

**Funktionelle Charakterisierung
von 9-O-Acetylerasen
enterohämorrhagischer *Escherichia coli***

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

Fakultät für Naturwissenschaften

Universität Hohenheim

Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie

Fachgebiet Lebensmittelmikrobiologie und -hygiene

vorgelegt von

Stefanie Feuerbaum

aus

Offenbach am Main

2019

Prodekanin: Prof. Dr. Waldtraut Schulze

1. berichtende Person: Prof. Dr. Herbert Schmidt

2. berichtende Person: Prof. Dr. Wolfgang Florian Fricke

3. prüfende Person: Prof. Dr. Julia Fritz-Steuber

Eingereicht am: 01.08.2019

Mündliche Prüfung am: 24.10.2019

Die vorliegende Arbeit wurde am 05.08.2019 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1. Zusammenfassung	1
2. Abstract	3
3. Einführung.....	5
3.1. Erkrankungen durch enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>	6
3.2. Epidemiologie enterohämorrhagischer <i>E. coli</i>	7
3.3. Virulenzfaktoren der enterohämorrhagischen <i>E. coli</i> O157:H7 Stamm EDL933.....	8
3.4. Virulenzfaktoren des Shiga Toxin-produzierenden enteroaggregativen <i>E. coli</i> O104:H4 Ausbruchsstammes.....	11
3.5. Mechanismus zur Kolonisierung von EHEC im Dickdarm	13
3.6. Kohlenhydratmetabolismus enterohämorrhagischer <i>E. coli</i> im Dickdarm	15
3.7. Vorkommen von 9-O-Acetylerasen bei Shiga Toxin-produzierenden <i>E. coli</i>	18
3.8. Vorkommen von O-Acetylerasen in anderen Organismen und Viren	20
3.9. Ziel der Arbeit	21
4. Material und Methoden	24
4.1. Material.....	24
4.1.1. Enzyme.....	24
4.1.2. Bakterienstämme	25
4.1.3. Verwendete Oligonukleotide	26
4.1.4. Verwendete Zellkulturen.....	27
4.1.5. Chemikalien	28
4.1.6. Geräte.....	32
4.1.7. Programme	35
4.1.8. Verwendete Kits.....	36
4.1.9. Medien.....	36
4.1.10. Puffer und Lösungen.....	37
4.1.11. Verwendete Antikörper	44
4.1.12. Laufmittel für die HPTLC	44
4.2. Methoden	45
4.2.1. Kultivierung von Bakterien.....	45
4.2.2. Restriktion des Plasmides pET22b(+)	45
4.2.3. Polymerase Kettenreaktion	45

4.2.4.	DNA-Isolierung aus Agarosegel	47
4.2.5.	HD In-Fusion® Reaktion.....	47
4.2.6.	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	48
4.2.7.	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	48
4.2.8.	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> (Mini Präparation)	49
4.2.9.	Induktion der Genexpression von <i>nanS</i> -p-His	49
4.2.10.	Protein-Aufreinigung.....	50
4.2.11.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
4.2.12.	Westernblot.....	51
4.2.13.	Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford.....	52
4.2.14.	Herstellen der Derivatisierungsreagenz Diphenylamin-Alanin-Phosphorsäure (DAPA) 53	
4.2.15.	High-Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)	53
4.2.16.	Enzymatische de-O-Acetylierung von Neuraminsäuren.....	54
4.2.17.	Enzymatischer Verdau von RinderdrüsenSpeichelmuzin	54
4.2.18.	Probenvorbereitung für nanoESI MS Analysen	54
4.2.19.	Massenspektrometrische Analysen mittels nanoESI MS	55
4.2.20.	Kultivierung und Passagieren von HT-29 und LS 180 Zellen.....	55
4.2.21.	Auftauen von Kryokonserven von Zellkulturen.....	56
4.2.22.	Herstellung von Kryokonserven von Zellkulturen	57
4.2.23.	Adhärenzassay	57
4.2.23.1.	Vorbereitung der Bakteriensuspension	57
4.2.23.2.	Vorbereitung der Zellkultur	57
4.2.23.3.	Infektion der HT-29 Zellen.....	58
4.2.24.	Deskriptive Statistik	59
4.2.25.	Analyse von Muzinabbau im Zellkulturversuch.....	59
4.2.26.	Unspezifische Färbung von Glykoproteinen mittels PAS-Färbung.....	60
4.2.27.	Mikroskopie gefärbter LS 180 Zellen.....	60
4.2.28.	Motilitätsassay nach Bufe et al. (173).....	61
5.	Ergebnisse.....	62
5.1.	Herstellung eines Vektors zur Expression von NanS-p15-His	62
5.2.	Expression rekombinanter 9-O-Acetylerasen und Konzentrationsbestimmung ..	65
5.3.	Analyse der de-O-Acetylierung von Neuraminsäuren durch 9-O-Acetylerasen mittels HPTLC	67

5.4.	Analyse der Enzymaktivität von 9-O-Acetylerasen in RinderdrüsenSpeichelmuzin mittels nanoESI MS.....	71
5.5.	HPTLC und nanoESI MS Analysen von NanS-His bzw. NanS-p-His und Sialidase BTSA-His behandeltem Muzin	75
5.6.	Einfluss von NanS-p auf die Adhärenz der EHEC O157:H7 Stamm EDL933 und O104:H4 Stamm C227-11 ϕ cu an die Darmepithelzelllinie HT-29 in vitro	80
5.7.	Abbau des Muzins von Darmepithelzellen LS 180 durch O157:H7 Stamm EDL933 und <i>nanS-p</i> Deletionsmutanten.....	85
5.8.	Motilität von EHEC Stämmen in Schwimmversuchen	89
6.	Diskussion.....	93
6.1.	Breiteres Substratspektrum der analysierten NanS-p aus O157:H7	93
6.2.	Prophagenkodierte 9-O-Acetylerasen aus EHEC als potentielle Virulenzfaktoren	96
6.2.1.	Einfluss der 9-O-Acetylerasen auf den Abbau von Glykoproteinen von Muzin-produzierenden Darmepithelzellen in vitro	96
6.2.2.	Einfluss der 9-O-Acetylerasen auf die Adhärenz von EHEC an Darmepithelzellen in vitro	99
6.2.3.	9-O-Acetylerasen reduzieren die Motilität von EHEC.....	102
6.3.	Gendosiseffekt durch Mehrfachausstattung der <i>nanS-p</i> Gene in EHEC.....	104
6.4.	Ausblick	105
7.	Literaturverzeichnis.....	109
8.	Anhang	124
8.1.	Cap-Contig Sequenz von pET22b(+)/ <i>nanS-p15</i>	124
8.2.	Massenspektrometrische Analyse der de-O-Acetylierung von Glykan-gebundenen Neuraminsäuren durch NanS-p2-His und NanS-p4-His.....	126
8.3.	Hydrolyse de-O-acetylierter Neuraminsäure nach Inkubation von BSM mit Sialidase BTSA-His und NanS-p2-His bzw. NanS-p4-His	128
8.4.	Ergebnisse des Bonferroni-Tests.....	130
8.4.1.	Vergleich von EDL933 mit Mutanten und Zugabe der BTSA-His	130
8.4.2.	Vergleich von C227-11 ϕ cu mit Mutanten und Zugabe der BTSA-His	131
8.5.	Aminosäuresequenz-Alignment von NanS-p1 und NanS-p15.....	132
9.	Eidesstattliche Versicherung.....	134
10.	Lebenslauf	135
11.	Danksagung.....	137

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
µS	Mikrosiemens
A/E	Attachement/effacement
AG	Aktiengesellschaft
AI-3	Autoinducer-3
AIEC	Adhärent-invasive <i>E. coli</i>
Amp	Ampicillin
ampR	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	American Type Culture Collection
ATS 4	Automatische Sprühvorrichtung 4
<i>B. thetaiotaomicron</i>	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BSM	Bovine submaxillary gland mucin
BTSA	Sialidase aus <i>B. thetaiotaomicron</i>
Bzw.	Beziehungsweise
C	Kohlenstoff
C1-INH	C1-Esterase-Inhibitor
C3b	Komplementfaktor 3b
CaCl ₂	Kalziumchlorid
C _B	Konzentration von Bakterien
C _C	Konzentration von Zellen
cm	Zentimeter
Cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Da	Dalton

DAEC	Diffus adhärierende <i>E. coli</i>
DAPA	Färbereagenz aus Diphenylamin, Alanin, Phosphorsäure und Aceton
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphat
DUF	Domain of unknown function
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	Enter aggregative <i>E. coli</i>
ECL	Enzymatische Chemolumineszenz
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>E. coli</i>
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPEC	Enteropathogene <i>E. coli</i>
ESBL	Extended-Spectrum Beta-Lactamasen
ESI	Elektrospray-Ionisierung
ETEC	Enterotoxin-produzierende <i>E. coli</i>
ExPEC	Extra-Intestinale pathogene <i>E. coli</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FH	Faktor H
For	Forward
Fuc	Fucose
Fwd	Forward
g	Erdbeschleunigung
G	Glycin
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
GluNAc	N-Acetylglucosamin
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GP	Glykoprotein
H	Histidin
H ₂ O	Wasser

H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HC	Hämorrhagische Kolitis
HF	High fidelity
HPTLC	High-Performance Thin Layer Chromotography
hRF	Retentionsfaktor
HUS	Hämolytisch-urämisches Syndrom
Inc.	Incorporated
InPEC	Intra-Intestinale pathogene <i>E. coli</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kb	Kilobasen
KbE	Koloniebildende Einheit
kDa	Kilodalton
KG	Kommanditgesellschaft
KgaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LB	Luria-Bertani
LEE	Locus of Enterocyte Effacement
LPS	Lipopolysaccharide
LTH	Lebensmitteltechnologie Hohenheim
M	Mol
<i>m/z</i>	Masse zu Ladung Verhältnis
mA	Milliampere
ManNAc	<i>N</i> -Acetylmannose
Mb	Megabasen
MCS	Multiple cloning site
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimol
MOI	Multiplicity of Infection
MS	Massenspektrometrie
MUC2	Muzin Typ 2
N	Asparagin
N ₂	Stickstoff
Na ⁺ /K ⁺	Natrium-Kalium-Ionen

Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	Natrium-Dihydrogenphosphat Monohydrat
NaOH	Natriumhydroxid
Neu5,4Ac ₂	5- <i>N</i> -Acetyl-4- <i>O</i> -Acetylneuraminsäure
Neu5,7(8)Ac ₂	5- <i>N</i> -Acetyl-7,8- <i>O</i> -Acetylneuraminsäure
Neu5,7,8,9Ac ₄	5- <i>N</i> -Acetyl-7,8,9- <i>O</i> -Acetylneuraminsäure
Neu5,7,9Ac ₃	5- <i>N</i> -Acetyl-7,9- <i>O</i> -Acetylneuraminsäure
Neu5,8,9Ac ₃	5- <i>N</i> -Acetyl-8,9- <i>O</i> -Acetylneuraminsäure
Neu5,9Ac ₂	5- <i>N</i> -Acetyl-9- <i>O</i> -Acetylneuraminsäure
Neu5Ac	5- <i>N</i> -Acetylneuraminsäure
Neu5Gc	<i>N</i> -Glykolyneuraminsäure
ng	Nanogramm
Ni ²⁺	Zweiwertige Nickel-Ionen
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte
ORF	Open reading frame
p	Signifikanzwert
pAA	Plasmid für aggregative Adhärenz
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	Periodsäure-Schiff-Reaktion
PBS	Phosphate-gepufferte Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rev	Reverse
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SCFA	Short chain fatty acid
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SOC	Super optimal broth with catabolite repression

SPATE	Serine Protease Autotransporter enzyme
STEC	Shiga Toxin produzierende <i>E. coli</i>
Stx	Shiga Toxin
T2SS	Typ 2 Sekretionssystem
T3SS	Typ 3 Sekretionssystem
TBS	Tris-buffered Saline
TBS-T	Tris-buffered Saline und Tween® 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TLC	Dünnschichtchromatographie
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
UKM	Universitätsklinikum Münster
UPEC	Uropathogene <i>E. coli</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
V%	Volumenprozent
V _B	Volumen der Bakterien
V _C	Volumen der Zellen
z. B.	Zum Beispiel
α	Signifikanzniveau
Δ	Delta
λ	Lambda
Φ _{cu}	Phage-cured

