

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. H. Wagner, Ph.D. (Melbourne))

Modulation immunogener Oberflächenmoleküle
in kommensalen Mikroorganismen
durch sequenzspezifische Rekombinasen

Katja Gabriele Weinacht

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. H. Wagner, Ph.D. (Melbourne)
2. Univ.-Prof. Dr. V. Erfle
3. Univ.-Prof. Dr. Th. A. Meitinger

Die Dissertation wurde am 08.07.2003 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 04.02.2004 angenommen.

Die experimentellen Grundlagen der vorliegenden Arbeit entstanden
in der Zeit von Februar bis Oktober 2001
am Channing Laboratory, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School,
unter Anleitung von Laurie Elisabeth Comstock, Ph.D..

Laurie war mir Lehrerin, Vorbild und Freundin zugleich.
Für alle wissenschaftlichen und weltlichen Fragen hatte sie stets ein offenes Ohr.
Ihre Begeisterung für Wissenschaft, um der Wissenschaft willen, ist mitreißend
und steckt jedermann in ihrer Nähe an.
Ihre Brillanz sucht ihresgleichen,
ihre Affinität zu DNA-Sequenzen bleibt unergründlich...

Ihr ist in Dankbarkeit diese Arbeit gewidmet.

Inhalt

1	Einleitung	5
1.1	Von Bakterien und Menschen	5
1.2	<i>Bacteroides fragilis</i> als Modell eines kommensalen Mikroorganismus	9
1.3	<i>Bacteroides fragilis</i> als opportunistischer Pathogen.....	11
1.3.1	Relevanz von <i>Bacteroides fragilis</i> für klinische Infektionen	11
1.3.2	Bedeutung von <i>Bacteroides fragilis</i> Kapselpolysaccharid für die Abszessinduktion.....	11
1.3.3	Genetische Charakteristika der Polysaccharid Biosyntheseloci	12
1.3.4	<i>Bacteroides fragilis</i> Kapselpolysaccharide durchlaufen Phasenvariation.....	13
1.3.5	Phasenvariation durch DNA–Inversion.....	15
1.4	Zielsetzung der Arbeit.....	21
2	Material und Methoden.....	22
2.1	Computergestütztes Arbeiten mit Sequenzen und Datenbanken (BLAST Search)..	22
2.2	Bakterien und Plasmide.....	22
2.3	Medien und häufig verwendete Lösungen	26
2.4	Molekularbiologisches Arbeiten mit DNA	28
2.4.1	MINI-Präparation von chromosomaler DNA	28
2.4.2	MINI-Präparation von Plasmid-DNA	28
2.4.3	MIDI-Präparation von Plasmid-DNA	29
2.4.4	Polymerase Chain Reaction (PCR)	29
2.4.5	Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen.....	30
2.4.6	Agarosegelelektrophorese.....	31
2.4.7	Extraktion gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA	31
2.4.8	Ligation von DNA-Fragmenten	31
2.4.9	Dephosphorylierung von 5'-Enden mit alkalischer Phosphatase	32
2.4.10	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	32
2.4.11	Blau-Weiß-Selektion bei Verwendung von pBluescript	32
2.4.12	Plasmid-Transfer mittels eines konjugativen Helferplasmids	33
2.4.13	Design der Expressionsplasmide.....	34
2.4.14	Herstellung von internen Deletionsmutanten.....	37
2.4.15	Herstellung und Markierung von DNA-Sonden	42

2.4.16	Transfer von DNA auf Membranen (Southern Blot)	42
2.4.17	Hybridisierung von membrangebundener DNA mit ECL-markierten DNA-Sonden.....	43
2.4.18	Primer	44
2.5	Protein Biochemie und immunologische Methoden.....	47
2.5.1	SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese (PAGE) und Western Blot	47
2.5.2	Gewinnung von Antiseren	47
2.5.3	Adsorbtion von Antiseren mit Bakterien.....	48
3	Ergebnisse	49
3.1	Untersuchung der Phasenvariation von <i>B. fragilis</i> Kapselpolysacchariden.....	49
3.1.1	Analyse des <i>Bacteroides fragilis</i> NCTC 9343 Genoms auf Homologe von <i>fimB</i> und <i>fimE</i>	49
3.1.2	Identifikation einer Serin-Rekombinase upstream <i>inv19</i>	57
3.1.3	Herstellung eines Expressionsplasmids zur Simulation der Rekombinaseaktivität der Kandidatengene.....	60
3.1.4	Herstellung einer internen Deletionsmutante in <i>res02</i>	67
3.2	Beschreibung eines phasenvariabel regulierten Fimbrienoperons in <i>B. fragilis</i>	71
3.2.1	Identifikation einer IR-Region downstream von <i>inv15</i>	71
3.2.2	Herstellung einer internen Deletionsmutante in <i>inv15</i>	74
4	Diskussion	81
4.1	Eine Multiple-Promotor-Invertase (MPI) reguliert die Phasenvariation von <i>Bacteroides fragilis</i> Kapselpolysacchariden	82
4.2	Kontrolle der Polysaccharidexpression in <i>Bacteroides fragilis</i> oder wofür ist die Kapsel eigentlich gut?	88
4.3	Phasenvariable Expression von Fimbrien auf der Oberfläche von <i>Bacteroides fragilis</i> NCTC 9343.....	91
4.4	Immunevasion durch Phasenvariation?.....	97
5	Zusammenfassung.....	99
6	Referenzen.....	101
7	Abkürzungen	112
8	Danksagung.....	114

1 Einleitung

1.1 Von Bakterien und Menschen

Vom Augenblick der Geburt bis zu unserem Tod werden wir von einer Vielfalt von Mikroben besiedelt, die in ihrer Anzahl die Zellen unseres eigenen Körpers übertreffen⁷¹. Diese Mikroorganismen stellen eine riesenhafte, dynamische, aus bis zu tausend verschiedenen Spezies bestehende Gesellschaft dar und greifen dabei auf einen Genpool zurück, der einhundertmal größer ist als der des Wirts, der sie beherbergt³². Dennoch ist über die vorherrschenden Vertreter der intestinalen Mikroflora wenig bekannt.

Bakterien haben die Erde seit mehr als 2,5 Milliarden Jahren bevölkert¹³. Als Konsequenz wissen wir, daß sich unsere Vorfahren an eine Biosphäre anpassen mußten, die von Mikroben beherrscht war. Wie es zu einer Koexistenz kam und wie die Koevolution mit den ansässigen Mikroorganismen unser eigenes Genom und damit unsere Physiologie geformt hat, darüber wissen wir nichts. Ein Beispiel: Das menschliche Genom beinhaltet 223 Proteine mit signifikanter Homologie zu bakteriellen, nicht aber zu eukaryotischen Proteinen. Die Vermutung liegt nahe, daß sie durch horizontalen Transfer bakterieller Gene erworben wurden. In welcher Form, und vor allem mit welchen Auswirkungen auf unsere eigene Entwicklung dies geschah, ist unbekannt⁴⁶. Der Nobelpreisträger Joshua Lederberg hat den Begriff „Microbiom“ für das Kollektiv der Genome der menschlichen Mikroflora geprägt und ging soweit zu behaupten, daß eine umfassende genetische Betrachtung der Lebensform *Homo sapiens* überhaupt nur möglich sei, wenn sie die Gene unseres „Microbioms“ mit einschließe³².

Die Interaktion zwischen Bakterien und ihrem Wirt kann als ein Kontinuum mit fließenden Übergängen zwischen Symbiose, Kommensalismus und Pathogenität angesehen werden³². Symbiose bezeichnet eine Beziehung zwischen zwei verschiedenen Spezies, von der wenigstens ein Partner profitiert, ohne den anderen zu schädigen. Sie gründet sich typischerweise auf metabolische Fähigkeiten, die es einem oder beiden Partnern erlauben, eine sonst unbrauchbare oder nicht zur Verfügung stehende Nahrungsquelle für sich nutzbar zu machen^{65, 85}. Der Ausdruck Kommensale kommt vom lateinischen „commensalis“ und bedeutet soviel wie „zusammen bei Tisch“. Er bezieht sich im allgemeinen auf das Zusammen- bzw. Nebeneinanderleben von Partnern, die sich nicht schaden, aber auch keinen

offenkundigen Nutzen füreinander haben. Eine pathogene Beziehung resultiert in der Schädigung des Wirts. Symbiose, Kommensalismus und Pathogenität sind von Steinert *et al.* als mögliche Ausgänge eines dynamischen Wettrüstens beschrieben worden, welches dann beginnt, wenn ein pathogener Keim in einen vulnerablen Wirt eindringt. Bei diesem Wettrüsten wird jede Veränderung einer Seite durch eine reaktive Maßnahme der anderen Seite beantwortet. In manchen Fällen führt dies zu einer Abschwächung der Virulenz des pathogenen Keims und friedlicher Koexistenz mit dem Wirt bis hin zu gegenseitiger Abhängigkeit. Unter anderen Umständen wird die pathogene Beziehung durch die Entwicklung wirkungsvollerer Strategien von Seiten des Bakteriums noch verstärkt, und die angeborene oder erworbene Abwehr des Wirts dadurch unterwandert⁷⁵. Es stellt sich die Frage, in welchem gegenseitigen Toleranz- bzw. Nutzenverhältnis demnach Bakterien und Menschen stehen, das es der menschlichen Mikroflora erlaubt hat, seit Millionen von Jahren in unserem Intestinaltrakt zu persistieren, ohne - im Normalfall - eine Immunreaktion zu provozieren, die uns schädigt oder sie selbst eliminiert?

Um seine Funktion aufrechtzuerhalten, muß der menschliche Intestinaltrakt einerseits ausreichend permeabel sein, so daß eine effiziente Nahrungsaufnahme gewährleistet ist, und andererseits so undurchdringbar sein, daß potentiell schädigende Immunreaktionen auf Nahrungsmittel- und Bakterienantigene vermieden werden. Angeborene oder inerte Abwehrstrategien, wie z.B. die Produktion von Defensinen und Muzinen durch das intestinale Epithel, helfen zu verhindern, daß Bakterien die Schleimhautbarriere durchbrechen^{87, 6, 41}. Zusätzlicher Schutz wird durch sekretorisches Immunglobulin A (sIgA) gewährt. Die Produktion von spezifischem sIgA gegen kommensale Antigene wird selektiv in der intestinalen Mukosa induziert⁵¹. Während die sIgA-Antwort auf Epitope pathogener Keime der Kostimulation antigen-spezifischer T-Zellen bedarf, konnte im Mausmodell gezeigt werden, daß eine Induktion von sIgA gegen kommensale Antigene T-Zell-unabhängig ist. Diese T-Zell-Unabhängigkeit erlaubt es dem Wirt, auf Veränderungen in der Intestinalflora einzugehen, ohne eine schädigende Immunantwort auszulösen, und stellt damit eine mögliche, evolutionär primitive Form adaptativer Immunität dar⁵¹. Neish *et al.* haben gezeigt, daß nicht-pathogene Bakterien das intestinale Epithel sogar direkt beeinflussen können, um einer Aktivierung des Immunsystems entgegenzuwirken. So unterbrachen avirulente *Salmonella*-Stämme die Produktion inflammatorisch wirksamer Zytokine in Gewebekulturen humanen Intestinalepithels, indem sie den Abbau von I- κ B verhinderten⁵⁷. I- κ B blockiert die nukleären

Bindungsstellen von NF- κ B und damit die NF- κ B-vermittelte Aktivierung proinflammatorischer Gene.

Einen Vorgeschmack davon, daß der Einfluß der intestinalen Mikroflora auf unsere Physiologie deutlich weitreichender ist als zunächst angenommen, vermitteln Daten über die Auswirkung der mikrobiellen Besiedlung auf die intestinale Transkription des Wirtes. Hooper *et al.* kolonisierten keimfreie Mäuse mit *Bacteroides thetaiotaomicron*, einem prominenten Vertreter der menschlichen und murinen Intestinalflora. Die nachfolgenden Veränderungen der globalen intestinalen Transkription wurden als Reaktion auf die Besiedlung anhand von DNA-Mikroarrays sichtbar gemacht, und der zelluläre Ursprung einzelner, ausgewählter Veränderungen durch Laser-Capture Mikrodissektion ermittelt³³. Die Ergebnisse demonstrieren, daß kommensale Bakterien die Expression von Genen modulieren, die an fast allen grundlegenden intestinalen Funktionen beteiligt sind. So wurde zum Beispiel durch die kommensale Kolonisierung des Darms die Aufnahme von Nährstoffen und Spurenelementen in den ehemals keimfreien Tieren durch Induktion der Absorptionsmaschinerie gefördert und der Energiebedarf dadurch gesenkt. Gleichzeitig wurde die Angiogenese in den Mikrovilli der Intestinalmukosa durch vermehrte Expression von Angiogenin-3 aktiviert, was seinerseits die Aufnahme und Verteilung von Nährstoffen aus dem Darm begünstigte. Als weitere Reaktion auf die Kolonisation mit *Bacteroides thetaiotaomicron* stiegen in der Ileummukosa der Influx IgA-produzierender B-Zellen und die Expression von polymerem Immunglobulinrezeptor (pIgR), der IgA über das Epithel transportiert, an. Ebenso war eine vermehrte Expression von Genen, die an der Mukusbildung beteiligt sind, nachweisbar. Die Transkription des Decay-Accelerating Factor (DAF), eines epithelialen Inhibitors der Komplement-vermittelten Zytolyse, erhöhte sich auf das sechsfache des Ursprungswerts, die produzierte Menge mRNA des Small Proline-rich Protein-2 (sprr2a), eines Proteins, welches durch Querbrückenbildung zu desmosomalem Desmoplakin die Interzellularräume des Epithel abdichtet, sogar auf das 280-fache⁷⁶. All diese Mechanismen verstärken die Schleimhautbarriere und wirken einer Invasion der Mikroorganismen entgegen. Ein weiterer Effekt der bakteriellen Kolonisation auf die Physiologie des Wirts war die gesteigerte Expression von Genen, die an der Synthese und Freisetzung von Neurotransmittern des enteralen Nervensystems beteiligt sind. Elektrophysiologische Studien haben bestätigt, daß konventionell aufgezogenen Mäuse im Vergleich mit keimfrei aufgezogenen eine deutlich ausgeprägtere Entwicklung des enterischen Nervensystems sowie eine gesteigerte Darmmotilität aufweisen³⁴.

Noch sind die aufgeführten Beispiele einzelne Steinchen in einem weithin unvollständigen Mosaik. Doch die Erforschung der Auseinandersetzung zwischen Mensch und Mikroben schreitet voran, und die Zukunft wird ein neues Bild davon zeichnen, welchen Einfluß die Koevolution mit der kommensalen Mikroflora auf unsere postnatale Entwicklung und adulte Physiologie hat.

1.2 *Bacteroides fragilis* als Modell eines kommensalen Mikroorganismus

Lange Zeit wurde die Interaktion zwischen Wirt und Mikroflora immer aus der Sicht des Wirts, selten aus der Sicht des Bakteriums betrachtet. Doch die Ära vergleichender und funktioneller Genetik ist angebrochen. Indem die Genome vieler Bakterien der menschlichen Mikroflora nun zur Verfügung stehen, beginnt die Erforschung einer seit Millionen von Jahren bestehenden Koexistenz aus einer neuen Perspektive.

Als Studienobjekt der vorliegenden Arbeit diente *Bacteroides fragilis*. Viele Faktoren machen dieses obligat anaerobe gramnegative Stäbchen aus der Familie der *Bacteroidaceae* zum Modell eines kommensalen Mikroorganismus. Die *Bacteroides fragilis*-Gruppe umfaßt zusammen mit den *Bifidobacterium*- und *Eubacterium*-Spezies den zahlenmäßig größten Teil der menschlichen Intestinalflora^{54, 69}. *Bacteroides fragilis* wurde in Konzentrationen von 10^8 bis 10^{10} Organismen pro Gramm aus menschlichem Darminhalt isoliert (James P. Nataro, persönliche Mitteilungen). Von besonderer Bedeutung für diese Arbeit ist, daß das Genom von *Bacteroides fragilis* als einem weniger kommensaler Keime bereits vollständig sequenziert wurde. Dies stellt insofern eine Besonderheit dar, als sich die meisten aktuellen Genom-Sequenzierungs-Projekte nur auf pathogene oder industriell nutzbare Keime konzentrieren. Die Kenntnis des Genoms erlaubt es, Mechanismen und Zusammenhänge auf molekularer Ebene zu betrachten. Sie gestattet die vergleichende und funktionelle Nutzung von Daten aus Genbanken und eröffnet so eine bislang ungekannte Herangehensweise an genetische Fragestellungen. Die leichte chromosomale Manipulierbarkeit von *Bacteroides fragilis* ermöglicht die Herstellung isogener Mutanten, die im Vergleich mit dem Ursprungsstamm zur gezielten Untersuchung einzelner Genprodukte herangezogen werden können. Außerdem ist *Bacteroides fragilis* – obwohl obligat anaerob – ausgesprochen aerotolerant und damit wenig aufwendig in der Bearbeitung. Der Keim kommt gleichermaßen in der menschlichen wie murinen Intestinalflora vor, so daß sich alle in vivo-Experimente am Mausmodell simulieren lassen. Schließlich gibt es einen Aspekt, der *Bacteroides fragilis* von anderen Keimen unserer Mikroflora abhebt und daher besondere Aufmerksamkeit verdient. Obwohl *Bacteroides fragilis* ein Musterorganismus der menschlichen Mikroflora ist, besitzt dieser Keim ein nicht zu unterschätzendes pathogenes Potential, wenn er seinen angestammten Platz im Intestinaltrakt des Menschen verläßt: Er wird als häufigster

Anaerobier von klinischen Infektionen isoliert²⁵. Die molekularen Mechanismen, die für die Signifikanz dieses Keims als opportunistischem Pathogen verantwortlich sind, werden seit langem untersucht und sind im Folgenden erläutert. Vorläufige Daten (L. E. Comstock, unveröffentlicht) legen nahe, daß genau dieselben Mechanismen, die bereits als Pathogenitätsfaktoren beschrieben wurden, zum Erfolg dieses Keims als kommensalem Mikroorganismus beitragen. Zu verstehen, was darüber entscheidet, ob der Keim von der Natur für intestinales Überleben selektioniert oder vom Wirtsorganismus als Pathogen eliminiert wird, wird Ziel nachfolgender Studien sein.

1.3 *Bacteroides fragilis* als opportunistischer Pathogen

1.3.1 Relevanz von *Bacteroides fragilis* für klinische Infektionen

Obwohl *Bacteroides fragilis* nur ein Vertreter der *Bacteroides fragilis*-Gruppe ist, die zusammen mit den *Eubacterium* Spezies und *Bifidobacterium* Spezies den größten Teil des anaeroben Kollektivs der menschlichen Intestinalflora ausmacht, ist *Bacteroides fragilis* der Anaerobier, der mit Abstand am häufigsten von klinischen Infektionen isoliert wird²⁵. Er verursacht überwiegend intraabdominale bzw. intraperitoneale Abszesse sowie anaerobe Bakteriämien^{25, 67, 77}, wurde aber auch bei Patienten mit Knochen- und Bindegewebsinfektionen nachgewiesen⁵⁵ und als ein Frühgeburtlichkeit begünstigender Faktor identifiziert⁴³. Durch *Bacteroides fragilis* hervorgerufene intraabdominale Abszesse führen bei Patienten mit Sepsis zu extrem kritischen Zuständen, persistieren häufig chronisch und sind antimikrobieller Therapie nur schwer zugänglich²⁵. Diese Beobachtungen zeigen, daß *Bacteroides fragilis* potente Virulenzfaktoren besitzt, die dann zum Einsatz kommen, wenn der Keim seinen angestammten Lebensraum im Intestinaltrakt des Menschen verläßt.

1.3.2 Bedeutung von *Bacteroides fragilis* Kapselpolysaccharid für die Abszessinduktion

Arbeiten über das pathogene Potential von *Bacteroides fragilis* haben gezeigt, daß der Keim in der Lage ist, die Bildung intraabdomineller Abszesse zu induzieren, wenn er in den Intraperitonelraum von Ratten injiziert wird⁵⁹. Die Abszesse der untersuchten Tiere gleichen histologisch denen, die man in Patienten mit von *Bacteroides fragilis* verursachten Erkrankungen findet. Weitere Untersuchungen demonstrierten, daß von der Oberfläche des Organismus isoliertes Kapselpolysaccharid im Tiermodell Abszessbildung auch in Abwesenheit des lebenden Organismus hervorrufen kann⁵⁹. Zwei verschiedene der inzwischen acht bekannten hochmolekularen Kapselpolysaccharide von *Bacteroides fragilis* NCTC 9343, PS A und PS B, wurden gereinigt und für beide getrennt gezeigt, daß sie Abszessentstehung im Tiermodell induzieren, wobei die Potenz von PS A mit einer AD₅₀ (abscess dose 50; injizierte Dosis, die bei 50% der Versuchstiere die Entstehung von intraabdominalen Abszessen induziert) von 0.67 µg/Versuchstier deutlich größer war als die

Potenz von PS B mit einer AD_{50} von 25 $\mu\text{g}/\text{Versuchstier}_{81}$. PS A und PS B sind aus Monosacchariden aufgebaut, die geladene substituierende Gruppen tragen, die man in bakteriellen Polysacchariden üblicherweise nicht findet₈₁. Wichtigstes Charakteristikum von PS A und PS B ist das gleichzeitige Vorhandensein von positiv und negativ geladenen Gruppen auf jeder Untereinheit. Struktur-Funktions-Untersuchungen haben gezeigt, daß dieses +/- Ladungsmotiv für die Fähigkeit der Kapselpolysaccharide, Abszesse zu induzieren, verantwortlich ist_{78, 79, 80}.

1.3.3 Genetische Charakteristika der Polysaccharid Biosyntheseloci

Der Kapselpolysaccharidkomplex (CPC) von *Bacteroides fragilis* ist aus mindestens acht verschiedenen Kapselpolysacchariden PS A bis PS H aufgebaut. Die Synthese einer solchen Anzahl unterschiedlicher Polysaccharide ist bisher für kein anderes Bakterium beschrieben₄₂. Noch ist die biologische Signifikanz dieser Vielfalt unerforscht.

Die Biosyntheseloci der Polysaccharide A-E wurden bereits kloniert und sequenziert (unveröffentlichte Daten). Die Struktur der Monosaccharid-Untereinheiten ist noch nicht für alle Polysaccharide untersucht, doch die genetische Zusammensetzung ihrer Syntheseloci legt nahe, daß sie, wie für PS A und PS B gezeigt, positiv und negativ geladene Gruppen tragen und damit über dasselbe zwitterionische Ladungsmotiv verfügen, das für die Induktion von Abszessen verantwortlich ist.

Die acht Kapselpolysaccharide verdanken ihre Entdeckung dem Umstand, daß sich direkt upstream von jedem der zunächst drei bekannten Kapselpolysaccharidsyntheseloci A, B und C zwei Open Reading Frames (ORFs) fanden, die auf Proteinebene große Homologie aufweisen. Diese Gene wurden mit *upxY* und *upxZ* benannt, wobei *x* abhängig vom PS-Locus für *a*, *b*, *c* usw. steht. Analyse des Genoms von *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 auf weitere Homologe von *upxY* und *upxZ* führte nacheinander zur Entdeckung von fünf bisher unbekanntem Genpaaren und damit zur Auffindung der Syntheseloci PS D bis PS H₄₂. Bisher unveröffentlichte Daten legen nahe, daß es sich bei den Produkten von *upxY* und *upxZ* um Faktoren handelt, die an der Regulation des jeweiligen Polysaccharid Biosyntheselocus beteiligt sind.

Untersuchungen zur Existenz von Kapselpolysaccharid-Serotypen zwischen verschiedenen *Bacteroides fragilis* Stämmen wurden sowohl auf immunologischer⁶² als auch auf genomischer Ebene^{18, 19} durchgeführt. Diese Studien haben gezeigt, daß eine große Vielfalt verschiedener Kapselpolysaccharid-Serotypen innerhalb der Spezies *Bacteroides fragilis* besteht. In einer Kollektion von 50 verschiedenen *Bacteroides fragilis* Stämmen konnten 15 genetisch verschiedene PS A Varianten¹⁹, 15 genetisch verschiedene PS B Varianten (L. E. Comstock, C. M. Krinos, unveröffentliche Daten) und 14 genetisch verschiedene PS C Varianten¹⁷ unterschieden werden, während die zugehörigen *upxY*- und *upxZ*-Gene in allen untersuchten Stämmen konserviert vorlagen (L. E. Comstock, C. M. Krinos, unveröffentliche Daten). Die Studien haben weiter gezeigt, daß innerhalb der verschiedenen Polysaccharidsyntheselocivarianten der Großteil der Gene, die an der Übertragung von geladenen Gruppen auf Polysaccharide beteiligt sind, in den untersuchten Stämmen ungeachtet von deren Serotyp konserviert vorliegen. Dies spricht dafür, daß das +/- Ladungsmotiv und damit die Fähigkeit, Abszesse zu induzieren, der gesamten Spezies eigen sind.

1.3.4 *Bacteroides fragilis* Kapselpolysaccharide durchlaufen Phasenvariation

Wir konnten in elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen, daß monoklonale Immunogold-markierte Antikörper gegen jedes der acht verschiedenen Kapselpolysaccharide von *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 nur mit einem Teil der Kultur reagieren, während die restlichen Bakterien durch die Antikörper nicht gekennzeichnet werden⁴². Dieses Ergebnis bestätigt sich auch dann, wenn die Kultur von einer Einzelzellkolonie abstammt. Die beobachtete variable Expression der Kapselpolysaccharide ist daher eher durch Regulation als durch Mutation zu erklären.

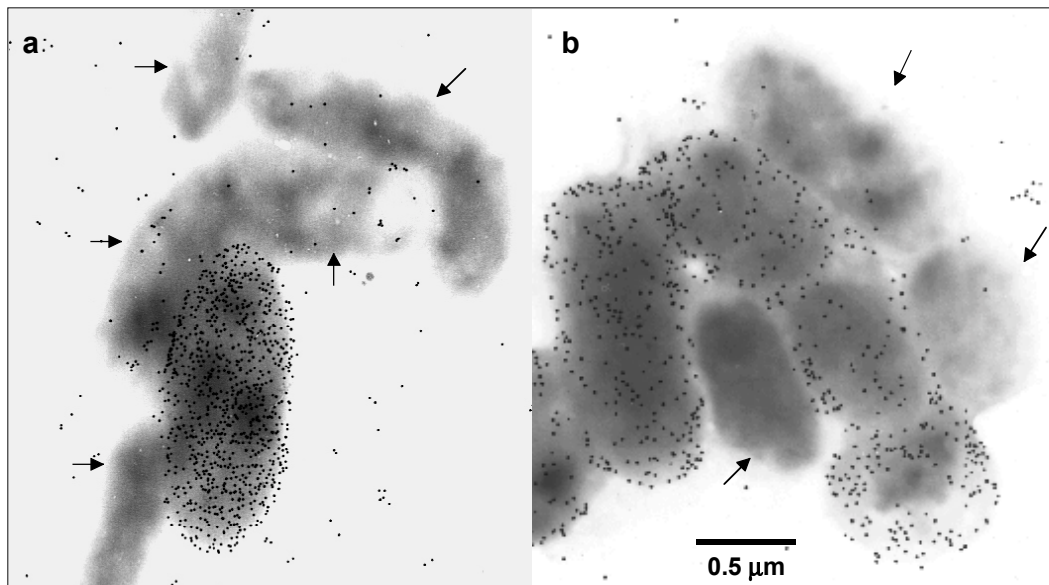


Abbildung 1: Phasenvariable Expression von *Bacteroides fragilis* Kapselpolysacchariden: Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen den ON und OFF Phänotyp von PS A (a) und PS B (b). Nicht Immunogold-markierte Zellen sind durch Pfeile gekennzeichnet.

In flow-zytometrischen Untersuchungen, in denen Bakterien mit zwei verschiedenen Fluoresceinen für die gleichzeitige Expression von zwei unterschiedlichen Polysacchariden markiert wurden, konnten wir vier verschiedene Populationen unterscheiden: Erstens positiv für das erste Polysaccharid, zweitens positiv für das zweite Polysaccharid, drittens positiv für beide Polysaccharide und viertens für keines der beiden Polysaccharide positiv. Für alle untersuchten Polysaccharidkombinationen scheint die Expression des einzelnen Polysaccharids unabhängig vom anderen reguliert zu sein. Bei acht verschiedenen Kapselpolysacchariden, die in zwei unterschiedlichen Phasen, nämlich ON und OFF, vorliegen können, hat der Organismus theoretisch die Möglichkeit, 2^8 also 256 verschiedene Polysaccharidkombinationen auf seiner Oberfläche zu präsentieren. Um herauszufinden, ob eine Änderung der Expressionsphase gleichermaßen in beiden Richtungen, also von ON nach OFF wie von OFF nach ON, stattfindet, verwendeten wir Fluorescence-Activated-Cell-Sorting (FACS). Die oberen 25% einer PS A-ON Population und die unteren 25% einer PS A-OFF Population wurden gesammelt, erneut zu mittlerer Log-Phase kultiviert und flow-zytometrisch nochmals auf Expression von PS A untersucht. Sowohl die ursprüngliche PS A-ON als auch die ursprüngliche PS A-OFF Populationen demonstrierten nun gemischte Populationen, die aus beiden Phänotypen bestehen. Dieselben Ergebnisse lieferten PS B- und PS C-ON und OFF Populationen. Die Ergebnisse bestätigen, daß die Kapselpolysaccharide Phasenvariation im Sinne einer hochfrequenten reversiblen ON-OFF Änderung des Phänotyps

durchlaufen. Der Wechsel von ON nach OFF und von OFF nach ON vollzieht sich ungefähr mit der gleichen Frequenz von mindestens 0,01 pro Zelle pro Generationszeit. Diese Frequenz unterliegt einer gewissen Variabilität, die wir auf Änderungen in der Umgebung zurückführen⁴².

1.3.5 Phasenvariation durch DNA–Inversion

Der Großteil der Genprodukte, die Phasenvariation durchlaufen, sind Oberflächenmoleküle. Phasenvariation von Oberflächenpolysacchariden wurde bereits bei *Haemophilus influenza*³⁹, *Neisseria meningitis*²⁸ und *Helicobacter pylori*⁵ beschrieben. Bei all diesen Organismen ist der Mechanismus der Phasenvariation Slipped-Strand Mispairing, welches den ORF eines für die Polysaccharidbiosynthese notwendigen Gens verschiebt, was auf der Ebene der Translation zu einem Kettenabbruch führt. Unsere Daten legen nahe, daß der Phasenvariation von *Bacteroides fragilis* Kapselpolysacchariden ein vollständig anderer Mechanismus zu Grunde liegt. Die Untersuchung des Polysaccharid C Biosyntheselocus des Stammes *B. fragilis* 638 R auf Promotoraktivität deckte einen einzigen Promotor 240 bp upstream von *upcY* auf (C. M. Krinos, D. Lipsett und L. E. Comstock, unveröffentlichte Daten). Dieser Promotor folgt in seiner Sequenz exakt dem Motiv des von Bayley *et al.*⁸ beschriebenen *Bacteroides fragilis* Konsensus-Promotor mit TAnnTTTG bei –7 und TTTG bei –33 und damit nicht den stark konservierten –10- und –35-Hexameren, TATAAT und TTGACA, die für die RNA-Polymerase σ^{70} Initiationssequenz der meisten Bakterien charakteristisch sind. Da der DNA-Abschnitt upstream des Polysaccharid-Biosyntheselocus in allen acht verschiedenen Kapselpolysacchariden über mehr als 2 kbp hinweg konserviert ist (C. M. Krinos, D. Lipsett und L. E. Comstock, unveröffentlichte Daten), liegt die Vermutung nahe, daß sich die Promotorregionen der restlichen sieben Kapselpolysaccharide ebenfalls upstream der entsprechenden *upxY*-Paralogen befinden. Zum Nachweis eines funktionellen Promotors wurde ein upstream des PS A-Operons gelegenes DNA-Segment von 420 bp mit Hilfe des Reporterplasmids pLEC23 untersucht. pLEC23 besitzt ein promotorloses *xylE*-Gen. Findet Expression dieses Gens statt, setzt XylE in einer Farbreaktion das Substrat Catechol zu einem gelben Produkt um. Zur Untersuchung eines DNA-Segments auf darin enthaltene Promotoraktivität wird das Segment in entsprechender Orientierung vor das promotorlose *xylE*-Gen kloniert, so daß von einem darin enthaltenen Promotor die Transkription von *xylE* ausgehen kann. Dieses Plasmid wird in *E. coli* transformiert und in *Bacteroides* überführt.

Eine qualitative Aussage, ob das zu untersuchende DNA-Fragment einen funktionellen Promotor beinhaltet, läßt sich bereits wenige Minuten später treffen, nachdem die Platten des Plasmid-tragenden Klons mit Catechol besprüht wurden: Kolonien, in denen Expression von XylE stattfindet, erscheinen phänotypisch gelb. Unterbleibt die Expression in Ermangelung eines Promotors, sind die Kolonien weiß. Die XylE-Aktivität ist in guter Näherung proportional zur photometrisch messbaren Farbintensität des umgesetzten Produkts. Diese erlaubt indirekt eine quantitative Beurteilung der Aktivität des Promotors, von dem Transkription von *xylE* ausgeht. Die experimentelle Untersuchung der 420 bp langen DNA-Region upstream des PS A-Operons mit Hilfe des Reporterplasmid pLEC23 führte in *Bacteroides fragilis* zur Entstehung von sowohl gelben als auch weißen Kolonien. Wurde eine gelbe Einzelkolonie ausgestrichen und beobachtet, war ein Teil der daraus erwachsenden Kolonien wieder gelb, der andere weiß. Dasselbe Gemisch aus gelben und weißen Kolonien zeigte sich, wenn eine weiße Einzelkolonie ausgestrichen wurde. Eine Sequenzanalyse des getesteten 420 bp DNA-Abschnitts deckte die Existenz einer 19 bp langen DNA-Sequenz auf, die sich in einem Abstand von 193 bp auf dem anderen Strang in exakt umgekehrter Reihenfolge wiederholt. Dieses Paar korrespondierender DNA-Sequenzen wird im Folgenden als Inverted Repeat, abgekürzt als IR, bezeichnet. Für das ganze DNA-Segment, welches die Inverted Repeats einschließen, wird folgend der Begriff Inverted Repeat-Region bzw. IR-Region verwendet. Sechs der sieben verbleibenden Polysaccharid-Biosyntheseloci (alle mit Ausnahme des PS C-Locus) enthalten upstream des eigentlichen Syntheselocus Inverted Repeats. Die IRs sind in Länge und Sequenz fast identisch und schließen etwa dieselbe Menge DNA (200 bp) ein. Ihre Entdeckung hat in Verbindung mit den Ergebnissen aus dem Reporterplasmid-Experiment zu der Hypothese geführt, daß alle sieben Inverted Repeat-flankierten DNA-Segmente die Promotorregionen der downstream gelegenen Kapselpolysaccharidsyntheseloci enthalten. Durch Inversion der IR-Region ändern sie die Orientierung des Promotors zum Operon, so daß im einen Fall Transkription der nachfolgenden Gene stattfinden kann, im anderen nicht.

