; 1; 1,5; 4; 4,5; 5,5; 6,5; 9,5 und 11 h erfolgte. Die OD-Messungen erfolgten parallel und zusätzlich nach 2 und 3 h. Die restliche Durchführung entspricht der unter dem Abschnitt „Eisenarme Bedingungen“ beschriebenen.

## 2.2.5 Sonstige Methoden

### Präparation von Enterobactin, seinen Komponenten und Salmochelinen

#### Enterobactinisolierung

Die Enterobactinisolierung wurde im kleinen Maßstab durchgeführt. Dazu wurde ein Enterobactinproduzent (BW25113) in eisenarmem M63-Medium mit Glycerol pH 5,6 angezogen und der Überstand auf eine DEAE-Säule gegeben. Nach Ammoniumchloridelution (2 M) sollte der Überstand produzierte Catecholate enthalten. In der analytischen HPLC wurde das Eluat mit größerem Injektionsvolumen (80 µl pro Durchlauf) untersucht. Die entsprechende Enterobactinfraktion wurde aufgefangen, analysiert (HPLC) und bei entsprechendem Reinheitsgrad lyophilisiert (eingefroren bei -80°C und gefriergetrocknet ü. N. oder länger).

#### Salmochelinisolierung

Die Vorkultur von *E. coli* 5544 R wurde in 20 ml TY Medium angezogen (37°C, ü. N.). Damit wurde die Hauptkultur in 2 l M63-Glycerol (0,6 %) Medium (pH 7,6) beimpft (37°C, für 20 h). Die Zellen wurden bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand mit 20 ml 0,2 M FeCl<sub>3</sub> versetzt. Nach Präzipitatbildung auf Eis (> 1 h) erfolgte erneut ein Zentrifugationsschritt bei 4°C und der Auftrag auf eine DEAE-Säule. Nach Waschen mit VE-H<sub>2</sub>O wurde mit 300 ml 2 M NH<sub>4</sub>Cl eluiert. Alle rötlichen Fraktionen wurden vereinigt und vollständig trocken einrotiert. Der trockene Überstand wurde in Methanol gelöst, feste Bestandteile abzentrifugiert und der Überstand vollständig einrotiert, um Salze weitgehend zu entfernen. Nach Lösung in Methanol wurden die Überstände mittels präparativer HPLC aufgetrennt. Nach ca. 18 min wurde die S0-Fraktion, nach ungefähr 25 min die S4-Fraktion im Fraktionssammler aufgefangen (Fließgeschwindigkeit: 5 ml pro min) und in der analytischen HPLC auf Reinheit getestet. Reine S4-Lösung wurde trocken einrotiert, in Reinstwasser gelöst und lyophilisiert trocken und dunkel aufbewahrt. S0 ist instabil in saurem Milieu unter Wärmeeinfluss. Da sich die S0-Fractionen in sauren Milieu befanden, wurden sie zur Stabilisierung bis zur Neutralität der S0-Lösung durch

eine P2-Biogel-Säulen-Konstruktion (Polyacrylamid, Fließmittel: Reinstwasser) neutralisiert. Mit einem Detektor wurde die S0-Fraktion anhand der veränderten UV-Absorption bei 220 nm erkannt und im Fraktionssammler aufgefangen und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren und anschließend lyophilisiert (ca. 15 h).

### 2.2.6 Sicherheit

Der Gebrauch von Chemikalien erfolgte entsprechend den Vorschriften (R- und S-Sätze). Alle mit gentechnisch veränderten Organismen in Berührung gekommenen Materialien wurden getrennt gesammelt und vor Reinigung und Entsorgung autoklaviert.

### 2.2.7 Statistische Auswertung

Die Mittelwerte (arithmetisches Mittel) und Standardabweichungen wurden als statistische Parameter mit dem Programm Excel von Microsoft<sup>®</sup> ermittelt. Weitere Auswertungen von Datensätzen erfolgten mit Hilfe des Statistikprogrammes JMP<sup>®</sup> 7.0/8.0. Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung geprüft. Normalverteilte Datensätze wurden mit einem parametrischen t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung, d. h. auf signifikante Unterschiede zwischen den Messreihen getestet. Nicht normalverteilte Datensätze wurden dagegen mit dem parameterfreien, verteilungsunabhängigen Wilcoxon / Kruskal-Wallis-Rangsummen-Test ausgewertet. Signifikanzniveaus wurden entsprechend definiert, wobei nur p-Werte von 0,05 und darunter als signifikant betrachtet wurden.

**Tabelle 1: Darstellung der Signifikanzdefinitionen und -niveaus.**

<b>Definition</b>	<b>Darstellung</b>	<b>Bezeichnung</b>
$0,05 \geq p > 0,01$	*	schwach signifikant
$0,01 \geq p > 0,001$	**	signifikant
$p \leq 0,001$	***	hoch signifikant

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Allgemeine Bemerkungen

Bei Vergleich verschiedener Messreihen wurde jeweils darauf geachtet, Mutanten und Elternstämme desselben Stammhintergrundes zu vergleichen. Dieser Stammhintergrund wird in der Abbildungsbeschreibung mit aufgeführt, da festgestellt wurde, dass verschiedene *E. coli* K-12 Stämme nicht immer gleich reagierten (3.5). So wurden 194 Veränderungen im Genomvergleich zwischen den beiden *Escherichia coli* K-12 Stämmen MC4100 und MG1655 gezeigt (Ferenci *et al.*, 2009).

Zu vergleichende Messreihen wurden jeweils parallel durchgeführt. Das bedeutet, die jeweilige Referenzmessung des Elternstammes erfolgte im selben Experiment wie auch die, der zu untersuchenden Mutante. Schwankungen, die auf Versuchsbedingungen gründen, sind daher zu vernachlässigen. Versuche, die wiederholt durchgeführt wurden, sind in ihrer Anzahl und in ihren Bedingungen in der Abbildungsbeschreibung nachzuvollziehen. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerindikatoren gekennzeichnet.

### 3.2 Siderophoraufreinigung

Für die Untersuchungen des Eisenmetabolismus von Mikroorganismen wurden regelmäßig definierte Siderophorproben benötigt, die beispielsweise als Kontrollsubstanz für *high performance liquid chromatography* (HPLC)-Messungen eingesetzt oder auch bei verschiedenen Experimenten zugesetzt wurden.

Die Aufreinigung von Siderophoren und die nachfolgende Erfolgskontrolle wurde vorwiegend zu Beginn der Arbeit und später zum Teil auch parallel zur Arbeit durchgeführt. Verwendet wurden Produzentenstämme wie *E. coli* K-12 oder *Salmonella* (S.), die Enterobactin (Eb), Salmochelin und deren Derivate in geeignetem Medium in ausreichender Menge produzierten. Mittels präparativer oder analytischer HPLC erfolgte zunächst eine Anreicherung, die nach erneuten Durchläufen zu reinen Substanzlösungen führten. Die Kontrolle erfolgte schließlich an der analytischen HPLC, die letztlich nur einen Peak mit definierter Retentionszeit aufweisen durfte, um die Substanz als rein gelten zu lassen. Siderophorlösungen, die diesem Standard entsprachen, wurde zunächst am Rotationsverdampfer die Trennflüssigkeit der HPLC-Fließmittel entzogen, um anschließend in einer Methanol / Reinstwasserlösung resuspendiert

### 3 Ergebnisse

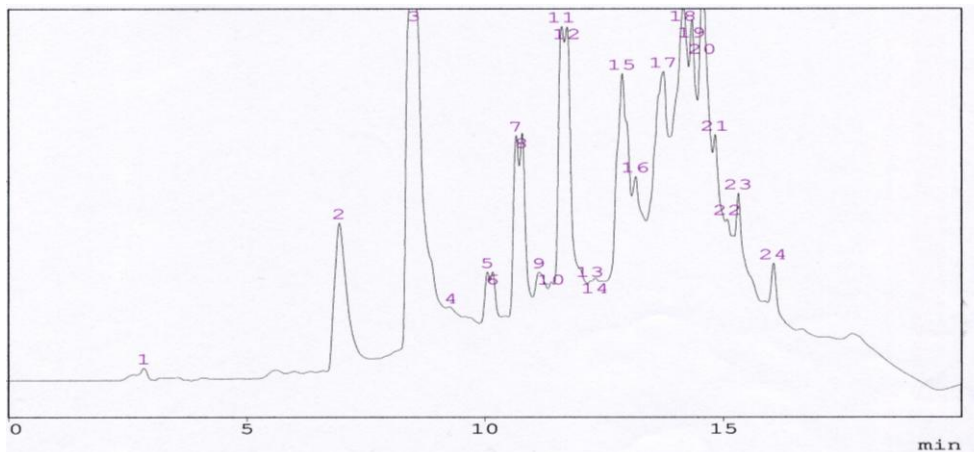
---

und lyophilisiert zu werden. Die Siderophore wurden schließlich trocken und unter Lichtabschluss aufbewahrt.

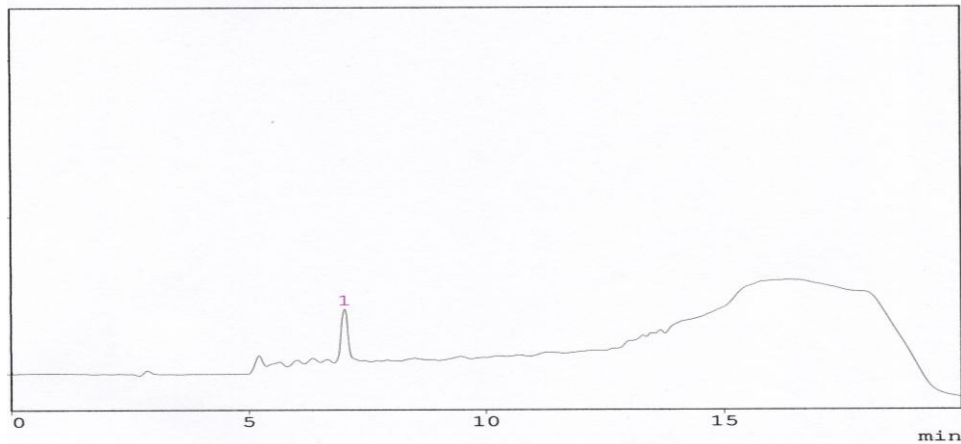
Die benötigten Siderophore wurden auf diese Weise aufgereinigt, bei 2,3-Dihydroxybenzoylserin (DHBS) und Enterobactin wurden zusätzlich Proben von Prof. Dr. Günther Winkelmann verwendet.

#### 3.2.1 Enterobactin und seine Derivate

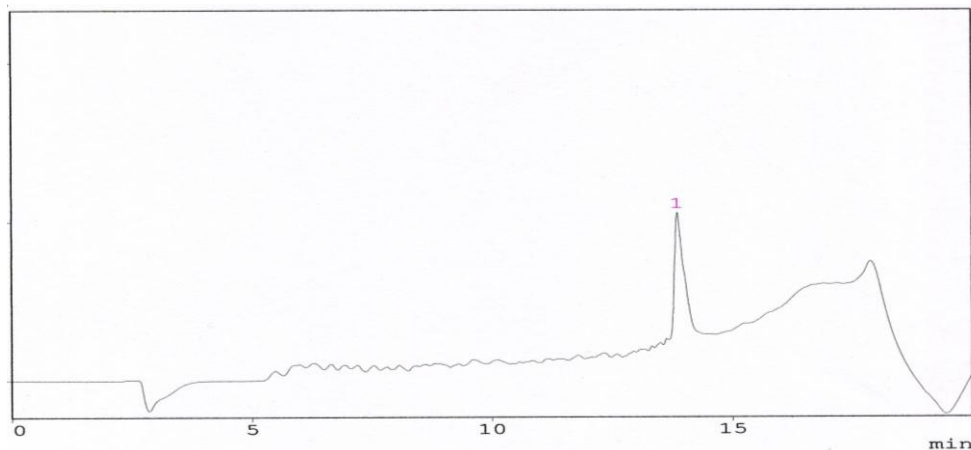
Enterobactin und seine Derivate wurden aus Medienüberständen an DEAE-Cellulose gebunden und mit 2 M Ammoniumchlorid eluiert. Dieser Rohextrakt wies jeweils eine Vielzahl produzierter Substanzen auf (Abbildung 3-1). Daraus wurde DHBS und Enterobactin mittels HPLC aufgereinigt (Abbildung 3-2; Abbildung 3-3).



**Abbildung 3-1: Rohextraktprobe des Anzuchtmediums von *E. coli* BW25113 [5863] vor der Substanzpräparation.** Die Abbildung zeigt ein HPLC-Chromatogramm der analytischen HPLC mit den entsprechenden Peaks der Produkte aus dem *E. coli*-Anzuchtmedium (M63 + Glycerol) nach Reinigung und Elution über eine DE52 Diethylaminoethyl Cellulosesäule. Außer Enterobactin (Peak Nr. 18) und seinen Derivaten DHBS (Peak Nr. 2), DHB (Peak Nr. 7), Dimer (Peak Nr. 14) und dem Trimeren (Peak Nr. 17) sind weitere Substanzen im Medium erkennbar.

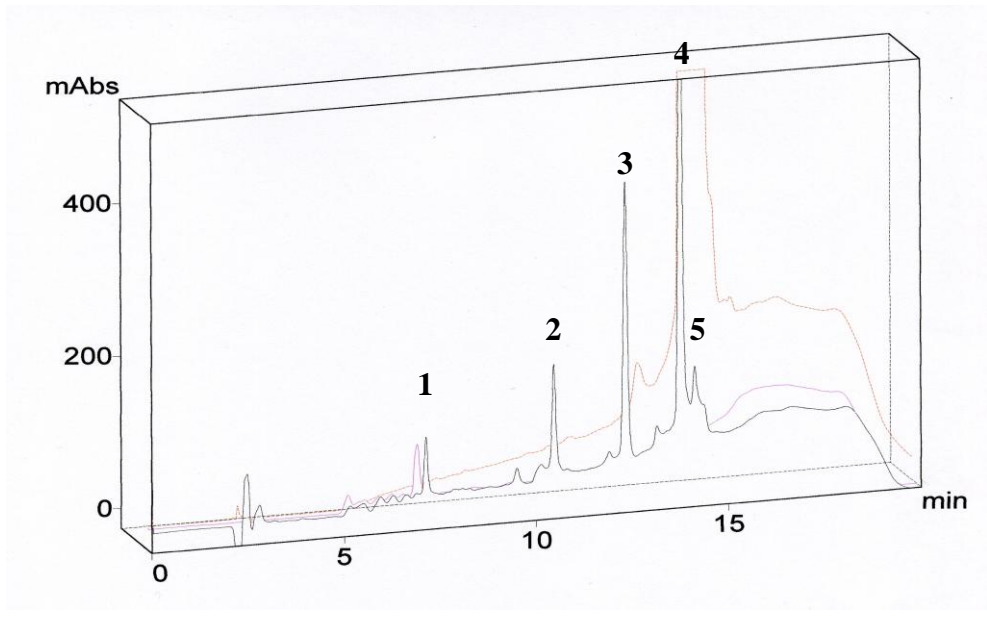


**Abbildung 3-2: DHBS-Aufreinigung mittels analytischer HPLC.** Die Abbildung zeigt ein HPLC-Chromatogramm der analytischen HPLC zur Überprüfung der Reinheit von DHBS, dem Monomeren von Enterobactin (Peak Nr. 1).



**Abbildung 3-3: Enterobactinaufreinigung mittels analytischer HPLC.** Die Abbildung zeigt ein HPLC-Chromatogramm der analytischen HPLC zur Überprüfung der Reinheit von Enterobactin (Peak Nr. 1).

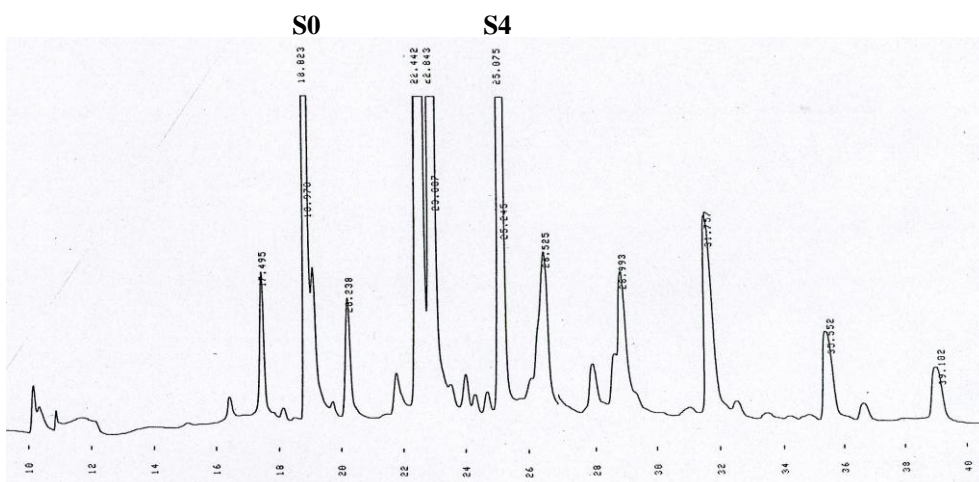
Die reinen Substanzen wurden zur Erstellung von Eichkurven benutzt, z. B. zur Positionsfestlegung von Enterobactin und seinen Abbauprodukten (2,3-Dihydroxybenzoesäure (DHB), DHBS bzw. Monomeres, Dimeres (D), Trimeres (T)) im Verlauf der zeitlichen Auftrennung der HPLC (Abbildung 3-4). Außerdem wurden mit definierten Enterobactinmengen die Referenzkurven für die Quantifikation von Enterobactin in der analytischen HPLC sowie für die Arnow-Reaktion (Catecholbestimmung) erstellt.



**Abbildung 3-4: Enterobactinstandard in der analytischen HPLC.** Zu sehen sind die einzelnen Peaks der Auftrennung, die den Abbauprodukten von Enterobactin und Enterobactin selbst entsprechen, in folgender Reihenfolge: DHBS (1), DHB (2), D (3), T (4) und Eb (5). Zum Positionsvergleich sind zwei weitere Chromatogramme mit dargestellt: DHBS (pink) und Enterobactin (rot).

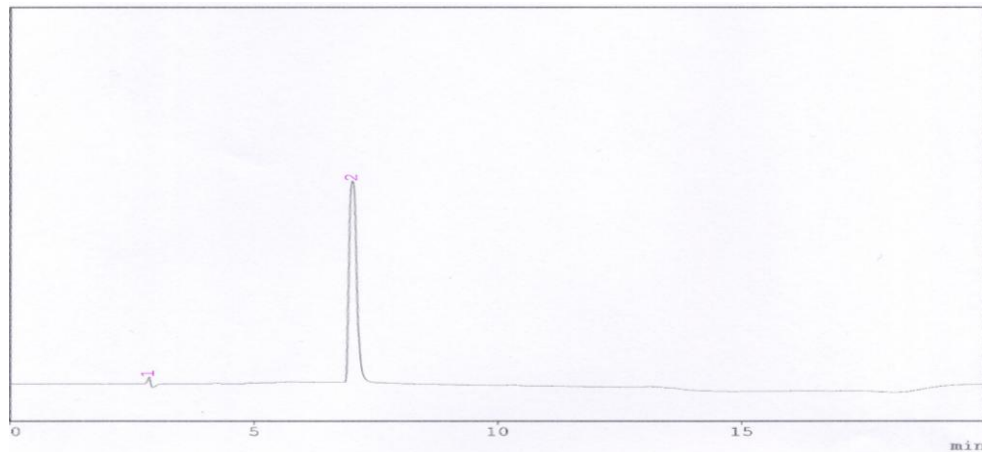
### 3.2.2 Salmocheline

Entsprechend der Aufreinigung der Enterobactinprodukte erfolgte die, der Salmocheline. Zunächst stand wiederum der Rohextrakt eines Salmochelinproduzenten vor der Aufarbeitung (Abbildung 3-5). Aufgereinigt wurden schließlich Salmochelin S0 und Salmochelin S4 mit Hilfe der präparativen und analytischen HPLC (Abbildung 3-6; Abbildung 3-7).

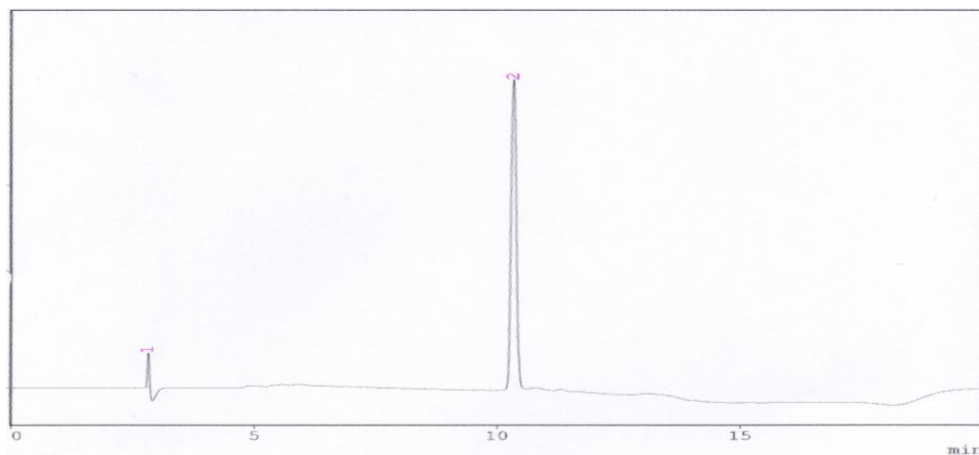


**Abbildung 3-5: Rohextraktprobe des Anzuchtmediums von *Salmonella enterica* ssp. *Typhimurium* [5544] vor der Aufreinigung.** Die Abbildung zeigt ein HPLC-Chromatogramm der präparativen HPLC mit den entsprechenden Peaks der Produkte aus dem *Salmonella*-Anzuchtmedium (M63 + Glycerol) nach Reinigung und Elution über eine DE52 Diethylaminoethyl Cellulosesäule.



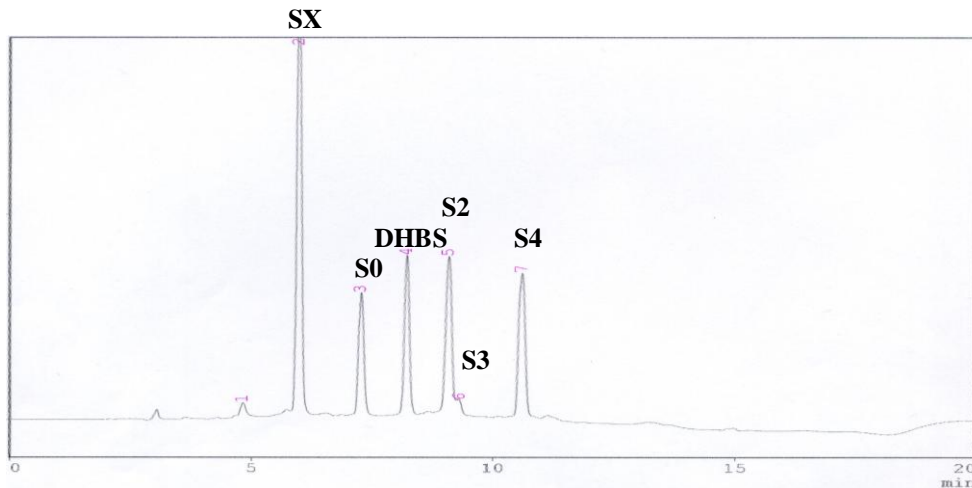


**Abbildung 3-6: Salmochelin S0-Aufreinigung mittels präparativer und analytischer HPLC.** Die Abbildung zeigt ein HPLC-Chromatogramm der analytischen HPLC zur Überprüfung der Reinheit von S0 (Peak Nr. 2).



**Abbildung 3-7: Salmochelin S4-Aufreinigung mittels präparativer und analytischer HPLC.** Die Abbildung zeigt ein HPLC-Chromatogramm der analytischen HPLC zur Überprüfung der Reinheit von S4 (Peak Nr. 2).

Salmochelin S4 und seine Abbauprodukte wurden für die Standardfestlegung im HPLC-Chromatogramm verwendet (Abbildung 3-8). S4 wurde außerdem für die Versuchsdurchführung der Wachstumsexperimente benötigt (3.3.7) sowie zur Verifizierung, dass Salmochelin nicht unspezifisch außen an Siderocalin (S) bindet und deshalb in der HPLC nachgewiesen werden kann. Zusätzlich wurde anhand der gewonnenen Substanz eine Standardreihe zur Quantifizierung von Proben unbestimmter S4-Menge festgelegt. Salmochelin S0 wurde für einige Experimente benötigt, die sich mit der näheren Strukturaufklärung dieses Siliciumkomplexes und seiner Eigenschaften befassen und von der Gruppe von Prof. Dr. Roderich Süßmuth in Berlin durchgeführt wurden (Schmiederer *et al.*, 2011).



**Abbildung 3-8: Salmochelinstandard in der analytischen HPLC.** Zu sehen sind die einzelnen Peaks der Auftrennung, die den Abbauprodukten von Salmochelin und Salmochelin selbst entsprechen.

## 3.3 Siderocalin und seine Liganden

### 3.3.1 Produktion und Aufreinigung von Siderocalin

Die Produktion von Siderocalin erfolgte rekombinant mittels GST-Tag in *E. coli* BL21 (DE3) [2173] und in *E. coli* Nissle 1917 [5603]. Je nach Stamm wurden zwei verschiedene Protokolle angewandt. Bei *E. coli* Nissle 1917 erfolgte die Produktion des Fusionsproteins mit Hilfe der im Plasmid pGP1-2 codierten T7-RNA-Polymerase durch temperaturabhängige Induktion. Bei *E. coli* BL21 wurde die T7-RNA-Polymerase mittels IPTG induziert.

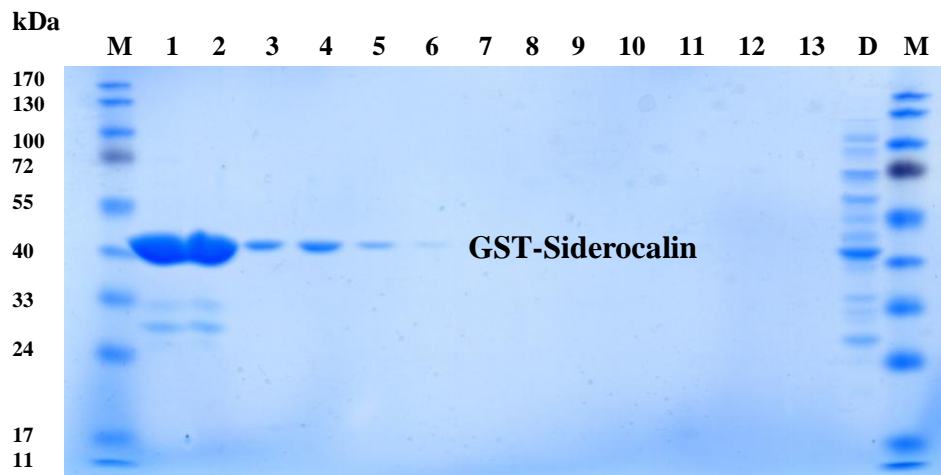
Aufgereinigtes rekombinantes Siderocalin aus einem enterobactinproduzierenden *E. coli* BL21, enthielt immer gebundenes Enterobactin in variierender Menge (3.3.6).

**Abbildung 3-9: Reines GST-Siderocalin in Lösung in PBS nach der Aufreinigung.** Siderocalin wurde stets mit gebundenem Enterobactin isoliert (3.3.6). Die Rosafärbung zeigt die Beladung mit Eisen-Enterobactin an.



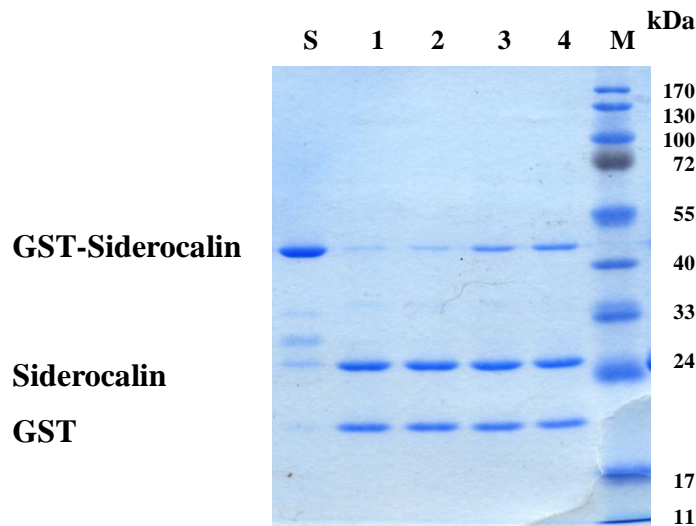
### 3.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Siderocalin)

Um die Größe des Proteins und die Reinheit der Proteinfraktionen zu überprüfen, wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Abbildung 3-10 zeigt ein beispielhaftes SDS-Gel (11 %iges Polyacrylamidgel) mit Elutionsfraktionen sowie dem Durchlauf und entsprechenden Größenmarkern, angefärbt mit Coomassie Blue. Die größte Proteinmenge wurde in den Fraktionen eins und zwei gefunden. Der Durchlauf enthielt noch eine geringe Menge an Siderocalin, der größte Teil wurde von der Glutathionsäule gebunden. Da Siderocalin als Fusionsprotein produziert wurde, setzt sich die endgültige Größe aus dem 25 kDa Siderocalin und dem GST-Tag von 23 kDa zusammen. Das Protein war somit in Höhe von 48 kDa zu finden.



**Abbildung 3-10: SDS-PAGE der Elutionsfraktionen nach Überexpression von Siderocalin in BL21 (11 %iges SDS-Gel).** Aufgetragen wurden jeweils 20 µl Probenmischung und 5 bzw. 10 µl Marker. Links wurde Proteinmarker (M) aufgetragen, es folgten 13 Siderocalinfraktionen (1-13) à 1 ml Eluat und die Durchlaufraktion (D), abschließend erneut eine Spur mit Proteinmarker. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Blue.

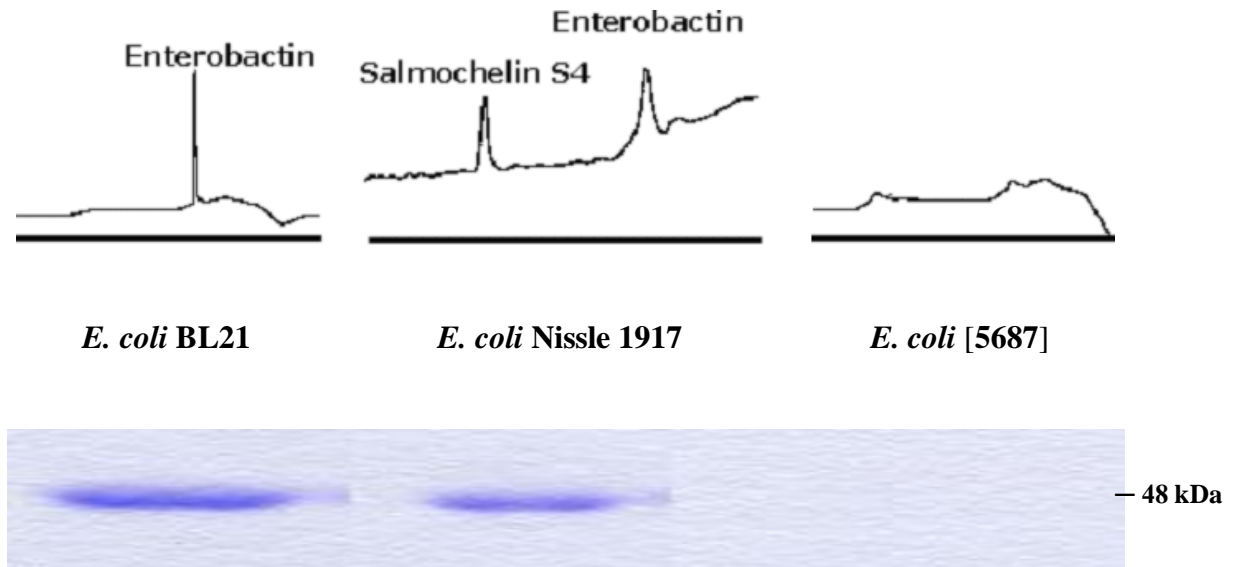
Des Weiteren wurde eine GST-Abspaltung mittels Thrombinverdau durchgeführt. In der Gelelektrophorese wurden die Spaltprodukte Siderocalin und GST in der erwarteten Größe von 25 kDa bzw. 23 kDa nachgewiesen (Abbildung 3-11). Der Verdau wurde durchgeführt, um eventuell auftretende Probleme, verursacht durch den GST-Tag, in den Bindestudien (3.3.3) zu umgehen. Da sich Siderocalin mit und ohne GST-Rest gleich verhielt, wurde im weiteren Verlauf auf diesen zusätzlichen Aufreinigungsschritt verzichtet.



**Abbildung 3-11: SDS-PAGE von GST-Siderocalin vor und nach Verdau durch Thrombin.** Aufgetragen wurden jeweils 20 µl Probenmischung und 10 µl Marker. Links wurde Siderocalin (S) in PBS aufgetragen, es folgten vier Siderocalinfraktionen (1-4) nach fünfständigem Thrombinverdau, mit zunehmender Thrombinverdünnung (1 : 25; 1 : 50; 1 : 100; 1 : 200), anschließend eine Spur mit Proteinmarker (M). Die Färbung erfolgte mit Coomassie Blue.

#### 3.3.3 HPLC-Analyse von Siderocalin

Die Analyse der Siderocalinproteinlösungen auf gebundene Liganden erfolgte mittels HPLC. Um die Detektion aller Moleküle zu gewährleisten, d. h. Adsorptionsvorgänge zu unterbinden, und um die Vorsäule vor Verunreinigungen zu schützen, wurde die Lösung zunächst mit Proteinase K verdaut. Nach Zentrifugation zur Entfernung etwaiger größerer Partikel erfolgte die Untersuchung. Bei 220 nm Wellenlänge mit einem ansteigenden Acetonitrilgradienten konnten Siderophore erfolgreich detektiert werden. Abbildung 3-12 zeigt das Ergebnis mehrerer Proteinanalysen von Siderocalin, produziert in drei verschiedenen Stämmen. *E. coli* BL21 produziert nur Enterobactin als Siderophor. Gereinigtes Protein aus BL21 enthielt laut HPLC-Analyse nur Enterobactin als Ligand. *E. coli* Nissle 1917 produziert zusätzlich zu Enterobactin Salmochelin als zweifach glycosyliertes Enterobactin, Aerobactin und Yersiniabactin. Das gereinigte Protein enthielt sowohl Enterobactin als auch Salmochelin. Die Untersuchung des Siderocalins in acht voneinander unabhängigen Experimenten ergab eine Bindung von Enterobactin und Salmochelin im Verhältnis von 1 : 1,2 (45 % zu 55 %) und eine Gesamtcatecholbelastung von ca. 21 % der Proteinmoleküle (3.3.6). Aerobactin und Yersiniabactin wurden hingegen nie detektiert. Die Untersuchung von [5687] (MC4100  $\Delta$ entC), der keine Siderophore produziert, wurde von Frau Dr. M. Valdebenito durchgeführt. Es wurde wie zu erwarten kein Siderophor in der HPLC festgestellt, zusätzlich wurden nur geringe Mengen an Siderocalin produziert (ca. 10 % der erwarteten Menge).



**Abbildung 3-12:** Das obere Teilbild zeigt HPLC-Chromatogramme der Detektion, der an Siderocalin gebundenen Siderophore; Der untere Abschnitt der Abbildung zeigt die korrespondierenden Stamminformationen sowie das dazugehörige Gelbild der SDS-PAGE auf Siderocalinhöhe von ca. 48 kDa. BL21 (DE3) [2173] produziert als Siderophor nur Enterobactin, Nissle 1917 [5603] hingegen Aerobactin, Enterobactin, Salmochelin und Yersiniabactin, *E. coli* MC4100  $\Delta$ entC [5687] produziert keine Siderophore. Untersucht wurde jeweils isoliertes Siderocalin nach Überexpression. BL21 wies Protein auf sowie gebundenes Enterobactin, [5687] zeigte eine schwache Siderocalinproduktion und keine gebundenen Siderophore, Nissle 1917 wies wiederum Protein auf und gebundene Siderophore: Enterobactin und Salmochelin. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Blue.

### 3.3.4 Ligandenkonkurrenzversuch: Enterobactin und Salmochelin

Zur Überprüfung, ob an Siderocalin gebundenes  $\text{Fe}^{3+}$ -Enterobactin *in vitro* von  $\text{Fe}^{3+}$ -Salmochelin verdrängt und ersetzt werden kann, wurden zwei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Dafür wurde eine GSTrap<sup>TM</sup>-Säule mit GST-Siderocalin (mit partieller Enterobactinbeladung) beladen und anschließend für 30 Minuten mit  $\text{Fe}^{3+}$ -Salmochelin äquilibriert. In dem nach Elution mit Glutathion isolierten Siderocalin ließ sich kein Salmochelin in der HPLC nachweisen.

### 3.3.5 Proteinmengenbestimmung von Siderocalin

Die Bradford-Proteinbestimmung erwies sich für Siderocalin als nicht günstig, da die Methode im Mikrotitermaßstab keine exakten Daten lieferte und die Bestimmung mit größeren Proteinmengen zu viel der Eluatmenge benötigte. Als verlässliche Methodik zur genauen Quantifizierung der Proteinmenge wurde der *bicinchoninic acid*-Test (BCA-Test) für jede Charge der Siderocalingewinnung durchgeführt. Die Proteinkonzentrationen zeigten Variationen, je nach Produktionsstamm und Produktionsbedingungen. Im eisenarmen M63 Medium für die Versu-

che aus 3.3.3 lagen die gewonnenen Siderocalinmengen bei 0,4 bis 0,8 mg/ml mit Ausnahme von *E. coli* [5687], der nur geringste Proteinmengen produzierte (ca. 10 %) (3.3.3).

#### 3.3.6 Siderophormengenbestimmung via Arnow-Reaktion und HPLC von Siderocalin

Die Quantifizierung der Siderophormengen in den Proteinproben wurde zur Absicherung nach zwei voneinander unabhängigen Methoden durchgeführt.

Der Arnow-Test wurde durchgeführt, um die Gesamt-Catecholmenge in den Proteinlösungen quantitativ zu ermitteln. In vier voneinander unabhängigen Experimenten wurde der Catecholgehalt von frisch isolierten Siderocalinlösungen bestimmt, mit einem mittleren Wert von 21 % beladener Proteinmoleküle. Dabei erfolgte die Umrechnung der ermittelten Daten auf den Catecholgehalt der Probe im Arnow-Test über einen Eichstandard von 2,3-Dihydroxybenzoesäure (Abbildung 3-13) und zur Überprüfung auf etwaige Unterschiede ebenfalls über einen Eichstandard von Salmochelin, mit nahezu identischem Ergebnis (Grafik nicht dargestellt;  $y = 0,0055 x$ ;  $R^2 = 0,9877$ ).

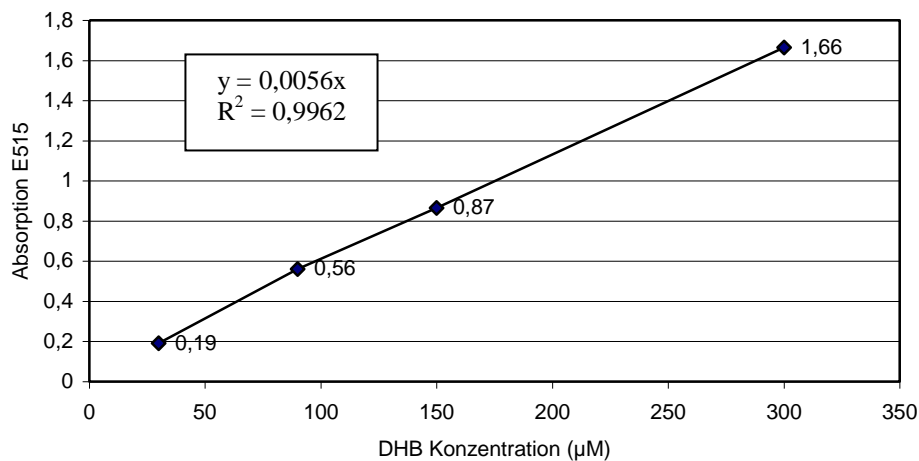


Abbildung 3-13: Darstellung der Eichgeraden für definierte Mengen an DHB. Ermittelt via Arnow-Test.

Die Siderophormenge wurde ebenfalls mit Hilfe der HPLC-Anlage bestimmt. Dazu wurden definierte Proben von DHB und / oder Enterobactin aufgetrennt und quantitativ ausgewertet. Abbildung 3-14 zeigt die Eichgerade basierend auf Messungen definierter Enterobactinmengen

in der HPLC, anhand der, die Proben unbekanntes Enterobactingehaltes eingeordnet werden konnten.

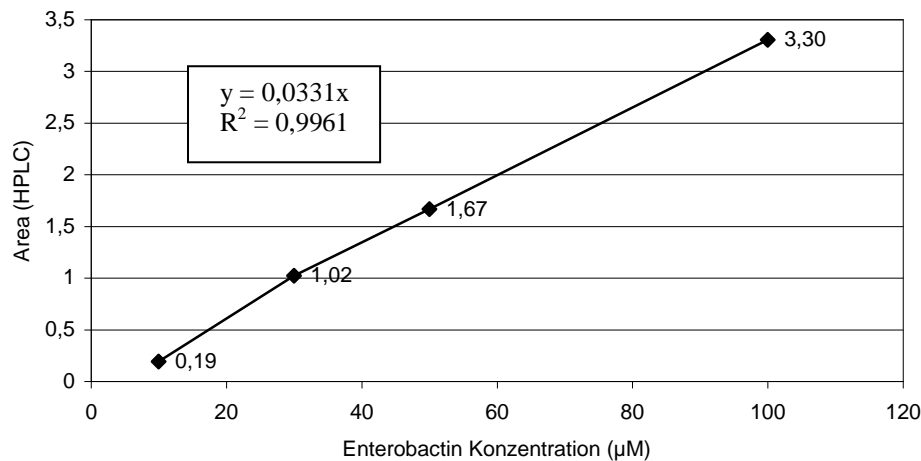
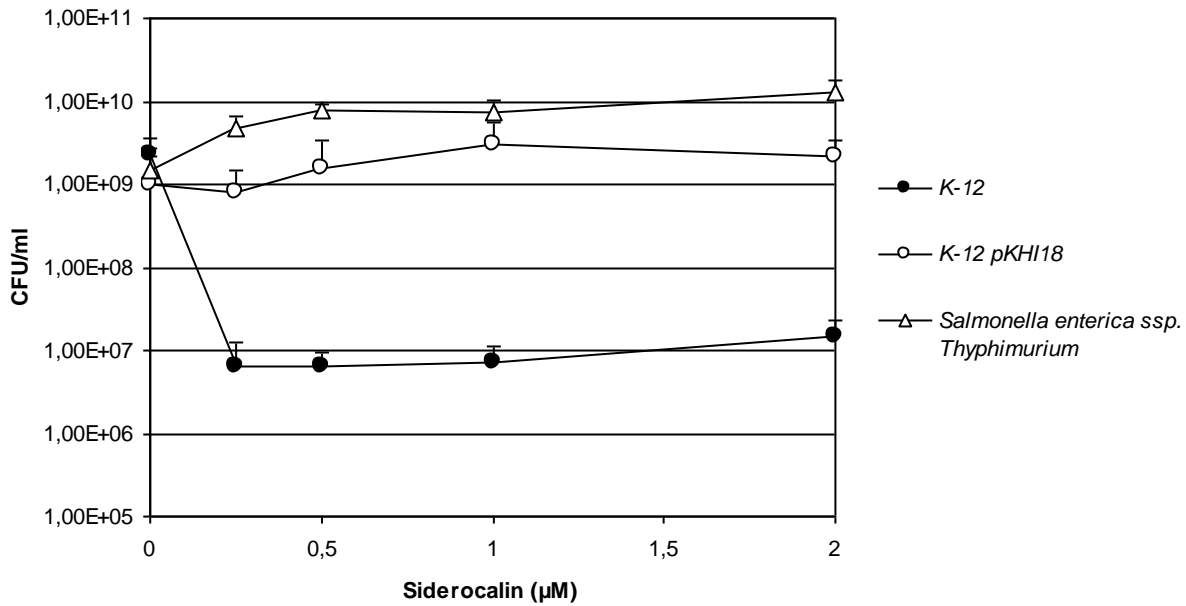


Abbildung 3-14: Darstellung der Eichgeraden für definierte Mengen an Enterobactin. Ermittelt via HPLC.

### 3.3.7 Wachstumstests zum Bindungsverhalten von Salmochelin an Siderocalin

Mit Wachstumsversuchen sollte die Frage geklärt werden, ob Siderocalin auch das Wachstum von Salmochelinproduzenten hemmt. Getestet wurden *E. coli* K-12 MG1655 [5538], der nur Enterobactin produziert, derselbe *E. coli* K-12 mit pKHI18, der zusätzlich Salmochelin herstellt und *Salmonella enterica* ssp. Typhimurium [205], der ebenfalls Enterobactin und Salmochelin produziert. Als Medium diente RPMI (+ 10 % FBS), ein Zellkulturmedium zur Simulation der Situation im Wirt. Diesem Medium wurden ansteigende Mengen an Siderocalin zugesetzt. Nach 16 Stunden wurden die Kolonie bildenden Einheiten (CFU) anhand von Verdünnungsausstrichen auf TY-Platten bestimmt. Die Ergebnisse sind der Abbildung 3-15 zu entnehmen. Der K-12 Stamm wurde als einziger Stamm im Test im Wachstum von Siderocalin inhibiert. Die beiden Salmochelinproduzenten blieben weitgehend ohne Reaktion auf ansteigende Mengen des Lipocalins und zeigten somit keine Hemmung. Salmochelin scheint intakt gefaltetem Siderocalin nicht als Ligand zu dienen.

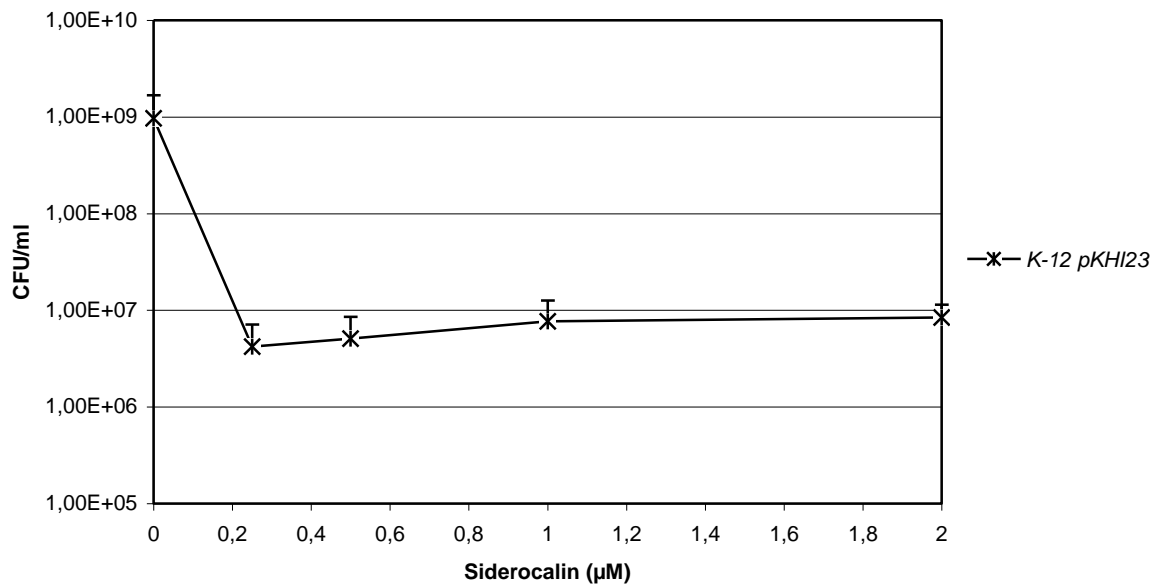
### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3-15: Wachstumsexperimente in Gegenwart von Siderocalin.** Die Stämme *E. coli* K-12 MG1655 [5538], *E. coli* K-12 MG1655 [5538] pKHI18 (*iroBCDEN*) und *Salmonella enterica* ssp. Typhimurium [205] wurden in RPMI-Medium mit 10 % FBS bei 37°C unter aeroben Bedingungen angezogen. GST-Siderocalin wurde in den angegebenen Konzentrationen zugefügt; Nach 16 Stunden Inkubation wurden die CFU-Daten bestimmt. Die Y-Achse zeigt die logarithmischen Werte an (n = 6). Wachstumsinhibition tritt nur bei Stämmen ohne Salmochelinproduktion auf.

Das Wachstum von *E. coli* K-12 mit pKHI18 (*iroBCDEN*) zeigte mit ansteigender Siderocalin-zugabe eine leichte Steigerung. Ein Grund für diese Beobachtung könnte die Mobilisierung gebundenen Enterobactins aus Siderocalin sein oder, dass IroN, der Salmochelinrezeptor, Enterobactin bzw. Salmochelin aus Siderocalin extrahiert. Zur Überprüfung dieser Möglichkeit wurde der Versuch mit *E. coli* K-12, transformiert mit pKHI23 (*iroDEN*), wiederholt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3-16 dargestellt. Das Wachstum wurde in gleichem Maße inhibiert wie bei dem Enterobactinproduzenten aus Abbildung 3-15, so dass geschlussfolgert werden kann, dass IroN nicht in der Lage ist, Enterobactin bzw. Salmochelin aus dem Protein-Siderophor-Komplex verfügbar zu machen.





**Abbildung 3-16: Wachstumsexperimente in Gegenwart von Siderocalin.** Der Stamm *E. coli* K-12 MG1655 [5538] pKHI23 (*iroDEN*) wurde in RPMI-Medium mit 10 % FBS bei 37°C unter aeroben Bedingungen angezogen. GST-Siderocalin wurde in den angegebenen Konzentrationen zugefügt; Nach 16 Stunden Inkubation wurden die CFU-Daten bestimmt. Die Y-Achse zeigt die logarithmischen Werte an (n = 4). Das Wachstum wird durch Zusatz von Siderocalin inhibiert.

### 3.3.8 Siderocalin und Desferal®

Desferrioxamin B (Desferal®) ist ein Chelatbildner mit sehr hoher Affinität zu dreiwertigen Eisenionen. Es handelt sich dabei um das eisenfreie Salz von Ferrioxamin und wird in der Medizin als Eisenfänger bei akuter Eisenvergiftung und bei Patienten mit Anämien angewandt, die transfusionsbedingt an chronischem Eisenüberschuss leiden (Porter, 2007). Aufgrund seiner Eigenschaften sollte getestet werden, ob die Inkubation mit einer Pufferlösung mit Desferal®-Zusatz im Stande ist, an Siderocalin gebundenes Enterobactin über Bindung der Eisenionen von Enterobactin zu befreien. Dazu wurde GST-Siderocalin an die Matrix einer Glutathionsäule gebunden und mit einer derartigen Lösung für 30 Minuten äquilibriert. Anschließend erfolgte die Proteinaufreinigung in gewohnter Weise. Die Intensität der Rotfärbung der Proteinlösung änderte sich nicht im Vergleich zur Ausgangslösung. Ebenso wenig ergab die anschließend durchgeführte HPLC-Analyse eine Verminderung des Enterobactingehaltes. Dies zeigt die starke Bindung von Enterobactin an Siderocalin.

### 3.3.9 Siderocalin und Dextran

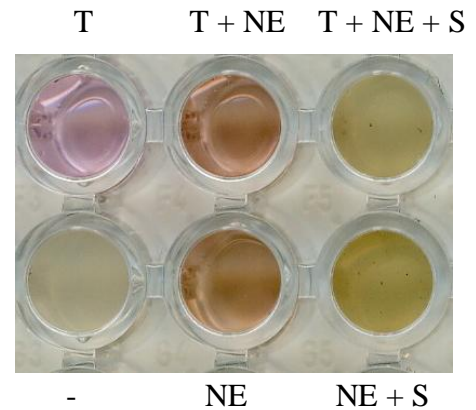
Laut Literatur kann Hydroxyalkoxypropyl-Dextran Typ VI (Lipidex) eingesetzt werden, um Lipocaline von ihren hydrophoben Liganden zu befreien (Cancedda *et al.*, 1996). Mit dieser Methode wurde versucht, Enterobactin aus beladenen Siderocalin Molekülen zu entfernen. Allerdings waren diese Versuche auch nach mehreren Anläufen erfolglos (Daten nicht gezeigt).