1. Zusammenfassung

Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) können während einer Infektion den menschlichen Dickdarm kolonisieren und konkurrieren mit kommensalen *E. coli* und anderen Darmbakterien um limitierte Nährstoffe. Gobletzellen des Dickdarms produzieren das Glykoprotein Muzin, wodurch eine mukosale Barriere entsteht, die kommensale Bakterien nicht durchbrechen können. Das am häufigsten vorkommende Glykoprotein im Mukus des Dickdarms ist Muzin 2 (MUC2). Dieses stark O-glykosylierte Protein enthält in seiner Glykanstruktur endständig Neuraminsäuren, welche an bis zu 4 C-Atomen O-Acetylierungen aufweisen können. Eine O-Acetylierung inhibiert die Aktivität von Glykosidasen, wodurch das Glykoprotein nicht degradiert werden kann. Viele apathogene und pathogene *E. coli* tragen chromosomal ein *nanS* Gen, welches für eine 9-O-Acetylerase kodiert. NanS ist für den Neuraminsäurestoffwechsel von Neu5,9Ac₂ notwendig. Durch die de-O-Acetylierung entstehen Neu5Ac und Acetat. Beide Verbindungen können als Energiequellen genutzt werden. Die beiden in dieser Arbeit verwendeten EHEC O157:H7 Stamm EDL933 und O104:H4 Stamm C227-11Φcu kodieren für weitere 9-O-Acetylerasen, deren Gene sich auf Prophagen befinden. In der vorliegenden Arbeit wurden die enzymatischen Funktionen der Prophagen-kodierten 9-O-Acetylerasen bezogen auf den Kohlenhydratmetabolismus und während der Infektion in vitro weiter charakterisiert. Da Neu5Ac nicht nur am C9, sondern auch an C4, C7 und C8 O-acetyliert sein kann, wurde mittels HPTLC und nanoESI MS Analysen das Substratspektrum rekombinant exprimierter NanS-p analysiert. Die Ergebnisse zeigten eine de-O-Acetylierung von bis zu dreifach O-acetylierten Neuraminsäuren aus RinderdrüsenSpeichelmuzin. Während an C4 keine de-O-Acetylierung stattfand, konnten O-Acetylgruppen an C7, C8 und C9 abgespalten werden. Diese enzymatische Aktivität fand auch bei Glykan-gebundenen Neuraminsäuren statt, wodurch diese zugänglich für Sialidasen wurden. Weitere Analysen zeigten einen NanS-p abhängigen Abbau von Muzin im Zellkulturversuch. Hierfür wurde die humane Epithelzelllinie LS 180 verwendet. Während der Wildtyp O157:H7 EDL933 das Muzin nach vierstündiger Infektion fast vollständig abbauen konnte, war die Deletionsmutante EDL933Δ*nanS*Δ*nanS*-p1-*nanS*-p7 nicht fähig, die Muzinschicht zu degradieren. Die Mutante EDL933Δ*nanS*Δ*nanS*-p1-*nanS*-p5 konnte während der Infektion lediglich einen geringen Anteil des Muzins abbauen. Da 9-O-

Acetylerasen anderer Organismen die Adhärenz an Epithelzellen vermitteln, wurde auch in der vorliegenden Arbeit überprüft, inwiefern NanS-p in vitro das Anheften von EHEC an Darmepithelzellen beeinflussen. Die Ergebnisse der durchgeführten Adhärenzassays mit HT-29 Zellen bestätigen den Einfluss von NanS-p auf die Adhärenz von O157:H7 EDL933 und O104:H4 C227-11Φcu an die Darmepithelzellen. Nach einstündiger Infektion adhärten Deletionsmutanten EDL933Δ*nanS*Δ*nanS*-p1-*nanS*-p7 und C227-11ΦcuΔ*nanS*-p11-*nanS*-p14 signifikant weniger als die Stämme O157:H7 EDL933 und O104:H4 C227-11Φcu. Während die Deletionsmutante O157:H7 EDL933Δ*nanS*Δ*nanS*-p1-*nanS*-p5 gleiches Adhärenzverhalten wie der Wildtyp aufweist, zeigt die Mutante C227-11ΦcuΔ*nanS*-p11-*nanS*-p12 im durchgeführten Assay eine verringerte Adhärenz an Epithelzellen als der Wildtyp O104:H4 C227-11Φcu. Hier wurde erneut der Gendosiseffekt sichtbar. Durch die Zugabe von rekombinant exprimiertem und aufgereinigtem NanS-p1-His zur Infektion konnte die Deletionsmutante EDL933Δ*nanS*Δ*nanS*-p1-*nanS*-p7 das Adhärenzverhalten des Wildtypes O157:H7 EDL933 erreichen. Wurde zur Infektion mit C227-11ΦcuΔ*nanS*-p11-*nanS*-p14 NanS-p15-His zugegeben, wurden im Vergleich zum Wildtyp O104:H4 C227-11Φcu signifikant mehr adhärenz Bakterien detektiert. Weitere Analysen zeigten zudem einen Einfluss der NanS-p auf die Motilität. Stämme O157:H7 EDL933 und O104:H4 C227-11Φcu weisen im Schwimmversuch durch das Vorhandensein kleiner Mengen an Neuraminsäuren eine verringerte Motilität auf. Alle verwendeten Deletionsmutanten EDL933Δ*nanS*Δ*nanS*-p1-*nanS*-p5, EDL933Δ*nanS*Δ*nanS*-p1-*nanS*-p7, C227-11ΦcuΔ*nanS*-p11-*nanS*-p12 und C227-11ΦcuΔ*nanS*-p11-*nanS*-p14 zeigten ein erhöhtes Schwimmverhalten im Vergleich zu wildtypischen Stämmen O157:H7 EDL933 bzw. O104:H4 C227-11Φcu. Durch die Zugabe von 80 mM Acetat zu Schwimmplatten zeigten die Deletionsmutanten EDL933Δ*nanS*Δ*nanS*-p1-*nanS*-p7 und C227-11ΦcuΔ*nanS*-p11-*nanS*-p14 eine verringerte Motilität. Durch die enzymatische Aktivität der O-Acetylerasen entstehen Neu5Ac und Acetat. Beide Verbindungen können Genexpressionen in Bakterien beeinflussen und somit die Nischen-Kolonisierung unterstützen. Zusammengefasst bestätigen die Ergebnisse, dass O-Acetylerasen aus EHEC eine wichtige Funktion während der Infektion aufweisen, indem sie die Motilität beeinflussen, notwendig zum Durchbrechen der mukosalen Barriere sind und dem Bakterium am Darmepithel die Adhärenz vermitteln.

2. Abstract

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) colonize the human colon and compete against commensal *E. coli* for limited nutrition. Colonic goblet cells produce glycoproteins called mucin, which are part of the mucosal barrier. This barrier is free of bacterial penetration and is important for the protection of the epithelium. The main glycoprotein in the large intestine is mucin 2 (MUC2), which is heavily O-glycosylated with terminal glycan-bounded sialic acids. These aminosugars naturally exists with up to four O-acetylgroups at position C4, C7, C8 and C9. The grade of O-acetylation acts as a protection for enzymatic degradation by glycosidases. Commensal *E. coli* and the pathogenic strain O157:H7 EDL933 encodes the single chromosomal 9-O-acetylerase NanS, which is important for the metabolism of sialic acids by de-O-acetylation of Neu5,9Ac₂ to the basic structure Neu5Ac and Acetate. Both can be used as an energy source. Pathogenic *E. coli* O157:H7 EDL933 and O104:H4 C227-11Φcu encode further several prophage-encoded 9-O-acetylerases (NanS-p). Recent studies demonstrated that NanS-p producing EHEC bacteria reveal a higher replication rate in Neu5,9Ac₂ containing medium compared with commensal *E. coli*. This could be an advantage during colonization in human large intestine, where Neu5,9Ac₂ is the most common sialic acid in mucins. The aim of this study was to further characterize the enzymatic function of prophage-encoded 9-O-acetylerases in carbohydrate metabolism and during infection in vitro. To analyze the NanS-p mediated cleavage of mucin-derived O-acetylneuraminic acids, HPTLC and nanoESI MS analyses were performed. The results revealed, that recombinant expressed NanS-p cleave-off acetyl residues from up to tri-O-acetylated Neu5Ac and Neu5Gc. While NanS-p were able to de-O-acetylate glycan-bounded sialic acids at positions C7, C8 and C9, the tested enzymes were not able to hydrolyze the acetyl ester from position C4. The lower specificity of the NanS-p leads to higher availability of mucin-derived substrates for sialidases of commensal bacteria *B. thetaiotaomicron*. Further analyses reveal a NanS-p dependent mucin degradation in cell culture assays. Mutant strains EDL933Δ*nanS*Δ*nanS*-p1-*nanS*-p7 and EDL933Δ*nanS*Δ*nanS*-p1-*nanS*-p5 were not able to degrade the mucinlayer, while the wildtype strain O157:H7 EDL933 could disrupt the mucosal barrier of LS 180 cells. The NanS-p dependent adherence of O157:H7 EDL933 and O104:H4 C227-11Φcu to epithelial cells HT-29 was demonstrated by performing adherence assays.

The deletion of *nanS-p* genes revealed less adhered bacteria compared to wildtype strains. Further performed swimming assays could show the impact of NanS-p on motility. The wildtype strains O157:H7 EDL933 and O104:H4 C227-11Φcu have shown less motility compared to *nanS-p* deletion mutants. Taken together, NanS-p show an important role during infection and could contribute to the preferred colonization of the large intestine due to their impact of the motility, disruption of the mucosal barrier and mediation of adherence of EHEC to the epithelium.

3. Einführung

Escherichia coli gehört zu den ersten Bakterien, welche nach Geburt eines Menschen den Darm besiedeln. Dort habitieren sie ein Leben lang und sind ein wichtiger Bestandteil der intestinalen Flora eines gesunden Menschen (1). Eingesetzt als Probiotikum zeigt der Stamm *E. coli* Nissle 1917 positive Effekte auf die Gesundheit (2). Bis spät in die 50er Jahre wurde das Bakterium lediglich als nicht-pathogener, kommensaler Bewohner des Dickdarms wahrgenommen. Neben kommensalen Stämmen existieren auch pathogene *E. coli*, welche schwere Erkrankungen verursachen können. In Abhängigkeit des Infektionsortes werden diese in die beiden Gruppen ExPEC (Extraintestinale pathogene *E. coli*) und InPEC (Intraintestinale pathogene *E. coli*) eingeteilt. Zu den ExPEC zählen uropathogene *E. coli* (UPEC), welche Harnwegsinfektionen auslösen können, sowie neonatale Meningitis auslösende *E. coli* (NMEC). InPECs können in die verschiedenen Pathotypen EPEC (enteropathogene *E. coli*), EHEC (enterohämorrhagische *E. coli*), EIEC (enteroinvasive *E. coli*), EAEC (enteroaggregative *E. coli*), DAEC (diffus adhärierende *E. coli*), ETEC (enterotoxinbildende *E. coli*) und AIEC (adhärentinvasive *E. coli*) eingeteilt werden (3). Diese Enteropathotypen werden aufgrund ihrer Virulenzfaktoren, Mechanismen der Infektion, Interaktionen mit Epithelzellen, Gewebetropismus, Symptome und Syndrome eingeteilt (4). EPEC und ETEC Infektionen kommen vor allem in einkommensschwachen Ländern wie Asien, Afrika oder Lateinamerika vor, während EHEC weltweit für große Ausbrüche sorgt (3, 5–7). EHEC Infektionen führen nicht nur zu Durchfallerkrankungen, sondern auch zur schwerwiegenden hämorrhagischen Colitis (HC) oder dem hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) (8). Der Pathotyp EAEC wurde in Industrieländern mit Durchfallerkrankungen in Verbindung gebracht. Zusätzlich wurde 2011 ein EHEC-EAEC Hybrid isoliert, welches in Deutschland einen großen Ausbruch verursachte (9–11).