Um die Inversion der IR-Region nachzuweisen, wurden für alle sieben bekannten Inverted Repeat Paare Primer-Triplets entworfen, so daß ein Forward-Primer upstream, ein Revers-Primer downstream und ein dritter Primer - gleich welcher Orientierung - in der Mitte der Inverted Repeats zu liegen kommt. PCR-Analysen der IR-Regionen von PS A, B, D, E, F, G und H zeigten, daß der mittlere Primer sowohl mit dem Forward-Primer upstream der Inverted Repeats ein PCR-Produkt amplifiziert, als auch ein PCR-Produkt bildet, wenn er mit

dem Reverse-Primer downstream der Inverted Repeats verwendet wird. Ein solches Ergebnis ist nur dann möglich, wenn das DNA-Segment, welches den mittleren Primer enthält, invertiert und damit die Ausrichtung des Primers ändert. Zusätzlich konnten wir durch PCR-Analyse zeigen, daß die DNA außerhalb der Inverted Repeats nicht invertiert. Von den acht bekannten Polysaccharidbiosyntheseloci besitzt nur PS C keine Inverted Repeats, die die Promotorregion flankieren, und nur für PS C konnten wir keine Inversion der Promotorregion demonstrieren⁴².

Um zu bestimmen, wo exakt das DNA-Segment innerhalb der Inverted Repeats invertiert, wurden das PS A-Konstrukt des Reporterplasmids von einer gelben und einer weißen Kolonie isoliert und sequenziert. Dabei stellten wir fest, daß die DNA-Inversion genau zwischen den Inverted Repeats stattfindet. Dieses Ergebnis bestätigt sich für die invertierbaren Promotorregionen der sechs weiteren Polysaccharidsyntheseloci⁴².

Diese Daten haben unsere Hypothese bestätigt, daß das Inverted Repeat flankierte DNA-Segment upstream des PS A-Operons invertiert und damit die Orientierung des Promotors determiniert. Zur Klärung, welche Orientierung funktionelle Promotoraktivität beinhaltet, wurde die IR-Region von PS A mit verkürzten Inverted Repeats in beiden Orientierungen in das Reporterplasmid pLEC23 kloniert. Mittels PCR-Analyse wurde sichergestellt, daß die IR-Region mit den unvollständigen Inverted Repeats nicht mehr invertieren kann. Die beiden neuen Plasmide wurden wieder in *E. coli* transformiert und in *Bacteroides fragilis* überführt. Die resultierenden Kolonien zeigten für die jeweilige Orientierung der IR-Region nun einen einheitlichen entweder ausschließlich weißen oder ausschließlich gelben Phänotyp, wobei die gemessene Xyle-Enzymaktivität eines gelben Klons mindestens 100mal größer war als die eines weißen. In gleicher Weise wurde die funktionelle ON-Orientierung der Promotorregion für die sechs verbleibenden Polysaccharidsyntheseloci B, D, E, F, G und H bestimmt. Diese funktionellen Ergebnisse stimmen mit der theoretisch ermittelten ON-Orientierung der Promotorregionen entsprechend der bekannten *Bacteroides fragilis* Konsensus-Promotor Sequenz nach Bayley *et al.* überein⁴².

Um zu demonstrieren, daß die ON-Orientierung des Promotors upstream eines Polysaccharidbiosyntheseoperons direkt mit der phänotypischen Expression des Polysaccharids korreliert, wurden mittels Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) Bakterien in eine PS A-ON Population und eine PS A-OFF Population getrennt. Von beiden

Populationen wurde die Orientierung der Promotorregion mittels PCR-Verdau in einer Weise bestimmt, die der Quantifizierung der Orientierung des *fim*-Switchs in *E. coli* nachempfunden ist⁴⁹. Dabei wurde für die jeweilige Population die IR-Region PCR amplifiziert und in einem anschließenden Restriktionsverdau so geschnitten, daß sich für die ON- und die OFF-Orientierung Fragmentpaare unterschiedlicher Länge ergeben. Die gelelektrophoretische Darstellung der Fragmente erlaubt, aus der Intensität der Bandenpaare eine semi-quantitative Aussage darüber zu treffen, in welchem Verhältnis ON- und OFF-Orientierung der Promotorregion zueinander vorgelegen haben. Eine Untersuchung der PS A-ON Population ergab, daß sich das Verhältnis von ON zu OFF deutlich auf die Seite der ON-Orientierung im Vergleich zu einer nicht sortierten Normalpopulation verschoben hat. Umgekehrtes fanden wir bei der PS A-OFF Population. Diese Ergebnisse wiederholten sich, als der Versuch mit einer PS B-ON und einer PS B-OFF Population durchgeführt wurde, und bestätigen damit, daß die Promotororientierung von PS A und B direkt mit der Expression des entsprechenden Polysaccharids korreliert ist⁴².

Die Ergebnisse zusammenfassend haben wir im Vorangehenden gezeigt, daß *Bacteroides fragilis* acht verschiedene Kapselpolysaccharide synthetisiert, die unabhängig voneinander Phasenvariation durchlaufen. Upstream jedes ihrer Syntheseloci ist ein funktioneller Promotor lokalisiert. Sieben der acht Promotorregionen befinden sich innerhalb eines Inverted Repeat flankierten DNA-Segments, welches durch Inversion die Orientierung des Promotors reversibel zwischen ON und OFF wechseln kann. Die Orientierung der Promotorregion upstream des Polysaccharidsyntheselocus ist direkt mit der Expression des entsprechenden Polysaccharids korreliert. Wir schließen daraus, daß Phasenvariation von *Bacteroides fragilis* Kapselpolysacchariden durch DNA-Inversion der Promotorregion ihrer Syntheseloci herbeigeführt wird.

Obwohl DNA-Inversion einer Promotorregion der erste beschriebene Mechanismus für Phasenvariation ist⁸⁹, folgt die variable Expression nur weniger Strukturen diesem Mechanismus³⁰. Die Phasenvariation eines Kapselpolysaccharids durch DNA-Inversion wurde bisher nicht beschrieben. Das bis heute am besten charakterisierte Beispiel von durch DNA-Inversion phasenvariabel exprimierten Strukturen sind die Typ I Fimbrien in *Escherichia coli*. Da die Phasenvariation von *Bacteroides fragilis* Kapselpolysaccharid in vieler Hinsicht Ähnlichkeit zu diesem System aufweist, diente die variable Expression der Typ I Fimbrien als Modellmechanismus für die nachfolgenden Studien.

Phasenvariation von Typ I Fimbrien in *E. coli* vollzieht sich durch die Inversion eines 314 bp umfassenden beweglichen DNA-Segments upstream von *fimA*, dem Gen, welches für die strukturelle Hauptuntereinheit des Typ I Fimbriums kodiert. Innerhalb des invertierbaren DNA-Segments befindet sich der Promotor, von dem Transkription von *fimA* ausgeht, wenn sich der Promotor in der korrekten Orientierung zu dem downstream gelegenen Gen befindet. Die Promotororientierung, in der Transkription von *fimA* stattfindet, wird als ON-Orientierung bezeichnet¹. Die Inversion des beweglichen DNA-Segments wird durch die sequenzspezifische Rekombination von 9 bp langen Inverted Repeat-Sequenzen herbeigeführt, die das 314 bp lange DNA-Segment flankieren^{1, 58}. Zwei sequenzspezifische Rekombinasen, FimB und FimE, kontrollieren die Inversion des Inverted Repeat-flankierten DNA-Elements⁴⁰. FimB und FimE wirken dabei nicht kooperativ, sondern sind in ihrer Aktivität unabhängig. Während FimB in der Lage ist, die invertierbare Region in beide Richtungen umzukehren, und damit den Promotor wie einen Schalter von ON nach OFF und von OFF nach ON umlegen kann, wendet FimE die Promotorregion nur von ON nach OFF^{53, 24}. Zusätzlich zu den Inverted Repeats, die den eigentlichen Ort des Rekombinationereignisses darstellen, gibt es vier weitere, für die Rekombination ebenfalls notwendige Bindungsstellen, die durch präferentielle Affinität zu FimB bzw. FimE die Richtung der Inversion determinieren⁴⁴. FimB-vermittelte Rekombination findet mit einer Rate von 10^{-3} bis 10^{-4} pro Zelle pro Generationszeit statt. Die Frequenz von FimE liegt mit 0.7 pro Zelle pro Generationszeit deutlich höher²³. An der FimB- bzw. FimE-vermittelten Inversion der Promotorregion sind zusätzlich globale Regulatorproteine wie H-NS (histone-like protein), IHF (integration host factor) und Lrp (leucine response protein) beteiligt^{20, 10}. Ein negativer Einfluß des Sigmafaktors RpoS auf die Expression von Typ I Fimbrien wird ebenfalls diskutiert²¹.

FimB und FimE gehören zur Familie der Tyrosin-Rekombinasen, die zusammen mit den Serin-Rekombinasen die beiden großen Familien sequenzspezifischer Rekombinasen darstellen. Tyrosin-Rekombinasen, auch λ -Integrasen genannt, sind strukturell divers und funktionell vielseitig. Durch sequenziellen Austausch zweier Paare von DNA-Strängen an definierten, innerhalb charakteristischer Erkennungssequenzen gelegenen Phosphodiesterbindungen katalysieren sie sowohl Integration, Inversion, Resolution als auch Exzision von DNA-Molekülen und werden entsprechend als Integrasen, Invertasen, Resolvasen oder Transposasen bezeichnet⁷³. Die Rekombination wird durch ein tetrameres Protein in zwei räumlich und zeitlich getrennten Schritten vollzogen. In einem ersten Schritt

werden die beiden Stränge an einem Ende der auszutauschenden Region in ihrer Kontinuität unterbrochen und miteinander über eine Holiday-Junction verknüpft. Anschließende Version des freien Doppelstrangendes hinüber auf die homologe Erkennungssequenz am anderen Ende der auszutauschenden Region und nachfolgende homologe Rekombination an entsprechender Stelle führen in einem zweiten Schritt zu Strangbruch und Querbrückenbildung auf dieser Seite, die nun ihrerseits invertiert und durch Rekombination die Kontinuität der DNA wieder herstellt. Jeder einzelne der vier Strangbruch-Austausch-Rekombinations-Schritte folgt dabei dem elementaren Topoisomerase I Mechanismus²⁶. DNA-Rearrangements durch sequenzspezifische Rekombination finden sich bei der Replikation bakterieller Genome sowie bei der Differenzierung und in der Pathogenese von Bakterien und spielen eine essentielle Rolle in der Verschiebung mobiler DNA-Elemente wie Transposons, Plasmide, Bakteriophagen und Integrons⁵⁶. Die Hinterlassenschaft sequenzspezifischer Rekombinationsereignisse hat erhebliche Konsequenzen für die Evolution des prokaryotischen Genoms mit sich gebracht⁴⁷.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Wir haben im Vorangehenden gezeigt, daß *Bacteroides fragilis* acht verschiedene Kapselpolysaccharide synthetisiert, die unabhängig voneinander Phasenvariation durchlaufen. Die Phasenvariation von sieben der acht Kapselpolysaccharide wird durch die Inversion einer Inverted Repeat-flankierten Promotorregion upstream jedes der acht Polysaccharidsyntheseloci hervorgerufen. Der beschriebene Mechanismus besitzt große Ähnlichkeit zur Phasenvariation von Typ I Fimbrien in *Escherichia coli*, bei der die Inversion des beweglichen DNA-Segments durch die Aktivität einer sequenzspezifische DNA-Rekombinase katalysiert wird¹. Dies hat zu der Hypothese geführt, daß die Inversion der Inverted Repeat-flankierten DNA-Segmente upstream der Kapselpolysaccharidsyntheseloci in *Bacteroides fragilis* ebenfalls durch eine sequenzspezifische DNA-Rekombinase herbeigeführt werden muß. Ziel dieser Arbeit ist es, den Faktor bzw. die Faktoren zu identifizieren, die für die Inversion der umkehrbaren DNA-Elemente upstream der Kapselpolysaccharidsyntheseloci in *Bacteroides fragilis* verantwortlich sind. Diese „Invertasen“ sollen kloniert und charakterisiert werden, um anhand ihrer Aktivität zu verstehen, wie Phasenvariation von Oberflächenmolekülen in *Bacteroides fragilis* reguliert wird.

2 Material und Methoden

2.1 Computergestütztes Arbeiten mit Sequenzen und Datenbanken (BLAST Search)

Die Sequenzierung des Genoms von *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 wurde von der Sanger Center's Microbial Pathogen Group durchgeführt und im Internet unter http://www.sanger.ac.uk./Projects/B_fragilis/ bereitgestellt. Die Sequenz der Gene *fimB* und *fimE* ist in der GenBank, die im Internet über das National Center for Biotechnology Information (NCBI) zugänglich ist, unter Accession No. X03923 hinterlegt. Um DNA und Proteinsequenzen mit einer Datenbank zu vergleichen, wurden das BLAST Klient^{2,3} und das FASTA₆₅ Klient verwendet. Beide sind im Wisconsin Package Version 9.1 der Genetics Computer Group (GCG; Madison, Wisconsin) enthalten. Für alle routinemäßigen Sequenz- und Restriktionsanalysen, Fragment Assembly, Open Reading Frame (ORF) Detektion und Translationssimulationen wurde ebenfalls das Wisconsin Package Version 9.1 der Genetic Computer Group verwendet.

2.2 Bakterien und Plasmide

In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme und Plasmide sind in Tabelle 1 beschrieben. *Escherichia coli* Stämme wurden in Luria (L)- Broth oder auf L-Agarplatten gezüchtet. *Bacteroides* Stämme wurden anaerob in supplementiertem Basal Medium₆₃ oder auf Brain Haert Infusion (BHI) Agarplatten gezüchtet, die mit Hemin (50µg/ml) und Vitamin K (0,5µg/ml) angereichert waren (BHIS; Randolph Biochemicals, West Warwick, R.I.).

Stamm oder Plasmid	Beschreibung	Referenz oder Quelle
Stamm		
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lac ZYA-argF</i>) U169 <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> ($r_K^- m_K^+$) <i>deoR thi-1 supE44 gyra96 relA1</i> λ^-	9
<i>B. fragilis</i> NCTC 9343	Typ Stamm, Appendix Abszess	37
<i>B. vulgatus</i> 8482	Typ Stamm	37
<i>Bacteroides fragilis</i> - Stämme der Southern Blot Analyse:		
<i>B. fragilis</i> US365	18	Peritonealflüssigk., BWH
<i>B. fragilis</i> US332	18	Abszess, BWH
<i>B. fragilis</i> 638R	18	Klin. Isolat, BWH
<i>B. fragilis</i> 379	18	Abszess, BCH
<i>B. fragilis</i> 38310	18	Mittelohr, BCH
<i>B. fragilis</i> 44355	18	Lochie, BCH
<i>B. fragilis</i> B16	18	Klin. Isolat, ISS
<i>B. fragilis</i> US324	18	Peritonealflüssigk., BWH
<i>B. fragilis</i> US357	18	Appendix, BWH
<i>B. fragilis</i> US326	18	Peritonealflüssigk., BWH
<i>B. fragilis</i> US1206	18	Klin. Isolat, BWH
<i>B. fragilis</i> US388	18	Ischias Wunde, BWH
<i>B. fragilis</i> US390	18	Abszess, BWH
<i>B. fragilis</i> US52540	18	Klin. Isolat, BWH
<i>B. fragilis</i> US2244	18	Klin. Isolat, BWH
<i>B. fragilis</i> B35	18	Stuhl, ISS
<i>B. fragilis</i> B110	18	Stuhl, ISS
<i>B. fragilis</i> B124	18	Stuhl, ISS

<i>B. fragilis</i> PA5	18	Stuhl, ISS
<i>B. fragilis</i> 17905	18	Plazenta, BWH
<i>B. fragilis</i> 13141	18	Plazenta, BCH
<i>B. fragilis</i> 4703	18	Liquor (subdural), BCH
<i>B. fragilis</i> US398	18	Blut, BWH
<i>B. fragilis</i> CM1	18	Hautfistel, RDR
<i>B. fragilis</i> B272	18	Klin. Isolat, ISS
<i>B. fragilis</i> CM3	18	Aszites, RDR
<i>B. fragilis</i> CM12	18	Abszess, RDR
<i>B. fragilis</i> 2429	18	Klin. Isolat, WVAH
<i>B. fragilis</i> 26877	18	Klin. Isolat, BCH
<i>B. fragilis</i> B117	18	Stuhl, ISS
<i>B. fragilis</i> 1279-2	18	Stuhl, BWH
<i>B. fragilis</i> 1284-2	18	Stuhl, BWH
<i>B. fragilis</i> 1281262I	18	Peritonealflüssigk., BWH
<i>B. fragilis</i> 1285531I	18	Peritonealflüssigk., BWH
<i>B. fragilis</i> B356772I	18	Blut, BWH
<i>B. fragilis</i> 1279155I	18	Handfläche, BWH
<i>B. fragilis</i> 1277810I	18	Niere, BWH
<i>B. fragilis</i> 12775L1II	18	Peritonealflüssigk., BWH
<i>B. fragilis</i> 1291662III	18	Peritonealflüssigk., BWH
<i>B. fragilis</i> 1287245I	18	Fuß, BWH
<i>B. fragilis</i> 12905-23V	18	Abszess, BWH
<i>B. fragilis</i> IL89375II	18	Peritonealflüssigk., BWH
<i>B. fragilis</i> 23745	18	Klin. Isolat, BWH

Plasmid		
pBlueskript II SK	Phagemider Cloning Vektor; ori _{<i>E. coli</i>} , Ap ^r	Stratagene, La Jolla, Calif.
pFD340	<i>E. coli</i> - <i>Bacteroides</i> Shuttle Vektor; ori _{<i>E. coli</i>} , ori _{<i>Bacteroides</i>} , Ap ^r , Em ^r _{<i>Bacteroides</i>}	
pJST55	<i>Bacteroides</i> Suicid Vektor; ori _{<i>E. coli</i>} , Ap ^r , Em ^r _{<i>Bacteroides</i>}	82
RK231	Mobilisierbares Plasmid, induziert Wachstum eines Konjugationspilus, Plasmidtransfer von <i>E.</i> <i>coli</i> zu <i>B. fragilis</i> ; RK2-Derivat; Tet ^r , Km ^r	27

Tabelle 1: Bakterienstämme und Plasmide

Ap^r, Ampicillin resistant; BCH, Boston City Hospital, Boston, USA; BHW, Brigham and Womens's Hospital, Boston, USA; Em^r, Erythromycin resistant; ISS, Istituto Superiore di Sanita, Rom, Italien; Km^r, Kanamycin resistant; RDR, Di Rosa, Policlinico Umberto I, Rom, Italien; Tet^r, Tetracyclin resistant; Km^r Kanamycin resistant; WVAH, Wadsworth VA Hospital, L.A., USA

2.3 Medien und häufig verwendete Lösungen

LB-Medium (Luria Broth): 15 g Bacto Agar
10 g Tryptone
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
5 ml Tris/HCl (1M, pH 8,0)
ad 1 l H₂O
steril autoklaviert

BHIS-Medium: 37 g Brain Heart Infusion
15 g Agar
ad 1 l H₂O
steril autoklaviert
abgekühlt auf RT und supplementiert mit:
1 ml Hemin 0,5%
500 µl Vitamin K

Basal Medium: 20 g Proteose Peptone
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
ad 1 l H₂O
steril autoklaviert
abgekühlt auf RT und 100 ml supplementiert mit:
1 ml L-Cystein 5%
2 ml Glucose 25%
2 ml K₂HPO₄
100 µl Hemin 0,5%
50 µl Vitamin K

Folgende Konzentrationen wurden bei der Herstellung von Medien mit Antibiotika verwendet: Ampicillin 100 µg/ml, Erythromycin 7,5 µg/ml, Gentamycin 200 µg/ml, Kanamycin 20 µg/ml.

<u>PBS-Puffer:</u>	150 mM NaCl 2,68 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O 1,47 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7,1) steril filtriert
<u>20x SSC:</u>	175 g NaCl 88,2 G NaCitrat ad 1 l H ₂ O mit NaOH auf pH 7,4
<u>50x TAE-Puffer:</u>	100 ml 0,5 M Na ₂ EDTA (pH 8,0) 242 g Tris in 500 ml H ₂ O 57,1 ml Essigsäure ad 1 l H ₂ O
<u>TBS-Puffer:</u>	12 g Tris 9 g NaCl ad 1 l H ₂ O mit HCl auf pH 7,5

2.4 Molekularbiologisches Arbeiten mit DNA

2.4.1 MINI-Präparation von chromosomaler DNA

10 ml voll supplementiertes Basal Medium wurde mit *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 inokuliert und über Nacht unter anaeroben Bedingungen kultiviert. 1,5 ml der ÜN-Kultur wurden in einem Eppendorfgemäß 2 min bei 5000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 0,6 ml TE resuspendiert. Es wurden 2 µl einer Proteinase K Stammlösung (20 mg/ml) und 17 µl 20%iges SDS zugesetzt, die Reagenzien vorsichtig durch Inversion gemischt und bei 37°C für 2 h inkubiert. Dann wurden 0,6 ml equilibriertes Phenol zugesetzt, der Ansatz gevortext und 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert. 500 µl Überstand wurden abpipetiert und mit 100 µl TE versetzt. 0,5xVol (300 µl) äquilibriertes Phenol und 0,5xVol (300 µl) Chloroform wurden zugegeben, der Ansatz gevortext und 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert. 500 µl Überstand wurden wieder mit 100 µl TE versetzt. Es wurden 1xVol (600 µl) Chloroform zugefügt, der Ansatz erneut gevortext und 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Die letzten beiden Schritte (Chloroformextraktion) wurden so lange wiederholt, bis nach dem Zentrifugieren keine weiße Interphase mehr zwischen Überstand und Unterphase zu sehen ist. Zu 500 µl des gereinigten Überstands wurden 0,1xVol (50 µl) Natrium Acetat und 2,5xVol (1,25 ml) EtOH 100% gegeben. Der Ansatz wurde auf Trockeneis präzipitiert, im Kühlraum für 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert und der Überstand sofort abgeschüttet. Die am Gefäß präzipitierte chromosomale DNA wurde mit EtOH 70% gespült und nach dem Trocknen in 400 µl Aqua dest. aufgenommen.

2.4.2 MINI-Präparation von Plasmid-DNA

Prinzip der Methode ist, chromosomale DNA und Plasmid-DNA durch Lyse der Bakterienzellen freizusetzen und durch Alkalisierung zu denaturieren. Bei der anschließenden Neutralisierung sind nur die kleinen ringförmigen Plasmid Moleküle in der Lage, vollständig zu renaturieren. Die chromosomale DNA hingegen bildet durch Hybridisierung unlösliche Komplexe, die abzentrifugiert werden können.

Zur MINI-Präparation der Plasmid-DNA wurde das Wizard MINI-Prep Kit der Firma Promega (North Chicago, Ill.) verwendet. 1 ml einer ÜN- Kultur wurden in einem Eppendorfgesäß 2 min bei 5000 rpm abzentrifugiert und in 200 µl Cell Resuspension Buffer resuspendiert. Es wurden 200 µl Cell Lysis Buffer zugesetzt und der Ansatz für 2 min bei RT inkubiert. 200 µl Neutralisationslösung wurden zugegeben, vorsichtig durch Inversion mit dem Ansatz durchmischt und anschließend 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert. 600 µl Überstand wurden auf die vom Hersteller mitgelieferten Säulen geladen und mit der zugehörigen Vakuumpumpe durch die Säule gesaugt. Die Säule wurde mit 2 ml Waschlösung gespült und 1 min bei 2000 rpm trocken zentrifugiert. Die an die Säule gebundene Plasmid-DNA wurde in 30 µl Aqua dest. eluiert. MINI-Präparation von Plasmid-DNA wurde ausschließlich für analytische Zwecke verwendet.

2.4.3 MIDI-Präparation von Plasmid-DNA

Zur MIDI-Präparation von Plasmid-DNA wurden 100 ml L-Broth mit der Resistenz des Plasmids entsprechendem Antibiotikum von einer frisch ausgestrichenen Platte inokuliert und schüttelnd über Nacht bei 37°C kultiviert. Die Bakterien wurden mit 12 000 rpm bei 4°C in einer Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert. Aus dem Pellet wurde die Plasmid-DNA unter Verwendung des QIAGEN Plasmid Midi Prep Kit (Qiagen, Valencia, Calif.) gemäß den Empfehlungen des Herstellers isoliert.

2.4.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR-Ansätze zur Analyse von DNA-Abschnitten enthalten:

20 µl PCR Supermix (Life Technologies, Gaithersburg, Md.)

0,5 µl *Taq*-Polymerase (Life Technologies, Gaithersburg, Md.)

3.2 pmol jedes Primers

ca. 20 ng chromosomaler DNA als Template

PCR-Ansätze zur Amplifikation von zur Klonierung verwendeter DNA enthalten:

100 µl PCR Supermix *High Fidelity* (Life Technologies, Gaithersburg, Md.)

2,5 µl *Taq*-Polymerase *High Fidelity* (Life Technologies, Gaithersburg, Md.)

16 pmol jedes Primers

ca. 50 ng chromosomaler DNA als Template

PCR-Produkte wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, Calif.)

gemäß den Empfehlungen des Herstellers gereinigt.

Alle Thermocycler Programme sind gemäß folgendem Schema aufgebaut:

Schritt 1: Initiale Denaturierung 94°C 120s

Schritt 2: Denaturierung 94°C 30s

Schritt 3: Annealing * 30s

Schritt 4: Elongation 72°C **

Wiederholung von 32 Zyclen, beginnend bei Schritt 2

Schritt 5: Final Finish 72°C 60s

* Die Annealing Temperatur wurde dem verwendeten Primerpaar entsprechend gewählt und für jeden Primer mittels standardisierter Computeranalyse ermittelt.

** Die Elongationszeit ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments und der Art der verwendeten Polymerase. Sie beträgt ca. 30 s /1 kbp für normale *Taq*-Polymerase und 60 s /1 kbp für *Taq*-Polymerase *High Fidelity*.

2.4.5 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen

Alle genannten Restriktionsenzyme wurden von Invitrogene (L.A., Calif.) bezogen und gemäß den Empfehlungen des Herstellers mit den dafür vorgesehenen Puffern verwendet.

Für einen analytischen Verdau wurden 0.5 µg bis 2 µg DNA eingesetzt, für einen präparativen Verdau 10 µg bis 25 µg DNA. Das Restriktionsenzym wurde in zweifachem Überschuß bezogen auf seine maximale Aktivität von 1U = 1 µg DNA /1h zugegeben und der Ansatz für mindestens 1h im Hitzebleck bei 37°C inkubiert. Bei Restriktionsdoppelverdaus wurden

ausschließlich Restriktionsenzyme mit kompatiblen Puffern verwendet und beide Reaktionen im gleichen Ansatz durchgeführt.

2.4.6 Agarosegelelektrophorese

Agarosegel-Lösungen wurden durch Erhitzen von Agarose (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) in TAE-Puffer hergestellt. Der verwendete Prozentsatz an Agarose ist von der Größe der Proben abhängig. Für Produkte > 500 bp sind 1,2 % Agarose, für Produkte von 500-1000 bp 1% Agarose, für Produkte < 1 kbp entsprechend geringere Agarosekonzentrationen geeignet. Für Gele, aus denen DNA extrahiert werden soll, wurde statt regulären TAE-Puffers TAE-Puffer mit 4% Guanosin verwendet. Die Proben wurden vor dem Laden mit 0.1 Vol Ladepuffer BlueJuice (Gibco) versetzt. Die Gelelektrophorese erfolgte in TAE bzw. TAE w/ Guanosin mit einer Spannung von 5 Volt /cm². Die Gele wurden anschließend in einer Ethidiumbromid-Lösung mit einer Konzentration von 5 µg/ml für ca. 15 min gefärbt und weitere 10 min unter fließendem Wasser entfärbt, um den Farbkontrast zu verstärken.

2.4.7 Extraktion gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA

Banden der zu extrahierenden DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, Calif.) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers extrahiert.

2.4.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurden Ligation ready-to-go tubes (Life Technologies, Gaithersburg, Md) für ein Volumen von 20 µl verwendet. Diese enthalten die Ligase des T4-Phagen. Für bi- und trimolekulare Ligationsreaktionen wurde ein molares Verhältnis von 4:1 von DNA-Fragment bzw. jedes DNA-Fragments zum Vektor gewählt. Der Reaktionsansatz wurde im Thermocycler für mindestens 1h bei 16°C inkubiert.

2.4.9 Dephosphorylierung von 5'-Enden mit alkalischer Phosphatase

Um eine Rezirkulierung des Vektors durch seine kompatiblen Enden bei der Ligation zu vermeiden, wurde dieser vor der Ligation mit CIP (Calf Intestinal Phosphatase) behandelt. Das Enzym wurde in einem Verhältnis von 0,01 U auf 1 pmol freier Enden des Vektors im entsprechenden Puffer zugesetzt. Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C im Hitzeblock inkubiert und anschließend das Enzym für 10 min bei 65°C im Wasserbad inaktiviert. Der Vektor wurde mittels Gelextraktion gereinigt.

2.4.10 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

300 µl kompetente Zellen des Stammes *E. coli* DH5α wurden auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit 5-6 µl des oben beschriebenen Ligationsprodukts in einem Eppendorfgefäß durchmischt. Der Ansatz wurde für 40 min auf Eis inkubiert und anschließend für bei 42°C für 1 min bzw. bei 37°C für 2-3 min Hitze-geschockt, um die Aufnahme von Plasmid-DNA zu verstärken. Nach Zugabe von 1 ml SOB (2% (w/v) Bacto Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄) wurden die Bakterien in ein Reagenzglas gegeben und bei 37°C für 30 min unter Rotation inkubiert. Der Transformationsansatz wurde in unterschiedlichen Verdünnungen auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion auf positive Transformanden ausplattiert.

2.4.11 Blau-Weiß-Selektion bei Verwendung von pBluescript

Der Klonierungsvektor pBluescript (Stratagene, La Jolla, Calif.) wurde speziell entwickelt, um die Beurteilung von transformierten Kolonien zu erleichtern. pBluescript besitzt eine β-Galaktosidase, die das im Medium verfügbare Substrat X-Gal (35 µg /Platte) in ein blaues, makroskopisch sichtbares Abbauprodukt umsetzt. Mit pBluescript transformierte Kolonien erscheinen dementsprechend blau. Wird das Galaktosidase-Gen durch ein Insert im Polylinker unterbrochen, findet keine Expression der Galaktosidase und damit keine Farbreaktion mehr statt: Transformierte Kolonien, deren Vektor ein Insert besitzt, erscheinen weiß. Die

Unterscheidung von weißen und blauen Kolonien ist in der Regel eindeutig, Grenzfälle (hellblaue Kolonien) können entstehen, wenn das Leseraster eines kleinen Inserts mit dem des LacZ-Gens übereinstimmt, so daß dieses „durchlesen“ wird.

2.4.12 Plasmid-Transfer mittels eines konjugativen Helferplasmids

Plasmid-Transfer fand in allen beschriebenen Experimenten in Richtung von *E. coli* auf eine *Bacteroides*-Spezies statt. Alle zu transferierenden Plasmide haben einen Origin of Replication (*ori*) in *E. coli* sowie selektive Ampicillinresistenz in *E. coli* und Erythromycinresistenz in *Bacteroides*. Alle verwendeten Plasmide wurden in *E. coli* transformiert. Der Plasmid-Transfer fand durch Vermittlung des Kanamycin-resistenten Helferplasmids RK231 statt. Durch seine Expression wird das Wachstum eines Konjugationspilus in der Zelle induziert. Über den Konjugationspilus wird RK231 weitergegeben und damit die Fähigkeit, dieses sowie das eigentlich zu transferierende Plasmid auf andere Bakterien zu übertragen. Zur Durchführung wurden RK231 und das zu transferierende Plasmid in *E. coli* getrennt auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum über Nacht zu einem konfluierenden Bakterienrasen kultiviert. Von beiden Platten wurde mit einem Wattetupfer eine erbsengroße Menge bakteriellen Materials abgenommen und auf einer LB-Platte ohne Antibiotikum vermischt. Nach 8 h Inkubation bei 37°C wurde von dieser Platte mit einer Öse ein Isolationsausstrich auf eine Kan-Amp-LB-Platte übertragen. Alle Kolonien, die auf der Kan-Amp-Platte wachsen, besitzen durch die Antibiotikaselektion sowohl RK231 als auch das zu transferierende Plasmid. Nach 2 d wurden 10 ml L-Broth w/ Kan + Amp mit einer Einzelkolonie des Isolationsausstrichs inokuliert und bei 37°C unter Schütteln kultiviert. Gleichzeitig wurden wenige Tropfen einer ÜN-Kultur der *Bacteroides*-Spezies, auf die das Plasmid übertragen werden soll, in 100 ml voll supplementiertes Basal-Medium inokuliert und bis zu einer OD_{550nm} von 0,1 kultiviert. Beide Ansätze wurden abzentrifugiert, ihre Pellets in 0,4 ml Überstand resuspendiert und auf einer BHIS-Platte ohne Antibiotikum gemischt. Diese wurde zunächst für 16-20 h unter aeroben Bedingungen inkubiert, dann bakterielles Material mit einem Wattetupfer auf mehrere BHIS-Gentamycin-Erythromycin-Platten übertragen und anaerob für 2-3 d bebrütet. Kolonien, die auf diesen Platten wachsen, wurden durch Erythromycin für „*Bacteroides*-Spezies mit

Plasmid“ und durch Gentamycin gegen „*E. coli*“ selektioniert. *Bacteroides*-Spezies sind von Natur aus Gentamycin-resistent.