### 3.3.10 Siderocalin, Adrenalin / Noradrenalin und Transferrin

Da Siderocalin ein Säugerprotein darstellt, das mit bakteriellen Stoffwechselprodukten interagiert, sollte überprüft werden, ob eine weitere Form der Interaktion mit wirtseigenen Hormonen wie z. B. Adrenalin (Epi) oder Noradrenalin (NE) existiert. Entsprechende Experimente wurden durchgeführt mit RPMI (+ 10 % FBS) als Versuchsmedium mit ansteigenden Konzentrationen an Adrenalin bzw. Noradrenalin (0, 1, 50, 100 und 200  $\mu\text{M}$ ) sowie zunehmender Inokulationszahl in je drei Ansätzen (0, 200, 2.000, 20.000, und 200.000 Bakterien pro ml; *E. coli* AB2847  $\Delta\text{aroB}$  [86], *E. coli*  $\Delta\text{aroB}$   $\Delta\text{lac}$  [456] und *E. coli* ABU [5814]) mit und ohne den Zusatz von Siderocalin (50  $\mu\text{M}$ ). Nach einer Inkubationsdauer von 16 Stunden unter Schütteln bei 37°C wurden die Ansätze photometrisch ausgewertet. Die Ergebnisse zeigten, dass durch Noradrenalin dosisabhängig das Wachstum gefördert wurde (Daten nicht gezeigt). Bei den unterschiedlichen Bakteriendichten zu Beginn, ergab sich nur eine leichte Steigerung der gemessenen Absorption bei höheren Bakterienzugaben (Daten nicht gezeigt). Der Zusatz von Siderocalin blieb ohne Auswirkung (Daten nicht gezeigt).

Derselbe Versuchsansatz wurde in leicht veränderter Form mit Noradrenalin in RPMI unter Zusatz einer Transferrinmischung (T-Mischung) (3 g/l; 30 %ige Eisenbeladung durch Mischung von Holo- und Apo-Transferrin; entsprechend den Bedingungen im menschlichen Organismus) als potentieller Eisenquelle anstelle von FBS, mit ansonsten gleichem Protokoll durchgeführt. In Abbildung 3-17 ist ein exemplarisches Ergebnis eines solchen Experimentes zu sehen. Ersichtlich wurde zum einen ein verstärktes Wachstum ohne Transferrinzugabe (ursprünglich rosafarbenes RPMI leicht eingetrübt), zum anderen eine Zunahme der bakteriellen Zellmasse mit Zusatz von Noradrenalin sowie eine weitere Erhöhung, wenn zusätzlich Siderocalin beigemischt wurde (starke Eintrübung). Dies wurde durch photometrische Messungen bestätigt (Daten nicht gezeigt).

**Abbildung 3-17: Dokumentation eines Wachstumsexperimentes nach 16-stündiger Inkubation.** In der oberen Reihe erfolgte die Animpfung mit 2.000 Bakterien *E. coli* ABU [5814] pro ml in RPMI mit, in der unteren ohne Transferrin (T) (3 g/l; 30 %ige Eisenbeladung). Links ohne weitere Zugaben, mittig mit Noradrenalin (NE) (50  $\mu$ M) und rechts mit Noradrenalin (50  $\mu$ M) und Siderocalin (S) (50  $\mu$ M). Versuche mit den zwei weiteren untersuchten Stämmen, zeigten gleiche Ergebnisse. Zu erkennen ist eine Wachstumsstimulation mit Zusatz von NE, die durch S weiter gesteigert wird. Mit T wird das Wachstum im Vergleich inhibiert.



Die Ergebnisse zeigen, dass Transferrin das bakterielle Wachstum einschränkt, vermutlich durch Bindung eines Teils der verfügbaren Eisenionen. Durch Zugabe von Noradrenalin wird das Wachstum stimuliert (zusätzliche Eisenquelle), und zugefügtes Siderocalin erhöht die Zellmenge nochmals (Einbringen gebundener und zum Teil frei werdender Siderophore). Dieses Ergebnis zeigt, dass Siderocalin in dieser Versuchsanordnung nicht in der Lage ist, Noradrenalin zu binden und dieses den Bakterien zu entziehen.

### 3.4 Das Zweikomponentensystem QseBC und das Protein YgiW

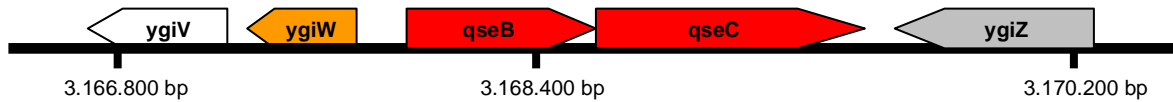
Der dritte Abschnitt innerhalb des großen Themas „Siderophore und Eisenmetabolismus“ beschäftigt sich mit Versuchen rund um die Aufklärung der Rolle des Zweikomponentensystems QseBC sowie des Proteins YgiW innerhalb der Regulationsmechanismen der bakteriellen Eisenversorgung.

QseC wird in der Literatur beschrieben als prokaryotischer Rezeptor, sowohl für das prokaryotische Signalmolekül *autoinducer-3* (AI-3), als auch für die eukaryotischen Signale hormoneller Natur Adrenalin und Noradrenalin (Clarke *et al.*, 2006). In Folge der Signalübermittlung werden bei diesen Bakterien virulenzspezifische Mechanismen induziert und Motilitätsgene aktiviert. Damit spielt QseC eine verbindende Rolle in der Kommunikation zwischen Wirt und Pathogen, ebenso wie innerhalb der Bakterienpopulation (Clarke *et al.*, 2006). Da Enterobactin und Salmochelin wie auch Adrenalin und Noradrenalin Catechole sind, sollte deren Einfluss auf das QseBC-Zweikomponentensystem im Folgenden, anhand ausgewählter Komponenten dieser beiden Siderophorsysteme, näher untersucht werden.

YgiW ist ein periplasmatisches Protein mit bislang unbekannter Funktion. Codiert wird es stromaufwärts von *qseBC* in entgegengesetzter Richtung, was die Vermutung nahe legt, dass ein funktioneller Zusammenhang zu QseBC besteht. Aufgrund dessen wurde YgiW in die folgenden Untersuchungen mit einbezogen.

### 3 Ergebnisse

Die Anordnung und Orientierung der Gene *ygiW*, *qseB* und *qseC* im Genom von *E. coli* K-12 (MG1655) ist der Abbildung 3-18 zu entnehmen.

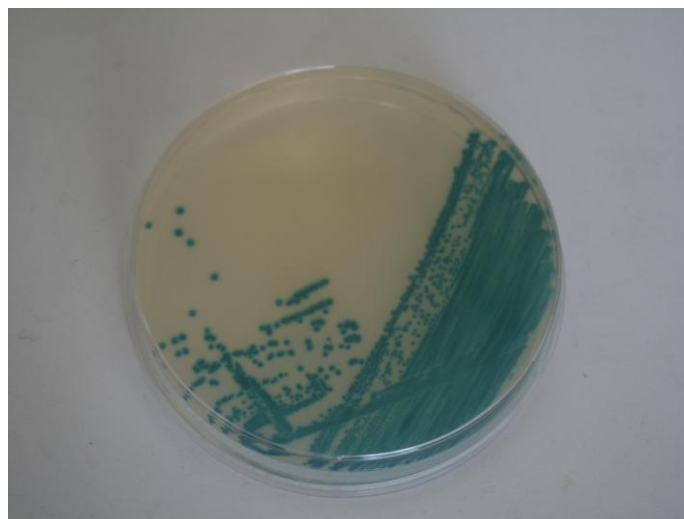


**Abbildung 3-18: Orientierung und Position der Gene *ygiW*, *qseB* und *qseC* im Genom von *E. coli* K-12 (MG1655) (gleiche Genfarbe steht für das gleiche Operon).** Gene und ihre Produkte: *ygiV* = vorhergesagter transkriptioneller Regulator; *ygiW* = konserviertes periplasmatisches Protein; *qseB* = Regulationsprotein des Zweikomponentensystems; *qseC* = Sensorprotein / Histidinkinase des Zweikomponentensystems; *ygiZ* = konserviertes IM-Protein

#### 3.4.1 Herstellung von LacZ-Operonfusionen

Zur Untersuchung der Genregulation wurden Promotorfusionen mit *lacZ* als Reportergen nach Simons *et al.* (Simons *et al.*, 1987) konstruiert. Als Promotoren wurden jeweils der von *fes*, *fepA* und *iroN* ausgewählt, um sowohl Komponenten des Enterobactin- (*fes*, *fepA*), als auch des Salmochelinsystems (*iroN*) zu untersuchen. Der entsprechende Promotorbereich wurde vor das Reportergen *lacZ* in das Plasmid pRS415 ligiert und die Konstruktion über Sequenzierung verifiziert. Die jeweilige Promotor-*lacZ*-Fusion wurde von dem Plasmid mittels homologer Rekombination *in vivo* auf den  $\lambda$ -Phagen  $\lambda$ RS45 übertragen. Die zu untersuchenden Stämme bzw. Mutanten wurden später mit dem entsprechenden Phagenkonstrukt lysogenisiert, um schließlich die Fusion als eine Kopie in deren Genom integriert zu wissen. Die qualitative Auswahl erfolgreicher LacZ-Reportergen-Fusionsstämmen erfolgte dabei mittels X-Gal (Abbildung 3-19).

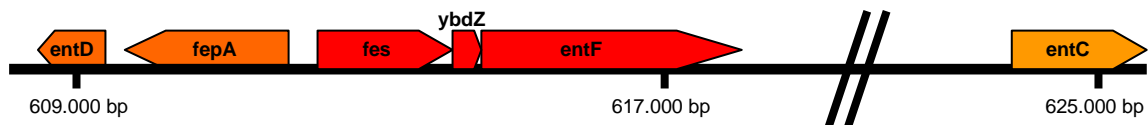
**Abbildung 3-19: Verdünnungsausstrich von BW25113 [5863] mit  $\lambda$ *fepA-lacZ* auf  $\lambda$ -Platten + X-Gal (0,2 mg/ml) + Desferal® (50  $\mu$ M) nach erfolgreicher chromosomaler Integration in das *E. coli* Genom.** Die einheitliche Blaufärbung durch den Umsatz von X-Gal indiziert den Nachweis der intakten  $\beta$ -Galaktosidase im Genom des zu untersuchenden Stammes.



Zur Kontrolle wurde eine Überprüfung der LacZ-Induktion auf MacConkey-Platten mit Dipyrindyl-Teststreifen

durchgeführt: Ist *lacZ* an einen durch Fur regulierten Promotor wie z. B. die Promotoren von *fes*, *fepA* oder *iroN* fusioniert, wachsen die Bakterienkolonien unter Eisenmangel, also im Diffusionsbereich des Dipyridyls, rot.

Abbildung 3-20 zeigt die Position und Orientierung der im Verlauf der Experimente untersuchten Gene wie *fepA*, *fes*, *entF* und *entC*. Der Abbildung 3-21 ist die Orientierung der Gene des Genclusters *iroA* zu entnehmen, mit den Genen *iroN*, *iroE*, *iroD*, *iroC* und *iroB* als relevanter Ausstattung zur Salmochelinproduktion.



**Abbildung 3-20: Orientierung und Position der Gene *fepA*, *fes*, *entF* und *entC* im Genom von *E. coli* K-12 (MG1655) (gleiche Genfarbe steht für das gleiche Operon). Gene und ihre Produkte: *entD* = Phosphopantetheinyl Transferase; *fepA* = Enterobactin OM-Rezeptor; *fes* = Fe-Enterobactin Esterase; *entF* = Enterobactin Synthase Komponente F; *entC* = Isochorismat Synthase**



**Abbildung 3-21: Karte des *iroA* Genclusters bei *S. enterica* und uropathogenen *E. coli* Stämmen. Gene und ihre Produkte: *iroA* = *iro*-Gencluster; *iroN* = Salmochelin Rezeptor; *iroE* = periplasmatische Salmochelin Esterase; *iroD* = cytoplasmatische Salmochelin Esterase; *iroC* = multidrug resistance protein ABC exporter; *iro* = Glycosyltransferase**

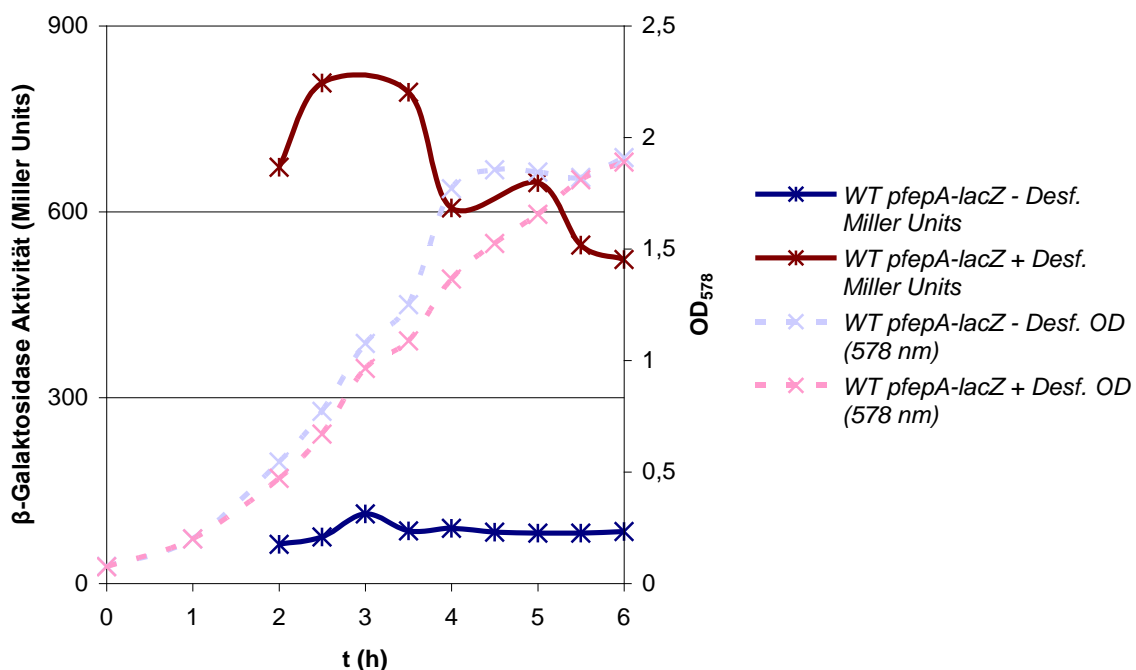
#### 3.4.1.1 $\beta$ -Galaktosidase als Reporterenzym für eisenregulierte Gene

Das Gen *lacZ*, das für die  $\beta$ -Galaktosidase codiert, wird in der Molekularbiologie häufig als Reportergen eingesetzt. Die spezifische Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase wird quantitativ mit ONPG als Laktose-Analogon bestimmt. Durch hydrolytische Spaltung entsteht aus farblosem ONPG Galaktose und gelbes o-Nitrophenol. Für unsere Messungen wurde die  $\beta$ -Galaktosidase als Reporter für die Aktivität verschiedener Promotoren eingesetzt, um deren Rolle und Regulation aufzuklären.

Alle Messungen erfolgten, wenn nicht anders angegeben, nach Vorkultur in eisenreichem Medium unter eisenarmen Bedingungen, d. h. NB-Medium zusätzlich versetzt mit dem Eisenfänger Desferal<sup>®</sup>. Die Abbildung 3-22 zeigt die Ergebnisse einer  $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung über den Zeitraum von sechs Stunden einmal mit und einmal ohne den Zusatz von Desferal<sup>®</sup> zum Medium, bei Messung derselben Stammkonstruktion (*E. coli* Wildtyp mit *pfepA-lacZ*).

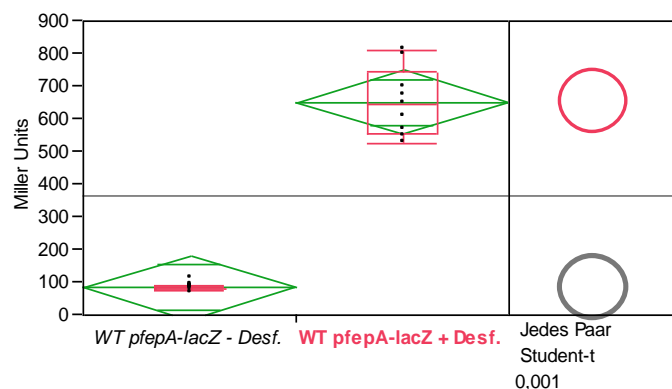
### 3 Ergebnisse

Der Unterschied ist deutlich zu sehen, die Induktion mit Desferal<sup>®</sup> ist mindestens um ein Sechsfaches erhöht. Der Grund liegt in der geschaffenen eisenarmen Umgebung, die die von Fur regulierten Gene, in diesem Fall den Promotor von FepA, dereprimiert und so die LacZ-Expression parallel erhöht (für nähere Erläuterungen siehe 3.4.1 und 3.4.1.2). Abbildung 3-23 zeigt die dazugehörige statistische Auswertung mit einem hoch signifikanten Unterschied. Die entsprechenden Wachstumskurven sind ebenfalls der Abbildung 3-22 zu entnehmen. Es sind keine bedeutenden Unterschiede festzustellen, mit Desferal<sup>®</sup> ist ein leicht schlechteres Wachstum zu beobachten, die Statistik dazu zeigt keine signifikanten Unterschiede (Grafik nicht gezeigt).



**Abbildung 3-22:  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der FepA-LacZ-Fusion sowie das Wachstum von *E. coli* K-12 [5863] mit und ohne Zusatz von Desferal<sup>®</sup>.** Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium (+/- 50  $\mu$ M Desferal<sup>®</sup>). Zu Grunde liegender Stamm war BW25113. Die Werte sind angegeben in *Miller Units* und entsprechen der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bzw. in  $OD_{578nm}$ -Messwerten und stellen die Absorption dar.

**Abbildung 3-23: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-22.** Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist hoch signifikant ( $p \leq 0,001$ ).



#### 3.4.1.2 Siderophorsysteme: Enterobactin und Salmochelin

Clarke *et al.* haben die Rolle der Catechole Adrenalin bzw. Noradrenalin und des Zweikomponentensystems QseBC in der bakteriellen Pathogenese untersucht und sie als Signalmoleküle pathogener *E. coli* Bakterien identifiziert (Clarke *et al.*, 2006). Enterobactin und Salmochelin gehören ebenfalls zur Gruppe der Catecholate und weisen strukturelle Ähnlichkeiten mit den Signalmolekülen des Wirtes auf.

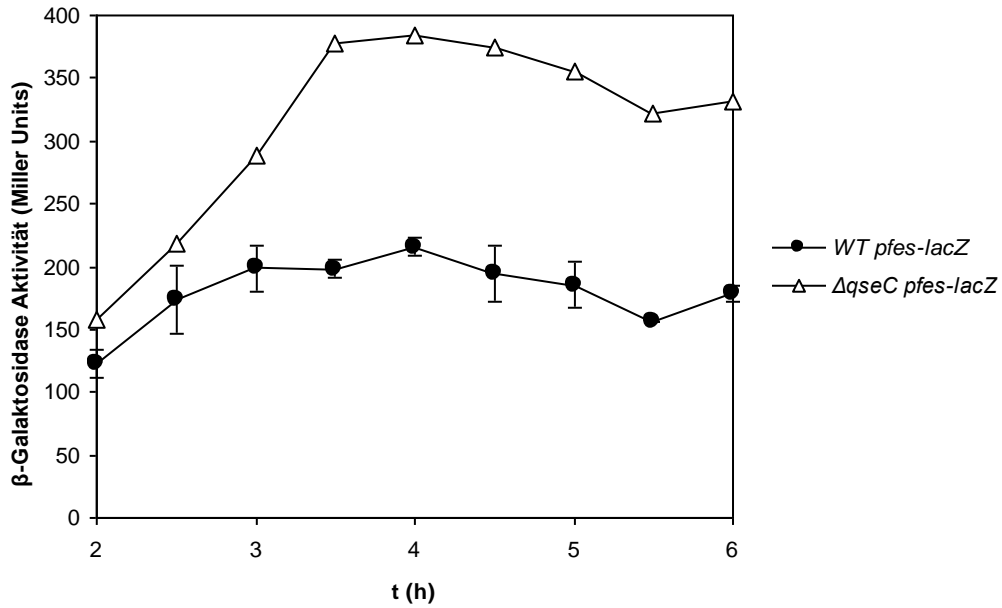
Die Gene *qseB* und *qseC* gehören zur normalen Genausstattung von fäkal coliformen *E. coli* und lassen somit weitere Funktionen vermuten. Wir untersuchten deshalb die Beteiligung an den Regulationsmechanismen der Siderophorproduktion durch die Analyse unterschiedlicher Gene des siderophorassoziierten Metabolismus auf ihre Induktion in Mutanten des QseBC-Systems.

#### Enterobactin

##### Fes

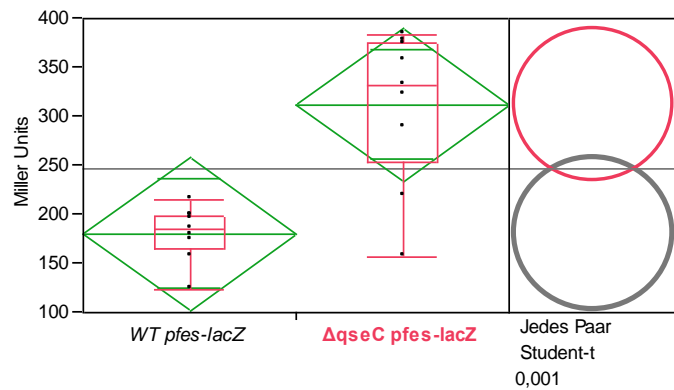
Der Fes-Promotor reguliert die Transkription von *fes* und *entF*. Das Gen *entF* codiert für eine Untereinheit des Enterobactinsynthese-Multienzym-Komplexes, *fes* codiert für die Esterase, die Fe<sup>3+</sup>-Enterobactin degradiert und so bei der Eisenfreisetzung im Zytoplasma hilft. Der Promotor wurde mit dem *lacZ*-Gen für die  $\beta$ -Galaktosidase gekoppelt und in verschiedene Mutanten eingebracht. Durch die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität konnte die Induktion des *fes*-Gens bestimmt werden.

Die Ergebnisse der Experimente mit der *qseC*-Mutante und dem entsprechenden Wildtyp sind der Abbildung 3-24 zu entnehmen. Die Untersuchung der *qseC*-Mutante zeigt eine Erhöhung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität um den Faktor 1,7 im Vergleich zum Wildtyp, d. h. ein Fehlen dieses Gens erhöht die Expression der *pfes-lacZ*-Operonfusion. QseC inhibiert demnach die Expression von *fes* mit dem dahinter liegenden *entF* und somit die Enterobactinsynthese. Insgesamt wird potentiell weniger Eisen des umgebenden Mediums aufgenommen. Die Datensätze sind dabei hoch signifikant verschieden (Abbildung 3-25). Abbildung 3-26 und Abbildung 3-27 beziehen sich auf die entsprechenden Wachstumskurven und zeigen ein ähnliches Wachstumsverhalten beider Stämme auf, wobei die Mutante leicht schlechter wächst, aber ohne signifikanten Unterschied zum Wildtyp.

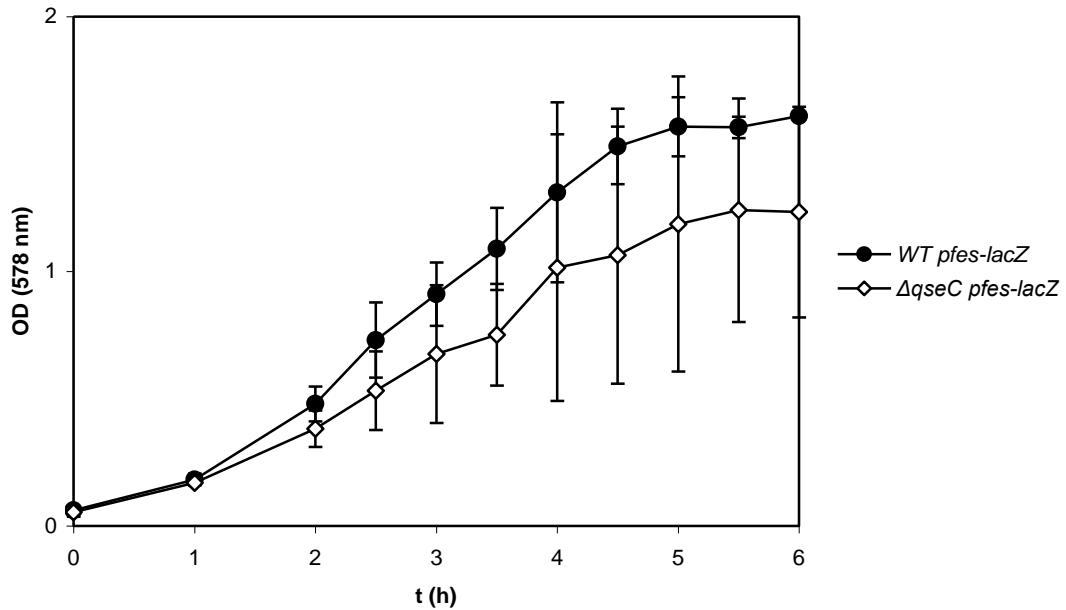


**Abbildung 3-24: β-Galaktosidase-Aktivität der Fes-LacZ-Fusion in *E. coli* K-12 [5885] und einer  $\Delta$ *qseC*-Mutante [5881].** Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 μM Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war BW25113. Die Werte sind angegeben in *Miller Units* und entsprechen der β-Galaktosidase-Aktivität. Die Messung der Wildtypdaten erfolgte in zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

**Abbildung 3-25: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-24.** Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist hoch signifikant ( $p \leq 0,001$ ).

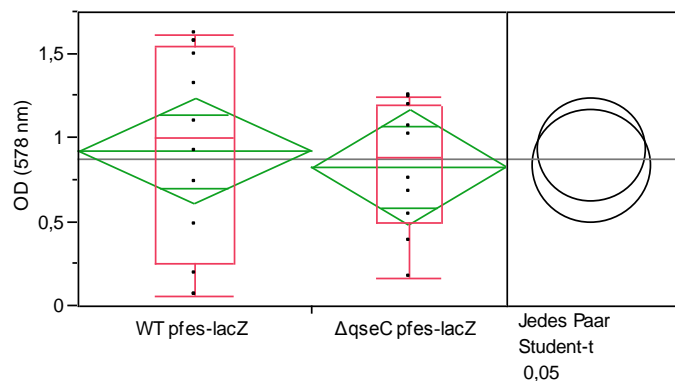






**Abbildung 3-26: Wachstumsverlauf während der  $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung.** Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50  $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war BW25113. Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt.

**Abbildung 3-27: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-26.** Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant.



## FepA

Für FepA, den Enterobactinrezeptor, wurde die gleiche Art von Versuchen durchgeführt. Der *fepA*-Promotor wurde mit dem *lacZ*-Gen für die  $\beta$ -Galaktosidase gekoppelt und in verschiedene Mutanten eingebracht. Die Untersuchungen wurden sowohl in einer Einfachmutante ( $\Delta$ *qseC*), als auch in einer Doppelmutante ( $\Delta$ *qseC \Delta**entC*) durchgeführt. Beide Ergebnisse zeigen den gleichen Trend und ergänzen sich demnach.

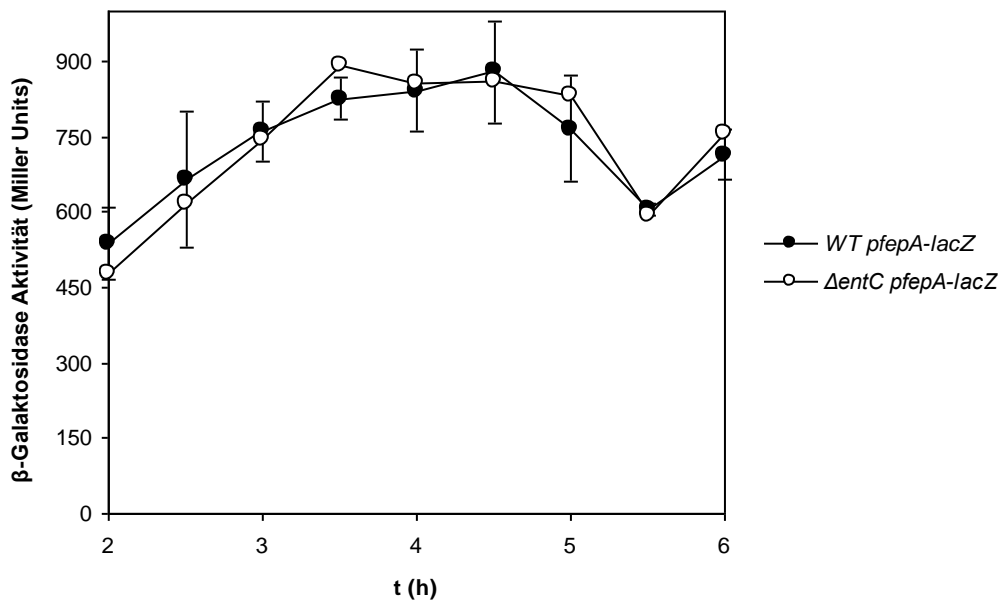
Der Vergleich wurde jeweils zu dem entsprechenden Hintergrund gezogen, einmal zum Wildtyp, einmal zur *entC*-Mutante. Das Fehlen von EntC unterbricht den Prozess der Enterobactinsynthese. Der Vorläufer Isochorisminsäure wird nicht gebildet und damit auch kein DHB.

### 3 Ergebnisse

Getestet werden sollte auf diese Weise, ob und inwieweit der Verlust von *entC* bereits Auswirkungen auf den Eisenhaushalt der Bakterien hat, und ob DHB, Enterobactin oder abgeleitete Substanzen einen regulatorischen Effekt haben.

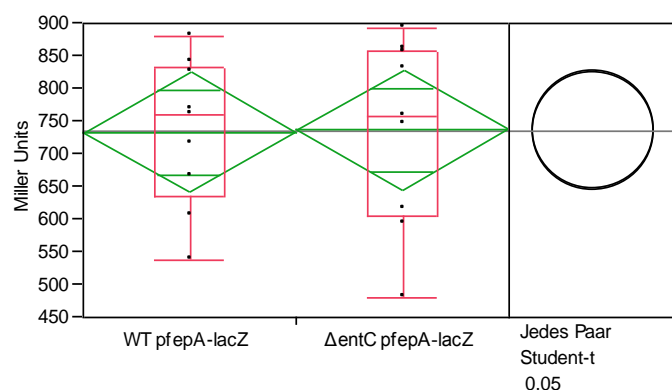
Abbildung 3-28 und Abbildung 3-29 zeigen der Vergleich der Datensätze und die Statistik für den Wildtyp und die *entC*-Mutante (*pfepA-lacZ*). Die Werte weisen keinen Unterschied auf, was auch die statistische Auswertung bestätigt. Ebenso verhält es sich mit den Daten der Wachstumsbestimmung (Abbildung 3-30; Abbildung 3-31), es sind keine Unterschiede zu erkennen.

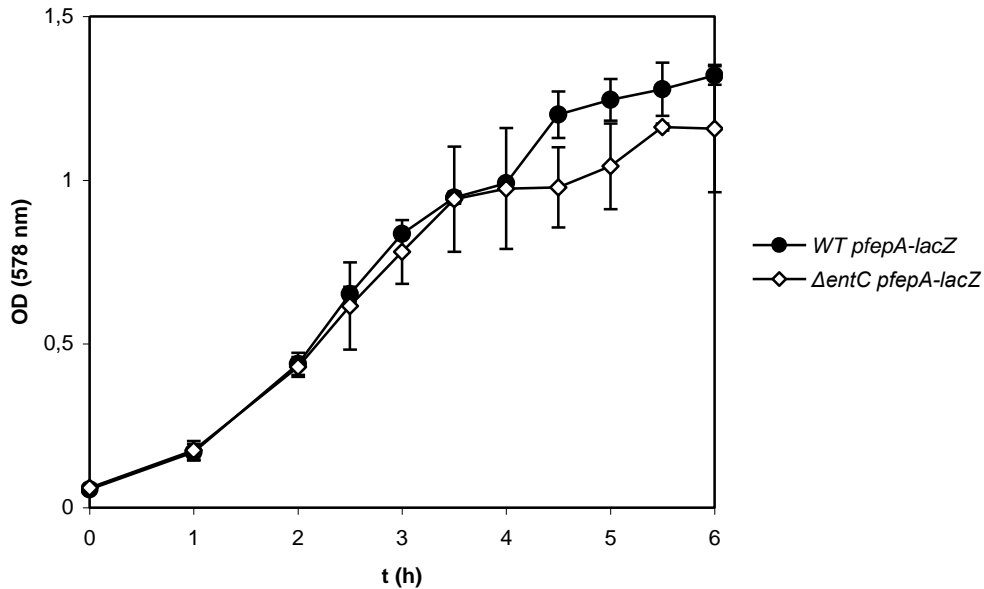
Die Ergebnisse für die beiden Referenzen Wildtyp und  $\Delta entC$ -Mutante zeigen, dass es kaum einen Unterschied zwischen ihnen gibt und somit beide als Vergleichswert herangezogen werden können.



**Abbildung 3-28:  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der FepA-LacZ-Fusion in *E. coli* K-12 [5989] und einer  $\Delta entC$ -Mutante [5910].** Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50  $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MC4100. Die Werte sind angegeben in *Miller Units* und entsprechen der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Die Messung der Daten erfolgte in zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

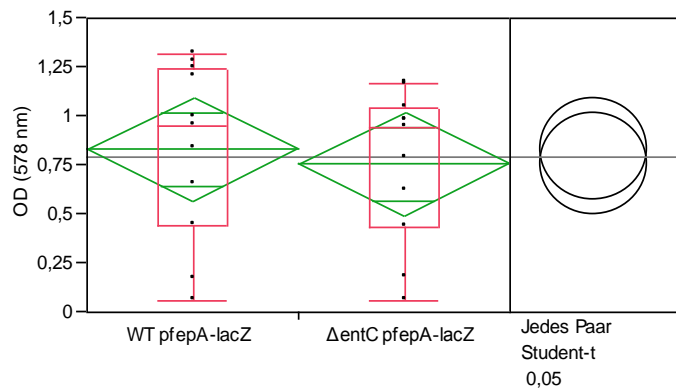
**Abbildung 3-29: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-28.** Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant.





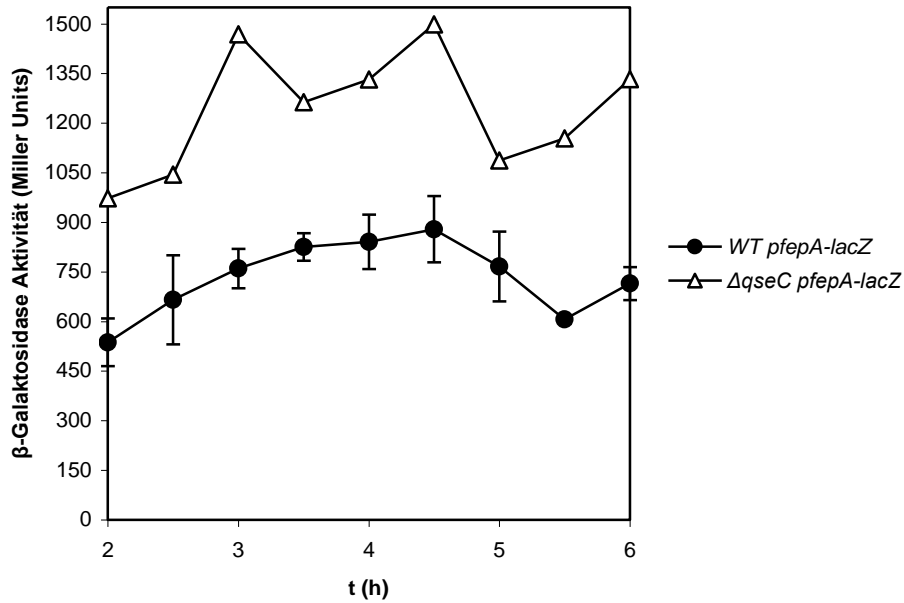
**Abbildung 3-30: Wachstumsverlauf während der  $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung.** Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50  $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MC4100. Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt.

**Abbildung 3-31: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-30.** Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant.



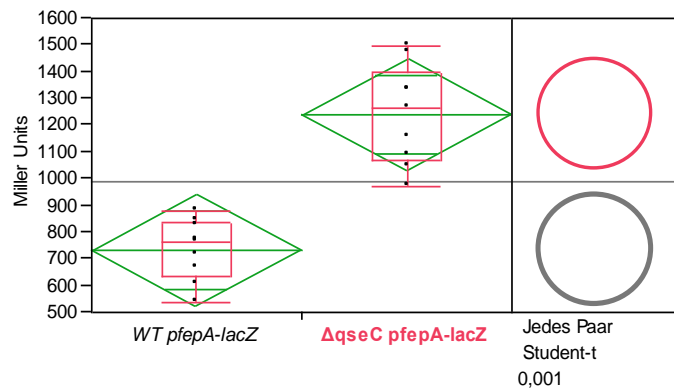
## QseC

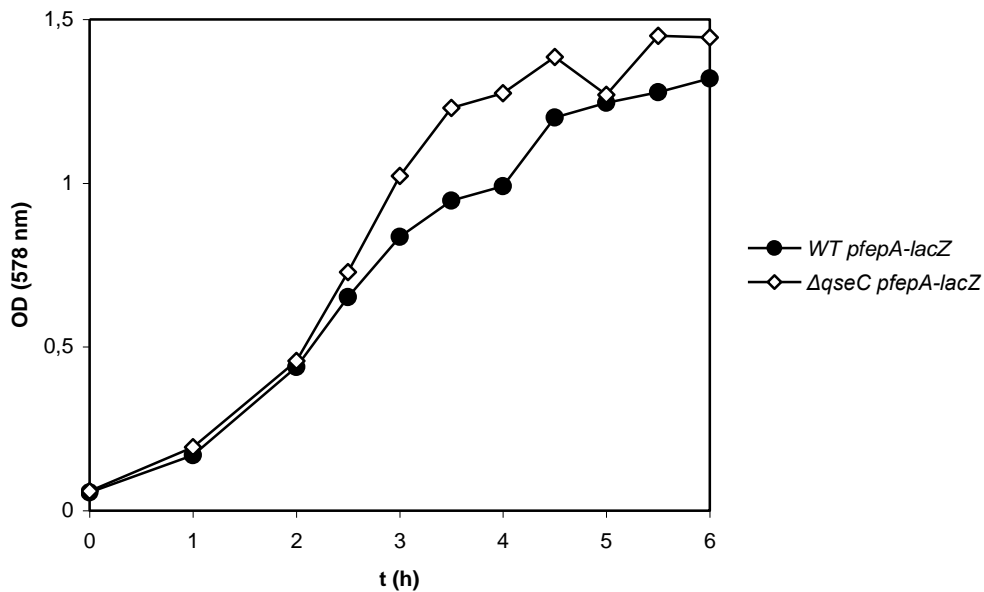
Um den möglichen Einfluss von QseC zu untersuchen, wurden weitere  $\beta$ -Galaktosidase-Versuche durchgeführt. Ermittelte Daten mit einer *pfepA-lacZ* Operonfusion zeigen für die *qseC*-Mutante, im Vergleich zur Referenz bei Fehlen dieses Gens, eine Erhöhung der Induktion um den Faktor 1,7 (Abbildung 3-32). Die Datensätze unterscheiden sich hoch signifikant voneinander (Abbildung 3-33). Die Wachstumskurven hingegen gleichen sich weitgehend und weisen auch statistisch betrachtet keine Unterschiede auf (Abbildung 3-34; Abbildung 3-35), so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Expressionsunterschiede nicht darauf gründen.



**Abbildung 3-32: β-Galaktosidase-Aktivität der FepA-LacZ-Fusion in *E. coli* K-12 [5909] und einer *ΔqseC*-Mutante [5905].** Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 μM Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war BW25113. Die Werte sind angegeben in *Miller Units* und entsprechen der β-Galaktosidase-Aktivität. Die Messung der Wildtypdaten erfolgte in zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

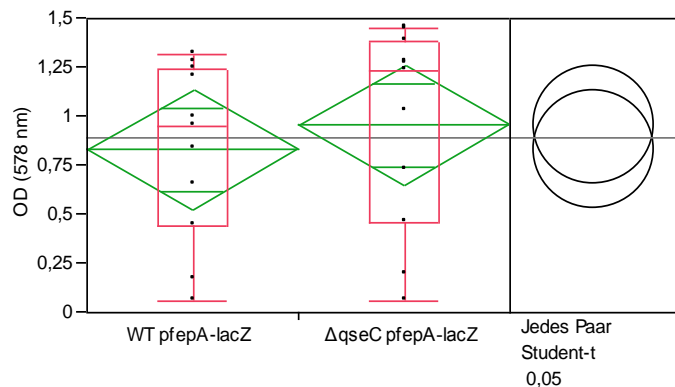
**Abbildung 3-33: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-32.** Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist hoch signifikant ( $p \leq 0,001$ ).





**Abbildung 3-34: Wachstumsverlauf während der  $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung.** Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50  $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war BW25113. Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder.

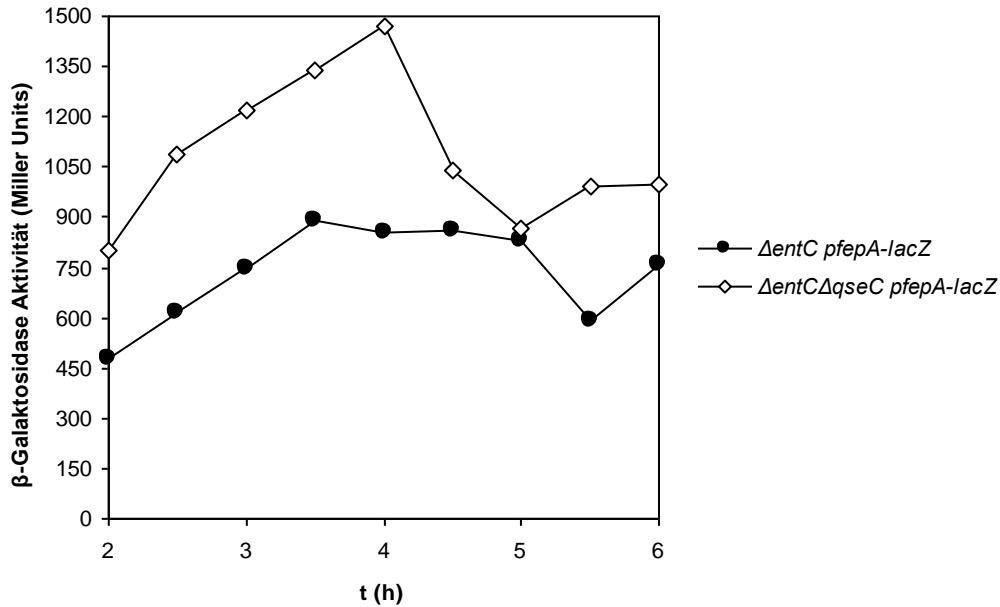
**Abbildung 3-35: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-34.** Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant.



Zur weiteren Aufklärung wurde zusätzlich eine Doppelmutante untersucht. Die Versuchsbedingungen entsprachen denen, der bereits durchgeführten Versuche in Dauer, Probennahme und Medium. Untersucht wurde wiederum die Promotorfusion *pfepA-lacZ*. Die Doppelmutante wies Deletionen von *qseC* und *entC* auf, verglichen wurde mit einer *entC*-Mutante als Referenz. Die  $\Delta$ *entC*  $\Delta$ *qseC*-Mutante zeigte wiederum eine Erhöhung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität um den Faktor 1,5, im Vergleich zur *entC*-Referenz (Abbildung 3-36). Dieser Unterschied ist ebenfalls hoch signifikant und in Abbildung 3-37 gezeigt. Das Wachstum während des Versuchsverlaufes ist nahezu gleich, die Doppelmutante wächst leicht besser, allerdings zeigt die statistische Auswertung keine diesbezüglichen Signifikanzen (Abbildung 3-38; Abbildung 3-39).

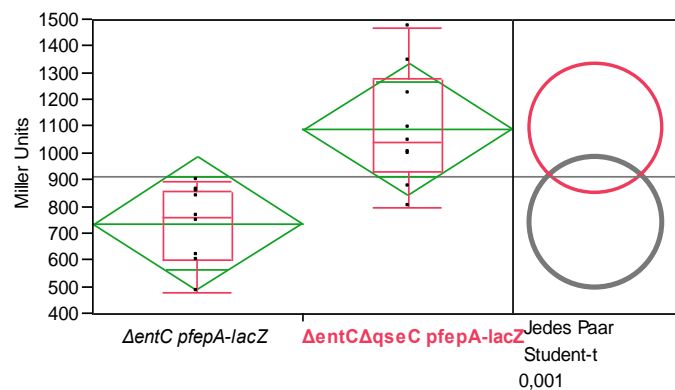
### 3 Ergebnisse

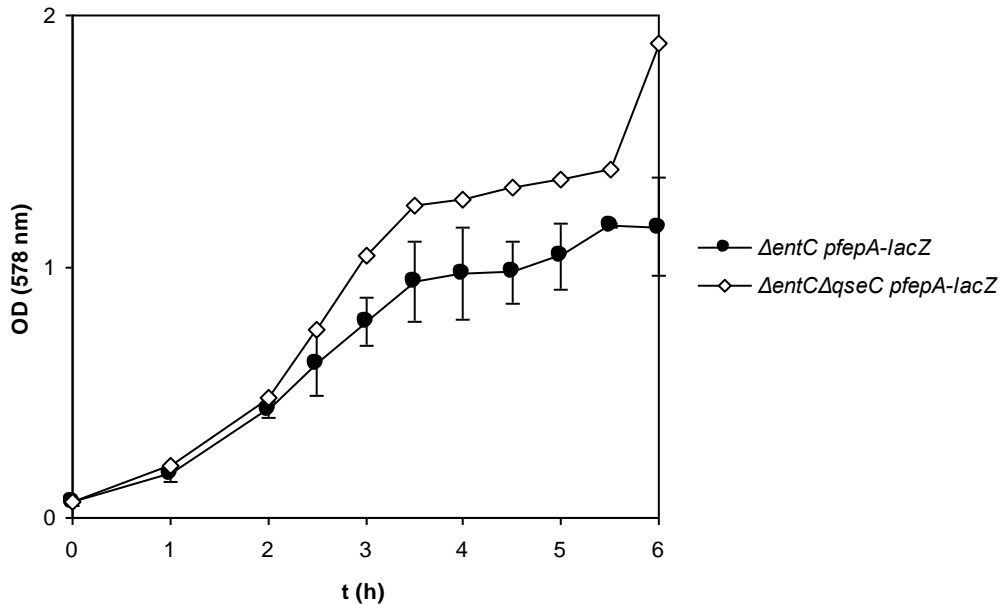
Die Beobachtungen ergänzen sich und zeigen, dass QseC die Expression von FepA inhibiert und somit auch die Enterobactinaufnahme. Insgesamt wird so weniger Eisen des umgebenden Mediums aufgenommen, da die Siderophormenge reduziert wird.



**Abbildung 3-36: β-Galaktosidase-Aktivität der FepA-LacZ-Fusion in *E. coli* ΔentC- [5910] und einer ΔentC ΔqseC-Doppelmutante [5907].** Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 μM Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MC4100. Die Werte sind angegeben in *Miller Units* und entsprechen der β-Galaktosidase-Aktivität.

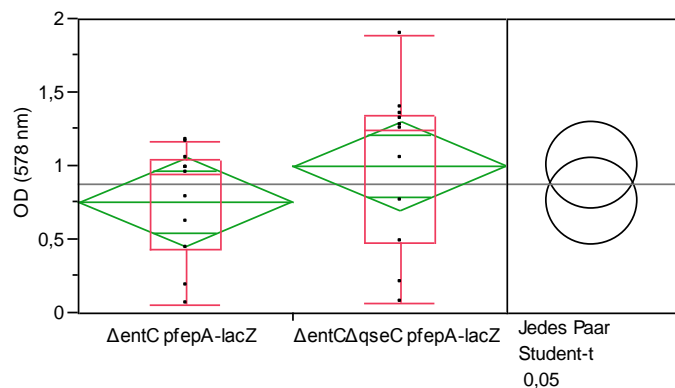
**Abbildung 3-37: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-36.** Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist hoch signifikant ( $p \leq 0,001$ ).





**Abbildung 3-38: Wachstumsverlauf während der  $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung.** Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50  $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MC4100. Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder. Die Daten für die Referenz wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt.

**Abbildung 3-39: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-38.** Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant.



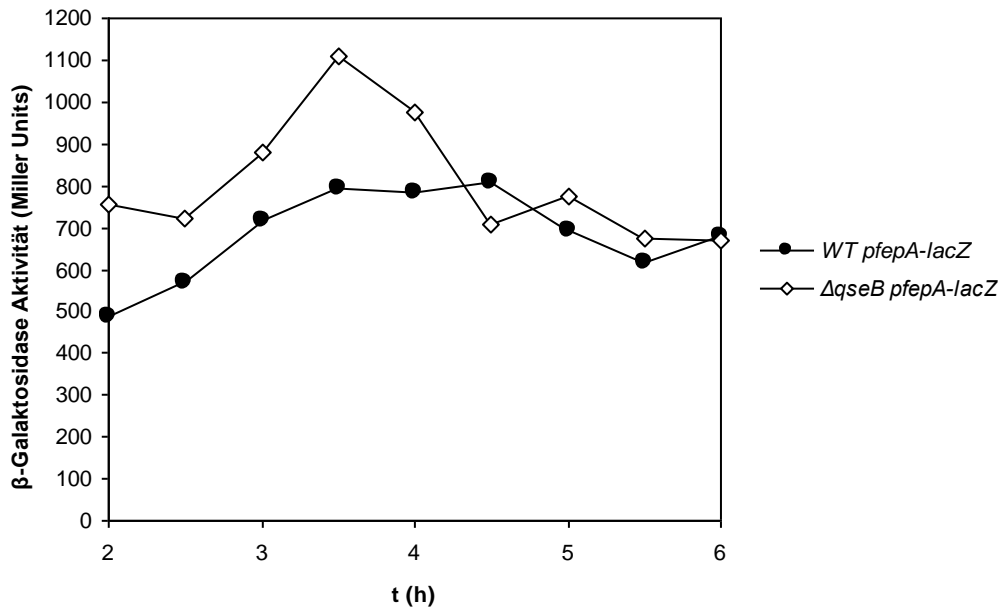
### QseB

Ein weiterer Part des Zweikomponentensystems, zusätzlich zur Sensor-Histidinkinase QseC, ist der dazu gehörige Response-Regulator QseB. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen zweier *qseB*-Mutanten gezeigt, die auch auf die Induktion bzw. Repression der Promotorfusion von *fepA* mit *lacZ* hin untersucht wurden. Die beiden Mutanten unterscheiden sich dabei ausschließlich in ihren Stammhintergründen (Wildtyp) und werden nacheinander vorgestellt.