3.1. Erkrankungen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli*

Rinder zählen zum Hauptreservoir von EHEC Bakterien (12). Werden die Tiere zu Lebensmitteln verarbeitet und vom Menschen konsumiert, kann es durch Hygienemängel zu Infektionen kommen. Der erste gemeldete EHEC-Ausbruch fand zwischen Februar und Juni 1982 in den Nordamerikanischen Bundesstaaten Michigan und Oregon statt. Durch den Konsum von unvollständig gegartem Rinderhackfleisch in einem Fast-Food-Restaurant erkrankten 47 Menschen an Durchfall, bedingt durch die Aufnahme des Serotyps O157:H7 (13). Während des Ausbruchs wurde der O157:H7 Stamm EDL933 isoliert, welcher bis heute zu den am besten charakterisierten EHEC-Stämmen weltweit zählt (14).

Neben unvollständig gegartem Rindfleisch sind weitere mögliche Infektionsquellen u.a. der Kontakt mit Tieren, welche Träger des Erregers sind, aber auch der Konsum von kontaminierten Lebensmitteln, wie nicht-pasteurisierte Milch, rohes Blattgemüse, Salami oder kontaminiertes Wasser (15–17). Eine mangelhafte Hygiene begünstigt die fäkal-orale Aufnahme von EHEC über eine Mensch-zu-Mensch-Übertragung (18). Die Infektionsdosis des Serotyps O157:H7 ist sehr niedrig und beträgt zwischen 10 bis 100 Erregern (19, 8). Die Inkubationszeit beträgt in der Regel zwischen 3 – 4 Tage. Zunächst entsteht bei der Mehrheit der Infizierten wässriger Durchfall mit Begleitsymptomen wie Erbrechen, abdominale Schmerzen oder Fieber. In etwa 10 % – 20 % der EHEC-Erkrankungen entsteht eine hämorrhagische Kolitis (HC). Durch die schwere Entzündung im Dickdarm sterben Epithelzellen ab und es kommt zu einem blutigen Durchfall (20). Hiervon sind vor allem immunschwächere Personen, wie z.B. ältere Menschen und Kinder betroffen (21). In circa 5 % - 10 % der Fälle kann neben der HC aber auch ungefähr 7 Tage nach Beginn des EHEC-bedingten Durchfalles, das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) entstehen (22). Hierbei kommt es zur Hämolyse von Erythrozyten, was eine Blutarmut zur Folge hat. Zusätzlich werden Thrombozyten geschädigt und die Funktion der Nieren ist beeinträchtigt (23, 22). Nicht selten folgt ein akutes Nierenversagen, wodurch Patienten eine Dialysebehandlung benötigen (24, 21). Die Letalität als Folge einer HUS-Erkrankungen, verursacht durch O157:H7, liegt bei bis zu 5 % (25).

3.2. Epidemiologie enterohämorrhagischer *E. coli*

Seit 2001 gibt es in Deutschland die Meldepflicht für EHEC-Erkrankungen. Seitdem konnte das Robert-Koch-Institut jährlich einen leichten Anstieg an Meldungen verzeichnen. Im zuletzt veröffentlichten Infektionsepidemiologischen Jahrbuch von 2017, gab es insgesamt 2020 EHEC-Erkrankte, was einem Anstieg von 11 % im Vergleich zum Vorjahr (1825 Erkrankungen) entspricht. Circa 29 % der Betroffenen waren Kinder unter 5 Jahren. Der Serotyp O157:H7 zählt mit 11 % (12 % im Jahr 2016) zu den am häufigsten genannten Serotypen bei EHEC-Erkrankungen (26). 2017 wurde außerdem 72-mal EHEC-assoziiertes HUS diagnostiziert, wovon bei 31 Patienten der Serotyp O157:H7 als Erreger genannt wurde. Insgesamt gab es im Jahr 2017 durch O157:H7 bedingt als Folge der HUS Erkrankung 4 Todesfälle. Die Infektionen entstanden durch den Konsum von abgepacktem Hackfleisch, welches mit einem Sorbitol-fermentierenden O157:H7 kontaminiert war. Der Ausbruchserreger produzierte Shiga Toxin 2, welches einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von EHEC (siehe 3.3.) (27) darstellt.

Im Vergleich zu 2017 wurde im Vorjahr 2016 44-mal EHEC-assoziiertes HUS verzeichnet, wovon 9-mal O157:H7 verantwortlich war. Keiner der betroffenen Patienten verstarb (28). Neben dem jährlich leichten Anstieg von EHEC-Infektionen, gab es 2011 in Deutschland einen großen Ausbruch mit 3842 Erkrankten, bedingt durch den Konsum von kontaminierten Sprossen. Mehr als die Hälfte der Patienten musste stationär im Krankenhaus behandelt werden. 855 Patienten entwickelten zudem HUS, wovon 54 der Infizierten verstarben (29–31). Der isolierte Ausbruchserreger wurde aufgrund serologischer Eigenschaften und einer Genomanalyse als ein Hybridstamm des Serotypes O104:H4 identifiziert, welcher Virulenzfaktoren von sowohl EHEC als auch EAEC kodiert (30). Der Serotyp O104:H4 war zwar zuvor schon bekannt, wurde aber vorher mit keinem Ausbruch in Verbindung gebracht. Erst durch die Kombination von enterohämorrhagischen und enteroaggregativen Eigenschaften konnte der Ausbruchserreger eine solche Epidemie auslösen. Da der Serotyp O157:H7 zu den am häufigsten identifizierten Serotypen bei EHEC-Infektionen gehört und der Hybridstamm O104:H4 für den letzten großen Ausbruch von EHEC-Erkrankungen verantwortlich war, stehen diese beiden Stämme im Fokus der Forschung.

3.3. Virulenzfaktoren der enterohämorrhagischen *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933

Das Genom von *E. coli* O157:H7 EDL933 weist eine Größe von 5,5 Mb auf, wobei 4,1 Mb konservierte Sequenzen aller *E. coli* Stämme sind (32). Bei den verbleibenden 1,4 Mb handelt es sich um über horizontalen Gentransfer erworbene Fremd-DNA, welche spezifisch für den Serotyp O157 ist (33, 32). Diese enthält zum größten Teil Prophagen und Prophagen-ähnliche Elemente. Während in *E. coli* K-12 lediglich 29 Phagen-assoziierte Gene vorhanden sind, enthält der Stamm O157:H7 EDL933 463 dieser Gene (34). Zusätzlich zur genomischen DNA enthält der Stamm zudem das Virulenzplasmid pO157 (35). Die Produktion von Shiga Toxin, Produkte der Pathogenitätsinsel LEE (locus of enterocyte effacement) sowie die auf dem Plasmid pO157 kodierten Proteine, zählen zu den am besten charakterisierten Virulenzfaktoren des *E. coli* O157:H7 Stammes EDL933, welche folgend detaillierter beschrieben werden.

Shiga Toxine (Stx) sind AB₅-Cytotoxine mit einer enzymatisch aktiven A-Untereinheit und fünf identischen B-Untereinheiten, welche Rezeptor-bindende Eigenschaften aufweisen (36). Die von lambdoiden Prophagen kodierten Toxine werden in die Gruppen Stx1 und Stx2 unterteilt, wobei die Aminosäure-Sequenz zwischen diesen zu 56% homolog ist (37). Bis auf eine Aminosäure ist Stx1 identisch zu Stx von *Shigella dysenteriae* Typ I (37). Stx2 ist im Vergleich zu Stx1 toxischer und wird häufiger mit HUS oder HC assoziiert (38, 39). Shiga Toxin-produzierende *E. coli* (STEC) produzieren entweder Stx1, Stx2 oder sogar beide Varianten (40). Die B-Untereinheit der Shiga Toxine bindet an den Glykorezeptor Globotriaosylceramide (Gb3) und vermittelt dadurch der A-Untereinheit die Internalisierung in die Wirtszelle (8, 41–43). Das Toxin gelangt dann über den retrograden Transport zum endoplasmatischen Retikulum, wo es aufgrund seiner Aktivität als RNA *N*-Glykosidase die Proteinsynthese der Zelle inhibiert, indem es ein Adenin der 28S RNA der 60S Untereinheit des Ribosoms abspaltet (44, 45). Dieser toxische Effekt ist häufig gefolgt von Apoptose. Gelangt Shiga Toxin über den Blutkreislauf in die Nieren, erreicht es dort eine gewebserstörende Wirkung, wodurch Infizierte ein Nierenversagen erleiden können (24, 21).

Adhärenzen und Infizieren EHEC Epithelzellen, entsteht das typische histopathologische Muster, welche auch „attaching & effacing“ (A/E) - Läsionen

genannt wird (46, 47). Charakteristisch hierfür sind der Verlust der Mikrovilli und eine Umstrukturierung des Aktins der Wirtszelle, wodurch sockelartige Ausstülpungen der Membran entstehen und eine stärkere Adhärenz der Bakterien an die Zelle ermöglicht wird (48, 49, 46). Verantwortlich dafür sind Proteine, deren Gene auf der Pathogenitätsinsel „**Locus of Enterocyte Effacement (LEE)**“ kodiert sind. In O157:H7 Stamm EDL933 enthält der 35 - 43 kb große LEE Locus zusätzlich eine 7,5 kb Prophagen-kodierende Sequenz (50, 51). Insgesamt enthält der LEE Locus 41 Gene, welche auf fünf Operons LEE1 – LEE5 aufgeteilt sind. Diese werden in drei wichtige Regionen unterteilt und kodieren für das Typ III Sekretionssystem, das Adhäsin Intimin, und der dazugehörige Rezeptor Tir sowie verschiedene Esp Effektorproteine (49, 48). Wird das nadelförmige Sekretionssystem ausgebildet, injiziert dieses den Rezeptor Tir in die Wirtsmembran. Dort verankert, kann das Adhäsin Intimin binden, wodurch der engere Kontakt zwischen Bakterium und Wirtszelle entsteht (48). Über das T3SS gelangen dann die Effektorproteine Esp in die Zelle, die eine Aktinpolymerisierung verursachen und Signalwege der Zelle modulieren (49, 47, 46, 52). LEE wird stark mit der Pathogenität von O157:H7 in Verbindung gebracht. Der konservierte LEE Locus ist auch im Genom von EPEC Stämmen enthalten (50, 51).

Neben den chromosomal kodierten Virulenzfaktoren enthalten alle bisher klinisch isolierten Stämme von O157:H7 das **Virulenzplasmid pO157**. Dieses hochkonservierte Plasmid weist eine Größe von 92 bis 104 kb auf und enthält bis zu 100 open reading frames (ORF) und weist eine dynamische Struktur mit mobilen genetischen Elementen wie Transposons, Prophagen und Insertionselementen auf (35, 53). Einige Gene konnten bereits charakterisiert werden, die sowohl Virulenz als auch Adaption von O157:H7 beeinflussen (54–56). Sowohl ein vollständiger Verlust des Plasmides, als auch eine Deletion des Genes *toxB* führten in vitro zu einer verringerten Adhärenz der Bakterien an Epithelzellen (54, 53). ToxB beeinflusst positiv die Expression und Sekretion von EspB via T3SS, wodurch die stärkere Adhärenz vermittelt wird (54). Ein weiterer Virulenzfaktor von pO157 ist das α -Hämolysin, welches auf dem *hly* Operon kodiert ist. Durch die Expression des Cytotoxins zeigt O157:H7 einen hämolytischen Phänotypen (57–59). Des Weiteren befindet sich auf dem Plasmid das Gen *katP*, welches für eine Katalase-Peroxidase kodiert (60). Durch die Expression von Katalasen und Peroxidasen können Bakterien oxidativen Stress umgehen, indem die Enzyme z.B. das für Zellen toxische H₂O₂ in

Wasser und Sauerstoff spalten (60). Des Weiteren kodiert das Gen *espP* des Plasmides für eine Serinprotease, welche eine enzymatische Aktivität gegenüber Pepsin A und Koagulationsfaktor V zeigt (61). Letzteres ist ein wichtiges Enzym für die Blutgerinnung. Durch die Spaltung wird angenommen, dass es mukosale Hämorrhagien verursacht und an der Entstehung der HC beteiligt ist (61, 62). Ein weiteres Enzym, dessen Gen *stcE* ebenfalls auf pO157 lokalisiert ist, ist eine Zink Metalloprotease und spaltet O-glycosylierte Proteine wie Muzin 2 und 7, Glykoprotein 340 und den Esterase-Inhibitor C1-INH (63–65). Somit trägt die Protease zum Durchbrechen der intestinalen Barriere und der Modifikation der Immunantwort bei (66, 67). Das Virulenzplasmid enthält zusätzlich 13 ORFs, welche für ein Typ II Sekretionssystem (T2SS) kodieren (68). In Gram-negativen Bakterien werden häufig Virulenzfaktoren über ein T2SS aus der Zelle transportiert (69). In O157:H7 gelangt durch ein Signalpeptid die Muzinase StcE in den periplasmatischen Raum und wird anschließend über das T2SS sekretiert. Bisher sind nur wenige Substrate bekannt (63, 70, 69). Obwohl noch nicht alle Gene des Virulenzplasmides pO157 charakterisiert sind, wird trotzdem der immense Einfluss auf die Pathogenität des Serotyps O157:H7 deutlich.