2.4.13 Design der Expressionsplasmide

Alle verwendeten Expressionsplasmide basieren auf dem *E. coli*-*Bacteroides*-Shuttle-Vektor pFD340, der einer Origin of Replication (*ori*) und Ampicillinresistenz in *E. coli* und einen Origin of Replication und Erythromycinresistenz in *Bacteroides*-Spezies besitzt. Der Expressionsvektor verbleibt extrachromosomal (in *trans*) und wird nicht in das Genom rekombiniert. pFD340 trägt einen starken *Bacteroides*-Promotor vor einer Multi-Restriktionsstelle, von dem die Transkription des zu exprimierenden Gens ausgeht.

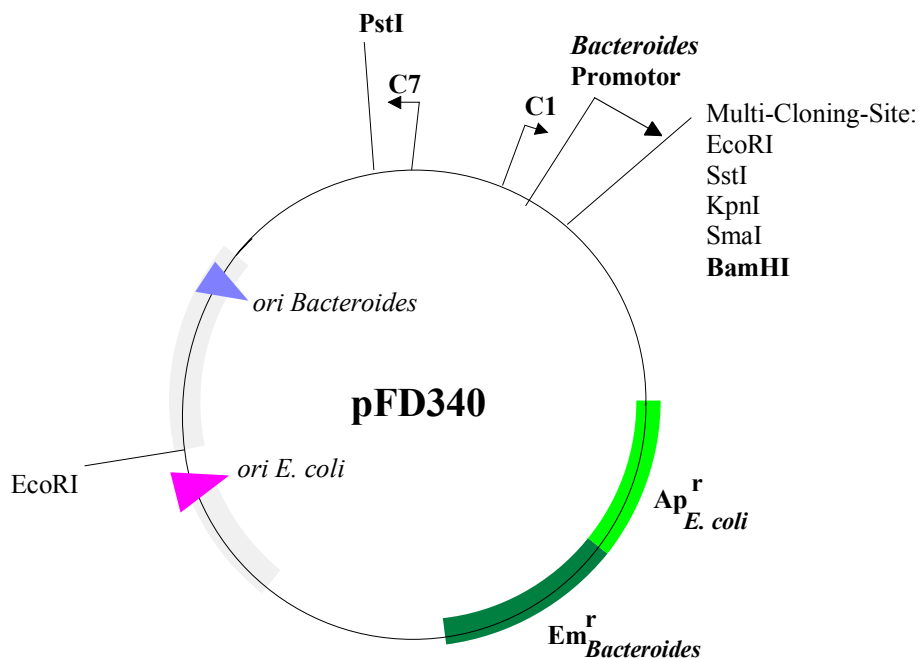
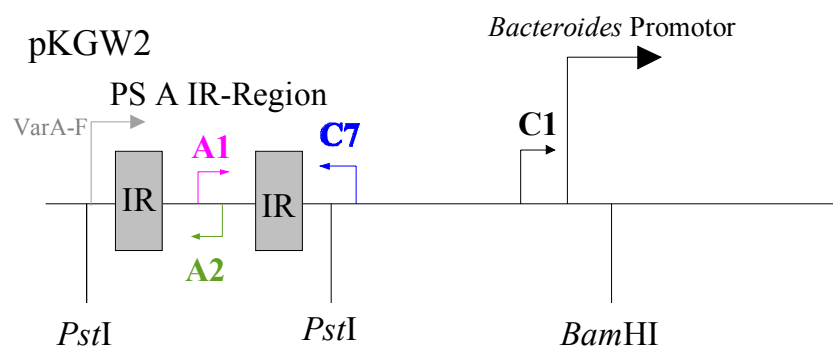


Abbildung 2: *E. coli*-*Bacteroides*-Shuttle-Vektor pFD340

Zur Konstruktion der Expressionsplasmide wurde ein 431 bp langes DNA-Fragment unter Verwendung der PstI-Enden tragenden Primer VarA-F und VarA-R PCR-amplifiziert. Das Fragment beinhaltet die 193 bp umfassende Promotor-tragende IR-Region upstream des PS A Syntheseoperons, nachfolgend genannt ‚Flippy A‘, sowie auf jeder Seite ca. 120 bp

anschließende DNA-Sequenz, um mögliche für die Inversion der Region notwendige „*cis-acting Factors*“ nicht zu übersehen. Mittels einfacher Ligation wurde das amplifizierte Fragment *PstI* verdaut, in die *PstI*-Schnittstelle von pFD340 kloniert und in *E. coli* transformiert. Die transformierten Kolonien wurden zunächst mittels PCR auf die Orientierung des Inserts im Vektor untersucht, indem sie für ein positives PCR-Produkt mit den Primern VarA-F und C7 selektioniert wurden. Klone mit der gewünschten Insert-Orientierung wurden in einem zweiten Schritt auf die Orientierung der invertierbaren Region ‚Flippy A‘ im Insert gescreent, indem für ein positives PCR-Produkt mit den Primern A1 und C7 selektioniert wurde. Das Plasmid mit der gewünschten Insert- und IR-Region-Orientierung wurde pKGW2 genannt.

pKGW2 diente als Basis der Expressionsplasmide pKGW3 (Expression von *inv19*), pKGW4 (Expression von *res02*), pKGW6 (Expression von *inv24*), pKGW9 (Expression von *inv21*) und pKGW15 (Expression von *inv15*), die alle nach dem selben Prinzip aufgebaut und zur Vereinfachung im Folgenden unter pKGW_x zusammengefaßt wurden. Das zu exprimierende Invertasengen wurde mit den *BamHI*-Enden tragenden Primern Invx-F2 und Invx-R2 PCR-amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment enthält den vollständigen ORF des Invertasengens ohne eigenen Promotor. Es wurde *BamHI* verdaut und mittels einfacher Ligation in das *BamHI*-geschnittene, CIP-behandelte Plasmid pKGW2 kloniert. Das Plasmid wurde in *E. coli* transformiert und auf die richtige Orientierung des Gens zum im Vektor kodierten *Bacteroides*-Promotor untersucht, indem für ein positives PCR-Produkt mit den Primern C1 und Invx-R2 selektioniert wurde. Das korrekte Plasmid (pKGW_x) wurde mit dem Invertasengen *inv19* pKGW3 genannt, mit *res02* pKGW4, mit *inv24* pKGW6, mit *inv21* pKGW9 und mit *inv15* pKGW15 genannt.



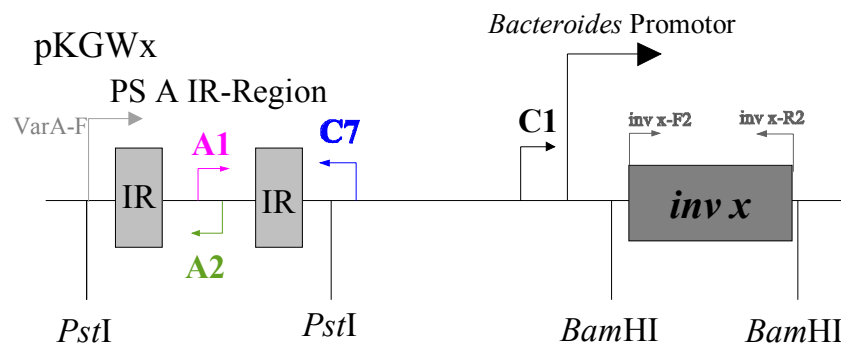


Abbildung 3: Design von pKGW2 und pKGWx

Die Orientierung der IR-Region in pKGW2 bzw. pKGWx wurde im Folgenden analog zur Promotororientierung in Richtung auf das downstream gelegene Operon im Genom von *Bacteroides fragilis* mit ON bezeichnet, wenn durch PCR ein Produkt mit den Primern A1 und C7 amplifiziert werden konnte. Konnte durch Inversion der IR-Region kein PCR-Produkt mit A1 und C7, dafür aber mit A2 und C7 amplifiziert werden, so wurde die Orientierung der IR-Region in pKGW2 bzw. pKGWx analog zur Promotororientierung weg vom downstream gelegenen Operon im Genom von *Bacteroides fragilis* mit OFF bezeichnet.

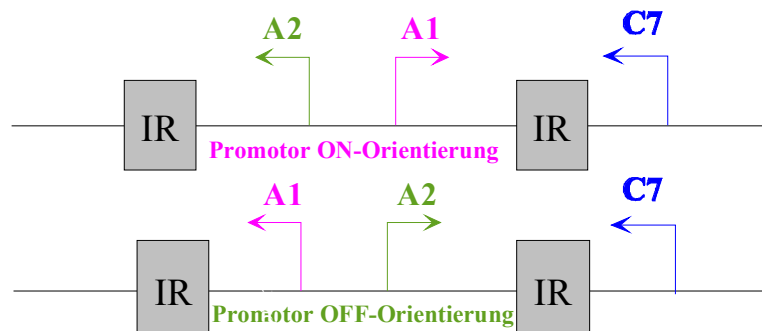


Abbildung 4: Bestimmung der Orientierung der IR-Region durch PCR-Analyse

2.4.14 Herstellung von internen Deletionsmutanten

Theorie:

Um Rückschlüsse auf die Funktion eines Gens anhand des Ausfalls seines Genprodukts zu ziehen, wurde eine Deletion im entsprechenden Gen hergestellt. Die Deletion unterbricht große Anteile seines ORFs, so daß kein sinnvolles Translationsprodukt mehr entstehen kann. Zur Herstellung einer Gendeletion werden DNA-Abschnitte, die die zu deletierende Region auf beiden Seiten flankieren, auf einer Länge von ca. 2 kbp PCR-amplifiziert. Die flankierenden DNA-Abschnitte sollen von gleicher Länge und GC-Gehalt sein, um die angestrebte homologe Rekombination an beiden Flanken mit gleicher Wahrscheinlichkeit stattfinden zu lassen. Die Flanken werden in einer 3-Reaktanden-Ligation in einen *Bacteroides*-Suicidvektor kloniert, in *E. coli* transformiert und mit PCR und Restriktionsverdau auf die korrekte Anordnung der 3 Fragmente selektioniert. Das gewünschte Suicid-Plasmid wird mittels eines konjugativen Helferplasmids in *Bacteroides fragilis* transferiert (→2.4.12).

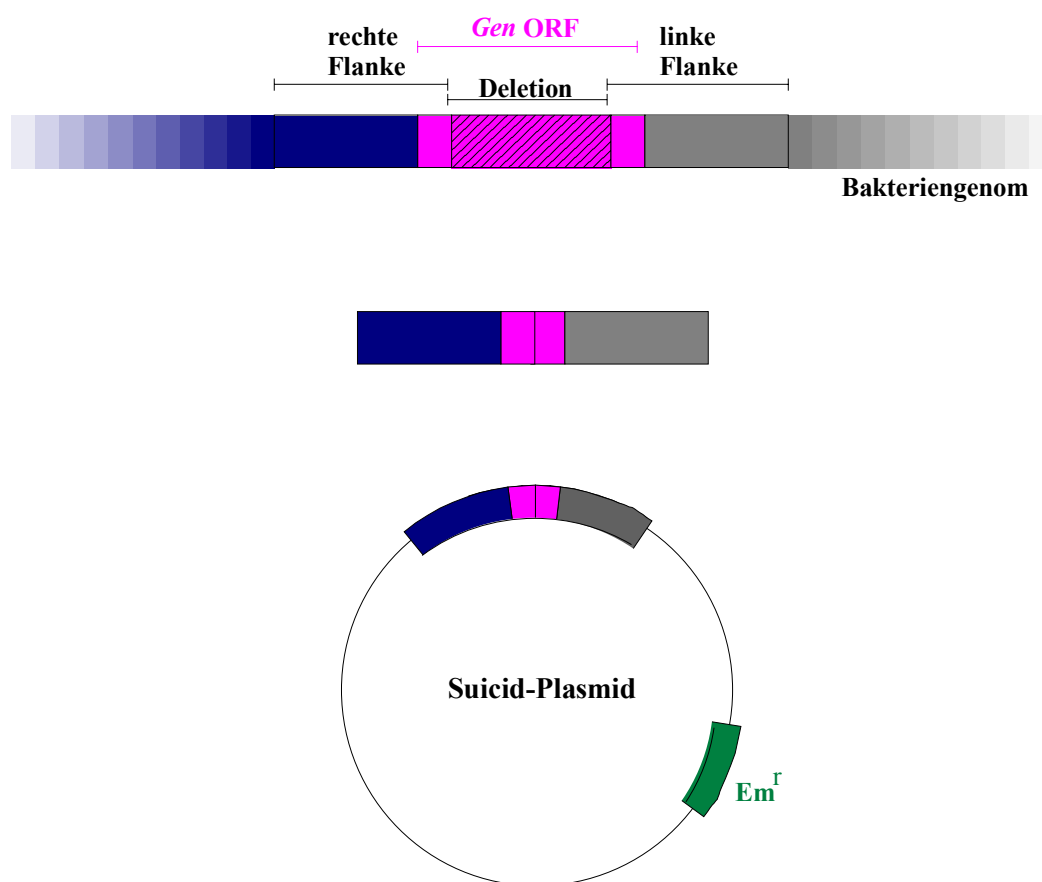


Abbildung 5: Design des Suicid-Plasmids

Das Suicidplasmid besitzt keinen Origin of Replication in *Bacteroides*. Da es sein genetisches Material nicht replizieren kann, geht dieses bei der Zellteilung verloren, wenn das Plasmid nicht mittels homologer Rekombination an den identischen DNA-Abschnitten in das Genom des Bakteriums integriert wird (1. Ereignis). Da der Vektor ein Erythromycinresistenzgen besitzt, kann mit Erythromycin für Bakterien mit rekombiniertem Plasmid, sogenannte „Cointegrates“, selektioniert werden. Erythromycinresistente Kolonien werden mit PCR-Analyse durch 2-faches Vorhandensein des Gens (eine Wildtyp- und eine Mutantenkopie) als echte „Cointegrates“ bestätigt.

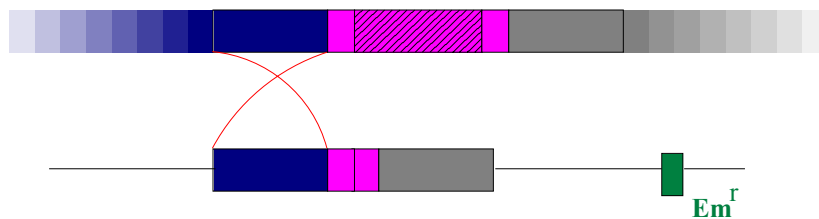


Abbildung 6: Integration des Suicid-Plasmids in das Bakteriengenom durch homologe Rekombination

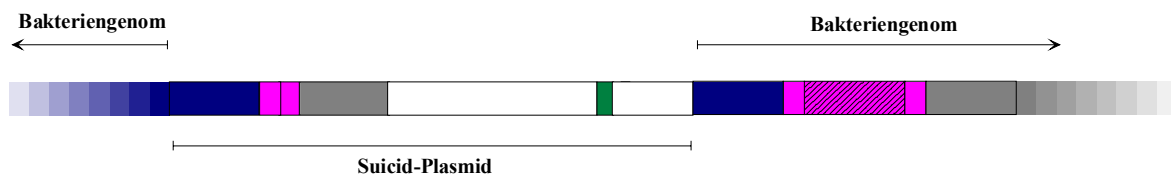


Abbildung 7: Cointegrate

Eine Cointegrate-Einzelkolonie wird ausgewählt, in Medium ohne Erythromycin kultiviert und in neues Medium überimpft. Dieser Vorgang wird 3-5 mal wiederholt, da das exponentielle Wachstum in der log-Phase bei fehlendem Selektionsdruck (Medium ohne Antibiotikum) die Auflösung des Cointegrate-Stadiums durch homologe Rekombination und anschließendes „Auskreuzen“ des Plasmids aus dem Genom (2. Ereignis) begünstigt. Wird die Integration des Plasmids in das Bakteriengenom rückgängig gemacht, bestehen zwei mögliche Ausgänge: Durch homologe Rekombination derselben Flanke, an der die Integration stattgefunden hat, kreuzt das Plasmid unverändert aus dem Genom aus, und es entsteht wieder der allelische Wild-Typ.

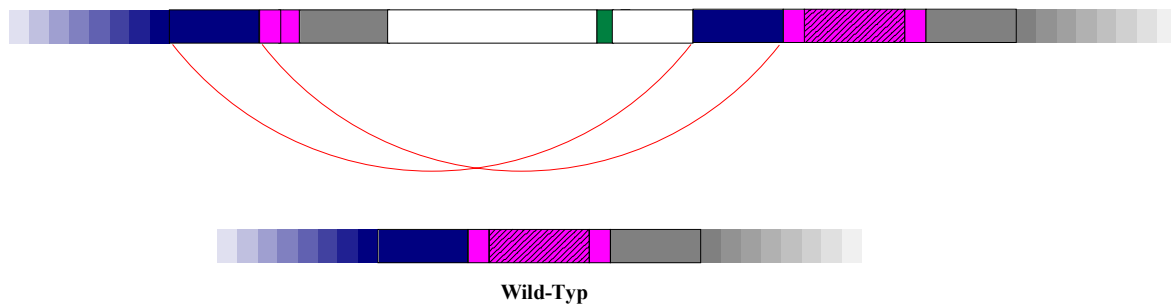


Abbildung 8: Homologe Rekombination an der Flanke, an der das Plasmid ins Genom eingetreten ist: Das Suicid-Plasmid verläßt das Bakteriengenom unverändert, der Wildtyp entsteht wieder.

Findet homologe Rekombination an der anderen Flanke statt, so verläßt das Plasmid das Genom unter Mitnahme des Wild-Typ-Gens, während das mutierte Gen im Genom verbleibt: Durch allelischen Austausch ist eine Deletionsmutante entstanden.

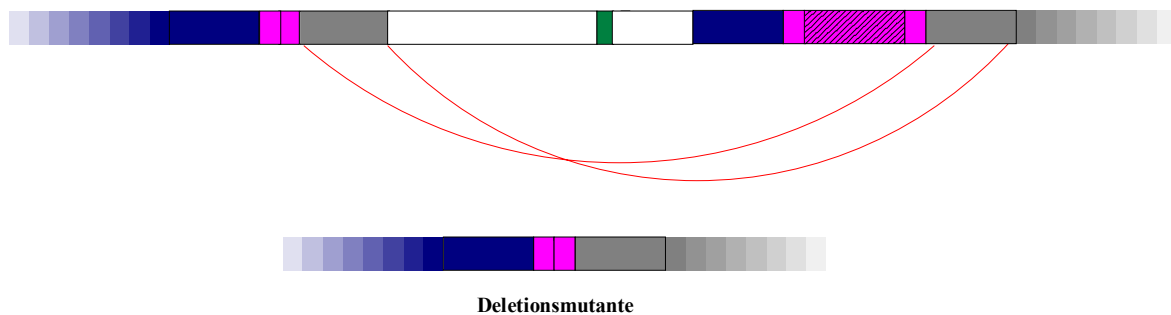


Abbildung 9: Homologe Rekombination der entfernten Flanke: Das Plasmid verläßt das Genom unter Mitnahme des WT-Gen, eine Deletionsmutante entsteht.

Zur Untersuchung der Cointegrate-Kultur auf Desintegration des Plasmids macht man sich den damit verbundenen Verlust der Erythromycinresistenz zunutze. Die Bakterien der Cointegrate-Kultur werden in verschiedenen Verdünnungen auf BHIS-Platten ausplattiert, wobei zu Grunde gelegt wird, daß eine *Bacteroides fragilis* Kultur bei einer OD_{600nm} von 0,8 10^9 Bakterien/ml enthält. Die Platten werden inkubiert, bis die Einzelkolonien einen Durchmesser von ca. 2 mm erreicht haben. Mittels eines Samt-Stempels werden die Kolonien in ihrer bestehenden Anordnung auf eine BHIS-Erythromycin-Platte übertragen. Dieser Vorgang wird als „Replica-Plating“ bezeichnet. Sobald die Kolonien auf der Antibiotika-Platte gewachsen sind, lassen sich die Kolonie-Muster der BHIS-Platten mit denen der BHIS-Antibiotika-Platten vergleichen. Findet sich an einer Stelle auf einer BHIS-Platte eine Kolonie, die an entsprechender Stelle auf der Antibiotika-Platte nicht vorhanden ist, so hat diese Kolonie durch Desintegration des Plasmids aus dem Genom ihr Erythromycinresistenzgen verloren. Alle Antibiotika-sensiblen Kolonien werden auf einer

Rasterplatte gesammelt und mittels PCR untersucht, ob es sich bei ihnen um Wild-Typ-Revertanten oder die erwünschten Deletionsmutanten handelt.

Herstellung der Deletionsmutante $\Delta res02$:

Zur Herstellung der Deletionsmutante $\Delta res02$, bei der 534bp innerhalb des 594 bp langen ORF von *res02* fehlen, wurden die flankierenden DNA-Abschnitte mit den Primern inv19D1 und inv19D2 (upstream Flanke 1,958 kbp) bzw. inv19D9 und inv19D10 (downstream Flanke 2,54 kbp) unter Verwendung von *High Fidelity Taq* bei einer Annealing Temperatur von 59°C und einer Elongationszeit von 2 min PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer tragen Restriktionssequenzen: Die an die Deletion anschließenden Enden der Flanken besitzen NcoI-Schnittstellen, die nach außen zeigenden Enden Schnittstellen für BamHI.

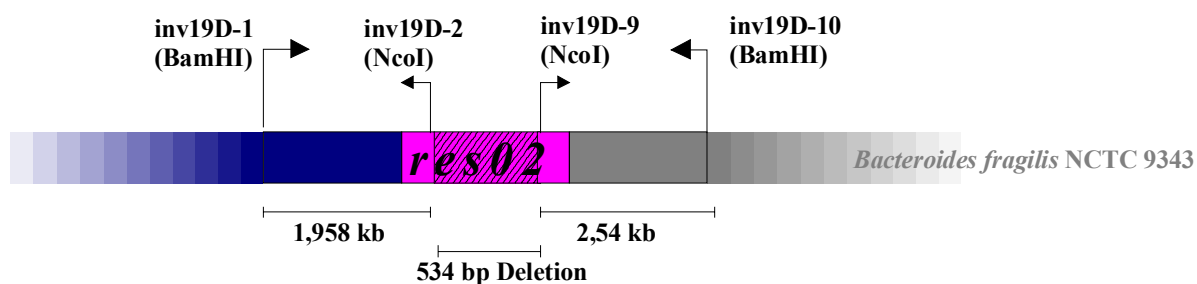


Abbildung 10: Amplifikation der flankierenden DNA-Abschnitte von $\Delta res02$

Die amplifizierten DNA-Abschnitte wurden NcoI-BamHI-restriktionsverdaut, durch Gelextraktion gereinigt und in einer 3-Reaktanden-Ligation in die BamHI-Schnittstelle des Klonierungsvektors pBlueskript II SK (Stratagene, La Jolla, Calif.) kloniert. Weiße Kolonien wurden mittels PCR (Primer Res02-R2 und Inv19-R) und Restriktionsverdau auf die gewünschte Anordnung der ligierten Fragmente untersucht. Das korrekte Plasmid wurde pKGW11 genannt. Plasmid-DNA von pKGW11 wurde unter Verwendung des Quiagen MIDI Prep Kits (Quiagen, Valencia, Calif.) präpariert, BamHI verdaut und das Insert durch Gelextraktion gereinigt. Das Insert, das die flankierenden DNA-Abschnitte vereinigt, wurde nun in einfacher Ligation in die BglII-Schnittstelle des Suicidvektors pJst55 subkloniert und in *E. coli* transformiert. Die transformierten Kolonien wurden mit PCR (Primer Res02-R2 und Inv19-R) und Restriktionsverdau auf das Vorhandensein des gewünschten Plasmids untersucht. Das Plasmid wurde pKGW10 genannt. pKGW10 wurde mit Hilfe des konjugativen Helferplasmids RK231 in *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 transferiert

(→2.4.12) und Cointegrates durch die von pJst55 codierte Erythromycinresistenz selektioniert. Alle Cointegrates wurden durch PCR-Analyse bestätigt. Eine Cointegrate-Einzelkolonie wurde in Medium ohne Erythromycin kultiviert und in neues Medium überimpft. Der Vorgang wurde dreimal wiederholt, um die Auflösung des Cointegrate-Stadiums durch homologe Rekombination zu begünstigen. Die Kultur wurde auf BHIS ausplattiert und nach drei Tagen auf Erythromycin-BHIS-Platten repliziert. Die beim Vergleich der Platten gefundenen Erythromycin-sensiblen Kolonien wurden mit den Primern Res02-R2 und Inv19-R auf den Genotyp Wild-Typ-Revertante oder Deletionsmutante untersucht.

Herstellung der Deletionsmutante $\Delta inv15$:

Zur Herstellung der Deletionsmutante $\Delta inv15$, bei der 874bp des 1000 bp umfassenden *inv15*-Gens fehlen, wurden die flankierenden DNA-Abschnitte mit den Primern inv15-1 und inv15-2 (upstream Flanke 2590 bp) bzw. inv15-3 und inv15-4 (downstream Flanke 2577 bp) unter Verwendung von *High Fidelity Taq* bei einer Annealing Temperatur von 61°C und einer Elongationszeit von 2 min 30 s PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer tragen Restriktionssequenzen: Die an die Deletion anschließenden Enden der Fanken besitzen EcoRI-Schnittstellen, die nach außen zeigenden Enden Schnittstellen für BamHI.

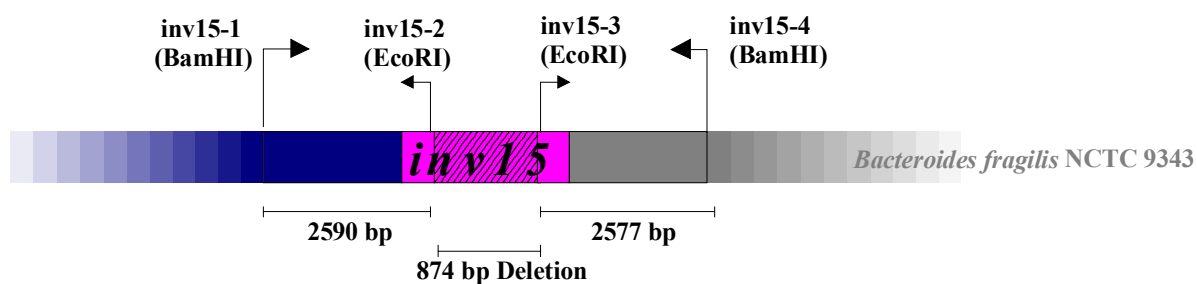


Abbildung 11: Amplifikation der flankierenden DNA-Abschnitte von $\Delta inv15$

Die amplifizierten DNA-Abschnitte wurden EcoRI-BamHI-restriktionsverdaut und durch Gelextraktion gereinigt. Die beiden Fragmente wurden in einer 3-Reaktanden-Ligation in die BglII-Schnittstelle des Suicidvektors pJst55 kloniert und in *E. coli* transformiert. Die transformierten Kolonien wurden mit PCR (Primer inv15-F2 und inv 15-R2) und Restriktionsverdau auf das Vorhandensein des gewünschten Plasmids untersucht. Das Plasmid wurde pKGW1 genannt. pKGW1 wurde mit Hilfe des konjugativen Helferplasmids RK231 in *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 transferiert und Cointegrates durch die von pJst55

codierte Erythromycinresistenz selektioniert. Alle Cointegrates wurden durch PCR-Analyse (Primer inv15-F2 und inv 15-R2) bestätigt. Eine Cointegrate-Einzelkolonie wurde in Medium ohne Erythromycin kultiviert und in neues Medium überimpft. Der Vorgang wurde dreimal wiederholt, um die Auflösung des Cointegrate-Stadiums durch homologe Rekombination zu begünstigen. Die Kultur wurde auf BHIS ausplattiert und nach drei Tagen auf Erythromycin-BHIS-Platten repliziert. Die beim Vergleich der Platten gefundenen Erythromycin-sensiblen Kolonien wurden mit den Primern inv15-F2 und inv 15-R2 auf den Genotyp Wild-Typ-Revertante oder Deletionsmutante untersucht.

2.4.15 Herstellung und Markierung von DNA-Sonden

Alle zur Hybridisierung verwendeten DNA-Sonden sind PCR-amplifizierte intern gelegene Anteile der Gene, nach denen sie benannt sind. Die DNA-Sonden variieren in ihrer Größe zwischen 527bp (inv02) und 946 bp (inv13). Sie wurden unter Verwendung von *High Fidelity* Taq gemeinsam bei einer Annealing Temperatur von 57°C und einer Elongationszeit von 1 min amplifiziert. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind unter 2.4.18 verzeichnet. Alle DNA-Proben wurden durch Gelextraktion gereinigt und mit dem ECL Direct Labeling Kit (Amersham, Piscataway, N.J.) markiert. Dazu wurden 15 µl gereinigtes PCR Produkt (entspricht ca. 50 ng DNA) für 5 min in kochendem Wasser denaturiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt, um eine erneute Renaturierung der Stränge zu verhindern. Es wurden 1xVol (15 µl) ECL-Labeling-Reagenz und 1xVol (15 µl) Glutaraldehyd zugesetzt, welches die ECL-Markierung mit der DNA-Probe verknüpft. Nach 15 min Inkubation bei 37°C sind die DNA-Sonden fertiggestellt.

2.4.16 Transfer von DNA auf Membranen (Southern Blot)

Nach der von Southern beschriebenen Methode⁷⁴ wurde elektrophoretisch aufgetrennte DNA wie folgt auf festes Trägermaterial (Nylonmembran) transferiert. Bei der DNA handelt es sich um chromosomale DNA von 44 verschiedenen *Bacteroides*-Stämmen (→ 2.2), die Chloroform-Phenol-extrahiert und EcoRI-verdaut wurden. Wie sich später zeigte, war der Restriktionsverdau nicht vollständig. Die präparierte DNA wurde gelelektrophoretisch

aufgetrennt und mit einem Lineal fotografiert, um die Auflänge der Markerbanden zu dokumentieren. Anschließend wurde die DNA im Gel depuriniert (5 min; 0.25 M HCl), denaturiert (30 min; 0.4 M NaOH) und neutralisiert (30 min; 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris/HCl, pH7). Für den DNA Transfer wurde Whatman 3MM Papier so auf eine Glasplatte gelegt, daß beide Enden in ein Pufferreservoir mit 20x SSC tauchen. Auf das Papier wurde das Gel gelegt und darauf ein in der Größe entsprechendes mit 20x SSC befeuchtetes Stück Quiabrane (Quiagen, Valencia, Calif.). Blasen zwischen Gel und Membran wurden mit einer Pasteurpipette entfernt. Darauf wurden zwei entsprechend große Stücke Whatmann Papier, ein Stapel Papierhandtücher und schließlich zum Beschweren eine Glasplatte gelegt. Diese Anordnung wurde über Nacht belassen, während sich der Kapillartransfer vollzog. Die DNA wurde auf der Membran durch UV-Bestrahlung in einem Stratalinker (Stratagen, La Jolla, Calif.) fixiert.

2.4.17 Hybridisierung von membrangebundener DNA mit ECL-markierten DNA-Sonden

Zur Prähybridisierung von Southern Blots wurde der vom Hersteller des ECL-Direct-Labeling Kits (Amersham, Piscataway, N.J.) mitgelieferte Hybridisierungspuffer gemäß dessen Empfehlungen verwendet. Dazu wurden 250 ml „Gold“-Puffer mit 5% (w/v) Blocking-Reagenz und 0,5 M NaCl versetzt und der Southern Blot in ca. 1 ml fertigem Hybridisierungspuffer pro 25 cm² Blot in einer hitzeversiegelbaren Plastiktüte bei 37°C für 1 h inkubiert. Anschließend wurde die DNA-Sonde (→2.4.15) dem Hybridisierungspuffer zugegeben und die Inkubation für ca. 2 h fortgesetzt. Nach der Hybridisierung wurde die Membran zweimal für je 20 min bei 37°C auf einem Schüttler mit Waschpuffer (0,1x SSC; 0,4% SDS) gewaschen, und das SDS des Waschpuffers durch dreimaliges Spülen mit 2x SSC entfernt. Zur Entwicklung wurden 2,5 ml Detecting-Reagenz 1 und 2,5 ml Detecting-Reagenz 2 gemischt und die Membran darin für 1 min bei RT inkubiert. Der Blot wurde in Plastikfolie eingewickelt und unverzüglich einem X-OMAT Film (Kodak) für 45 min in der Dunkelkammer exponiert. Anschließend wurde der Film entwickelt.