In Erwartung einer Bestätigung der Ergebnisse der QseC-Daten, sollte ein Fehlen von QseB die Expression von FepA stimulieren. Die Ergebnisse für die *qseB*-Mutante aus BW25113

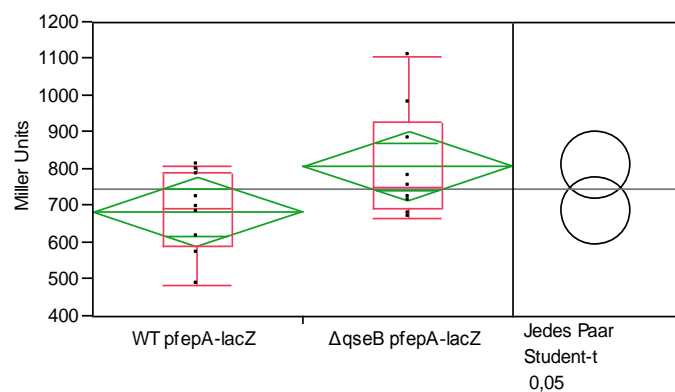
### 3 Ergebnisse

zeigen einen entsprechenden Trend, der sich statistisch aber nicht verifizieren lässt (Abbildung 3-40; Abbildung 3-41). Die dazu gehörigen Wachstumsdaten zeigen keine Unterschiede in der Darstellung und in der statistischen Auswertung (Abbildung 3-42; Abbildung 3-43).

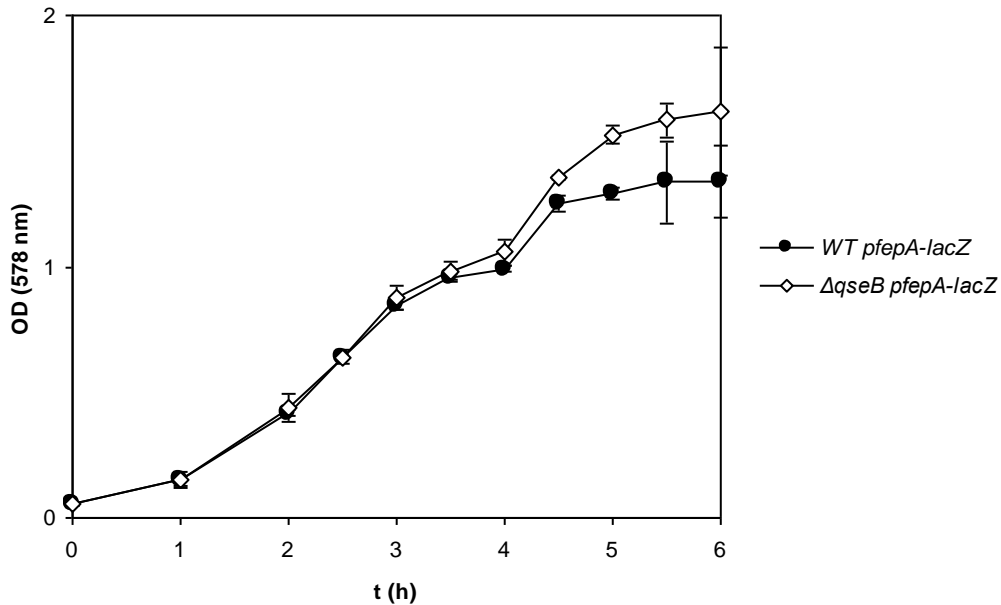


**Abbildung 3-40:**  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der *FepA-LacZ*-Fusion in *E. coli* K-12 [5909] und einer  $\Delta$ *qseB*-Mutante [5987]. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50  $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war BW25113. Die Werte sind angegeben in *Miller Units* und entsprechen der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität.

**Abbildung 3-41:** Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-40. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant.

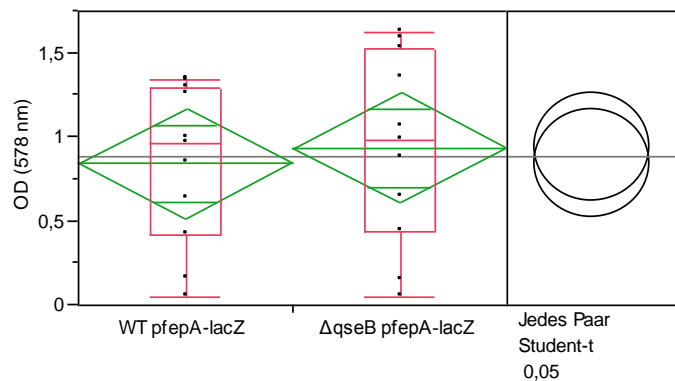




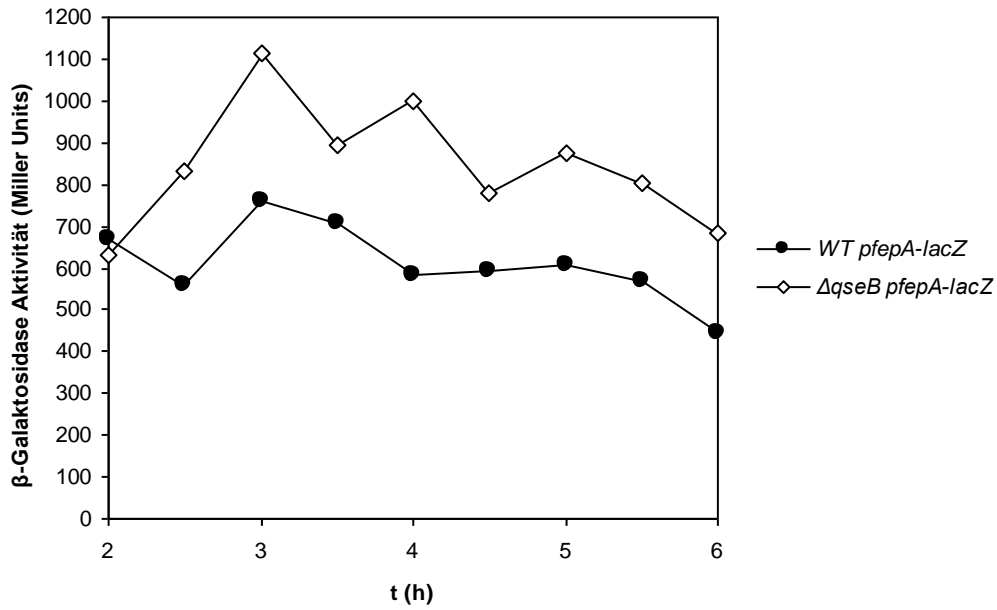


**Abbildung 3-42: Wachstumsverlauf während der  $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung.** Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50  $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war BW25113. Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt.

**Abbildung 3-43: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-42.** Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant.

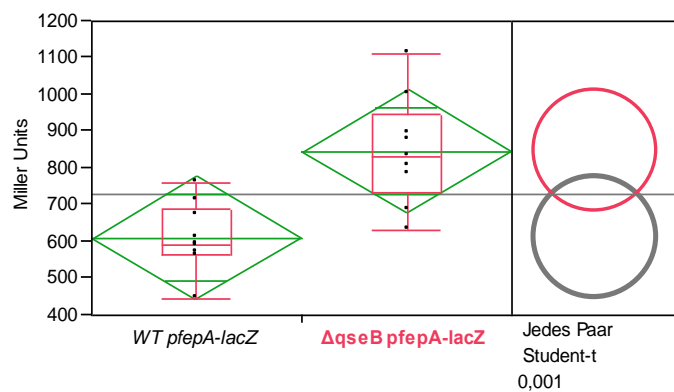


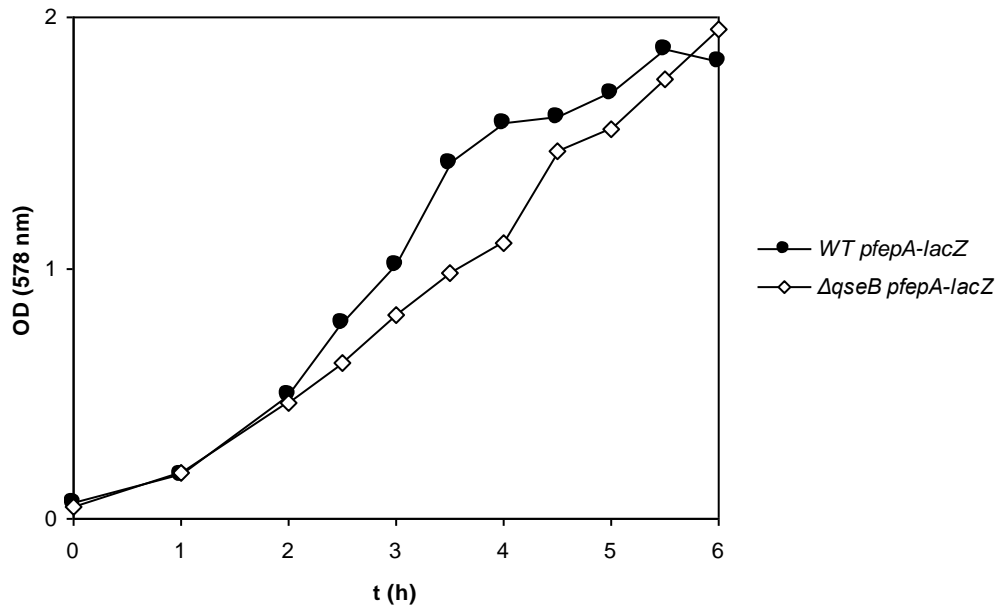
Die zweite untersuchte *qseB*-Mutante ist von K-12 MG1655 abgeleitet. Die ermittelten Daten zur Expression von FepA mit und ohne QseB unter eisenarmen Versuchsbedingungen zeigten in diesem Fall nicht nur den Trend, sondern eine hoch signifikante Induktion der Expression (Abbildung 3-44; Abbildung 3-45). Die Wachstumsraten beider Stämme sind weitgehend gleich und ohne statistische Unterschiede (Abbildung 3-46; Abbildung 3-47).



**Abbildung 3-44: β-Galaktosidase-Aktivität der FepA-LacZ-Fusion in *E. coli* K-12 [5988] und einer ΔqseB-Mutante [5983].** Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 μM Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MG1655. Die Werte sind angegeben in *Miller Units* und entsprechen der β-Galaktosidase-Aktivität.

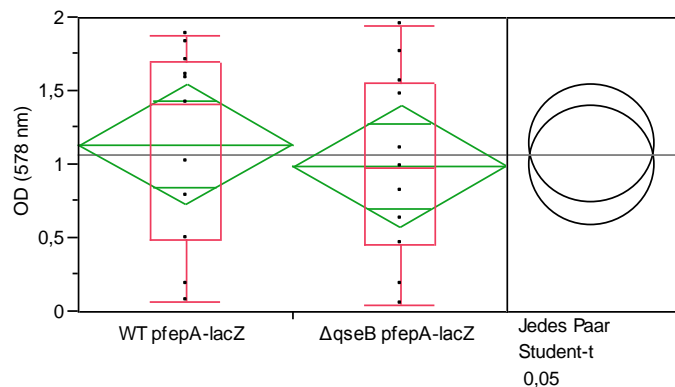
**Abbildung 3-45: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-44.** Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist hoch signifikant ( $p \leq 0,001$ ).





**Abbildung 3-46: Wachstumsverlauf während der  $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung.** Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50  $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MG1655. Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder.

**Abbildung 3-47: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-46.** Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant.



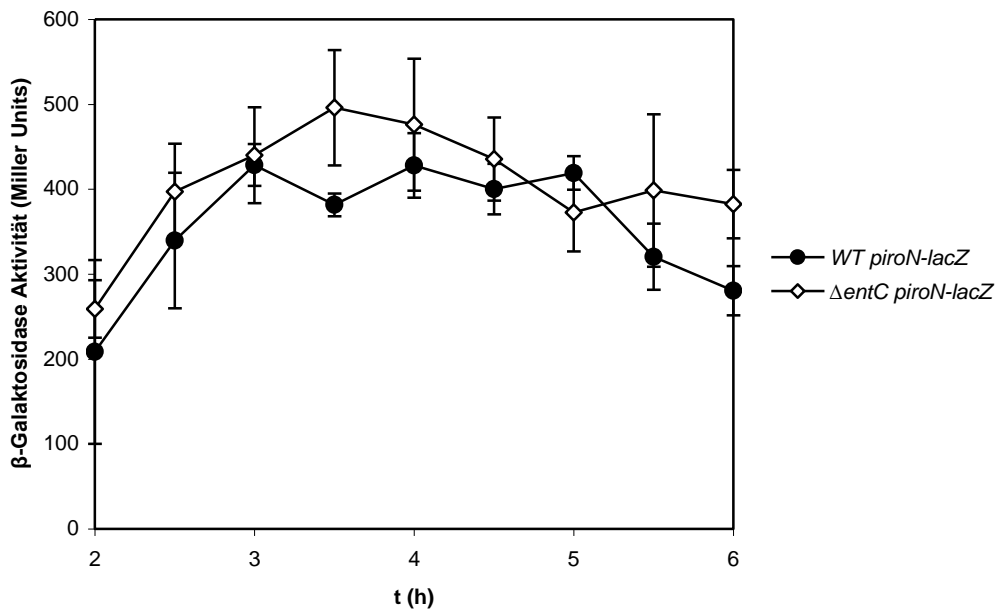
### Salmochelin

Die Produktion des Siderophors Salmochelin als zweifach glycosyliertes Enterobactin gilt als virulenzassoziiert. Aufgrund seiner Hydrophilie, im Gegensatz zu Enterobactin, entgehen die produzierenden Bakterien so der Immunantwort des Wirtes. Dieser produziert Siderocalin, das Enterobactin binden kann, das hydrophilere Salmochelin nach Vorhersage und Experimenten unter regulären Expressionsbedingungen hingegen nicht (Fischbach *et al.*, 2006; Valdebenito *et al.*, 2007).

**IroN**

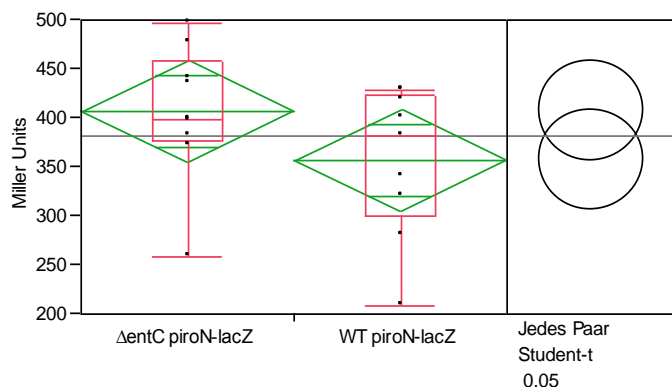
IroN wurde als Salmochelinrezeptor zur Untersuchung des Salmochelinsystems herangezogen. Der IroN-Promotor wurde mit dem *lacZ*-Gen für die  $\beta$ -Galaktosidase gekoppelt und in verschiedene Mutanten eingebracht. Die Untersuchungen wurden in der  $\Delta entC \Delta qseC$ -Doppelmutante durchgeführt.

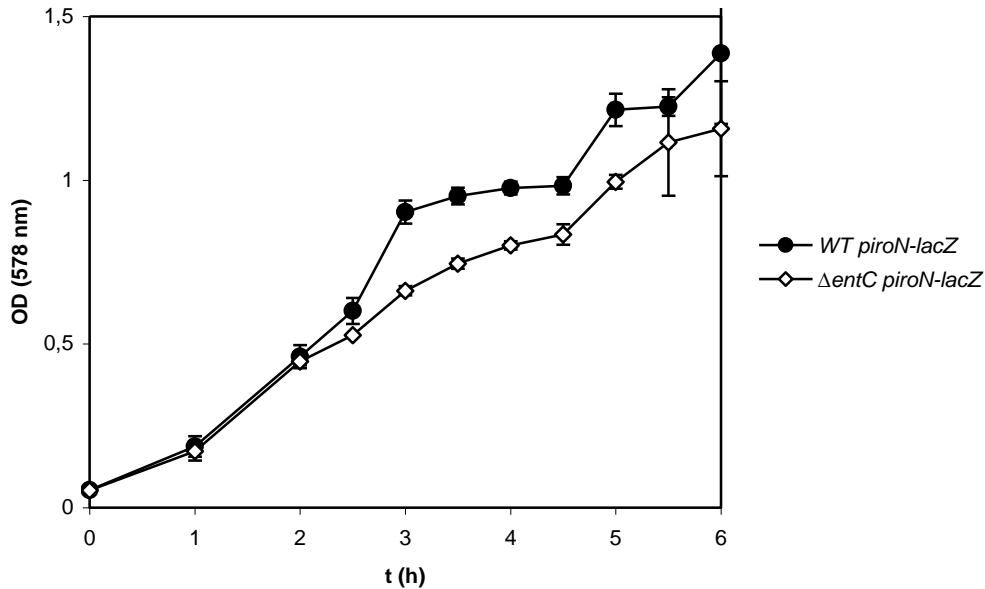
Zunächst wurde zum Vergleich die *piroN-lacZ*-Expression im Wildtyp K-12 und in der *entC*-Mutante bestimmt. Die gemessenen Aktivitäten gleichen sich und zeigen keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 3-48; Abbildung 3-49). Das Wachstum zeigt ebenfalls kaum einen Unterschied, der K-12 Stamm weist leicht erhöhte  $OD_{578nm}$ -Werte gegenüber der Mutante auf, aber ohne Signifikanzen (Abbildung 3-50; Abbildung 3-51).



**Abbildung 3-48:  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der IroN-LacZ-Fusion in *E. coli* K-12 [5831] und einer  $\Delta entC$ -Mutante [5820].** Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50  $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MC4100. Die Werte sind angegeben in *Miller Units* und entsprechen der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Die Messung der Daten erfolgte in zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

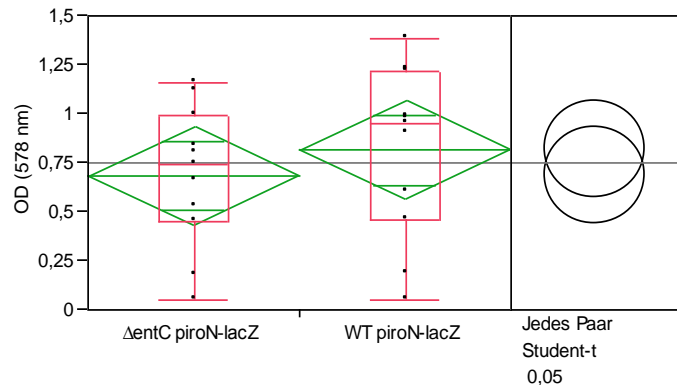
**Abbildung 3-49: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-48.** Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant.





**Abbildung 3-50: Wachstumsverlauf während der  $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung.** Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50  $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MC4100. Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt.

**Abbildung 3-51: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-50.** Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant.

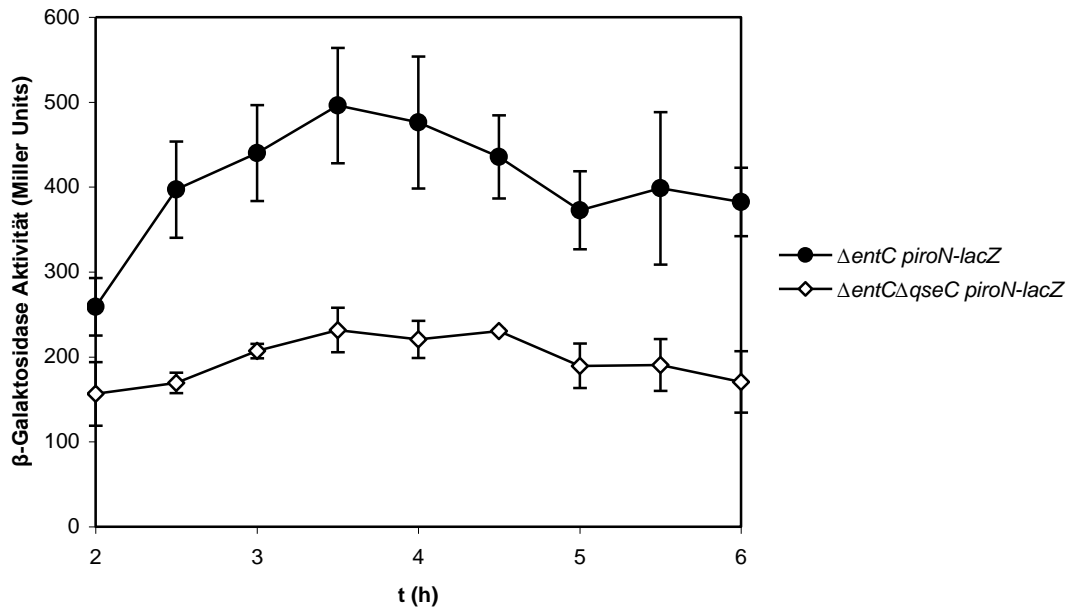


## QseC

Zur näheren Untersuchung der Regulierung von IronN durch QseC wurde eine Doppelmutante ( $\Delta$ entC  $\Delta$ qseC) herangezogen. Es wurden  $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmungen über sechs Stunden in eisenarmem Medium durchgeführt. Die Versuchsbedingungen entsprechen den vorher beschriebenen. Die Ergebnisse zeigen einen gegenläufigen Trend zu enterobactinassoziierten Komponenten. Die  $\Delta$ entC  $\Delta$ qseC-Mutante zeigt eine deutliche Erniedrigung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität im Vergleich zur Referenz (Abbildung 3-52). Der Unterschied wurde als hoch signifikant bestätigt (Abbildung 3-53). Die Wachstumsraten hingegen weisen kaum Unterschiede auf, die statistische Auswertung zeigt keine signifikanten Differenzen (Abbildung 3-54; Abbildung 3-55).

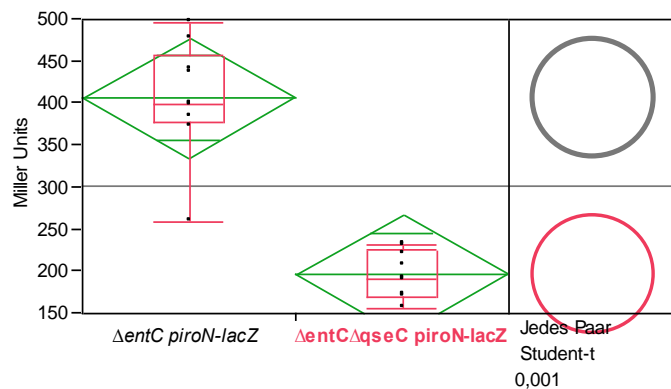
### 3 Ergebnisse

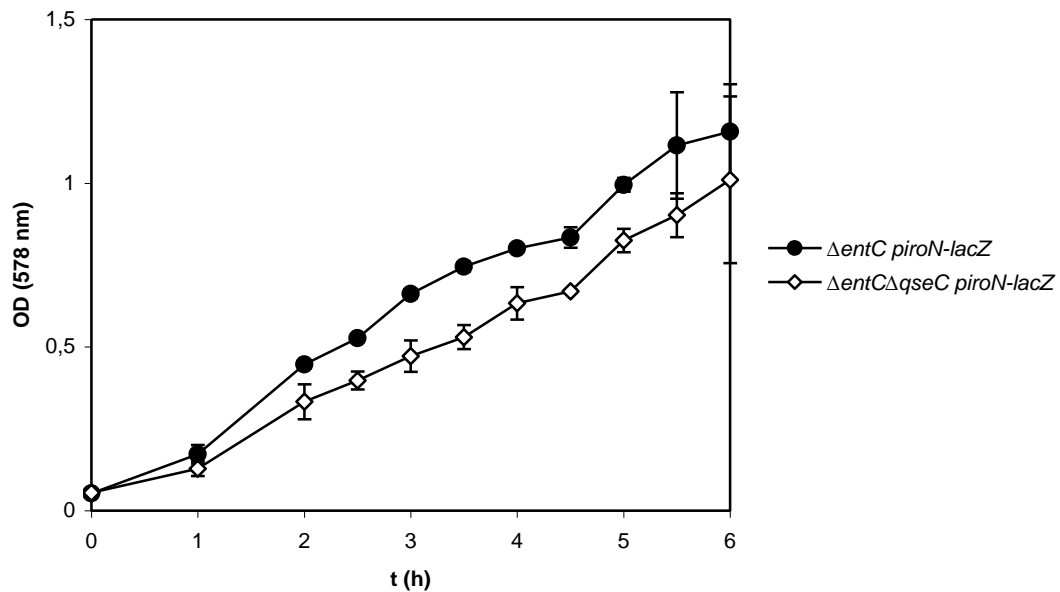
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass QseC demnach die Expression von *IroN* und somit des Salmochelinsystems erhöht. Insgesamt wird eine Mehraufnahme an Eisen-Siderophormolekülen möglich gemacht.



**Abbildung 3-52:**  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der *IroN-LacZ*-Fusion in *E. coli*  $\Delta entC$ - [5820] und einer  $\Delta entC \Delta qseC$ -Doppelmutante [5787]. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50  $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MC4100. Die Werte sind angegeben in *Miller Units* und entsprechen der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Die Messung der Daten erfolgte in zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

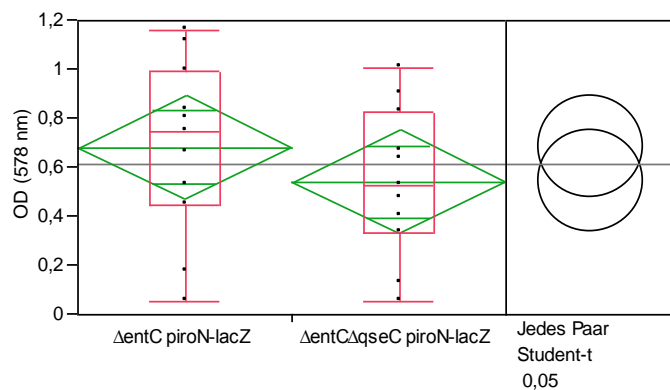
**Abbildung 3-53:** Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-52. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist hoch signifikant ( $p \leq 0,001$ ).





**Abbildung 3-54: Wachstumsverlauf während der  $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung.** Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50  $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MC4100. Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt.

**Abbildung 3-55: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-54.** Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant.



#### 3.4.1.3 Das Protein YgiW

Das Protein YgiW, dessen Genlocus in unmittelbarer Umgebung des Zweikomponentensystems QseBC liegt (Abbildung 3-18), wurde ebenfalls auf seine Beteiligung in der Siderophorproduktions-Regulierung untersucht.

#### Enterobactin

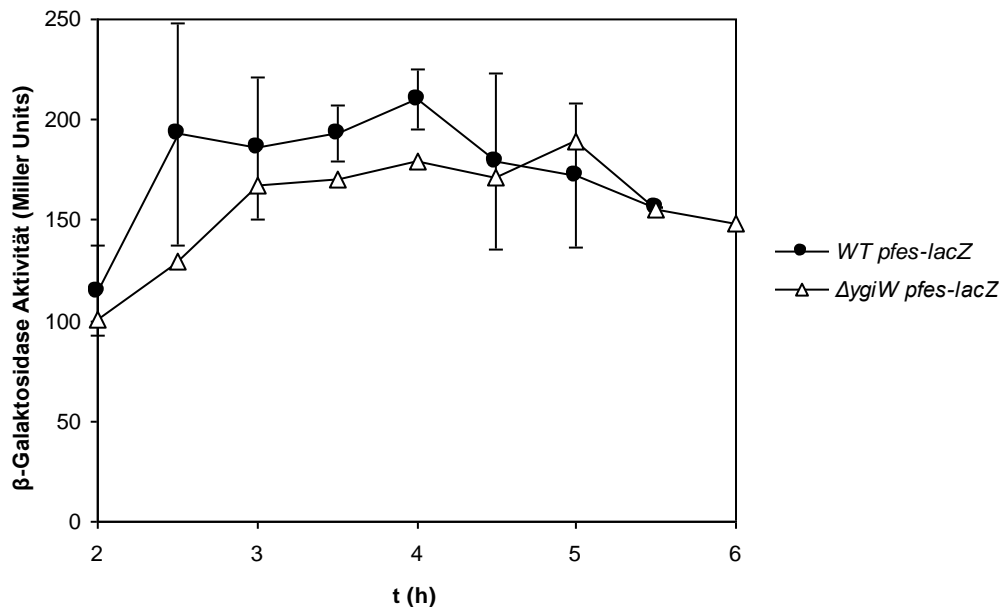
Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der *p<sub>fes</sub>-lacZ*- bzw. der *p<sub>fepA</sub>-lacZ*-Expression (Enterobactin-system) wurde in der  $\Delta ygiW$ -Mutante und im entsprechenden Elternstamm untersucht sowie

### 3 Ergebnisse

zusätzlich im  $\Delta entC$  und  $\Delta entC \Delta ygiW$  Hintergrund für  $pfepA$ . Die Versuche wurden unter standardisierten Bedingungen, wie zuvor beschrieben, durchgeführt.

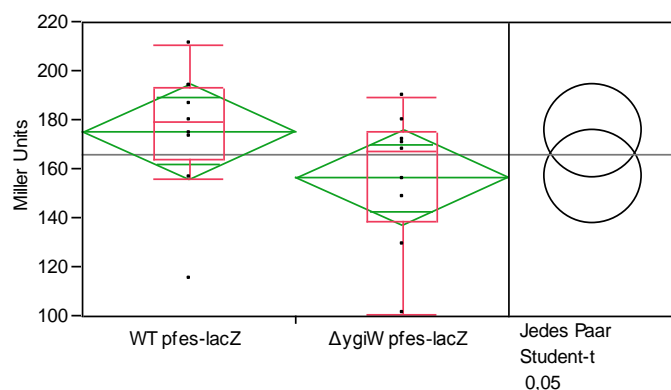
#### Fes

Die Gegenüberstellung der Ergebnisse der Induktionsraten für die Einzelmutation in  $YgiW$  und der K-12 Referenz ergaben keinen eindeutigen Trend und waren ohne statistische Relevanz (Abbildung 3-56; Abbildung 3-57). Das Wachstum zeigt keine großen Unterschiede, die Mutante ist leicht besser gewachsen, aber wiederum ohne signifikante Differenzen (Abbildung 3-58; Abbildung 3-59).

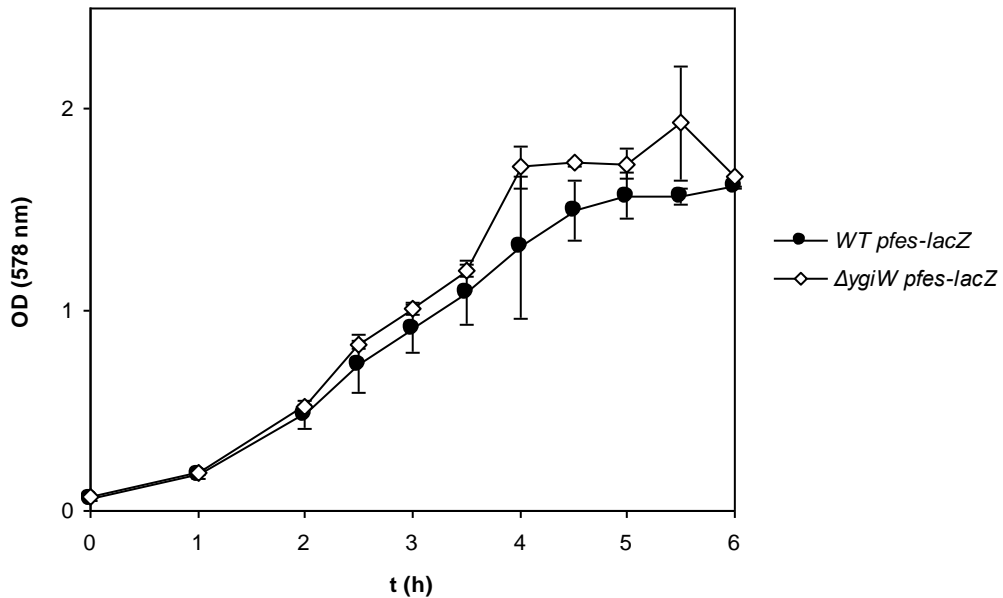


**Abbildung 3-56:  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Fes-LacZ-Fusion in *E. coli* K-12 [5885] und einer  $\Delta ygiW$ -Mutante [5882].** Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50  $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war BW25113. Die Werte sind angegeben in *Miller Units* und entsprechen der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Die Messung der Wildtypdaten erfolgte in zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

**Abbildung 3-57: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-56.** Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant.

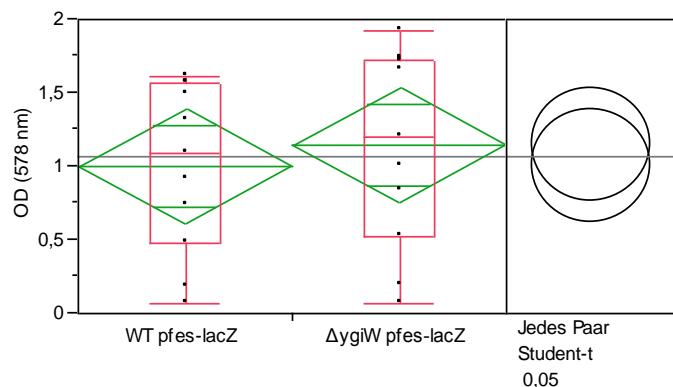






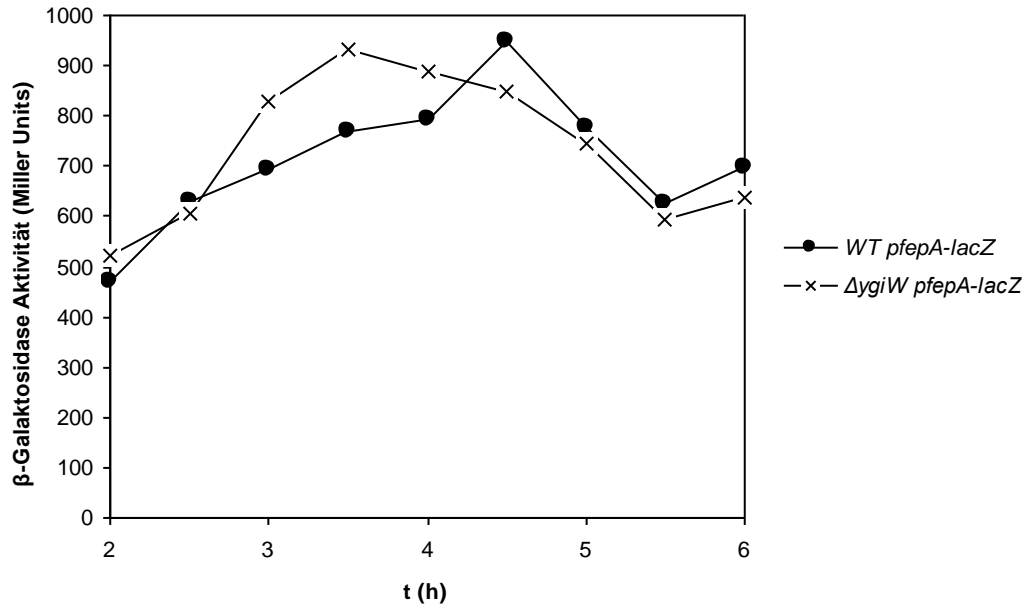
**Abbildung 3-58: Wachstumsverlauf während der  $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung.** Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50  $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war BW25113. Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt.

**Abbildung 3-59: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-58.** Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant.



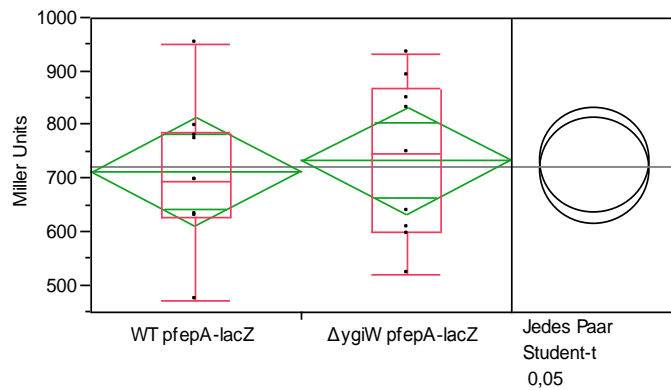
## FepA

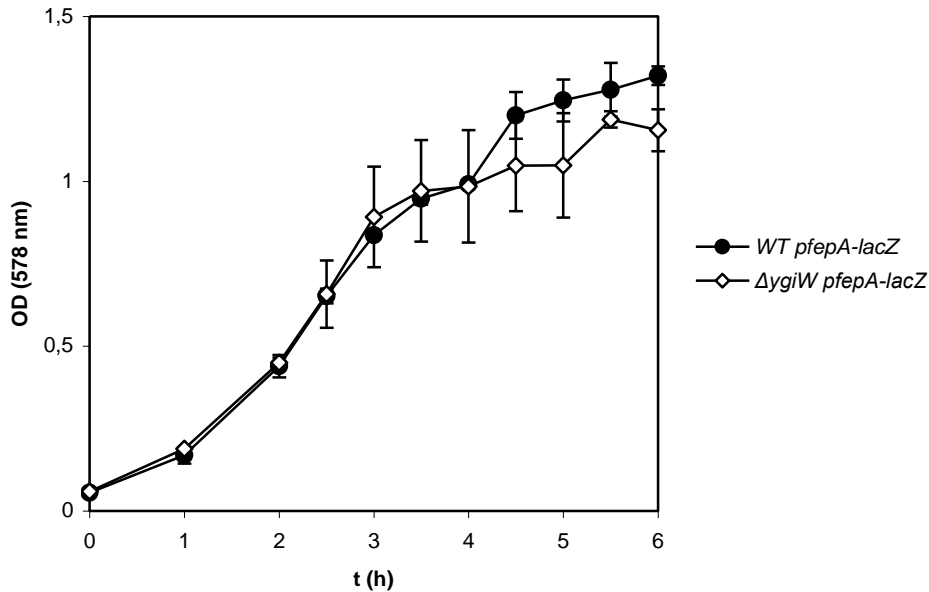
Die Darstellung der Daten der  $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmungen für die Promotorfusion von *fepA* und *lacZ* zeigen in der Einzelmutation von *ygiW* im Vergleich zum Wildtyp keine Unterschiede (Abbildung 3-60; Abbildung 3-61). Das Wachstum war ebenfalls nahezu identisch, die Mutante ist minimal schlechter gewachsen, die Unterschiede sind ohne statistische Relevanz (Abbildung 3-62; Abbildung 3-63).



**Abbildung 3-60:  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der FepA-LacZ-Fusion in *E. coli* K-12 [5909] und einer  $\Delta ygiW$ -Mutante [5906].** Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50  $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war BW25113. Die Werte sind angegeben in *Miller Units* und entsprechen der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität.

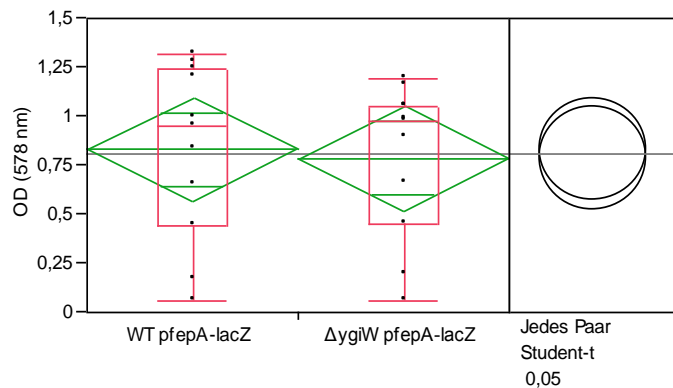
**Abbildung 3-61: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-60.** Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant.





**Abbildung 3-62: Wachstumsverlauf während der  $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung.** Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50  $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war BW25113. Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt.

**Abbildung 3-63: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-62.** Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant.

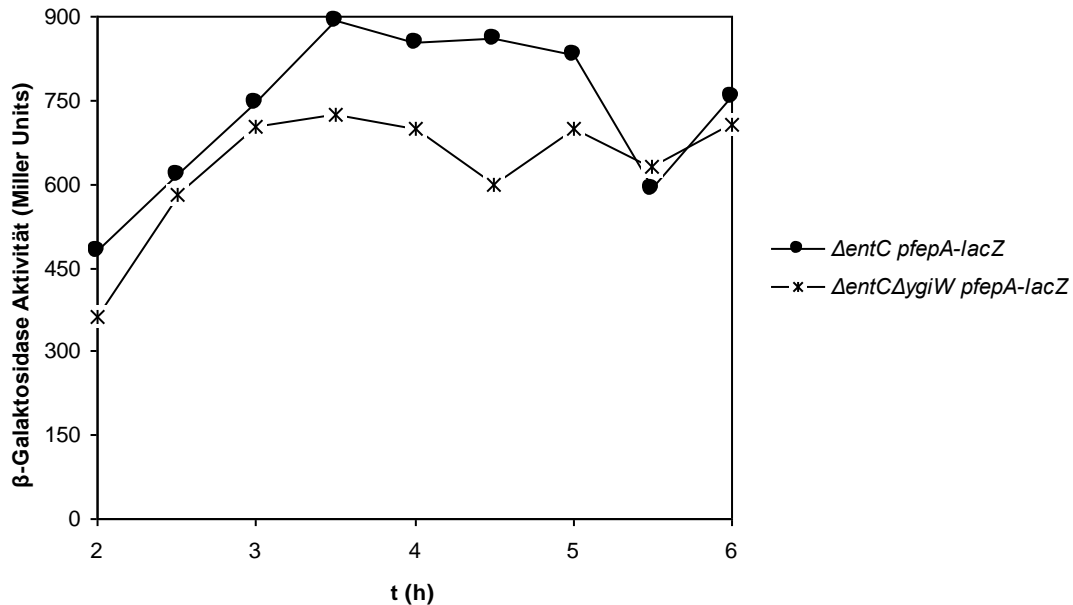


Die Doppelmutante  $\Delta entC \Delta ygiW$  zeigte im Versuch eine leichte Abnahme der Expression im Vergleich zur  $\Delta entC$ -Referenz (Abbildung 3-64). Die statistische Überprüfung erfolgte in diesem Fall mit den nichtparametrischen Wilcoxon / Kruskal Wallis (Rangsummen) Tests, da die Daten nicht normal verteilt waren. Es waren keine Signifikanzen festzustellen (Abbildung 3-65). Die Wachstumskurven gleichen sich weitgehend, statistisch gesehen lassen sich keine Unterschiede nachweisen (Abbildung 3-66; Abbildung 3-67).

Im enterobactinassoziierten System ließen sich, insgesamt betrachtet, keine großen Unterschiede zu den jeweiligen Referenzstämmen nachweisen. Weder für den Fes- noch für den FepA-Promotor waren Expressionunterschiede zu beobachten. YgiW bzw. sein Fehlen scheint einen

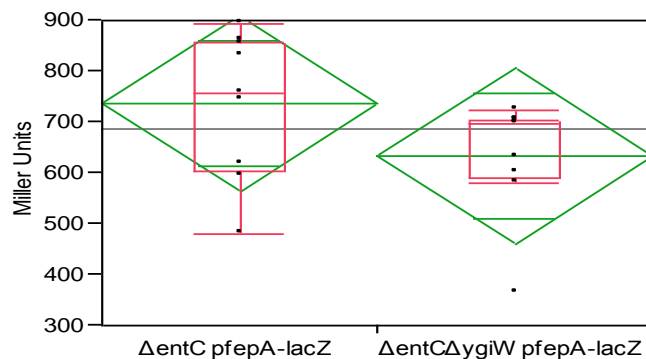
### 3 Ergebnisse

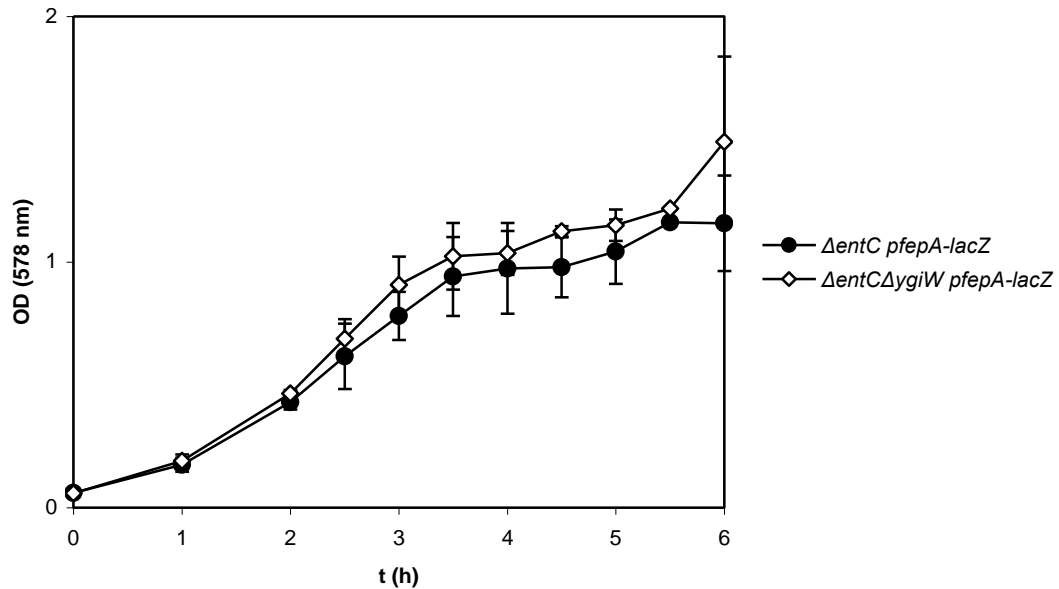
geringen Einfluss auf die Expression der untersuchten Komponenten des Enterobactinsystems zu haben.



**Abbildung 3-64:**  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der FepA-LacZ-Fusion in *E. coli*  $\Delta entC$ - [5910] und einer  $\Delta entC \Delta ygiW$ -Doppelmutante [5908]. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50  $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MC4100. Die Werte sind angegeben in *Miller Units* und entsprechen der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität.

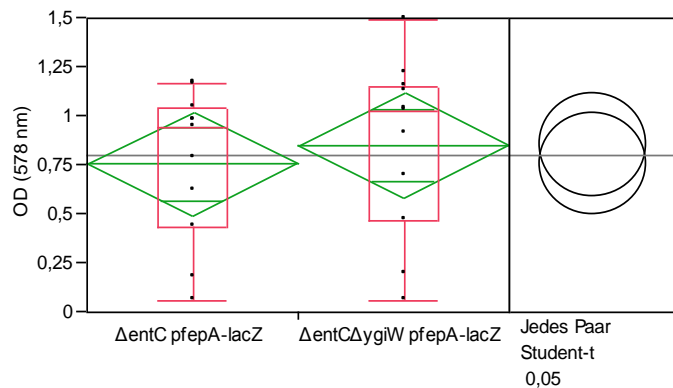
**Abbildung 3-65:** Statistische Analyse der Datensätze aus **Abbildung 3-64**. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test nicht normal verteilt und wurden deshalb mit dem parameterfreien Wilcoxon / Kruskal-Wallis-Rangsummen-Test getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant.





**Abbildung 3-66: Wachstumsverlauf während der  $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung.** Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50  $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MC4100. Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt.

**Abbildung 3-67: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-66.** Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant.



## Salmochelin

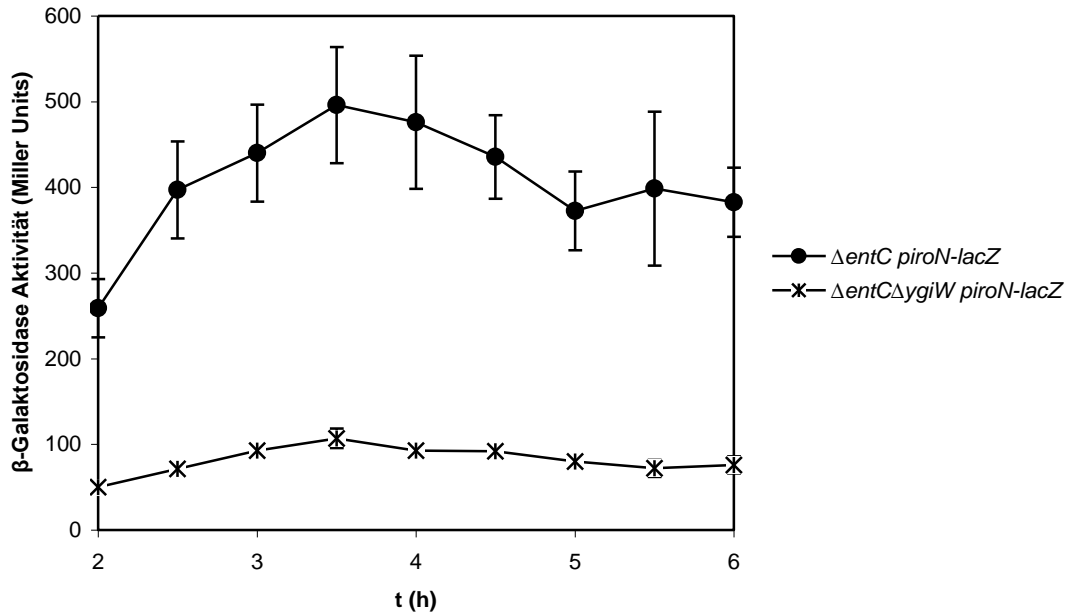
### Iron

Zur weiteren Charakterisierung der Rolle von YgiW wurde wiederum das salmochelinassoziierte System mit Iron als exemplarischen Vertreter herangezogen. Eine *iron-lacZ* Promotorfusion wurde in verschiedene Mutanten eingebracht und deren Expression unter eisenminimierten Bedingungen über einen längeren Zeitraum bestimmt. Ebenso wurden die Wachstumskurven der einzelnen Stämme verzeichnet.

Die erste untersuchte Konstellation war der Vergleich einer  $\Delta entC$ -Referenz mit einer  $\Delta entC \Delta ygiW$ -Doppelmutante. Als Effekt der *ygiW*-Deletion war eine deutliche Absenkung um den Faktor 5 der Induktionsrate von Iron zu verzeichnen (Abbildung 3-68). Die Daten zeigen

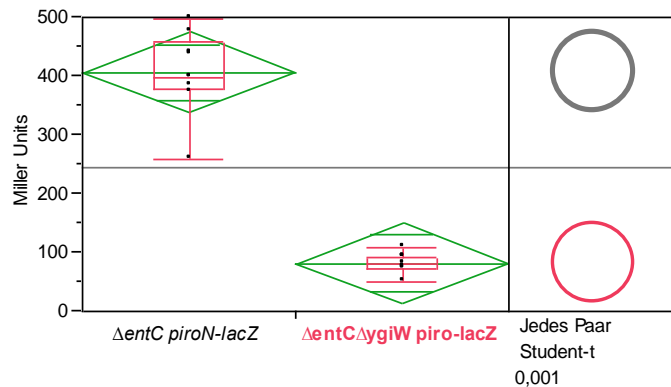
### 3 Ergebnisse

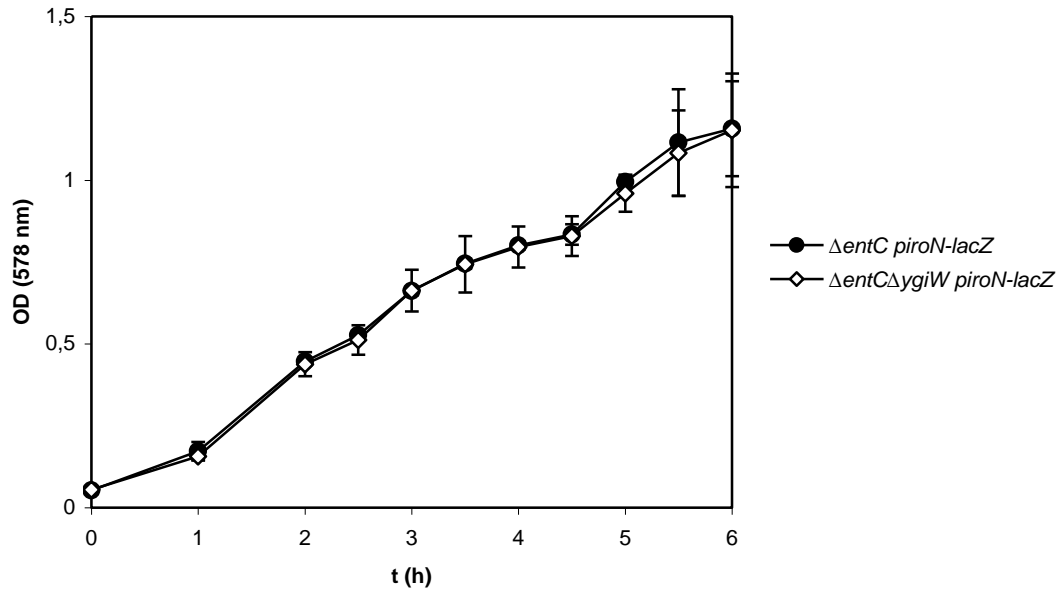
hoch signifikante Unterschiede (Abbildung 3-69). Das Wachstum hingegen verlief nahezu identisch, ohne signifikante Unterschiede (Abbildung 3-70; Abbildung 3-71).