Die Motilität der Bakterien spielt während des Infektionsprozesses eine wichtige Rolle, da diese nach der oralen Aufnahme bis zum Infektionsort, dem Dickdarm, gelangen müssen. Die Beweglichkeit der Bakterien wird unter anderem durch **Flagellen** beeinflusst. Diese beeinflussen aber nicht nur die Beweglichkeit von EHEC, sondern fungieren auch als Adhäsine und interagieren mit Epithelzellen (71). Die Expression von Flagellen wird durch 17 Operons komplex und stufenweise kontrolliert (72). Die Kaskade der Genexpression beginnt mit der Expression der Masterregulatoren *flhDC*, anschließend wird der Motorkomplex gebildet, welcher in der Membran verankert ist (73). Erst zum Schluss wird durch die Expression des Gens *fliC* das Flagellin gebildet, welches extrazellulär das Flagellum verlängert (72). Die Transkription der Masterregulatoren können durch verschiedene Umweltsignale beeinflusst werden (74). EHEC selbst produzieren das Signalmolekül Autoinducer-3 (AI-3) (75). Dieses wird sekretiert und über das Quorum Sensing Zwei-Komponentensystem QseBC wahrgenommen. Wird bedingt durch die Zelldichte eine bestimmte Konzentration an AI-3 erreicht, aktiviert QseBC die Expression von *flhDC* (75). Die im Gastrointestinaltrakt gebildeten Hormone Adrenalin und Noradrenalin, haben ebenfalls einen aktivierenden Effekt auf QseBC (76). Zwei wichtige

Sensormoleküle, welche die Transkription Flagella-assoziiierter Gene in O157:H7 inhibieren, sind Muzin und kurzkettige Fettsäuren (engl. Short chain fatty acids; SCFA) wie z.B. Acetat in Konzentrationen, wie sie im Dickdarm vorzufinden sind (77, 78).

Das **Adhäsिन Iha** trägt zur Kolonisierung von EHEC im Dickdarm bei. Eisen reprimiert und SCFA erhöhen die Expression des Gens *iha*. Dadurch trägt das Adhäsिन zur präferierten Kolonisierung im Dickdarm bei, da an der mukosalen Oberfläche eine verringerte Eisenkonzentration vorliegt und SCFA höher konzentriert sind (79–81).

In O157:H7 EDL933 kodieren die zwei Gene *lpf1* und *lpf2* für lange, polare **Fimbrien**, welche in vivo den Bakterien Adhärenz an Epithelzellen vermitteln (82). Des Weiteren werden den Fimbrien bindende Eigenschaften gegenüber den extrazellulären Matrixproteinen Fibronektin, Koagulationfaktor V und Laminin zugesagt (83). Durch die positiv regulierende Expression der Gene unter physiologischen Bedingungen des Darms, wird vermutet, dass die Fimbrien an der bevorzugten Nischen-Kolonisierung beteiligt sind (84).

3.4. Virulenzfaktoren des Shiga Toxin-produzierenden enteroaggregativen *E. coli* O104:H4 Ausbruchsstammes

Der Ausbruchsstamm in Deutschland aus dem Jahr 2011 repräsentiert einen Hybridstamm aus enterohämorrhagischen und enteroaggregativen *E. coli*, da er Virulenzfaktoren wie den Shiga Toxin-2 Prophagen, das Adhäsिन Iha, sowie homologe Gene von *lpf1* und *lpf2* des Serotyps O157:H7 erworben hat und aufgrund seines genetischen Backgrounds als Serotyp O104:H4 EAEC Virulenzfaktoren kodiert (85). Zusätzlich zu den bereits genannten Faktoren, welche ihren Ursprung im O157:H7 haben, zählen das Virulenzplasmid pAAI, SPATE (Serine protease autotransporter of *Enterobacteriaceae*) Proteine und das ESBL (Extended spectrum β -lactamases) Resistenzplasmid mit zu den wichtigsten Virulenzfaktoren des Hybridstammes, welche folgend genauer beschrieben werden. Klassische EHEC-Marker wie die LEE-Pathogenitätsinsel und das Virulenzplasmid pO157 fehlen dem Hybridstamm (85, 86).

Das 75 kb große **pAAI Virulenzplasmid** enthält einige Virulenz-assoziierte Gene, deren Expression durch den Transkriptionsregulator AggR aktiviert wird (87). Darunter zählen die Gene *aggABCD*, welche für die aggregativen Adhärenz-Fimbrien I (AAF/I) kodieren und dem Bakterium durch eine Verankerung an die Darmwand eine starke Adhärenz vermitteln (88, 89). Des Weiteren befinden sich auf dem Plasmid die Gene *aap* und *aatPABCD*, welche für das Dispersin und das dazugehörige Sekretionssystem kodieren (90). Dispersin ist ein äußeres Membranprotein und bindet nichtkovalent an LPS, wodurch die negative Ladung von LPS neutralisiert wird und diese dadurch keinen störenden Effekt auf die positiv geladenen AAF/I haben (90).

Zu den **SPATE Proteinen** aus O104:H4 zählen die drei Serinproteasen SigA, SepA und Pic. Als Autotransporter gelangen sie aufgrund ihrer Signalsequenz über den Sec-abhängigen Transport vom Cytoplasma in den periplasmatischen Raum (91, 92). Der C-Terminus der Proteine formt dann in die äußere Membran eine Pore, wodurch eine Sekretion ermöglicht wird (91, 92). Über Hydrolyse werden die Proteine von der Membran abgespalten. Der N-Terminus enthält die katalytische Domäne der Serinprotease (93).

Eine funktionelle Analyse des auf dem Chromosom kodierten SPATE Proteins Pic zeigte eine enzymatische Aktivität als Muzinase. Zudem ist das Enzym serumresistent und trägt zur Hämagglutination bei (94, 95). Durch die Bindung an Muzin im Darm ermöglicht es den ersten Schritt zur Kolonisierung (94). Diese Bindung scheint stark abhängig von Neuraminsäuren zu sein. Wurden diese vom Muzin entfernt, war die enzymatische Aktivität der Muzinase inhibiert (96).

Der auf dem Virulenzplasmid kodierten Serinprotease SepA wird die Funktion zugeteilt, die Invasion der Bakterien und der Zerstörung des Darmepithels zu regulieren (97, 98). Als Enzym zeigt es ein ähnliches Substratspektrum wie Cathepsin G, welches eine wichtige Rolle bei der Auslösung von Entzündungsreaktionen spielt (98).

Die Serinprotease SigA zeigt eine Zell-bindende Eigenschaft und spaltet das in der Wirtszelle vorhandene faserartige Protein Fodrin, welches für die Vernetzung des Aktins verantwortlich ist. Durch die Spaltung verformen sich Zellen und verlieren an Stabilität (99, 100).

Neben dem Plasmid pAAF/I enthält der Hybridstamm zusätzlich ein 88,5 kb großes **ESBL-kodierendes Resistenzplasmid**, welches für ESBL-Gene kodiert (86, 101). ESBL sind Enzyme, die dem Bakterium Resistenzen gegenüber β -Lactam-Antibiotika vermitteln und dadurch eine Antibiotikabehandlung nach Infektion mit dem Stamm unwirksam sein kann (86, 102). Eine Studie konnte zeigen, dass das Plasmid zusätzlich an der Persistenz der Bakterien im Darm beteiligt ist (86).

3.5. Mechanismus zur Kolonisierung von EHEC im Dickdarm

Der Infektionsort von EHEC Bakterien ist der Dickdarm. Bevor die Bakterien allerdings dort infizieren können, müssen sie nach der oralen Aufnahme zuerst durch den Magen gelangen. Die dort vorherrschenden Bedingungen, wie ein pH-Wert von 1,5 – 3, ist die erste Abwehr des Menschen gegenüber pathogenen Darmbakterien (103). EHEC allerdings können an verschiedenste Umgebungen adaptieren und somit extreme Umweltschwankungen z.B. der Temperatur, Osmolarität oder des pH-Wertes überleben (104). Sowohl O157:H7 als auch O104:H4 beschützen sich gegenüber dem niedrigen pH-Wert der Magenpassage durch verschiedene Mechanismen zur Säureresistenz (105–108). Überstehen die Bakterien den sauren Magen, gelangen sie anschließend in den Darm, dessen pH-Wert im neutralen bis leicht basischen Bereich bei circa 7 – 8 liegt und in Dünn- und Dickdarm unterteilt wird. Die Serotypen O157:H7 und O104:H4 kolonisieren beide bevorzugt im Dickdarm (109–111). Verantwortlich dafür sind bakterielle Systeme zur sensorischen Wahrnehmung diverser Stimuli, welche die Produktion von Adhärenz- und Virulenzfaktoren beeinflussen (112). So wird z.B. die Expression der LEE Gene bei einem höheren Biotin-Level, wie er im Dünndarm vorkommt, inhibiert, während das niedrige Level im Dickdarm die Expression und somit die Adhärenz und Infektion begünstigt (109, 113). Des Weiteren reguliert in O157:H7 die kleine nicht-kodierende RNA Esr055 Virulenzfaktoren in Abhängigkeit der freien DNA-Konzentration, welche im Dünndarm in größeren Mengen vorkommt, und trägt dadurch zur bevorzugten Adhärenz im Dickdarm bei (114). Einen weiteren Einfluss auf die Nischen-Kolonisierung von EHEC haben die kurzkettigen Fettsäuren SCFAs. Die am häufigsten im Darm vorkommenden SCFA sind Butyrat, Propionat und Acetat. Die Konzentration an SCFA steigt vom Dünn- bis in den Dickdarm auf über 140 mM, wobei Acetat am häufigsten vorkommt (115–117). SCFAs werden von EHEC

sensorisch wahrgenommen und regulieren in Abhängigkeit der Konzentration die Expression von Flagellen, LEE Gene und Shiga Toxin (117, 79, 77). Dadurch wird die Adhärenz und Pathogenität im Dickdarm hochreguliert, während sie im Dünndarm durch SCFA inhibiert wird (118).