2.4.18 Primer

Primer zur Herstellung und Untersuchung der Expressionsplasmide

	Oligo	Sequenz 5' > 3'	Tm in °C
<i>inv15</i>	Inv15-F2	AGAAATGATTGAAGCGGTGTCT	60
	Inv15-R2	ATATATTTAAATTTGCCGCCGATA	60
<i>inv19</i>	Inv19-F2	AGTACTGATAACTCCGGTACCTCC	61
	Inv19-R2	ATGACTGATAACTAAGGTGCCTCC	61
<i>inv21</i>	Inv21-F2	TTATTTGCAACCCGAAAAGATAAT	60
	Inv21-R2	GCGAGCCCGCTAGATTGATGAAAA	59
<i>inv24</i>	Inv24-F2	AACAATATTTCAAGGTGCAAAGGT	60
	Inv24-R2	AAAACATCGTGTTTACGGGTTGT	60
<i>res02</i>	Res02-F2	TGTAATCTGCGGTGAATTATGACT	60
	Res02-R2	CGTATTTGAATGAATAGCCGTTTT	60
flippy A	Var-AF	TGTGTAAATGATAGGAGGCTAGGG	62
	Var-AR	AGAGGTTACTTTCGGGTGCG	59
Analyse	A1	ACCTTTTTTCGACCTTTTCTAAAAATC	60
Analyse	A2	ACAAAGGTAAGGCACATTTTATAAC	60
Analyse	C1	GACTTGGATACCTCACGCC	57

Primer zur Herstellung der Deletionsmutante $\Delta res02$

	Oligo	Sequenz 5' > 3'	Tm in °C
linke Flanke	Inv19-D1	AGAAATGATTGAAGCGGTGTCT	60
	Inv19-D2	ATATATTTAAATTTGCCGCCGATA	59
rechte Flanke	Inv19-D9	TTTAAGAAAGAGGAGGAGGAGTGA	60
	Inv19-D10	TACACAGAGTTTCACAGGGTTTTC	60
Analyse	Res02-R2	CGTATTTGAATGAATAGCCGTTTT	60
Analyse	Inv19-R	GAAAGAATTTAGAGTGTCTTGTTG	60

Primer zur Herstellung der Deletionsmutante $\Delta inv15$

	Oligo	Sequenz 5' > 3'	Tm in °C
linke Flanke	Inv15-1	GAGAAAGAGAATCTGATGGTACGTA	61
	Inv15-2	TCTCCATAAATCGAGTCAAAGTTC	60
rechte Flanke	Inv15-3	AGAAGAAAGGGGACAGCCTAAAA	61
	Inv15-4	CTCCCTTCCGTAACCTCCAC	60
Analyse	Inv15-F2	AGAAATGATTGAAGCGGTGTCT	60
Analyse	Inv15-R2	ATATATTTAAATTTGCCGCCGATA	60

DNA-Proben zur Southern Blot-Hybridisierung

	Oligo	Sequenz 5' > 3'	Tm in °C
<i>inv01</i>	Inv01-F	GGAGTATCACAAAGGGCGTAACATCGAC	59
	Inv01-R	CAAATGGGTAGCGAAAGAGTGACGGAG	58
<i>inv02</i>	Inv02-F	TTTGCGGGAGAAACCTCCGCTAC	57
	Inv02-R	GCCTCTTTCAGCTTCTTGACACGA	57
<i>inv03</i>	Inv03-F	GCGAGAACACGACACCATACTTA	57
	Inv03-R	CAATGCCGACAACTTCTTGTCAA	57
<i>inv04</i>	Inv04-F	TGGGATTGTGGCAACAGGGGAAAC	57
	Inv04-R	TTGGTATGGCGACGGTATGGAAC	57
<i>inv05</i>	Inv05-F	TAATGACCGAGAAAGCCGAGCCATCC	58
	Inv05-R	CGCATTTCACCAGCAGCCAGTCC	57
<i>inv06</i>	Inv06-F	GCGTTTCAAGAAAGTGATACGCTATGCC	59
	Inv06-R	CTTCAACCCGCTATGTCCGAGTAAACC	59
<i>inv07</i>	Inv07-F	ACAGGACCGAAAAATAAAAGCCACTTCCC	61
	Inv07-R	TGACCCAAAAGCTCTTTCACCGCAC	57
<i>inv08</i>	Inv08-F	GTCCAAGCGAATATGGCGAAAAATACGG	59
	Inv08-R	ATGTCCCATCAGGTCAGCAACAGAG	57
<i>inv09</i>	Inv09-F	CTACATCAAGAGATCCGAGTGAGAAACC	59
	Inv09-R	TGAGCAAGGGCATAGTGTATATCCAGAGG	60
<i>inv10</i>	Inv10-F	ACTAATCGAAAACCACATTCTGCCAGCC	59
	Inv10-R	ACGAGTTGCGAAACTATGCCTAAGTCC	58
<i>inv11</i>	Inv11-F	AGTCTTATTTTATCTCAAGCGCAAGCCCC	60
	Inv11-R	CAACTTACCGTCTTTCGCCATACCCTC	59
<i>inv12</i>	Inv12-F	AGGCAAAGAAAGGCGGAAAGCAC	58
	Inv12-R	TGCCGATGATTCTGAGCTGAGGCA	58
<i>inv13</i>	Inv13-F	GCGATCACCGTAAACAAGCGAG	57
	Inv13-R	GGTAATGCCGCATAAATCAGCGA	57
<i>inv14</i>	Inv14-F	TTTACGGGCGACCAAACAAGGCAC	57
	Inv14-R	CCACGACCGCCAATGACTGATTGATAC	59
<i>inv15</i>	Inv15-F	CGCAATGCCCATGTATATCAGCGT	57
	Inv15-R	GCTATCATCCGGTTTACCTCATCG	57
<i>inv16</i>	Inv16-F	TCCGCGCTGTCTATAACAAAGCCC	58
	Inv16-R	TTGCCTCAGAAGTATGCCCAAGCC	58
<i>inv17</i>	Inv17-F	TGGCAGTCCTTTTTCGTTTGAGGA	57
	Inv17-R	AAGCCGCTTAGTGTCTATGCGATC	57
<i>inv18</i>	Inv18-F	AGATTGTTTCTGCCCGTGCCATAGTAAACC	61
	Inv18-R	ACTATCCACAAGTTGCCGTTGCTATCC	58
<i>inv19</i>	Inv19-F	ACAGCACAGCCAATACCTACCTCTACAC	60
	Inv19-R	CTTCTTAAATCTCACGGCGGCAATCAC	60
<i>inv20</i>	Inv20-F	ACCCGCGCATAACGGACGGATAAAG	58
	Inv20-R	AGATACCGTATAAAGATCGGCACCGAGAG	61
<i>inv21</i>	Inv21-F	ACCGCCGCTGCTTACAAAGTCC	56
	Inv21-R	AATCCCGCACTGATTGCCGAAACC	57

<i>inv22</i>	Inv22-F	GGAAAGAAAAATCCCCAAACGAAGGCAG	60
	Inv22-R	ACGCGCCCAATAAACCGTTAGCTC	58
<i>inv23</i>	Inv23-F	CGTATGCGAAGTATGTGACCGTGT	58
	Inv23-R	TCGCTATTGGATGTTGAATGTTAT	57
<i>inv24</i>	Inv24-F	AAACACATGGAGGCTTACTTGAC	57
	Inv24-R	ACTCATGCCCAACATGCATTCCCT	57
<i>res01</i>	Res01-F	TCATCTATACCCGTGTTACTTCCA	57
	Res01-R	GGAATGGTAGACACGAAGGACTTA	58
<i>res02</i>	Res02-F	GCGTGAGCACAAAAGACAGAAAGCTATC	59
	Res02-R	ATACCCCATCTTCTCCGCCAATTCC	58

Primer zur Untersuchung der Orientierung der PS-Promotorregionen

	Oligo	Sequenz 5' > 3'	T _m in °C
PS A	C469	TGGAGTTTTCTCCGATTTTCAC	57
	A1	ACCTTTTTCGACCTTTTCTAAAAATC	58
	C473	AGAAAACCTCCTGGTCCTTCTTTG	57
PS B	L119	CCGGAATGCTCTGGCATATTTTTTCAGCTC	60
	B2	GTAAAGTAGCTGAACAAAGAAC	57
	L73	GCGCTCAATACACCGGCAATACGAATAAC	59
PS D	D8	AGTGGGCAAATGAATGTGGAATTAAAGGGG	60
	D19	TTTTTTAAAGATCGACAATTA	55
	D9	GGGCCTTACTGATCTTACAATCTGTAAACG	59
PS E	UpE-1	GCCTTTTCCGTTGCTTACTG	57
	UpE-2	AGGTATAAACTAAATTTTGATGTGCAA	60
	UpE-3	CGTTGAGGATAACAGCAGCA	58
PS F	UpF-1	CGTTTCATGTAAGGCGGATT	58
	UpF-2	CAGAAGAGAACAGAAAACAAAATCA	60
	UpF-3	CCAGTTCAAAGCGGAAGAAG	57
PS G	UpG-1	TTTCTTGTTGTCGTTTTG	55
	UpG-2	TCGAAACATAAAAGCAGACAGA	57
	UpG-3	ACCGCATAGCGTCAGTCTCT	56
PS H	UpH-1	CTTTGCCAGTTCCTCGTATGT	55
	UpH-2	TGATGAAATTCAGAACCGGATA	57
	UpH-3	CGCTCGTTCTTGACGATGTA	56
<i>fim</i>	15-IR1	ATATTGGGAATCAGAGACCGACT	60
	15-IR2	AAAATCCTTCCCATCTTTCAAC	60
	15-IR3	TGGATATTACTCCACGAAGTTTCC	61

2.5 Protein Biochemie und immunologische Methoden

2.5.1 SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese (PAGE) und Western Blot

Zur Herstellung der Proteinproben für die Elektrophorese wurden 1,5 ml einer *Bacteroides fragilis* ÜN-Kultur mit PBS gewaschen, das Pellet in 800 µl PBS resuspendiert, mit 200 µl 5x Precast Loading Buffer des Gelherstellers (ESA Inc., Chelmsford, Mass.) versetzt und 5 min in kochendem Wasser denaturiert. 15 µl Bakterienzellsat wurden als Probe auf ein kontinuierliches 12% SDS-Polyacrylamid Gel (ESA Inc., Chelmsford, Mass.) geladen, elektrophoretisch (PAGE) aufgetrennt und über 2 h bei 380 mA mit Standardtechnik auf eine PVDF-Membran (Immobilon; Millipore, Bedford, Mass.) transferiert (Western Transfer). Der Blot wurde zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen für 30 min bei 37°C in TBS mit 3% Skim Milk-Pulver inkubiert. Der primäre Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:3000 der Skim Milk Lösung zugegeben und die Inkubation für 1 h fortgesetzt. Der Blot wurde dreimal in TBS gewaschen und in TBS mit alkalische Phosphatase-konjugiertem Anti-Hasen-Immunglobulin G (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) in einer Verdünnung von 1:1000 erneut inkubiert. Der Blot wurde wieder dreimal mit TBS gewaschen und die Proteine, an die Antikörper gebunden sind, durch die alkalische Phosphatase in einer kolorimetrischen Reaktion mit BCIP/NBT Posphat Substrat (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) sichtbar gemacht.

2.5.2 Gewinnung von Antiseren

Die verwendeten Antiseren wurden als Auftragsarbeit von der Firma Lampire Biological Laboratories (L.A., Calif.) geliefert. Sie wurden in Kaninchen gegen ganze formalinfixierte Bakterien der Stämme *Bacteroides fragilis* NCTC 9343, *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 $\Delta inv15$ M4 und *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 $\Delta inv15$ M8 über einen Zeitraum von zwölf Wochen erzeugt, indem die Tiere dreimal im Abstand von vier Wochen geboostet wurden.

2.5.3 Adsorbtion von Antiseren mit Bakterien

Diese in L. E. Comstocks Labor gebräuchliche Methode beruht darauf, polyklonale Seren durch Adsorbtion eines Teils der Immunglobuline an ein vorgegebenes Antigenspektrum für die nicht dargebotenen Antigene spezifisch zu machen. Hierbei werden polyklonale Seren gegen *Bacteroides fragilis* WT mit lebenden Bakterien einer *Bacteroides fragilis* Mutante (hier defizient für ein Kapselpolysaccharid oder Fimbrium) inkubiert. Durch Adsorbtion von Immunglobulinen an die Oberfläche des Mutantenorganismus und nachfolgendes Abzentrifugieren der Bakterien werden aus dem Serum alle Antikörper entfernt, mit Ausnahme derer, die spezifisch gegen das von der Mutante nicht exprimierte Genprodukt gerichtet sind. Die durch Adsorbtion hergestellten spezifischen Seren sind in der Lage, das entsprechende von der Mutante nicht exprimierte Genprodukt im Western Blot beim Wild-Typ spezifisch zu detektieren.

Zur Herstellung adsorbierter Seren wurde der als Adsorbenz verwendeten *Bacteroides*-Stamm in 2 x 100 ml voll supplementierten Basal Mediums ÜN kultiviert. Die Zellen wurden in einer Sorvall-Zentrifuge bei 12 000 rpm pelletiert, in 100 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml PBS resuspendiert und das so entstandene Gesamtvolumen von ca. 3 ml in zwei Teile geteilt. Ein Teil wurde abzentrifugiert und das Pellet für den späteren Gebrauch gekühlt aufbewahrt. Der andere Teil wurde mit PBS auf ein Volumen von 10 ml gebracht und mit 100 µl des zu verwendenden Antiserums versetzt, so daß das Antiserum in einer Verdünnung von 1:100 vorliegt. Der Ansatz wurde End-über-End-rotierend für 45 min bei 37°C inkubiert, die Zellen in einem 10-ml-Sorvall-Gefäß für 10 min bei 17 000 rpm abzentrifugiert und der Überstand asserviert. In diesem Überstand wurde der zweite Teil der Bakterien resuspendiert, in gleicher Weise wie zuvor inkubiert und wieder abzentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt, auf 10 Eppendorfgefäße verteilt und erneut in einer Tischzentrifuge für 5 min bei 5 000 rpm zentrifugiert, um ihn zuverlässig von Zellkontamination zu befreien. Die einzelnen Überstände wurden asserviert und gefroren.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Phasenvariation von *Bacteroides fragilis* Kapselpolysacchariden

3.1.1 Analyse des *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 Genoms auf Homologe von *fimB* und *fimE*

Die Sequenzierung des *Bacteroides fragilis* Genoms durch die Sanger Center Microbial Pathogen Group wurde vor kurzem fertiggestellt. Um herauszufinden, ob *Bacteroides fragilis* spezifische Faktoren synthetisiert, die, ähnlich wie FimB und FimE in *E. coli*, für die Inversion der Promotorregionen upstream der Kapselpolysaccharidsyntheseloci verantwortlich sind, wurde das Genom von *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 auf das Vorhandensein von *fimB*- und *fimE*-Homologen (Gene Bank Accession No. X03923) untersucht (→2.1). *Bacteroides fragilis*-Orthologe, die bei dieser Suche gefunden wurden, wurden erneut benutzt, um weitere Orthologe zu identifizieren. Auf diese Weise fanden sich 25 homologe Gene, die alle Mitglieder der Familie der Tyrosin-sequenzspezifischen Rekombinasen (TsR) sind. Die 25 neu entdeckten Gene wurden, abgeleitet von ihrer putativen Funktion als Invertasen, mit *inv01* bis *inv25* bezeichnet. Eine Untersuchung ihrer Genprodukte untereinander auf globale Übereinstimmung in Aminosäuresequenz und -motivik mittels ClustalW[®]-Analyse (Wisconsin Package 9.1; Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) zeigte, daß sich die Invertasen gemäß ihrer Proteinverwandschaft weiter in drei Unterfamilien unterteilen lassen. Mitglieder der einzelnen Unterfamilien wurden als Invertasen der Gruppe A, B und C bezeichnet, wobei Invertasen der Gruppe C die größte Homologie zu FimB und FimE besitzen. Das Ergebnis der ClustalW[®]-Analyse ist als Baumdiagramm in Abbildung 12 dargestellt.

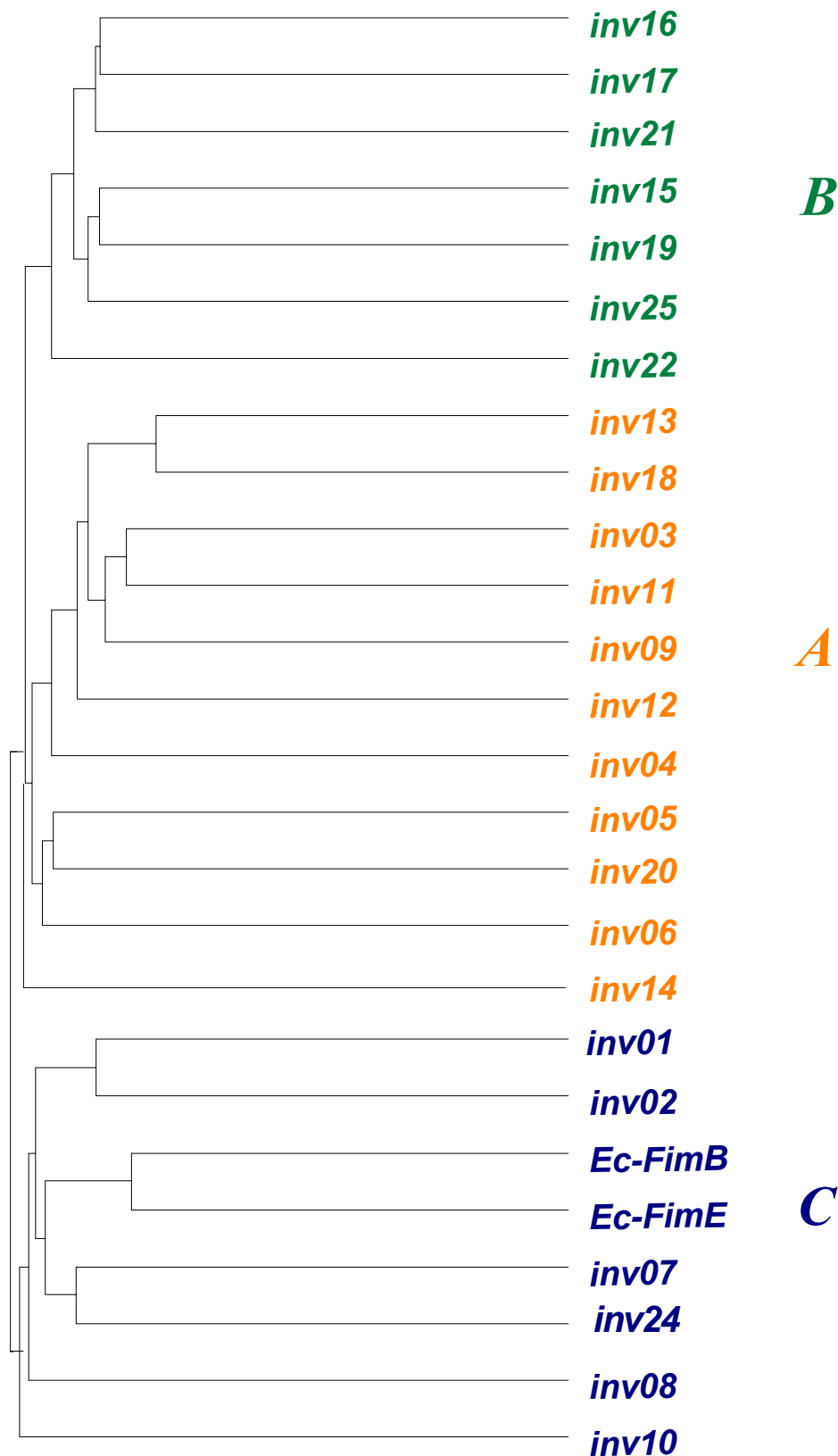
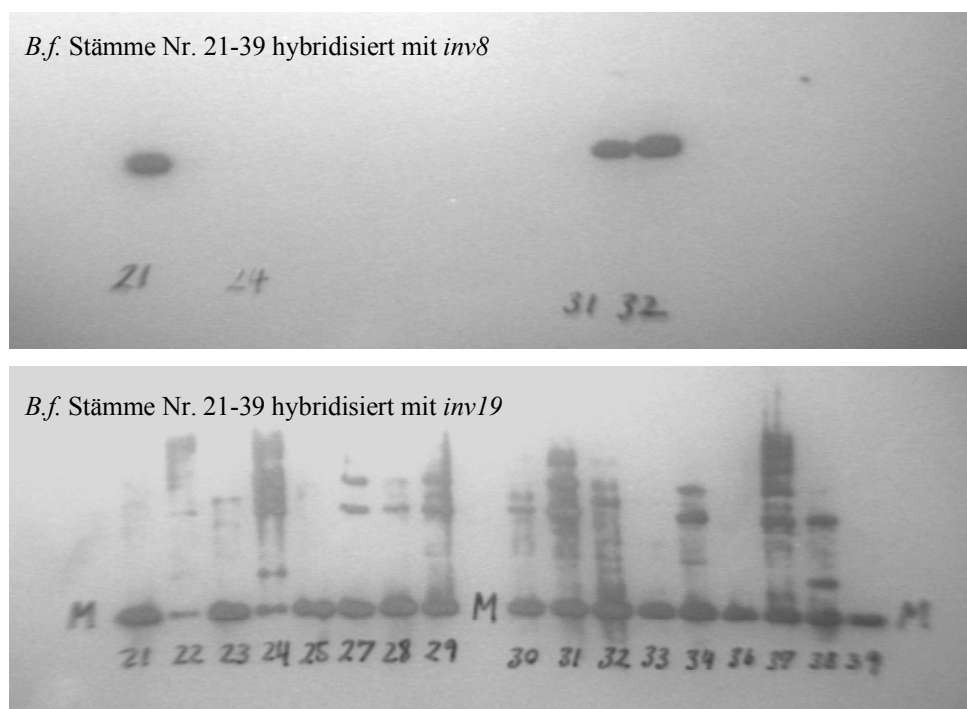


Abbildung 12: Verwandtschaft der 25 Mitglieder der Familie der Tyrosin-Rekombinasen, die im Genom von *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 enthalten sind. Die Darstellung basiert auf globaler Übereinstimmung in Aminosäuresequenz und -motivik und wurde durch ClustalW[®]-Analyse ermittelt. Zugehörigkeit zu den Unterfamilien A, B, und C ist in den Farben gelb, grün und blau hervorgehoben.

Um der Frage nachzugehen, ob eines dieser Genprodukte für die Inversion der Promotorregionen upstream der Kapselpolysaccharidsyntheseloci verantwortlich ist, wurde folgende Überlegung angestellt: Die genetische Charakterisierung der Polysaccharidsyntheseloci hat ergeben, daß eine große Zahl verschiedener Polysaccharid-Serotypen für jedes einzelne der acht verschiedenen Kapselpolysaccharide innerhalb der Spezies *Bacteroides fragilis* existiert^{18, 19} (L. E. Comstock, C. M. Krinos, unveröffentlichte Daten). Demgegenüber liegen die DNA-Abschnitte, die die Polysaccharidsyntheseloci flankieren und die Inverted Repeat-flankierten DNA-Elemente mit den Promotorregionen enthalten, in allen untersuchten *Bacteroides fragilis*-Stämmen konserviert vor^{17,18} (L. E. Comstock, C. M. Krinos, unveröffentlichte Daten). Wir schließen daraus, daß die Faktoren, die eine Inversion der umkehrbaren DNA-Elemente herbeiführen, in der Spezies *Bacteroides fragilis* ebenfalls konserviert vorliegen müssen.

Um die 25 Tyrosin-Rekombinasen auf ihre Konservierung innerhalb der Spezies *Bacteroides fragilis* zu untersuchen und damit gegebenenfalls die Liste der möglichen Kandidatengene einzuengen, wurde EcoRI verdaute chromosomale DNA von 44 verschiedenen *Bacteroides fragilis*-Stämmen¹⁸ mittels Southern Blot-Analyse mit intern gelegenen Segmenten der 25 *inv*-Gene als DNA-Sonden auf die Konservierung der Invertasengene hin überprüft. Stellvertretend für die Vielzahl der Einzelerperimente ist ein Southern Blot exemplarisch in Abbildung 13 dargestellt.



B.f. Stämme Nr. 21-39 hybridisiert mit *inv15*

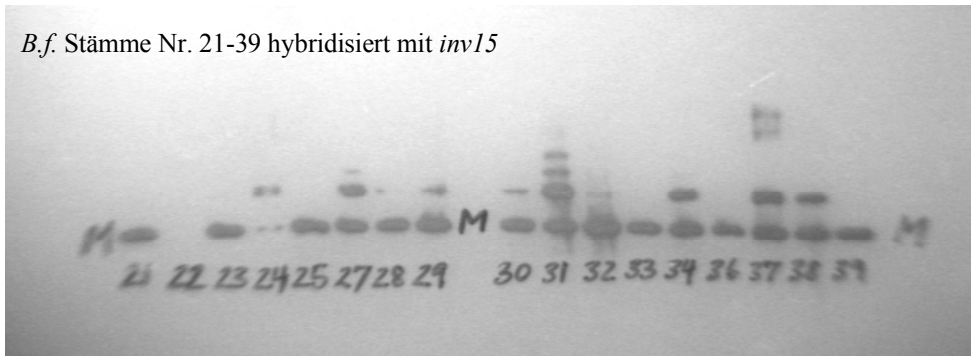


Abbildung 13: Exemplarische Darstellung von Southern Blot-Analysedaten. Die Gene *inv15* und *inv19* erscheinen in allen gezeigten Stämmen Nr. 21-39 konserviert, während *inv08* nur sporadisch in einzelnen *B.f.*-Stämmen, hier Nr. 21, 24, 31 und 32, vorkommt. Die unterschiedliche Intensität der Banden (Nr. 22 und Nr. 24 getestet mit *inv15* sind kaum zu sehen) erklärt sich aus den stark schwankenden Mengen an *EcoRI* verdauter chromosomaler DNA, die eingesetzt wurden.

Die Ergebnisse der gesamten Southern-Analyse fassen die Tabellen 2, 3 und 4 zusammen. Bereiche unterschiedlicher Farbintensität in den Tabellen signalisieren drei verschiedene Serien von Southern Blot-Analysen. Zeigte sich eines der zu testenden Gene bereits in der ersten Serie, also bei einem Drittel der Teststämme, als nicht konserviert, wurde auf eine weitere Testung des Gens in den verbleibenden zwei Dritteln der Stämme verzichtet. Daraus ergeben sich freie Bereiche innerhalb der Tabellen.

	Group A									
	inv13	inv18	inv03	inv11	inv09	inv12	inv04	inv05	inv20	inv06
9343			+	+			+			
US365			-	-			+			
US332			+	-			+			
638R			+	+			+			
379			-	-			+			
38310			-	-			+			
44355			-	-			+			
B16			-	-			+			
US324			+	-			+			
US357			-	-			+			
US326			-	-			+			
US1206			-	-			+			
US388			-	-			+			
US390			+	-			+			
US52540			-	-			+			
US2244			+	-			+			
B35			+	-			+			
B110	+				-	+		-		
B124	-				-	+		+		
PA5	-				-	-		-		
17905	-				+	-		+		
13141	+				-	-		+		
45703	-				-	-		-		
US398	-				-	-		+		
CM11	+				-	+		+		
B272	-				-	+		-		
CM3	-				-	-		+		
CM12	+				-	-		+		
2429	+				-	-		-		
26877	+				-	+		+		
B117	+				-	-		+		
1279-2	-				-	-		-		
1284-2		+							+	+
1281262I		-							+	+
1285531I		-							+	+
B356772I		+							+	+
1279155I		-							+	-
1277810I		-							+	+
12775L1II		-							+	-
1291662III		-							+	+
1287245I		+							+	+
12905-23V		-							+	+
IL89375II		-							+	+
23745		+							+	+

Tabelle 2: Southern Blot-Analyse von 44 *Bacteroides fragilis* Stämmen mit Invertasen der Gruppe A

	Group B						
	inv15	inv19	inv16	inv17	inv21	inv22	inv14
9343	+		+	-			
US365	+		+	-			
US332	+		-	+			
638R	+		+	-			
379	+		+	+			
38310	+		+	-			
44355	+		-	+			
B16	+		+	+			
US324	+		+	-			
US357	+		+	+			
US326	+		-	+			
US1206	+		+	-			
US388	+		+	+			
US390	+		+	-			
US52540	+		-	+			
US2244	+		+	+			
B35	+		+	+			
B110	+	+		+			-
B124	+	+		-			+
PA5	+	+		-			-
17905	+	+		-			+
13141	+	+		-			-
45703	+	+		-			+
US398	+	+		+			+
CM11	+	+		-			+
B272	+	+		+			+
CM3	+	+		-			+
CM12	+	+		+			+
2429	+	+		-			+
26877	+	+		+			+
B117	+	+		+			+
1279-2	+	+		+			+
1284-2	+	+		-	+	+	
1281262I	+	+		+	+	+	
1285531I	+	+		+	+	+	
B356772I	+	+		-	+	+	
1279155I	+	-		-	+	-	
1277810I	+	+		+	+	-	
12775L1II	+	+		-	+	+	
1291662III	+	+		-	+	+	
1287245I	+	+		-	+	+	
12905-23V	+	+		+	+	+	
IL89375II	+	+		-	+	+	
23745	+	+		+	+	+	

Tabelle 3: Southern Blot-Analyse von 44 *Bacteroides fragilis* Stämmen mit Invertasen der Gruppe B

Group C						
	inv01	inv02	inv07	inv24	inv08	inv10
9343	+		+	+		
US365	+		+	+		
US332	+		-	+		
638R	+		+	+		
379	+		+	+		
38310	+		+	+		
44355	+		-	+		
B16	+		+	+		
US324	+		+	+		
US357	+		+	+		
US326	+		+	+		
US1206	+		+	+		
US388	+		+	+		
US390	+		+	+		
US52540	+		+	+		
US2244	+		+	+		
B35	+		+	+		
B110				+	+	
B124				+	-	
PA5				+	-	
17905				+	-	
13141				+	-	
45703				+	-	
US398				+	-	
CM11				+	+	
B272				+	+	
CM3				+	-	
CM12				+	-	
2429				+	-	
26877				+	-	
B117				+	-	
1279-2				+	-	
1284-2	+	+		+		+
1281262I	+	-		+		-
1285531I	+	-		+		-
B356772I	+	-		+		-
1279155I	+	-		+		-
1277810I	+	+		+		-
12775L1III	+	-		+		-
1291662III	+	-		+		-
1287245I	+	-		+		-
12905-23V	+	-		+		-
IL89375II	+	-		+		-
23745	+	-		+		-

Tabelle 4: Southern Blot-Analyse von 44 *Bacteroides fragilis* Stämmen mit Invertasen der Gruppe C

Die Invertasengene *inv01*, *inv04*, *inv15*, *inv19*, *inv20*, *inv21* und *inv24* zeigten sich in allen getesteten *Bacteroides fragilis*-Stämmen konserviert und erfüllen damit eine notwendige Bedingung als Kandidatengene für die Invertase, die die Umkehrung der Promotorregionen der Kapselpolysaccharidsyntheseloci herbeiführt.

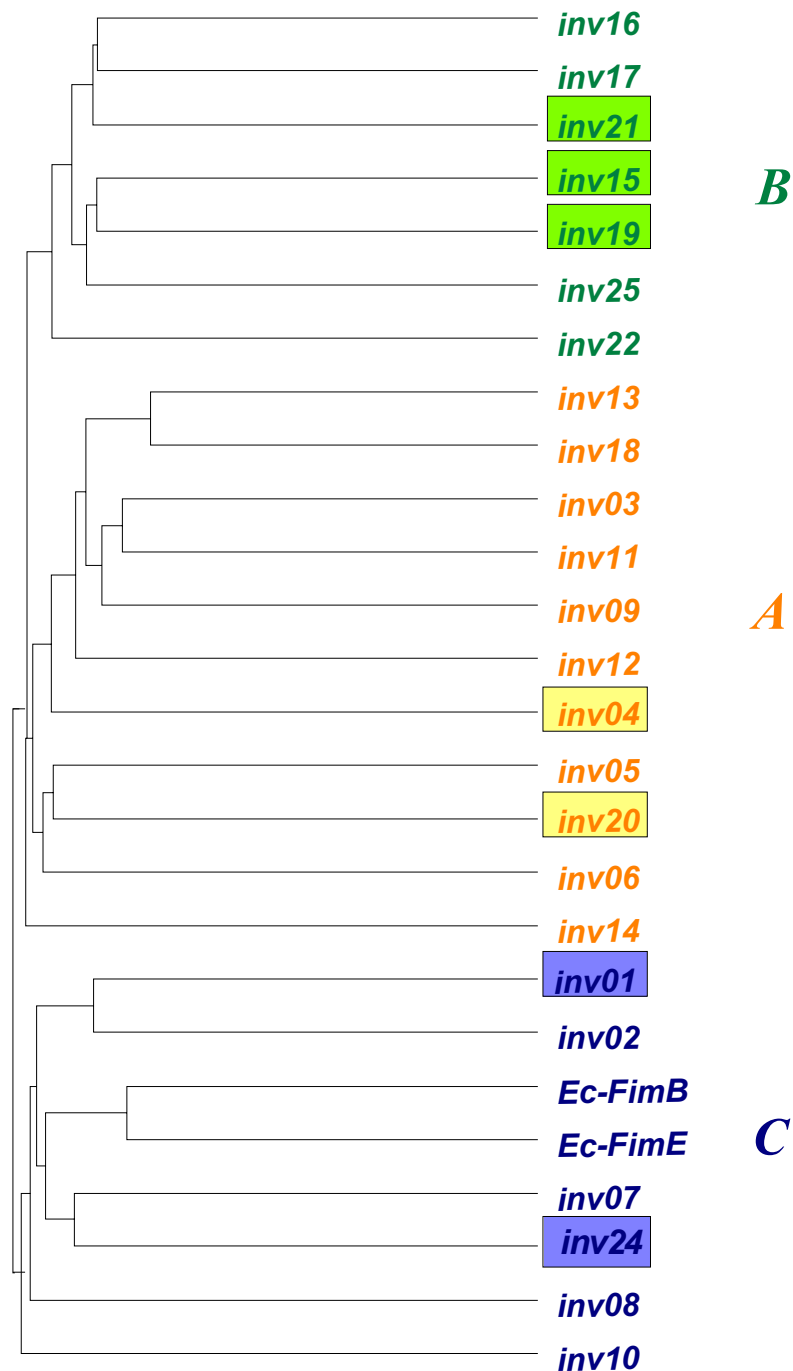


Abbildung 14: Verwandtschaft der 25 Tyrosin-Rekombinasen. Die Invertasengene *inv01*, *04*, *15*, *19*, *20*, *21* und *inv24* liegen in allen getesteten *Bacteroides fragilis* Stämmen konserviert vor. Sie sind im Baumdiagramm schattiert dargestellt.