**Abbildung 3-68:** β-Galaktosidase-Aktivität der Iron-LacZ-Fusion in *E. coli* ΔentC- [5820] und einer ΔentC ΔygiW-Doppelmutante [5784]. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 μM Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MC4100. Die Werte sind angegeben in *Miller Units* und entsprechen der β-Galaktosidase-Aktivität. Die Messung der Referenzdaten erfolgte in zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

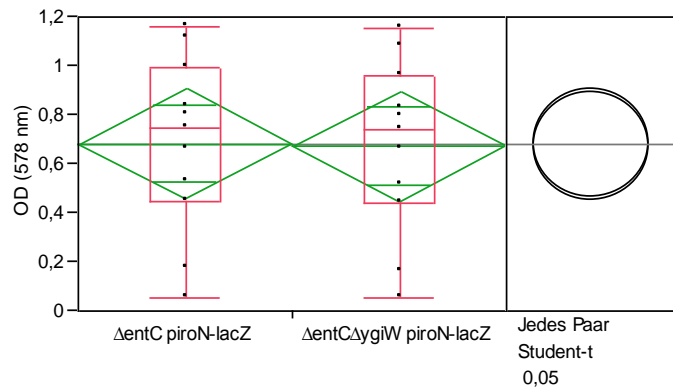
**Abbildung 3-69: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-68.** Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist hoch signifikant ( $p \leq 0,001$ ).





**Abbildung 3-70: Wachstumsverlauf während der  $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung.** Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50  $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MC4100. Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt.

**Abbildung 3-71: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-70.** Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant.

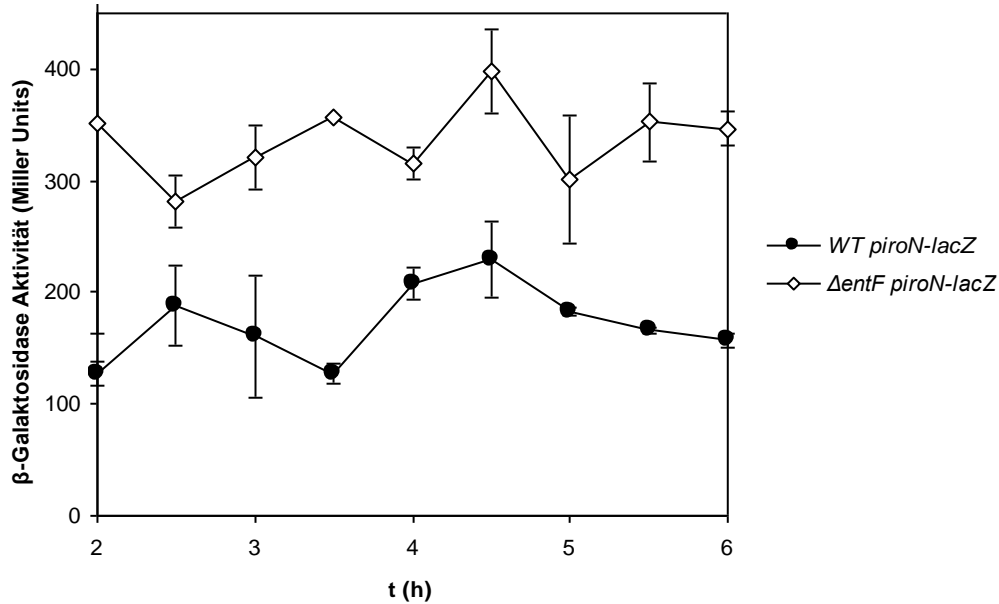


Die gleichen Versuche wurden unter zusätzlicher Zugabe von DHB durchgeführt, um einen etwaigen Effekt feststellen zu können. Sowohl die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten, als auch die Wachstumskurven, zeigten allerdings keine Unterschiede zu den Messungen ohne DHB (Daten nicht gezeigt).

Die nächsten Experimente wurden mit Mutanten durchgeführt, denen eine *entF*-Deletion zu Grunde lag. Wenn EntF fehlt, kommt es im Syntheseweg von Enterobactin zwar noch zur Bildung von Dihydroxybenzoesäure, aber Enterobactin selbst wird nicht produziert. Demnach erfolgte zunächst eine Überprüfung der potentiellen Unterschiede zwischen der Wildtyp- und der  $\Delta entF$ -Referenzexpression von IronN. Die *entF*-Mutante lag deutlich höher in ihrer Induktionsrate, mit einem hoch signifikanten Unterschied zum Wildtyp (Abbildung 3-72; Abbildung

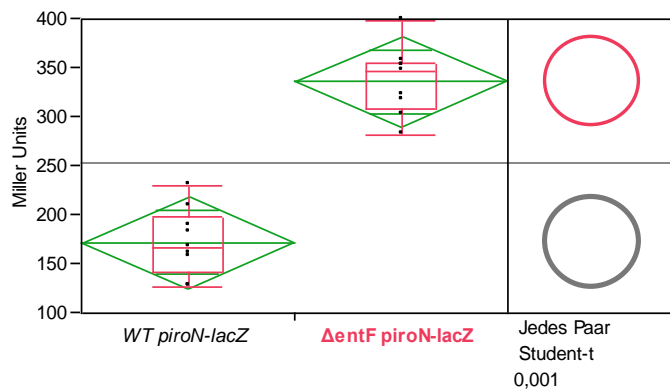
### 3 Ergebnisse

3-73). Das Wachstum wies diesmal gewisse Unterschiede auf: Trotz der erhöhten Expression zeigte die Mutante ein schlechteres Wachstum mit schwach signifikanten Differenzen (Abbildung 3-74; Abbildung 3-75).

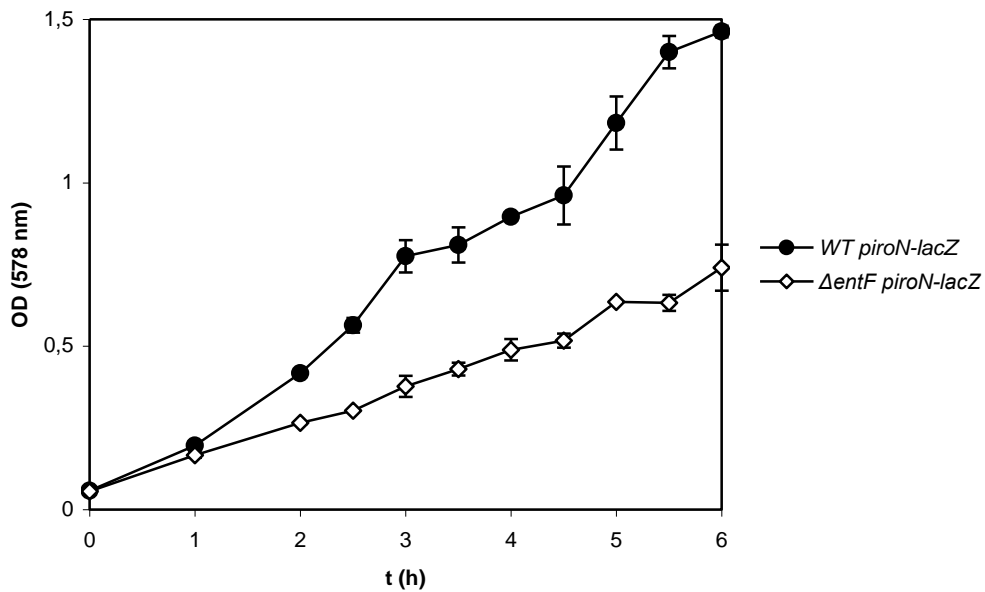


**Abbildung 3-72:  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der *IroN-LacZ*-Fusion in *E. coli* K-12 [5757] und einer  $\Delta$ *entF*-Mutante [5751].** Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50  $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MG1655. Die Werte sind angegeben in *Miller Units* und entsprechen der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Die Messung der Daten erfolgte in zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

**Abbildung 3-73: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-72.** Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist hoch signifikant ( $p \leq 0,001$ ).







**Abbildung 3-74: Wachstumsverlauf während der  $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung.** Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50  $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MG1655. Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt.

**Abbildung 3-75: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-74.** Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist schwach signifikant ( $p \leq 0,05$ ).

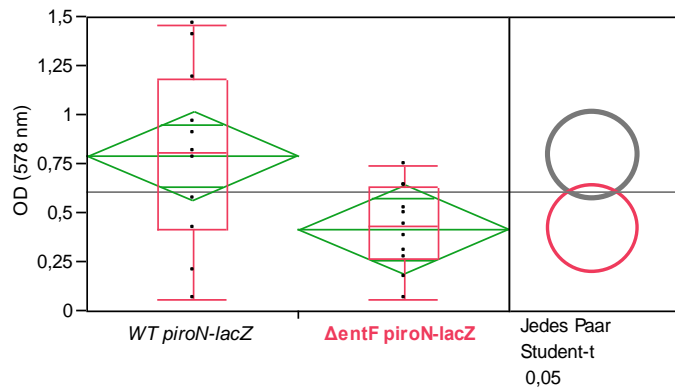
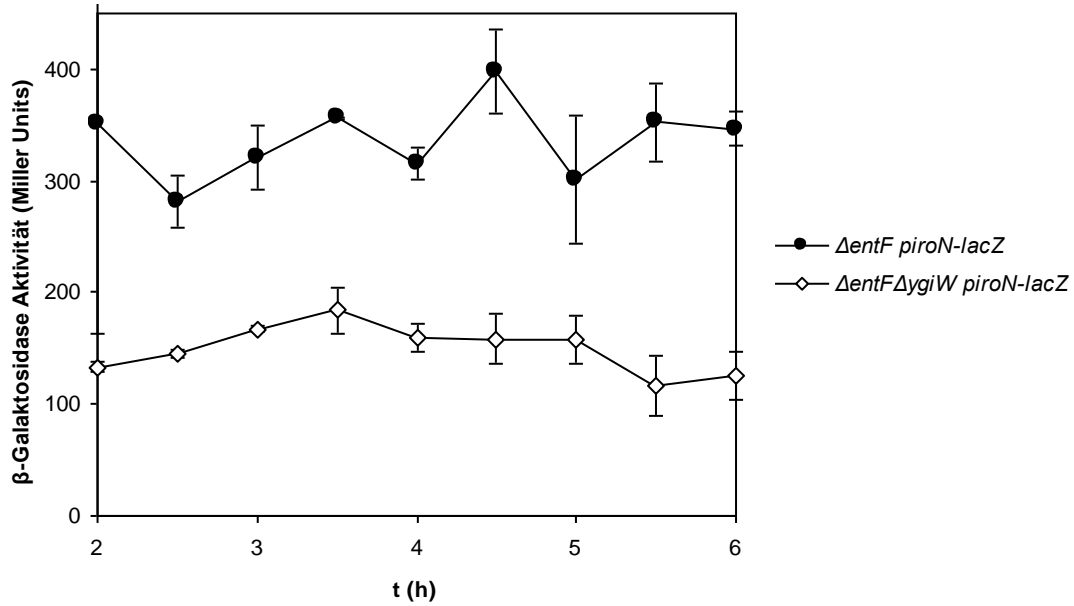
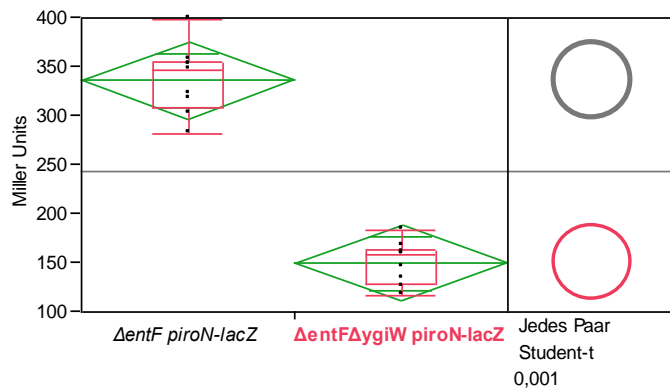


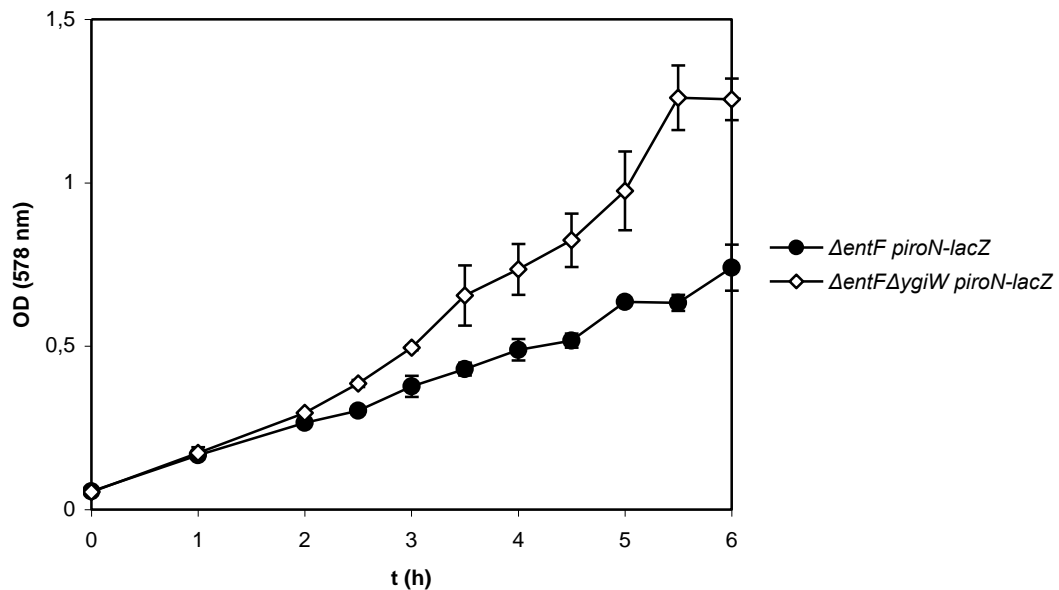
Abbildung 3-76 zeigt die Messergebnisse für eine  $\Delta entF \Delta ygiW$ -Doppelmutante im Vergleich mit der  $\Delta entF$ -Referenz. Die Induktionsrate bei Fehlen von YgiW ist um den Faktor 2,3 erniedrigt, mit einem hoch signifikanten Unterschied zu den Vergleichswerten (Abbildung 3-77). Die Doppelmutante ist insgesamt etwas besser gewachsen, aber ohne statistisch relevante Unterschiede (Abbildung 3-78; Abbildung 3-79).



**Abbildung 3-76:  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Iron-LacZ-Fusion in *E. coli*  $\Delta entF$ - [5751] und einer  $\Delta entF \Delta ygiW$ -Doppelmutante [5753].** Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50  $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MG1655. Die Werte sind angegeben in *Miller Units* und entsprechen der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Die Messung der Daten erfolgte in zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

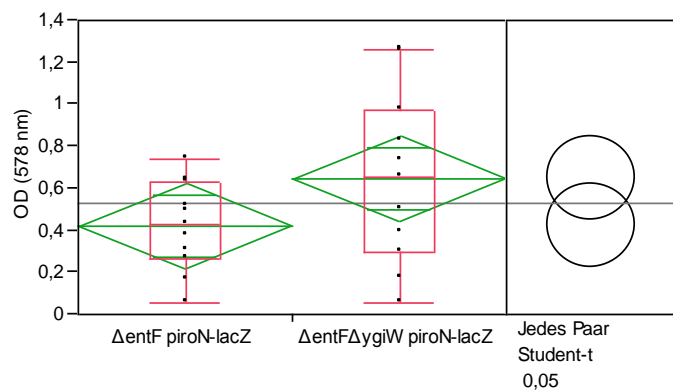
**Abbildung 3-77: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-76.** Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist hoch signifikant ( $p \leq 0,001$ ).





**Abbildung 3-78: Wachstumsverlauf während der  $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung.** Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50  $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MG1655. Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt.

**Abbildung 3-79: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-78.** Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant.



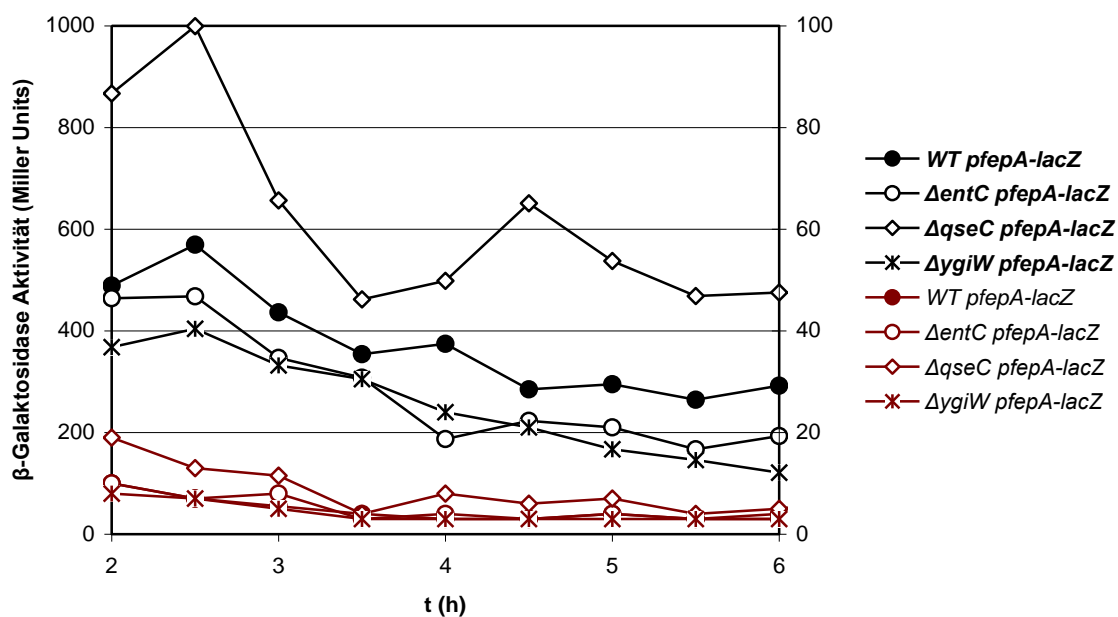
Insgesamt betrachtet sieht es im salmochelinassoziierten System anders aus. Hier zeigt sich eine deutliche Erniedrigung des Expressionslevels ohne YgiW. Das bedeutet, dass YgiW die Expression des Salmochelinrezeptors stimuliert und so bei IroN den gleichen Trend auslöst wie ein Fehlen von QseC.

#### 3.4.1.4 $\beta$ -Galaktosidase-Assays in TY-Medium

Die  $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmungen zur Funktionsaufklärung von QseC und YgiW wurden zusätzlich in TY-Medium, allein und mit Desferal®-Zusatz, durchgeführt. Überprüft wurden die Promotoren von FepA und Fes. Abbildung 3-80 zeigt die Ergebnisse für die

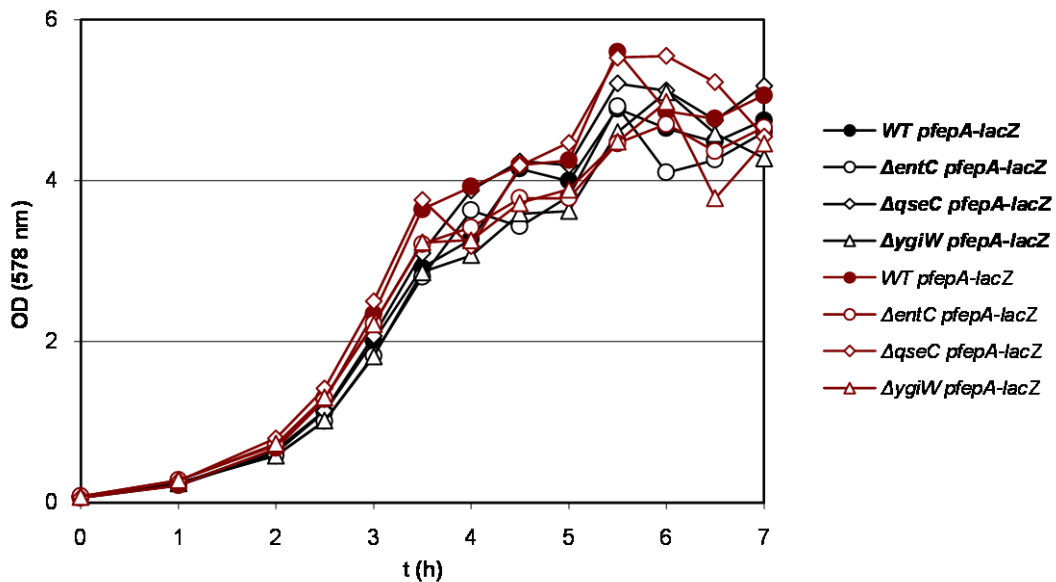
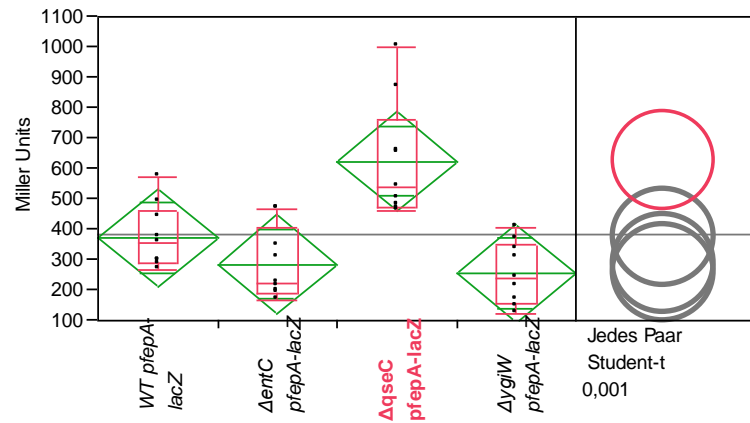
### 3 Ergebnisse

*pfepA-lacZ*-Fusion für den Wildtyp K-12, die  $\Delta entC$ -,  $\Delta qseC$ - und die  $\Delta ygiW$ -Mutante, jeweils mit und ohne Desferal<sup>®</sup> im Medium. Ohne Desferal<sup>®</sup> ist keinerlei Induktion zu beobachten, die Datenpunkte liegen nahe Null. Mit Desferal<sup>®</sup> findet eine Stimulation der eisenregulierten Systeme statt, und eine messbare Expression kommt zustande. Die Mutanten  $\Delta entC$  und  $\Delta ygiW$  lagen in ihren Messwerten unterhalb derer des Wildtyps, waren allerdings nicht signifikant verschieden; Die  $qseC$ -Mutante zeigte hingegen Werte, die über denen des Wildtyps lagen, mit hoher Signifikanz (Abbildung 3-81); Die Daten der  $qseC$ -Mutante zeigten zusätzlich einen signifikanten Unterschied zu denen der  $ygiW$ -Mutante. Die Daten ergaben die gleichen Trends wie die Datensätze, die in NB-Medium gewonnen wurden, mit niedrigerem *Miller Unit* Niveau und Wachstumskurven, die ein Vielfaches der OD<sub>578nm</sub> erreichten. Alle untersuchten Stämme zeigten ein ähnliches Wachstum, unabhängig vom Versuchsmedium, ohne statistisch relevante Unterschiede (Grafik nicht gezeigt) (Abbildung 3-82).



**Abbildung 3-80:  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der FepA-LacZ-Fusion in *E. coli* K-12 [5909], einer  $\Delta entC$ - [5910],  $\Delta qseC$ - [5905] und einer  $\Delta ygiW$ -Mutante [5906].** Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in TY-Medium + 50  $\mu$ M Desferal<sup>®</sup> (schwarze Kennung) bzw. - Desferal (rote Kennung). Zu Grunde liegender Stamm war BW25113, mit Ausnahme der  $\Delta entC$ -Mutante (MC4100). Die Werte sind angegeben in *Miller Units* und entsprechen der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Die Messung der Daten erfolgte in zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

**Abbildung 3-81: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-80.** Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Ein statistisch signifikanter Unterschied ist nur zwischen den Messreihen  $\Delta qseC$  *pfepA-lacZ* und  $\Delta ygiW$  *pfepA-lacZ* festzustellen ( $p \leq 0,01$ ).

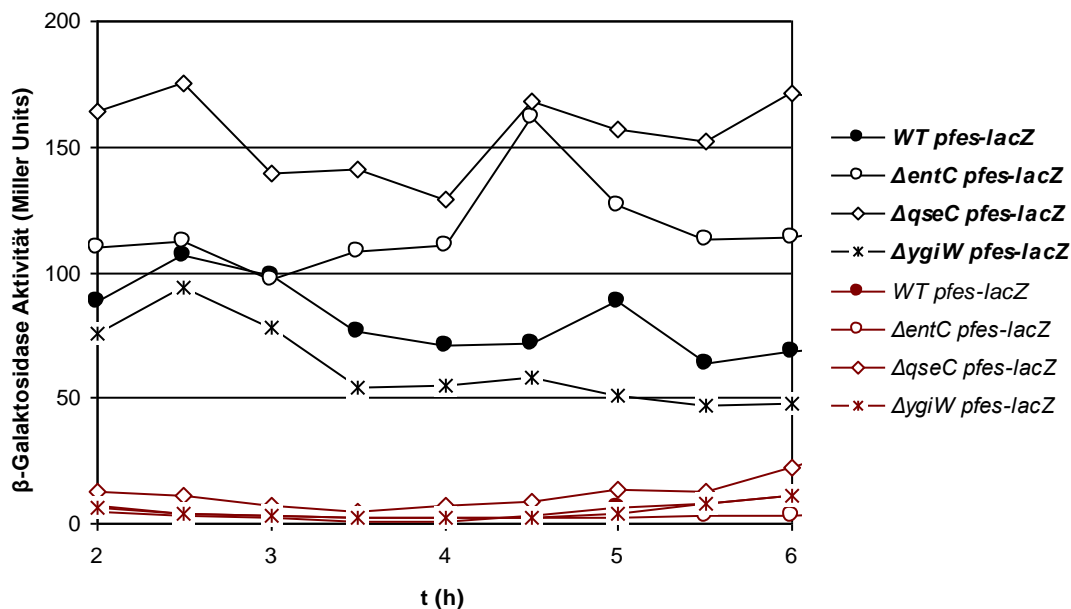


**Abbildung 3-82: Wachstumsverlauf während der  $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung.** Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in TY-Medium + 50  $\mu$ M Desferal<sup>®</sup> (schwarze Kennung) bzw. - Desferal (rote Kennung). Zu Grunde liegender Stamm war BW25113, mit Ausnahme der  $\Delta entC$ -Mutante (MC4100). Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt.

Dieselben Stämme (WT,  $\Delta entC$ ,  $\Delta qseC$ ,  $\Delta ygiW$ ) wurden nach Einbringen einer *fes-lacZ* Promotorfusion in TY und TY mit Desferal<sup>®</sup> Medien untersucht. Die *Miller Units* wurden über einen Versuchszeitraum von sechs Stunden bzw. die  $OD_{578nm}$ -Werte des Wachstums über sieben Stunden hinweg bestimmt. Die ermittelten Daten für das Medium TY waren sehr niedrig, nahezu ohne Induktion. Die Daten für die Versuche mit TY und Desferal<sup>®</sup> zeigten, jeweils im Vergleich zum Wildtypstamm, eine Erniedrigung der Expression bei Fehlen von YgiW, eine

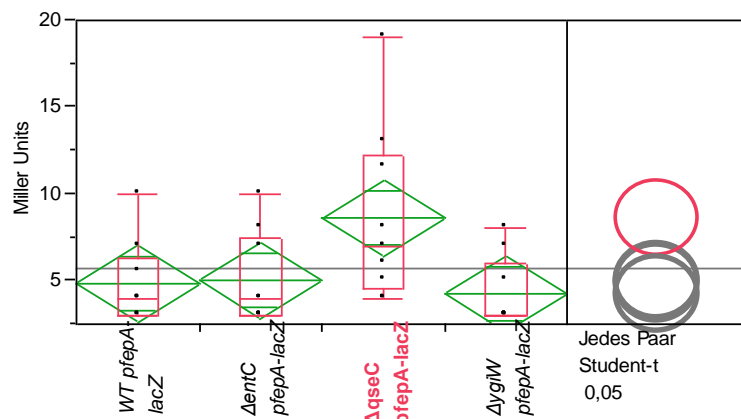
### 3 Ergebnisse

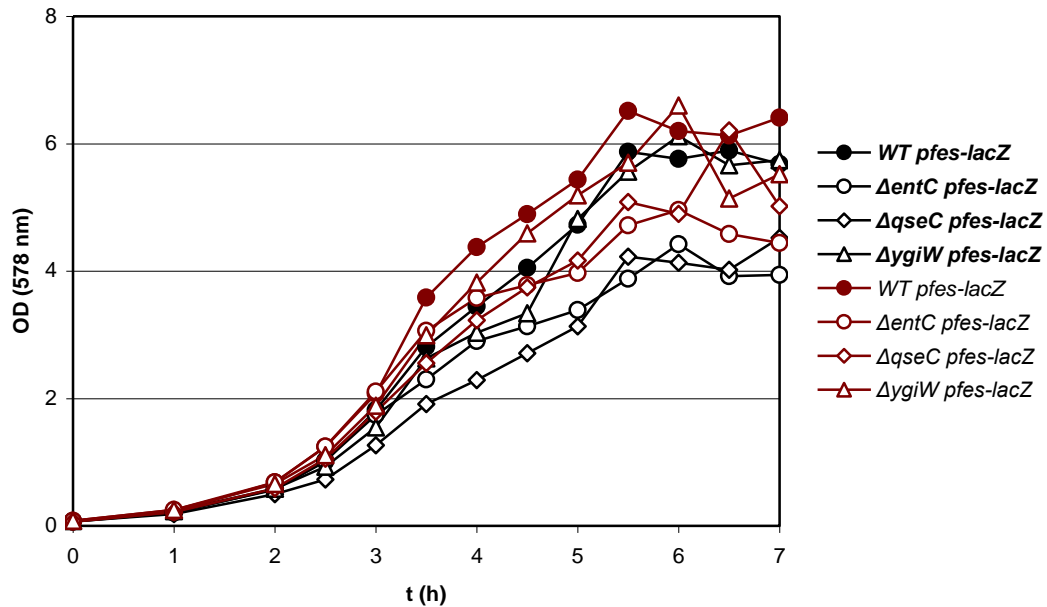
leichte Erhöhung bei Fehlen von EntC und eine stärkere, schwach signifikante Erhöhung bei der *qseC*-Deletion (Abbildung 3-83; Abbildung 3-84). Im Vergleich mit dem eisenlimitierenden Medium NB, lagen die Werte der  $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmungen niedriger und zeigten somit eine geringere Induktion. Die Hinweise auf die Regulierung der eisenassoziierten Prozesse durch die beteiligten Komponenten zeigten dieselben Tendenzen, mit Ausnahme der, der *entC*-Mutante, wie es bereits in den Versuchen mit NB ersichtlich wurde. Unter diesen Bedingungen zeigte die *entC*-Deletionsmutante leichte, statistisch nicht nachzuweisende Abweichungen vom Wildtyp. Das Wachstum der verschiedenen Stämme zeigte keine Unterschiede, auch nicht bei Zusatz von Desferal<sup>®</sup> zum Medium (Abbildung 3-85; Statistikdaten nicht gezeigt).



**Abbildung 3-83:  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Fes-LacZ-Fusionen in *E. coli* K-12 [5885], einer *ΔentC*-[5886], *ΔqseC*- [5881] und einer *ΔygiW*-Mutante [5882].** Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in TY-Medium + 50  $\mu$ M Desferal<sup>®</sup> (schwarze Kennung) bzw. - Desferal<sup>®</sup> (rote Kennung). Zu Grunde liegender Stamm war BW25113, mit Ausnahme der *ΔentC*-Mutante (MC4100). Die Werte sind angegeben in *Miller Units* und entsprechen der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Die Messung der Daten erfolgte in zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

**Abbildung 3-84: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-83.** Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen *ΔqseC pfes-lacZ* und den weiteren Messreihen ist schwach signifikant ( $p \leq 0,05$ ).

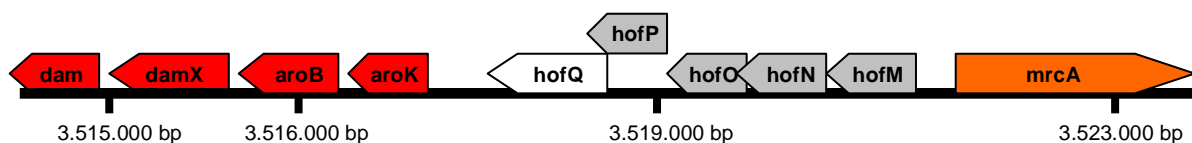




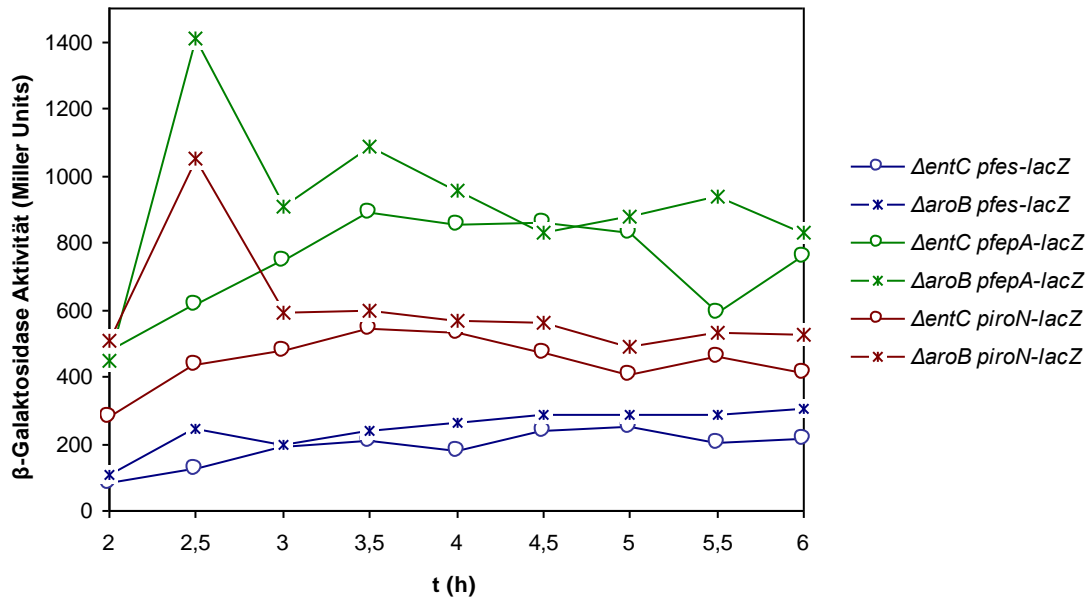
**Abbildung 3-85: Wachstumsverlauf während der  $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung.** Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in TY-Medium + 50  $\mu$ M Desferal® (schwarze Kennung) bzw. - Desferal® (rote Kennung). Zu Grunde liegender Stamm war BW25113, mit Ausnahme der  $\Delta entC$ -Mutante (MC4100). Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt.

#### 3.4.1.5 Vergleich von $\Delta entC$ und $\Delta aroB$

Das Gen *aroB* codiert bei *E. coli* für das Enzym 3-Dehydroquinat Synthase, das einen der Schritte in der Aromatensynthese katalysiert. Ein Fehlen unterbricht die Funktionskette und nimmt damit auch Einfluss auf die Catecholproduktion, von der auch Enterobactin betroffen ist. Wir wollten aufgrund dieses Zusammenhanges eine Überprüfung etwaiger Unterschiede in der Expression der drei Promotor-Operonfusionen *fes-lacZ*, *fepA-lacZ* und *iron-lacZ* in den Stammhintergründen von  $\Delta aroB$  und  $\Delta entC$  untersuchen.



**Abbildung 3-86: Orientierung und Position von *aroB* im Genom von *E. coli* K-12 (MG1655) (gleiche Genfarbe steht für das gleiche Operon).** Gene und ihre Produkte: *dam* = DNA Adenin Methylase; *damX* = vorhergesagtes membranverankertes Protein, stört die Zellteilung; *aroB* = 3-Dehydroquinat Synthase; *aroK* = Shikimat Kinase; *hofQ* - *hofM* = an der Nutzung von DNA als C-Quelle beteiligte Proteine; *mrcA* = Peptidoglycan Synthetase



**Abbildung 3-87:**  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Fes-, FepA- und IroN-LacZ-Fusionen in der *E. coli*  $\Delta entC$ -[5886, 5910, 5820] und einer  $\Delta aroB$ -Mutante [5992, 5993, 5994]. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50  $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MC4100. Die Werte sind angegeben in *Miller Units* und entsprechen der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität.

**Abbildung 3-88:** Statistische Analyse der Datensätze aus **Abbildung 3-87**. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test nicht normal verteilt und wurden deshalb mit dem parameterfreien Wilcoxon / Kruskal-Wallis-Rangsummen-Test getestet. Der Unterschied zwischen den Messreihen ist signifikant: Für den FepA- und den Fes-Promotor schwach signifikant, für den Promotor IroN signifikant.

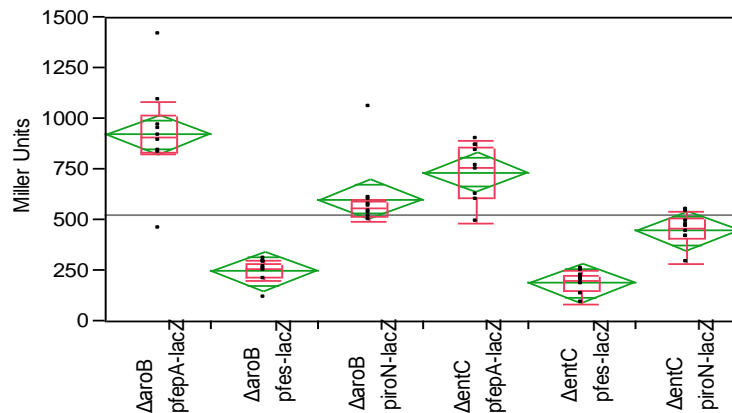
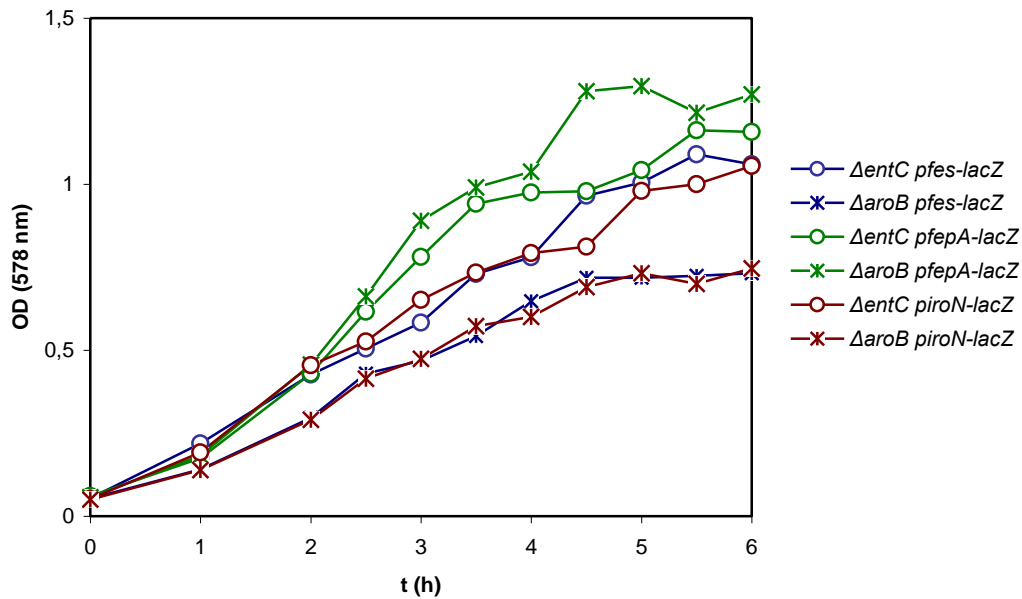


Abbildung 3-87 zeigt die Ergebnisse der  $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmungen von entsprechend zu vergleichenden  $\Delta aroB$ - und  $\Delta entC$ -Mutanten mit derselben Promotorfusion. Die drei Paare zeigten keine relevanten Unterschiede, mit Ausnahme der 2,5 Stunden-Werte der  $\Delta aroB$ -Mutanten, die ein Maximum an dieser Stelle aufwiesen, unabhängig von der jeweiligen Promotorfusion. Dies wurde nicht weiter untersucht. Die Expression der jeweiligen Promotorfusion war im  $\Delta aroB$ - und  $\Delta entC$ -Stammhintergrund sehr ähnlich. Die drei untersuchten Promotoren wiesen aber erneut unterschiedliche Niveaus in ihrer Expressionsrate auf, wie bereits in anderen Experimenten beobachtet (z. B.  $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmungen in 3.4.1.2).





**Abbildung 3-89: Wachstumsverlauf während der  $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung.** Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50  $\mu$ M Desferal<sup>®</sup>. Zu Grunde liegender Stamm war MC4100. Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder.

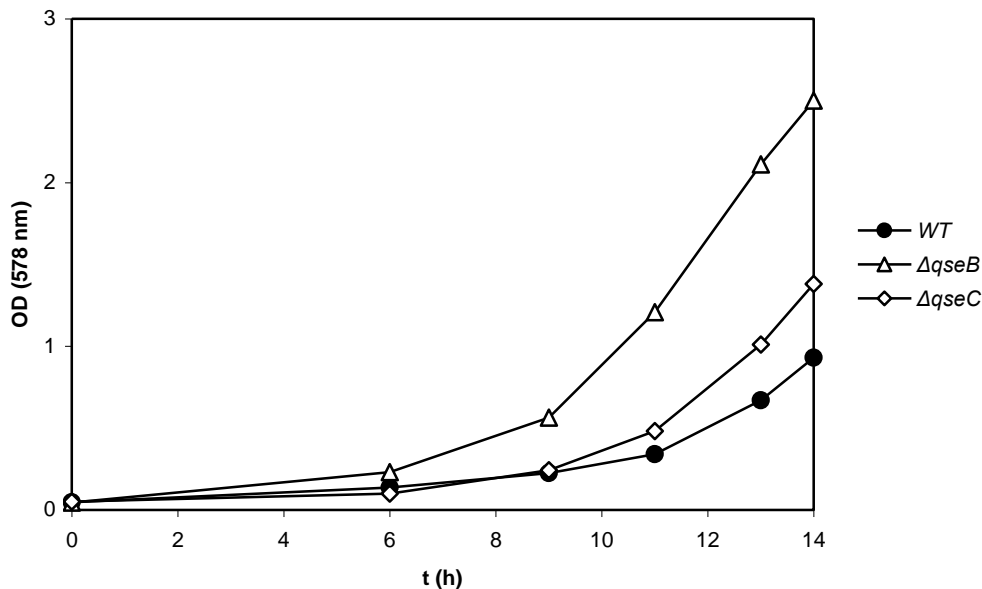
In Abbildung 3-89 sind die entsprechenden Wachstumskurven aufgeführt. Die  $\Delta aroB$ -Stämme gleichen sich in ihrem Wachstumsniveau, mit Ausnahme der Mutante mit der integrierten *pfeA-lacZ*-Fusion. Dieser Stamm ist schneller und insgesamt besser gewachsen als die anderen zwei. Die  $\Delta entC$ -Stämme liegen in ihrem Wachstumsverhalten zwischen denen der  $\Delta aroB$ -Stämme und ähneln sich in ihrem Verlauf. Bei Vergleich des Wachstums der Stämme  $\Delta entC$  und  $\Delta aroB$  mit denselben Promotorfusionen, ergaben sich statistisch gesehen keine Signifikanzen (Grafik nicht gezeigt).

#### 3.4.2 Enterobactinproduktion

Die Auswirkungen der Mutationen im Zweikomponentensystem QseBC auf die Enterobactinproduktion wurde quantitativ untersucht. Dazu wurden ein Wildtyp K-12, eine  $\Delta qseB$ - sowie eine  $\Delta qseC$ -Mutante eingesetzt und in verschiedenen Medien jeweils bei 37°C und aerob unter Schütteln über mehrere Stunden angezogen (3.4.2.1; 3.4.2.2). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und zur Enterobactinbestimmung einer quantitativen HPLC-Analyse unterzogen.

### 3.4.2.1 Eisenarme Bedingungen

Die Anzucht der zu untersuchenden Stämme erfolgt in eisenarmem Milieu, in M63-Medium mit definiertem pH-Wert. Untersucht wurden der *E. coli* Wildtyp K12, eine  $\Delta qseB$ - und eine  $\Delta qseC$ -Mutante. Nach sechs Stunden erfolgte die erste Probennahme und Untersuchung mittels HPLC, bis einschließlich 14 Stunden nach Beginn des Versuches.



**Abbildung 3-90: Wachstumsverlauf während der Enterobactinbestimmung von *E. coli* K-12 [5538], einer  $\Delta qseB$ - [5796] sowie einer  $\Delta qseC$ -Mutante [5722].** Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von 14 Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in M63-Medium (pH 7,6). Es wurde der Stamm BW25113, MG1655  $\Delta qseB$  und BW25113  $\Delta qseC$  verwendet. Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt.

Die Abbildung 3-90 zeigt das Wachstum der drei Stämme in eisenlimitiertem Medium. Auffällig ist das deutlich eingeschränkte Wachstum des Wildtyps im Vergleich zu den beiden Mutanten. Ein Defekt im QseBC-Zweikomponentensystem scheint sich unter diesen Bedingungen wachstumsfördernd auszuwirken, resultierend in einer höheren optischen Dichte während des Wachstumsverlaufes. Vergleichsmessungen, die nach 24-stündigem Wachstum durchgeführt wurden, zeigten eine Angleichung der  $OD_{578nm}$ -Werte der drei untersuchten Stämme über einen längeren Versuchszeitraum. Die Wachstumsunterschiede scheinen in der stationären Phase nicht mehr relevant zu sein.

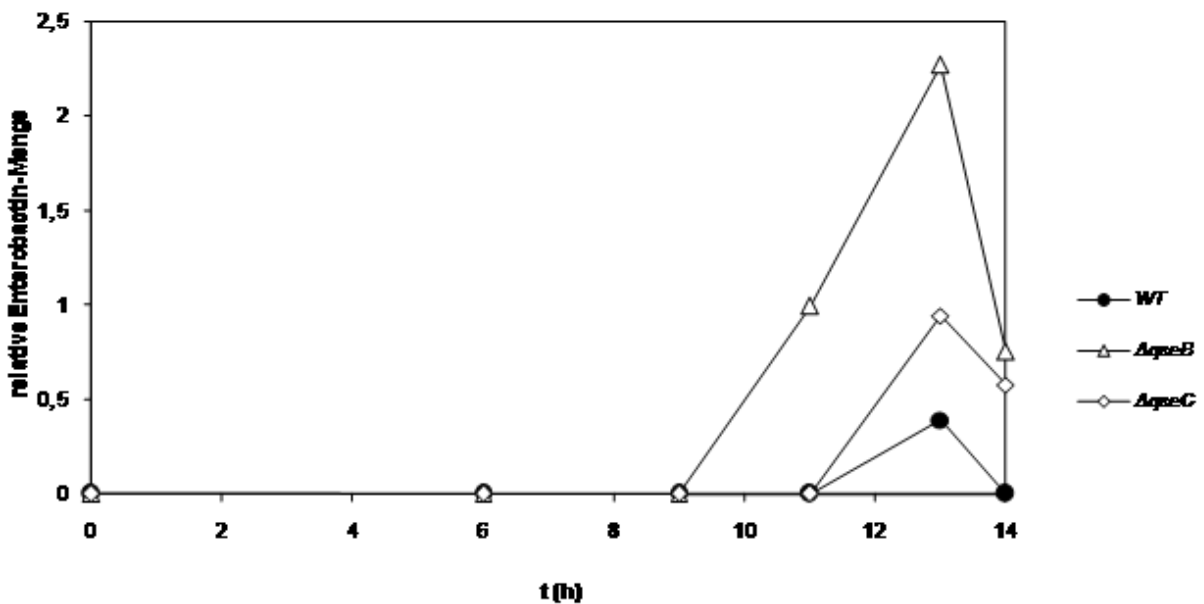


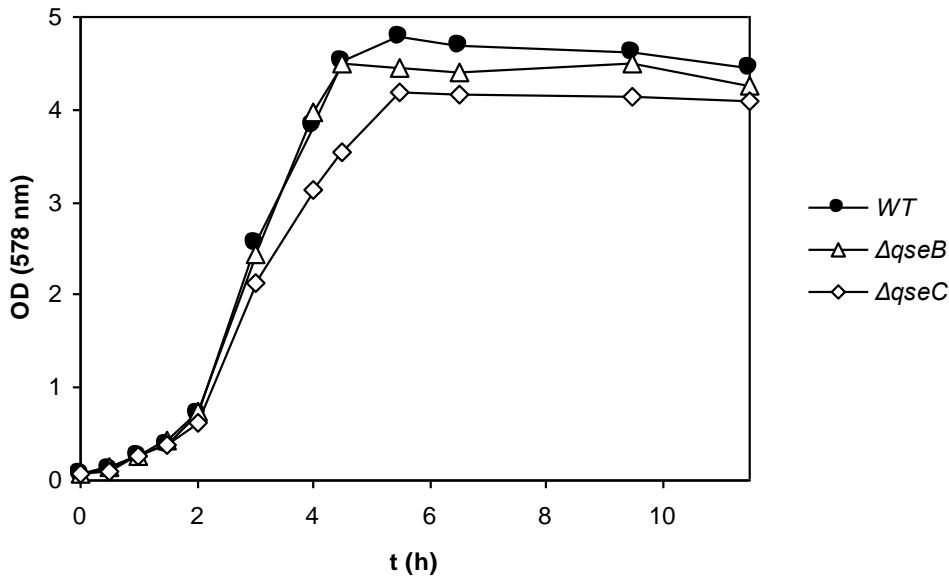
Abbildung 3-91: Enterobactinproduktion in Bezug auf die jeweilige optische Dichte (Area / HPLC pro ca.  $0,8 \times 10^9$  Zellen) von *E. coli* K-12 [5538], einer  $\Delta qseB$ - [5796] sowie einer  $\Delta qseC$ -Mutante [5722]. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von 14 Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in M63-Medium (pH 7,6). Es wurde der Stamm BW25113, MG1655  $\Delta qseB$  und BW25113  $\Delta qseC$  verwendet. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten via HPLC-Messung ermittelt.

Die beiden Mutanten zeigten eine intensivere Enterobactinproduktion, wobei vor allem die  $qseB$ -Mutante, aber auch die  $qseC$ -Mutante deutlich früher und größere Mengen an Enterobactin pro Zelle produzierten, als der K-12 Stamm (Abbildung 3-91).

Dieses Ergebnis ergänzt die Daten der  $\beta$ -Galaktosidase-Messungen, aus denen ebenso ersichtlich wurde, dass das Fehlen eines Partners dieses Zweikomponentensystems im eisenarmen Milieu, zu einer Induktion der Produktion von Enterobactin und seinen Aufnahme- und Abbaukomponenten führt. Weiterhin war ein Maximum der Enterobactinmenge kurz nach Beginn der Produktion nach 13 Stunden Versuchsdauer festzustellen, um im weiteren Verlauf wieder abzunehmen.