Der mukosale Aufbau des Dickdarms trägt ebenfalls zur Kolonisierung bei. Die Hauptkomponenten des Mukus sind antimikrobielle Peptiden und Immunglobuline, welche von Epithelzellen des Darmepitheliums produziert werden, und Muzin (119, 120). Bei Muzinen handelt es sich um Glykoproteine, welche aus einem Proteingrundgerüst bestehen, an dem Zuckerketten gebunden sind, die wiederum als Glykane bezeichnet werden (121). Durch diese erreicht der Mukus seine Gel-formende Eigenschaft. Muzine werden von Gobletzellen des Darmepitheliums gebildet und sind entweder membrangebunden oder werden sekretiert (122, 123). Demnach findet man im Darm ein Zwei-Schichten-System. Das membrangebundene Muzin im Dickdarm bildet die innere dichte Schicht mit circa 100 μM Mukus (119, 123). Durch die dichte Struktur und die Sekretion der antimikrobiellen Peptide und Immunglobuline ist diese Schicht frei von bakterieller Penetration (124, 120). Das lose sekretierte Muzin bildet mit circa 700 μM die äußere Schicht des Mukus, welche eine größere Anzahl an Bakterien enthält (119). Der produzierte Mukus erreicht dadurch eine intestinale Barriere, welche die Mikrobiota vom Epithel separiert (124). Gelangen Pathogene wie auch EHEC in den Darm, wird unter anderem durch das LPS oder auch den Flagellen die Produktion des Muzins durch Gobletzellen als Abwehrmechanismus angeregt (120, 125). Trotzdem können EHEC die intestinale Barriere durchbrechen und gelangen im Dickdarm bis zum Epithelium (126, 94). Neben den zuvor genannten Faktoren, welche zur Kolonisierung im Dickdarm beitragen, spielen auch die produzierten Muzine eine wichtige Rolle (123). Während Gobletzellen im Dickdarm bis zu 7 verschiedene membrangebundene Muzine (MUC1, MUC3A/B, MUC12, MUC13, MUC15, MUC17, MUC20, MUC21) produzieren, sekretieren sie lediglich zwei Muzintypen MUC2 und MUC5B, wobei MUC2 in größeren Mengen vorkommt und den Hauptanteil des Mukus ausmacht (121–123). Bei MUC2 handelt es sich um ein stark O-Glykosyliertes Glykoprotein, das ein Molekulargewicht von mehr als 240 kDa erreichen kann (127). Die O-Glykosylierung entsteht durch die Bindung von N-Acetylgalactosamin (GalNAc) an Serin oder Threonin des Proteingerüsts (128). Daran verknüpft sind dann die weiteren Zucker Galactose (Gal), N-Acetylglucosamin (GlcNAc), Fucose (Fuc) und

Neuraminsäuren (Neu5Ac). Diese bilden als Kette, welche mehr oder weniger auch verzweigt sein kann, die sogenannten O-Glykane (121). Ye et. al. konnte zeigen, dass die Adhärenz von EHEC O157:H7 im Dickdarm abhängig von MUC2 O-Glykanen ist und in Abwesenheit der Zucker die Adhärenz inhibiert war (129). Die Serinprotease Pic in O104:H4 bindet und spaltet Muzin in Abhängigkeit endständiger Neuraminsäuren in Glykanen, wodurch die Adhärenz beeinflusst werden kann (94, 96). EHEC verfügt über verschiedene Systeme zur sensorischen Wahrnehmung der Zucker aus Muzinen. Unter anderem reguliert der Repressor NagC in Abhängigkeit von GalNAc und Neu5Ac die Expression der LEE Operone (130). Auch das Zwei-Komponenten-System FusKR reguliert die LEE Gene durch Fukose (131). Generierte EHEC-Mutanten, die nicht mehr fähig waren Fukose oder GalNAc zu metabolisieren, zeigten in Wettbewerbsversuchen bei Mäusen im Vergleich zum Wildtypstamm eine reduzierte Adhärenz im Dickdarm (132). Durch die sensorische Wahrnehmung und Metabolismus der Zucker wird die Expression von Adhärenzfaktoren und Effektorproteinen über LEE reguliert, woraus die Kolonisierung im Dickdarm, Umgehung der Immunantwort und Infektion des Epitheliums resultieren. Der Abbau der Zucker aus Muzinen stellt demnach eine wichtige Funktion während der Kolonisierung im Dickdarm und der Infektion dar. Über die sensorische Wahrnehmung der Zucker und daraus resultierender Einfluss auf die Infektion, ist im *E. coli* O104:H4 Ausbruchsstamm bisher wenig bekannt.

3.6. Kohlenhydratmetabolismus enterohämorrhagischer *E. coli* im Dickdarm

Eine für Bakterien wichtige Kohlenhydratquelle im Darm ist der in täglich großen Mengen produzierte Mukus (133). Die im MUC2 vorkommenden Zucker Galactose, GalNAc, GluNAc, Fucose und Neuraminsäuren sind in Glykanen gebunden und kommen ohne enzymatische Hydrolyse nicht als freie Zucker vor (121, 134). Sowohl kommensale als auch pathogene *E. coli* können Glykane nicht enzymatisch degradieren und dadurch keine Zucker freisetzen (135). Sie sind von kommensalen Bakterien abhängig, die durch die Expression von Glykosidasen Monosaccharide freisetzen können (134, 135). Zum Beispiel produzieren *Bacteroides thetaiotaomicron* Stämme Sialidasen, die endständig gebundene Neu5Ac abspalten können (121, 136). Die Hydrolyse von Glykanen, der Metabolismus der Zucker durch

Kommensale und die Produktion von Mukus durch Gobletzellen stehen im gesunden Menschen im Gleichgewicht. Kommensale sind gut an den Mukus im Darm adaptiert, befinden sich allerdings lediglich in der äußeren losen Muzinschicht und können trotz Glykosidasen die intestinale Barriere nicht durchbrechen (122, 135, 123, 137). Gelangen EHEC in den Dickdarm, konkurrieren die pathogenen Bakterien mit der kommensalen Mikrobiota um die limitierten Kohlenstoffquellen (138). Die größte Konkurrenz stellen kommensale *E. coli* dar, da diese einen ähnlichen genetischen Hintergrund haben (32, 138). Die durch Glykosidasen-Produzenten frei zugänglichen Zucker können sowohl von kommensalen *E. coli* als auch von Serotypen O157:H7 und O104:H4 verstoffwechselt werden (139, 136, 140). Kompetitionsstudien im Tiermodell zeigten, dass die Expression von Metabolismus-bezogenen Genen bei EHEC höher war im Vergleich zu kommensalen *E. coli*. Durch die schnellere Aufnahme der Zucker und des Metabolismus ergibt sich eine höhere Replikationsrate, wodurch EHEC einen starken Wettbewerbsvorteil haben (141). Unter den in EHEC erhöhten Expressionsraten befanden sich unter anderem Gene für den Metabolismus von Neu5Ac (141).

N-Acetylneuraminsäuren sind C9-Ketozucker, mit einer am C5 gebundenen *N*-Acetylgruppe (Neu5Ac). Sie befinden sich häufig endständig gebunden in Glykanen von Glykoproteinen wie z.B. Muzin (142). Die im Darm vorkommenden Neuraminsäuren zeigen eine immense Heterogenität mit diversen Modifikationen. Die häufigste Modifikation stellt die *O*-Acetylierung dar (143, 144). Die *O*-Acetylierung kann Glykosidasen wie Sialidasen in ihrer Aktivität hindern, weshalb Neuraminsäuren als Schutz vor Degradierung des Glykans dienen. Das C9-Gerüst kann bis zu vierfach *O*-acetyliert vorkommen, wobei sich die *O*-Acetylgruppen an Positionen C4, C7, C8 und C9 befinden (143, 144). Die Grundstruktur Neu5Ac ist die häufigste Form der Neuraminsäure in Muzin, gefolgt von einfach *O*-acetylierten *N*-Acetyl-9-*O*-Acetylneuraminsäure (kurz: Neu5,9Ac₂), Neu5,7Ac₂ und Neu5,8Ac₂. Seltener zu finden sind die zweifach *O*-acetylierten Neu5,7,9Ac₃ und Neu5,8,9Ac₃ (142). Zudem können Neuraminsäuren anstelle der *N*-Acetylierung am C5 glykosyliert sein. Diese *N*-Glykolyneuraminsäuren (Neu5Gc) entstehen durch Hydroxylasen und sind grundsätzlich in tierischem Muzin zu finden, da Menschen dieses Enzym nicht exprimieren (145). Trotzdem findet man geringe Mengen von Neu5Gc in humanem Muzin, wahrscheinlich bedingt durch die Aufnahme von tierischen Lebensmitteln (144). Die Konzentration von Neuraminsäuren in Muzin steigt vom Dünndarm bis in

den Dickdarm an, wo EHEC bevorzugt kolonisiert (142, 118, 146). Sowohl kommensale *E. coli* als auch der Serotyp O157:H7 enthalten im Genom die drei Operone *nanATEK-yhcH*, *nanCMS* (ursprünglich *yjhATS*) und *yjhBC*, welche an der Aufnahme und am Metabolismus von Neuraminsäuren beteiligt sind (147, 148). Liegt Neu5Ac in der Zelle vor, inaktiviert dieses den Repressor NanR, wodurch die *nan*-Operone transkribiert werden und die Neuraminsäure verstoffwechselt wird (149). Die Funktionen der Gene *yhcH*, *yjhB* und *yjhC* sind bisher nicht bekannt, allerdings zeigten Analysen von Deletionsmutanten, dass die Gene für den Stoffwechsel der Neuraminsäure nicht notwendig sind (150). Über das Porin NanC in der äußeren Membran können Neu5Ac und Neu5,9Ac₂ in den periplasmatischen Raum des Bakteriums gelangen. (151). Durch den Transporter NanT kann Neu5Ac direkt in die Zelle aufgenommen werden (152). Neu5Ac wird dann mittels der Aldolase NanA in Pyruvat und *N*-Acetylmannosamin (ManNAc) gespalten (153). ManNAc wird durch die Konvertase NanK und Epimerase NanE zu ManNAc-6-Phosphat konvertiert, das wiederum als Edukt in weiteren Stoffwechselprozessen der Glykolyse als Energie- und Stickstoffquelle dient (149, 143). Wie bereits erwähnt, stellt die *O*-Acetylierung von Neuraminsäuren eine häufige Modifikation dar. Das über NanC in das Periplasma aufgenommene Neu5,9Ac₂ kann *E. coli* kann auch als C- und N-Quelle verwenden. Bevor allerdings die Neuraminsäure über NanT in das Cytoplasma aufgenommen und anschließend metabolisiert werden kann, de-*O*-acetyliert das Enzym NanS den Zucker in seine Grundstruktur Neu5Ac (143, 150). NanS wurde als *N*-Acetyl-9-*O*-Acetylneuraminsäureesterase charakterisiert, welche die *O*-Acetylgruppe an C9 hydrolysieren kann. Weitere Analysen zeigten, dass die *O*-Acetylgruppe an C8 ebenfalls abgespalten werden kann, wohingegen Neu5,7Ac₂ und Neu5,4Ac₂ kein Substrat der Esterase sind (150). Das Gen *nanS* mit einer Länge von 981 bp enthält neben der unbekanntenen Domäne DUF303, welche im Zusammenhang mit der Funktion als Esterase steht, am N-Terminus eine Signalsequenz, wodurch das Enzym NanS in den periplasmatischen Raum gelangt (147). Dies ermöglicht eine de-*O*-Acetylierung der Neuraminsäuren vor Aufnahme durch NanT in das Cytoplasma der Bakterien (150). Durch konservierte Sequenzbereiche und der enzymatischen Eigenschaft von NanS als *O*-Acetylesterase, wird es in Gruppe der SGNH Serinproteasen eingeteilt. Sequenzanalysen zeigten, dass sowohl der Serotyp O157:H7, also auch der Serotyp O104:H4 mehrere homologe *nanS* Gene auf Prophagen kodieren (148, 140, 143).