3.1.2 Identifikation einer Serin-Rekombinase upstream *inv19*

Eine eingehende Analyse der DNA-Abschnitte, die die konservierten Invertasengene flankieren, enthüllte direkt upstream von *inv19* ein weiteres Gen, welches bezogen auf *inv19* gegenläufig transkribiert wird, so daß die Startcodons beider Gene nur 15 Basenpaare voneinander entfernt zu liegen kommen. Die Gene sind von fast identischem GC-Gehalt, was die Vermutung zuläßt, daß sie gemeinsam erworben wurden. Analyse der Sequenz des neuen Gens ergab, daß dieses ebenfalls für eine sequenzspezifische Rekombinase kodiert. Während *Inv19* die für die Tyrosin-sequenzspezifischen Rekombinasen (TsR) typische λ -Phage-Integrasendomäne pfam00589₇ besitzt, weist das neu entdeckte Gen eine 139 Aminosäuren lange Konsensus-Sequenz (pfam00239)₇ auf, die für Serin-sequenzspezifische Rekombinasen (SsR), die andere große Familie sequenzspezifischer Rekombinasen, charakteristisch ist. Um mögliche weitere Serin-sequenzspezifischer Rekombinasen zu detektieren, wurde das *Bacteroides fragilis* Genom nach pfam00239-Motiven untersucht. Dabei fanden sich neben dem bereits bekannten SsR-Gen „*upstream inv19*“ zwei weitere Serin-Rekombinasen. Größe und Aminosäuresequenz der Serin-Rekombinase „Upstream *inv19*“ sowie einer der beiden anderen Serin-Rekombinasen wiesen diese als Vertreter des Resolvasen/Invertasen-Zweigs der Familie Serin-sequenzspezifischer Rekombinasen aus. Die dritte Serin-Rekombinase konnte anhand von Größe und Homologie klar dem Zweig der „großen Serin-Rekombinasen“ zugerechnet werden, die Integration₅₂, Exzision₁₅ und Transposition₈₆, aber keine Inversion von DNA-Fragmenten katalysieren. Sie schied damit als Kandidat für die gesuchte DNA-Invertase aus. Die beiden anderen Serin-sequenzspezifischen Rekombinasen wurden in Abgrenzung zu den zuvor als Invertasen bezeichneten TsR-Genen Resolvase 01 und Resolvase 02 (ehemals „Upstream *inv19*“) genannt.

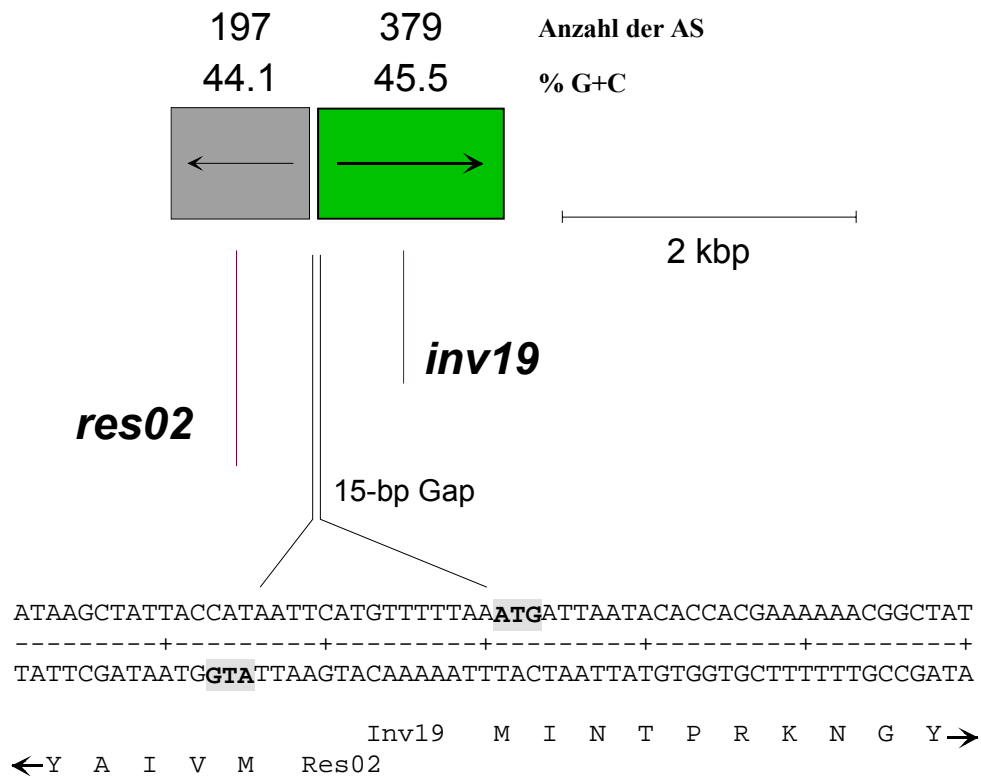


Abbildung 15: Beziehung zwischen *res02* und *inv19*

Southern Blot-Analyse der beiden neuen Gene *res01* und *res02* auf ihre Konservierung im Genom der 44 bekannten *Bacteroides fragilis*-Teststämme ergab, daß *res01* nur sporadisch in einzelnen *Bacteroides fragilis*-Stämmen vorkommt, während *res02* in allen untersuchten Stämmen konserviert vorliegt (Tabelle 5). Die strenge Konservierung einer weiteren, von den Tyrosin-Rekombinasen evolutionär und mechanistisch zu unterscheidenden Rekombinase im Genom von *Bacteroides fragilis*, ihre lokale Beziehung zu *inv19* sowie der Umstand, daß die Gene gegenläufig transkribiert und dabei möglicherweise gemeinsam reguliert werden, steigerten das Interesse an Res02 und Inv19. Res02 wurde in die nachfolgenden Überlegungen zur Untersuchung potentieller Kandidatenresolvasen, die die Inversion der Promotorregion upstream der Kapselpolysaccharidsyntheseloci herbeiführen, miteinbezogen.

	resolvases			resolvases	
	res01	res02		res01	res02
9343	+	+	45703		+
US365	-	+	US398		+
US332	-	+	CM11		+
638R	-	+	B272		+
379	+	+	CM3		+
38310	-	+	CM12		+
44355	-	+	2429		+
B16	-	+	26877		+
US324	-	+	B117		+
US357	-	+	1279-2		+
US326	-	+	1284-2		+
US1206	-	+	1281262I		+
US388	-	+	1285531I		+
US390	+	+	B356772I		+
US52540	-	+	1279155I		+
US2244	+	+	1277810I		+
B35	+	+	12775L1II		+
B110		+	1291662III		+
B124		+	1287245I		+
PA5		+	12905-23V		+
17905		+	IL89375II		+
13141		+	23745		+

Tabelle 5: Southern Blot-Analyse von 44 *Bacteroides fragilis* Stämmen mit *res01* und *res02*

3.1.3 Herstellung eines Expressionsplasmids zur Simulation der Rekombinaseaktivität der Kandidatengene

Eine häufig verwendete Methode zur Untersuchung eines unbekanntes Gens besteht in der Herstellung einer Deletionsmutanten, um anhand des Ausfalls seines Genprodukts Rückschlüsse auf seine Funktion zu ziehen. Diese Herangehensweise ist wissenschaftlich präzise, doch für eine erste Einschätzung der Funktion mehrerer möglicher Kandidatengene recht aufwendig. Um auf einfachere Weise mehr über die Aktivität der konservierten Rekombinasen und ihre potentielle Wirkung auf die Promotorregionen der Kapselpolysaccharidsyntheseloci zu erfahren, wurde ein Expressionsplasmid konstruiert, indem sich die Aktivität der Kandidatengene auf die invertierbaren Promotorregionen simulieren läßt. Das Expressionsplasmid enthält die komplette Inverted Repeat-flankierte Promotorregion von PS A und jeweils eines der zu testenden, konservierten Rekombinasengene. Diese werden von einem *Bacteroides*-Promotor bekannter Aktivität exprimiert, der auf dem Vektor enthalten ist. Das Expressionsplasmid mit der invertierbaren Promotorregion von PS A, jedoch ohne Rekombinasengen, dient als Kontrolle. Alle Plasmide werden in *E. coli* transformiert und durch Konjugation in *Bacteroides vulgatus* überführt. *Bacteroides vulgatus* ist eine *Bacteroides*-Spezies, die weder Sequenzen ähnlich den beschriebenen Inverted Repeats besitzt noch selbst Faktoren synthetisiert, die auf diese wirken können (L. E. Constock, unveröffentlichte Daten). Demnach kann die invertierbare Promotorregion im Expressionsplasmid durch *Bacteroides vulgatus* nicht invertiert werden (Kontrolle). Findet nach Expression eines bestimmten Rekombinasengens im Plasmid dennoch Inversion der Inverted Repeat-flankierten Promotorregion statt, ist diese auf die direkte Einwirkung des entsprechenden Genprodukts zurückzuführen.

Da Überexpression eines Faktors in einem Expressionsplasmid mangelnde Substratspezifität kompensieren kann, müssen Rekombinasen, die im Modellversuch die Inversion der Promotorregion herbeiführen können, durch Herstellung einer Deletionsmutanten überprüft und bestätigt werden.

Zur Konstruktion des Basisplasmids wurde der *E. coli*-*Bacteroides* Shuttle Vektor pFD340 verwendet. Er besitzt einen Origin of Replication (*ori*) in beiden Spezies. Daher werden alle Plasmide zunächst in *E. coli* transformiert und dann in *Bacteroides vulgatus* mittels eines konjugativen Helferplasmids überführt. pFD340 besitzt eine für jede Spezies spezifische Antibiotikaresistenz, durch die das Plasmid einfach selektioniert werden kann. Außerdem

enthält pFD340 einen starken *Bacteroides*-Promotor, der ihn als Expressionsvektor auszeichnet. In die PstI-Schnittstelle dieses Vektors wurde stellvertretend für die sieben invertierbaren Promotorregionen der Kapselpolysaccharide ein DNA-Fragment mit der IR-Region von PS A in der Promotor-ON-Orientierung kloniert. Upstream und downstream der Inverted Repeats, der Stelle, an der durch Rekombination die Inversion stattfinden soll, wurde zusätzliche DNA-Sequenz belassen, um weitere für eine Inversion potentiell notwendige „cis-acting Factors“ nicht zu übergehen. Das Plasmid wurde in *E. coli* transformiert und pKGW2 genannt.

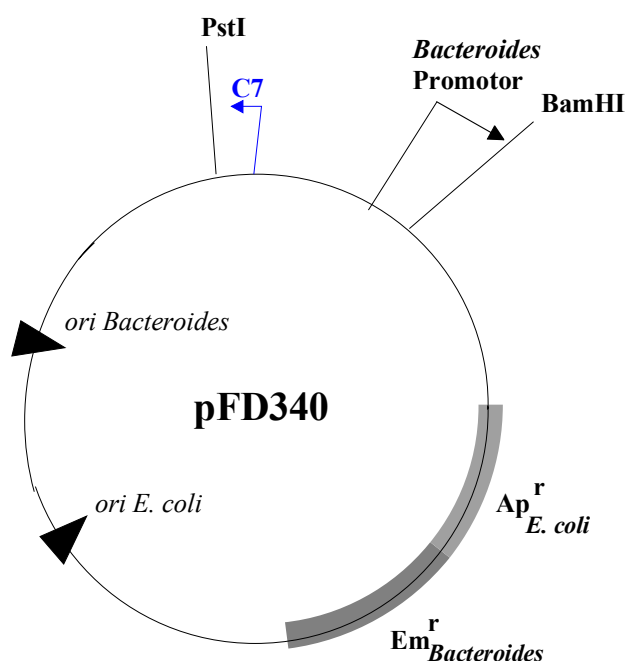


Abbildung 16: Expressionsvektor pFD340

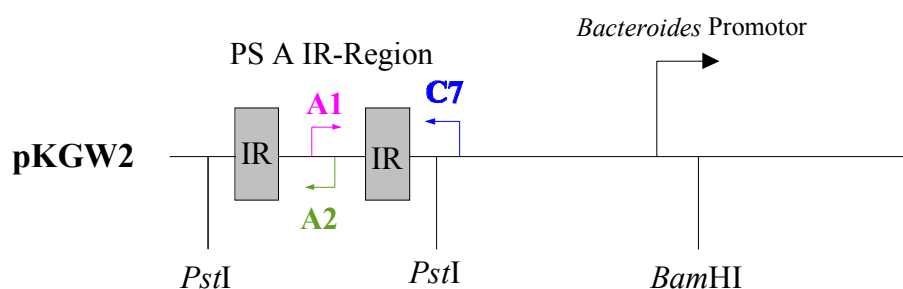
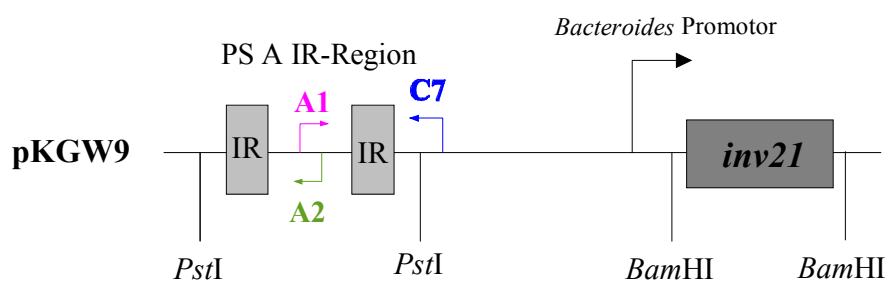
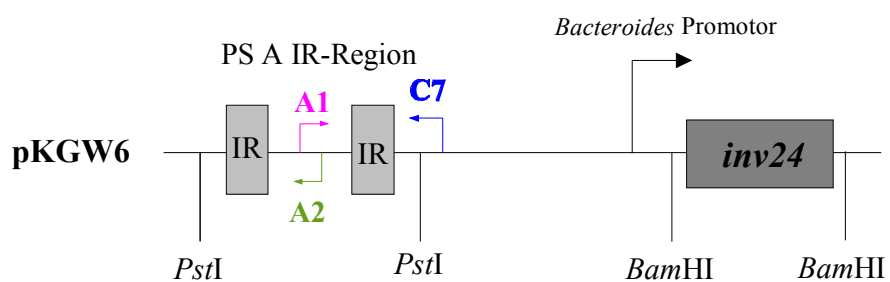
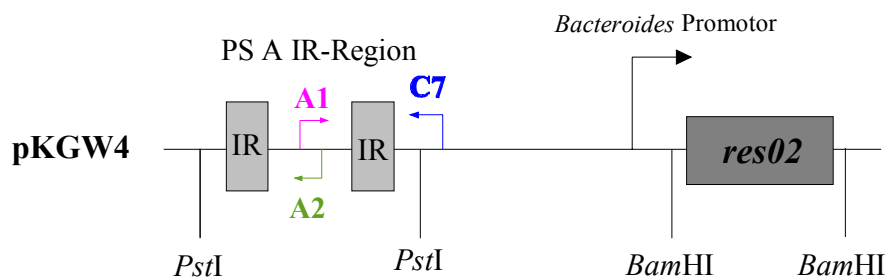
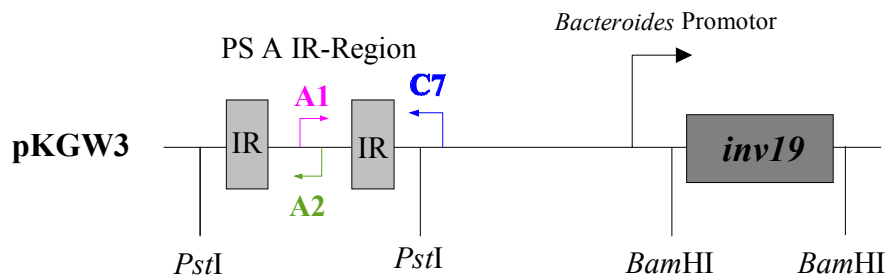


Abbildung 17: Konstruktion des Basisplasmids pKGW2

pKGW2 stellte die Basis für das eigentliche Expressionsplasmid dar und diente im Versuch als Kontrolle. In dieses Konstrukt wurden in einem zweiten Schritt die konservierten Rekombinasene in die BamHI Schnittstelle kloniert, so daß die Expression des Gens vom

Vektor-eigenen Promotor aus stattfinden kann. Die Expressionsplasmide wurden in *E. coli* transformiert. pKGW2 mit *inv19* wurde pKGW3, pKGW2 mit *res02* pKGW4, pKGW2 mit *inv24* pKGW6, pKGW2 mit *inv21* pKGW9 und pKGW2 mit *inv15* pKGW15 genannt.



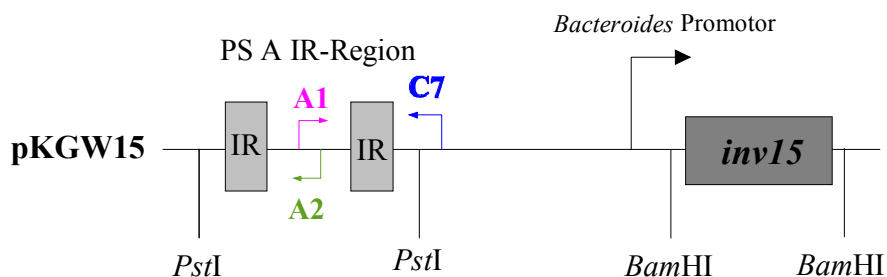


Abbildung 18: Konstruktion der Expressionsplasmide

Die Expressionsplasmide wurden mit Hilfe des konjugativen Helferplasmids RK231 in den Stamm *Bacteroides vulgatus* 8242 überführt und Plasmid DNA mittels PCR auf Inversion der Promotorregion überprüft.

Um die Orientierung der Promotorregion zu bestimmen, wurden die Primer A1 und A2 entworfen, die innerhalb der Inverted Repeats auf unterschiedlichen Strängen liegen und damit in verschiedene Richtungen zeigen. Bei gegebener Orientierung der Promotorregion kann also nur einer der beiden Primer mit dem downstream gelegenen Vektor-basierten Primer C7 ein PCR-Produkt liefern. Die Orientierung der Promotorregion in den Expressionsplasmiden wurde im Folgenden, analog zur Promotororientierung in Richtung auf das downstream gelegene Operon im Genom von *Bacteroides fragilis*, mit ON bezeichnet, wenn durch PCR aus A1 und C7 ein Produkt entsteht, und umgekehrt mit OFF bezeichnet, wenn mit A2 und C7 ein Produkt amplifiziert werden kann. Ein PCR-Produkt von beiden Primerpaaren kann nur dann amplifiziert werden, wenn die Expression der „richtigen“ Rekombinase eine Inversion der Promotorregion herbeiführt, so daß Kopien der Plasmid-DNA gleichzeitig in beiden Orientierungen vorliegen.

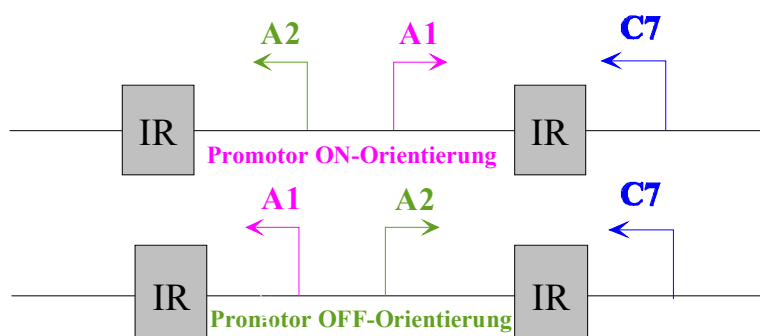


Abbildung 19: Untersuchung der IR-Region auf Orientierung des Promotors

Um sicherzustellen, daß die nachfolgenden Experimente auf korrekten Annahmen basieren, wurde mit der Analyse des Kontrollplasmids pKGW2 begonnen. DNA von fünf Plasmid-tragenden *Bacteroides vulgatus* Einzelkolonien wurde mit den Primerpaaren A1 + C7 bzw. A2 + C7 auf Amplifikation eines PCR-Produktes untersucht. Alle fünf untersuchten Einzelkolonien zeigen nur ein PCR-Produkt mit den Primern A1 und C7, welche die Promotorregion in der ON-Orientierung amplifizieren, so wie sie in den Vektor kloniert wurde. Ein Produkt mit den Primern A2 und C7, welche die IR-Region in OFF-Orientierung amplifizieren, war nicht darstellbar. Die Analyse des Kontrollplasmids bestätigte unsere bestehenden Daten, daß *Bacteroides vulgatus* keine Faktoren synthetisiert, die die Umkehrung der IR-Region herbeiführen können.

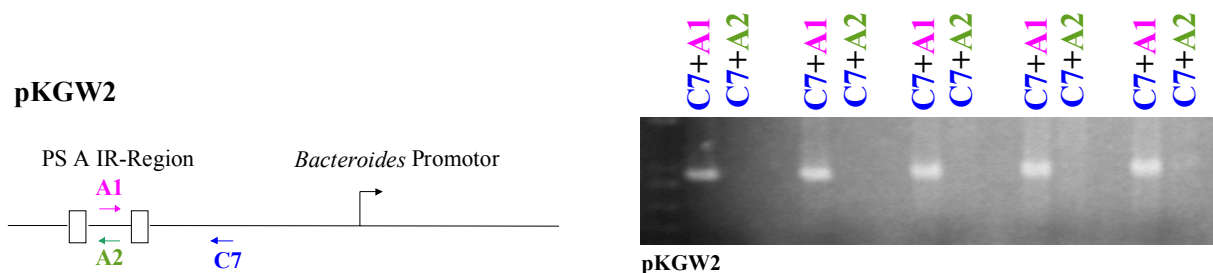


Abbildung 20: PCR Analyse fünf verschiedener Einzelkolonien von pKGW2 in *Bacteroides vulgatus* auf Orientierung der IR-Region

Zur Analyse der Orientierung der IR-Region in den Expressionsplasmiden pKGW3, pKGW4, pKGW6, pKGW9 und pKGW15 wurde erneut DNA von fünf *Bacteroides vulgatus* Einzelkolonien, die das jeweilige Plasmid tragen, mit den Primerpaaren A1 und C7 bzw. A2 und C7 auf Amplifikation eines PCR-Produktes untersucht. Von allen Plasmiden pKGW3, pKGW4, pKGW6, pKGW9 und pKGW15 (nicht gezeigt) konnte mit den Primern A1 und C7 ein Produkt amplifiziert und damit die IR-Region in der ON-Orientierung dargestellt werden. In pKGW6, pKGW9 und pKGW15 (nicht gezeigt) war mit den Primern A2 und C7, welche die IR-Region in OFF-Orientierung repräsentieren, kein Produkt amplifizierbar. In den Plasmiden pKGW3 und pKGW4 hingegen wurde zusätzlich ein Produkt mit den Primern A2 und C7 amplifiziert. Da PCR-Produkte von beiden Primerpaaren nur entstehen können, wenn Kopien der Plasmid-DNA gleichzeitig in beiden Promotororientierungen vorliegen, muß die Expression der „gesuchten“ Rekombinasen in pKGW3 und pKGW4 die Inversion der Promotorregion von ON nach OFF herbeigeführt haben.

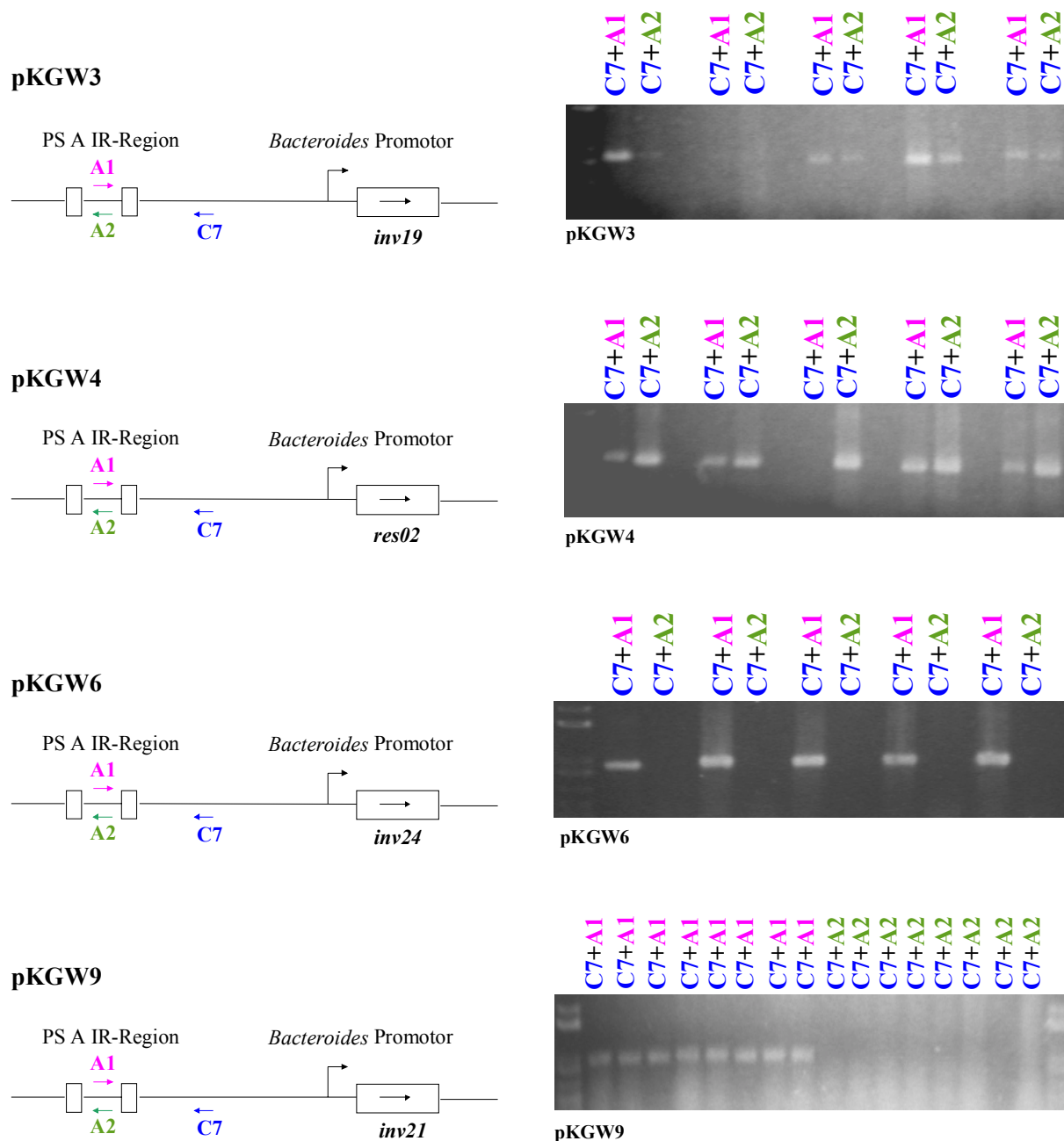


Abbildung 21: PCR Analyse 5 verschiedener Einzelkolonien von pKGW3, pKGW4, pKGW6, pKGW9 und pKGW15 in *Bacteroides vulgatus* zur Bestimmung der Orientierung der IR-Region. Von allen Plasmiden kann mit den Primern A1 und C7 ein Produkt amplifiziert werden, welches die IR-Region in der bestehenden ON-Orientierung repräsentiert (pKGW3, Kolonie Nr.2, mit A1 und C7 nur schwach zu sehen, ist ebenfalls positiv). Von den Plasmiden pKGW3 und pKGW4 wird zusätzlich ein Produkt mit den Primern A2 und C7 amplifiziert, welches nur entsteht, wenn die IR-Region in OFF-Orientierung vorliegt. Expression der Rekombinasen Inv19 und Res02 hat im Modellversuch die Inversion der IR-Region herbeigeführt.

Expression der Rekombinasen Inv19 und Res02 hat im Modellversuch zur Inversion der IR-Region geführt und legt damit nahe, daß Inv19 und Res02 für die Drehung der sieben beweglichen DNA-Segmente upstream der Kapselpolysaccharidsyntheseloci in *Bacteroides fragilis* verantwortlich sind. Deletionsmutanten der Gene *res02* und *inv19* müssen die im Modellversuch gewonnenen Ergebnisse nun in vivo bestätigen.

Inv15, Inv21 und Inv24 haben im Modellversuch keine Aktivität auf die IR-Region von PS A gezeigt und scheiden daher als Kandidatengene aus. Die anderen konservierten Invertasen Inv01, Inv 04 und Inv20 sind keine Gruppe B Invertasen und weisen keine besondere Homologie zu Inv19 und Res02. Sie wurden in die weiteren Überlegungen ebenfalls nicht mehr miteinbezogen.

3.1.4 Herstellung einer internen Deletionsmutante in *res02*

Zur Untersuchung, ob *Res02* in vivo für die Inversion der beweglichen Promotorregionen der Kapselpolysaccharidsyntheseloci A, B, D, E, F, G und H verantwortlich ist, wurde eine interne Deletionsmutante von *res02* hergestellt. Während im Wildtyp eine stete Inversion der Promotorregion darstellbar ist, indem mittels PCR die Sequenz des Promotors sowohl in ON- als auch in OFF-Orientierung amplifiziert werden kann, müßte das Fehlen des die Inversion herbeiführenden Faktors zu einem Verbleiben des Inverted Repeat-flankierten DNA-Segments in einer Position führen. Dieser Sachverhalt soll im Folgenden an der Δ *res02*-Mutante untersucht werden.

Zur Herstellung von Δ *res02* wurde im Genom des Prototypstamms *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 ein intern gelegener Teil von 534bp aus dem 594bp großen ORF von *res02* durch homologe Rekombination und allelischen Austausch des Suicid-Plasmids pKGW10 deletiert (\rightarrow 2.4.14). Dabei wurden acht verschiedene Mutantenpopulationen erhalten und mit *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 Δ *res02* M2, M4, M8, M10, M42, M44, M48 und M62 benannt. Alle acht Mutanten wurden mittels PCR auf die Orientierung der Promotorregion der Kapselpolysaccharide (PS) A, B, D, E, F, G und H untersucht. Dazu wurden für jede Inverted Repeat-flankierte Promotorregion Primer entworfen, von denen einer upstream, einer innerhalb und einer downstream der Inverted Repeats zu liegen kommt. Die beiden äußeren Primer zeigen zu den Inverted Repeats hin. Die Richtung des inneren Primers hängt von der Orientierung der IR-Region ab und ändert sich mit deren Inversion. Dementsprechend wird entweder ein Produkt mit dem oberen oder dem unteren Primer synthetisiert.

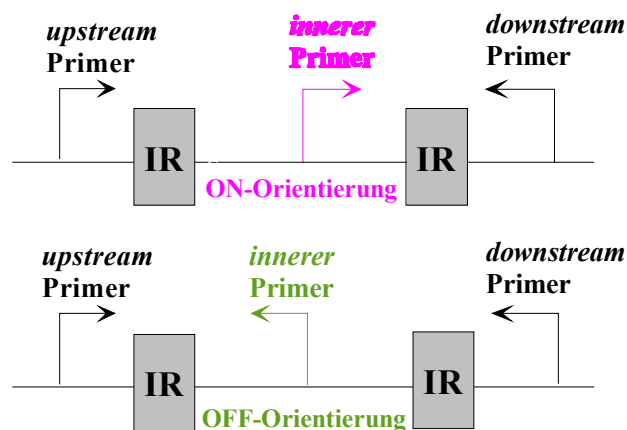




Abbildung 22: PCR Analyse zur Bestimmung der Promotororientierung

Folgende Primer wurden zur Bestimmung der Promotororientierung verwendet:

	<i>upstream</i> Primer:	 OFF	<i>innerer</i> Primer	 ON	<i>downstream</i> Primer
PS A	C469		A1		C473
PS B	L119		B2		L73
PS D	D8		D19		D9
PS E	UpE-1		UpE-2		UpE-3
PS F	UpF-1		UpF-2		UpF-3
PS G	UpG-1		UpG-2		UpG-3
PS H	UpH-1		UpH-2		UpH-3

Zur Bestimmung der Orientierung der Promotorregion der acht Mutanten sowie des Wild-Typs wurde chromosomale DNA der zu testenden Stämme mit jedem der oben genannten 14 Primerpaare auf Amplifikation eines PCR-Produkts untersucht. Im Wild-Typ als Kontrolle sind die beweglichen Promotorregionen von allen sieben Kapselpolysacchariden A, B, D, E, F, G und H erwartungsgemäß in beiden Orientierungen amplifizierbar, da durch Inversion des DNA-Segments Kopien seiner Sequenz in beiden Ausrichtungen vorliegen. In den $\Delta res02$ -Mutanten hingegen liegen die einzelnen Promotorregionen unabhängig voneinander in einer Orientierung fixiert vor. Dabei fallen die $\Delta res02$ -Mutanten durch zwei unterschiedliche Genotypen auf. Während NCTC 9343 $\Delta res02$ M4, M8, M10, M42, M44, M48 und M62 genotypisch identisch sind und wahrscheinlich von derselben Ursprungszelle abstammen, besitzt NCTC 9343 $\Delta res02$ M2 einen abweichenden Genotyp. Durch dieselbe Mutation sind zwei genetisch unterschiedliche Mutantenpopulationen entstanden. Dies ist nur dann möglich, wenn der mutierte Faktor am Rearrangement chromosomaler DNA beteiligt war. Alle Mutanten vom Typ NCTC 9343 $\Delta res02$ M44 zeigen die Promotorregion von PS A ausschließlich in der ON-Orientierung, die Promotorregion von PS B ausschließlich in der OFF-Orientierung, Promotor E nur in ON und die übrigen Promotorregionen der Kapselpolysaccharide F, G und H nur in OFF. NCTC 9343 $\Delta res02$ M2 amplifiziert die Promotorregion von PS A nur in ON und sämtliche anderen Promotorregionen nur in der OFF-Orientierung.