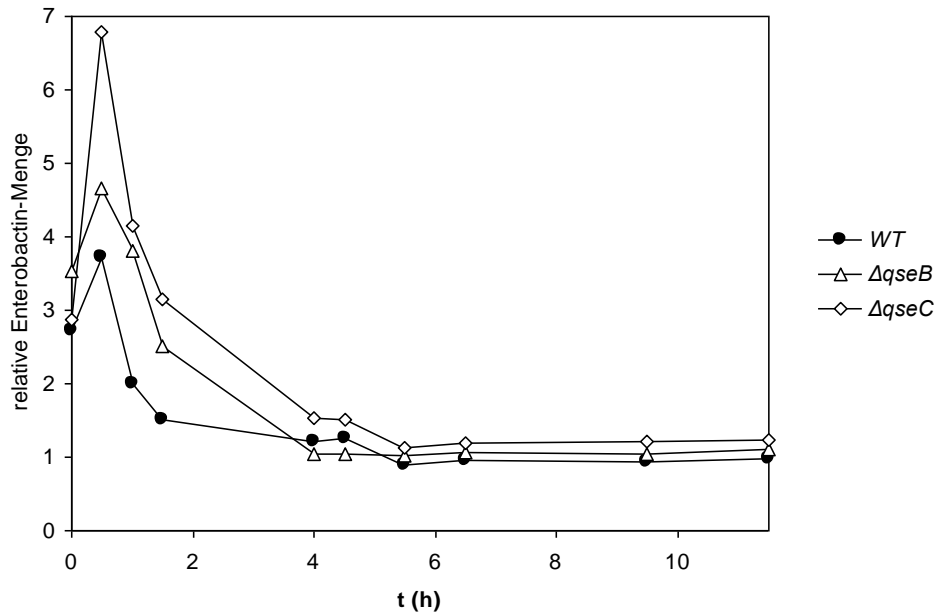
### 3.4.2.2 Eisenreiche Bedingungen

Um zu überprüfen, ob die Wachstumsunterschiede auch in eisenreichem Medium bestehen bleiben oder ob diese auf den Vorteil vermehrter Enterobactinproduktion zurückzuführen sind, wurden die entsprechenden Versuche mit Anzucht in eisenreichem TY-Medium wiederholt.



**Abbildung 3-92:** Wachstumsverlauf während der Enterobactinbestimmung von *E. coli* K-12 [5538], einer  $\Delta qseB$ - [5796] sowie einer  $\Delta qseC$ -Mutante [5722]. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von elf Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in TY-Medium. Es wurden der Stamm BW25113, MG1655  $\Delta qseB$  und BW25113  $\Delta qseC$  verwendet. Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt.

Abbildung 3-92 zeigt den Wachstumsverlauf bei denselben drei Stämmen (WT, *qseB*-Mutante, *qseC*-Mutante), die auch in 3.4.2.1 untersucht wurden, in TY-Medium. Die Versuchsdauer betrug zwölf Stunden, innerhalb dieses Zeitraumes wurden mehrere Proben genommen, die auf die OD<sub>578nm</sub> und ihren Enterobactingehalt via HPLC hin untersucht wurden. Das Wachstum der drei Stämme zeigt einen typischen exponentiellen Verlauf. Die zwei Mutanten mit den jeweiligen Defekten im Zweikomponentensystem QseBC wuchsen etwas langsamer und zeigten insgesamt etwas geringere OD<sub>578nm</sub>-Werte als der *E. coli* K-12. Ein gegenteiliges Ergebnis im Vergleich zu den M63-Daten. Der Wachstumsvorteil in eisenarmen Medien scheint auf vermehrte Enterobactinproduktion und somit auf einen Vorteil in der Eisenversorgung dieser Stämme zurückführbar zu sein.



**Abbildung 3-93: Enterobactinproduktion in Bezug auf die jeweilige optische Dichte (Area / HPLC pro ca.  $0,8 \times 10^9$  Zellen) von *E. coli* K-12 [5538], einer  $\Delta qseB$ - [5796] sowie einer  $\Delta qseC$ -Mutante [5722].** Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von elf Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in TY-Medium. Es wurde der Stamm BW25113, MG1655  $\Delta qseB$  und BW25113  $\Delta qseC$  verwendet. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten via HPLC-Messung ermittelt.

Die Bestimmung des Enterobactingehaltes der Proben ergab ein frühes Einsetzen der Produktion sowie eine höhere relative Produktionsmenge, bezogen auf die vorhandene Zellzahl im Vergleich zur Anzucht in eisenarmem Milieu (Abbildung 3-93). Beide Mutanten zeigten wiederum eine erhöhte Enterobactinproduktion im Vergleich zum Wildtyp, bis zu einem Zeitpunkt von ca. sechs Stunden Versuchsdauer, ab dem eine Angleichung erfolgte und alle drei Stämme sich auf einem Niveau einpendelten. Da die Wachstumsbedingungen eisenreich gehalten waren, zeigte sich dieser Unterschied, anders als in M63-Medium, nicht in verbessertem Wachstum (Abbildung 3-92). Auch hier ließ sich ein maximaler Enterobactin-Peak, dieses Mal nach 30 Minuten, kurz nach Einsetzen der Produktion feststellen.

#### 3.4.3 Analysen von YgiW

Zur weiteren Charakterisierung des periplasmatischen Proteins YgiW sowie die Untersuchung seiner Rolle im Regulationsmechanismus der Eisen-Siderophor-Systeme, wurde YgiW näher analysiert. Dazu erfolgte eine Aufreinigung als rekombinantes, GST-getagtes Protein.

### 3.4.3.1 Produktion und Aufreinigung von YgiW

Um für weitere biochemische und analytische Untersuchungen genügend Protein zur Verfügung zu haben, erfolgte eine Aufreinigung zunächst aus einer Anzucht im Labormaßstab von 800 ml und später aus einer Anzucht im Fermentationsmaßstab von 10 bis 20 l.

Nach erfolgreicher Transformation von pYH9 in BL21 wurde jeweils eine Vorkultur beimpft, die am folgenden Tag eine  $OD_{578nm}$  von mindestens 4 aufwies. Damit wurde die Hauptkultur angeimpft (1 : 20). Das Wachstum wurde in regelmäßigen Abständen überwacht, und bei einer  $OD_{578nm}$  von 0,7 bis 0,8 erfolgte die Induktion durch IPTG. Nach der abschließenden Zentrifugation wurde die Zellausbeute, die bei ca. 4 g/l lag, eingefroren.

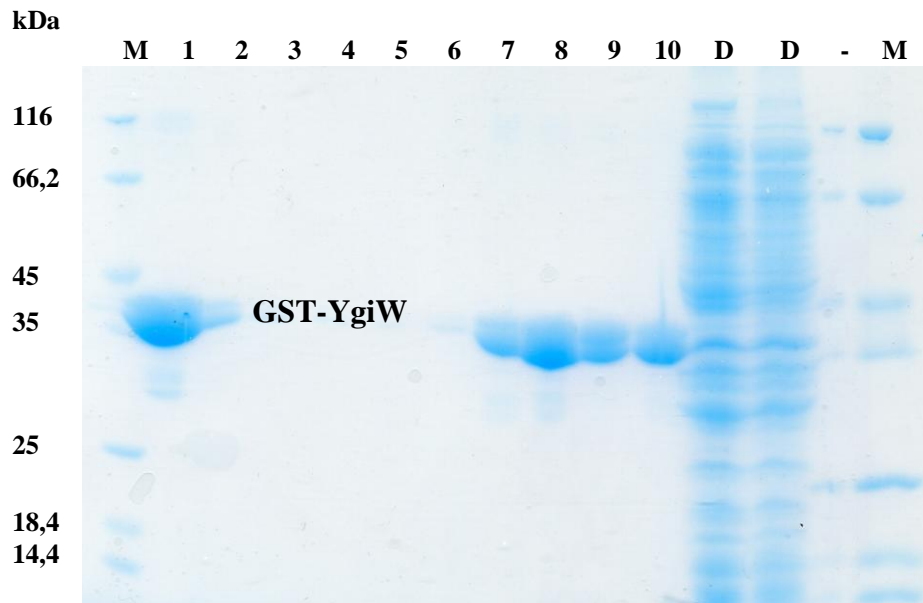
Bei der folgenden Aufreinigung war es wichtig, die Zellen sowie das später extrahierte Protein stets gekühlt zu halten. Nach dem Aufbrechen der Zellen und der Entfernung der Zelltrümmer mittels Zentrifugation wurde der Überstand mit dem Protein auf eine Affinitätsäule aufgetragen. Diese Methode mittels GST-Tag markiertem Protein und GSTrap<sup>TM</sup>-Säule lieferte sehr saubere Ergebnisse: Die anschließend durchgeführte SDS-PAGE zeigte reines Protein, die HPLC-Analyse zeigte definierte Liganden-Peaks.

Im Gegensatz zur ebenfalls durchgeführten Proteinaufreinigung mit Hilfe eines Hexahistidin-Tags: Diese Aufreinigung erfolgte mittels Affinitätschromatographie mit  $Ni^{2+}$ -NTA und die anschließende Untersuchung in der HPLC zeigte diverse Verunreinigungen der Proteinlösung, so dass die GST-Methode Mittel der Wahl blieb.

Eine Besonderheit, vor allem im Vergleich zu Siderocalin, war die farblose Proteinlösung. Siderocalin wurde stets als rosa gefärbte Lösung gewonnen, was auf die Bindung von eisenbeladenem Siderophor zurückzuführen ist.

### 3.4.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (YgiW)

Die Proteinlösungen wurde nach der Aufreinigung einer Qualitätskontrolle mittels SDS-PAGE unterzogen. Abbildung 3-94 zeigt ein exemplarisches 11 %iges Gel mit GST-YgiW-Proteineluaten sowie den Durchlaufaktionen.



**Abbildung 3-94: SDS-PAGE der Elutionsfraktionen nach Überexpression von GST-YgiW.** Aufgetragen wurden jeweils 20 µl Probenmischung und 5 bzw. 10 µl Marker. Links wurde Proteinmarker (M) aufgetragen, es folgten zehn YgiW-Fraktionen (1-10) à 1 ml Eluat bei 38 kDa und zwei Durchlaufraktionen (D), anschließend eine leere lane (-) und erneut eine Spur mit Proteinmarker. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Blue.

#### 3.4.3.3 HPLC-Analyse von YgiW

Um festzustellen, welche Liganden YgiW natürlicherweise gebunden hat, wurden Proteinproben in der HPLC untersucht. Die Abbildung 3-95 zeigt ein Chromatogramm der Messung einer YgiW-Proteinlösung. Zu sehen ist ein einziger Peak, aufgetreten nach 13,9 Minuten, spezifisch für Enterobactin, das aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften erst mit steigendem Acetonitrilgehalt im aufgebauten Gradienten von der Säule eluiert wird. Da die gemessenen Proben jeweils ausschließlich YgiW enthielten (Abbildung 3-94), ist davon auszugehen, dass das detektierte Enterobactin von YgiW gebunden vorlag. Diese Messungen wurden mehrfach wiederholt ( $n > 10$ ). Es wurden ausschließlich Enterobactin bzw. seine Abbauprodukte (DHB, Monomeres / DHBS, Dimeres, Trimeres) detektiert (Abbildung 3-96).

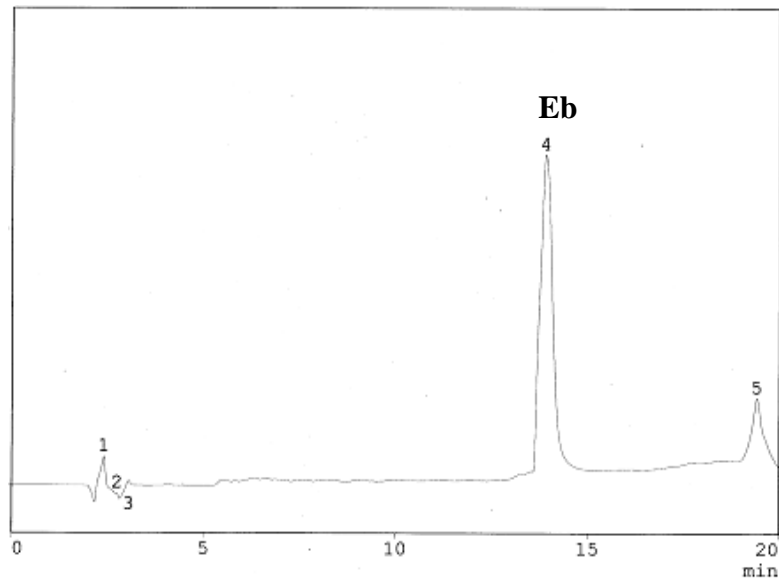


Abbildung 3-95: HPLC-Analyse einer YgiW-Proteinlösung nach Proteinase K-Verdau. Peak Nr. 4 entspricht Enterobactin.

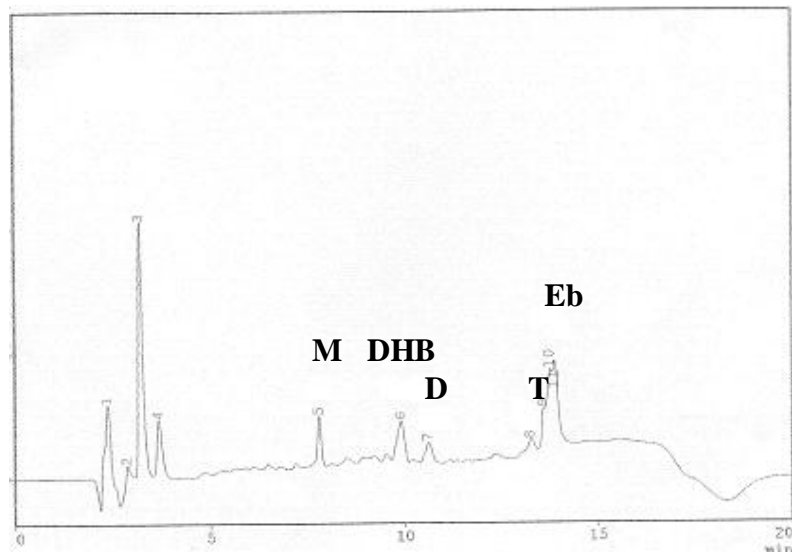


Abbildung 3-96: HPLC-Analyse einer YgiW-Proteinlösung nach Proteinase K-Verdau. Peak Nr. 5 entspricht dem Monomeren von Enterobactin, Nr. 6 Dihydroxybenzoesäure, Nr. 7 dem Dimeren, Nr. 8 dem Trimeren und Peak Nr. 10 entspricht Enterobactin.

#### 3.4.3.4 Proteinmengen-Bestimmung (YgiW)

Der BCA-Test wurde standardmäßig eingesetzt, um die Proteinkonzentrationen der YgiW-Lösungen photometrisch zu quantifizieren. Dabei ergaben sich variable Proteinmengen in den gewonnenen Proben, in Abhängigkeit der aufgearbeiteten Zellmenge sowie der Intensität der späteren Einkonzentrierung zwischen 0,5 und 5 mg/ml.



### 3.4.3.5 Arnow-Reaktion (YgiW)

Der Arnow-Test weist die Anwesenheit von Catecholstrukturen in Lösungen spezifisch und quantitativ nach. Nachdem gezeigt wurde, dass die Proteinlösung nach spezifischer Aufreinigung nur YgiW enthielt (SDS-PAGE) und zudem die HPLC-Analyse die Anwesenheit von Enterobactin nachwies, sollte die Quantifizierung mittels Arnow-Test den Grad der Beladung aufklären. Das Verhältnis von YgiW und Enterobactin (einschließlich seiner Abbauprodukte) lag bei 1 : 0,6 (Durchschnitt von n = 10) (Proteingehalt: siehe 3.4.3.4; Tabelle 2).

**Tabelle 2: Darstellung des Protein- und Enterobactingehaltes der YgiW-Eluate sowie deren Verhältnis zueinander (n = 10).**

Versuch	YgiW-Gehalt	Enterobactin-Gehalt	Verhältnis
1	22,5 µM	2 µM	1 : 0,1
2	17,8 µM	5,4 µM	1 : 0,3
3	18,6 µM	6 µM	1 : 0,3
4	37,2 µM	18,1 µM	1 : 0,5
5	59 µM	34,2 µM	1 : 0,6
6	57,2 µM	37,3 µM	1 : 0,7
7	57 µM	45,3 µM	1 : 0,8
8	57,1 µM	48,4 µM	1 : 0,9
9	18,6 µM	18,2 µM	1 : 1 (0,979)
10	271,2 µM	270 µM	1 : 1 (0,999)
<b>Gesamtverhältnis</b>			<b>1 : 0,6</b>

### 3.4.3.6 Isothermal titration calorimetry (YgiW)

Die *isothermal titration calorimetry* (ITC) ist eine biophysikalische Methodik, mit deren Hilfe man Protein-Ligand-Bindestudien durchführen kann, um thermodynamische Parameter wie Daten zur Bindungsenergie und Reaktionskinetiken zu ermitteln. Da YgiW Enterobactin bzw. seine Abbauprodukte bindet (3.4.3.3), wurden entsprechende Experimente zur Ermittlung der Bindedaten durchgeführt.

Als potentielle Liganden sollten die folgenden Moleküle getestet werden:

2,3-Dihydroxybenzoesäure (DHB) als ein Vorläufermolekül im Prozess der Herstellung des Siderophors Enterobactin. Da aus den Ergebnissen der HPLC-Messungen hervorgeht, dass sowohl Enterobactin als auch dessen Vorstufen gebunden werden, wurde DHB als Positivkontrolle eingesetzt, um die optimalen Bedingungen für eine erfolgreiche ITC-Messung zu bekommen.

Dihydroxybenzoylserin (DHBS), als das Monomere von Enterobactin, sollte erst nach erfolgreicher Einstellung der Messparameter eingesetzt werden, weil sich die Gewinnung mittels

### 3 Ergebnisse

HPLC als sehr zeitintensiv und unergiebig herausstellte und der Erwerb dieser Substanz teuer war.

Noradrenalin als Wirthormon und eventuelles Schnittstellenmolekül zwischen Wirt und Bakterium sollte ebenfalls auf potentielle Bindung getestet werden.

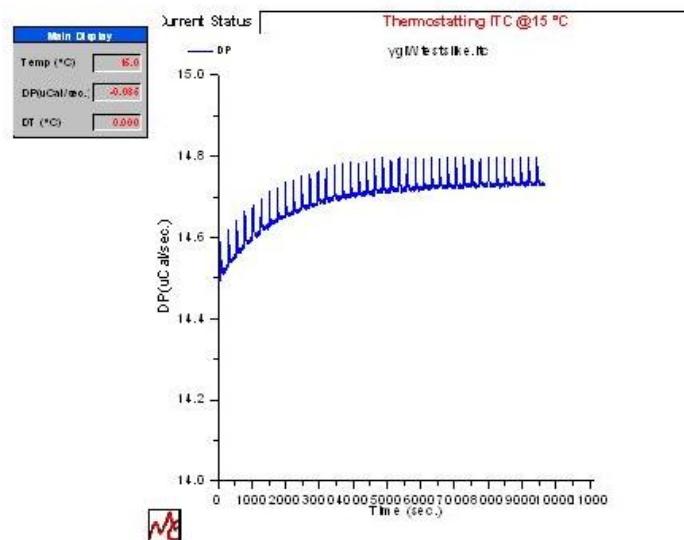
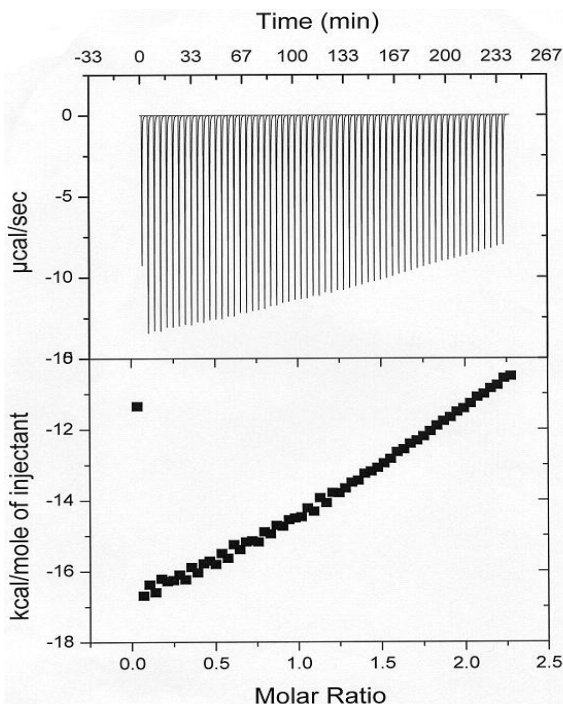
Im Verlauf mehrerer Experimente ergaben sich einige Schwierigkeiten:

Mehrere Messungen mit DHB als Ligand ergaben ITC-Kurven mit immer gleicher, nicht ansteigender Reaktionsstärke auf den zugesetzten Liganden. Zur Kontrolle wurde reiner Puffer (PBS) getestet, der keine Reaktion auf zugegebene Liganden zeigte (8 mM 2,3-DHB).

Erfolgreiche Messungen ergaben Ausschläge zu geringer (Abbildung 3-97) bzw. zu intensiver Intensität (Abbildung 3-98). Zudem waren massive Proteinverluste während der Dialyse zu verzeichnen, was die Messungen rein quantitativ erschwerte.

Aufgrund dieser Problematik erfolgten die Experimente mit weiteren potentiellen Liganden bislang noch nicht.

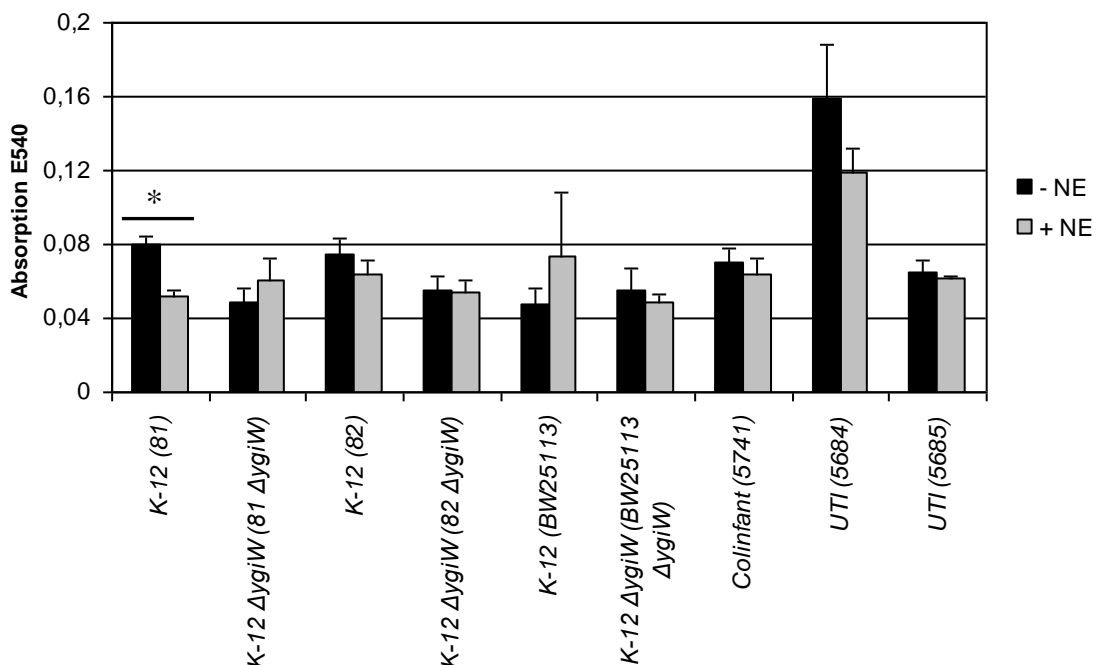
**Abbildung 3-97: Darstellung eines ITC-Experimentes.** GST-YgiW wurde mit 0,1 mM eingesetzt, DHB mit 1 mM bei einer Versuchstemperatur von 15°C.



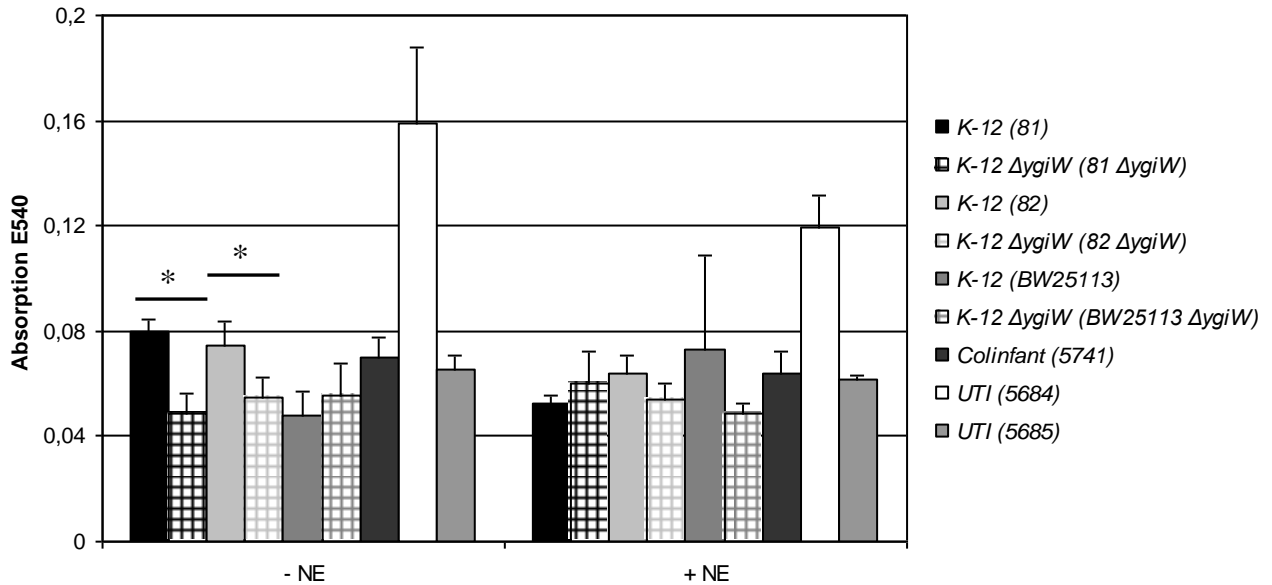
**Abbildung 3-98: Darstellung eines ITC-Experimentes.** GST-YgiW wurde mit 0,4 mM eingesetzt, DHB mit 4 mM bei einer Versuchstemperatur von 15°C.

### 3.4.4 Biofilmbildung

Die Bildung eines Biofilms gilt als virulenzassoziiert. In der Schleimschicht sind die Mikroorganismen geschützt vor vielen, sie bedrohenden äußeren Faktoren. Biofilmbildung wird ebenfalls koordiniert über *Quorum sensing*. Aus diesem Grund erfolgte eine Überprüfung verschiedener Stämme auf ihre Biofilmbildung hin. Die untersuchten Stämme waren verschiedene *E. coli* K-12 Stämme und ihre YgiW-Mutante, Probiotika und UTI Stämme. Alle wurden mit und ohne den Zusatz von Noradrenalin untersucht, um etwaige Effekte dieses Hormons auf die Zellen zu studieren. Dazu wurden die Kulturen in Mikrotiterplatten in eisenarmes M63-Medium mit Glycerol überführt. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C wurde der Biofilm mit Kristallviolett gefärbt. Der gebundene Farbstoff wurde in Ethanol gelöst und die Absorption photometrisch bei 540 nm bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-100 dargestellt. Ohne den Zusatz von Noradrenalin zeigte sich bei der Mehrheit der Stämme eine leichte Erhöhung der Biofilmproduktion im Vergleich zum Ansatz mit Noradrenalin (schwach signifikant bei K-12 [81]). Ebenso war bei der Mehrzahl der Stämme mit YgiW, gegenüber Stämmen ohne YgiW, eine erhöhte Biofilmbildung zu erkennen (schwach signifikant bei K-12 [81] und YgiW-Mutante und K-12 [82] und YgiW-Mutante).



**Abbildung 3-99: Biofilm-Assay Ergebnisse verschiedener *E. coli* Stämme [81, 81  $\Delta$ ygiW, 82, 82  $\Delta$ ygiW, 5863, 5737, 5741, 5684, 5685].** Die Zellen wurden in M63 mit Glycerol (pH 7,6) angezogen mit und ohne den Zusatz von 50  $\mu$ M Noradrenalin (NE). Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C erfolgte die Anfärbung der Zellen des Biofilms mit Kristallviolett. Der gebundene Farbstoff wurde in Ethanol gelöst und die Absorption der Lösung bei 540 nm bestimmt. Der signifikante Unterschied (\*) ist  $0,05 \geq p > 0,01$  (n = 3).



**Abbildung 3-100: Biofilm-Assay Ergebnisse verschiedener *E. coli* Stämme [81, 81 *ΔygiW*, 82, 82 *ΔygiW*, 5863, 5737, 5741, 5684, 5685].** Die Zellen wurden in M63 mit Glycerol (pH 7,6) angezogen mit und ohne den Zusatz von 50  $\mu$ M Noradrenalin (NE). Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C erfolgte die Anfärbung der Zellen des Biofilms mit Kristallviolett. Der gebundene Farbstoff wurde in Ethanol gelöst und die Absorption der Lösung bei 540 nm bestimmt. Der signifikante Unterschied (\*) ist  $0,05 \geq p > 0,01$  ( $n = 3$ ).

#### 3.4.5 Motilität

Die Motilität einer Bakterienpopulation ist ein entscheidender Faktor für deren Virulenz und bedeutet einen Selektionsvorteil. Motile Organismen haben Vorteile in der Neubesiedlung von Nischen und Habitaten und damit in der Ausbreitung im Wirt. Um zu überprüfen, ob und inwieweit *YgiW*, aber auch Noradrenalin und Adrenalin, einen Einfluss auf die Motilität ausüben, wurden folgende Versuche angesetzt: Noradrenalin (NE) bzw. Adrenalin (Epi) dienten als potentiell Attraktans und wurden in den Vergleichsansätzen mit 50  $\mu$ M dem Schwärmagar zugesetzt; Ein Teil der Experimente wurde aerob durchgeführt, ein anderer mit anaerober Vorinkubation, ein weiterer Part vollständig anaerob, um die anaeroben Bedingungen im Darm nachzuahmen. Getestet wurden verschiedene *E. coli* K-12 Stämme und abgeleitete *YgiW*-Mutanten, probiotische *E. coli* und UTI Stämme. Die Ergebnisse sind der Tabelle 3 sowie Abbildung 3-101 bis Abbildung 3-105 zu entnehmen. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichung, soweit vorhanden.

### 3.4 Das Zweikomponentensystem QseBC und das Protein YgiW

**Tabelle 3: Durchschnittliche Größe der Wachstumshöfe nach 24 Stunden Inkubation auf Schwärmagar in Millimetern mit entsprechenden Angaben zur Standardabweichung (SD).** Die untersuchten Stämme und ihre Eigenschaften sind links dargestellt, die vier Experimente mit ihren Versuchsbedingungen sind oberhalb aufgeführt: aerobe Kontrolle und SD, aerob mit Zusatz von Noradrenalin (NE) (50 µM) und SD (n = 2-5); aerobe Kontrolle, aerob mit Zusatz von Adrenalin (Epi) (50 µM) (n = 1); Kontrolle nach anaerobem Schock, nach anaerobem Schock mit Zusatz von Noradrenalin (50 µM) (n = 1); anaerobe Kontrolle und SD, anaerob mit Zusatz von Noradrenalin (50 µM) und SD (n = 2).

Stamm	Kontr. aerob	SD	mit NE aerob	SD	Kontr. aerob	mit Epi aerob	Kontr. anaer. Schock	mit NE anaer. Schock	Kontr. anaer.	SD	mit NE anaer.	SD
K-12 [81]	22,8	3,6	26,6	4	26	25	25	29	20	2,8	23	2,8
K-12 <i>ΔygiW</i> [81 <i>ΔygiW</i> ]	23,8	2,1	26	4,1	22	25	26	32	21,5	3,5	25,5	3,5
K-12 [82]	25,6	8,8	25,8	11	21	22	27	38	21,5	3,5	27,5	3,5
K-12 <i>ΔygiW</i> [82 <i>ΔygiW</i> ]	15,5	2,5	18,5	7,4	16	21	21	14	11,5	2,1	13	2,8
K-12 (BW25113) [5863]	29,4	9,6	30,6	10,6	-	-	21	13	23,5	6,4	25	7,1
K-12 <i>ΔygiW</i> (BW25113 <i>ΔygiW</i> ) [5737]	29	11,1	30,6	11	-	-	19	10	25	2,8	28	1,4
Colinfant [5741]	15	1,4	16,8	2,1	16	20	15	13	18,5	3,5	18,5	3,5
ABU [5814]	15	8,5	14,5	7,8	21	23	-	-	-	-	-	9,9
mpk 2 [5916]	29,7	7,6	32,3	9,3	-	-	18	15	17	8,5	25	1,4
UTI [5684]	28,7	1,5	31,3	2,3	-	-	29	18	26,5	4,9	29	4,2
UTI [5685]	23,3	0,6	28,7	5,5	-	-	21	15	23,5	4,9	27	2,8

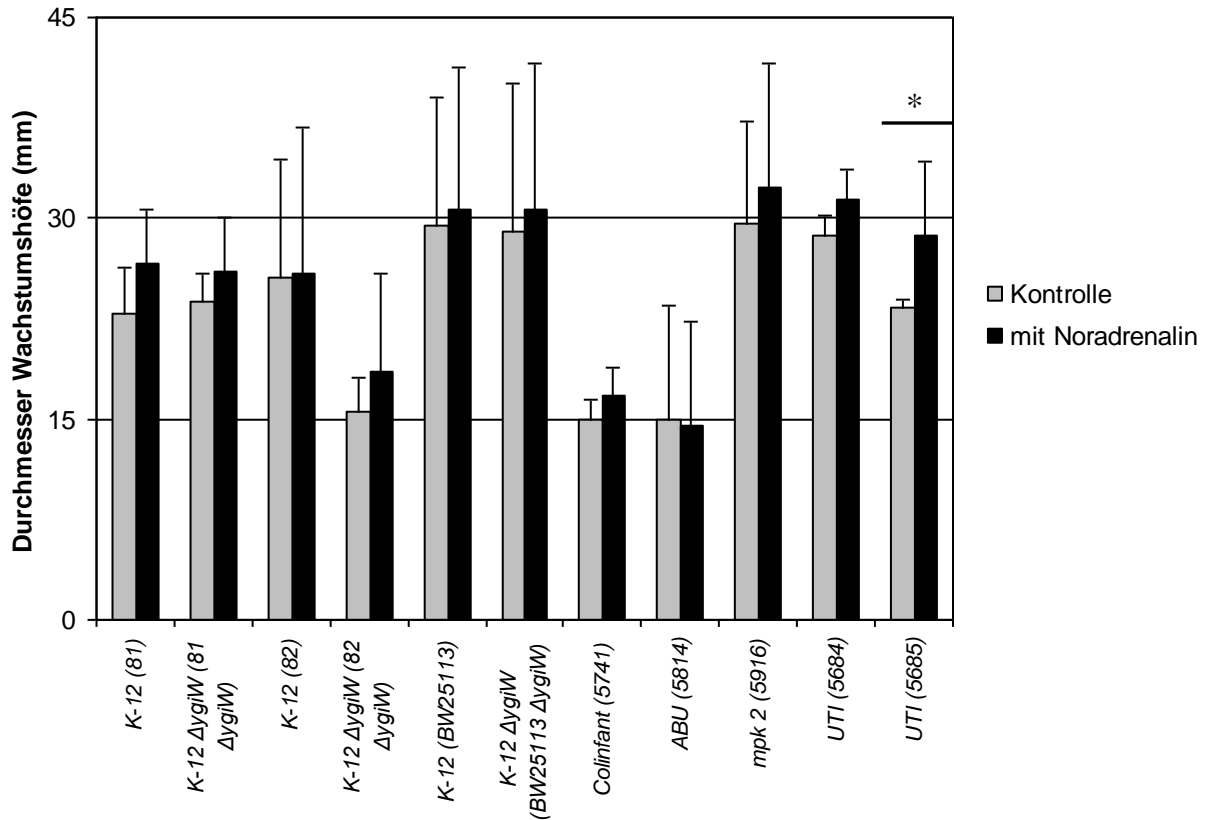
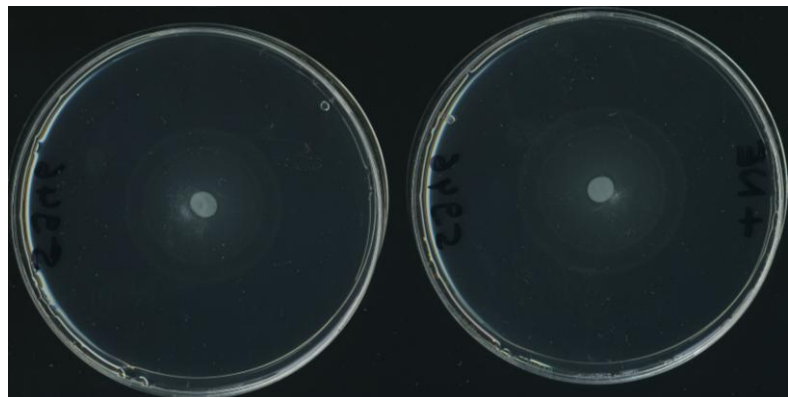


Abbildung 3-101: Vergleich der durchschnittlichen Größe der Wachstumshöfe verschiedener *E. coli* Stämme mit und ohne Noradrenalin nach 24 Stunden aerober Inkubation auf Schwärmagar in mm [81, 81  $\Delta ygiW$ , 82, 82  $\Delta ygiW$ , 5863, 5737, 5741, 5814, 5916, 5684, 5685]. Der Zusatz von NE vergrößerte die Wachstumshöfe meist. Der signifikante Unterschied (\*) ist  $0,05 \geq p > 0,01$  ( $n = 2-5$ ).

Abbildung 3-102: Motilitäts-Assay auf Soft-Agar von K-12 BW25113  $\Delta ygiW$  [5737], links ohne Noradrenalin, rechts mit Noradrenalinzusatz zum Medium (50  $\mu M$ ), aufgenommen nach 24-stündiger aerober Inkubation bei 37°C. Mit Noradrenalin ergab sich in diesem Beispiel eine Vergrößerung des Wachstumshofes um 10 %.



### 3.4 Das Zweikomponentensystem QseBC und das Protein YgiW

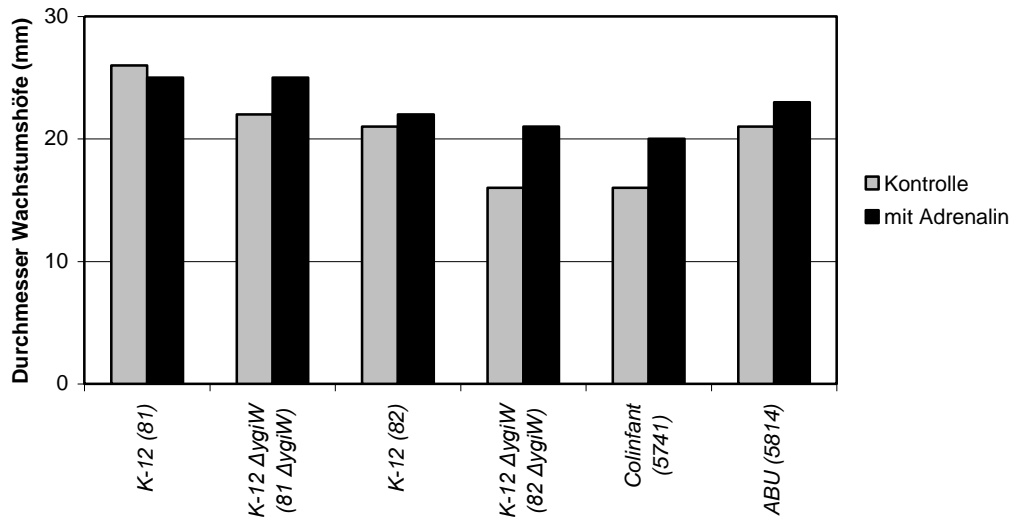


Abbildung 3-103: Vergleich der durchschnittlichen Größe der Wachstumshöfe verschiedener *E. coli* Stämme mit und ohne Adrenalin nach 24 Stunden aerober Inkubation auf Schwärmagar in mm [81, 81  $\Delta ygiW$ , 82, 82  $\Delta ygiW$ , 5741, 5814]. Der Zusatz von Epi vergrößerte die Wachstumshöfe meist.

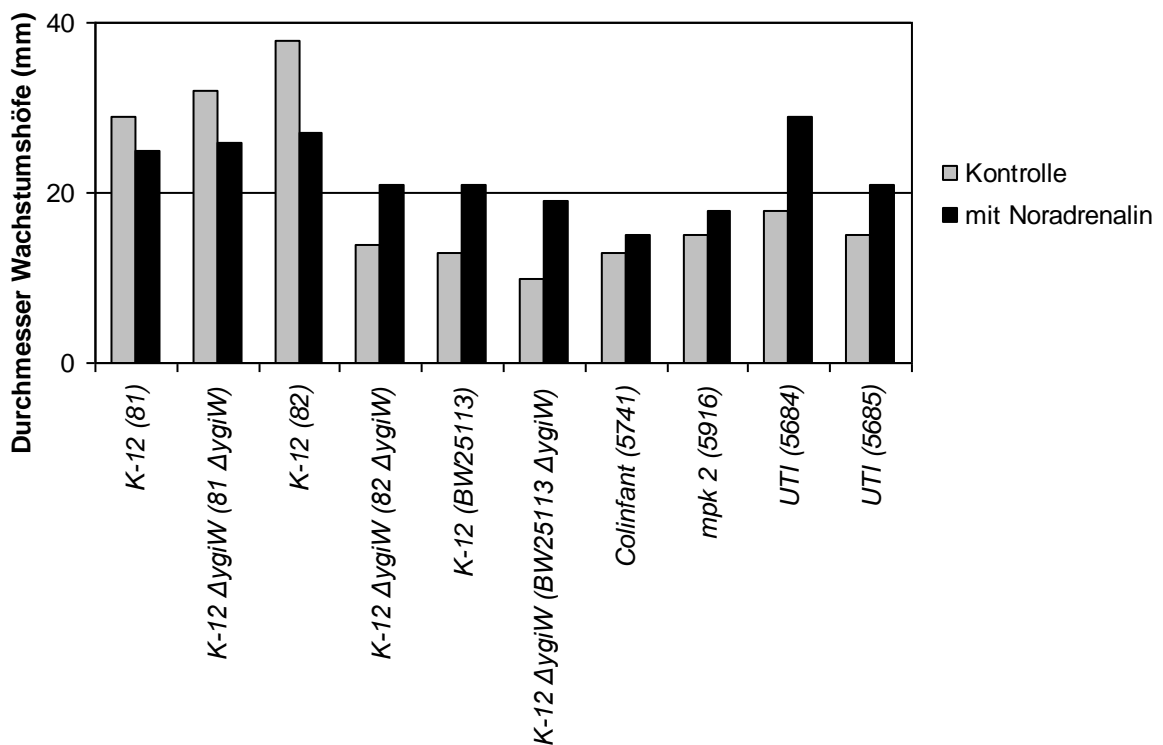
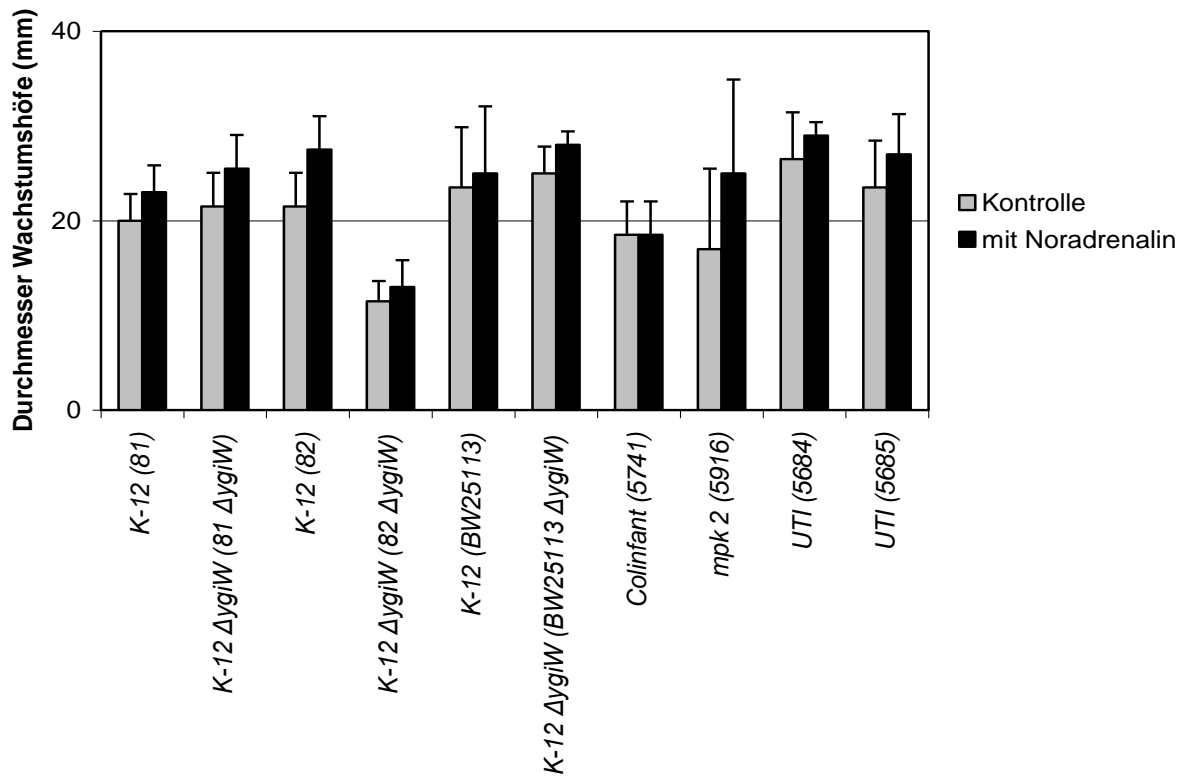


Abbildung 3-104: Vergleich der durchschnittlichen Größe der Wachstumshöfe verschiedener *E. coli* Stämme mit und ohne Noradrenalin nach vorangegangenem anaerober Inkubation nach 24 Stunden aerober Inkubation auf Schwärmagar in mm [81, 81  $\Delta ygiW$ , 82, 82  $\Delta ygiW$ , 5863, 5737, 5741, 5916, 5684, 5685]. Es ließ sich unter diesen Bedingungen kein eindeutiger Effekt von NE nachvollziehen.



**Abbildung 3-105:** Vergleich der durchschnittlichen Größe der Wachstumshöfe verschiedener *E. coli* Stämme mit und ohne Noradrenalin nach 24 Stunden anaerober Inkubation auf Schwärmagar in mm (n = 2) [81, 81  $\Delta ygiW$ , 82, 82  $\Delta ygiW$ , 5863, 5737, 5741, 5916, 5684, 5685]. Der Zusatz von NE vergrößerte die Wachstumshöfe meist.

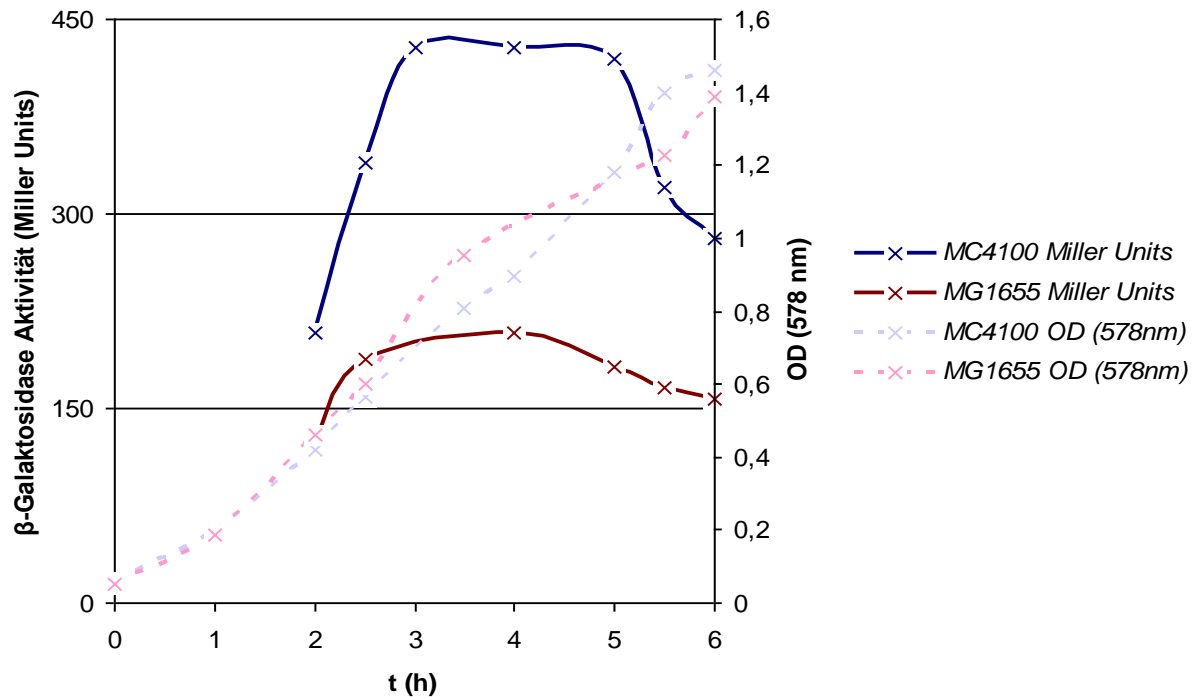
Die Ergebnisse wiesen bei den meisten aeroben und anaeroben Ansätzen bei Zusatz von Adrenalin oder Noradrenalin zum Soft-Agar, eine Erhöhung der Motilität auf. Der Versuchsansatz nach anaerober Vorinkubation zeigte hingegen keine Regel der Beeinflussung durch Noradrenalin. Die Größe der Wachstumshöfe unter anaeroben Bedingungen fiel überwiegend kleiner aus, im Vergleich zu denjenigen, die aerob bebrütet wurden. In der Mehrheit der Fälle zeigte sich mit Vorhandensein von *YgiW* eine erhöhte Motilität, besonders bei *E. coli* K-12 [82] und K-12  $\Delta ygiW$  [82  $\Delta ygiW$ ] (in Tabelle 3 gelb unterlegt).

### 3.5 Vergleich verschiedener Wildtypllinien

Im Zuge der  $\beta$ -Galaktosidase-Assays ergaben sich Messunterschiede zwischen zwei verschiedenen K-12 Stämmen (MC4100 und MG1655), was den Anlass gab, weitere Untersuchungen diesbezüglich durchzuführen. Abbildung 3-106 zeigt die Aktivität des *IroN*-Promotors unter Eisenmangelbedingungen im Stamm MC4100 und MG1655 sowie die dazugehörigen

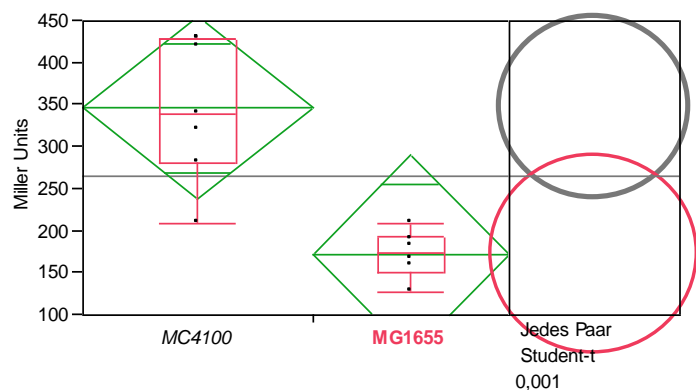


Wachstumskurven. Es ist ein statistisch hoch signifikanter Unterschied im Expressionslevel (*Miller Units*) zu erkennen (Abbildung 3-107); Die Wachstumskurven wiesen keine Unterschiede auf.