3.7. Vorkommen von 9-O-Acetylerasen bei Shiga Toxin-produzierenden *E. coli*

Insgesamt wurde das Genom des Stammes O157:H7 EDL933 dreimal sequenziert und publiziert (32, 154, 148). Die erstmals in 2001 publizierte Sequenz des Stammes O157:H7 EDL933 zeigte insgesamt 18 funktionelle und kryptische Prophagen (32). Die unter anderem durch Lücken fehlerbehaftete Sequenz wurde von Latif et al. einige Jahre später durch modernere Sequenzierungsmethoden korrigiert (154). Der größte Unterschied befand sich in Prophagen-kodierten Regionen der Sequenz. Vimr et al. konnten durch in silico Analysen zeigen, dass sich im EDL933 Genom 7 vollständige und 5 fragmentierte homologe *nanS* Gene befinden (143). Als Referenzstamm wurde die erstmals publizierte Sequenz verwendet (32). Neuere in silico Analysen, welche auf der Verwendung der publizierten Sequenz von Latif et al. beruhten, zeigten insgesamt 10 vollständige auf Prophagen kodierte *nanS* Homologe, welche aufgrund der Lokalisierung als *nanS*-p1 bis *nanS*-p10 bezeichnet wurden (148). Der Stamm EDL933, erstmals 1982 isoliert, wurde über Jahrzehnte weltweit in Laboren als Referenzstamm verwendet, wobei die Isolate unterschiedliche Ursprünge haben. Es wird vermutet, dass sich die verschiedenen Isolate über die Jahre in der Sequenz verändert haben (155). Eine erneute Analyse der Sequenz des verwendeten Stammes EDL933 von Saile et al. zeigten tatsächlich Unterschiede. Demnach befanden sich im Genom die 7 Prophagen kodierte *nanS*-p1 bis *nanS*-p7, wobei *nanS*-p1 geringe Unterschiede in der Sequenz aufweist und deshalb als *nanS*-p1a umbenannt wurde (148). Die Sequenzen der Gene *nanS*-p2 bis *nanS*-p7 sind identisch. Die Gene *nanS*-p8 bis *nanS*-p10 waren nicht vorhanden (148). Im Rahmen einer Sequenzanalyse des Shiga Toxin 2 Prophagen wurde erstmals der Genlokus von *nanS*-p1 beschrieben, welcher das Gen *stx2b* flankiert. Die *stx2* Gene und *nanS*-p1 liegen zwischen den Genen des Antiterminators Q und dem Lysegen S (156). Alle anderen *nanS*-p sind ebenfalls zwischen den Genen Q und S auf funktionellen oder kryptischen Prophagen lokalisiert. Das Gen *nanS*-p2 befindet sich im Shiga Toxin 1 Prophagen und flankiert *stx1b* (148). Die zum chromosomalen *nanS* homologen Gene enthalten ebenfalls die Domäne DUF303 und werden den SGNH Serinproteasen zugeteilt. Während *nanS* eine Länge von 981 bp aufweist, variiert die Länge der *nanS*-p Gene des EDL933 Stammes zwischen 1851 und 1947 bp (148). In der Sequenz befindet sich zusätzlich am N-Terminus die konservierte Domäne DUF1737, deren Funktion bisher unbekannt ist. Aus EDL933

wurden bisher NanS-p1, NanS-p2 und NanS-p4 charakterisiert und als *N*-Acetyl-9-*O*-Acetylneuraminsäureesterasen (kurz: 9-*O*-Acetylerasen) identifiziert (148, 157). Transkriptomanalysen zeigten in EDL933 nach Inkubation mit subinhibitorischer Konzentration von Norfloxacin eine erhöhte Co-Expressionsrate der *stx2* Gene und *nanS*-p1 (158). Zudem ist die Expression von *nanS*-p1 unter aerobem Wachstum in Dickdarm simulierendem Medium 40-fach erhöht (159). Das Temperaturoptimum von rekombinant exprimierten, aufgereinigten NanS-p1 und NanS-p2 liegt bei 50 °C, von NanS-p4 bei 40 °C. Bei einem pH Wert von 7 bis 9 zeigten die Esterasen die höchste Aktivität (157, 148). Wachstumsversuche mit Deletionsmutanten unter der Verwendung von Neu5,9Ac₂ als Kohlenstoffquelle zeigten, dass der Stamm EDL933 bei einer vollständigen Deletion von *nanS* und *nanS*-p nicht mehr fähig war, den Zucker zu metabolisieren (148). Dieses Wachstumsdefizit konnte durch die Zugabe von rekombinant exprimiertem NanS-p im Medium aufgehoben werden. Das Wachstumsverhalten des Wildtyps konnte ebenfalls gehalten werden, sofern noch mindestens zwei *nanS*-p Gene im Genom von EDL933 vorhanden waren (148). Die exprimierten NanS-p waren zudem in der Lage, deletiertes *nanS* zu kompensieren und hielten den Neuraminsäurestoffwechsel aufrecht. Anders als *nanS*, sind *nanS*-p Gene allerdings nicht unter der Kontrolle des Repressors NanR (148, 160).

Weitere bioinformatische Analysen zeigten, dass der Ausbruchstamm O104:H4 LB226692 aus dem Jahr 2011 im Genom fünf Prophagen kodierte *nanS*-p enthält, wobei dem Stamm das *nanCMS* Operon fehlt (140). Die vorhandenen *nanS*-p Gene wurden nach der entsprechenden Nomenklatur von *nanS*-p11-p15 benannt. Die Lokalisierung der *nanS*-p Gene auf Prophagen, zwischen dem Antiterminator Q und dem Lysegen S, gleicht der des EDL933, wobei sich *nanS*-p12 in einer Region befindet, die Phagenkapsid- und Phagenschwanz-kodierende Gene enthält. Das Gen für *nanS*-p15 befindet sich auf dem Shiga Toxin 2 Prophagen und ist dem *stx2b* nachgeschaltet (140). Die Gene enthalten die für SGNH-Serinproteasen typische DUF303 Domäne, sowie die unbekannte Domäne DUF1737 am N-Terminus. Die Genlängen variierten zwischen 1854 und 1983 bp. Rekombinant exprimiertes NanS-p13 wurde enzymatisch charakterisiert und zeigt ein Temperatur- und pH-Optimum bei 50 °C und pH 7 (140). Der Vergleich des Wachstums von *nanS*-p Deletionsmutanten mit dem wildtypischen Stamm zeigten auch im O104:H4 LB226692 einen Gendosiseffekt und die Abhängigkeit des Neuraminsäurestoffwechsels von Prophagen-kodierten Esterasen. Co-

Kultivierungsversuche mit kommensalen *E. coli* und Neu5,9Ac₂ als Kohlenstoffquelle zeigten, dass O104:H4 eine kürzere Generationszeit aufwies und das Wachstum des Kommesalen unterdrückt (140). Das Vorhandensein mehrerer Prophagen-kodierter *nanS* Homologe in pathogenen *E. coli* Stämmen könnte während der Kolonisierung im Darm ein Wettbewerbsvorteil sein. Durch den Gendosisseffekt könnte EHEC die Neuraminsäuren schneller verstoffwechseln als kommensale *E. coli*, was die höhere Replikationsrate erklären würde und wodurch EHEC die natürliche Kolonisierungsresistenz umgehen könnte (148, 138, 140). Ob NanS-p ebenfalls wie NanS in den periplasmatischen Raum transportiert werden, ist bisher nicht bekannt. Aufgrund der Häufigkeit der *nanS*-p Gene und vor allem deren Lokalisation in Prophagen, stehen die 9-O-Acetylerasen aus EHEC im Fokus der Forschung.

3.8. Vorkommen von O-Acetylerasen in anderen Organismen und Viren

Neben den Sialidasen produzieren auch manche kommensale Bacteroides Spezies im Dickdarm O-Acetylerasen (136, 161). Sialidasen sind durch O-Acetylierungen an Neuraminsäuren in ihrer Aktivität gehemmt. *Bacteroides fragilis* kodiert für das Enzym EstA, welche extrazellulär Neu5,9Ac₂ in Neu5Ac hydrolysiert und als 9-O-Acetylerase charakterisiert wurde (136). Die vom Bakterium zusätzlich sekretierte Sialidase wird dann in ihrer Aktivität nicht mehr gehindert und spaltet die de-O-acetylierten Neuraminsäuren ab. Eine Studie zeigte, dass sowohl kommensale Bakterien der Mikrobiota, als auch pathogene Vertreter wie O157:H7, die hydrolysierten Neuraminsäuren metabolisierten und somit von der Aktivität der 9-O-Acetylerase und der Sialidase profitieren (136). Ähnliche Ergebnisse zeigten die Analyse der O-Acetylerase aus *Tannerella forsythia* (162). Das Oralpathogen kodiert zusätzlich für eine Sialidase. Durch das Zusammenspiel der Enzyme trägt das Pathogen zum Abbau der Schleimhaut im Mund bei (162).

Die Rolle der 9-O-Acetylerasen im Metabolismus von Neuraminsäuren und dem daraus resultierenden Muzinabbau ist deutlich (147, 136, 143, 148). Die Enzyme zeigen aber eine weitere Rolle während der Infektion von pathogenen *E. coli*. Eine Analyse von generierten Insertionsmutanten des UPEC Stammes ST131 zeigte den Einfluss eines Gens EC958_1546 auf *flhD*, dem Masterregulator des Flagella-

Operons (163). Das auf einem Prophagen lokalisierte Gen zeigt Sequenzähnlichkeiten zu *nanS*-p Genen (150, 157). Die Expression des Gens EC_1546 steht im Zusammenhang mit erhöhter Flagellen-assoziiierter Motilität, indem es die Produktion von Flagellen hochreguliert. Interessanterweise enthält das Genom von ST131 drei weitere homologe Gene zu EC958_1546, deren Expression allerdings keinen Einfluss auf die Motilität hatten (163).

Neben Bakterien kodieren auch Viren, wie z.B. das Coronavirus OC43 und das Maus Hepatitisvirus für O-Acetylerasen, die während der Infektion eine wichtige Rolle spielen. Die Enzyme zeigen ein spezifisches Substratspektrum für entweder Neu5,9Ac₂, wie die Esterase des Coronavirus OC43, oder Neu5,4Ac₂, das durch die Esterase des Hepatitisvirus de-O-acetyliert werden kann (164). Das Influenza C Virus kodiert für eine weniger Substratspezifische O-Acetylerase, welche neben Neu5,9Ac₂ auch Neu5,7(8),9Ac₃ und Neu5Gc9Ac de-O-acetylieren kann (164). Endständig-gebundene Neuraminsäuren in Glykanen kommen nicht nur in Muzin, sondern auch in Glykorezeptoren vor. Diese befinden sich im extrazellulären Raum, während der Lipidanteil in der Membran verankert ist (165). Eine Veränderung der Glykanstruktur kann Signalwege in der Zelle auslösen. Die O-Acetylerase aus dem Influenza C Virus ermöglicht die Adhärenz an die Membran der Wirtszelle, zerstört dabei Glykorezeptoren, wodurch die Signaltransduktion verändert wird und das Virus in die Zelle gelangt (165, 164, 166, 167).

3.9. Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten Prophagen-kodierte 9-O-Acetylerasen von EHEC funktionell charakterisiert werden, um Aufschluss über deren möglichen Einfluss auf verschiedene Pathogenitätsmerkmale geben zu können. Generell kann in Muzinen, wie sie im Dickdarm des Menschen vorkommen, neben der einfach O-acetylierten Neuraminsäure Neu5,9Ac₂ auch die bis zu dreifach O-acetylierte Neuraminsäure Neu5,7,8,9Ac₄ vorkommen. Zusätzlich findet man die glykosylierten Derivate. Im Rahmen dieser Arbeit sollte das spezifische Substratspektrum von NanS-p, bezogen auf die Position der de-O-Acetylierung, analysiert werden. Mittels den Methoden HPTLC und nanoESI MS sollte gezeigt werden, ob NanS, NanS-p1, NanS-p2 und NanS-p4 weitere O-Acetylgruppen an C4, C7 oder C8 abspalten

können. Hierfür sollten zunächst die mit einem His-Tag versehenen Enzyme rekombinant exprimiert und mittels Ni^{2+} -NTA-Säulen aufgereinigt werden. Als Substrate für enzymatische Assays sollten kommerziell erhältliches Neu5,9Ac₂, Neu5,4Ac₂ und RinderdrüSENSPEICHELMUZIN (BSM) als Neuraminsäurequellen eingesetzt werden. Eine de-O-Acetylierung ändert die Polarität von Neuraminsäuren und kann somit über HPTLC detektiert werden. Zudem verringert sich die Masse des Zuckers um 42 Dalton (Da). Der Massenunterschied sollte über nanoESI MS Analysen nachgewiesen werden. Zusätzlich sollten Co-Inkubationen von rekombinant exprimierter Sialidase BTSA des kommensalen Darmbakteriums *B. thetaiotaomicron* mit NanS, NanS-p1, NanS-p2 und NanS-p4 durchgeführt werden. Als Substrat der enzymatischen Assays dient BSM. Ziel der Ergebnisse ist es, darüber Aufschluss zu geben, inwiefern 9-O-Acetylerasen aus EHEC der Sialidase BTSA de-O-acetylierte Neuraminsäure Neu5Ac als Substrat liefern, welches dann durch BTSA von Glykanen des Muzins abgespalten werden kann. Die Hydrolyse von Neuraminsäuren durch BTSA sollte mittels HPTLC und nanoESI MS analysiert werden.

Neben der funktionellen Analyse der 9-O-Acetylerasen im Neuraminsäure-Stoffwechsel, sollten weitere Funktionen der Enzyme, die während der Infektion eine wichtige Rolle spielen, charakterisiert werden. Inwiefern 9-O-Acetylerasen aus EHEC an der Adhärenz an Darmepithelzellen beteiligt sind, sollte im Rahmen dieser Arbeit analysiert werden. Hierfür sollten Adhärenzassays durchgeführt werden. Als Zelllinie dienen die humanen Darmepithelzellen HT-29, welche mit Wildtypstämmen O157:H7 EDL933 und O104:H4 C227-11 ϕ cu, sowie mit *nanS-p* Deletionsmutanten infiziert wurden. Nach der Infektion sollte die Anzahl adhärenter Bakterien der jeweiligen Stämme untereinander verglichen werden.