Durch Deletion von *res02* sind genetisch unterschiedliche Mutantenpopulationen entstanden, die durch den Verlust der Fähigkeit die Orientierung der Promotorregion zu verändern, die bekannten Kapselpolysaccharide A, B, D, E, F, G, und H entweder konstitutiv oder gar nicht exprimieren.

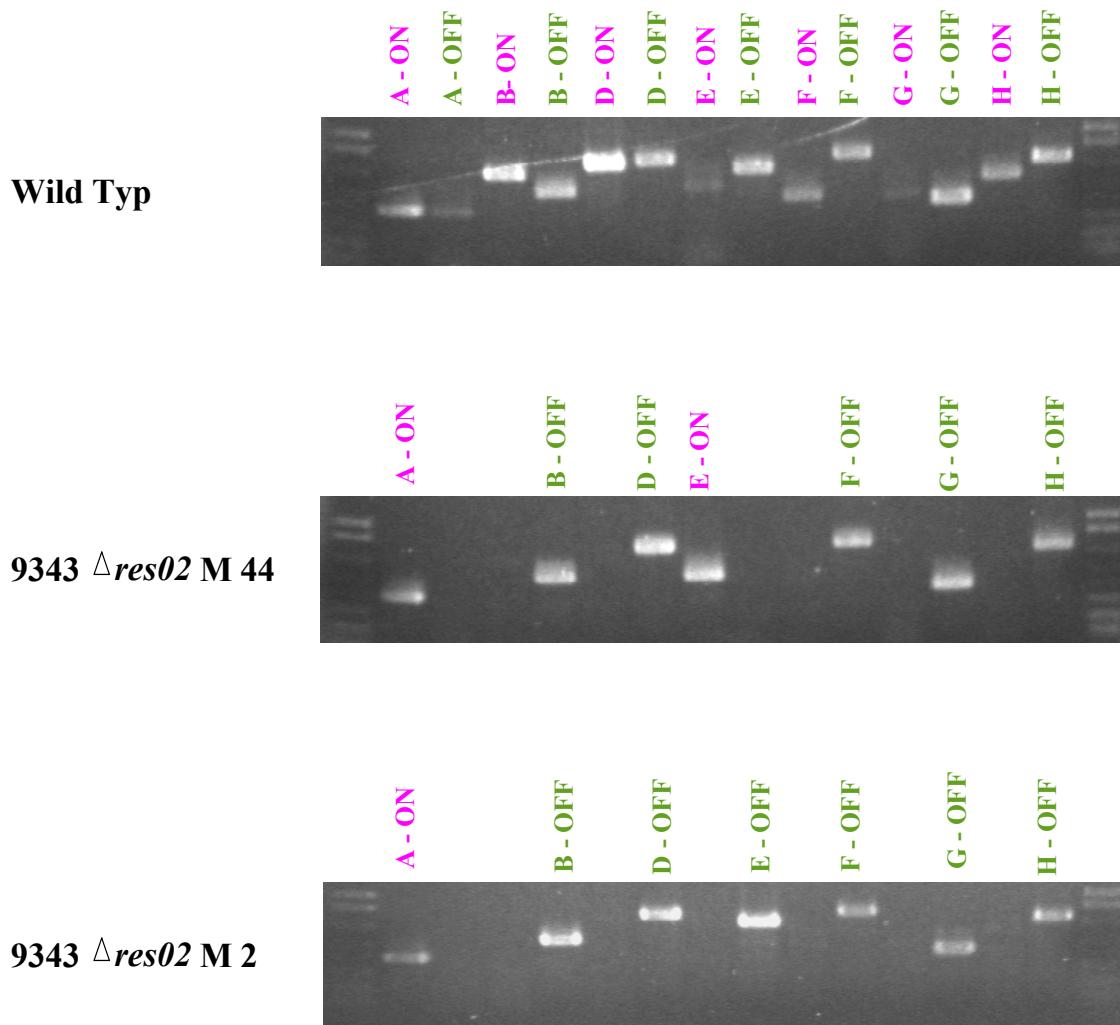


Abbildung 23: PCR Analyse der Promotororientierung der Δ *res02* Mutanten im Vergleich zum Wild Typ. Während die IR-Regionen der Kapselpolysaccharide im Wild-Typ steter Inversion unterliegen, sind sie in den Mutanten in der einen oder anderen Orientierung „eingeschlossen“.

Um sicherzustellen, daß bei der Deletion von *res02* keine anderen Gene affektiert wurden, die Einfluß auf die gewonnenen Daten haben können, wurde die $\Delta res02$ -Mutante M44 mit dem *res02*-Gen auf dem Expressionsplasmid pKGW4 komplementiert. Die Expression von *res02* in *trans* hebt die Blockierung der IR-Region in der jeweiligen Orientierung auf und gibt der Mutante die Fähigkeit zurück, die beweglichen DNA-Segmente zu invertieren. Wie Abbildung 24 zeigt, findet Promotorinversion wieder statt.

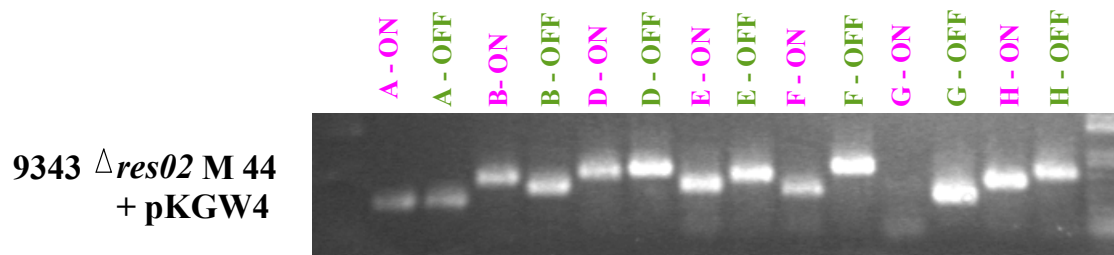


Abbildung 24: Nach Expression von Res02 in pKGW4 findet in M44 Promotorinversion statt.

3.2 Beschreibung eines phasenvariabel regulierten Fimbrienoperons in *Bacteroides fragilis*

3.2.1 Identifikation einer IR-Region downstream von *inv15*

Analyse der DNA upstream und downstream der konservierten Invertasen enthüllte unmittelbar downstream von *inv15* ein weiteres Paar von Inverted Repeats. Die Sequenz der Inverted Repeats ist nicht identisch mit der der Kapsel-Inverted Repeats, jedoch mit 23 bp ähnlich lang und schließt mit 247 bp etwa dieselbe Menge DNA ein. An die Inverted Repeat-Region schließen unmittelbar acht Gene an, die eng geclustert sind und zusammen mit den vorangehenden DNA-Elementen die Struktur eines Operons aufweisen. Die Anordnung der einzelnen DNA-Elemente erinnert stark an den Aufbau der Kapselpolysaccharidsyntheseloci und wie dort findet sich auch hier innerhalb des Inverted Repeat-flankierten DNA-Segments die Sequenz des bekannten *Bacteroides fragilis* Konsensus Promotors₈.

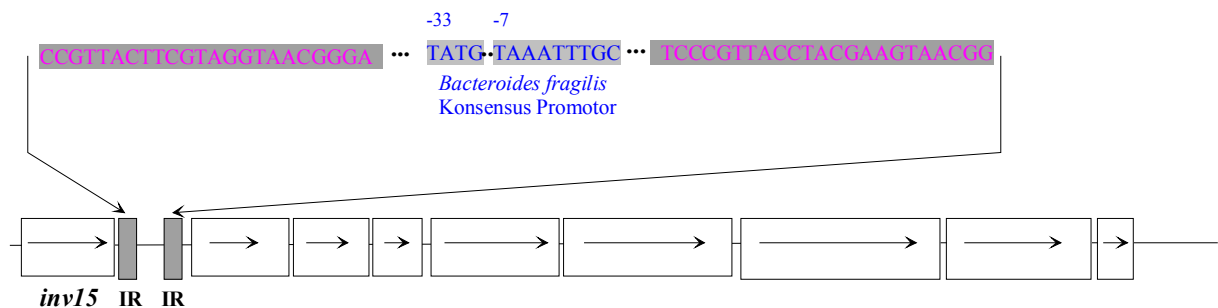


Abbildung 25: Downstream *inv15* befindet sich eine weitere IR-Region, an die acht eng geclusterte Gene anschließen.

Da im Vorangehenden bereits gezeigt wurde, daß Inv15 keine Aktivität an den Inverted Repeats der Kapselpolysaccharidsyntheseloci besitzt, liegt die Vermutung nahe, daß Inv15 auf die neu entdeckten Inverted Repeats direkt downstream wirkt. Dies hat zu der Hypothese geführt, daß *inv15* für eine Rekombinase kodiert, die die Inversion der anschließenden IR-Region herbeiführt und durch die damit verbundene Änderung der Promotororientierung, die Transkription des downstream gelegenen Operons reguliert.

Zur Bestätigung der Hypothese wurden zwei Ziele angestrebt: Erstens zu zeigen, daß das Inverted Repeat-flankierte DNA-Segment downstream *inv15* tatsächlich invertiert und daß *Inv15* der Faktor ist, der diese Inversion herbeiführt. Zweitens zu demonstrieren, daß die Gene, die an die Inverted Repeat-flankierte Promotorregion anschließen, abhängig von deren Orientierung exprimiert werden. Darüber hinaus wurde angestrebt, mehr über das Genprodukt bzw. die Funktion des unbekanntes Operons zu erfahren.

Um zu zeigen, daß das Inverted Repeat-flankierte DNA-Segment downstream *inv15* invertiert und damit die Orientierung des putativen Promotors umkehrt, wurden analog zur Untersuchung der Promotororientierung in den Δ *res02*-Mutanten Primer entworfen, die upstream, innerhalb und downstream der neuen Inverted Repeats zu liegen kommen.

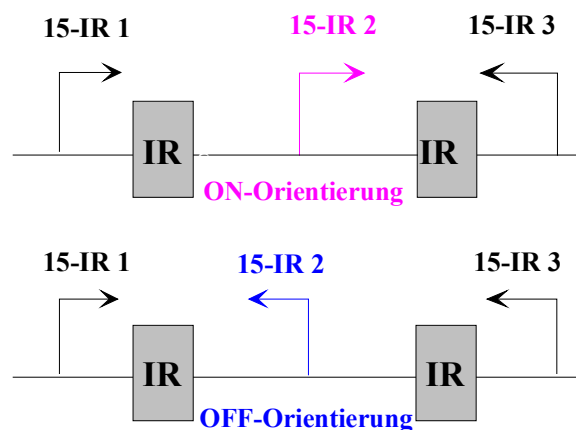


Abbildung 26: PCR Analyse der IR-Region downstream *inv15* auf Inversion

Chromosomale DNA einer Einzelzellkolonie von *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 wurde mit den Primerpaaren 15-IR 1 und 15-IR 2 bzw. 15-IR 2 und 15-IR 3 auf Amplifikation entsprechender PCR-Produkte untersucht. Mit beiden Primerpaaren konnte ein PCR-Produkt synthetisiert werden, was bedeutet, daß die IR-Region sowohl in der ON-Orientierung als auch in der OFF-Orientierung vorgelegen haben muß. Damit wurde gezeigt, daß das Inverted Repeat-flankierte DNA-Segment downstream *inv15* tatsächlich invertiert.

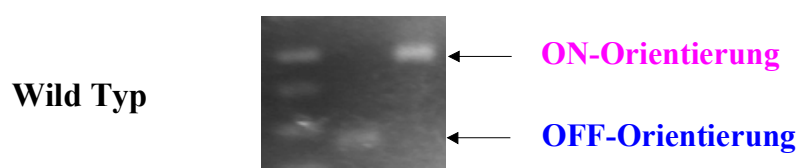


Abbildung 27: Die IR-Region downstream *inv15* unterliegt DNA-Inversion in *B. fragilis* Wild Typ

Wie im Vorangehenden bereits gezeigt, hat die Expression von Inv15 keinen Einfluß auf die Orientierung der Promotorregionen der Kapselpolysaccharide.

Um sicherzustellen, daß die bekannte Invertase Res02 keine Aktivität an den neu beschriebenen Inverted Repeats besitzt, wurden die $\Delta res02$ -Mutanten M8, M10, M42, M44, M48 und M62 in gleicher Weise wie der Wild Typ auf Inversion des DNA-Segments downstream *inv15* untersucht.

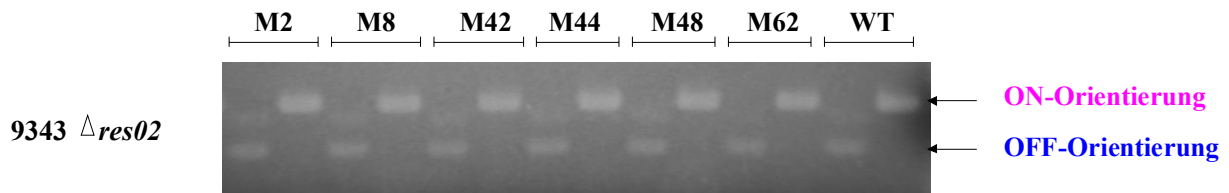


Abbildung 28 : Deletion von *res02* hat keinen Einfluß auf die Inversion der IR-Region downstream *inv15*

Es konnte gezeigt werden, daß die IR-Region downstream *inv15* auch in den $\Delta res02$ -Mutanten in beiden Orientierungen amplifizierbar ist und von der Deletion in *res02* nicht beeinträchtigt wurde. Der erste Teil der aufgestellten Hypothese, nachdem das Segment downstream *inv15* in der Lage ist, DNA-Inversion zu durchlaufen, konnte hiermit bestätigt werden. Eine interne Deletionsmutante in *inv15* soll nun zeigen, daß die Inversion abhängig von der Expression von Inv15 ist, indem das Fehlen der Invertase 15 zu einer Fixierung der IR-Region in einer gegebenen Position führt.

3.2.2 Herstellung einer internen Deletionsmutante in *inv15*

Zur Herstellung von $\Delta inv15$ wurde im Genom des Prototypstamms *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 ein intern gelegener Teil von 874 bp aus dem 1000 bp großen ORF von *inv15* durch homologe Rekombination und allelischen Austausch des Suicid-Plasmids pKGW1 deletiert (\rightarrow 2.4.14). Dabei wurden verschiedene Mutantenpopulationen erhalten und mit NCTC 9343 $\Delta inv15$ M4, M8, M15 und M16 benannt. Einzelzellkolonien der vier Mutanten wurden mittels PCR auf die Orientierung der putativen Promotorregion downstream *inv15* untersucht. Dafür wurden wieder die bekannten Screening-Primer 15-IR 1, 15-IR 2 und 15-IR 3 verwendet.

In allen Mutanten läßt sich die IR-Region nur in einer Orientierung amplifizieren. Sie haben durch die Deletion in *inv15* die Fähigkeit zur Inversion verloren. Dabei sind zwei genotypisch unterschiedliche Mutantenpopulationen entstanden: M4 enthält den putativen Promotor in der OFF-Orientierung fixiert, während bei M8, M15 und M16 der Promotor nur in ON-Orientierung vorliegt.

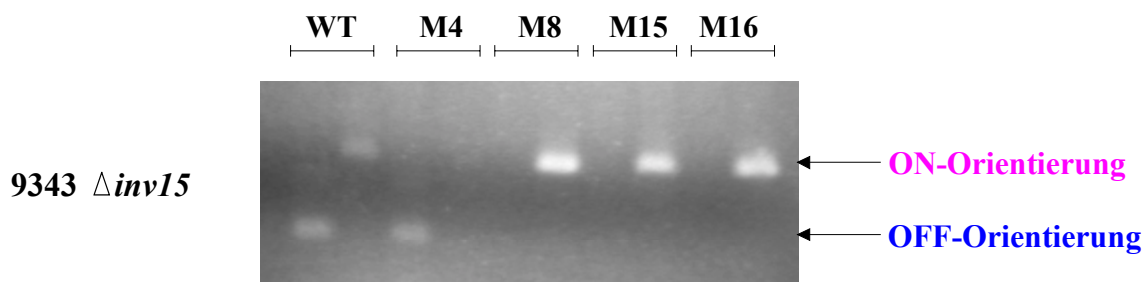


Abbildung 29: In allen 9343 $\Delta inv15$ -Mutanten ist die Promotorregion in einer Orientierung fixiert: M4 zeigt den Promotor nur in der OFF-Orientierung, bei M8, M15 und M16 liegt der Promotor nur in der ON-Orientierung vor.

Die $\Delta inv15$ -Mutanten bestätigen, daß Inv15 die Umkehrung der beweglichen Promotorregion downstream *inv15* herbeiführt. Es liegt nahe, daß dieser Promotor die Expression des anschließenden Operons steuert. Demnach fände in M4 gar keine Expression der anschließenden Gene statt (OFF-Mutante), während in M8 das Operon konstitutiv exprimiert würde (ON-Mutante). Im Wildtyp würde Genexpression phasenvariabel entsprechend der aktuellen Promotororientierung vorliegen. Da sich M4 und M8 genotypisch nur in der Orientierung des Promotors downstream *inv15* unterscheiden, würden Proteine, welche von

der ON-Mutante M8, nicht jedoch von der OFF-Mutante M4 synthetisiert werden, dem unbekanntem Operon als Genprodukt zugeschrieben werden.

Um mehr über die von den unbekanntem Genen produzierten Proteine herauszufinden, wurde hitzedenaturiertes Bakterienzellysate von *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 Wild Typ, 9343 $\Delta inv15$ M4 und 9343 $\Delta inv15$ M8 durch SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese aufgetrennt, mit Western Transfer auf PVDF übertragen und im Immunoblot auf seine Reaktivität mit polyklonalem *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 Wild Typ Antiserum untersucht. Die hierbei gewonnenen Daten lieferten erste Hinweise darauf, daß M8 ein ca. 40 kDa schweres Protein synthetisiert, das in WT und M4 nicht sichtbar war. Um die Ergebnisse zu verdeutlichen, wurden monospezifische Antiseren durch Adsorption des polyklonalen Antiserums gegen *Bacteroides fragilis* 9343 WT mit Zellen der Mutante 9343 $\Delta inv15$ M4 hergestellt (\rightarrow 2.5.3). Die Methode basiert auf der Idee, durch Bindung von Antikörpern an die immunodominanten Strukturen von M4 jene im Serum verbleibenden Antikörper zu konzentrieren, die gegen die von M4 nicht synthetisierten Proteine gerichtet sind. Dieses monospezifische Serum wurde erneut im Western Blot auf spezifische Reaktivität mit Proteinen von M4 und M8 untersucht und das entstehende Bandenmuster im Hinblick auf Proteine, die von M8 nicht jedoch von M4 synthetisiert werden, verglichen. Innerhalb des normalen, für beide Mutanten identischen Proteinspektrums, welches auf eine unspezifische Restaktivität der durch M4 nicht gebundenen polyklonalen Antikörper im adsorbierten Serum zurückzuführen ist, sticht im Proteinprofil von M8 eine prominente Bande bei einem Molekulargewicht von ca. 44 kDa hervor. Diese ist im Proteinprofil von M4 nicht zu sehen. Wir schreiben die Synthese des 44 kDa schweren Proteins daher einem bzw. den Genen des unbekanntem Operons downstream *inv15* zu.

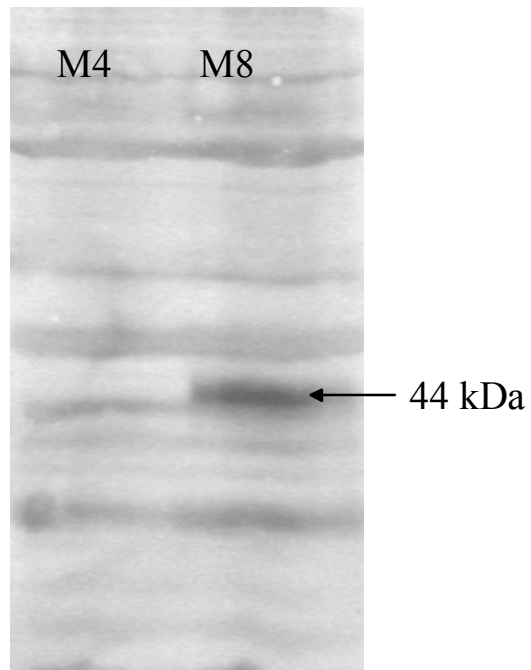


Abbildung 30: Western Blot-Analyse des Proteinprofils von 9343 $\Delta inv15$ M4 und M8 mit monospezifischem M4-adsorbierten Antiserum. In M8 sticht eine prominente Bande bei 44 kDa hervor, die in M4 nicht zu sehen ist.

Während der Präparation der adsorbierten Seren kam ein phänotypisches Charakteristikum der Mutante $\Delta inv15$ M8 zum Vorschein. Im Gegensatz zu *Bacteroides fragilis* Wild Typ oder Bakterien der Mutante $\Delta inv15$ M4, die sich nach dem Zentrifugieren einfach in PBS resuspendieren lassen, aggregieren Bakterien der Mutante 8 und sinken zum Boden des Präparationsgefäßes ab.

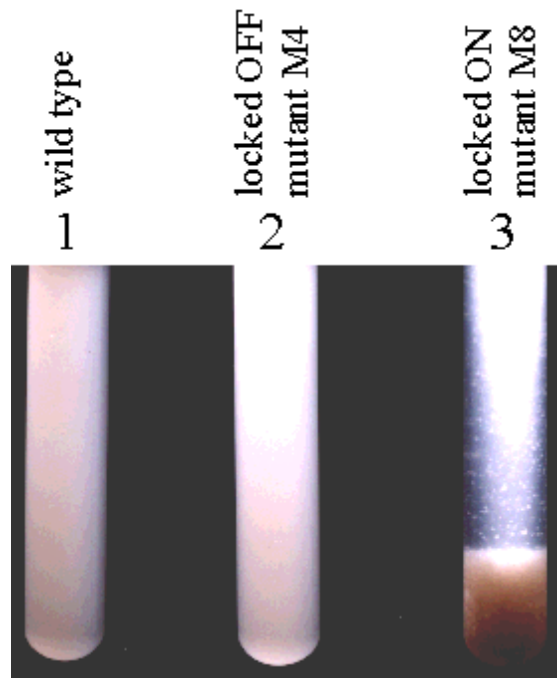
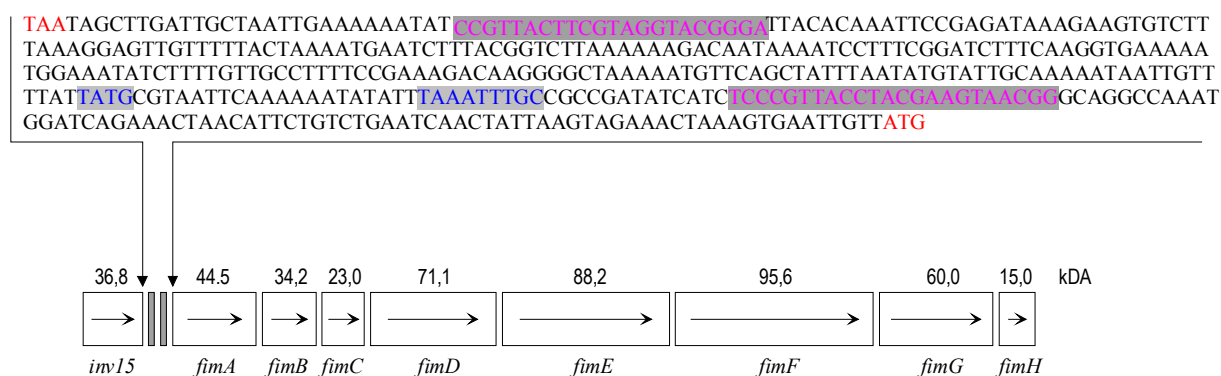


Abbildung 31: Phänotypische Besonderheit der $\Delta inv15$ ON-Mutante M8: Bakterienzellen lassen sich nicht resuspendieren, sondern aggregieren und sinken zum Boden ab (3).

Der Zusammenhang, daß Aggregation von Bakterien in salzhaltigen Lösungen mit der Expression von Fimbrien auf ihrer Oberfläche in Verbindung gebracht wurde, lenkte das Interesse auf eine Veröffentlichung von van Doorne *et al.*⁸³ aus dem Jahr 1987. Diese hat die Charakterisierung eines 40 kDa schweren Fimbrien-Subunit in *Bacteroides fragilis* BE 1 zum Inhalt. Bereits zuvor wurden Fimbrien auf der Oberfläche verschiedener *Bacteroides fragilis* Stämme beobachtet⁶⁸ und Phasenvariation von Fimbrien in *Bacteroides fragilis* A 312 in Abhängigkeit von Umgebungstemperatur und Wachstumsphase beschrieben^{60, 61}. Van Doorn *et al.*⁸³ gelang es, BE1 Fimbrien zu purifizieren und ein 40 kDa schweres Fimbrien-Subunit zu isolieren. Durch N-terminale Sequenzierung konnten die ersten 28 aminoterminalen

Aminosäuren des Fimbrien Subunit-BE1 bestimmt werden⁸⁴. Polyklonale Antikörper, die gegen das denaturierte Fimbrien-Subunit hergestellt wurden, markierten nach Immunogold-Labeling native Fimbrien intakter Bakterienzellen. Immunoblot-Experimente zeigten, daß andere *Bacteroides fragilis* Stämme ein 40-44 kDa schweres Polypeptid synthetisierten, das antigenetisch mit dem BE1 Subunit verwandt ist⁸³.

Um zu untersuchen, ob Gene des unbekanntes Operons an der Synthese von Fimbrien in *Bacteroides fragilis* beteiligt sind, wurde zunächst durch Open Reading Frame Detektion und Sequenzanalyse die Größe der einzelnen Genprodukte des unbekanntes Operons bestimmt. Die Gene wurden vorläufig *fimA* – *fimH* benannt. Das Genprodukt von *fimA* entspricht in seiner Größe mit 44,5 kDa exakt dem im Western Blot-Profil von M8 vorherrschenden Protein von ca. 44 kDa. Vergleich der bekannten BE1 Sequenz mit der translatierten Nucleotidsequenz von *fimA* ergab eine fast vollständige Übereinstimmung des aminoterminalen Endes von BE1 mit einem Ausschnitt der Aminosäuresequenz von *fimA*, bei Mismatches in nur zwei Aminosäuren.



Bacteroides fragilis NCTC 9343

fimA: 61 QSTAVPETSWSNIHQVQILLYDASNI 86

QSTAVPETSWS+ I Q QILLYDASNI

Bacteroides fragilis BE 1 40 kDa Fimbrien Subunit: 3 QSTAVPETSWSBIRQXQILLYDASNI 28

Abbildung 32: Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen des bekannten Fimbrien-Subunits von *B. f.* BE 1 und der translatierten Nucleotid-Sequenz von *B. f.* NCTC 9343 *fimA*.

Das Produkt eines weiteren Gens dieses Operons, *fimF*, weist große Homologie zu einem Fimbrien-„Usher“ (Platzanweiser) auf, einem Protein, das an der Zusammensetzung der

Fimbrienmonomeren zu einer strukturellen Einheit beteiligt ist. Diese genetischen Entdeckungen haben zusammen mit den beobachteten phänotypischen Charakteristika zur Identifikation des unbekanntes Genlocus als Fimbrienoperons in *Bacteroides fragilis* geführt.

Um nachzuweisen, daß bei der Deletion in *inv15* direkt oder indirekt keine anderen Gene verändert wurden und alle hier demonstrierten genotypischen und phänotypischen Veränderungen direkt auf die fehlende Expression von Inv15 zurückzuführen sind, wurden die $\Delta inv15$ -Mutanten M4 und M8 mit *inv15* auf dem Expressionsplasmid pKGW5 in *trans* komplementiert. Zur Herstellung von pKGW5 wurde der bereits mehrfach erwähnte Expressionsvektor pFD340 verwendet. *Inv15* wurde mit den Primern Inv15-F2 und Inv15-R2 amplifiziert und in die BamHI-Schnittstelle von pFD340 kloniert. Das Plasmid wurde in *E. coli* transformiert und pKGW5 genannt. pKGW5 wurde mit Hilfe des konjugativen Helferplasmids RK231 in $\Delta inv15$ M4 und M8 transferiert. Die komplementierten Mutanten wurden zusammen mit dem Wild Typ und $\Delta inv15$ M4 und $\Delta inv15$ M8 als Kontrolle in gleicher Weise wie zuvor auf die Orientierung der Promotorregion untersucht. Erwartungsgemäß ist im Wild Typ DNA-Inversion darstellbar, während die regulären $\Delta inv15$ -Mutanten M4 und M8 die Promotorregion als Ausdruck ihrer permanenten Ausrichtung nur in einer Orientierung amplifizieren. Die komplementierten Mutanten zeigen genotypisch die Promotorregion wieder in beiden Orientierungen und bestätigen damit, daß allein die Expression von *inv15* für die DNA-Inversion verantwortlich ist.

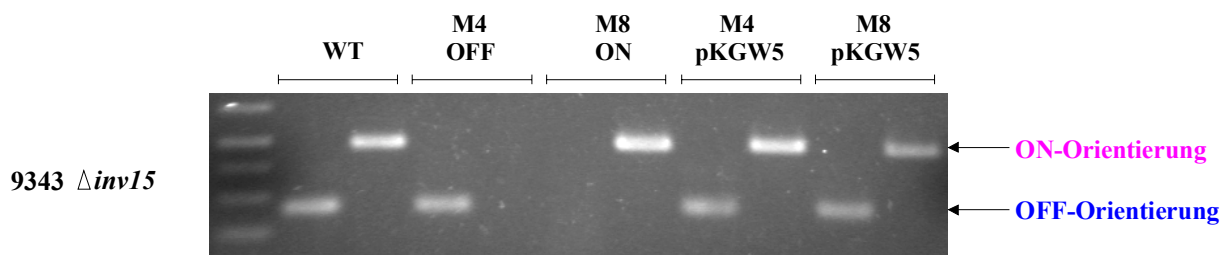


Abbildung 33: Expression von *inv15* auf pKGW5 führt zur DNA-Inversion in $\Delta inv15$ M4 und M8.

Auch die phänotypisch beobachtete Aggregation von $\Delta inv15$ M8 wird durch Komplementierung mit pKGW5 wieder aufgehoben.

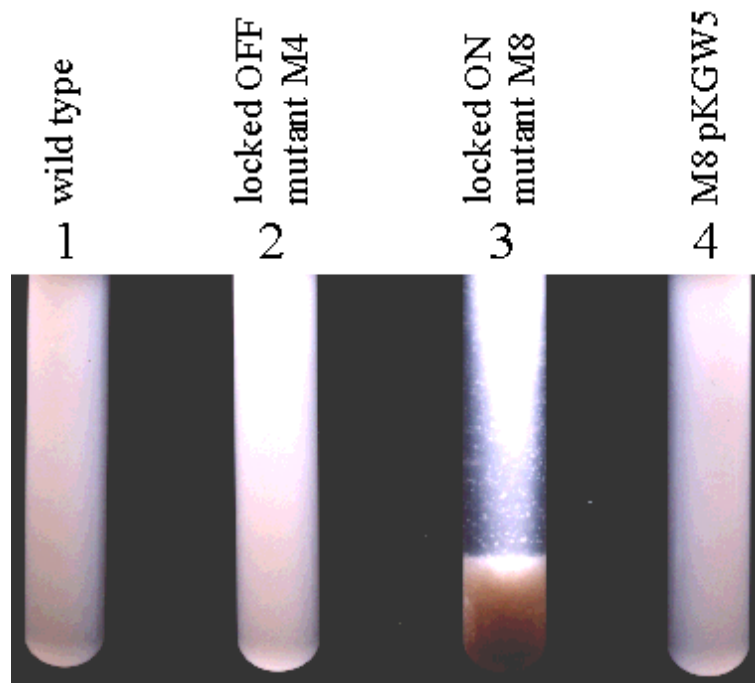


Abbildung 34: Die phänotypische Aggregation von $\Delta inv15$ M8 wird durch Komplementierung mit pKGW5 aufgehoben.

Damit wurde direkt gezeigt, daß Inv15 durch Inversion einer Inverted Repeat-flankierten Promotorregion die Expression eines phasenvariablen Fimbrienoperons in *Bacteroides fragilis* reguliert.

4 Diskussion

Modulation von immunogenen Oberflächenmolekülen kommensaler Mikroorganismen durch sequenzspezifische Rekombinasen

Der menschliche Intestinaltrakt ist ein vielfältiges und komplexes Ökosystem, das auf der einzigartigen Interaktion zwischen dem Wirt und der bakteriellen Mikroflora beruht. Die Bakterienoberfläche dient dabei als Grenzfläche, an der sich ein dynamischer Austausch vollzieht. Sie ist daher für beide Symbionten von besonderer Bedeutung.

Diese Arbeit beschreibt die Entdeckung einer spezifischen DNA-Rekombinase, durch die der kommensale Mikroorganismus *Bacteroides fragilis* die immunogene Architektur seiner Oberfläche global moduliert.

4.1 Eine Multiple-Promotor-Invertase (MPI) reguliert die Phasenvariation von *Bacteroides fragilis* Kapselpolysacchariden

Beachtliche Fortschritte wurden dabei erzielt, die Mechanismen aufzuklären, die pathogene Bakterien benutzen, um Krankheiten auszulösen. Im Vergleich dazu ist wenig darüber bekannt, wie es den Billionen von Bakterien, die den menschlichen Intestinaltrakt bewohnen, gelingt, erfolgreich kommensale oder gar symbiontische Beziehungen mit dem Wirt einzugehen. Bakterien, die den Wirt im Lauf seines Lebens besiedeln, müssen Mechanismen entwickelt haben, die es ihnen erlauben, in Interaktion mit dem Wirt zu treten. Nur wer Veränderungen wahrnehmen und angemessen darauf reagieren kann, überlebt.