**Abbildung 3-106:  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Iron-LacZ-Fusion sowie Daten der optischen Dichte von *E. coli* K-12 MC4100 [5831] und MG1655 [5757].** Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50  $\mu$ M Desferal®. Die Werte sind angegeben in *Miller Units* und entsprechen der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bzw. in OD<sub>578nm</sub>-Messwerten und stellen die Absorption dar. Die Messung der Daten erfolgte in zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

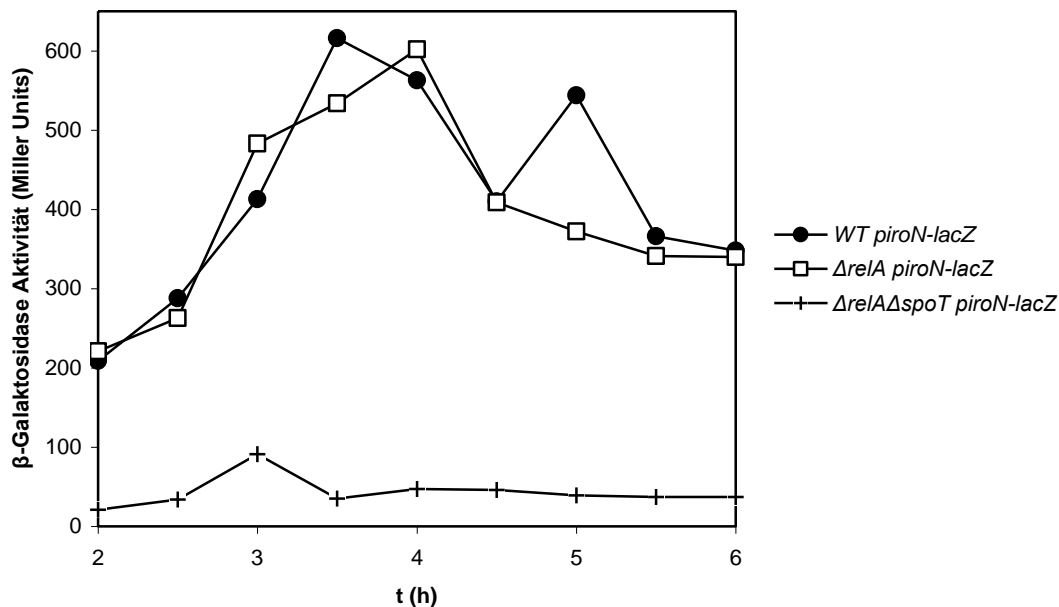
**Abbildung 3-107: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-106.** Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist hoch signifikant ( $p \leq 0,001$ ).



Der genetische Hintergrund beider Stämme weist Unterschiede auf, die kürzlich durch Sequenzierung bestimmt wurden (Ferenci *et al.*, 2009). Die Gene *relA* und *spoT* sind involviert in die bakterielle Stressantwort, die *stringent response*. Die ppGpp-Synthetasen RelA und SpoT, die zusätzlich als ppGpp-Phosphatase fungiert, fehlen dem MC4100 und wurden deshalb näher

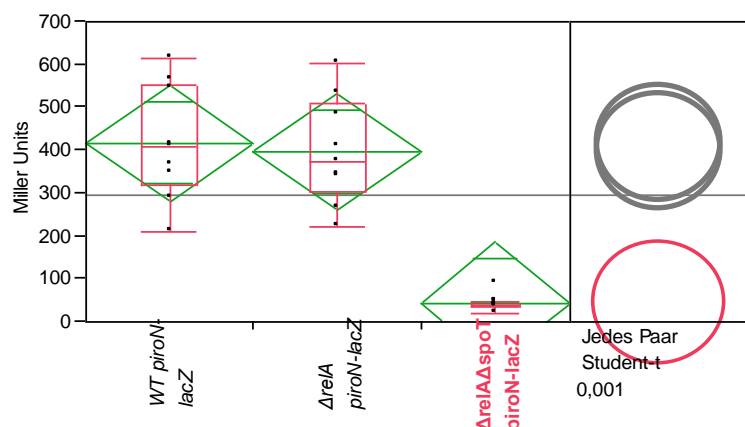
### 3 Ergebnisse

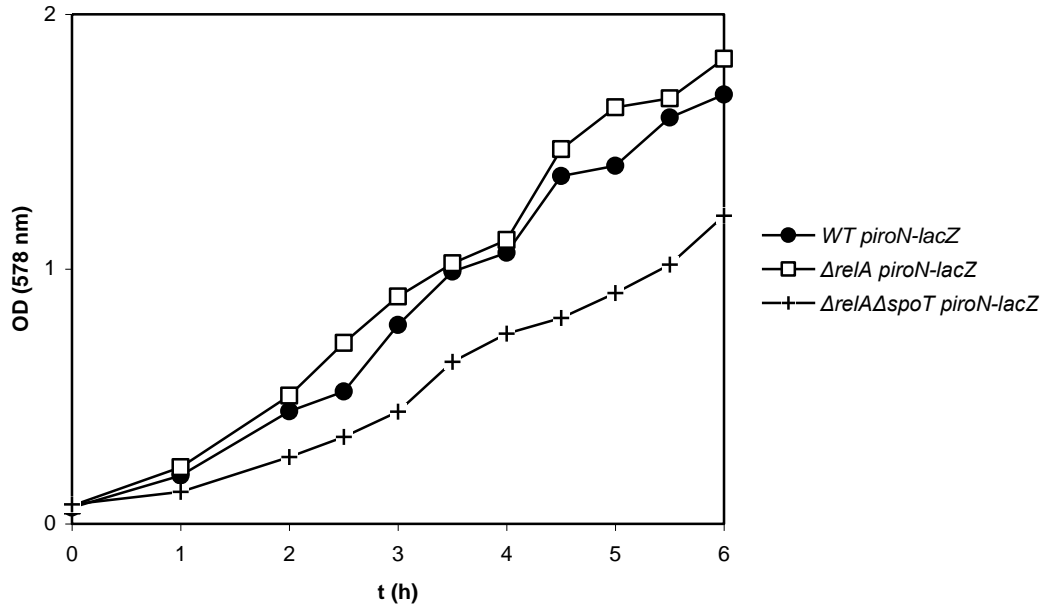
betrachtet. Abbildung 3-108 zeigt die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität des *IronN*-Promotors im Wildtyp, einer  $\Delta$ *relA*- und einer  $\Delta$ *relA*  $\Delta$ *spoT*-Doppelmutante, jeweils mit MG1655 als Stammhintergrund. Zwischen dem Wildtyp und der  $\Delta$ *relA*-Mutante ließen sich keine Differenzen nachweisen. Unterschiede ergaben sich nur zur  $\Delta$ *relA*  $\Delta$ *spoT*-Doppelmutante (hoch signifikant; Abbildung 3-109). Bei Betrachtung der Wachstumskurven konnten keine statistisch relevanten Unterschiede nachgewiesen werden, allerdings lag die  $\Delta$ *relA*  $\Delta$ *spoT*-Doppelmutante in ihrem Wachstumsniveau etwas unterhalb dessen, der anderen getesteten Stämme (Abbildung 3-110; Abbildung 3-111). *RelA* scheidet somit als entscheidende Größe aus, weitere Faktoren stehen in ihrer Testung noch aus. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde während aller Versuche darauf geachtet, möglichst Stämme und Stammkonstruktionen zu vergleichen, die auf demselben Stammhintergrund beruhen.



**Abbildung 3-108:  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der *IronN*-LacZ-Fusion in *E. coli* K-12 [5936], einer  $\Delta$ *relA*-[5937] und einer  $\Delta$ *relA*  $\Delta$ *spoT*-Doppelmutante [5938].** Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50  $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MG1655 (Cashel). Die Werte sind angegeben in *Miller Units* und entsprechen der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität.

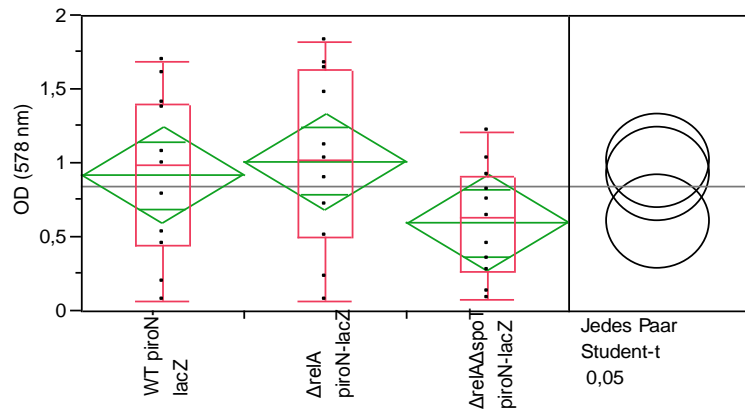
**Abbildung 3-109: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-108.** Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen  $\Delta$ *relA*  $\Delta$ *spoT* *piroN-lacZ* und den weiteren Messreihen ist hoch signifikant ( $p \leq 0,001$ ).





**Abbildung 3-110: Wachstumsverlauf während der  $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung.** Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50  $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MG1655 (Cashel). Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder.

**Abbildung 3-111: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-110.** Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen den Messreihen sind nicht signifikant.





## 4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden einerseits mögliche Evasionsmechanismen einiger Bakterien vor humanen Abwehrstrategien bezüglich ihrer Eisenversorgung und andererseits die Rolle eines Zweikomponentensystems im Eisenregulations-Kontrollsystem sowie differenzierte Unterschiede zwischen verschiedenen, K-12 deklarierten *E. coli* Stämmen untersucht.

Wir konnten zeigen, dass *E. coli* sich mit Hilfe von Salmochelin der Immunantwort des Wirtes entzieht. Nur unter bestimmten Voraussetzungen kann Salmochelin vom humanen Abwehrprotein Siderocalin gebunden werden. Es wurde nachgewiesen, dass QseBC und YgiW eine Rolle im Kontrollmechanismus der Eisenregulation bei *E. coli* spielen. Der Nachweis dieser Regulation wurde durch Unterschiede zwischen verschiedenen *E. coli* K-12 Derivaten, erschwert.

### 4.1 Siderophoraufreinigung

Die HPLC-Technik wurde als Mittel der Wahl für die letzten Schritte der Siderophorreinigung und zur Kontrolle eingesetzt (Collins, 2004).

### 4.2 Siderocalin

Siderocalin ist als bakteriostatisch wirksame Substanz des menschlichen angeborenen Immunsystems bekannt. Es fängt bestimmte mikrobielle Siderophore ab und verhindert so den Zugang der Mikroorganismen zu ihrer Eisenquelle (Abergel *et al.*, 2008). Es wurde gezeigt, dass sowohl Siderocalin, als auch andere Lipocaline wie das *tear* Lipocalin (TLC), an verschiedenen Wirkorten zum Einsatz kommen und, dass diese Form der Immunabwehr eine wichtige Rolle spielt (Breustedt *et al.*, 2009) und beispielsweise eine Barriere für die Besiedlung durch Pathogene des oberen Respirationstraktes bildet (Bachman *et al.*, 2009). Mikroorganismen versuchen dieser Maßnahme des Wirtes zu entgehen. Durch strukturelle Modifikation der Siderophore, z. B. durch Methylierung der Catecholatringle von Enterobactin, kann die Erkennung durch Siderocalin *in vitro* verhindert werden (Abergel *et al.*, 2006a). Die Methylierung der Catecholatringle von Enterobactin wurde allerdings *in vivo* noch nicht beobachtet. Catechol-Siderophore sind weit verbreitete Siderophore der Mikroorganismen des Menschen und gleichzeitig die hauptsächlichen Bindungspartner von Siderocalin. Diese Interaktion kann durch eine strukturelle Veränderung des Moleküls gestört werden, wie es z. B. durch Glycosylierung von Enterobactin zum hydrophilen Salmochelin beobachtet wurde. Laut Vorhersage

und Bindungsstudien wird es unter natürlichen Voraussetzungen nicht mehr erkannt und gebunden (Fischbach *et al.*, 2006; Strong, 2006). Unter bestimmten Bedingungen jedoch, konnte in dieser Arbeit eine Bindung und Komplexbildung zum Eisen-Salmochelin-Siderocalin gezeigt werden. Weitere Analysen zu potentiellen Bindungspartnern und den Bindungen selbst wurden durchgeführt und beleuchten die Spezifität und Stärke der Siderocalin-Siderophor Interaktion.

### 4.2.1 Siderocalin bindet Enterobactin und seine Derivate

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass humanes Siderocalin bestimmte Siderophore binden kann. Der Nachweis für eine Bindung von Enterobactin und seiner Derivate wurde erbracht (Goetz *et al.*, 2002), ebenso wie für Bacillibactin und Carboxymycobactin (Holmes *et al.*, 2005). Um die Bindung von Enterobactin und Siderocalin näher zu beleuchten, wurden Versuche mit einem GST-konjugierten, rekombinant gewonnenen Siderocalin durchgeführt. Weil GST ein relativ hohes Molekulargewicht von ca. 23 kDa aufweist, wurde mit der sehr spezifischen Protease Thrombin, der GST-Rest abgespalten. Da Experimente zur Funktionalität des Komplexes keine Beeinträchtigung durch den GST-Rest aufwiesen, wurde im Folgenden auf die Abspaltung des GST-Restes verzichtet. Analysen des rekombinant hergestellten Siderocalins zeigten, dass der Komplex stets mit Fe-Enterobactin aufgereinigt wird. Erkennbar war das an der rötlichen Färbung der gewonnenen Proteinlösung, was in anderen Arbeiten ebenfalls gezeigt wurde (Goetz *et al.*, 2002). Eisenfreies Enterobactin, Apo-Enterobactin, hingegen ist farblos. Die Menge von Enterobactin in der Siderocalinlösung, konnte in der HPLC-Analyse nachgewiesen werden. Die Produktion des Proteins erfolgte dabei in einem *E. coli* Stamm, der als Siderophor nur Enterobactin produziert. Vor der HPLC-Analyse wurde das Siderocalin mit Proteinase K verdaut. Analysen hatten gezeigt, dass sich beim intakten Protein weniger Siderophor nachweisen lässt, als nach einem Proteaseverdau. Für eine genauere Quantifizierung wurde deshalb das Siderocalin vorher verdaut, um die gesamte Siderophormenge freizusetzen und Schwebstoffe wurden durch Zentrifugation entfernt, um die Messung nicht zu stören. Bei der HPLC-Analyse konnten auch Enterobactin-Spaltprodukte nachgewiesen werden wie beispielsweise das Monomere, das von Goetz *et al.* auch in der Kristallisation von Siderocalin gefunden wurde (Goetz *et al.*, 2002). Siderocalin weist, wenn es aus einem Enterobactinproduzenten gewonnen wird, immer einen Anteil an gebundenem Fe-Enterobactin auf (Doneanu *et al.*, 2004). Versuche der Aufreinigung aus einem Enterobactin-*non-producer*, zeigten nur geringe Mengen an gewonnenem Protein, was vermuten lässt, dass die

Enterobactinbindung zur Stabilisierung des Siderocalins beiträgt (Valdebenito *et al.*, 2007). In diesem Zusammenhang verwundert die niedrige Beladung des Siderocalins mit ca. 21 % Siderophor nach Aufreinigung aus *E. coli* Nissle 1917. Der Catecholatgehalt wurde mit zwei Methoden ermittelt: zum Einen, die Quantifizierung über die Fläche der Peaks in der HPLC und zum Anderen, über die Bestimmung der Catecholmenge in der zu untersuchenden Lösung mittels Arnow-Reaktion. Eine teilweise Beladung scheint das GST-Siderocalin während seiner Produktion in der Zelle zu stabilisieren.

#### 4.2.2 Siderocalin bindet Salmochelin S4 unter bestimmten Voraussetzungen

Die Bindung von Salmochelin durch Siderocalin wurde von Strong theoretisch ausgeschlossen (Strong, 2006). Noch während des Entstehens dieser Arbeit wurde von Fischbach und seiner Gruppe ebenfalls experimentell gezeigt, dass Salmochelin nicht von Siderocalin gebunden wird (Fischbach *et al.*, 2006). Die Vermutung, dass die Glycosylierung von Enterobactin einen Evasionsmechanismus der Bakterien darstellt, um der Immunantwort des Wirtes zu entgehen, wurde so bestätigt. Salmochelin zählt somit zu den virulenzassoziierten Systemen der Bakterien (Crouch *et al.*, 2008; Russo *et al.*, 2002). Die zweifache Glycosylierung macht das lipophile Enterobactin zum hydrophilen Salmochelin, was sich in HPLC-Analysen durch eine deutlich kürzere Retentionszeit zeigte. Der im Verlauf der Messung ansteigende Acetonitrilgehalt sorgt für eine beschleunigte Elution hydrophober Substanzen. Salmochelin eluierte bei einem 20-minütigen Analyselauf vier bis fünf Minuten früher als Enterobactin. Die Frage, inwieweit sich die Veränderung des Moleküls auf die Bindefähigkeit durch Siderocalin auswirkt, war Teil der Fragestellung dieser Arbeit. Hierzu diente die heterologe Expression von GST-Siderocalin in *E. coli* Nissle 1917, der auch als Probiotikum Mutaflor<sup>®</sup> bekannt ist. Dieser Stamm produziert zusätzlich zu Aerobactin und Yersiniabactin sowohl Enterobactin, als auch Salmochelin (Bister *et al.*, 2004). Die prozentuale Aufteilung zeigt dabei 79 % Salmochelin und 21 % Enterobactin bei Anzucht in Minimalmedium (pH 7,6 und 37°C) (Valdebenito *et al.*, 2006). Die Analysen des aus diesem Stamm isolierten Siderocalins ergaben eine durchschnittliche Tri-Catecholbeladung des Siderocalins von 21 %. Die Bestimmung wurde durch Arnow-Tests ermittelt und durch HPLC-Quantifizierung verifiziert. In den HPLC-Analysen wurde auch die Natur der gebundenen Catechole bestimmt: nachgewiesen wurden sowohl Enterobactin, als auch Salmochelin S4 und sein Monomeres, SX. Der Anteil an Salmochelin lag bei durchschnittlich 55 %, der von Enterobactin bei 45 %. Interessanterweise wurde sogar mehr

Salmochelin in den Komplexen gebunden, als Enterobactin, so dass während der Siderocalin-synthese von einer hohen Affinität für beide Catecholat-Siderophore ausgegangen werden kann. Um auszuschließen, dass Salmochelin nur unspezifisch an Siderocalin oder den GST-Rest bindet, wurde ein Konkurrenzversuch durchgeführt. GST-Siderocalin wurde mit Salmochelin inkubiert und anschließend untersucht: Es ließ sich kein gebundenes Salmochelin nachweisen. Demnach kann von einer unspezifischen Bindung abgesehen werden, ebenso wie von der Möglichkeit der Verdrängung von gebundenem Enterobactin durch Salmochelin. Wenn beide Substanzen, Salmochelin und Siderocalin, im selben Organismus produziert werden, scheint das noch nicht vollständig gefaltete Protein Salmochelin als Ligand zu erkennen und zu binden. Salmochelin wird also vermutlich während der Elongation der Polypeptidkette bzw. im Prozess der Proteinfaltung gebunden.

### 4.2.3 Siderocalin bindet kein Yersiniabactin

Yersiniabactin ist ein Carboxylat-Siderophor, das von verschiedenen Arten der Enterobacteriaceae produziert wird (Carniel, 2001), charakteristisch und namensgebend ist seine Produktion durch *Yersinia pestis* und *Yersinia enterocolitica* (Drechsel, 1995). Strong hat die theoretischen Ligandeneigenschaften von verschiedenen Siderophoren, aufgrund ihrer Struktur von Siderocalin gebunden zu werden, untersucht (Strong, 2006). Yersiniabactin wurde auf die Liste der Moleküle gesetzt, die keine potentiellen Liganden der humanen Siderophorfänger darstellen. Diese Vorhersage wurde im Rahmen dieser Arbeit experimentell überprüft. *E. coli* Nissle 1917 produziert vier verschiedene Siderophore, außer Enterobactin und Salmochelin noch Aerobactin und Yersiniabactin (Grozdanov *et al.*, 2004). In diesem Stamm wurde Siderocalin heterolog exprimiert und aufgereinigt. Die anschließenden Analysen zeigten eine Bindung der beiden Catecholate Enterobactin und Salmochelin, Aerobactin und Yersiniabactin konnten nicht nachgewiesen werden. Für das Hydroxamat Aerobactin wurde eine Bindung bereits ausgeschlossen (Flo *et al.*, 2004), was diese Studien ebenfalls zeigten, und auch Yersiniabactin wird von Siderocalin nicht erkannt und gebunden; auch nicht, wenn Protein und Siderophor im selben Organismus produziert werden und somit die Möglichkeit besteht, dass das Siderophor in Kontakt mit dem ungefalteten Protein tritt. Die Produktion dieser Siderophore wirkt sich demnach positiv für die entsprechenden Bakterien bezüglich ihrer Eisenversorgung und somit ihres Wachstums und ihrer Virulenz im menschlichen Organismus aus.



#### 4.2.4 Siderocalin hemmt das Wachstum von *Escherichia coli* K-12

Die Tatsache, dass Siderocalin Enterobactin binden kann und es so für Mikroorganismen unzugänglich macht, hat verschiedene Auswirkungen auf die Bakterienpopulation. Siderophore werden i. d. R. erst ab einer bestimmten Zelldichte produziert, die diesen Aufwand rentabel macht (*Quorum sensing*). Die Produktion startet erst unter Eisenmangelbedingungen, wenn der Fur-Repressor die Aktivierung der entsprechenden Gene zulässt. Wenn die energieaufwändig hergestellten Enterobactinmoleküle durch das Wirtspolypeptid für die Bakterien verloren sind und der benötigte Eisenzugang fehlt, kommt das Wachstum durch Eisenmangel zum Erliegen, denn effizientes Wachstum ist nur bei Konzentrationen über  $10^{-7}$  M Fe(III) möglich (Braun, 2007). Um die Auswirkungen von ansteigenden Siderocalinkonzentrationen auf einen *E. coli* K-12 Stamm zu untersuchen, wurde MG1655 in Zellkulturmedium mit Dosen bis 2  $\mu$ M Siderocalin versetzt. Das Wachstum wurde nach 16 Stunden über die Koloniezahl bestimmt. Das Ergebnis zeigte erwartungsgemäß eine Hemmung des Wachstums, obwohl dem Medium zusätzlich 10 % fötales Kälberserum zugesetzt wurde, das den Eisengehalt der Lösung entsprechend erhöhte. Der Grad der Hemmung lag bei einem Faktor von ca.  $10^2$ . Da das Siderocalin nur zu ca. 20 % mit Enterobactin (Doneanu *et al.*, 2004) beladen war, konnten weitere Eisen-Siderophormoleküle gebunden werden, womit es zu einem Entzug der Eisenquelle für *E. coli* kam. Dies resultierte letztlich in einer Wachstumsinhibition. Diese Funktionsweise des humanen Immunabwehrproteins wurde bereits von Goetz *et al.* beschrieben (Goetz *et al.*, 2002). Die Untersuchung des zum Enterobactin verwandten Salmochelins und seiner Rolle in dieser Wirt-Bakterium / Pathogen-Interaktion wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

#### 4.2.5 Siderocalin beeinflusst das Wachstum von Salmochelinproduzenten nicht

Bei *Salmonella enterica* wurde lange angenommen, dass das hauptsächlich produzierte und sekretierte Siderophor wie bei den meisten Enterobacteriaceae, Enterobactin ist. Im Jahr 2003 wurde aber der Nachweis erbracht, dass ein weiteres wichtiges Siderophor dieser Spezies ein zweifach glycosyliertes Enterobactin ist, das Salmochelin genannt wurde und das vorwiegend von pathogenen oder potentiell pathogenen Bakterienarten hergestellt wird (Bister *et al.*, 2004; Hantke *et al.*, 2003). Diese Bakterien tragen das *iroA*-Cluster, das für die notwendige Glycosyltransferase (Fischbach *et al.*, 2005; Hantke *et al.*, 2003) und Salmochelinaufnahme- und weitere relevante Gene des Salmochelinmetabolismus codiert (Bister *et al.*, 2004; Hantke *et al.*, 2003). Es wurde vermutet und später, parallel zu den Arbeiten dieser Dissertation gezeigt, dass

die Glycosylierung von Enterobactin als Evasionsmechanismus angesehen werden kann, der die bakteriellen Siderophore davor schützt, von Siderocalin gebunden zu werden und damit für die Mikroorganismen verloren zu sein (Fischbach *et al.*, 2006). Studien, bei denen beide Substanzen im selben Organismus heterolog produziert wurden, zeigten eine Bindung beider Siderophortypen an Siderocalin (4.2.2), was zunächst gegen die Theorie der Evasion sprach. Die negativen Ergebnisse der Konkurrenzversuche hingegen, bei denen Salmochelin Enterobactin nicht verdrängen und ersetzen konnte, stützen die Evasionshypothese. Wachstumsstudien von Salmochelinproduzenten in Gegenwart ansteigender Mengen Siderocalins, sollten Aufschluss hinsichtlich der Bindefähigkeit von Salmochelin an Siderocalin geben. Die Wachstumsstudien wurden wie in 4.2.4 beschrieben in eisenarmem RPMI, einem Zellkulturmedium versetzt mit 10 % fötalem Kälberserum, durchgeführt und anschließend die Koloniezahl bestimmt. So wurden Bedingungen, die denen im Wirt verwandt sind, nachempfunden. Verwendete Bakterienstämme waren zum einen *Salmonella enterica* ssp. Typhimurium und derselbe *E. coli* K-12 Stamm MG1655, mit dem die Hemmung durch Zusatz von Siderocalin zuvor getestet wurde, allerdings transformiert mit dem Plasmid pKHI18, das das Gencluster *iroBCDEN* für die Produktion und Nutzung von Salmochelin trägt. Der Stamm produziert dann vorwiegend Salmochelin und in geringerem Umfang Enterobactin (Valdebenito *et al.*, 2006). Die Experimente zeigten, dass nur der reine Enterobactinproduzent im Wachstum gehemmt wurde, die Salmochelinproduzenten blieben unbeeinflusst von der Zugabe von Siderocalin, unabhängig von der zugesetzten Menge. Dieses Ergebnis war konträr zu den Beobachtungen, die während den heterologen Expressionsstudien gemacht wurden. Der Grund ist vermutlich wie oben bereits diskutiert, dass Salmochelin beim korrekt gefalteten Siderocalin nicht mehr in die *cup-like*-Struktur hineingelangt oder passt. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Glycosylierung von Enterobactin, als Evasionsmechanismus angesehen werden kann. Damit unterlaufen einige Pathogene wie *Salmonella enterica*, UTI *E. coli* oder weitere pathogene Enterobacteriaceae Maßnahmen der humanen angeborenen Immunantwort.

Eine leichte Stimulation des Wachstums des *E. coli* K-12 Stammes MG1655 (pKHI18) wurde mit steigender Siderocalinzugabe beobachtet. Als mögliche Ursachen wurden erwogen: (a) eine Mobilisierung eines Teils des von Siderocalin gebundenen Enterobactins durch die Bakterien oder (b) die Möglichkeit, dass IronN, der äußere Membranrezeptor für Salmochelin, Enterobactin aus dem Siderocalin bindet und entzieht. Eine ähnliche Beobachtung wurde von Wandersman und Delepelaire für den Hämophor HasA und den Rezeptor HasR gemacht (Wandersman & Delepelaire, 2004). HasA kann Häm aus Hämoglobin mobilisieren und an HasR abgeben, Häm wird dann über HasR in das Bakterium aufgenommen.

Um die leichte Stimulation des Wachstums zu überprüfen, wurde der gleiche Versuchsansatz mit demselben *E. coli* K-12 MG1655 Stamm wiederholt, allerdings wurde dieser zuvor mit dem Plasmid pKHI23 transformiert, das für *iroDEN* codiert. Somit ist er in der Lage Salmochelin zwar aufzunehmen und zu spalten, aber die Produktion von Salmochelin ist ausgeschlossen. Das Wachstum dieses Stammes zeigte unter Siderocalineinfluss eine Wachstumsinhibition in gleichem Maße wie der reine Enterobactinproduzent, der Ausgangsstamm, auch. Vermutlich resultierte die leichte Stimulation des Wachstums aus partiell denaturiertem Siderocalin während der 16-stündigen Inkubation der Ansätze, so dass geringe Mengen an Enterobactin frei wurden und den Bakterien als Eisenquelle dienten. Da die Ansätze mit MG1655, MG1655 (pKHI23) und *Salmonella enterica* ssp. Thyphimurium die leichte Stimulation auch, aber in geringerem Maße zeigten, unterstützen diese Beobachtungen den Erklärungsansatz.

Insgesamt betrachtet scheint die Versorgung mit Eisen in eisenarmen Habitaten wie beispielsweise humanem Urin eine besondere Rolle zu spielen (Tabelle 4). Pathogene Organismen, die auf eine rasche Vermehrung im Wirt angewiesen sind, benötigen zuverlässige Eisenquellen. Die meisten der UTI *E. coli* Stämme produzieren daher drei bis vier verschiedene Siderophore aus den drei Siderophorklassen stammend wie Enterobactin, Salmochelin, Aerobactin und Yersiniabactin (Valdebenito *et al.*, 2006). Diese zeigen nicht nur strukturelle Unterschiede, sie haben ihre Produktionsmaxima auch bei unterschiedlichen pH-Werten. Da Urin in Abhängigkeit der circadianen Rhythmik und der Zufuhr verschiedener Lebensmittel und Flüssigkeiten pH-Schwankungen von pH 5 bis 9 unterliegt (Siener *et al.*, 2004), wird so ein gewisses Spektrum durch die Produktion der unterschiedlichen Siderophore von der Bakterien des Urogenitaltraktes abgedeckt. Außerdem wurden bei dieser Art von Bakterien 17 Siderophor- bzw. Häm-Rezeptoren aus den Genomsequenzen vorhergesagt. So wird die potentielle Aufnahme weiterer Eisenchelatoren möglich, auch wenn die entsprechenden Siderophore nicht selbst produziert werden. Im Gegensatz dazu, weisen fäkale *E. coli* Stämme (wozu auch *E. coli* K-12 gerechnet wird) deutlich weniger, in der Regel nur sechs bis zehn solcher Siderophor- / Häm-Rezeptoren auf (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Übersicht über die Anzahl der produzierten Siderophore und der aus Genomsequenzen vorhergesagten von TonB abhängigen Siderophorrezeptoren in *E. coli* Stämmen.**

	<i>E. coli</i> K-12 (fäkal)	Uropathogene <i>E. coli</i>
Produzierte Siderophore	1	bis zu 4
TonB-abhängige Siderophorrezeptoren	6	bis zu 13
TonB-abhängige Häm-Rezeptoren	0	bis zu 4

### 4.2.6 Desferal<sup>®</sup> und Dextran entfernen kein Eisen oder Enterobactin aus dem Fe(III)-Siderophor-Siderocalin-Komplex

Siderocalin wurde immer mit einer partiellen Eisen-Enterobactinbeladung isoliert. Es wurde versucht, Siderocalin im Nachhinein mit Desferal<sup>®</sup> von Eisen-Enterobactin zu befreien. Desferal<sup>®</sup> bzw. Desferrioxamin B ist als starker Eisenkomplexbildner bekannt. Die Siderocalin-Fe(III)Enterobactin-Lösung wurde mit Desferrioxamin B inkubiert, um so bei einer möglichen Umkomplexierung das Eisen und das Enterobactin dem Siderocalin zu entziehen. Selbst ein Überschuss an Desferrioxamin B konnte die Menge an gebundenem Enterobactin nicht herabsetzen. Dies liegt wohl daran, dass auch unbeladenes Enterobactin noch von Siderocalin gebunden wird (Abergel *et al.*, 2008).

Hydroxyalkoxypropyl-Dextran Typ VI (Lipidex) kann eingesetzt werden, um Lipocaline von ihren hydrophoben Liganden zu befreien (Cancedda *et al.*, 1996). Das hydrophobe Enterobactin konnte damit allerdings nicht aus dem Siderocalin entfernt werden, es blieb in gleicher Quantität nachweisbar.

### 4.2.7 Adrenalin und Noradrenalin sind keine Bindungspartner von Siderocalin

Die beiden Hormone Adrenalin und Noradrenalin wirken im menschlichen Organismus als Stresshormone, die während der *fight-or-flight*-Reaktion ausgeschüttet werden und in verschiedenen Organen und Organsystemen diverse Prozesse aktivieren (Furness, 2000; Purves *et al.*, 2001). Es wurde nachgewiesen, dass einige Bakterien in der Lage sind, auf diese Hormone zu reagieren. Bei *E. coli* werden sie durch die Sensor kinase QseC erkannt und das Signal wird über den Response-Regulator QseB weitergeleitet (Clarke *et al.*, 2006). Die strukturelle Ähnlichkeit der beiden Hormone als Catecholamine zu den Catecholatsiderophoren gab Anlass dazu, eine mögliche Bindereaktion der Hormone mit Siderocalin zu untersuchen. Die Anzucht

der Stämme erfolgte in Zellkulturmedium mit fötalem Kälberserum oder einer physiologischen Transferrinmischung aus Holo- und Apo-Transferrin. Die verwendeten Bakterien hatten eine *aroB*-Mutation und waren so in der Aromaten- und damit der Catecholsynthese defekt oder es waren Bakterien, die eine asymptotische Bakteriurie verursachen (ABU). Diese wurden in unterschiedlichen Inokulationsmengen mit ansteigenden Konzentrationen von Epinephrin oder Norepinephrin und mit oder ohne Siderocalin angezogen. Zu sehen war eine Wachstumshemmung durch den Zusatz von Transferrin. Transferrin war nur partiell mit Eisenionen beladen und konnte dadurch freies Eisen im Medium binden. Der Eisenmangel führte zu einem verminderten Wachstum der Bakterienpopulation. Durch Zugabe der Wirtshormone kam es zu einer Stimulation des Wachstums, wahrscheinlich durch das Einbringen eines zusätzlichen Eisenlieferanten. Siderocalin erzeugte den gleichen Effekt: Das Wachstum wurde stimuliert, vermutlich durch die partielle Siderophorbeladung, die zum Teil frei wurde und so Eisen für die Bakterien verfügbar machte. Die vermutete mögliche Bindung der beiden Wirtsmoleküle, Siderocalin und Adrenalin / Noradrenalin ließ sich in dieser Form nicht nachweisen.

### 4.3 Das Zweikomponentensystem QseBC und das Protein YgiW

Signaltransduktions- bzw. Zweikomponentensysteme wie QseBC sind essentiell für das Überleben von Bakterien. QseBC findet man in verschiedenen pathogenen, aber auch kommensalen Gram-negativen Bakterien. Bevor seine Rolle beim *Quorum sensing* in Bakterien beschrieben wurde und eine Umbenennung der Proteine in QseBC erfolgte, lautete die Bezeichnung der beiden vorhergesagten Proteine YgiX (QseB) und YgiY (QseC). Clarke *et al.* konnten zeigen, dass diese eine Rolle im virulenzassoziierten *Quorum sensing*-System bei EHEC-Bakterien spielen und QseC-Mutanten eine geringere Virulenz aufweisen (Clarke *et al.*, 2006). Bereits 2002 erfolgte der Nachweis einer Beteiligung an einer Wirt-Pathogen-Kommunikation („*interkingdom signaling*“) mittels Erkennung von *autoinducer-3* und den adrenergen Wirtshormonen von QseC (Sperandio *et al.*, 2003). Da dieses Zweikomponentensystem ebenfalls in kommensalen Darmbakterien nachgewiesen wurde, galt es, dessen Funktion im regulären bakteriellen Metabolismus näher zu beleuchten. Die Wirkung der Catecholamine Adrenalin und Noradrenalin auf EHEC-Bakterien wurde gezeigt. Leider ist die Struktur des bakteriellen AI-3 Signalmoleküls immer noch unbekannt. Die Frage, ob die Catechol-Siderophore Enterobactin und Salmochelin auch auf QseBC einwirken, galt es zu untersuchen. In diesem Zusammenhang sollte auch das periplasmatische Protein YgiW untersucht werden: Seine Gensequenz liegt in unmittelbarer Nähe stromaufwärts auf dem Gegenstrang von *qseBC* und YgiW ist in vielen

Enterobacteriaceen gekoppelt an QseBC zu finden. Interessanterweise codieren auch viele Shiga-Toxin-Phagen ein zu YgiW homologes Protein mit unbekannter Funktion.

Die Auswirkung von Mutationen der Gene *qseB* und *qseC* und weiteren Mutationen auf Eisen-transportgene wurde bestimmt. Dabei wurden die Promotoren von eisenregulierten Genen an das promotorlose *lacZ*-Gen fusioniert und die Konstrukte als Reporter genutzt. Die Stämme wurden in verschiedenen Medien angezogen und die Auswirkung auf die Reportergene verglichen. Nutrient Broth versetzt mit Desferrioxamin B wurde letztlich zum Standard, da das nährstoffreiche, aber eisenarme Komplexmedium die besten Voraussetzungen schuf: *E. coli* kann Ferrioxamin B kaum als Eisenquelle nutzen und deshalb werden seine Eisenaufnahmesysteme induziert (Matzanke *et al.*, 2004). Ein weiterer Vorteil gegenüber Minimalmedien war das gute Wachstum der Bakterien. Weiterhin wurden Enterobactinproduktions- und Wachstumsdaten der verschiedenen Stämme erhoben.

Mit YgiW wurden weitere Tests durchgeführt, wie Untersuchungen zur Ligandenbindung in der ITC, HPLC-Analysen und die Arnow-Reaktion zur Mengenbestimmung der Catecholate.

Des Weiteren wurden Untersuchungen zur Motilität und Biofilmbildung durchgeführt.

EntC katalysiert den ersten Schritt der Enterobactinbiosynthese, die Konversion von Chorismat zu Isochorismat (Liu *et al.*, 1990); EntF ist verantwortlich für die letzten Schritte der Enterobactinbiosynthese (Crosa & Walsh, 2002; Gehring *et al.*, 1998). Eine Deletion von *entC* zeigte keinen signifikanten Unterschied zum Elternstamm, weder in den  $\beta$ -Galaktosidase-Messungen, noch bei den Wachstumsverläufen bei nicht zu großem Eisenmangel. *E. coli* besitzt eine zweite Isochorismatsynthase, MenF, die entscheidend für die Produktion von Menaquinon ist. Im Gegensatz zu EntC wird sie nicht vornehmlich unter Eisenmangelbedingungen produziert, sondern i. d. R. in Anaerobie. Eine volle Komplementation von EntC ist nicht zu erwarten, aber eine gewisse Redundanz wurde nachgewiesen (Buss *et al.*, 2001). Bei Fehlen von EntF hingegen, waren hoch signifikante Unterschiede der Induktionswerte und schwach signifikante Abweichungen der Wachstumsdaten zu erkennen.

### 4.3.1 Das Zweikomponentensystem nimmt Einfluss auf das Enterobactin-system

Frühere Arbeiten haben den Einfluss von QseBC auf die Virulenzregulation in verschiedenen Gram-negativen Pathogenen gezeigt. EHEC QseC-Deletionsmutanten zeigten sich attenuiert durch Missregulationen in ihrem Metabolismus (Hadjifrangiskou *et al.*, 2011).

Diese Arbeit hier zeigt, dass QseBC einen deutlichen Einfluss auf den Eisenmetabolismus von *E. coli* hat und zwar nicht nur in virulenten Stämmen, sondern ebenso im kommensalen *E. coli* K-12. Die Schlussfolgerung basiert auf folgenden Beobachtungen:

Zunächst ergaben die Versuche mit *lacZ*-Operonfusionen bei einer *qseC*-Mutante sowohl für Fes, als auch für FepA eine hoch signifikante Abweichung des Induktionswerts im Vergleich zum Kontrollstamm, wie auch bei einer *entC-qseC*-Doppelmutante für FepA. Ohne QseC wird also die Expression siderophor- bzw. enterobactinspezifischer Biosynthesegene erhöht.

QseC inhibiert demnach die Expression von Fes und FepA und damit auch die Enterobactinaufnahme insgesamt, so dass weniger Eisen des umgebenden Mediums aufgenommen wird.

Die Untersuchungen für zwei *qseB*-Mutanten für FepA ergaben ein ähnliches, aber nicht ganz so eindeutiges Bild. Die Mutante mit dem Stammhintergrund MG1655 fügt sich in das Bild ein, mit ebenfalls hoch signifikanten Testwerten, bei der Mutante basierend auf BW25113 ergibt sich lediglich eine statistisch nicht relevante Abweichung der Werte nach oben.

Untersuchungen in TY-Vollmedium mit Desferrioxamin B zeigten sowohl für FepA, als auch für Fes ähnliche Resultate, QseC scheint die Enterobactinmenge hoch signifikant zu vermindern, wobei auch hier das Zellwachstum aller untersuchten Stämme ähnlich verlief.

Zur näheren Untersuchung der Einflussnahme von QseBC auf die Enterobactinproduktion wurden mittels HPLC quantitative Siderophorbestimmungen an einem K-12 Stamm, einer  $\Delta qseB$ - und einer  $\Delta qseC$ -Mutante durchgeführt. Untersucht wurden der Zeitpunkt des Produktionsbeginns und die Enterobactinmenge sowohl in eisenarmem Minimalmedium, als auch in eisenreichem Komplexmedium. Die Ergebnisse zeigten eine frühere und intensivere Siderophorproduktion bei den untersuchten Mutanten. QseBC scheint demnach die Enterobactinproduktion der Zelle zu drosseln. Im Vergleich reagiert die *qseB*-Mutante deutlich stärker als die *qseC*-Mutante. Die Untersuchungen zeigten eine intensivere Reaktion für QseB an. Der Grund hierfür könnte sein, dass QseB als unphosphorylierter Regulator die führende Rolle in der Inhibition des Wachstums einnimmt, da gezeigt wurde, dass QseB seine eigene Expression in *qseC*-Mutanten stimuliert (Kostakioti *et al.*, 2009). Nicht auszuschließen ist, dass der Unterschied darauf beruht, dass die beiden Deletionsmutanten unterschiedliche Stammhintergründe aufweisen (MG1655 K-12 [5538], MG1655  $\Delta qseB$  [5796], BW25113  $\Delta qseC$ -Mutante [5722]; siehe 4.4).

Interessant ist auch die Beobachtung, dass beide Mutanten im Vergleich zum Wildtyp ein deutlich besseres Wachstum unter eisenarmen Bedingungen zeigen. QseBC scheint die Reaktion auf die Eisenmangelbedingungen zu dämpfen und führt damit auch zu einem langsameren Wachstum. Die Wachstumsstimulation der beiden Mutanten basiert vermutlich auf einer ver-

mehrten und beschleunigten Siderophorproduktion und der damit einhergehenden verbesserten Eisenversorgung der Zelle.

Dieser Effekt ist in eisenreichem Komplexmedium aufgehoben: Die Mutanten bleiben leicht hinter dem Wildtypwachstum zurück, allerdings zeigt sich auch hier überraschenderweise eine vermehrte und frühere Enterobactinbildung der beiden Mutanten, aber die Mutationen wirken sich unter diesen Bedingungen leicht negativ auf das Zellwachstum aus, wenngleich die Siderophormenge, die des Wildtypstammes übertrifft. Da das komplexe Medium weitere Unterschiede zum Minimalmedium aufweist, als allein die der Eisenversorgung, lassen sich die Ergebnisse nicht nur im Eisenkontext interpretieren.

### 4.3.2 Die Einflussnahme des Zweikomponentensystems auf das Salmochelinsystem

Der stimulierende Effekt den QseC auf die Expression von IroN zeigt, ist konträr zu den Beobachtungen der Inhibition der Expression von Fes und FepA.

QseC erhöht die IroN-Produktion hoch signifikant. Eine Mehraufnahme von Eisen wird so ermöglicht.

Diese Beobachtung geht einher mit der Tatsache, dass die Signalmoleküle, die QseBC aktivieren, die Expression verschiedener Virulenzgene wie die der Shiga-Toxine oder Intimin / Eae in EHEC induzieren (Dowd, 2007). Weiterhin wurde sowohl für *E. coli* (Clarke *et al.*, 2006) als auch für *Salmonella* (Bearson & Bearson, 2008) gezeigt, dass *qseC*-Deletionsmutanten weniger virulent sind als ihre Elternstämme. Salmochelin wird ebenfalls zu den virulenzassoziierten Systemen gezählt.

### 4.3.3 YgiW bindet Enterobactin und seine Derivate

YgiW ist ein kleines periplasmatisches Protein (Baars *et al.*, 2006), dessen Transkription vom divergenten Promotor von *qseBC* gesteuert wird (Merighi *et al.*, 2009). Es gehört zur Familie der BOF Proteine (*bacterial oligonucleotide / oligosaccharide binding fold*), die voraussichtlich Proteine oder andere Liganden wie kleine Moleküle binden (Ginalski *et al.*, 2004).

Unsere HPLC-Analysen haben gezeigt, dass YgiW Enterobactin und seine Derivate bindet. Mittels Arnow-Reaktion konnte ermittelt werden, dass der Prozentsatz der Beladung je nach Charge variiert und zwar zwischen 10 % und 90 %.



Nähere Untersuchungen zu YgiW-Liganden an der ITC erwiesen sich in verschiedener Hinsicht als problematisch. In diesem Bereich bedarf es weiterer Untersuchungen sowie Optimierung der Bedingungen um erfolgreiche Messungen durchzuführen. Weitere Messungen mit potentiellen Liganden wie DHB, DHBS, Enterobactin und Noradrenalin sind notwendig um die Funktion dieses Proteins in Kommensalen und seine Verbindung zum Eisenmetabolismus näher zu beleuchten.

#### 4.3.4 Das periplasmatische Protein YgiW spielt eine Rolle im QseBC- und Eisenmetabolismus

Vor Kurzem wurde von der Arbeitsgruppe um Merighi der Nachweis erbracht, dass das Ortholog von QseB in *Salmonella* die Expression von YgiW und MdaB reguliert (Merighi *et al.*, 2009). Die Transkription des *ygiW*-Gens wird vom Promotor von *qseBC* gesteuert.

Um die Frage nach der Rolle von YgiW im Eisenhaushalt zu klären und die Verbindung zu QseBC näher zu beleuchten, wurden ebenfalls Operonfusionsstudien durchgeführt. Unterschiede zwischen *ygiW*-Mutanten und Referenzstämmen waren nur bei IroN im virulenzassoziierten System zu finden. Diese sind allerdings hoch signifikant und zeigen eine deutliche Stimulation des Salmochelinsystems durch YgiW (*entC ygiW*-Doppelmutante). Auch eine *entF ygiW*-Doppelmutante zeigte diesen Effekt (YgiW stimuliert), wobei in diesem Fall auch die *entF*-Deletion allein deutliche Effekte zeigte (EntF inhibiert; siehe 4.3).

YgiW scheint eine wichtige Rolle bei der Stimulation der Expression von IroN und eventuell weiteren Proteinen des Salmochelinsystems einzunehmen.

Vor Kurzem wurde YgiW in die Reihe der Stressproteine bei Bakterien aufgenommen: Die *ygiW*-Mutanten reagierten sensitiver auf Versuchsbedingungen von oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid und Cadmium als ihr Elter (Lee *et al.*, 2009). Diese Sensitivität lässt sich auch für eine *qseB*- und *qseC*-Mutante nachweisen. Menadion, als ein weiterer oxidativer Stressor, zeigte nur bei der *qseC*-Mutante Auswirkungen (Hantke, unveröffentlicht). Die konkrete Funktion unter Stress ist allerdings noch nicht aufgeklärt. Die *ygiW*-Mutanten waren empfindlicher gegen Wasserstoffperoxid und Cadmium als der Elternstamm und wiesen eine vermehrte Biofilmbildung auf (Lee *et al.*, 2009).

YgiW wird zudem eine Rolle in der Polymyxin B Resistenz zugeschrieben (Pilonieta *et al.*, 2009). In Stx-Phagen findet man überraschenderweise auch YgiW-Homologe. Diese Tatsachen lassen sich allerdings noch nicht zu einem Gesamtbild vereinen.

### 4.3.5 QseBC und YgiW wirken sich auf Biofilmbildung und Motilität von *Escherichia coli* aus

Biofilmbildung und Motilität sind Eigenschaften von Mikroorganismen, die sich unmittelbar auf deren Virulenz auswirken. Unsere Versuche zur Ausbildung eines Biofilms ergaben schwach signifikante Unterschiede bei einem K-12 Stamm, der mit und ohne den Zusatz von Noradrenalin angezogen wurde. Der Einsatz von Noradrenalin reduziert den Biofilm in einem der untersuchten Stämme. Interessanterweise gelten Catecholamine eigentlich als Moleküle, die das Wachstum, die Biofilmbildung und den horizontalen Gentransfer und somit die Virulenz fördern (Peterson *et al.*, 2011). Bei *Salmonella enterica* ssp. Typhimurium wurde für Nor-epinephrin ein vermehrtes Wachstum und eine erhöhte Motilität festgestellt (Bearson *et al.*, 2010). Beim Vergleich von Stämmen mit und ohne YgiW zeigte sich eine schwach signifikante Reduktion bei zwei der drei untersuchten *ygiW*-Deletionsmutanten. Das geht einher mit den Forschungsergebnissen, die YgiW als Stressmarkerprotein sehen, das ebenfalls in der Biofilmbildung involviert ist (Lee *et al.*, 2009). Allerdings wurde von der Arbeitsgruppe um Lee bei den YgiW-Mutanten eine Induktion der Biofilmbildung unter Stress beobachtet und keine Inhibition.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Daten der Untersuchungen zur Motilität der *E. coli* Stämme, ergeben sich Parallelen, die Hancock *et al.* vor Kurzem für Nissle 1917 und einen UPEC Stamm veröffentlicht haben: Biofilmbildung-Knock-out Mutanten zeigten eine verminderte Motilität (Hancock *et al.*, 2010).

Die Daten der Motilitätsuntersuchungen zeigen für eine *ygiW*-Mutante eine deutliche Verminderung der Schwärmzone unter verschiedenen Bedingungen. Diese Ergebnisse ließen sich nicht durchweg bei allen Versuchsstämmen beobachten.

Der Einsatz von Noradrenalin zeigte bei einem UTI Stamm eine schwach signifikante Vergrößerung der Schwärmzone. Bei den anderen Stämmen war dies in Tendenzen auch zu beobachten.

Anhand flagellenspezifischer Gene konnte ein Zusammenhang von Motilität, Biofilmbildung und *Quorum sensing* mit QseBC gezeigt werden (Sperandio *et al.*, 2002).

Auch für *Pseudomonas aeruginosa* wurde dieser Zusammenhang festgestellt: Eine Störung des *Quorum sensing*-Systems reduziert die Virulenz in Pflanzen, Tieren und inhibiert die Biofilmbildung (Costerton *et al.*, 1999; Rahme *et al.*, 1995; Tan *et al.*, 1999).

### 4.3.6 Arbeitsmodell der Fes-, FepA- und Iron-Regulation durch QseB, QseC und YgiW

Basierend auf den Ergebnissen der Operonfusionsstudien und den anderen Tests hat QseBC eine regulatorische Funktion sowohl bei der Biosynthese, als auch beim Transport von Enterobactin und seinen Derivaten.

Autoregulatorische Faktoren wurden bereits bei verschiedenen Siderophoraufnahmesystemen wie dem für Yersiniabactin (Pelludat *et al.*, 1998) oder Pyoverdine beobachtet.

Das Modell (Abbildung 4-1) zeigt die Siderophor-QseBC-YgiW-Interaktion unter Eisenmangelbedingungen in kommensalen *E. coli* Stämmen unter Berücksichtigung unserer Daten.