Enzyme wie Hydrolasen können in ihrer Aktivität durch O-Acetylgruppen an Neuraminsäuren inhibiert werden. EHEC selbst produziert Hydrolasen wie StcE oder Pic, die Muzin degradieren können. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb der mukosale Abbau in Abhängigkeit von NanS-p analysiert werden. Hierfür kommen Muzin-produzierende Darmepithelzellen LS 180 zur Verwendung. Die Analyse des Muzins nach Infektion mit O157:H7 EDL933 und *nanS-p* Deletionsmutanten sollte mittels PAS Färbung und anschließender Mikroskopie erfolgen.

Des Weiteren sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der NanS-p der Stämme O157:H7 EDL933 und O104:H4 C227-11φcu auf das Schwimmverhalten der Bakterien analysiert werden. Hierbei sollte die Motilität der wildtypischen Stämme mit *nanS-p* Deletionsmutanten verglichen werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollen Aufschluss darüber geben, welche Bedeutung NanS-p nicht nur für den Kohlehydratmetabolismus und der Konkurrenz um Nährstoffe im Darm haben, sondern auch eine Darstellung über den Einfluss auf die Virulenzeigenschaften von EHEC, insbesondere auf die Adhärenz, Motilität und den mukosalen Abbau, aufzeigen.

4. Material und Methoden

4.1. Material

Materialien, die für die Durchführung der Methoden der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, sind in folgenden Tabellen aufgelistet. Der Autoklaviervorgang für sämtliche Medien, Puffer und Lösungen erfolgte bei 121 °C und 1 bar für 15 Minuten.

Einwegmaterialien wie HPTLC Platten (20 x 10 cm; Kieselgel 60 F₂₅₄), sterile Multiwellplatten (24-Well, 96-Well), serologische Pipetten, Reaktionsgefäße und Kryogefäße wurden von Firmen Merck KgaA, Greiner Bio-One GmbH und Sarstedt AG & Co. KG bezogen.

In der vorliegenden Arbeit wurde Wasser mit verschiedenen Qualitäten verwendet. Das durch Ionenaustausch gewonnene demineralisierte Wasser wird als Reinstwasser bezeichnet. Die Leitfähigkeit des Reinstwassers beträgt bei 25 °C zwischen 0,5 und 5 µS/cm. Zusätzlich wurde ein hochwertigeres Reinstwasser verwendet (bezeichnet als Ultra-Reinstwasser), welches mittels eines Wasseraufbereitungssystems (Synergy UV SYN SV000; Merck KgaA) hergestellt wurde. Dieses entspricht der Wasserqualität 1 und beträgt eine maximale Leitfähigkeit von 0,1 µS/cm bei 25 °C.

4.1.1. Enzyme

Tabelle 1: Auflistung aller verwendeten Enzyme, die Konzentrationen und deren Hersteller

Enzym	Konzentration	Quelle/Hersteller
Sialidase BTSA-His	0,96 mg/ml	(140)
Trypsin-EDTA, Phenolrot ArtikelNr.: 25300054	0,05 %	Thermo Fisher Scientific Inc.
XhoI ArtikelNr.: ER0691	10 U/µl	Thermo Fisher Scientific Inc.
NdeI ArtikelNr.: ER0581	10 U/µl	Thermo Fisher Scientific Inc.
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase; ArtikelNr.: F530S	2 U/µl	Thermo Fisher Scientific Inc.

Taq DNA Polymerase Artikelnr.: M0273S	5000 U/ml	New England Biolabs GmbH
NanS-His	0,50 mg/ml	Diese Arbeit
NanS-p1-His	Erste Aufreinigung: 1,59 mg/ml Zweite Aufreinigung: 1,40 mg/ml	Diese Arbeit
NanS-p2-His	0,68 mg/ml	Diese Arbeit
NanS-p4-His	0,79 mg/ml	Diese Arbeit
NanS-p15-His	0,15 mg/ml	Diese Arbeit

4.1.2. Bakterienstämme

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Bakterienstämme, sowie die relevanten Charakteristika

Stammbezeichnung	Relevante Charakteristika	Quelle
<i>E. coli</i> DH5 α /pET22b(+)	Expressionsvektor unter der Kontrolle eines T7 Promoter, IPTG induzierbar, amp ^R , C-terminale His-Tag kodierende Sequenz	Universität Hohenheim, Fachgebiet Mikrobiologie (250), Prof. Kuhn; (168)
<i>E. coli</i> C600/ Φ 226692	<i>E. coli</i> C600 Transduktante mit dem <i>Stx2a</i> -kodierenden Prophagen aus <i>E. coli</i> O104:H4 LB226692	(UKM; Institut für Hygiene; Münster-No. 1679 LOG)
<i>E. coli</i> Stellar competent cells TM	<i>E. coli</i> HST08 Stamm; Genotyp: F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>phoA</i> , Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169, Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Δ <i>mcrA</i> , λ -	Takara Bio Inc.

<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Genotyp: [F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hdsSB</i> (rB ⁻ , mB ⁻) gal dcm (DE3)]	(169)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET-22b(+)/ <i>nanS</i> -p1	Rekombinantes NanS-p1-His	(157)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET-22b(+)/ <i>nanS</i> -p2	Rekombinantes NanS-p2-His	(148)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET-22b(+)/ <i>nanS</i> -p4	Rekombinantes NanS-p4-His	(148)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET-22b(+)/ <i>nanS</i> -p15	Rekombinantes NanS-p15-His	Diese Arbeit
O157:H7 EDL933	<i>nanS</i> ⁺ , <i>nanS</i> -p1a ⁺ bis <i>nanS</i> -p7 ⁺	(14)
O157:H7 EDL933Δ <i>nanS</i> Δ <i>nanS</i> -p1-p5	Deletion von <i>nanS</i> , <i>nanS</i> -p1a bis <i>nanS</i> -p5	(148)
O157:H7 EDL933Δ <i>nanS</i> Δ <i>nanS</i> -p1-p7	Deletion von <i>nanS</i> , <i>nanS</i> -p1a bis <i>nanS</i> -p7	(148)
O104:H4 C227-11Φcu	Serotyp O104:H4, Deletion des <i>stx2a</i> -Phagen, <i>nanS</i> ⁻	(170)
O104:H4 C227-11ΦcuΔ <i>nanS</i> -p11-p12	Deletion von <i>nanS</i> -p11 bis <i>nanS</i> -p12	(140)
O104:H4 C227-11ΦcuΔ <i>nanS</i> -p11-p14	Deletion von <i>nanS</i> -p11 bis <i>nanS</i> -p14	(140)

4.1.3. Verwendete Oligonukleotide

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide zur Amplifikation von *nanS*-p15 und zur Sequenzierung

Name	Laborinterne Nummer	5' - 3' Sequenz
fwd-nanSp15-SF	1999	agaaggagatatacaatggcatttaaaca

rev-nanSp15-SF	2000	gggtggtggtgctcgaatgccgcggcatccgc
pET22-seq-for	887	gggttatgctagttattgc
pET22-seq-rev	888	gcgaaattaatacgcactcac
nanSp13-1f	1703	cttgctggtcagtccaatg
nanS-p15-1	1892	gccgctgtataaggacct
nanS-p15-2	1893	gaaatggcgtgacagctc
nanS-p15-3	1894	gctttaaggtttcgggag

4.1.4. Verwendete Zellkulturen

Tabelle 4: Verwendete Zelllinien inklusive Charakteristika, ATCC Nr. und der verwendeten Passagen

Zelllinie	Relevante Charakteristika	Verwendete Passagen	Herkunft
HT-29	Adhärente, humane Epithelzelllinie des Dickdarms, keine Mukusproduktion	4 bis 19	ATCC® Nr. : HTB-38
LS 180	Adhärente, humane Epithelzelllinie des Dickdarms, Produktion von Muzin MUC2	46 bis 51	Universität Hohenheim, Fachgebiet Biofunktionalität der Lebensmittel (140b) Ursprünglich : ATCC® Nr.: CL-18

4.1.5. Chemikalien

Tabelle 5: Auflistung aller verwendeten Chemikalien, Hersteller und zugehörige Artikelnummer

Chemikalien	Hersteller	Artikelnummer
10x Standard Taq Reaktionspuffer	New England Biolabs GmbH	B9014S
5-N-Acetyl-4-O-Acetylneuraminsäure	Applied BioTech GmbH	SA-4-S
5-N-Acetyl-9-O-Acetylneuraminsäure	Applied BioTech GmbH	SA-9-S
5-N-Acetylneuraminsäure	Applied BioTech GmbH	SA-5-Ac
5X Phusion HF Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc.	F518L
85 % ortho-Phosphorsäure	Merck KGaA	1005732510
Aceton ≥99,7 %	Carl Roth GmbH + Co. KG	CP40.2
Agar-Agar	Becton, Dickinson and Company	257353
Akasolv Aqua Care	Akadia-Chemie	1719
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH + Co. KG	9592.3
Ampicillinsalz ≥97 %	Carl Roth GmbH + Co. KG	K029.1
Anilin ≥99,5 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	242284
Bacto Agar	Becton, Dickinson and Company	214010
Bacto Trypton	Becton, Dickinson and Company	211699
Borsäure ≥99,5 %	Merck KGaA	2710

Bromphenolblau Natriumsalz	Merck KGaA	1117460005
Calciumchlorid Dihydrat	Merck KGaA	208290
Chloramphenicol ≥98,5 %	Carl Roth GmbH + Co. KG	3886.2
Quick Coomassie® Stain	Serva Electrophoresis GmbH	35081.01
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KGaA	1065761000
Diphenylamin ≥99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG	9865.2
Dimethylsulfoxid (DMSO), ≥99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	W387520
DNA Gel Loading Dye (6X)	Thermo Fisher Scientific Inc.	R0611
Deoxynucleotide solution mix 10 mM (dNTP)	New England Biolabs GmbH	N0447S
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc.	31885-023
Ethylenediaminetetraacetic acid Di-Natriumhydrat (EDTA), 0,25 M	Biomol GmbH	E2210-05
Essigsäure 100 %	Carl Roth GmbH + Co. KG	6755.2
Ethanol ≥99,5 %	Carl Roth GmbH + Co. KG	5054.4
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom GmbH	S0115
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc.	SM0311
Glycerin, Wasserfrei	AppliChem GmbH	A1123,1000
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30%	Merck KGaA	8222871000

Bacto-Hefeextrakt	Becton, Dickinson and Company	212720
Imidazol ≥99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG	X998.1
Carl Zeiss™ Immersionsöl	Thermo Fisher Scientific Inc.	10418653
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG), ≥99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG	CN08.2
Isopropanol ≥99,9 %	Carl Roth GmbH + Co. KG	7590.1
Kalium-Dihydrogenphosphat, ≥99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG	3904.1
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH	840004
Luminol BC ≥95 %	AppliChem GmbH	A2185,0005
Methanol ≥99,9 %	Carl Roth GmbH + Co. KG	0082.3
p-coumaric acid ≥98.0%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	C9008-5G
Oxoid™ Magermilchpulver	Thermo Fisher Scientific Inc.	LP0031B
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED), ≥99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG	2367.3
Natriumchlorid (NaCl) ≥99,5 %	Carl Roth GmbH + Co. KG	3957.2
Natriumacetat wasserfrei	Merck KGaA	1062680250
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA	1064821000
Natriumdodecylsulfat (SDS), ≥99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG	4360.1
n-Butanol	Merck KGaA	1019901000