Daß die Mukosa des Wirts auf die Besiedelung mit endogenen Mikroorganismen in vielfältigster Weise reagiert, ist von der wissenschaftlichen Welt mit großer Aufmerksamkeit zur Kenntnis genommen worden^{14, 33}. Welche ungeahnte Kapazität die Oberfläche kommensaler Bakterien besitzt, sich an Änderungen des Wirtsmilieus anzupassen, demonstriert diese Arbeit.

Der kommensale Mikroorganismus *Bacteroides fragilis* ist in der Lage, seine Oberfläche in außergewöhnlichem Maße zu variieren, indem er acht verschiedene Kapselpolysaccharide synthetisiert. Diese Kapselpolysaccharide durchlaufen Phasenvariation im Sinne einer hochfrequenten ON-OFF-Änderung ihrer phänotypischen Expression. Die Phasenvariation von sieben der acht Polysaccharide wird durch einen DNA-Inversionsmechanismus reguliert: Die Promotorregionen, von denen die Transkription der Polysaccharidsyntheseloci ausgeht, sind von 19 bp langen Inverted Repeat-Sequenzen flankiert. Die DNA zwischen den Inverted Repeats invertiert und richtet damit den Promotor in die korrekte bzw. inkorrekte Orientierung, um die Transkription der downstream gelegenen Gene stattfinden zu lassen oder nicht. Den Faktor bzw. die Faktoren aufzuklären, die diese Inversion regulieren, erscheint maßgeblich, um die Interaktion zwischen Wirt und Bakterienoberfläche zu verstehen, und war das Ziel dieser Arbeit.

Faktoren die DNA-Inversion herbeiführen, sogenannte DNA-Invertasen, fallen in zwei unterschiedliche Familien: Tyrosin-sequenzspezifische Rekombinasen, auch bekannt als λ -Integrasen²⁶, und Serin-sequenzspezifische Rekombinasen⁷³. Die beiden

Rekombinasenfamilien sind evolutionär und mechanistisch verschieden. Vertreter beider Familien sind funktionell vielseitig und können als Transposasen, Resolvasen, Integrasen und DNA-Invertasen aktiv sein^{73, 26}. DNA-Invertasen der Familie der Serin-sequenzspezifischen Rekombinasen (SsR) sind typischerweise auf mobilen DNA-Elementen wie Phagen^{45, 35, 34} oder Plasmiden¹⁶ kodiert und werden durch sie weitergegeben. Sie entfalten ihre katalytische Aktivität lokal an dem importierten Element. Viele DNA-Invertasen der Familie der Tyrosin-sequenzspezifischen Rekombinasen regulieren die Phasenvariation von Fimbrien, indem sie einen singulären Abschnitt des Chromosoms invertieren, der direkt an das Invertasengen anschließt^{40, 48, 31}.

Um Kandidatengenprodukte zu identifizieren, die an der Inversion der Polysaccharidpromotorregionen beteiligt sind, wurde das Genom des Prototypstammes *Bacteroides fragilis* NCTC9343 benutzt. Zur Identifikation von Tyrosin-sequenzspezifischen Rekombinasen wurde das Genom auf Homologe von FimB untersucht. (FimB kontrolliert ein ähnliches DNA-Inversionssystem in *E. coli*, mit dem die Expression von Typ I Fimbrien an- und abgeschaltet wird.) *Bacteroides fragilis*-Orthologe, die sich bei dieser Suche fanden, wurden erneut benutzt, um weitere Orthologe zu identifizieren. Auf diese Weise wurden insgesamt 25 Mitglieder der Familie Tyrosin-sequenzspezifischer Rekombinasen gefunden. Eine Analyse der 25 TsR-Genprodukte zeigte, daß alle eine pfam00589-Domäne⁷ enthalten, an der sie erkannt wurden. Eine erneute Untersuchung des *Bacteroides fragilis*-Genoms mit der pfam00589-Konsensussequenz⁷ konnte keine weiteren Mitglieder der TsR-Familie ermitteln. Die TsR-Gene wurden *inv01-inv25* genannt. Eine ähnliche Analyse wurde verwendet, um Mitglieder der Familie Serin-sequenzspezifischer Rekombinasen aufzufinden. Dazu wurde das *Bacteroides fragilis*-Genom auf das Vorhandensein von pfam00239-Motiven⁷ untersucht, einer 139 Aminosäuren langen Konsensussequenz, die für Serin-Rekombinasen charakteristisch ist. Drei Gene wurden bei dieser Suche entdeckt. Bei zweien davon handelt es sich um DNA-Invertasen und damit um mögliche Kandidatengene, während das dritte Gen zu den „großen Serin-Rekombinasen“ gehört, die Integration⁵², Exzision¹⁵ und Transposition⁸⁶, aber keine DNA-Inversion vermitteln. Somit wurden zwei Serin-Rekombinasen als weitere potentielle Kandidatengene gefunden und *res01* und *res02* genannt. *Res02* kommt dabei besondere Bedeutung zu, da es sich in unmittelbarer räumlicher Nähe zu dem TsR-Gen *inv19* befindet und in Bezug auf dieses gegenläufig transkribiert wird, so daß die Start-Codons beider Gene nur 15 bp voneinander entfernt liegen. Beide Gene sind von identischem GC-Gehalt, was die Vermutung zuläßt, daß sie gemeinsam erworben wurden.

Diese erste computergestützte Näherung auf der Suche nach der Invertase, die die Inversion der Kapselpolysaccharidpromotorregionen herbeiführt, lieferte somit 25 TsR und 2 SsR, zusammen 27 potentielle Kandidatengene.

Um die Liste der Kandidatengene weiter einzuengen, wurde der Umstand ausgenutzt, daß die invertierbaren Promotorregionen der Kapselpolysaccharide, ungeachtet der Vielfalt an existenten Kapselpolysaccharidserotypen, auf streng konservierten Bereichen des Chromosoms liegen^{17, 18, 19}. Folglich ist davon auszugehen, daß der Faktor bzw. die Faktoren, die für die DNA-Inversion der Promotorregionen verantwortlich sind, ebenfalls in der gesamten Spezies konserviert sein müssen. Southern-Blot-Analysen mit intern gelegenen Teilen der potentiellen Invertasengene zeigten, daß nur acht der 27 Kandidatengene, nämlich *inv01*, *inv04*, *inv15*, *inv19*, *inv20*, *inv21*, *inv24* und *res02* in der gesamten Spezies *Bacteroides fragilis* konserviert vorkommen. Das Gen *res01* war bereits in der ersten Southern-Blot Testserie in nur 5 von 17 untersuchten Stämmen präsent und schied daher als Anwärter auf die gesuchte Invertase aus. Ein kürzlich erschienener Artikel⁶⁴ zeigte, daß *res01*, dort *finB* genannt, auf einem *Bacteroides fragilis*- Plasmid kodiert ist. Die Autoren schrieben FinB replektive Res01 die Umkehrung der Kapselpolysaccharidpromotorregionen zu. Da Res01 nur in der Minderzahl der *Bacteroides fragilis*-Stämme vertreten ist, die in ihrer Gesamtheit als Spezies die Kapselpolysaccharidexpression durch Promotorinversion kontrollieren, erscheint diese Deutung wenig wahrscheinlich.

Um in einem nächsten Schritt zu untersuchen, ob eine der DNA-Invertasen, die sich im Test als konserviert gezeigt hatten, tatsächlich Aktivität an den IR-flankierten Promotorregionen der Kapselpolysaccharide besitzt, wurde das Expressionsplasmid pKGW2 konstruiert. Dazu wurde ein 420 bp langes DNA-Fragment, welches die IR-flankierte Promotorregion von PSA enthält, in den *E. coli*-*Bacteroides* Shuttle-Vektor pFD340 cloniert. Wurde pKGW2 konjugativ in *Bacteroides fragilis* transferiert, so fand Inversion der Promotorregion statt. Wurde pKGW2 jedoch in eine andere *Bacteroides*-Spezies, *Bacteroides vulgatus*, überführt, blieb die DNA-Inversion der Inverted Repeat-flankierten Promotorregion aus. Demnach synthetisiert *Bacteroides fragilis*, nicht aber *Bacteroides vulgatus*, spezifische Faktoren, die die DNA-Inversion herbeiführen.

Kandidatengene für die gesuchte Invertase wurden nun einzeln in pKGW2 kloniert, wo ihre Transkription durch einen Vektor-situierten *Bacteroides*-Promotor kontrolliert wird. Diese Konstrukte wurden erneut in *Bacteroides vulgatus* überführt und die Fähigkeit der

Kandidateninvertasen, die Promotorregion zu invertieren, mittels PCR untersucht. Die konservierten TsR-Rekombinasen Inv15, Inv21 und Inv24 waren nicht in der Lage, die Inversion des PSA-Promotors im Expressionsversuch in *Bacteroides vulgatus* herbeizuführen. Wurde hingegen Inv19 oder Res02 in pKGW2 exprimiert, fand DNA-Inversion in beträchtlichem Ausmaß statt.

Um sicherzustellen, daß die beobachtete Inversion nicht durch unspezifische Aktivität des im Modell im Überschuß exprimierten Enzyms zustande kommt, sondern auf die spezifische katalytische Aktivität von Inv19 und Res02 an den Inverted Repeats zurückzuführen ist und um weiter zu untersuchen, ob diese Rekombinasen auch an der Inversion der verbleibenden sechs IR-flankierten Promotorregionen beteiligt sind, wurden interne Deletionsmutanten in den entsprechenden Genen angefertigt. Die Mutation von *inv19* gestaltete sich insofern schwieriger, als mehrere unterschiedlich lange C-terminale Deletionen hergestellt wurden, um zu gewährleisten, daß der Promotor des direkt upstream gelegenen, gegenläufig transkribierten Gens *res02* von der Deletion in *inv19* nicht affektiert wird. Diese Mutanten lieferten mehrdeutige Ergebnisse und weitere Experimente sind notwendig, um eine Aussage zu treffen, welche Rolle Inv19 bei der Regulation der Polysaccharidexpression in *Bacteroides fragilis* spielt. Im Unterschied dazu verlief die Untersuchung von *res02* ohne Umwege. Zur Herstellung von Δ *res02* wurde ein intern gelegener, fast den gesamten ORF des Gens ausmachender Teil von *res02* durch allelischen Austausch deletiert. Dabei entstanden acht Mutanten, die mit PCR auf ihre Fähigkeit untersucht wurden, die sieben IR-flankierten Promotorregionen zu invertieren. In jeder der acht Mutanten sind die Polysaccharidpromotoren in der einen oder anderen Orientierung eingeschlossen und nicht mehr in der Lage sich umzukehren. Dabei zeigte sich, daß durch Deletion in *res02* unterschiedliche Genotypen entstanden sind. Zum direkten Nachweis, daß die fehlende Expression des Faktors Res02 für das „Einfrieren“ der Promotorregionen verantwortlich ist, wurde das einzelne *res02*-Gen in einen Expressionsvektor kloniert und die Δ *res02*-Mutanten damit komplementiert. Durch Expression von *res02* in *trans* fand Promotorinversion wieder wie im WT statt.

Damit wurde direkt gezeigt, daß Res02 der Faktor oder einer der Faktoren ist, der Phasenvariation von *Bacteroides fragilis* Kapselpolysacchariden durch Inversion ihrer Promotoreregionen reguliert.

Fortführende Arbeiten in L. E. Comstock's Labor haben ergeben, daß Res02 zusätzlich zu den sieben Inverted Repeat-flankierten DNA-Segmenten upstream der Kapselpolysaccharidsyntheseloci sechs weitere Inverted Repeat-flankierte Promotorregionen erkennt, von denen die Transkription von sechs Regionen ausgeht, deren Gene große Homologie zueinander aufweisen (unveröffentlichte Daten). Die Produkte dieser Gene tragen N-terminale Signalsequenzen, die sie als Proteine ausweisen, die eine extrazytoplasmatische Bestimmung wahrscheinlich auf der Bakterienoberfläche haben. Die Analyse der $\Delta res02$ -Mutanten auf die „eingefrorene“ Orientierung der sechs neuen und sieben alten Res02-abhängig kontrollierten Promotorregionen konnte keine Kopplung zweier oder mehrerer Promotororientierungen nachweisen. Vielmehr scheint die Inversion der einzelnen Promotorregionen unabhängig voneinander stattzufinden. Die unterschiedlichen Genotypen der Mutanten spiegeln zufällige Konstellationen von Promotororientierungen wieder, in der sich die Promotorregionen zum Zeitpunkt der Deletion befunden haben. Damit obliegt einer einzelnen Invertase die Kontrolle über 13 unabhängig regulierte Oberflächenmoleküle, die phasenvariabel exprimiert werden. Eine „Multiple Promoter Invertase“ MPI dieser Art wurde bisher nicht beschrieben. Die Regulation durch MPI generiert die größtmögliche Anzahl an Kombinationen unterschiedlicher Oberflächenmoleküle und damit ein Maximum an Dynamik und Variabilität der Bakterienoberfläche.

Das Genom eines weiteren vorherrschenden Symbionten unseres Intestinaltrakts, *Bacteroides thetaiotaomikron*, wurde kürzlich veröffentlicht⁸⁸. Es enthält ebenfalls sieben Kapselpolysaccharidsyntheseloci, die dem Anschein nach durch DNA-Inversion reguliert werden. Würde es die Beschreiber des *B. thetaiotaomikron*-Genoms überraschen, wenn sie wüßten, daß sich in den von ihnen publizierten Sequenzen ein Gen befindet, welches große Homologie zu *mpi* respektive *res02* aufweist?

Die Entdeckung einer über die Speziesgrenzen von *Bacteroides fragilis* hinaus konservierten „Multiple Promoter Invertase“ (MPI) aus der Familie der Serin-Rekombinasen ist durchaus bemerkenswert: Wie im vorangehenden erwähnt, kommen Serin-Rekombinasen mit der bekannten Ausnahme des Hin-Invertosoms in *Salmonella typhimurium*^{29, 38, 73} normalerweise auf mobilen DNA-Elementen vor. Die Tatsache, daß ein Rekombinasengen wie *res02*, das seit Milliarden von Jahren quasi promiskuitiv auf Transposons, Plasmiden oder Integrons durch das genetische Material der Eubakterien geistert, im Genom der vorherrschenden Vertreter der menschlichen Intestinalflora konserviert zu finden ist, läßt Rückschlüsse darauf

zu, daß in dieser Art der Regulation von Oberflächenmolekülen ein entscheidender Selektionsvorteil für diese Organismen liegen muß.

4.2 Kontrolle der Polysaccharidexpression in *Bacteroides fragilis* oder wofür ist die Kapsel eigentlich gut?

Um den Fokus dieser Arbeit „Res02“ im Gesamtbild „Kontrolle der Polysaccharidexpression in *Bacteroides fragilis*“ zu positionieren, müssen vorrangig drei Ziele angestrebt werden: Erstens die Identifikation von Co-Faktoren, die an der Res02-vermittelten Inversion der Promotor-tragenden DNA-Segmente beteiligt sind und durch deren Einfluß auf die Res02-Aktivität z.B. die Richtung der Inversion determiniert wird.

Zweitens die Identifikation weiterer Faktoren, die eine Inversion der beschriebenen Klasse von Inverted Repeat-flankierten DNA-Elementen herbeiführen können sowie die Charakterisierung der Interaktion zwischen diesen verschiedenen Faktoren. Dabei ist zu klären, welche Rolle Inv19 bei der Umkehrung der Promotorregionen zukommt. Das dritte Ziel ist, Phasenvariation anhand einer qualitativen und quantitativen Analyse der Kapselpolysaccharidexpression *in vitro* und *in vivo* zu charakterisieren. Für jedes einzelne Polysaccharid soll die Frequenz des Phasenwechsels ON zu OFF und OFF zu ON ermittelt, und die Ko-Expression verschiedener Polysaccharide auf der Oberfläche eines Organismus studiert werden. Um herauszufinden, ob bestimmte Polysaccharide unter bestimmten Bedingungen exprimiert werden, muß *in vitro* der Einfluß unterschiedlicher Kulturbedingungen auf die Expression bestimmter Polysaccharide und *in vivo* die exprimierte Polysaccharide-Konstellation im Hinblick auf die Herkunft und das pathogene Potential der Isolate untersucht werden. Diese Ergebnisse könnten erste Hinweise darauf liefern, ob Phasenvariation ein „zufällig“ geschehendes Ereignis ist oder eine zielgerichtete Reaktion des Organismus auf Änderungen in seiner Umgebung.

Die Tatsache, daß *Bacteroides fragilis* Kapselpolysaccharide Phasenvariation durchlaufen, ist neu entdeckt und als solche in vieler Hinsicht unerforscht. Vor diesem Hintergrund ist zu sehen, daß das Wissen um den genetischen Mechanismus, der der Phasenvariation zu Grunde liegt, weiter fortgeschritten ist, als das Verständnis des Phänomens selbst. Bevor wir eine umfassende Erklärung geben können, warum *Bacteroides fragilis* acht verschiedene Kapselpolysaccharide synthetisiert, die unabhängig voneinander Phasenvariation durchlaufen, müssen viele grundlegende Fragen beantwortet werden. Im Kern dreht sich alles um die Bedeutung, die die Polysaccharidkapsel für das Bakterium hat. Der Vorteil, den *Bacteroides fragilis* als opportunistischer Pathogen aus der Produktion einer Polysaccharidkapsel zieht,

wird offenkundig, wenn er aus seinem angestammten Lebensraum heraus nach extraintestinal, z.B. in die Peritonealhöhle des Menschen, verschleppt wird: Der Polysaccharidkomplex induziert die Bildung von Abszessen, in denen der Organismus abgekapselt und vor der Immunantwort des Wirts geschützt bleibt⁷⁸. Dabei ist die Abszessbildung eine spezifische Abwehrreaktion des Wirts auf die Invasion bestimmter pathogener Mikroorganismen, mit dem Ziel, die weitere Ausbreitung der eindringenden Keime zu verhindern. Doch das Unvermögen, voll ausgebildete Abszesse wieder aufzulösen und die darin persistierenden Bakterien endgültig zu eliminieren, können bei sinkender Abwehrlage des Wirtsorganismus zu einem Sieg der Überlebensstrategien des Bakteriums über die des Wirts führen, die schwere Komplikationen für den Wirt mit sich bringen und manchmal sogar fatal enden. Im Gegensatz dazu, ist über die Vorteile, die *Bacteroides fragilis* als kommensaler Mikroorganismus bei der Besiedelung des menschlichen Intestinaltrakts aus der Expression einer Polysaccharidkapsel zieht, wenig bekannt. Eine Betrachtung der verschiedenen Umgebungsbedingungen, denen der Keim im Laufe eines „Wirtszklus“ ausgesetzt ist, mag hier weiterhelfen. *Bacteroides fragilis* wird Säuglingen auf fäkal-oralem Weg übertragen. Long *et al.*⁵⁰ haben gezeigt, daß 61% der termingeborenen, vaginal entbundenen und mit Formelnahrung ernährten Säuglinge vier bis sechs Tage nach der Geburt mit *Bacteroides fragilis* kolonisiert werden. Um seine Existenz zu sichern, muß der Mikroorganismus so anpassungsfähig sein, daß er den niedrigen pH des Magens und die Strapazen der Dünndarmpassage überlebt, um schließlich in der Lage zu sein, den Dickdarm zu besiedeln und sich in der Auseinandersetzung mit vielen hundert anderen Spezies zu behaupten. Fortan muß es ihm gelingen, im Intestinaltrakt des Menschen zu persistieren, ohne eine Immunreaktion zu triggern, bis er ausgeschieden wird, und die Reise durch die sich wandelnden Umweltbedingungen im nächsten Wirt von neuem beginnt.

Stellen wir uns die Frage nach dem Vorteil, den *Bacteroides fragilis* als kommensaler Mikroorganismus aus der Expression einer Polysaccharidkapsel zieht, erneut, scheint die Antwort auf der Hand zu liegen: All diesen existenzlimitierenden Faktoren würde der Keim durch die Synthese einer multifunktionalen, dynamischen Oberfläche begegnen: Die Polysaccharidkapsel schützt den Organismus vor chemischen und physikalischen Noxen und durch die variable Expression einer Vielfalt von Oberflächenmolekülen tritt er in Interaktion mit Intestinalepithel des Wirts, ohne eine Immunreaktion zu triggern, was ihm sowohl in der Auseinandersetzung mit der mikrobiellen Konkurrenz als auch mit dem Wirt selbst einen entscheidenden Selektionsvorteil verschafft. Die Tatsache, daß bekapselte *Bacteroides*-

Spezies in der Kolonisierung des Wirts erfolgreicher sind als unbekapselte, ist bereits belegt⁶¹. Welche Mechanismen im Einzelnen dafür verantwortlich sind, wird Thema zukünftiger Projekte sein.

4.3 Phasenvariable Expression von Fimbrien auf der Oberfläche von *Bacteroides fragilis* NCTC 9343

Fimbrien sind fadenförmige Polymere, die in großer Anzahl auf der Oberfläche vieler Bakterien exprimiert werden, um an Rezeptoren auf Epithelzellen des Wirts und anderen Oberflächen zu binden. Bereits vor langer Zeit wurden Fimbrien auf der Oberfläche verschiedener *Bacteroides fragilis* Stämme beobachtet⁶⁸ und ihre Expression in Abhängigkeit von Umgebungstemperatur und Eisengehalt des Kulturmediums beschrieben⁶⁰. Van Doorn *et al.* haben eine Fimbrienuntereinheit von *Bacteroides fragilis* BE1 isoliert und ihre N-terminale Aminosäuresequenz aufgeklärt. Dabei konnte keine Homologie zu bekannten Fimbrienmonomeren anderer Bakterien festgestellt werden. Über die Funktion der Fimbrien in *Bacteroides fragilis*, insbesondere ihre Bedeutung bei der Kolonisation des Wirts, sowie ihre mögliche Rolle als Pathogenitätsfaktor außerhalb des Intestinaltrakts ist nichts bekannt. Daten über die genetischen Grundlagen eines Fimbrienoperons lagen bisher ebenfalls nicht vor. Diese Arbeit beschreibt die Entdeckung eines Fimbrienbiosyntheseoperons in *Bacteroides fragilis* sowie seine phasenvariabel regulierte Expression durch eine sequenzspezifische DNA-Rekombinase, die zu seiner Entdeckung geführt hat.

Auf der Suche nach „der“ DNA-Invertase, die die Phasenvariation von *Bacteroides fragilis* Kapselpolsacchariden reguliert, wurden im Genom des Stammes NCTC9343 25 Tyrosinsequenzspezifische Rekombinasen identifiziert und *inv01* bis *inv25* genannt. Eine solche Anzahl sequenzspezifischer Rekombinasen derselben Familie ist nach unserer Kenntnis bisher beispiellos. Die vergleichende Analyse des Genoms von *Escherichia coli* K12 konnte nur sechs Tyrosin-Rekombinasen ermitteln. Sieben der 25 TsR von *B.f.* NCTC9343 waren in einer Southern-Blot Analyse mit intern gelegenen Abschnitten der Rekombinasengene in allen 44 getesteten *Bacteroides fragilis* Stämme präsent und ließen darauf schließen, dass sie in der gesamten Spezies *Bacteroides fragilis* konserviert sind. Den von ihnen regulierten Systemen kommt somit besondere Bedeutung zu.

Analyse der DNA-Abschnitte, die die konservierten Invertasen flankieren, enthüllte direkt downstream des Gens *inv15* ein bisher unbekanntes Paar von Inverted Repeats. Die Inverted Repeats sind nicht identisch mit denen, die an der Phasenvariation der Kapselpolysaccharide beteiligt sind, jedoch mit einer Sequenz von 23 bp ähnlich lang und schließen ein ähnlich

großes DNA-Segment von 247 bp ein. Innerhalb der Inverted Repeats findet sich auch hier die Sequenz des bekannten *Bacteroides fragilis* Konsensus-Promotors⁷. An die Inverted Repeat-Region schließen unmittelbar acht Gene an, die zusammen mit den zuvor beschriebenen DNA-Elementen die Struktur eines Operons aufweisen und *fimA* bis *fimH* genannt wurden. *FimA* kodiert für ein Protein, welches in seiner Aminosäuresequenz mit der bekannten aminoterminalen Sequenz des Fimbrienmonomeren von *Bacteroides fragilis* BE1₈₃,₈₄ übereinstimmt. Das Produkt von *fimH* weist große Homologie zu einem Fimbrien-„Usher“ (Platzanweiser) auf, einem Protein, das an der Zusammensetzung der Fimbrienmonomeren zu einer strukturellen Einheit beteiligt ist.

Viele DNA-Invertasen der Familie der Tyrosin-sequenzspezifischen Rekombinasen regulieren die Phasenvariation von Fimbrien, indem sie einen singulären Abschnitt des Chromosoms invertieren, der direkt an das Invertasengen anschließt^{40, 48, 31}. Die phasenvariable Kontrolle der Typ I Fimbrienexpression durch FimB und FimE in *E. coli* ist das bestuntersuchte Beispiel für diesen Mechanismus.

Um zu beweisen, daß Inv15 in gleicher Weise die phasenvariable Expression eines Fimbrienlocus in *Bacteroides fragilis* reguliert, wurde das 247 bp umfassende Inverted Repeat-Segment downstream *inv15* auf die Orientierung der darin enthaltenen Promotorregion untersucht. Die Promotorregion war mittels PCR-Analyse in beiden Orientierungen nachweisbar. Inversion des IR-flankierten DNA-Segments findet somit statt. Zur Identifikation von Inv15 als dem Faktor, der diese Inversion herbeiführt, wurde eine interne Deletionsmutante in *inv15* hergestellt, bei der große Teile des ORF durch allelischen Austausch entfernt wurden. Dabei entstanden zwei genotypisch unterschiedliche Mutantenpopulationen: In der einen lag die Promotorregion downstream $\Delta inv15$ ausschließlich in der ON-Orientierung, in der anderen ausschließlich in der OFF-Orientierung vor. Die IR-flankierten Promotorregionen der sieben Kapselpolysaccharide waren durch die Deletion in *inv15* erwartungsgemäß nicht beeinträchtigt. Wurden die $\Delta inv15$ -Mutanten mit *inv15* auf einem Expressionsplasmid komplementiert, fand Phasenwechsel wieder statt. Damit wurde gezeigt, daß die DNA-Invertase Inv15 unmittelbar für die spezifische Inversion der IR-Region downstream *inv15* verantwortlich ist.

Um mehr über das Produkt des putativen Fimbrienoperons zu erfahren, wurden die Proteinprofile beider $\Delta inv15$ -Mutanten im Western-Blot verglichen. Im Bandenmuster der

ON-Mutante fiel eine prominente Bande bei ca. 44 kDa auf, die in der OFF-Mutante nicht nachweisbar war. Da sich beide Mutanten nur in der Expression des Operons downstream *inv15* unterscheiden, schreiben wir diese Bande dem Produkt eines der Gene des putativen *fim*-Operons zu. Die starke Intensität der Bande läßt darauf schließen, daß es sich bei diesem Protein um ein Strukturprotein handelt, welches in der ON-Mutante nun konstitutiv exprimiert wird. Das Protein entspricht in seiner Größe genau FimA (44,5 kDa), dem Produktes des Gens, welches in seiner Sequenz mit dem bekannten N-Terminus des *Bacteroides fragilis* BE1 Fimbrienmonomeren (bei Mismatches in zwei Aminosäuren) übereinstimmt, und so mit höchster Wahrscheinlichkeit für die fimbrielle Untereinheit in *Bacteroides fragilis* kodiert. Die amino-terminale BE1-Sequenz projiziert sich dabei auf einen weiter intern gelegenen Teil von *fimA*, was sich daraus erklärt, daß dessen Open Reading Frame mit 314 Aminosäuren etwas größer ist als der des BE1-Subunits. Der finale Beweis dafür, daß es sich bei dem im Western-Blot aufgefallenen Protein von 44 kDa tatsächlich um FimA handelt, wurde durch massenspektroskopische Analyse seiner Aminosäuresequenz angestrebt. Leider war die aus einem SDS-Gel isolierte Probe durch die benutzte Färbetechnik nicht verwertbar. Doch die Evidenz dafür, daß es sich bei dem überexprimierten Protein tatsächlich um die Fimbrienuntereinheit FimA handelt, erschien zum damaligen Zeitpunkt bereits so groß, daß auf eine Wiederholung der Massenspektroskopie verzichtet wurde.

In ersten Versuchen mit Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) negativ gefärbte Fimbrien auf der Oberfläche von *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 sichtbar zu machen, konnten filamentartige Strukturen angefärbt werden. Weiterführende Arbeiten in Laurie E. Comstocks Labor müssen nun mittels Immunogold-markierten monoklonalen Antikörpern gegen FimA zeigen, daß es sich bei den elektronenmikroskopisch dargestellten Strukturen um die beschriebenen Fimbrien handelt.

Bemerkenswert ist, daß die $\Delta inv15$ -ON Mutante einen auffälligen Phänotyp besitzt: Suspension von Bakterien in salzhaltigen Lösungen hat das sofortige Aggregieren und Absinken der Zellen zu Folge. Dieses Charakteristikum ist voll reversibel, wenn die Mutante mit dem fehlenden Invertasengen *inv15* komplementiert wird, so daß die Zelle die Kontrolle über das Invertasen-abhängig exprimierte Operon zurückerhält.

Die Beobachtung ist mit der konstitutiven Expression von Fimbrien auf der Oberfläche der Zellen leicht zu erklären. Doch auch die Expression von Ag43, eines anderen prominenten, phasenvariabel regulierten Oberflächenproteins in *E. coli*, ist in Zusammenhang mit

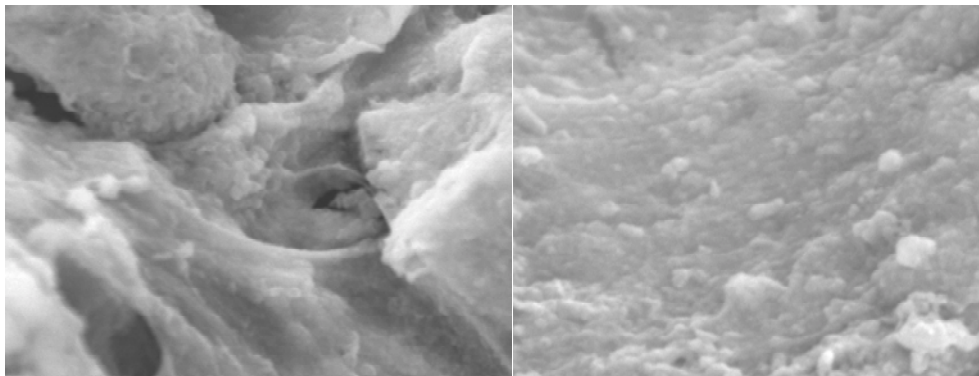
phänotypischer Aggregation und Absinken der Zellen in flüssigem Medium beschrieben worden. Die Expression von Ag43 ist von der des Typ I-Fimbrienlocus abhängig, indem die ON-Phase der Fimbrienexpression zur Repression der Ag43-Synthese führt und umgekehrt⁷². Um zu demonstrieren, daß in *Bacteroides fragilis* die Produkte des Fimbriensyntheselocus selbst und kein anderes abhängig exprimiertes Protein für die phänotypisch auffällige Aggregation der Bakterien verantwortlich sind, wurde ein großer intern gelegener Teil des konstitutiv exprimierten Fimbrienoperons der $\Delta inv15$ -ON-Mutante deletiert. Das phänotypisch beobachtete Klumpen der Bakterien bleibt daraufhin vollständig aus (L. E. Comstock, unveröffentlichte Daten). Dies beweist, daß die Aggregation der Zellen in *Bacteroides fragilis* direkt durch die Expression des *fim*-Locus verursacht wird.

Der hochaggregative Phänotyp, der durch die Fimbriensynthese verursacht wird, macht eine strikte Kontrolle der Expression des Fimbrienoperons in vivo notwendig. Diese Überlegung stimmt mit den experimentellen Daten überein, wonach die Promotorregion des Fimbrienlocus in *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 Wildtyp sowohl unter Laborbedingungen als auch von untersuchten in vivo Isolaten hauptsächlich in der OFF-Orientierung vorliegt, und die Fimbrienexpression damit größten Teils abgeschaltet ist. Wie die Komplementierung der beiden $\Delta inv15$ -Mutanten mit *inv15* auf einem Expressionsvektor gezeigt hat, ist Inv15 in der Lage, eine Umkehrung der Promotorregion von ON nach OFF als auch von OFF nach ON herbeizuführen. Da das Gleichgewicht der Promotororientierung zwischen ON und OFF deutlich auf der Seite der OFF-Orientierung liegt, ist davon auszugehen, daß es zusätzliche Faktoren gibt, die an der Regulierung des Fimbrienoperons in *Bacteroides fragilis* beteiligt sind. Die Identifikation und Charakterisierung dieser Faktoren wird das Ziel zukünftiger Arbeiten sein.

Auch bleibt zu klären, ob von dem beschriebenen Inverted Repeat-flankierten Konsensus-Promotor effektiv die Transkription des *fim*-Operons ausgeht oder ob es sich, wie für den Promotor des Typ I Fimbrienoperons in *E. coli* nachträglich postuliert⁴⁹, um einen sogenannten „read-through-Promotor“ handelt. Dieser initiiert die Transkription nicht selbst, sondern beeinflusst die Transkription eines weiter upstream gelegenen Promotors, indem seine ON-Orientierung das bereits begonnene Transkript stabilisiert, während seine OFF-Orientierung zu vorzeitigem Strangabbruch führt⁴⁹.