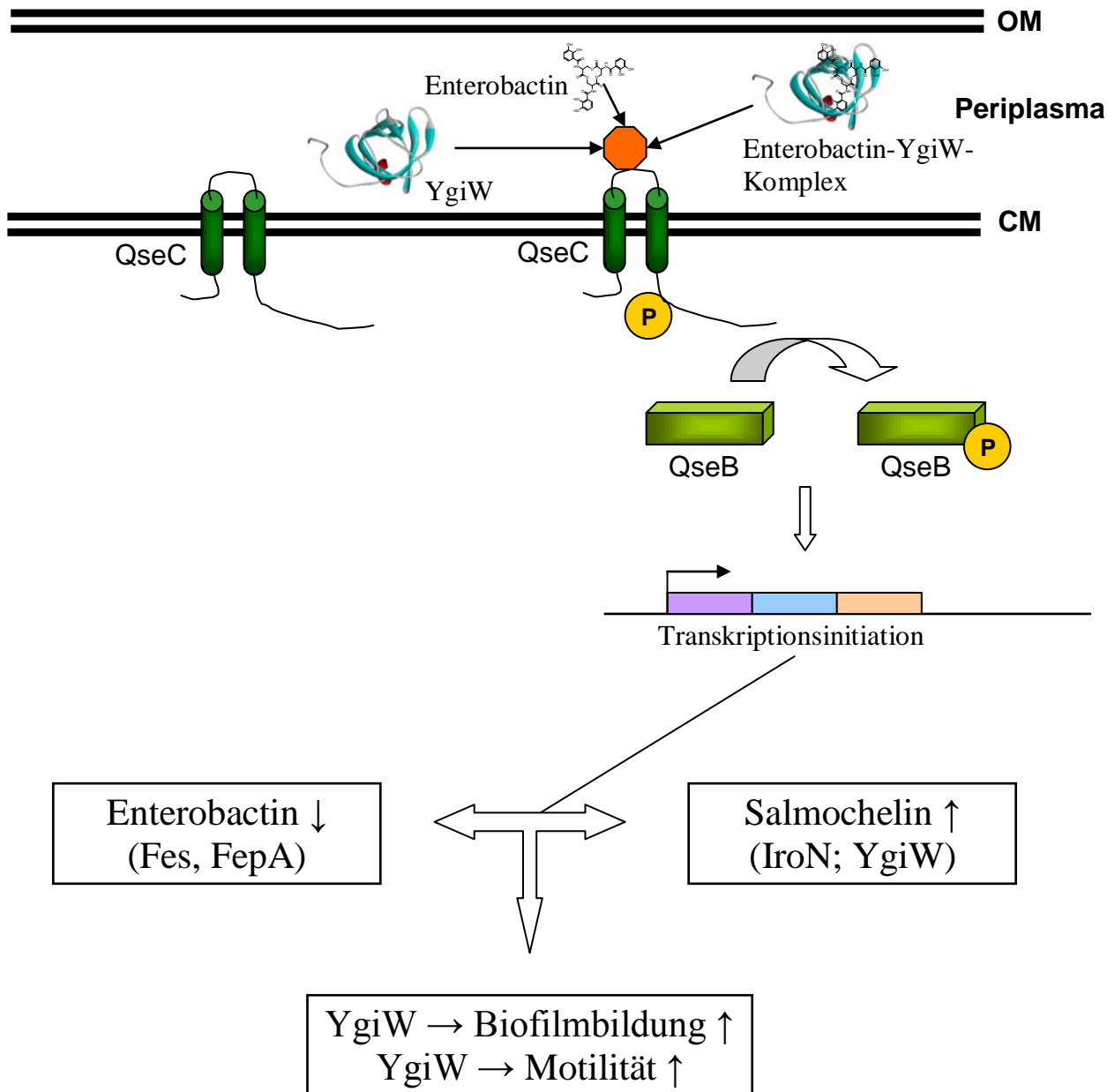


Abbildung 4-1: Schematische Darstellung der Regulation durch QseBC und YgiW unter Eisenmangelbedingungen (Enterobactin: Hider & Kong, 2010; YgiW: Bearbeitet mit PyMOL von Prof. Dr. Hantke (Lehmann C. *et al.*, 2004)).

QseC wird nach der Bindung seines Signalmoleküls autophosphoryliert und phosphoryliert anschließend das Regulationsprotein QseB. Der nachfolgende Schritt ist die Transkriptionsaktivierung der Zielgene:

Wir vermuten, dass QseC mit seiner Sensordomäne Enterobactin, YgiW und / oder den Enterobactin-YgiW-Komplex erkennt. Das sollte zur Regulation der Signaltransduktionskaskade führen.

YgiW bindet Enterobactin und seine Derivate. Im virulenzassoziierten Salmochelinsystem wirkt YgiW stimulierend. YgiW erhöht die Biofilmbildung und in geringem Maße die Motilität, wenn Adrenalin bzw. Noradrenalin als Attraktantien eingesetzt werden.

QseB wird phosphoryliert und greift in die weitere Regulation ein: Das Enterobactinsystem wird von QseBC herunterreguliert, Salmochelin und die Komponenten seines Metabolismus werden von QseBC gegenteilig reguliert, sprich aktiviert. Die Steigerung anderer Virulenzfaktoren durch QseB wurde in *Aeromonas hydrophila* vor Kurzem gezeigt (Khajanchi *et al.*, 2012). Im Wirt könnte die Induktion des IronN-Aufnahmesystems unter dem dort herrschenden Eisenmangel die Nutzung von Eisenkomplexen der Catechole Adrenalin und Noradrenalin erlauben. Über das negative Rückkopplungssystem von Enterobactin pendelt sich das System entsprechend ein: Deletionsmutanten, denen QseBC fehlt, weisen eine früher einsetzende und erhöhte Enterobactinproduktion auf. Vermutlich darauf gegründet, erfolgt ein schneller einsetzendes verbessertes Wachstum.

#### 4.4 Vergleich von *Escherichia coli* K-12 Derivaten

Bei  $\beta$ -Galaktosidase Messungen von LacZ-Reportergenen ergaben sich Unstimmigkeiten zwischen zwei *E. coli* K-12 Derivaten: MG1655 und MC4100 zeigten in ihren Grundwerten hoch signifikante Abweichungen voneinander. Aufgrund dessen wurden die genetischen Hintergründe beider Stämme verglichen, um mögliche Ursachen für die unterschiedlichen Werte zu finden.

##### 4.4.1 Unterschiede zwischen den *Escherichia coli* K-12 Stämmen MC4100 und MG1655

*E. coli* K-12 MC4100 ist ein häufig verwendeter Laborstamm, der für die Genetik der Bakterien historisch bedeutsam ist (Peters *et al.*, 2003). Er ist ein Abkömmling von MG1655, der wiederum aus dem ursprünglich 1922 aus dem Stuhl eines konvaleszenten Diphtherie Patienten isolierten *E. coli* K-12 Stamm hervorging (Casadaban, 1976; Bachmann, 1996; Lederberg, 1951). Es existieren zahlreiche genetische Unterschiede zwischen MC4100 und anderen *E. coli* K-12 Stämmen, die mittels DNA-Array näher untersucht wurden (Peters *et al.*, 2003). Im Jahr 2009 konnten durch Sequenzierung ca. 200 Sequenzunterschiede zu dem als ursprünglich geltenden Stamm MG1655 festgestellt werden (Ferenci *et al.*, 2009). Eine der Abweichungen ist die Mutation von *relA1* bei MC4100. RelA ist ein zentrales Protein der *stringent response*, der

Stressreaktion unter globaler Kontrolle in Prokaryoten und mit Homologen in einigen Pflanzen (Braeken *et al.*, 2006; Givens *et al.*, 2004; van der Biezen *et al.*, 2000), aber nicht in Tieren zu finden (Mittenhuber, 2001). Die Rel A-Produktion wird dabei von zwei Promotoren gesteuert, die zusammen eine komplexe Regulation der RelA-Expression in *E. coli* bedingen (Nakagawa *et al.*, 2006). Die stringente Kontrolle wird ausgelöst durch Nährstoffmangel. Bis zu einem Drittel aller Gene der Zelle werden als Folge durch die Alarmone (p)ppGpp moduliert und die Ressourcen so von „Wachstum und Teilung“ hin zu „(Aminosäure-)Synthese und Aufnahme“ verschoben. Die Alarmonproduktion wird bei Aminosäuremangel von RelA und bei Mangel von Kohlenstoff, Stickstoff, Phosphat oder Fettsäuren von SpoT induziert (Cashel, 1996). SpoT funktioniert dabei nicht nur als Synthetase, sondern auch als Hydrolase von (p)ppGpp (Laffler & Gallant, 1974; Stamminger & Lazzarini, 1974).

Die stringente Kontrolle, ausgelöst durch Stress- und Hungerreaktionen und *Quorum sensing* mit der Biofilmbildung sind miteinander über die (p)ppGpp-vermittelte Regulation verknüpft. Erste Hinweise darauf lieferte die alarmonbedingte Inhibition von der A-Signal-Produktion einer RelA-Mutante von *Myxococcus xanthus* (Harris *et al.*, 1998). Weiterhin zeigte sich eine Verbindung von (p)ppGpp und *Quorum sensing* im stickstofffixierenden Bakterium *Rhizobium etli*, in *Agrobacterium tumefaciens* sowie in *Pseudomonas aeruginosa*. In *Rhizobium etli* wurde RelA auf seine Funktions-, Regulations- und Zielgene hin analysiert. Die Arbeitsgruppe um Moris hat mehrere Gene ausgemacht, die unter RelA-Regulation stehen, u. a. Gene der Stickstofffixierung und des *Quorum sensing* (Moris *et al.*, 2005). Zhang *et al.* fanden in *Agrobacterium tumefaciens*, dass das AI Degradationssystem sowohl an die (p)ppGpp Stressantwort gekoppelt, als auch von ihr reguliert ist (Zhang *et al.*, 2004). In *Pseudomonas aeruginosa* wurden die Auswirkungen der *stringent response* auf *Quorum sensing*-Systeme von van Delden *et al.* untersucht. Gefunden wurde, dass die *stringent response* die beiden *Quorum sensing*-Systeme von *Pseudomonas aeruginosa* unabhängig von der Zelldichte aktivieren kann (van Delden *et al.*, 2001).

Während der  $\beta$ -Galaktosidase Messungen der Induktion von IroN ergaben sich hoch signifikant unterschiedliche Referenzniveaus bei MG1655 und MC4100 bei nahezu gleichen Wachstumskurven. Das bedeutete für diese Arbeit, dass die Messwerte eines Stammes möglichst mit denen des jeweiligen Elter zu vergleichen waren. Im Jahr 2005 wurde ein Zusammenhang von Alarmonen, SpoT, Enterobactin und weiteren Eisenaufnahmesystemen beschrieben (Vinella *et al.*, 2005): Es existiert eine homeostatisch negative Rückkopplung, die den Eisenerwerb lenkt. Eisenmangel führt zu einem Anstieg an SpoT und ppGpp; Dieses ppGpp stimuliert die

Synthese von Eisenaufnahmesystemen wie das von Enterobactin, was zu mehr verfügbarem Eisen in der Zelle führen kann. Es erhöht zudem die Stressresistenz der Zelle (Spira *et al.*, 2008).

MC4100 ist im Gegensatz zu MG1655 im Gen *relA1* mutiert (The Coli Genetic Stock Center; <http://cgsc2.biology.yale.edu/Strain.php?ID=9973>) und RelA ist eine ppGpp-Synthetase, die den ppGpp Spiegel beeinflusst.

Vor Kurzem wurde durch Sequenzierung nachgewiesen, dass MC4100 zusätzlich eine *spoT1*-Mutation trägt (Ferenci *et al.*, 2009), die die ppGpp-Synthetase / -Hydrolase betrifft und ein höheres Basallevel an ppGpp induziert (Spira *et al.*, 2008).

So ließen sich die erhöhten Induktionswerte erklären, die bei MC4100 gefunden wurden: Der vergrößerte ppGpp-Pool bedingt eine erhöhte Expression von eisenaufnahmerelevanten Genen und damit eine Steigerung der Siderophormenge und siderophorassoziierter Proteine (hier: IroN).

#### 4.4.2 Die Proteine RelA und SpoT sind nicht die verantwortlichen Faktoren

Um als mögliche Ursache der Induktionsunterschiede während der  $\beta$ -Galaktosidase-Messungen zwischen den K-12 Stämmen die Proteine RelA und SpoT zu überprüfen, wurde die Feinregulation des Salmochelinrezeptors IroN von Fur unabhängigen Mechanismen an einem Wildtyp MG1655, einer  $\Delta relA$  Mutante und einer  $\Delta relA \Delta spoT$ -Doppelmutante untersucht. Die Ergebnisse der  $\beta$ -Galaktosidase Messungen schlossen RelA und SpoT als verantwortliche Faktoren aus: Der Wildtyp MG1655 zeigte das gleiche Induktionslevel wie die entsprechende Mutante ( $\Delta relA$  MG1655), das aber deutlich über dem, der  $\Delta relA \Delta spoT$ -Doppelmutante lag. RelA allein bedingt demnach im MG1655-Hintergrund keine Veränderung der IroN-Induktion und eine RelA und SpoT Doppelmutation reduziert das Level, entgegen unserer Erwartungen, deutlich, wirkt sich also gegenteilig aus.

Es wurden weitere K-12 Stämme untersucht und es ergab sich eine Aufteilung in zwei Gruppen mit unterschiedlichem Level: einmal ein hohes Induktionsniveau von MC4100 und ein niedriges Level von MG1655, WL311 und W3110.

Es existiert ein eisenabhängiger Unterschied auf Genebene unter den gebräuchlichen K-12 Derivaten, der verantwortliche Faktor ist aber nicht RelA oder SpoT.

### 4.5 Ausblick

Weiterführende Untersuchungen stehen noch aus und könnten offene Fragen klären: Die Analyse der Enterobactinproduktion verschiedener K-12 Stämme und der entsprechenden *qseBC*-Mutanten in eisenarmem und -reichem Medium sowie ein Kontrollversuch unter direkter Eisenzugabe zum eisenarmen Medium M63 könnte das Bild des Einflusses von QseBC auf den Eisenhaushalt in Details ergänzen.

Weitere Experimente zur Funktion von YgiW stehen ebenfalls noch aus: So fehlt eine erfolgreiche Analyse mittels ITC mit verschiedenen potentiellen Liganden, die bislang an der benötigten Proteinmenge scheiterte. Um das Ausfallen von Protein während der Dialyse zu unterbinden, müssten beispielsweise verschiedene Puffersysteme getestet werden; Für die Durchführung einer erfolgreichen Kristallisation in Gegenwart potentieller Liganden, muss ebenfalls genügend Protein nach erfolgter Abspaltung des GST-Restes zur Verfügung stehen; Ein weiterer interessanter Punkt wäre die Untersuchung der Auswirkungen einer YgiW-Überexpression bei unterschiedlicher Eisenversorgung und Auswirkungen auf die Induktion von Shiga-Toxin-Phagen, die ein zu YgiW homologes Protein codieren. Wichtig wäre insbesondere Interaktionspartner (Proteine) von YgiW im Periplasma zu identifizieren.



## 5 Zusammenfassung

### 5.1 Kurzfassung

Viele Mikroorganismen produzieren im Eisenmangel Siderophore (Eisenchelatoren), die das schlechtlösliche dreiwertige Eisen binden. Die Eisen-Siderophorkomplexe werden über spezifische Transportsysteme aufgenommen und versorgen die Zellen mit dem lebensnotwendigen Eisen. Enterobactin ist ein für Enterobakterien typisches Siderophor. *Salmonella* und uropathogene *Escherichia coli* Stämme produzieren außerdem ein C-glycosyliertes Enterobactin, das Salmochelin.

Enterobactin kann im humanen Serum durch das Protein Siderocalin gebunden werden, wodurch das Wachstum, beispielsweise von *E. coli* Stämmen, unterdrückt werden kann. Durch Wachstumsversuche konnte gezeigt werden, dass das von den pathogenen Stämmen produzierte Salmochelin diese Wachstumshemmung aufhebt. Rekombinant aus *E. coli* K-12 isoliertes Siderocalin enthält fest gebundenes Enterobactin. Wider Erwarten enthielt das aus einem Salmochelinproduzenten gewonnene rekombinante Siderocalin gebundenes Salmochelin. Weitere Tests bestätigten die aus den Wachstumsversuchen gewonnene Erkenntnis, dass Siderocalin Salmochelin nicht bindet. Pathogene Enterobakterien können damit die Wirtsabwehr unterlaufen. Somit scheint Salmochelin nur während der Siderocalinsynthese in der Bakterienzelle in die Bindetasche des Siderocalins gelangen zu können.

Über das Zweikomponentensystem QseBC wird in *E. coli* durch das Wirtshormon Norepinephrin Motilität und Virulenz gesteuert. Wir konnten eine Beteiligung von QseBC an der Steuerung der Eisenaufnahmesysteme in *E. coli* während Eisenmangelsituationen zeigen.

Mit Promotorfusionen an das *lac*-Gen konnte gezeigt werden, dass QseC inhibierend auf das Enterobactinsystem wirkt. Auf das virulenzassoziierte Salmochelinsystem, das hilft, die Wirtsabwehr zu umgehen, wirkt QseC hingegen aktivierend. Die Stimulation konnte für IroN, den Salmochelinrezeptor, gezeigt werden.

Die Enterobactinproduktion setzte in einer *qseBC*-Deletionsmutante früher ein, als im Elternstamm, was die Daten der Regulationsstudien bestätigt.

Das von QseBC regulierte periplasmatische Protein YgiW bindet Enterobactin, was mittels HPLC-Messungen gezeigt werden konnte. YgiW scheint außerdem die Ablesung des *iroN*-Promotors zu hemmen, während die Ablesung von den enterobactinassoziierten Promotoren von *fes* und *fepA* nicht beeinflusst wurde.

Die Ergebnisse zeigen, dass das Zweikomponentensystem QseBC nicht nur Virulenzgene reguliert wie es für EHEC *E. coli* beschrieben wurde, sondern, dass es ebenso Funktionen des normalen Metabolismus apathogener *E. coli* Stämme beeinflusst.

### 5.2 Summary

Many microorganisms produce siderophores (chelators) under iron-poor conditions, which bind badly soluble  $\text{Fe}^{3+}$ . Iron-siderophore-complexes scavenge ferric iron molecules and transport them into the cells by using specific transport systems to provide bacteria with vital iron. Enterobactin is a typical siderophore for Enterobacteriaceae. *Salmonella* and uropathogenic *Escherichia coli* strains produce additionally a C-glycosylated enterobactin, called salmochelin. In human serum, enterobactin can be bound by the protein siderocalin, whereby for instance growth of *E. coli* strains can be suppressed. Performing growth assays one could show, that salmochelin produced by pathogenic strains neutralizes this effect. Recombinant siderocalin from *E. coli* K-12 contains firmly bound enterobactin. Contrary to expectations, recombinant siderocalin isolated from a salmochelin-producer contained bound salmochelin. Further tests confirmed the cognition from our growth assays, that siderocalin does not bind salmochelin. Pathogenic Enterobacteriaceae can by this means evade human immune defence. Therefore it seems, that salmochelin can only attain to the binding cup during synthesis and folding of siderocalin in the bacterial cell.

In *E. coli*, motility and virulence are regulated by the host hormone norepinephrine via the QseBC two-component system. We could show a participation of QseBC in the regulation of iron-dependent systems in *E. coli* during iron deprivation.

Using promoter-*lacZ*-fusions it was shown, that QseC inhibits the enterobactin-system. However, expression of the virulence-associated salmochelin-system was stimulated via QseC.

Confirming the data of our regulation studies, the enterobactin-production began earlier in a *qseBC*-deletion-mutant, than in the parent strain.

The periplasmic protein YgiW, which is also regulated by QseBC, binds enterobactin, which was shown by HPLC analysis. YgiW appears to inhibit the transcription of *iroN*, whereas the transcription of enterobactin-associated genes *fes* and *fepA* was not influenced.

The results show, that QseBC not only regulates virulence genes as it was described for EHEC *E. coli*, but also affects functions of the metabolism of apathogenic *E. coli* strains.

## 6 Anhang

### 6.1 Verzeichnisse

#### 6.1.1 Abkürzungen

Abkürzung	Lesung und Bedeutung
<b>A</b>	Ampere
aa	engl.: <i>amino acid(s)</i> , Aminosäuren
ABC	engl.: <i>ATP binding cassette</i> , ATP-bindende Kassette
ABU	<i>E. coli</i> ABU 83972, apathogener, asymptomatischer Bakteriuriestamm
ad	lat.: bis auf
ADP	Adenosindiphosphat, Nukleotid
AI-3	engl.: <i>autoinducer-3</i> , Autoinduktor-3, Signalmolekül des <i>Quorum sensing</i>
Amp	Ampicillin
anaer.	anaerob/er
APS	Ammoniumperoxodisulfat, „Starter“ bei der Polymerisierung von Acrylamid
AroB	3-Dehydroquinat Synthase, Teil der Chorismatbiosynthese
AroK	Shikimat Kinase
ATP	Adenosintriphosphat, Nukleotid
<b>BCA</b>	engl.: <i>bicinchoninic acid</i> , 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure, zur quantitativen, photometrischen Bestimmung von Proteinlösungen
BL21	<i>E. coli</i> Stamm
BOF	engl.: <i>bacterial oligonucleotide / oligosaccharide binding fold</i> , Proteine, die Moleküle mit bestimmter Struktur binden können
bp	engl.: <i>base pair(s)</i> , Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
BtuB	Vitamin B12
bzw.	beziehungsweise
<b>C</b>	Celcius
c	Centi 10 <sup>-2</sup>
C	Kohlenstoff
ca.	circa
cat	Chloramphenicol
CFU	engl.: <i>colony-forming units</i> , Kolonie bildende Einheiten
CM	Cytoplasmamembran
cm	Zentimeter
<b>D</b>	Dimeres von Enterobactin
D	Durchlauffraktion
D.	Deutschland
d. h.	das heißt
Da	Dalton, Masse-Äquivalent eines Wasserstoffatoms
DAEC	Diffus adhärierende <i>E. coli</i>
Dam	DNA Adenin Methylase
DamX	vorhergesagtes membranverankertes Protein, stört die Zellteilung
DEAE	DE52, Diethylaminoethyl, basischer Anionenaustauscher, Cellulose für die Chromatografie
Desf.	Desferal®, Desferrioxamin B, Chelatbildner
DHB	2,3-Dihydroxybenzoesäure
DHBS	2,3-Dihydroxybenzoylserin, Monomeres von Enterobactin, siehe „M“
DNA	engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

Dr.	Doktor
Dr. rer. nat.	Doktor der Naturwissenschaften (lat.: <i>rerum naturalium</i> )
DTT	1,4-Dithiotreit, Reduktionsmittel
DtxR	engl.: <i>diphtheria toxin repressor / regulator</i> , Regulator eisensensitiver Gene in <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , Äquivalent zu Fur in Gram-positiven Bakterien
<b>E</b>	(dekadische) Extinktion, spektrales (dekadisches) Absorptionsmaß
E	exponentielle Darstellung der Bakterienzahl
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
Eae	engl.: <i>E. coli</i> attaching and effacing, Membranprotein Intimin, Virulenzfaktor
EAggEC	Enteroaggregative <i>E. coli</i>
Eb	Enterobactin
EDDHA	engl.: <i>ethylenediamine di(o-hydroxyphenylacetic acid)</i> , Ethylendiamin Di(o-Hydroxyphenyllessigsäure)
EDTA	engl.: <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i> , Ethylendiamintetraessigsäure, Chelator
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>E. coli</i>
engl.	englisch
EntA	engl.: <i>2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase</i> (Enterobactinbiosynthese)
EntB	Isochorismatase (Enterobactinbiosynthese)
EntC	Isochorismat Synthase (Enterobactinbiosynthese)
EntD	Phosphopantetheinyl Transferase (Enterobactinbiosynthese)
EntE	engl.: <i>2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase</i> (Enterobactinbiosynthese)
EntF	engl.: <i>enterobactin synthetase component F</i> , Enterobactin Synthetase Komponente F (Enterobactinbiosynthese)
EPEC	Enteropathogene <i>E. coli</i>
Epi	Epinephrin, Adrenalin
<i>et al.</i>	lat.: <i>et alii</i> , und andere
etc.	lat.: <i>et cetera</i> , und so weiter
ETEC	Enterotoxische <i>E. coli</i>
ExbB	membranständiges Protein im TonB-ExbB-ExbD Komplex
ExbD	membranständiges Protein im TonB-ExbB-ExbD Komplex
<b>FBS</b>	engl.: <i>fetal bovine serum</i> , fetales / fötales Kälberserum
Fe	lat.: <i>ferrum</i> , Eisen
Fec	engl.: <i>ferric citrate</i> , Eisencitrat
FepA	engl.: <i>ferrienterobactin receptor</i> , Enterobactin OM-Rezeptor
Fes	engl.: <i>ferric enterobactin esterase</i> , Fe-Enterobactin Esterase
FhuA	engl.: <i>ferric hydroxamate uptake</i> , multifunktionaler OM-Rezeptor
franz.	französisch
Fur	engl.: <i>ferric uptake regulation protein</i> , globaler Regulator des Eisenmetabolismus
<b>g</b>	engl.: <i>gravity</i> , Erdbeschleunigung, Erdanziehung
g	Gramm
griech.	griechisch
GST	Glutathion-S-Transferase, Affinitätstag
<b>h</b>	engl.: <i>hour(s)</i> , Stunde(n)
H <sub>2</sub> O	Wasser
HasA	Hämophorprotein
HasR	Häm-OM-Rezeptor
His	Histidin
HofQ - HofM	an der Nutzung von DNA als C-Quelle beteiligte Proteine
HPI	engl.: <i>high pathogenicity island</i> , Pathogenitätsinsel, horizontaler Transfer von Virulenzgenen
HPLC	engl.: <i>high pressure liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Hrsg.	Herausgeber
<b>i. d. R.</b>	in der Regel
IdeR	engl.: <i>iron dependent regulatory protein</i> , Homolog von DtxR, Regulator eisensensitiver Gene, Äquivalent zu Fur in Gram-positiven Bakterien

IM	engl.: <i>inner membrane</i> , innere Membran
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid, Induktor für $\beta$ -Galaktosidase
IroA	<i>iro</i> -Gencluster (Salmochelinbiosynthese)
IroB	Glycosyltransferase (Salmochelinbiosynthese)
IroC	engl.: <i>multidrug resistance protein ABC exporter</i> , Transportprotein (Salmochelinbiosynthese)
IroD	cytoplasmatische Salmochelin Esterase (Salmochelinbiosynthese)
IroE	periplasmatische Salmochelin Esterase (Salmochelinbiosynthese)
IroN	engl.: <i>salmochelin siderophore receptor protein</i> , Salmochelin Rezeptor (Salmochelinbiosynthese)
Irp	engl.: <i>iron repressible outer membrane receptor / protein</i> , Yersiniabactinrezeptor / -Siderophorsystem
ITC	engl.: <i>isothermal titration calorimetry</i> , biophysikalische Methode zur analytischen Quantifizierung von Bindereaktionen
<b>k</b>	Kilo $10^3$
K-12	Bezeichnung für avirulente <i>E. coli</i> Referenzstämme, genutzt als Standard in der mikrobiologischen Forschung
kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
Kd	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton, Masse-Äquivalent von 1000 Wasserstoffatomen
Kontr.	Kontrolle
<b>l</b>	Liter, $10^{-3} \text{ m}^3$
LacZ	$\beta$ -Galaktosidase
lat.	lateinisch
LPS	Lipopolysaccharid
<b>m</b>	Meter
m	Milli $10^{-3}$
M	molar, g (Molmasse in Gramm)/l
M	Monomeres von Enterobactin, siehe „DHBS“
M	Proteinmarker
mA	Milliampere
mAbs	Milli-Absorption
MC4100	<i>E. coli</i> K-12 Derivat
MCS	engl.: <i>multiple cloning site</i> , Polylinker
MenF	Isochorismat Synthase 2
MeOH	Methanol
mg	Milligramm, $10^{-3} \text{ g}$
MG1655	<i>E. coli</i> K-12 Derivat
min	Minute(n)
ml	Milliliter, $10^{-3} \text{ l}$
mm	Millimeter, $10^{-3} \text{ m}$
mM	millimolar, $10^{-3} \text{ M}$
mol	Stoffmenge eines Systems, die aus so vielen Elementarteilchen besteht, wie Atome in 12 g des $^{12}\text{C}$ -Nukleotids enthalten sind
mpk	kommensaler <i>E. coli</i>
MrcA	Peptidoglycan Synthetase
MW	engl.: <i>molecular weight</i> , Molekulargewicht
<b>n</b>	Nano $10^{-9}$
n	Stichprobenumfang
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NB	engl.: <i>nutrient broth</i> , eisenarme Standard-Nährbouillon
NE	Norepinephrin, Noradrenalin
Neo	Neomycin
ng	Nanogramm, $10^{-9} \text{ g}$
NGAL	engl.: <i>neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i> , Siderocalin
Ni	Nickel

nm	Nanometer, $10^{-9}$ m
NMEC	Neonatal Meningitis <i>E. coli</i>
nmol	nanomol
Nr.	Nummer
NTA	Nitrilotriacetat, Nitrilotriessigsäure, Chelatbildner
<b>OD</b>	engl.: <i>optical density</i> , optische Dichte
OM	engl.: <i>outer membrane</i> , äußere Membran
ONPG	o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid
ORF	engl.: <i>open reading frame</i> , offenes Leseraster
ori	engl.: <i>origin of replication</i> , Replikationsursprung
<b>p</b>	Irrtumswahrscheinlichkeit
P	Phosphatrest
P	Phosphor
p	Piko $10^{-12}$
p	Plasmid
p. a.	lat.: <i>pro analysi</i> , „für die Analyse / analytische Zwecke“, Chemikalien mit hohem Reinheitsgrad
PAGE	engl.: <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PC	engl.: <i>personal computer</i> , persönlicher Computer
PCR	engl.: <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
PDB	engl.: <i>protein data bank</i> , Proteindatenbank
pH	lat.: <i>pondus Hydrogenii</i> , Gewicht des Wasserstoffs
pI	engl.: <i>isoelectric point</i> , isoelektrischer Punkt
ppGpp	Guanosin-3',5'-bispyrophosphat, Signalmolekül der bakteriellen Stressantwort ( <i>stringent response</i> ), Alarmon
Prof.	Professor
psi	engl.: <i>pounds per square inch</i> , Gewichtskraft eines Pfunds auf einen Quadratzoll, 6894,75729 Pascal, 1 bar entsprechen 14,5038 psi
Pwo	<i>Pyrococcus woesei</i>
<b>QseB</b>	cytoplasmatisches <i>transcriptional regulatory protein</i> , Regulationsprotein eines Zweikomponentensystems
QseC	Transmembran Sensorprotein, Sensorprotein / Histidinkinase eines Zweikomponentensystems
<b>r</b>	resistent
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß, Maß der Statistik
RelA	ppGpp-Synthetase
RNA	engl.: <i>ribonucleic acid</i> , Ribonucleinsäure(n)
rpm	engl.: <i>rotations / revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RPMI	Zellkulturmedium für humane und tierische Zellen, entwickelt am <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
R-Satz	Risiko-Satz
RT	Raumtemperatur
<b>s</b>	engl.: <i>second(s)</i> , Sekunde(n)
S	Siderocalin
S(n)	Salmochelins(n = X, 0, 1, 2, 3, 4 oder 5)
S.	<i>Salmonella</i>
S.	Seite
s. o.	siehe oben
SD	engl.: <i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SDS	engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat, Detergens
SI	franz.: <i>système international d'unités</i> , Internationales Einheitensystem
spec.	lat.: <i>species</i> , Artbezeichnung für Gattungen, wenn diese unbekannt oder irrelevant ist
SpoT	ppGpp-Synthetase / -Hydrolase
S-Satz	Sicherheits-Satz
ssp.	lat.: <i>subspecies</i> , Unterarten, Species

Stx	engl.: <i>Shiga toxin-encoding</i> , Shiga-Toxin codierend
<b>t</b>	engl.: <i>time</i> , Zeit
T	Trimeres von Enterobactin
T.	Transferrin
Tabl.	Tablette
TAE	Tris-Acetat-EDTA, Elektrophoresepuffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin, „Starter“ bei der Polymerisierung von Acrylamid
TFA	engl.: <i>trifluoroacetic Acid</i> , Trifluoressigsäure
TLC	engl.: <i>tear</i> Lipocalin, Tränen-Lipocalin
TolA	membranständiges Protein im TolA-TolQ-TolR Komplex
TolQ	membranständiges Protein im TolA-TolQ-TolR Komplex
TolR	membranständiges Protein im TolA-TolQ-TolR Komplex
TonB	membranständiges Protein im TonB-ExbB-ExbD Komplex
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Puffersubstanz
TY	Vollmedium TY
<b>U</b>	engl.: <i>unit(s)</i> , Einheit(en)
u. a.	und andere(r)
u. a.	unter anderem
ü. N.	über Nacht
UK	engl.: <i>United Kingdom</i> , Vereinigtes Königreich
UPEC	Uropathogene <i>E. coli</i>
upm	Umdrehungen pro Minute
usw.	und so weiter
UTI	engl.: <i>urinary tract infecting / infection</i> , Harnwegsinfekt/ion
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge / Ultrazentrifugation
<b>V</b>	Volt
V	Volumen
VE	vollentsalzt
<i>vir</i>	Virulenzgen
<b>WT</b>	Wildtyp
<b>x</b>	Abszisse
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid, Substrat der $\beta$ -Galaktosidase
<b>y</b>	Ordinate
YgiV	vorhergesagter transkriptioneller Regulator
YgiW	konserviertes periplasmatisches Protein
YgiZ	konserviertes IM-Protein
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

## Nukleobasen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

## Symbole

::	ersetzt durch
°	Grad
$\Delta$	griech.: <i>delta</i> , Deletion
$\lambda$	griech.: <i>lambda</i> , temperenter Phage
$\mu$	griech.: <i>my</i> , Mikro $10^{-6}$
$\Phi$	griech.: <i>phi</i> , Phage
-	leere <i>lane</i>
$\mu\text{g}$	Mikrogramm, $10^{-6}$ g
$\mu\text{l}$	Mikroliter, $10^{-6}$ l
$\mu\text{M}$	mikromolar, $10^{-6}$ M
%	Prozent

Maßeinheiten wurden dem SI-System entsprechend verwendet. Für verschiedene Verbindungen wurden deren chemische Strukturformeln mit den üblichen Symbolen gebraucht. Für im deutschen Sprachgebrauch nicht übliche Begriffe wurden die englischen Fachbegriffe belassen und diese wie alle fremdsprachlichen Begriffe kursiv dargestellt.

## 6.1.2 Abbildungen

Abbildung 1-1: Darstellung der Strukturformeln verschiedener Catechol-Siderophore: Enterobactin und Salmochelin S4 mit den zwei Glycosylresten (rot markiert) (Hider & Kong, 2010).....	4
Abbildung 1-2: Darstellung der Strukturformeln verschiedener Siderophore: Aerobactin, Desferrioxamin B und Ferrichrom (Hydroxamate) sowie Yersiniabactin und Citrat (Carboxylate / Mischformen).....	6
Abbildung 1-3: Siderocalin komplexiert mit Ferri-2,3-Dihydroxybenzoylserin (links und mittig: Ansicht von der Seite; rechts: Ansicht von oben) (Goetz <i>et al.</i> , 2002).....	11
Abbildung 1-4: YgiW (links: Ansicht von der Seite, rechts: Ansicht von oben). (Basierend auf Daten der RCSB Protein Data Bank: PDI-ID: 1NNX, Lehmann, C., Galkin, A., Pullalarevu, S., Sarikaya, E., Krajewski, W., Lim, K., Howard, A., Herzberg, O. Structure of the hypothetical protein ygiW from <i>E. coli</i> . Unveröffentlicht. Bearbeitet mit PyMOL von Prof. Dr. Hantke (Lehmann C. <i>et al.</i> , 2004)).....	14
Abbildung 1-5: Darstellung der Strukturformeln von Adrenalin / Epinephrin (links) und Noradrenalin / Norepinephrin (rechts), beides Catecholamine (erstellt mit: Formeleditor). Die Catecholstruktur ist rot markiert. ....	15
Abbildung 3-1: Rohextraktprobe des Anzuchtmediums von <i>E. coli</i> BW25113 [5863] vor der Substanzpräparation. Die Abbildung zeigt ein HPLC-Chromatogramm der analytischen HPLC mit den entsprechenden Peaks der Produkte aus dem <i>E. coli</i> -Anzuchtmedium (M63 + Glycerol) nach Reinigung und Elution über eine DE52 Diethylaminoethyl Cellulosesäule. Außer Enterobactin (Peak Nr. 18) und seinen Derivaten DHBS (Peak Nr. 2), DHB (Peak Nr. 7), Dimer (Peak Nr. 14) und dem Trimeren (Peak Nr. 17) sind weitere Substanzen im Medium erkennbar. ....	52
Abbildung 3-2: DHBS-Aufreinigung mittels analytischer HPLC. Die Abbildung zeigt ein HPLC-Chromatogramm der analytischen HPLC zur Überprüfung der Reinheit von DHBS, dem Monomeren von Enterobactin (Peak Nr. 1).....	53
Abbildung 3-3: Enterobactinaufreinigung mittels analytischer HPLC. Die Abbildung zeigt ein HPLC-Chromatogramm der analytischen HPLC zur Überprüfung der Reinheit von Enterobactin (Peak Nr. 1).....	53
Abbildung 3-4: Enterobactinstandard in der analytischen HPLC. Zu sehen sind die einzelnen Peaks der Auftrennung, die den Abbauprodukten von Enterobactin und Enterobactin selbst entsprechen, in folgender Reihenfolge: DHBS (1), DHB (2), D (3), T (4) und Eb (5). Zum Positionsvergleich sind zwei weitere Chromatogramme mit dargestellt: DHBS (pink) und Enterobactin (rot). ....	54
Abbildung 3-5: Rohextraktprobe des Anzuchtmediums von <i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>Thyphimurium</i> [5544] vor der Aufreinigung. Die Abbildung zeigt ein HPLC-Chromatogramm der präparativen HPLC mit den entsprechenden Peaks der Produkte aus dem <i>Salmonella</i> -Anzuchtmedium (M63 + Glycerol) nach Reinigung und Elution über eine DE52 Diethylaminoethyl Cellulosesäule. ....	54



- Abbildung 3-6: Salmochelin S0-Aufreinigung mittels präparativer und analytischer HPLC. Die Abbildung zeigt ein HPLC-Chromatogramm der analytischen HPLC zur Überprüfung der Reinheit von S0 (Peak Nr. 2).....55
- Abbildung 3-7: Salmochelin S4-Aufreinigung mittels präparativer und analytischer HPLC. Die Abbildung zeigt ein HPLC-Chromatogramm der analytischen HPLC zur Überprüfung der Reinheit von S4 (Peak Nr. 2).....55
- Abbildung 3-8: Salmochelinstandard in der analytischen HPLC. Zu sehen sind die einzelnen Peaks der Auftrennung, die den Abbauprodukten von Salmochelin und Salmochelin selbst entsprechen. ....56
- Abbildung 3-9: Reines GST-Siderocalin in Lösung in PBS nach der Aufreinigung. Siderocalin wurde stets mit gebundenem Enterobactin isoliert (3.3.6). Die Rosafärbung zeigt die Beladung mit Eisen-Enterobactin an...56
- Abbildung 3-10: SDS-PAGE der Elutionsfraktionen nach Überexpression von Siderocalin in BL21 (11 %iges SDS-Gel). Aufgetragen wurden jeweils 20 µl Probenmischung und 5 bzw. 10 µl Marker. Links wurde Proteinmarker (M) aufgetragen, es folgten 13 Siderocalinfraktionen (1-13) à 1 ml Eluat und die Durchlaufraction (D), abschließend erneut eine Spur mit Proteinmarker. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Blue.....57
- Abbildung 3-11: SDS-PAGE von GST-Siderocalin vor und nach Verdau durch Thrombin. Aufgetragen wurden jeweils 20 µl Probenmischung und 10 µl Marker. Links wurde Siderocalin (S) in PBS aufgetragen, es folgten vier Siderocalinfraktionen (1-4) nach fünfständigem Thrombinverdau, mit zunehmender Thrombinverdünnung (1 : 25; 1 : 50; 1 : 100; 1 : 200), anschließend eine Spur mit Proteinmarker (M). Die Färbung erfolgte mit Coomassie Blue. ....58
- Abbildung 3-12: Das obere Teilbild zeigt HPLC-Chromatogramme der Detektion, der an Siderocalin gebundenen Siderophore; Der untere Abschnitt der Abbildung zeigt die korrespondierenden Stamminformationen sowie das dazugehörige Gelbild der SDS-PAGE auf Siderocalinhöhe von ca. 48 kDa. BL21 (DE3) [2173] produziert als Siderophor nur Enterobactin, Nissle 1917 [5603] hingegen Aerobactin, Enterobactin, Salmochelin und Yersiniabactin, *E. coli* MC4100 [5687] produziert keine Siderophore. Untersucht wurde jeweils isoliertes Siderocalin nach Überexpression. BL21 wies Protein auf sowie gebundenes Enterobactin, [5687] zeigte eine schwache Siderocalinproduktion und keine gebundenen Siderophore, Nissle 1917 wies wiederum Protein auf und gebundene Siderophore: Enterobactin und Salmochelin. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Blue.....59
- Abbildung 3-13: Darstellung der Eichgeraden für definierte Mengen an DHB. Ermittelt via Arnow-Test. ....60
- Abbildung 3-14: Darstellung der Eichgeraden für definierte Mengen an Enterobactin. Ermittelt via HPLC.....61
- Abbildung 3-15: Wachstumsexperimente in Gegenwart von Siderocalin. Die Stämme *E. coli* K-12 MG1655 [5538], *E. coli* K-12 MG1655 [5538] pKHI18 (*iroBCDEN*) und *Salmonella enterica* ssp. Typhimurium [205] wurden in RPMI-Medium mit 10 % FBS bei 37°C unter aeroben Bedingungen angezogen. GST-Siderocalin wurde in den angegebenen Konzentrationen zugefügt; Nach 16 Stunden Inkubation wurden die CFU-Daten bestimmt. Die Y-Achse zeigt die logarithmischen Werte an (n = 6). Wachstumsinhibition tritt nur bei Stämmen ohne Salmochelinproduktion auf.....62
- Abbildung 3-16: Wachstumsexperimente in Gegenwart von Siderocalin. Der Stamm *E. coli* K-12 MG1655 [5538] pKHI23 (*iroDEN*) wurde in RPMI-Medium mit 10 % FBS bei 37°C unter aeroben Bedingungen angezogen. GST-Siderocalin wurde in den angegebenen Konzentrationen zugefügt; Nach 16 Stunden Inkubation wurden die CFU-Daten bestimmt. Die Y-Achse zeigt die logarithmischen Werte an (n = 4). Das Wachstum wird durch Zusatz von Siderocalin inhibiert. ....63
- Abbildung 3-17: Dokumentation eines Wachstumsexperimentes nach 16-stündiger Inkubation. In der oberen Reihe erfolgte die Animpfung mit 2.000 Bakterien *E. coli* ABU [5814] pro ml in RPMI mit, in der unteren ohne Transferrin (T) (3 g/l; 30 %ige Eisenbeladung). Links ohne weitere Zugaben, mittig mit Noradrenalin (NE) (50 µM) und rechts mit Noradrenalin (50 µM) und Siderocalin (S) (50 µM). Versuche mit den zwei weiteren untersuchten Stämmen, zeigten gleiche Ergebnisse. Zu erkennen ist eine Wachstumsstimulation mit Zusatz von NE, die durch S weiter gesteigert wird. Mit T wird das Wachstum im Vergleich inhibiert. ...65
- Abbildung 3-18: Orientierung und Position der Gene *ygiW*, *qseB* und *qseC* im Genom von *E. coli* K-12 (MG1655) (gleiche Genfarbe steht für das gleiche Operon). Gene und ihre Produkte: *ygiV* = vorhergesagter transkriptioneller Regulator; *ygiW* = konserviertes periplasmatisches Protein; *qseB* = Regulationsprotein des Zweikomponentensystems; *qseC* = Sensorprotein / Histidinkinase des Zweikomponentensystems; *ygiZ* = konserviertes IM-Protein .....66
- Abbildung 3-19: Verdünnungsausstrich von BW25113 [5863] mit *λp<sub>fepA</sub>-lacZ* auf *λ*-Platten + X-Gal (0,2 mg/ml) + Desferal® (50 µM) nach erfolgreicher chromosomaler Integration in das *E. coli* Genom. Die einheitliche Blaufärbung durch den Umsatz von X-Gal indiziert den Nachweis der intakten  $\beta$ -Galaktosidase im Genom des zu untersuchenden Stammes. ....66
- Abbildung 3-20: Orientierung und Position der Gene *fepA*, *fes*, *entF* und *entC* im Genom von *E. coli* K-12 (MG1655) (gleiche Genfarbe steht für das gleiche Operon). Gene und ihre Produkte: *entD* = Phosphopantetheinyl Transferase; *fepA* = Enterobactin OM-Rezeptor; *fes* = Fe-Enterobactin Esterase; *entF* = Enterobactin Synthase Komponente F; *entC* = Isochorisimat Synthase .....67
- Abbildung 3-21: Karte des *iroA* Genclusters bei *S. enterica* und uropathogenen *E. coli* Stämmen. Gene und ihre Produkte: *iroA* = *iro*-Gencluster; *iroN* = Salmochelin Rezeptor; *iroE* = periplasmatische Salmochelin

Esterase; <i>iroD</i> = cytoplasmatische Salmochelin Esterase; <i>iroC</i> = multidrug resistance protein ABC exporter; <i>iroB</i> = Glycosyltransferase .....	67
Abbildung 3-22: $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der FepA-LacZ-Fusion sowie das Wachstum von <i>E. coli</i> K-12 [5863] mit und ohne Zusatz von Desferal <sup>®</sup> . Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium (+/- 50 $\mu$ M Desferal <sup>®</sup> ). Zu Grunde liegender Stamm war BW25113. Die Werte sind angegeben in <i>Miller Units</i> und entsprechen der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bzw. in OD <sub>578nm</sub> -Messwerten und stellen die Absorption dar. ....	68
Abbildung 3-23: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-22. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist hoch signifikant ( $p \leq 0,001$ ).....	68
Abbildung 3-24: $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Fes-LacZ-Fusion in <i>E. coli</i> K-12 [5885] und einer $\Delta$ <i>qseC</i> -Mutante [5881]. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 $\mu$ M Desferal <sup>®</sup> . Zu Grunde liegender Stamm war BW25113. Die Werte sind angegeben in <i>Miller Units</i> und entsprechen der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Die Messung der Wildtypdaten erfolgte in zwei voneinander unabhängigen Versuchen. ....	70
Abbildung 3-25: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-24. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist hoch signifikant ( $p \leq 0,001$ ).....	70
Abbildung 3-26: Wachstumsverlauf während der $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung. Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 $\mu$ M Desferal <sup>®</sup> . Zu Grunde liegender Stamm war BW25113. Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt. ....	71
Abbildung 3-27: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-26. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant. ....	71
Abbildung 3-28: $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der FepA-LacZ-Fusion in <i>E. coli</i> K-12 [5989] und einer $\Delta$ <i>entC</i> -Mutante [5910]. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 $\mu$ M Desferal <sup>®</sup> . Zu Grunde liegender Stamm war MC4100. Die Werte sind angegeben in <i>Miller Units</i> und entsprechen der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Die Messung der Daten erfolgte in zwei voneinander unabhängigen Versuchen. ....	72
Abbildung 3-29: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-28. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant. ....	72
Abbildung 3-30: Wachstumsverlauf während der $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung. Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 $\mu$ M Desferal <sup>®</sup> . Zu Grunde liegender Stamm war MC4100. Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt. ....	73
Abbildung 3-31: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-30. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant. ....	73
Abbildung 3-32: $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der FepA-LacZ-Fusion in <i>E. coli</i> K-12 [5909] und einer $\Delta$ <i>qseC</i> -Mutante [5905]. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 $\mu$ M Desferal <sup>®</sup> . Zu Grunde liegender Stamm war BW25113. Die Werte sind angegeben in <i>Miller Units</i> und entsprechen der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Die Messung der Wildtypdaten erfolgte in zwei voneinander unabhängigen Versuchen.....	74
Abbildung 3-33: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-32. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist hoch signifikant ( $p \leq 0,001$ ).....	74
Abbildung 3-34: Wachstumsverlauf während der $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung. Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 $\mu$ M Desferal <sup>®</sup> . Zu Grunde liegender Stamm war BW25113. Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder. ....	75
Abbildung 3-35: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-34. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant. ....	75
Abbildung 3-36: $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der FepA-LacZ-Fusion in <i>E. coli</i> $\Delta$ <i>entC</i> - [5910] und einer $\Delta$ <i>entC</i> $\Delta$ <i>qseC</i> -Doppelmutante [5907]. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 $\mu$ M Desferal <sup>®</sup> . Zu Grunde liegender Stamm war MC4100. Die Werte sind angegeben in <i>Miller Units</i> und entsprechen der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität.....	76
Abbildung 3-37: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-36. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist hoch signifikant ( $p \leq 0,001$ ).....	76

Abbildung 3-38: Wachstumsverlauf während der $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung. Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MC4100. Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder. Die Daten für die Referenz wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt. ....	77
Abbildung 3-39: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-38. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant.....	77
Abbildung 3-40: $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der FepA-LacZ-Fusion in <i>E. coli</i> K-12 [5909] und einer <i>AqseB</i> -Mutante [5987]. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war BW25113. Die Werte sind angegeben in <i>Miller Units</i> und entsprechen der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität.....	78
Abbildung 3-41: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-40. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant.....	78
Abbildung 3-42: Wachstumsverlauf während der $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung. Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war BW25113. Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt. ....	79
Abbildung 3-43: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-42. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant.....	79
Abbildung 3-44: $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der FepA-LacZ-Fusion in <i>E. coli</i> K-12 [5988] und einer <i>AqseB</i> -Mutante [5983]. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MG1655. Die Werte sind angegeben in <i>Miller Units</i> und entsprechen der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität.....	80
Abbildung 3-45: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-44. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist hoch signifikant ( $p \leq 0,001$ ). ....	80
Abbildung 3-46: Wachstumsverlauf während der $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung. Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MG1655. Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder.....	81
Abbildung 3-47: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-46. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant.....	81
Abbildung 3-48: $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der <i>IroN</i> -LacZ-Fusion in <i>E. coli</i> K-12 [5831] und einer <i>AentC</i> -Mutante [5820]. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MC4100. Die Werte sind angegeben in <i>Miller Units</i> und entsprechen der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Die Messung der Daten erfolgte in zwei voneinander unabhängigen Versuchen. ....	82
Abbildung 3-49: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-48. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant.....	82
Abbildung 3-50: Wachstumsverlauf während der $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung. Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MC4100. Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt. ....	83
Abbildung 3-51: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-50. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant.....	83
Abbildung 3-52: $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der <i>IroN</i> -LacZ-Fusion in <i>E. coli</i> <i>AentC</i> - [5820] und einer <i>AentC AqseC</i> -Doppelmutante [5787]. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MC4100. Die Werte sind angegeben in <i>Miller Units</i> und entsprechen der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Die Messung der Daten erfolgte in zwei voneinander unabhängigen Versuchen. ....	84
Abbildung 3-53: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-52. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist hoch signifikant ( $p \leq 0,001$ ). ....	84
Abbildung 3-54: Wachstumsverlauf während der $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung. Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MC4100. Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt. ....	85

Abbildung 3-55: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-54. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant. ....	85
Abbildung 3-56: $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Fes-LacZ-Fusion in <i>E. coli</i> K-12 [5885] und einer <i>AygiW</i> -Mutante [5882]. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war BW25113. Die Werte sind angegeben in <i>Miller Units</i> und entsprechen der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Die Messung der Wildtypdaten erfolgte in zwei voneinander unabhängigen Versuchen. ....	86
Abbildung 3-57: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-56. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant. ....	86
Abbildung 3-58: Wachstumsverlauf während der $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung. Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war BW25113. Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt. ....	87
Abbildung 3-59: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-58. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant. ....	87
Abbildung 3-60: $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der FepA-LacZ-Fusion in <i>E. coli</i> K-12 [5909] und einer <i>AygiW</i> -Mutante [5906]. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war BW25113. Die Werte sind angegeben in <i>Miller Units</i> und entsprechen der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. ....	88
Abbildung 3-61: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-60. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant. ....	88
Abbildung 3-62: Wachstumsverlauf während der $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung. Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war BW25113. Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt. ....	89
Abbildung 3-63: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-62. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant. ....	89
Abbildung 3-64: $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der FepA-LacZ-Fusion in <i>E. coli</i> <i>AentC</i> - [5910] und einer <i>AentC AygiW</i> -Doppelmutante [5908]. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MC4100. Die Werte sind angegeben in <i>Miller Units</i> und entsprechen der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. ....	90
Abbildung 3-65: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-64. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test nicht normal verteilt und wurden deshalb mit dem parameterfreien Wilcoxon / Kruskal-Wallis-Rangsummen-Test getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant. ....	90
Abbildung 3-66: Wachstumsverlauf während der $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung. Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MC4100. Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt. ....	91
Abbildung 3-67: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-66. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant. ....	91
Abbildung 3-68: $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der IroN-LacZ-Fusion in <i>E. coli</i> <i>AentC</i> - [5820] und einer <i>AentC AygiW</i> -Doppelmutante [5784]. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MC4100. Die Werte sind angegeben in <i>Miller Units</i> und entsprechen der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Die Messung der Referenzdaten erfolgte in zwei voneinander unabhängigen Versuchen. ....	92
Abbildung 3-69: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-68. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist hoch signifikant ( $p \leq 0,001$ ). ....	92
Abbildung 3-70: Wachstumsverlauf während der $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung. Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MC4100. Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt. ....	93
Abbildung 3-71: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-70. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant. ....	93