Übergeordnet dem Verständnis der molekularen Zusammenhänge steht die Frage nach der Bedeutung, die die Expression von Fimbrien für die Auseinandersetzung des Bakteriums mit dem Wirt hat. Der aggregative Phänotyp der *fim*-ON-Mutante gibt Anlaß zu der Überlegung, ob die gleichen Eigenschaften, die für die Aggregation der Zellen verantwortlich sind, auch die Bildung von Biofilm hervorrufen können. Obwohl die Synthese von Biofilm im Intestinaltrakt des Menschen noch nie direkt nachgewiesen wurde³², geht man seit langem davon aus, daß Keime der intestinalen Mikroflora zur Biofilmbildung in der Lage sind. Der Vergleich von *fim*-ON-Mutante, *fim*-OFF-Mutante und dem 9343 Wildtyp in einem Biofilm-Essay demonstrierte, daß die *fim*-ON-Mutante eine ausgeprägte Adhärenz und Biofilmbildung an Plastikoberflächen aufweist, während praktisch keine Bakterien der *fim*-OFF-Mutante und nur wenige Bakterien des Wildtyps an der Plastikoberfläche der verwendeten Polyvinylchloridgefäße haften blieben (L. E. Comstock, unveröffentlichte Daten). Zur Untersuchung, ob die beobachtete Biofilmbildung biologische Signifikanz für die Kolonisation des Wirts besitzt, verglichen Mitarbeiter aus L. E. Comstocks Labor im Mausmodell die Fähigkeit der beiden *fim*-Mutanten, intestinale Mukosa zu besiedeln. Dazu wurde eine isolierte Colon-Schleife (ligated loop) fünf Stunden mit der jeweiligen *fim*-Mutante inkubiert und anschließend gründlich gewaschen. Wie Abbildung 35 zeigt, sind Bakterien der *fim*-OFF-Mutante nicht in der Lage dem Intestinalepithel anzuhaften, während Zellen der *fim*-ON-Mutante massive Adhärenz an der Schleimhaut aufweisen, und dabei eine clusterförmige Anordnung einnehmen, wie sie für die Bildung von Biofilm charakteristisch ist.

***fim* OFF-Mutante**



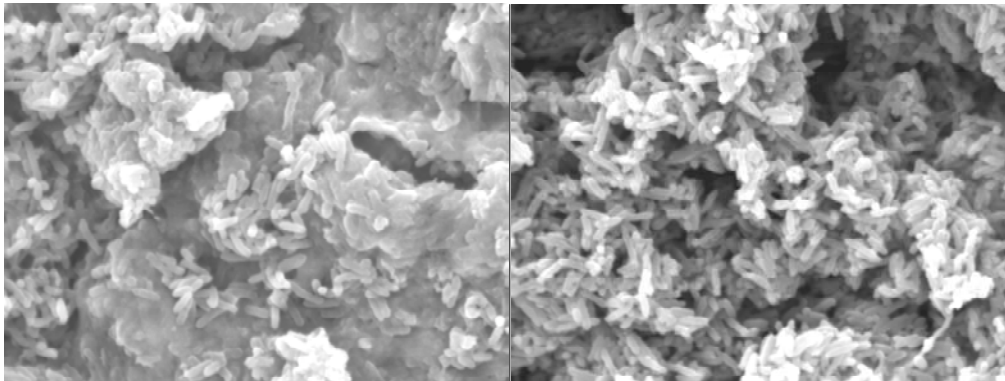
***fim* ON-Mutante**

Abbildung 35: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Colon-Schleife der Maus, die mit der *fim*-OFF-Mutante (Bild oben) und der *fim*-ON-Mutante (Bild unten) kolonisiert wurde. Während die *fim*-OFF-Mutante nicht in der Lage ist, dem Intestinalepithel anzuhaften, zeigt die *fim*-ON-Mutante eine massive Adhärenz an der Mukosaoberfläche. (5000fache Vergrößerung)

Das „ligated loop“-Experiment demonstriert einen überwältigenden Besiedelungsvorteil der Fimbrien-exprimierenden Mutante gegenüber der Fimbrien-freien Mutante. Zur Bestätigung der Ergebnisse *in vivo* werden die *fim*-Mutanten nun in keimfreien Mäusen untersucht, doch ist der Unterschied zwischen *fim*-ON-Mutante und *fim*-OFF-Mutante in ihrer Fähigkeit, das Intestinalepithel experimentell zu kolonisieren, so eindrucksvoll, daß ein Einfluß der Fimbrienexpression auf die Besiedelung des Wirts bereits zum jetzigen Zeitpunkt unbestritten erscheint.

4.4 Immunevasion durch Phasenvariation?

Die Fähigkeit, schnell auf Veränderungen der Umgebung zu reagieren, ist eine Schlüsseleigenschaft bakteriellen Überlebens. Um zu überleben, müssen Einzelzellen in der Lage sein, Veränderungen in der Umwelt wahrzunehmen und angemessen darauf zu reagieren. Dies geschieht gewöhnlich über Signaltransduktionssysteme, die zu einer Änderung der Expression der benötigten Gene führen. In den meisten Fällen benötigt dieser Vorgang kein chromosomales DNA-Rearrangement.

Zunehmend werden Bakterien jedoch als multizelluläre, „altruistische“ Populationen angesehen⁴, in denen das Überleben der Einzelzelle wenig bedeutet im Vergleich zum Überleben der Population als Ganzes. Durch das kontinuierliche Generieren von Zellen unterschiedlicher Phänotypen entstehen gemischte Populationen, die gegen jede Umgebungsveränderung gerüstet sind. Der Vorteil dieser Art von Diversität liegt auf der Hand: Ganz gleich wie schnell sich eine Änderung der Umweltbedingungen vollzieht, ein Teil der Zellen exprimiert bereits den Phänotyp, der für ein Fortbestehen der Einzelzelle und damit der Population notwendig ist²². Solche genetisch unterschiedlichen Subpopulationen werden in der Regel durch DNA-Rearrangement generiert, welches durch eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen zustande kommt. Einer davon ist DNA-Inversion, die durch eine hochfrequente ON-OFF-Änderung von Genexpression jenen raschen phänotypischen Wechsel hervorruft, den wir als Phasenvariation kennen.

Da die überwiegende Mehrheit der Genprodukte, die phasenvariabel exprimiert werden, Oberflächenstrukturen sind, die meist hochgradig immunogen und Angriffspunkt protektiver Antikörper des Wirts sind, könnte Phasenvariation ein Mechanismus sein, wie sich der Keim dem Immunsystem des Wirts entzieht.

Im Falle von *Bacteroides fragilis* bedeutete dies, daß durch die phasenvariable Expression von acht Kapselpolysacchariden, sechs neu entdeckten Oberflächenproteinen und - angesichts der Vielzahl von DNA-Invertasen in seinem Genom - zweifellos zahlreichen weiteren unbekanntem, aber ebenfalls phasenvariabel exprimierten Oberflächenmolekülen permanent Zellen generiert werden, die verschiedenste Subpopulationen bilden. Von diesen wird nur ein winziger Bruchteil den erforderlichen Phänotyp besitzen, um sich der Immunabwehr des Wirts zu entziehen. Aus dieser kleinen Subpopulation heraus wird die

Gesamtheit einer neuen Population erwachsen, um in der nächsten Sekunde selbst von einer eigenen Subpopulation verdrängt zu werden, während der Rest der Zellen zu Grunde geht, und der kurzlebige Aufstieg und Fall einer neuen Subpopulation bereits beginnen ...

Während wir anfangen zu begreifen, in welchem Ausmaß sequenzspezifische Rekombinationsereignisse die Evolution des prokaryotischen Genoms beeinflusst haben, setzt sich die Interaktion mit der kommensalen Mikroflora in unserem Intestinaltrakt unbemerkt und leise fort. Die Forschung wird weitergehen, damit wir nun beginnen, den Einfluß des prokaryotischen Genoms auf unsere eigene Entwicklung zu verstehen.

5 Zusammenfassung

Der menschliche Intestinaltrakt ist ein vielfältiges und komplexes Ökosystem, das auf der einzigartigen Interaktion zwischen dem Wirt und der bakteriellen Mikroflora beruht. Die Bakterienoberfläche dient dabei als Grenzfläche, an der sich ein dynamischer Austausch vollzieht. Sie ist daher für beide Symbionten von besonderer Bedeutung.

Diese Arbeit beschreibt die Entdeckung spezifischer DNA-Rekombinasen, durch die der kommensale Mikroorganismus *Bacteroides fragilis* die immunogene Architektur seiner Oberfläche global moduliert.

Bacteroides fragilis synthetisiert acht verschiedene Kapselpolysaccharide. Alle Kapselpolysaccharide durchlaufen Phasenvariation im Sinne einer hochfrequenten ON-OFF Änderung ihrer phänotypischen Expression. In sieben der acht Kapselpolysaccharide ist der genetische Mechanismus, der der Phasenvariation zu Grunde liegt, DNA-Inversion. Dabei invertiert ein Inverted Repeat-flankiertes DNA-Element, welches den für die Kapselpolysaccharidexpression notwendigen Promotor enthält, und ändert seine Orientierung in Bezug auf das downstream gelegene Operon, so daß im einen Fall Polysaccharidsynthese stattfindet (ON-Orientierung), im anderen nicht (OFF-Orientierung). Den Faktor bzw. die Faktoren zu identifizieren, die für die Inversion der Kapselpolysaccharidpromotorregionen verantwortlich sind, war Ziel der folgenden Studien.

Faktoren die DNA-Inversion herbeiführen, sogenannte DNA-Invertasen, teilen sich in zwei Familien: Tyrosin-sequenzspezifische Rekombinasen (TsR) und Serin-sequenzspezifische Rekombinasen (SsR). Beide Familien sind evolutionär und mechanistisch verschieden. Analyse des Genoms des *Bacteroides fragilis* Prototyp-Stammes NCTC 9343 auf darin enthaltene sequenzspezifische Rekombinasen enthüllte 25 TsR (Inv 01 bis Inv 25) und 3 SsR (Res01 bis Res03). Southern Blot-Analysen von 50 verschiedenen *Bacteroides fragilis* Stämmen mit intern gelegenen Anteilen der Rekombinasengene zeigten, daß 7 der 25 TsR und eine der 3 SsR in der gesamten Spezies *Bacteroides fragilis* konserviert vorliegen. Diese Rekombinasen sind potentielle Kandidatengene der gesuchten DNA-Invertase.

Zwei der sieben konservierten Invertasen, Inv 19 und Res02, zeigten sich *in vitro* in der Lage, die Promotorregion von PS A zu invertieren, wenn sie in einem Vektor exprimiert wurden.

Deletionsmutanten in den entsprechenden Rekombinasengen bestätigten die Serinsequenzspezifische Rekombinase Res02 *in vivo* als den Faktor, der Phasenvariation der Kapselpolysaccharide in *Bacteroides fragilis* reguliert.

Analyse der DNA-Sequenzen, die die konservierten Invertasengene flankieren, enthüllte direkt downstream von *inv 15* ein weiteres Inverted Repeat-flankiertes DNA-Element, welches ebenfalls eine *Bacteroides fragilis* Konsensus Promotor Sequenz enthält. Weiter downstream schließen sich acht eng geclusterte Gene an, die die Struktur eines Operons aufweisen. PCR-Analyse zeigte, daß auch dieses Inverted Repeat-flankierte DNA-Element *in vivo* invertiert. Durch Deletion des Invertasengens *inv15* entstanden zwei unterschiedliche Mutantenpopulationen, die das bewegliche DNA-Element entweder nur in der ON- oder nur in der OFF-Orientierung aufwiesen und das „Operon downstream *inv15*“ demnach konstitutiv oder gar nicht exprimierten. Die $\Delta inv15$ ON-Mutante zeigte im Western Blot die Synthese eines Proteins, dessen Aminosäuresequenz große Homologie zu der bekannten Fimbrienuntereinheit des Stammes *Bacteroides fragilis* BE 1 hat. Die DNA-Sequenz eines weiteren Gens dieses Operons wies Homologie zu einem bekannten Fimbrien-„Usher“ auf. Phänotypisch demonstrierte die ON-Mutante ausgeprägte Autoaggregation in salzhaltigen Lösungen sowie signifikante Adhärenz an künstlichen Oberflächen im Biofilm-Essay. Diese Ergebnisse haben zur Beschreibung eines durch die Tyrosinsequenzspezifische Rekombinase Inv 15 phasenvariabel regulierten Fimbrienoperons in *Bacteroides fragilis* geführt.

Die Arbeit zeigt, daß *Bacteroides fragilis* die immunogene Architektur seiner Oberfläche durch die Aktivität unterschiedlicher sequenzspezifischer DNA-Rekombinasen moduliert. Die chromosomale Konservierung von Rekombinasen, die üblicherweise auf mobilen DNA-Elementen weitergegeben werden, legt nahe, daß die phasenvariable Regulation bakterieller Oberflächenmoleküle sehr alt ist und einen selektiven Vorteil für diese Mikroorganismen in der Koevolution mit dem Menschen mit sich gebracht hat.

6 Referenzen

1. **Abraham, J., C. Freitag, J. Clemens, and B. Eisenstein.** 1985. An invertible element of DNA controls phase variation of type I fimbriae in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. **82**:5724-5727.
2. **Altschul, S. F., W. Gisch, W. Miller, E. W. Meyers, and D. J. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. **215**:403-410.
3. **Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of database search programs. Nucleic Acid Res. **25**:3389-3402.
4. **Andrews, J. H.** 1995. What if bacteria are modular organisms. Am. Soc. Microbiol. News. **33**:236-239
5. **Appelmek, B., B. Shiberu, C. Trinks, N. Tapsi, P. Zheng, T. Verboom, J. Maaskant, C. Hokke, W. Schiphorst, D. Blanchard, I. Simmons-Smith, D. van den Eijnden, and C. Vandenbroucke-Grauls.** 1998. Phase variation in *Helicobacter pylori* lipopolysaccharid. Infect. Immun. **66**:70-76.
6. **Ayabe, T., D. P. Satchell, C. L. Wilson, W. C. Parks, M. E. Selsted, and A. J. Ouellette.** 2000. Secretion of microbicidal alfa-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. Nat. Immunol. **1**:113-118.
7. **Bateman, A., E. Birney, L. Cerruti, R. Durbin, L. Etwiller, S. R. Eddy, S. Griffiths-Jones, K. L. Howe, M. Marshall, and E. Sonnhammer.** 2002. The Pfam protein families database. Nuc. Acids Res. **30**:276-280.
8. **Bayley, D. P., E. R. Rocha, and C. J. Smith.** 2000. Analysis of *cepA* and other *Bacteroides fragilis* genes reveals a unique promoter structure. FEMS Microbiol. Lett. **193**:149-154.

9. **Bethesda Research Laboratories.** 1986. BRL pUC host: *E. coli* DH5 α competent cells. Focus. **8**:9.
10. **Blomfield, I. C., P. J. Calie, K. J. Eberhardt, M. S. McClain, and B. I. Eisenstein.** 1993. Lrp stimulates phase variation of type I fimbriation in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. **175**:27-36.
11. **Bode, J., T. Schlake, M. Iber, D. Schublerer, J. Seibler, E. Snezhkov, and L. Nikolaev.** 2000. The transgenetecist's toolbox: novel methods for the targeted modification of eukaryotic genomes. Biol. Chem. **381**:801-813.
12. **Booth, S. J., R. J. van Tassell, J. L. Johnson, and T. D. Wilkins.** 1979. Bacteriophages of *Bacteroides*. Rev. Infect. Dis. **1**:325-336.
13. **Brocks, J. J., G. A. Logan, R. Buick, and R. E. Summons.** 1999. Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes. Science. **285**:1033-1036.
14. **Bry, L., P. Falk, T. Midtvedt, and J. Gordon.** 1996. A model of host-microbial interactions in an open mamalian ecosystem. Science. **273**:1380-1383.
15. **Carrasco, C. D., K. S. Ramaswamy, T. Ramasubramanian, and J. W. Golden.** 1994. *Anabaena* xisF gene encodes a developmentally regulated site-specific recombinase. Gene Dev. **8**:74-83.
16. **Chen J., D. Leblanc, and D. Galli.** 2002. DNA-Inversion on conjugative plasmid pVT745. J. Bacteriol. **184**:5926-5934.
17. **Comstock, L. E., M. J. Coyne, A. O. Tzianabos, and D. L. Kasper.** 1999. Interstrain variation of the polysaccharid B biosynthesis locus of *Bacteriodes fragilis*: Characterisation of the region from strain 638R. J. Bacteriol. **181**:6192-6196.

18. **Comstock, L. E., A. Pantosti, and D. L. Kasper.** 2000. Genetic diversity of the capsular polysaccharide C biosynthesis region of *Bacteroides fragilis*. *Infect. Immun.* **68**:6182-6188.
19. **Coyne, M. J., A. O. Tzianabos, B. C. Mallory, V. J. Carey, D. L. Kasper, and L. E. Comstock.** 2001. Polysaccharide synthesis locus required for virulence in *Bacteroides fragilis*. *Infect. Immun.* **69**:4342-4350.
20. **Dorman, C. J., and C. F. Higgins.** 1987. Fimbrial phase variation in *Escherichia coli*: dependence on integration host factor and homologies with other site-specific recombinases. *J. Bacteriol.* **169**:3840-3843.
21. **Dove, S. L., S. G. Smith, and C. J. Dorman.** 1997. Control of *Escherichia coli* type I fimbrial gene expression in stationary phase: a negative role for RpoS. *Mol. Gen. Genet.* **33**:13-20.
22. **Dybvig, K.** 1993. DNA rearrangements and phenotypic switching in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* **10**:465-471.
23. **Gally, D. L., A. J. Bogan, B. I. Eisenstein, and I. C. Blomfield.** 1993. Environmental regulation of the *fim* switch controlling type I fimbrial phase variation in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **175**:6186-6193.
24. **Gally, D., J. Leahart, and I. Blomfield.** 1996. Interaction of FimB and FimE with the *fim* switch that controls the phase variation of type I fimbriae in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **21**:725-738.
25. **Gorbach, S. L., and J. G. Bartlett.** 1974. Anaerobic Infections. *N. Eng. J. Med.* **290**:21357-21363.
26. **Grainge, I., and M. Jayaram.** 1999. The integrase family of recombinases: organisation and function of the active site. *Mol. Microbiol.* **33**:449-456.

27. **Guiney, D., P. Hasegawa, and C. Davis.** 1984. Plasmid transfer from *Escherichia coli* to *Bacteroides fragilis*: differential expression of antibiotic resistance phenotypes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **82**:7203-7206.
28. **Hammerschmidt, S., A. Müller, H. Sillmann, M. Mühlenhoff, R. Borrow, A. Fox, J. van Putten, W. Zollinger, R. Gerardy-Schahn, and M. Frosch.** 1996. Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped strand mispairing in the polysialyltransferase gene (*siaD*): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease. Mol. Microbiol. **20**:1211-1220.
29. **Heichmann, K. A., and R. C. Johnson.** 1990. The Hin invertosome: Protein-mediated joining of distant recombination sites at the enhancer. Science. **249**:511-517.
30. **Henderson, I. R., P. Owen, and J. P. Narato.** 1999. Molecular switches - the ON and OFF of bacterial phase variation. Mol. Microbiol. **33**:919-925.
31. **Honavar, S., B.-K. Choi, and D. M. Schifferli.** 2003. Phase variation of the 987P-like CS18 fimbriae of human enterotoxigenic *Escherichia coli* is regulated by site-specific recombinases. Mol. Microbiol. **48**:157-171.
32. **Hooper, L. V., and J. I. Gordon.** 2001. Commensal host-bacterial relationship in the gut. Science. **292**:1115-1118.
33. **Hooper, L. V., M. H. Wong, A. Thelin, L. Hansson, P. G. Falk, and J. I. Gordon.** 2001. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. Science. **291**:881-884.
34. **Husebye, E. P. M. Hellstrom, and T. M. Midtvedt.** 1994. Intestinal microflora stimulates myoelectric activity of rat small intestine by promoting cyclic initiation and aboral propagation of myoelectric complexes. Dig. Dis. Sci. **39**:946-956.

35. **Iida, S., J. Meyer, K. Kennedy, and W. Arber.** 1982. A site-specific, conservative recombination system carried by bacteriophage ϕ 1. Mapping the recombinase gene *cin* and the cross-over sites *cix* for the inversion of the C segment. *EMBO J.* **1**:1445-1453.
36. **Iida, S., H. Sandmeier, p. Hubner, R. Hiestand-Nauer, K. Schneitz, and W. Arber.** 1990. The *min* DNA inversion enzyme of plasmid p15B of *Escherichia coli* 15T-: a new member of the *Din* family of site-specific recombinases. *Mol. Microbiol.* **4**:991-997.
37. **Johnson, J. L.** 1978. Taxonomy of *Bacteroides*. I. Desoxyribonucleic acid homologies among *Bacteroides fragilis* and other saccharolytic *Bacteroides* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **28**:245-268.
38. **Johnson R. C., and M. I. Simon.** 1985. *Hin*-mediated site-specific recombination requires two 26 bp recombination sites and a 60 bp recombinational enhancer. *Cell.* **41**:781-791.
39. **Kimura, A.** 1986. Antigenic and phenotypic variants of *Hemophilus influenzae* type b lipopolysaccharide and their relationship to virulence. *Infect. Immun.* **51**:60-79.
40. **Klemm, P.** 1986. Two regulatory *fim* genes, *fimB* and *fimE*, control the phase variation of type I fimbriae in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **5**:1389-1393.
41. **Kopp, E., and R. Medzhitov.** 2002. Skin antibiotics get in the loop. *Nature Med.* **8**:1359-1360.
42. **Krinos, C. M., M. J. Coyne, K. G. Weinacht, A. O. Tzianabos, D. L. Kasper, and L. E. Comstock.** 2001. Extensive surface diversity of a commensal microorganism by multiple DNA inversions. *Nature.* **414**:555-558.

43. **Krohn, M. A., S. L. Hillier, M. L. Lee, L. K. Rabe, and D. A. Eschenbach.** 1991. Vaginal *Bacteroides* species are associated with an increased rate of preterm delivery among women in preterm labor. *J. Infect. Dis.* **164**:88-93.
44. **Kulasekara, H. D., and I. C. Blomfield.** 1999. The molecular basis for the specificity of FimE in phase variation of type I fimbriae in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol.* **31**:1171-1182.
45. **Kwohl, D., and D. Ziper.** 1981. Identification of the gin protein of bacteriophage mu. *Virology.* **114**:291-296.
46. **Lander, E. S., L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczyk, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J. P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Nylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, N. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humfray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J. C. Mullikin, A. Mungal, R. Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R. H. Waterston, R. K. Wilson, L. W. Hillier, J. D. McPherson, M. A. Marra, E. R. Mardis, L. A. Fulton, A. T. Chinwalla, K. H. Pepin, W. R. Gish, S. L. Cissoe, M. C. Wendl, K. D. Lelehaunty, T. L. Miner, A. Delehaunty, J. B. Kramer, L. L. Cock, R. S. Hawkins, E., Brancomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J.-F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, E. Uberbacher, M. Frazier, and A. Richard.** 2001. Human Genome Sequencing Projekt. *Nature.* **409**:860-922.
47. **Lawrence, J. G.** 1999. gene transfer, speciation, and the evolution of bacterial genomes. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:519-523.

48. **Li, X., C. V. Lockett, D. E. Johnson, and H. L. Mobley.** 2002. Identification of Mrp I as the sole recombinase that regulates phase variation of MR/P fimbria, a bladder colonisation factor of uropathogenic *Proteus mirabilis*. *Mol. Microbiol.* **45**:865-874.
49. **Lim, J. K., N. W. Gunther IV, H. Zhao, D. E. Johnson, Susan K. Keay, and H. L. T. Mobley.** 1998. In vivo phase variation of *Escherichia coli* Typ 1 fimbrial genes in women with urinary tract infection. *Infect. Immun.* **66**:3303-3010.
50. **Long, S., and R. Swenson.** 1977. Development of anaerobic fecal flora in healthy newborn infants. *J. Pediatr.* **91**:298-301.
51. **Macpherson, A. J., D. Gatto, E. Sainsbury, G. R. Harriman, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel.** 2000. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science.* **288**:2222-2226.
52. **Matsuura, M., T. Noguchi, D. Yamaguchi, T. Aida, M. Sayama, H. Takahashi, and M Shirai.** 1996. The sre gene (ORF 469) encodes a site-specific recombinase responsible for integration of the R4 phage genome. *J. Bacteriol.* **178**:3374-3376.
53. **McClain, M., I. Blomfield, K. Eberhardt, and B. Eisenstein.** 1993. Inversion-independent phase variation of type I fimbriae in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**:4335-4344.
54. **Meier-Severs, G., and E. van Santen.** 1986. Variations in anaerobic faecal flora of ten healthy human volunteers with special reference to the *Bacteroides fragilis*-group and *Clostridium difficile*. *Zentralbl. Bakteriologie, Mikrobiol. Hyg.* **261**:43-52.
55. **Nakata, M. and R. Lewis.** 1984. Anaerobic bacteria in bone and joint infections. *Rev Infect Dis.* **6**:165-170.

56. **Nash, H.** 1996. Site-specific recombination: Integration, excision, resolution, and inversion of defined DNA-segments. In *Escherichia coli and Salmonella*, Vol.1, American Society for Microbiology Press. pp. 2363-2376.
57. **Neish, A. S., A. T. Gewirtz, H. Zeng, A. N. Young, M. E. Hobert, V. Karmali, A. S. Rao, and J. L. Madara.** 2000. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of I κ B- α ubiquitination. *Science*. **289**:1560-1563.
58. **Olsen, P., and P. Klemm.** 1994. Localisation of promoters in the *fim* gene cluster and the effect of H-NS on the transkription of *fimB* and *fimE*. *FEMS Microbiol. Lett.* **116**:95-100.
59. **Onderdonk, A. B., D. L. Kasper, R. L. Cisneros, and J. G. Bartlett.** 1977. The capsular polysaccharid of *Bacteriodes fragilis* is a virulence factor: Comparison of the pathogenic potential of encapsulated and unencapsulated strains. *J. Infect. Dis.* **136**:82-89.
60. **Oyston, P. C. F., and P. S. Handley.** 1990. Surface structures, haemagglutination and cell surface hydrophobicity of *Bacteroides fragilis* strains. *J. Gen. Microbiol.* **136**:941-948.
61. **Oyston, P. C. F., and P. S. Handley.** 1991. Surface components of *Bacteroides fragilis* involved in adhesion and haemagglutination. *J. Med. Microbiol.* **34**:51-55.
62. **Pantosti, A., R. Colangeli, A. O. Tzianabos, and D. L. Kasper.** 1995. Monoclonal antibodies to detect capsular diversity among *Bacteroides fragilis* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **33**:2647-2652.
63. **Panosti, A., A. O. Tzianabos, A. B. Onderdonk, and D. L. Kasper.** 1991. Immunochemical Characterisation of two surface polysaccharides in *Bacteroides fragilis*. *Infect. Immun.* **59**:2075-2082.

64. **Patrick, S., J. Parkhill, L. J. McCoy, N. Lennard, M. J. Larkin, M. Collins, M. Sczaniecka, and G. Blakely.** 2003. Multiple inverted DNA repeats of *Bacteroides fragilis* that control polysaccharide antigenic variation are similar to the *hin* region inverted repeats in *Salmonella typhimurium*. *Microbiology*. **149**:915-924.
65. **Pearson, W. R., and D. J. Lipman.** 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **85**:2444-2448.
66. **Perret, X., C. Staehelin, and W. J. Broughton.** 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**:180-186.
67. **Polk, B. F., and D. L. Kasper.** 1977. *Bacteroides fragilis* subspecies in clinical isolates. *Annals. Inter. Med.* **86**:569-571.
68. **Pruzzo C., B. Dainelle, and M. Riocchetti.** 1984. Pilated *Bacteroides fragilis* strains adhere to epithelial cells and are more sensitive to phagocytosis by human neutrophils than nonpilated strains. *Infect. Immun.* **43**:189-194.
69. **Salyers, A.** 1984. *Bacteroides* of the human lower intestinal tract. *Ann. Rev. Microbiol.* **38**:293-313.
70. **Sauer, B.** 1998. Inducible gene targeting in mice using the Cre/Lox system. *Methods: Companion Methods Enzymol.* **14**:381-392.
71. **Savage, D. C.** 1977. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Ann. Rev. Microbiol.* **31**:107-133.
72. **Schembri, M. A., and P. Klemm.** 2001. Coordinate gene regulation by fimbriae-induced signal transduction. *EMBO J.* **20**:3074-3081.
73. **Smith, M. C. M., and H. M. Thorpe.** 2002. Diversity of serine recombinases. *Mol. Microbiol.* **44**:299-307.

74. **Southern, E. M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gelelektrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503-517.
75. **Steinert, M., U. Hentschel, and J. Hacker.** 2000. Symbiosis and pathogenesis: evolution of the microbe – host interaction. *Naturwissenschaften.* **87**:1-10.
76. **Steinert, P. M., and L. N. Marekov.** 1999. Initiation of assembly of the cell envelope barrier structure of stratified squamous epithelia. *Mol. Biol. Cell.* **10**:4247-4261.
77. **Thadepalli, H., S., S. Gorbach , P. Broido, J. Norsen, and L. Nyhus.** 1973. Abdominal trauma, anaerobes, and antibiotics. *Surg. Gynecol. Obs.* **137**:270-276.
78. **Tzianabos, A. O., D. L. Kasper, R. L. Cisneros, R. S. Smith, and A. B. Onderdonk.** 1995. Polysaccharid-mediated protection against abscess formation in experimental intra-abdominal sepsis. *J. Clin. Investig.* **26**:2727-2731.
79. **Tzianabos, A. O., A. B. Onderdonk, B. Rosner, R. L. Cisneros, and D. L. Kasper.** 1993. Structural features of polysaccharides that induce intra-abdominal abscesses. *Science.* **262**:416-419.
80. **Tzianabos, A. O., A. B. Onderdonk, R. S. Smith, and D. L. Kasper.** 1994. Structure-function relationship for polysaccharid-induced intra-abdominal abscesses. *Infect. Immun.* **62**:3590-3593.
81. **Tzianabos, A. O., A. Pantosti, H. Baumann, J. R. Brisson, H. J. Jennings, and D. L. Kasper.** 1992. The capsular polysaccharide of *Bacteroides fragilis* comprises two ionically linked polysaccharides. *J. Biol. Chem.* **267**:18230-18235.

82. **Thompson, J. S., and M. H. Malamy.** 1990. Sequencing the gene for an imipenem-cefoxitin-hydrolysing enzyme (CfiA) from *Bacteroides fragilis*. *J. Bacteriol.* **172**:2584-2593.

83. **Van Doorn, J., F. R. Mooi, A. M. J. J. Verweij-van Vught, and D. M. MacLaren.** 1987. Characterisation of fimbriae from *Bacteroides fragilis*. *Microb. Pathogen.* **3**:87-95.

84. **Van Doorn, J., B. Oudega, and D. M. MacLaren.** 1992. Characterization and detection of the 40 kDa fimbrial Subunit of *Bacteroides fragilis* BE1. *Microb. Pathogen.* **13**:75-79.

85. **Visick, K. L., and M. J. McFall-Ngai.** 2000. An exclusive contract: specificity in the *Vibrio fischeri* – *Eupymna scolopes* partnership. *J. Bacteriol.* **182**:1779-1787.

86. **Wang, H., and P. Mullany.** 2000. The large resolvase TndX is required and sufficient for integration and excision of derivatives of the novel conjugative transposon Tn5397. *J. Bacteriol.* **182**:6577-6583.

87. **Wilson, C. L., A. J. Ouellette, D. P. Satchell, T. Ayabe, Y. S. Lopez-Boado, J. L. Stratman, S. J. Hultgren, L. M. Matrisian, and W. C. Parks.** 1999. Regulation of intestinal α -defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science.* **286**:113-117.

88. **Xu, J., M. K. Bjursell, J. Himrod, S. Deng, L. K. Carmichael, H. C. Chiang, L. V. Hooper, and J. I. Gordon.** 2003. A genomic view of human-*Bacteroides thetaiotaomicron* symbiosis. *Science.* **299**:2074-2076.

89. **Zieg, J., M. Silverman, M. Hilmen, M. and Simon.** 1977. Recombinational switch for gene expression. *Science.* **196**:170-172.

7 Abkürzungen

AD ₅₀	Abcess Dose 50; Dosis, bei der 50% der Versuchstiere Abszesse entwickeln
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
BHIS	Brain Haert Infusion Broth
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CIP	calf intestinal phosphatase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Ery	Erythromycin
EDTA	Ethylendiaminetetraaceticacid
EtOH	Ethanol
Gent	Gentamycin
IR	Inverted Repeat
Kan	Kanamycin
kbp	kilo bp
kDa	kilo Dalton
L-(B)	Luria-(Broth)
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NaAc	Natrium Aceat
OD	optical density
ORF	Open Reading Frame
<i>ori</i>	origin of replication
PAGE	polyacrylamid gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
pmol	picomol
PS	Polysaccharid
rpm	revolutions per minute
RT	Raum Temperatur
SDS	sodium dodecyl sulfat
TAE	Tris/Acetat/EDTA

TBS	Tris buffered saline
TE	Tris/EDTA
T _m	maximale Annealing Temperatur
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
ÜN	über Nacht
xVol	Teil des Gesamtvolumens
w/	with
WT	Wild Typ
w/v	weight per volume

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Hermann Wagner für die Überlassung des Themas, vor allem aber für seine spontane Bereitschaft, diese Arbeit aus der Ferne zu übernehmen und zu betreuen. Seine Zusage als Doktorvater mag für wenige seiner Doktoranden so viel Erleichterung bedeutet haben wie für mich, und sein Name ruft seither bei jederman in Dr. Comstock's Labor positive Assoziationen hervor. Die persönlichen Treffen waren weit über die fachlichen Grenzen hinaus bereichernd. Sie haben wichtige Entscheidungen nachhaltig beeinflußt und waren mir besonders in der Zeit konzentrierten Niederschreibens der Ergebnisse ein Lichtblick.

Dr. Hassan Jumaa danke ich für seine konstruktive Kritik an der Arbeit und seine ermutigende Überzeugung, daß schöne Dissertationen einem ein Leben lang begleiten.

Vor allem aber danke ich meinen Eltern, die am Gelingen dieser Arbeit - wie an allem anderen, was mir bisher gelungen ist - großen Anteil haben: Angefangen bei ihren Besuchen in Boston, wo alles begann, bis zu dem Tag als diese Arbeit in ihrem Haus zwischen Erdbeerkuchen und juristischer Sachkompetenz schließlich ein Ende fand.