Abbildung 3-72: $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der IroN-LacZ-Fusion in <i>E. coli</i> K-12 [5757] und einer $\Delta entF$ -Mutante [5751]. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MG1655. Die Werte sind angegeben in <i>Miller Units</i> und entsprechen der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Die Messung der Daten erfolgte in zwei voneinander unabhängigen Versuchen. ....	93
Abbildung 3-73: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-72. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist hoch signifikant ( $p \leq 0,001$ ). ....	93
Abbildung 3-74: Wachstumsverlauf während der $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung. Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MG1655. Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt. ....	95
Abbildung 3-75: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-74. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist schwach signifikant ( $p \leq 0,05$ ). ....	95
Abbildung 3-76: $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der IroN-LacZ-Fusion in <i>E. coli</i> $\Delta entF$ - [5751] und einer $\Delta entF \Delta ygiW$ -Doppelmutante [5753]. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MG1655. Die Werte sind angegeben in <i>Miller Units</i> und entsprechen der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Die Messung der Daten erfolgte in zwei voneinander unabhängigen Versuchen. ....	96
Abbildung 3-77: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-76. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist hoch signifikant ( $p \leq 0,001$ ). ....	96
Abbildung 3-78: Wachstumsverlauf während der $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung. Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MG1655. Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt. ....	97
Abbildung 3-79: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-78. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist nicht signifikant. ....	97
Abbildung 3-80: $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der FepA-LacZ-Fusion in <i>E. coli</i> K-12 [5909], einer $\Delta entC$ - [5910], $\Delta qseC$ - [5905] und einer $\Delta ygiW$ -Mutante [5906]. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in TY-Medium + 50 $\mu$ M Desferal® (schwarze Kennung) bzw. - Desferal (rote Kennung). Zu Grunde liegender Stamm war BW25113, mit Ausnahme der $\Delta entC$ -Mutante (MC4100). Die Werte sind angegeben in <i>Miller Units</i> und entsprechen der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Die Messung der Daten erfolgte in zwei voneinander unabhängigen Versuchen. ....	98
Abbildung 3-81: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-80. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Ein statistisch signifikanter Unterschied ist nur zwischen den Messreihen $\Delta qseC \text{ pfepA-lacZ}$ und $\Delta ygiW \text{ pfepA-lacZ}$ festzustellen ( $p \leq 0,01$ ). ....	99
Abbildung 3-82: Wachstumsverlauf während der $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung. Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in TY-Medium + 50 $\mu$ M Desferal® (schwarze Kennung) bzw. - Desferal (rote Kennung). Zu Grunde liegender Stamm war BW25113, mit Ausnahme der $\Delta entC$ -Mutante (MC4100). Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt. ....	99
Abbildung 3-83: $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Fes-LacZ-Fusionen in <i>E. coli</i> K-12 [5885], einer $\Delta entC$ - [5886], $\Delta qseC$ - [5881] und einer $\Delta ygiW$ -Mutante [5882]. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in TY-Medium + 50 $\mu$ M Desferal® (schwarze Kennung) bzw. - Desferal® (rote Kennung). Zu Grunde liegender Stamm war BW25113, mit Ausnahme der $\Delta entC$ -Mutante (MC4100). Die Werte sind angegeben in <i>Miller Units</i> und entsprechen der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Die Messung der Daten erfolgte in zwei voneinander unabhängigen Versuchen. ....	100
Abbildung 3-84: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-83. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen $\Delta qseC \text{ pfes-lacZ}$ und den weiteren Messreihen ist schwach signifikant ( $p \leq 0,05$ ). ....	100
Abbildung 3-85: Wachstumsverlauf während der $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung. Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in TY-Medium + 50 $\mu$ M Desferal® (schwarze Kennung) bzw. - Desferal® (rote Kennung). Zu Grunde liegender Stamm war BW25113, mit Ausnahme der $\Delta entC$ -Mutante (MC4100). Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt. ....	101

- Abbildung 3-86: Orientierung und Position von *aroB* im Genom von *E. coli* K-12 (MG1655) (gleiche Genfarbe steht für das gleiche Operon). Gene und ihre Produkte: *dam* = DNA Adenin Methylase; *damX* = vorhergesagtes membranverankertes Protein, stört die Zellteilung; *aroB* = 3-Dehydroquinat Synthase; *aroK* = Shikimat Kinase; *hofQ* - *hofM* = an der Nutzung von DNA als C-Quelle beteiligte Proteine; *mrcA* = Peptidoglycan Synthetase..... 101
- Abbildung 3-87:  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Fes-, FepA- und Iron-LacZ-Fusionen in der *E. coli*  $\Delta$ entC- [5886, 5910, 5820] und einer  $\Delta$ aroB-Mutante [5992, 5993, 5994]. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50  $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MC4100. Die Werte sind angegeben in *Miller Units* und entsprechen der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität..... 102
- Abbildung 3-88: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-87. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test nicht normal verteilt und wurden deshalb mit dem parameterfreien Wilcoxon / Kruskal-Wallis-Rangsummen-Test getestet. Der Unterschied zwischen den Messreihen ist signifikant: Für den FepA- und den Fes-Promotor schwach signifikant, für den Promotor Iron signifikant. .... 102
- Abbildung 3-89: Wachstumsverlauf während der  $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung. Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50  $\mu$ M Desferal®. Zu Grunde liegender Stamm war MC4100. Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder..... 103
- Abbildung 3-90: Wachstumsverlauf während der Enterobactinbestimmung von *E. coli* K-12 [5538], einer  $\Delta$ qseB- [5796] sowie einer  $\Delta$ qseC-Mutante [5722]. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von 14 Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in M63-Medium (pH 7,6). Es wurde der Stamm BW25113, MG1655  $\Delta$ qseB und BW25113  $\Delta$ qseC verwendet. Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt..... 104
- Abbildung 3-91: Enterobactinproduktion in Bezug auf die jeweilige optische Dichte (Area / HPLC pro ca.  $0,8 \times 10^9$  Zellen) von *E. coli* K-12 [5538], einer  $\Delta$ qseB- [5796] sowie einer  $\Delta$ qseC-Mutante [5722]. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von 14 Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in M63-Medium (pH 7,6). Es wurde der Stamm BW25113, MG1655  $\Delta$ qseB und BW25113  $\Delta$ qseC verwendet. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten via HPLC-Messung ermittelt..... 105
- Abbildung 3-92: Wachstumsverlauf während der Enterobactinbestimmung von *E. coli* K-12 [5538], einer  $\Delta$ qseB- [5796] sowie einer  $\Delta$ qseC-Mutante [5722]. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von elf Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in TY-Medium. Es wurden der Stamm BW25113, MG1655  $\Delta$ qseB und BW25113  $\Delta$ qseC verwendet. Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt..... 106
- Abbildung 3-93: Enterobactinproduktion in Bezug auf die jeweilige optische Dichte (Area / HPLC pro ca.  $0,8 \times 10^9$  Zellen) von *E. coli* K-12 [5538], einer  $\Delta$ qseB- [5796] sowie einer  $\Delta$ qseC-Mutante [5722]. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von elf Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in TY-Medium. Es wurde der Stamm BW25113, MG1655  $\Delta$ qseB und BW25113  $\Delta$ qseC verwendet. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten via HPLC-Messung ermittelt..... 107
- Abbildung 3-94: SDS-PAGE der Elutionsfraktionen nach Überexpression von GST-YgiW. Aufgetragen wurden jeweils 20  $\mu$ l Probenmischung und 5 bzw. 10  $\mu$ l Marker. Links wurde Proteinmarker (M) aufgetragen, es folgten zehn YgiW-Fraktionen (1-10) à 1 ml Eluat bei 38 kDa und zwei Durchlaufaktionen (D), anschließend eine leere *lane* (-) und erneut eine Spur mit Proteinmarker. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Blue. .... 109
- Abbildung 3-95: HPLC-Analyse einer YgiW-Proteinlösung nach Proteinase K-Verdau. Peak Nr. 4 entspricht Enterobactin..... 110
- Abbildung 3-96: HPLC-Analyse einer YgiW-Proteinlösung nach Proteinase K-Verdau. Peak Nr. 5 entspricht dem Monomeren von Enterobactin, Nr. 6 Dihydroxybenzoesäure, Nr. 7 dem Dimeren, Nr. 8 dem Trimeren und Peak Nr. 10 entspricht Enterobactin. .... 110
- Abbildung 3-97: Darstellung eines ITC-Experimentes. GST-YgiW wurde mit 0,1 mM eingesetzt, DHB mit 1 mM bei einer Versuchstemperatur von 15°C. .... 112
- Abbildung 3-98: Darstellung eines ITC-Experimentes. GST-YgiW wurde mit 0,4 mM eingesetzt, DHB mit 4 mM bei einer Versuchstemperatur von 15°C. .... 112
- Abbildung 3-99: Biofilm-Assay Ergebnisse verschiedener *E. coli* Stämme [81, 81  $\Delta$ ygiW, 82, 82  $\Delta$ ygiW, 5863, 5737, 5741, 5684, 5685]. Die Zellen wurden in M63 mit Glycerol (pH 7,6) angezogen mit und ohne den Zusatz von 50  $\mu$ M Noradrenalin (NE). Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C erfolgte die Anfärbung der Zellen des Biofilms mit Kristallviolett. Der gebundene Farbstoff wurde in Ethanol gelöst und die Absorption der Lösung bei 540 nm bestimmt. Der signifikante Unterschied (\*) ist  $0,05 \geq p > 0,01$  (n = 3). 113
- Abbildung 3-100: Biofilm-Assay Ergebnisse verschiedener *E. coli* Stämme [81, 81  $\Delta$ ygiW, 82, 82  $\Delta$ ygiW, 5863, 5737, 5741, 5684, 5685]. Die Zellen wurden in M63 mit Glycerol (pH 7,6) angezogen mit und ohne den Zusatz von 50  $\mu$ M Noradrenalin (NE). Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C erfolgte die Anfärbung der Zellen des Biofilms mit Kristallviolett. Der gebundene Farbstoff wurde in Ethanol gelöst und die

Absorption der Lösung bei 540 nm bestimmt. Der signifikante Unterschied (*) ist $0,05 \geq p > 0,01$ ( $n = 3$ ).....	114
Abbildung 3-101: Vergleich der durchschnittlichen Größe der Wachstumshöfe verschiedener <i>E. coli</i> Stämme mit und ohne Noradrenalin nach 24 Stunden aerober Inkubation auf Schwärmagar in mm [81, 81 <i>AygiW</i> , 82, 82 <i>AygiW</i> , 5863, 5737, 5741, 5814, 5916, 5684, 5685]. Der Zusatz von NE vergrößerte die Wachstumshöfe meist. Der signifikante Unterschied (*) ist $0,05 \geq p > 0,01$ ( $n = 2-5$ ).....	116
Abbildung 3-102: Motilitäts-Assay auf Soft-Agar von K-12 BW25113 <i>AygiW</i> [5737], links ohne Noradrenalin, rechts mit Noradrenalinzusatz zum Medium (50 $\mu$ M), aufgenommen nach 24-stündiger aerober Inkubation bei 37°C. Mit Noradrenalin ergab sich in diesem Beispiel eine Vergrößerung des Wachstumshofes um 10 %.	116
Abbildung 3-103: Vergleich der durchschnittlichen Größe der Wachstumshöfe verschiedener <i>E. coli</i> Stämme mit und ohne Adrenalin nach 24 Stunden aerober Inkubation auf Schwärmagar in mm [81, 81 <i>AygiW</i> , 82, 82 <i>AygiW</i> , 5741, 5814]. Der Zusatz von Epi vergrößerte die Wachstumshöfe meist. ....	117
Abbildung 3-104: Vergleich der durchschnittlichen Größe der Wachstumshöfe verschiedener <i>E. coli</i> Stämme mit und ohne Noradrenalin nach vorangegangener anaerober Inkubation nach 24 Stunden aerober Inkubation auf Schwärmagar in mm [81, 81 <i>AygiW</i> , 82, 82 <i>AygiW</i> , 5863, 5737, 5741, 5916, 5684, 5685]. Es ließ sich unter diesen Bedingungen kein eindeutiger Effekt von NE nachvollziehen.....	117
Abbildung 3-105: Vergleich der durchschnittlichen Größe der Wachstumshöfe verschiedener <i>E. coli</i> Stämme mit und ohne Noradrenalin nach 24 Stunden anaerober Inkubation auf Schwärmagar in mm ( $n = 2$ ) [81, 81 <i>AygiW</i> , 82, 82 <i>AygiW</i> , 5863, 5737, 5741, 5916, 5684, 5685]. Der Zusatz von NE vergrößerte die Wachstumshöfe meist. ....	118
Abbildung 3-106: $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der <i>IroN-LacZ</i> -Fusion sowie Daten der optischen Dichte von <i>E. coli</i> K-12 MC4100 [5831] und MG1655 [5757]. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 $\mu$ M Desferal <sup>®</sup> . Die Werte sind angegeben in <i>Miller Units</i> und entsprechen der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bzw. in OD <sub>578nm</sub> -Messwerten und stellen die Absorption dar. Die Messung der Daten erfolgte in zwei voneinander unabhängigen Versuchen.	119
Abbildung 3-107: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-106. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen beiden Messreihen ist hoch signifikant ( $p \leq 0,001$ ).....	119
Abbildung 3-108: $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der <i>IroN-LacZ</i> -Fusion in <i>E. coli</i> K-12 [5936], einer <i>ArelA</i> - [5937] und einer <i>ArelA ΔspoT</i> -Doppelmutante [5938]. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 $\mu$ M Desferal <sup>®</sup> . Zu Grunde liegender Stamm war MG1655 (Cashel). Die Werte sind angegeben in <i>Miller Units</i> und entsprechen der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. ....	120
Abbildung 3-109: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-108. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen <i>ArelA ΔspoT piroN-lacZ</i> und den weiteren Messreihen ist hoch signifikant ( $p \leq 0,001$ ). ....	120
Abbildung 3-110: Wachstumsverlauf während der $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung. Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in NB-Medium + 50 $\mu$ M Desferal <sup>®</sup> . Zu Grunde liegender Stamm war MG1655 (Cashel). Die Werte geben die optische Dichte bei 578 nm wieder. ....	121
Abbildung 3-111: Statistische Analyse der Datensätze aus Abbildung 3-110. Die Datensätze sind laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt und wurden deshalb mit einem t-Test auf eine potentielle Student-t-Verteilung getestet. Der Unterschied zwischen den Messreihen sind nicht signifikant. ....	121
Abbildung 4-1: Schematische Darstellung der Regulation durch QseBC und YgiW unter Eisenmangelbedingungen (Enterobactin: Hider & Kong, 2010; YgiW: Bearbeitet mit PyMOL von Prof. Dr. Hantke (Lehmann C. <i>et al.</i> , 2004))......	138

### 6.1.3 Tabellen

Tabelle 1: Darstellung der Signifikanzdefinitionen und -niveaus.....	50
Tabelle 2: Darstellung des Protein- und Enterobactingehaltes der YgiW-Eluate sowie deren Verhältnis zueinander ( $n = 10$ ). ....	111
Tabelle 3: Durchschnittliche Größe der Wachstumshöfe nach 24 Stunden Inkubation auf Schwärmagar in Millimetern mit entsprechenden Angaben zur Standardabweichung (SD). Die untersuchten Stämme und ihre Eigenschaften sind links dargestellt, die vier Experimente mit ihren Versuchsbedingungen sind oberhalb aufgeführt: aerobe Kontrolle und SD, aerob mit Zusatz von Noradrenalin (NE) (50 $\mu$ M) und SD ( $n = 2-5$ ); aerobe Kontrolle, aerob mit Zusatz von Adrenalin (Epi) (50 $\mu$ M) ( $n = 1$ ); Kontrolle nach anaerobem Schock,	

nach anaerobem Schock mit Zusatz von Noradrenalin (50 µM) (n = 1); anaerobe Kontrolle und SD, anaerob mit Zusatz von Noradrenalin (50 µM) und SD (n = 2).....	115
Tabelle 4: Übersicht über die Anzahl der produzierten Siderophore und der aus Genomsequenzen vorhergesagten von TonB abhängigen Siderophorrezeptoren in <i>E. coli</i> Stämmen.....	130

### 6.2 Publikationen

- 2011 SCHMIEDERER T, RAUSCH S, VALDEBENITO M, MANTRI Y, MÖSKER E, BARAMOV T, STELMASZYK K, SCHMIEDER P, BUTZ D, MÜLLER SI, SCHNEIDER K, BAIK MH, HANTKE K, SÜSSMUTH RD: The *E. coli* Siderophores Enterobactin and Salmochelin Form Six-Coordinate Silicon Complexes at Physiological pH. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2011 Apr 6. (Schmiederer *et al.*, 2011)
- 2009 MÜLLER SI, VALDEBENITO M, HANTKE K: Salmochelin, the long-overlooked catecholate siderophore of *Salmonella*. *Biometals.* 2009 Feb 13. (Müller *et al.*, 2009)
- 2008 MÜLLER SI: Special Conditions Allow Binding of the Siderophore Salmochelin to Siderocalin (NGAL-Lipocalin). BLUM-OEHLER G (HRSG.), DOBRINDT U (HRSG.), HACKER J (HRSG.), TER MEULEN V (HRSG.): *Escherichia coli* - Facets of a Versatile Pathogen. On the Occasion of the 150th Birthday of Theodor Escherich (1857 - 1911) Leopoldina Symposium. *Nova Acta Leopoldina N.F. Band 98, Nummer 359* ISBN 978-3-8047-2519-5. 2008:169-172. (Müller, 2008)



2007

VALDEBENITO M, MÜLLER SI, HANTKE K:

Special conditions allow binding of the siderophore salmochelin to siderocalin (NGAL-lipocalin). *FEMS Microbiol Lett.* 2007 Dec;277(2):182-7. (Valdebenito *et al.*, 2007)

## 6.3 Literatur

- Abergel, R.J., Clifton, M.C., Pizarro, J.C., Warner, J.A., Shuh, D.K., Strong, R.K. & Raymond, K.N. (2008) The siderocalin/enterobactin interaction: a link between mammalian immunity and bacterial iron transport. *J Am Chem Soc* 130(34), 11524-34.
- Abergel, R.J., Moore, E.G., Strong, R.K. & Raymond, K.N. (2006a) Microbial evasion of the immune system: structural modifications of enterobactin impair siderocalin recognition. *J Am Chem Soc* 128(34), 10998-9.
- Abergel, R.J., Wilson, M.K., Arceneaux, J.E., Hoette, T.M., Strong, R.K., Byers, B.R. & Raymond, K.N. (2006b) Anthrax pathogen evades the mammalian immune system through stealth siderophore production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(49), 18499-503.
- Ames, G.F., Spudich, E.N. & Nikaido, H. (1974) Protein composition of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*: effect of lipopolysaccharide mutations. *J Bacteriol* 117(2), 406-16.
- Archibald, F.S. & Duong, M.N. (1984) Manganese acquisition by *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol* 158(1), 1-8.
- Arnow, L.E. (1937) Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalaninetyrosine mixtures. *The Journal of Biological Chemistry*, 531-7.
- Axelsson, L., Bergenfeldt, M. & Ohlsson, K. (1995) Studies of the release and turnover of a human neutrophil lipocalin. *Scand J Clin Lab Invest* 55(7), 577-88.
- Baars, L., Ytterberg, A.J., Drew, D., Wagner, S., Thilo, C., van Wijk, K.J. & de Gier, J.W. (2006) Defining the role of the *Escherichia coli* chaperone SecB using comparative proteomics. *J Biol Chem* 281(15), 10024-34.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L. & Mori, H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* 2, 2006 0008.
- Bachman, M.A., Miller, V.L. & Weiser, J.N. (2009) Mucosal lipocalin 2 has pro-inflammatory and iron-sequestering effects in response to bacterial enterobactin. *PLoS Pathog* 5(10), e1000622.
- Bachmann, B.J. (1972) Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol Rev* 36(4), 525-57.
- Bachmann, B.J. (1996) Derivations and genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12. In *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, pp. 2460–2488. Edited by R.C. F. C.

Neidhardt, J.L.I. III, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, & M.S. M. Riley, and H. E. Umbarger. Washington: ASM Press.

Bassford, P.J., Jr., Bradbeer, C., Kadner, R.J. & Schnaitman, C.A. (1976) Transport of vitamin B12 in tonB mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 128(1), 242-7.

Bassford, P.J., Jr., Schnaitman, C.A. & Kadner, R.J. (1977) Functional stability of the bfe and tonB gene products in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 130(2), 750-8.

Bearson, B.L. & Bearson, S.M. (2008) The role of the QseC quorum-sensing sensor kinase in colonization and norepinephrine-enhanced motility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microb Pathog* 44(4), 271-8.

Bearson, B.L., Bearson, S.M., Lee, I.S. & Brunelle, B.W. (2010) The *Salmonella enterica* serovar Typhimurium QseB response regulator negatively regulates bacterial motility and swine colonization in the absence of the QseC sensor kinase. *Microb Pathog* 48(6), 214-9.

Bister, B., Bischoff, D., Nicholson, G.J., Valdebenito, M., Schneider, K., Winkelmann, G., Hantke, K. & Süssmuth, R.D. (2004) The structure of salmochelins: C-glucosylated enterobactins of *Salmonella enterica*. *Biometals* 17(4), 471-81.

Blattner, F.R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B. & Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277(5331), 1453-62.

Bobrov, A.G., Geoffroy, V.A. & Perry, R.D. (2002) Yersiniabactin production requires the thioesterase domain of HMWP2 and YbtD, a putative phosphopantetheinylate transferase. *Infect Immun* 70(8), 4204-14.

Boland, C.A. & Meijer, W.G. (2000) The iron dependent regulatory protein IdeR (DtxR) of *Rhodococcus equi*. *FEMS Microbiol Lett* 191(1), 1-5.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.

Braeken, K., Moris, M., Daniels, R., Vanderleyden, J. & Michiels, J. (2006) New horizons for (p)ppGpp in bacterial and plant physiology. *Trends Microbiol* 14(1), 45-54.

Braun, V. (1991) Eisen als Virulenzregulator. *Nova acta Leopoldina* NF 66(Nr. 279), 105-117.

Braun, V. (1995) Energy-coupled transport and signal transduction through the gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS Microbiol Rev* 16(4), 295-307.

Braun, V. (2001) Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria. *Int J Med Microbiol* 291(2), 67-79.

Braun, V., Hantke, K. (2007) Acquisition of Iron by Bacteria. In *Molecular Microbiology of Heavy Metals*, Vol. Volume 6/2007, pp. 189-219. Edited by S.S. Nies D. H. Berlin / Heidelberg: Springer-Verlag.

- Braun, V. & Herrmann, C. (1993) Evolutionary relationship of uptake systems for biopolymers in *Escherichia coli*: cross-complementation between the TonB-ExbB-ExbD and the TolA-TolQ-TolR proteins. *Mol Microbiol* 8(2), 261-8.
- Breustedt, D.A., Chatwell, L. & Skerra, A. (2009) A new crystal form of human tear lipocalin reveals high flexibility in the loop region and induced fit in the ligand cavity. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 65(Pt 10), 1118-25.
- Brickman, T.J. & McIntosh, M.A. (1992) Overexpression and purification of ferric enterobactin esterase from *Escherichia coli*. Demonstration of enzymatic hydrolysis of enterobactin and its iron complex. *J Biol Chem* 267(17), 12350-5.
- Bundgaard, J.R., Sengeløv, H., Borregaard, N. & Kjeldsen, L. (1994) Molecular cloning and expression of a cDNA encoding NGAL: a lipocalin expressed in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 202(3), 1468-75.
- Buss, K., Müller, R., Dahm, C., Gaitatzis, N., Skrzypczak-Pietraszek, E., Lohmann, S., Gassen, M. & Leister, E. (2001) Clustering of isochorismate synthase genes *menF* and *entC* and channeling of isochorismate in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1522(3), 151-7.
- Cadieux, N. & Kadner, R.J. (1999) Site-directed disulfide bonding reveals an interaction site between energy-coupling protein TonB and BtuB, the outer membrane cobalamin transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(19), 10673-8.
- Cancedda, F.D., Malpeli, M., Gentili, C., Di Marzo, V., Bet, P., Carlevaro, M., Cermelli, S. & Cancedda, R. (1996) The developmentally regulated avian Ch21 lipocalin is an extracellular fatty acid-binding protein. *J Biol Chem* 271(33), 20163-9.
- Carniel, E. (2001) The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island. *Microbes Infect* 3(7), 561-9.
- Casadaban, M.J. (1976) Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J Mol Biol* 104(3), 541-55.
- Cashel, M., Gentry, D.M., Hernandez, V.J., and Vinella, D. (1996) The stringent response. In *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, Vol. 1, pp. 1458-1496. Edited by R.C. F. C. Neidhardt, J.L.I. III, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, & M.S. M. Riley, and H. E. Umbarger. Washington D.C.: ASM Press.
- Chang, C., Mooser, A., Plückthun, A. & Wlodawer, A. (2001) Crystal structure of the dimeric C-terminal domain of TonB reveals a novel fold. *J Biol Chem* 276(29), 27535-40.
- Chimento, D.P., Kadner, R.J. & Wiener, M.C. (2003) The *Escherichia coli* outer membrane cobalamin transporter BtuB: structural analysis of calcium and substrate binding, and identification of orthologous transporters by sequence/structure conservation. *J Mol Biol* 332(5), 999-1014.
- Chipperfield, J.R. & Ratledge, C. (2000) Salicylic acid is not a bacterial siderophore: a theoretical study. *Biomaterials* 13(2), 165-8.
- Clarke, M.B., Hughes, D.T., Zhu, C., Boedeker, E.C. & Sperandio, V. (2006) The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(27), 10420-5.
- Collins, R.N. (2004) Separation of low-molecular mass organic acid-metal complexes by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1059(1-2), 1-12.

- Costerton, J.W., Stewart, P.S. & Greenberg, E.P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284(5418), 1318-22.
- Cowland, J.B., Sørensen, O.E., Sehested, M. & Borregaard, N. (2003) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is up-regulated in human epithelial cells by IL-1 beta, but not by TNF-alpha. *J Immunol* 171(12), 6630-9.
- Crosa, J.H. & Walsh, C.T. (2002) Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 66(2), 223-49.
- Crouch, M.L., Castor, M., Karlinsey, J.E., Kalthorn, T. & Fang, F.C. (2008) Biosynthesis and IroC-dependent export of the siderophore salmochelin are essential for virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* 67(5), 971-83.
- Datsenko, K.A. & Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(12), 6640-5.
- Doneanu, C.E., Strong, R.K. & Howald, W.N. (2004) Characterization of a noncovalent lipocalin complex by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *J Biomol Tech* 15(3), 208-12.
- Dowd, S.E. (2007) *Escherichia coli* O157:H7 gene expression in the presence of catecholamine norepinephrine. *FEMS Microbiol Lett* 273(2), 214-23.
- Drechsel, H., Stephan, H., Lotz, R., Haag, H., Zähner, H., Hantke, K., Jung, G. (1995) Structure elucidation of yersiniabactin, a siderophore from highly virulent *Yersinia* strains. *Liebigs Annalen* 1995(10), 1727-1733.
- Earhart C.F. (1996) Uptake and Metabolism of Iron and Molybdenum. In *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, Vol. 2nd ed. , pp. 1075-1090. Edited by R.C.I. F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.). Washington, DC: ASM Press.
- Elkins, M.F. & Earhart, C.F. (1989) Nucleotide sequence and regulation of the *Escherichia coli* gene for ferrienterobactin transport protein FepB. *J Bacteriol* 171(10), 5443-51.
- Fecker, L. & Braun, V. (1983) Cloning and expression of the *fhu* genes involved in iron(III)-hydroxamate uptake by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 156(3), 1301-14.
- Ferenci, T., Zhou, Z., Betteridge, T., Ren, Y., Liu, Y., Feng, L., Reeves, P.R. & Wang, L. (2009) Genomic sequencing reveals regulatory mutations and recombinational events in the widely used MC4100 lineage of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 191(12), 4025-9.
- Fiedler, H.P., Krastel, P., Müller, J., Gebhardt, K. & Zeeck, A. (2001) Enterobactin: the characteristic catecholate siderophore of Enterobacteriaceae is produced by *Streptomyces* species.(1). *FEMS Microbiol Lett* 196(2), 147-51.
- Fischbach, M.A., Lin, H., Liu, D.R. & Walsh, C.T. (2005) In vitro characterization of IroB, a pathogen-associated C-glycosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(3), 571-6.
- Fischbach, M.A., Lin, H., Zhou, L., Yu, Y., Abergel, R.J., Liu, D.R., Raymond, K.N., Wanner, B.L., Strong, R.K., Walsh, C.T., Aderem, A. & Smith, K.D. (2006) The pathogen-associated *iroA* gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(44), 16502-7.

- Flo, T.H., Smith, K.D., Sato, S., Rodriguez, D.J., Holmes, M.A., Strong, R.K., Akira, S. & Aderem, A. (2004) Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 432(7019), 917-21.
- Furness, J.B. (2000) Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* 81(1-3), 87-96.
- Gehring, A.M., Mori, I. & Walsh, C.T. (1998) Reconstitution and characterization of the Escherichia coli enterobactin synthetase from EntB, EntE, and EntF. *Biochemistry* 37(8), 2648-59.
- Ginalski, K., Kinch, L., Rychlewski, L. & Grishin, N.V. (2004) BOF: a novel family of bacterial OB-fold proteins. *FEBS Lett* 567(2-3), 297-301.
- Givens, R.M., Lin, M.H., Taylor, D.J., Mechold, U., Berry, J.O. & Hernandez, V.J. (2004) Inducible expression, enzymatic activity, and origin of higher plant homologues of bacterial RelA/SpoT stress proteins in Nicotiana tabacum. *J Biol Chem* 279(9), 7495-504.
- Goetz, D.H., Holmes, M.A., Borregaard, N., Bluhm, M.E., Raymond, K.N. & Strong, R.K. (2002) The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell* 10(5), 1033-43.
- González Barrios, A.F., Zuo, R., Hashimoto, Y., Yang, L., Bentley, W.E. & Wood, T.K. (2006) Autoinducer 2 controls biofilm formation in Escherichia coli through a novel motility quorum-sensing regulator (MqsR, B3022). *J Bacteriol* 188(1), 305-16.
- Greenwood, K.T. & Luke, R.K. (1978) Enzymatic hydrolysis of enterochelin and its iron complex in Escherichia Coli K-12. Properties of enterochelin esterase. *Biochim Biophys Acta* 525(1), 209-18.
- Grozdanov, L., Raasch, C., Schulze, J., Sonnenborn, U., Gottschalk, G., Hacker, J. & Dobrindt, U. (2004) Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917. *J Bacteriol* 186(16), 5432-41.
- Guterman, S.K. (1973) Colicin B: mode of action and inhibition by enterochelin. *J Bacteriol* 114(3), 1217-24.
- Guyer, M.S., Reed, R.R., Steitz, J.A. & Low, K.B. (1981) Identification of a sex-factor-affinity site in E. coli as gamma delta. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 45 Pt 1, 135-40.
- Haag, H., Hantke, K., Drechsel, H., Stojiljkovic, I., Jung, G. & Zähler, H. (1993) Purification of yersinia-bactin: a siderophore and possible virulence factor of Yersinia enterocolitica. *J Gen Microbiol* 139(9), 2159-65.
- Hadjifrangiskou, M., Kostakioti, M., Chen, S.L., Henderson, J.P., Greene, S.E. & Hultgren, S.J. (2011) A central metabolic circuit controlled by QseC in pathogenic Escherichia coli. *Mol Microbiol* 80(6), 1516-29.
- Hakenbeck, R. & Stock, J.B. (1996) Analysis of two-component signal transduction systems involved in transcriptional regulation. *Methods Enzymol* 273, 281-300.
- Hanahan, D. (1985) A Practical Approach. In *DNA Cloning*, Vol. 1, p. 109. Edited by D.M. Glover. Virginia: RL Press.

- Hancock, V., Vejborg, R.M. & Klemm, P. (2010) Functional genomics of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 and 83972, and UPEC strain CFT073: comparison of transcriptomes, growth and biofilm formation. *Mol Genet Genomics* 284(6), 437-54.
- Hantke, K. (2001) Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 4(2), 172-7.
- Hantke, K. & Braun, V. (1978) Functional interaction of the tonA/tonB receptor system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 135(1), 190-7.
- Hantke, K., Nicholson, G., Rabsch, W. & Winkelmann, G. (2003) Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(7), 3677-82.
- Harris, B.Z., Kaiser, D. & Singer, M. (1998) The guanosine nucleotide (p)ppGpp initiates development and A-factor production in *myxococcus xanthus*. *Genes Dev* 12(7), 1022-35.
- Harris W. R., Carrano C. J., Cooper S. R., Sofen S. R., Avdeef A. E., McArdle J. V. & N., R.K. (1979) Coordination chemistry of microbial iron transport compounds. 19. Stability constants and electrochemical behavior of ferric enterobactin and model complexes. *Journal of the American Chemical Society* 101 (20), 6097-6104.
- Heesemann, J., Hantke, K., Vocke, T., Saken, E., Rakin, A., Stojiljkovic, I. & Berner, R. (1993) Virulence of *Yersinia enterocolitica* is closely associated with siderophore production, expression of an iron-repressible outer membrane polypeptide of 65,000 Da and pesticin sensitivity. *Mol Microbiol* 8(2), 397-408.
- Heller, K. & Kadner, R.J. (1985) Nucleotide sequence of the gene for the vitamin B12 receptor protein in the outer membrane of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 161(3), 904-8.
- Hider, R.C. & Kong, X. (2010) Chemistry and biology of siderophores. *Nat Prod Rep* 27(5), 637-57.
- Holmes, M.A., Paulsene, W., Jide, X., Ratledge, C. & Strong, R.K. (2005) Siderocalin (Lcn 2) also binds carboxymycobactins, potentially defending against mycobacterial infections through iron sequestration. *Structure* 13(1), 29-41.
- Hvidberg, V., Jacobsen, C., Strong, R.K., Cowland, J.B., Moestrup, S.K. & Borregaard, N. (2005) The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. *FEBS Lett* 579(3), 773-7.
- Kadner, R.J. (1990) Vitamin B12 transport in *Escherichia coli*: energy coupling between membranes. *Mol Microbiol* 4(12), 2027-33.
- Khajanchi, B.K., Kozlova, E.V., Sha, J., Popov, V.L. & Chopra, A.K. (2012) The two-component QseBC signalling system regulates in vitro and in vivo virulence of *Aeromonas hydrophila*. *Microbiology* 158(Pt 1), 259-71.
- Kjeldsen, L., Cowland, J.B. & Borregaard, N. (2000) Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse. *Biochim Biophys Acta* 1482(1-2), 272-83.
- Kjeldsen, L., Johnsen, A.H., Sengeløv, H. & Borregaard, N. (1993) Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* 268(14), 10425-32.

- Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., Pinkner, J.S. & Hultgren, S.J. (2009) QseC-mediated dephosphorylation of QseB is required for expression of genes associated with virulence in uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 73(6), 1020-31.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259), 680-5.
- Laffler, T. & Gallant, J.A. (1974) Stringent control of protein synthesis in *E. coli*. *Cell* 3(1), 47-9.
- Larsen, R.A., Letain, T.E. & Postle, K. (2003) In vivo evidence of TonB shuttling between the cytoplasmic and outer membrane in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 49(1), 211-8.
- Lazdunski, C.J., Bouveret, E., Rigal, A., Journet, L., Llobès, R. & Bénédicti, H. (1998) Colicin import into *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol* 180(19), 4993-5002.
- Lederberg, J. (1951) Genetic studies with bacteria. In *Genetics in the 20th century*, pp. 263-289. Edited by L. Dunn. New York: Macmillan.
- Lee, J., Hiibel, S.R., Reardon, K.F. & Wood, T.K. (2009) Identification of stress-related proteins in *Escherichia coli* using the pollutant cis-dichloroethylene. *J Appl Microbiol* 108(6), 2088-102.
- Lehmann C., Galkin A., Pullalarevu S., Sarikaya E., Krajewski W., Lim K., Howard A. & O., H. (2004) Structure of the hypothetical protein ygiW from *E. coli*.
- Letain, T.E. & Postle, K. (1997) TonB protein appears to transduce energy by shuttling between the cytoplasmic membrane and the outer membrane in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 24(2), 271-83.
- Lin, H., Fischbach, M.A., Liu, D.R. & Walsh, C.T. (2005) In vitro characterization of salmochelin and enterobactin trilactone hydrolases IroD, IroE, and Fes. *J Am Chem Soc* 127(31), 11075-84.
- Liu, J., Quinn, N., Berchtold, G.A. & Walsh, C.T. (1990) Overexpression, purification, and characterization of isochorismate synthase (EntC), the first enzyme involved in the biosynthesis of enterobactin from chorismate. *Biochemistry* 29(6), 1417-25.
- Liu, Q. & Nilsen-Hamilton, M. (1995) Identification of a new acute phase protein. *J Biol Chem* 270(38), 22565-70.
- Liu, Q.S., Nilsen-Hamilton, M. & Xiong, S.D. (2003) Synergistic regulation of the acute phase protein SIP24/24p3 by glucocorticoid and pro-inflammatory cytokines. *Sheng Li Xue Bao* 55(5), 525-9.
- Lundrigan, M.D. & Kadner, R.J. (1986) Nucleotide sequence of the gene for the ferrienterochelin receptor FepA in *Escherichia coli*. Homology among outer membrane receptors that interact with TonB. *J Biol Chem* 261(23), 10797-801.
- Luria, S.E., Delbrück, M. & Anderson, T.F. (1943) Electron Microscope Studies of Bacterial Viruses. *J Bacteriol* 46(1), 57-77.
- Matsushiro, A. (1963) Specialized transduction of tryptophan markers in *Escherichia coli* K12 by bacteriophage phi-80. *Virology* 19, 475-82.
- Matzanke, B.F., Anemüller, S., Schünemann, V., Trautwein, A.X. & Hantke, K. (2004) FhuF, part of a siderophore-reductase system. *Biochemistry* 43(5), 1386-92.

- Merighi, M., Septer, A.N., Carroll-Portillo, A., Bhatiya, A., Porwollik, S., McClelland, M. & Gunn, J.S. (2009) Genome-wide analysis of the PreA/PreB (QseB/QseC) regulon of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *BMC Microbiol* 9, 42.
- Miller, J. (1972) Laboratory Manuals. In *Experiments in Molecular Genetics*: Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.
- Miller, M.B. & Bassler, B.L. (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 55, 165-99.
- Mittenhuber, G. (2001) Comparative genomics and evolution of genes encoding bacterial (p)ppGpp synthetases/hydrolases (the Rel, RelA and SpoT proteins). *J Mol Microbiol Biotechnol* 3(4), 585-600.
- Moris, M., Braeken, K., Schoeters, E., Verreth, C., Beullens, S., Vanderleyden, J. & Michiels, J. (2005) Effective symbiosis between *Rhizobium etli* and *Phaseolus vulgaris* requires the alarmone ppGpp. *J Bacteriol* 187(15), 5460-9.
- Müller, S.I. (2008) Special Conditions Allow Binding of the Siderophore Salmochelin to Siderocalin (NGAL-Lipocalin). In *Escherichia coli - Facets of a Versatile Pathogen. On the Occasion of the 150th Birthday of Theodor Escherich (1857 - 1911) Leopoldina Symposium* Vol. Nova Acta Leopoldina N.F. Band 98, Nummer 359: BLUM-OEHLER G (HRSG.), DOBRINDT U (HRSG.), HACKER J (HRSG.), TER MEULEN V (HRSG.).
- Müller, S.I., Valdebenito, M. & Hantke, K. (2009) Salmochelin, the long-overlooked catecholate siderophore of *Salmonella*. *Biometals* 22(4), 691-5.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-73.
- Nakagawa, A., Oshima, T. & Mori, H. (2006) Identification and characterization of a second, inducible promoter of *relA* in *Escherichia coli*. *Genes Genet Syst* 81(5), 299-310.
- Nau, C.D. & Konisky, J. (1989) Evolutionary relationship between the TonB-dependent outer membrane transport proteins: nucleotide and amino acid sequences of the *Escherichia coli* colicin I receptor gene. *J Bacteriol* 171(2), 1041-7.
- Nealson, K.H. & Hastings, J.W. (1979) Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol Rev* 43(4), 496-518.
- Nealson, K.H. & Markovitz, A. (1970) Mutant analysis and enzyme subunit complementation in bacterial bioluminescence in *Photobacterium fischeri*. *J Bacteriol* 104(1), 300-12.
- Nealson, K.H., Platt, T. & Hastings, J.W. (1970) Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* 104(1), 313-22.
- O'Brien, I.G. & Gibson, F. (1970) The structure of enterochelin and related 2,3-dihydroxy-N-benzoylserine conjugates from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 215(2), 393-402.
- Otto, B.R., Verweij, W.R., Sparrius, M., Verweij-van Vught, A.M., Nord, C.E. & MacLaren, D.M. (1991) Human immune response to an iron-repressible outer membrane protein of *Bacteroides fragilis*. *Infect Immun* 59(9), 2999-3003.
- Parkinson, J.S. (1993) Signal transduction schemes of bacteria. *Cell* 73(5), 857-71.



- Pawelek, P.D., Croteau, N., Ng-Thow-Hing, C., Khursigara, C.M., Moiseeva, N., Allaire, M. & Coulton, J.W. (2006) Structure of TonB in complex with FhuA, E. coli outer membrane receptor. *Science* 312(5778), 1399-402.
- Peacock, R.S., Andrushchenko, V.V., Demcoe, A.R., Gehmlich, M., Lu, L.S., Herrero, A.G. & Vogel, H.J. (2006) Characterization of TonB interactions with the FepA cork domain and FecA N-terminal signaling domain. *Biometals* 19(2), 127-42.
- Pelludat, C., Rakin, A., Jacobi, C.A., Schubert, S. & Heesemann, J. (1998) The yersiniabactin biosynthetic gene cluster of *Yersinia enterocolitica*: organization and siderophore-dependent regulation. *J Bacteriol* 180(3), 538-46.
- Peters, J.E., Thate, T.E. & Craig, N.L. (2003) Definition of the *Escherichia coli* MC4100 genome by use of a DNA array. *J Bacteriol* 185(6), 2017-21.
- Peterson, G., Kumar, A., Gart, E. & Narayanan, S. (2011) Catecholamines increase conjugative gene transfer between enteric bacteria. *Microb Pathog* 51(1-2), 1-8.
- Pilonieta, M.C., Erickson, K.D., Ernst, R.K. & Detweiler, C.S. (2009) A protein important for antimicrobial peptide resistance, YdeI/OmdA, is in the periplasm and interacts with OmpD/NmpC. *J Bacteriol* 191(23), 7243-52.
- Pittard, J. & Wallace, B.J. (1966) Distribution and function of genes concerned with aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 91(4), 1494-508.
- Pollack, J.R. & Neilands, J.B. (1970) Enterobactin, an iron transport compound from *Salmonella typhimurium*. *Biochem Biophys Res Commun* 38(5), 989-92.
- Porter, J.B. (2007) Concepts and goals in the management of transfusional iron overload. *Am J Hematol* 82(12 Suppl), 1136-9.
- Posey, J.E. & Gherardini, F.C. (2000) Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science* 288(5471), 1651-3.
- Postle, K. (1993) TonB protein and energy transduction between membranes. *J Bioenerg Biomembr* 25(6), 591-601.
- Postle, K. & Kadner, R.J. (2003) Touch and go: tying TonB to transport. *Mol Microbiol* 49(4), 869-82.
- Pressler, U., Staudenmaier, H., Zimmermann, L. & Braun, V. (1988) Genetics of the iron dicitrate transport system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 170(6), 2716-24.
- Purves, T., Middlemas, A., Agthong, S., Jude, E.B., Boulton, A.J., Fernyhough, P. & Tomlinson, D.R. (2001) A role for mitogen-activated protein kinases in the etiology of diabetic neuropathy. *FASEB J* 15(13), 2508-14.
- Rahme, L.G., Stevens, E.J., Wolfort, S.F., Shao, J., Tompkins, R.G. & Ausubel, F.M. (1995) Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268(5219), 1899-902.
- Rasko, D.A., Moreira, C.G., Li de, R., Reading, N.C., Ritchie, J.M., Waldor, M.K., Williams, N., Taussig, R., Wei, S., Roth, M., Hughes, D.T., Huntley, J.F., Fina, M.W., Falck, J.R. & Sperandio, V. (2008) Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development. *Science* 321(5892), 1078-80.

- Ratledge, C. (2007) Iron metabolism and infection. *Food Nutr Bull* 28(4 Suppl), 515-23.
- Ratledge, C. & Dover, L.G. (2000) Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* 54, 881-941.
- Raymond, K.N., Dertz, E.A. & Kim, S.S. (2003) Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(7), 3584-8.
- Reading, N.C. & Sperandio, V. (2006) Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 254(1), 1-11.
- Russo, T.A., McFadden, C.D., Carlino-MacDonald, U.B., Beanan, J.M., Barnard, T.J. & Johnson, J.R. (2002) IroN functions as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 70(12), 7156-60.
- Sauer, M., Hantke, K. & Braun, V. (1987) Ferric-coprogen receptor FhuE of *Escherichia coli*: processing and sequence common to all TonB-dependent outer membrane receptor proteins. *J Bacteriol* 169(5), 2044-9.
- Schmiederer, T., Rausch, S., Valdebenito, M., Mantri, Y., Mösker, E., Baramov, T., Stelmaszyk, K., Schmieder, P., Butz, D., Müller, S.I., Schneider, K., Baik, M.H., Hantke, K. & Süßmuth, R.D. (2011) The *E. coli* Siderophores Enterobactin and Salmochelin Form Six-Coordinate Silicon Complexes at Physiological pH. *Angew Chem Int Ed Engl* 50(18), 4230-3.
- Sevéus, L., Amin, K., Peterson, C.G., Roomans, G.M. & Venge, P. (1997) Human neutrophil lipocalin (HNL) is a specific granule constituent of the neutrophil granulocyte. Studies in bronchial and lung parenchymal tissue and peripheral blood cells. *Histochem Cell Biol* 107(5), 423-32.
- Shen, F., Hu, Z., Goswami, J. & Gaffen, S.L. (2006) Identification of common transcriptional regulatory elements in interleukin-17 target genes. *J Biol Chem* 281(34), 24138-48.
- Shultis, D.D., Purdy, M.D., Banchs, C.N. & Wiener, M.C. (2006) Outer membrane active transport: structure of the BtuB:TonB complex. *Science* 312(5778), 1396-9.
- Siener, R., Jahnen, A. & Hesse, A. (2004) Influence of a mineral water rich in calcium, magnesium and bicarbonate on urine composition and the risk of calcium oxalate crystallization. *Eur J Clin Nutr* 58(2), 270-6.
- Simons, R.W., Houtman, F. & Kleckner, N. (1987) Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* 53(1), 85-96.
- Sorsa, L.J., Dufke, S., Heesemann, J. & Schubert, S. (2003) Characterization of an iroBCDEN gene cluster on a transmissible plasmid of uropathogenic *Escherichia coli*: evidence for horizontal transfer of a chromosomal virulence factor. *Infect Immun* 71(6), 3285-93.
- Sperandio, V., Torres, A.G., Jarvis, B., Nataro, J.P. & Kaper, J.B. (2003) Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(15), 8951-6.
- Sperandio, V., Torres, A.G. & Kaper, J.B. (2002) Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. *Mol Microbiol* 43(3), 809-21.

- Spira, B., Hu, X. & Ferenci, T. (2008) Strain variation in ppGpp concentration and RpoS levels in laboratory strains of *Escherichia coli* K-12. *Microbiology* 154(Pt 9), 2887-95.
- Sprencel, C., Cao, Z., Qi, Z., Scott, D.C., Montague, M.A., Ivanoff, N., Xu, J., Raymond, K.M., Newton, S.M. & Klebba, P.E. (2000) Binding of ferric enterobactin by the *Escherichia coli* periplasmic protein FepB. *J Bacteriol* 182(19), 5359-64.
- Stamminger, G. & Lazzarini, R.A. (1974) Analysis of the RNA of defective VSV particles. *Cell* 3(1), 85-93.
- Strong, R.K. (2006) Siderocalins. In *Lipocalins*, pp. 83-98. Edited by B. Akerstrom, Borregaard, N., Flower, D. & Salier, J.-P. Georgetown Landes Bioscience.
- Studier, F.W. & Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189(1), 113-30.
- Sunil, V.R., Patel, K.J., Nilsen-Hamilton, M., Heck, D.E., Laskin, J.D. & Laskin, D.L. (2007) Acute endotoxemia is associated with upregulation of lipocalin 24p3/Lcn2 in lung and liver. *Exp Mol Pathol* 83(2), 177-87.
- Tabor, S. & Richardson, C.C. (1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(4), 1074-8.
- Tan, M.W., Rahme, L.G., Sternberg, J.A., Tompkins, R.G. & Ausubel, F.M. (1999) *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(5), 2408-13.
- Valdebenito, M., Crumbliss, A.L., Winkelmann, G. & Hantke, K. (2006) Environmental factors influence the production of enterobactin, salmochelin, aerobactin, and yersiniabactin in *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Int J Med Microbiol* 296(8), 513-20.
- Valdebenito, M., Müller, S.I. & Hantke, K. (2007) Special conditions allow binding of the siderophore salmochelin to siderocalin (NGAL-lipocalin). *FEMS Microbiol Lett* 277(2), 182-7.
- van Delden, C., Comte, R. & Bally, A.M. (2001) Stringent response activates quorum sensing and modulates cell density-dependent gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 183(18), 5376-84.
- van der Biezen, E.A., Sun, J., Coleman, M.J., Bibb, M.J. & Jones, J.D. (2000) *Arabidopsis* RelA/SpoT homologs implicate (p)ppGpp in plant signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7), 3747-52.
- Vinella, D., Albrecht, C., Cashel, M. & D'Ari, R. (2005) Iron limitation induces SpoT-dependent accumulation of ppGpp in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 56(4), 958-70.
- Wandersman, C. & Delepelaire, P. (2004) Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol* 58, 611-47.
- Wawzkiewicz, E.J. & Schneider, H.A. (1975) Control of salmonellosis pacifarin biosynthesis by iron. *Infect Immun* 11(1), 69-72.
- Wayne, R., Frick, K. & Neilands, J.B. (1976) Siderophore protection against colicins M, B, V, and Ia in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 126(1), 7-12.

- Wooldridge, K.G. & Williams, P.H. (1993) Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 12(4), 325-48.
- Yang, J., Mori, K., Li, J.Y. & Barasch, J. (2003) Iron, lipocalin, and kidney epithelia. *Am J Physiol Renal Physiol* 285(1), F9-18.
- Zhang, H.B., Wang, C. & Zhang, L.H. (2004) The quorumone degradation system of *Agrobacterium tumefaciens* is regulated by starvation signal and stress alarmone (p)ppGpp. *Mol Microbiol* 52(5), 1389-401.
- Zhu, M. (2005) Salmochelin, a new siderophore of *E. coli*: biosynthesis, transport and utilization. In *Microbiology Tübingen: Eberhard Karls Universität Tübingen*.
- Zhu, M., Valdebenito, M., Winkelmann, G. & Hantke, K. (2005) Functions of the siderophore esterases IroD and IroE in iron-salmochelin utilization. *Microbiology* 151(Pt 7), 2363-72.