Page Ruler Unstained Protein Ladder 10 – 200 kDa	Thermo Fisher Scientific Inc.	26614
PageRuler Plus	Thermo Fisher Scientific Inc.	26619
Prestained Protein Ladder 10 – 250 kDa		
Penicillin (10000 U/ml)- Streptomycin (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	P4333
Dulbecco`s Phosphate buffered saline (PBS)	Biochrom GmbH	L1825
Prestained Protein MW Marker 20 – 120 kDa	Thermo Fisher Scientific Inc.	26612
Puffer O (10x)	Thermo Fisher Scientific Inc.	BO5
Rinderdrüsenspeichelmuzin (BSM)	Merck KGaA	M3895
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH + Co. KG	3029.2
SOC Medium	Takara Bio Inc.	636763
Terralin® protect	Schülke & Mayr GmbH	181612
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) Pufferan®, ≥99,9 %	Carl Roth GmbH + Co. KG	4855.1
Trypan blue solution (0,4 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	T8154
Tween® 20	Carl Roth GmbH + Co. KG	9127.1

4.1.6. Geräte

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Laborgeräte, Hersteller und Seriennummer oder Bezeichnung

Geräte	Hersteller	Seriennr. /Bezeichnung
Autoklav	Fedegari Autoclavi S.p.A.	F0B4/TS
Autoklav	Fedegari Autoclavi S.p.A.	FVA2/A1
Autoklav	Fedegari Autoclavi S.p.A.	FVA3/A1
Autoklav	System Industrial Systems GmbH	DE-45
Automatic TLC Sampler 4	Camag AG	022.7410
Automatische Tauchvorrichtung	Camag AG	022.6606
Beckmann Zentrifuge	Beckman Coulter, Inc	Rotoren: Avanti J-25; JA-12
Camag Heat Plate III	Camag AG	022.3306
Camag TLC Scanner 4	Camag AG	027.6200
Camag TLC Visualizer II	Camag AG	022.9810
CO ₂ Inkubator	NuAire Inc.	Autoflow NU-5500E; NU-5100E
Electrophoresis Power Supply	GE Healthcare	EPS-301
Entwicklungskammer	Camag AG	022.5265
Farbkamera	Carl Zeiss AG	Axio Cam ICc1

Feinwaage	Sartorius AG	BP 210 S
Föhn	Braun GmbH	-
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr GmbH	-
Gefrierschrank (-70 °C)	Thermo Fisher Scientific Inc.	Herafreeze Basic HFU 486
Geldokumentationssystem	Intas Sciences Imaging Instruments GmbH	Gel IX Imager
Inkubator	Thermo Fisher Scientific Inc.	Heraeus B 6120
Kühlschrank	CTC, Clatronic International GmbH	-
Magnetrührer	IKA-Werke GmbH & CO. KG	IKAMAG Classic
Mikroskop	Carl Zeiss AG	PrimoVert
Mikroskop	Carl Zeiss AG	Axiovert 200
PCR-Cycler	Peqlab Biotechnologie GmbH	peqSTAR
pH-Elektrode	VWR International GmbH	SJ 114, 662-1383
pH-Meter	VWR International GmbH	inoLab pH 720
Plattenzentrifuge	Kisker Biotech GmbH	LMC-3000
Scanner	Canon GmbH	CanonScan 4400F
Schüttel-Inkubator	IKA-Werke GmbH & CO. KG	KS 4000 i control
Schüttel-Inkubator	Infors AG	Multitron Standard

Spektrophotometer	Agilent Technologies Inc.	Cary 60 UV-Vis
Spektrophotometer	VWR International GmbH	WPA CO 8000 Biowave
Sterilwerkbank	NuAire Inc.	NU-437400E
Thermoblock	Eppendorf AG	Thermomixer C
Tischzentrifuge	Eppendorf GmbH	5415D
Ultraschallgerät	Branson Ultrasonics Corp.	Branson 150
Vortexer	IKA-Werke GmbH & CO. KG	MS3 basic
Waage	Sartorius AG	I4800P
Wasser- aufbereitungssystem	Merck KGaA	Synergy UV SYN SV000
Wippschüttler	CAT Ingenieurbüro M. Zipperer GmbH	ST5
Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc.	Multifuge 1S-R

4.1.7. Programme

Tabelle 7: Programme und verwendeten Versionen

Programm	Version	Hersteller
Wincats	1.4.6.2002	CAMAG
APE – a plasmid editor	v2.0.30	by M. Wayne Davis
BioEdit	7.2.5	Hall, T.A. 1999.
Tecan i-control	2.0.10.0	Tecan Austria GmbH
OriginPro 2018b	b9.5.5.409	Origin Lab Corporation

4.1.8. Verwendete Kits

Tabelle 8: Verwendete Kits, Hersteller und die dazugehörige Artikelnummer

Name des Kits	Hersteller	Artikelnummer
PAS-Färbekit	Merck KGaA	101646
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH	27104
In-Fusion® HD Cloning Plus	Takara Bio Europe	638909
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega GmbH	A9281

4.1.9. Medien

Herstellung von LB-Medium (-Agar) nach Sambrook et al. (171)

Zur Herstellung von LB-Medium (-Agar) wurden folgende Chemikalien pro 1 L Reinstwasser gelöst:

10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

10 g NaCl

Sollte Agar hergestellt werden, wurden pro Liter zusätzlich 15 g Agar eingewogen. Substanzen wurden in destilliertem Wasser in zunächst Dreiviertel des Gesamtvolumens gelöst. Der pH-Wert des Mediums bzw. Agars wurde mit 1 M NaOH auf $\text{pH } 7,0 \pm 0,1$ eingestellt und anschließend mit destilliertem Wasser auf das Gesamtvolumen aufgefüllt. Der Agar wurde anschließend autoklaviert, auf 50 °C abgekühlt und in Petrischalen gegossen. Die Lagerung von Medien und Agar erfolgte bei 4 °C.

0,3 % LB-Bacto-Agarplatten

Zur Analyse des Schwimmverhaltens wurden LB-Bacto-Agarplatten hergestellt. Hierfür wurden in 40 ml LB-Medium 0,12 g Bacto-Agar (entspricht 0,3 %)

eingewogen. Sollten 60 bzw. 80 mM Natriumacetat dem Agar hinzugefügt werden, wurden zu 0,12 g Bacto-Agar entweder 800 µl bzw. 1,07 ml der 3 M Stocklösung von Natriumacetat (4.1.10.) hinzugefügt und anschließend mit LB-Medium auf 40 ml aufgefüllt. Der Agar wurde autoklaviert und anschließend in Petrischalen gegossen. Die Lagerung erfolgte maximal für einen Tag bei 4 °C. Vor Verwendung wurden die Platten unter der Sterilwerkbank für eine Stunde bei offenem Deckel getrocknet. Durch die Zugabe des Natriumacetats wurde der pH-Wert von $7,0 \pm 0,1$ nicht verändert.

Zellkulturmedien

Zur Herstellung von Kultivierungsmedium wurden zu 500 ml DMEM 50 ml fötales Kälberserum (Endkonzentration 10 %) und 5 ml Penicillin-Streptomycin (Endkonzentration 100 U/ml/ 100 µg/ml) hinzugefügt. Als Infektionsmedium wurde lediglich DMEM ohne Zusätze verwendet. Die Lagerung der Medien erfolgte bei 4 °C.

4.1.10. Puffer und Lösungen

3 M Natriumacetat-Lösung

Für eine 3 M Natriumacetat-Lösung wurden zuerst in 30 ml Ultra-Reinstwasser 9,84 g Natriumacetat (wasserfrei) gelöst, anschließend mit Ultra-Reinstwasser das Volumen auf 40 ml aufgefüllt und die Lösung sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

0,1 M CaCl₂-Lösung (+20 % Glycerin)

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* wurde eine 0,1 M CaCl₂-Lösung benötigt. Hierfür wurden in 80 ml Ultra-Reinstwasser 1,47 g CaCl₂ gelöst, anschließend das Volumen auf 100 ml mit Ultra-Reinstwasser aufgefüllt. Zusätzlich wurden in 60 ml Ultra-Reinstwasser 20 ml Glycerin und 1,47 g CaCl₂ gelöst und anschließend das Volumen auf 100 ml mit Ultra-Reinstwasser aufgefüllt. Diese Lösungen wurden autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

Herstellung des His-Lysepuffers nach Nübling et al. (157)

Zur Herstellung des His-Lysepuffers wurden folgende Chemikalien pro 750 ml Ultra-Reinstwasser gelöst:

17,54 g	NaCl	300 mM
6,9 g	NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	50 mM
0,68 g	Imidazol	10 mM

Der pH-Wert wurde anschließend mit 1 M NaOH auf pH 8,0 ± 0,1 eingestellt und das Volumen mit Ultra-Reinstwasser auf 1 L aufgefüllt. Nach dem Autoklavieren wurde der Puffer bei 4 °C gelagert.

Herstellung des His-Waschpuffers nach Nübling et al. (157)

Zur Herstellung des His-Waschpuffers wurden folgende Chemikalien pro 750 ml Ultra-Reinstwasser gelöst:

17,54 g	NaCl	300 mM
6,9 g	NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	50 mM
1,36 g	Imidazol	20 mM

Der pH-Wert wurde anschließend mit 1 M NaOH auf pH 8,0 ± 0,1 eingestellt und das Volumen mit Ultra-Reinstwasser auf 1 L aufgefüllt. Nach dem Autoklavieren wurde der Puffer bei 4 °C gelagert.

Herstellung des His-Elutionspuffers nach Nübling et al. (157)

Zur Herstellung des His-Elutionspuffers wurden folgende Chemikalien pro 750 ml Ultra-Reinstwasser gelöst:

17,54 g	NaCl	300 mM
6,9 g	NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	50 mM

17 g Imidazol 250 mM

Der pH-Wert wurde anschließend mit 1 M NaOH auf pH $8,0 \pm 0,1$ eingestellt und das Volumen mit Ultra-Reinstwasser auf 1 L aufgefüllt. Nach dem Autoklavieren wurde der Puffer bei 4 °C gelagert.

Herstellung des Na⁺/K⁺-Puffer 10 mM nach Saile et al. (148)

Zuerst wurden 10 mM Stocklösungen hergestellt. Hierfür wurden in je 950 ml Ultra-Reinstwasser 1,42 g Na₂HPO₄ bzw. 1,36 g KH₂PO₄ gelöst, anschließend das Volumen mit Ultra-Reinstwasser auf 1 L aufgefüllt. Anschließend wurden beide Stocklösungen gemischt, bis pH $7,0 \pm 0,1$ erreicht wurde. Der Puffer wurde nach dem Autoklavieren bei 4 °C gelagert.

10x Laufpuffer

Zur Herstellung des 10x Laufpuffers wurden pro 750 ml Ultra-Reinstwasser folgende Substanzen eingewogen:

144 g Glycin

33 g Tris

25 g SDS

Nach vollständigem Lösen der Substanzen wurde mit Ultra-Reinstwasser das Volumen auf 1 L aufgefüllt. Der Puffer wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

1x Laufpuffer

Für die SDS-PAGE wurde der 10x Laufpuffer 1:10 mit Ultra-Reinstwasser verdünnt und nach Beenden der Elektrophorese verworfen.

6x Lämmli Puffer

In folgender Reihenfolge wurden zur Herstellung des 6x Lämmli Puffers folgende Substanzen gelöst:

2,1 ml	Ultra-Reinstwasser
4,7 ml	Glycerin
0,01 %	Bromophenolblau
1,2 ml	Tris 0.5 M pH 6.8
1,2 g	SDS

Vor Gebrauch wurden $\frac{1}{8}$ V% β -Mercaptoethanol hinzugefügt. Die Lagerung des 6x Lämmli Puffers erfolgte bei 4 °C. Nach Hinzufügen von β -Mercaptoethanol wurde dieser bei -20 °C weggefroren.

Herstellung von 10x TBS Lösung nach Nübling et al. (157)

Zur Herstellung der 10x TBS Lösung wurden 24,2 g Tris (200 mM) und 81,8 g NaCl (1,4 M) eingewogen und zuerst in 750 ml Ultra-Reinstwasser gelöst, anschließend wurde das Volumen mit Ultra-Reinstwasser auf 1 L aufgefüllt. Nach dem Autoklavieren wurde die Lösung bei Raumtemperatur gelagert.

Herstellung der 1x TBS-T Lösung nach Nübling et al. (157)

Der für den Westernblot benötigte Waschpuffer besteht aus 10fach verdünnter 10x TBS Lösung. Dieser wurde vor jeder Verwendung frisch hergestellt, indem 100 ml der 10x TBS Lösung in 900 ml Ultra-Reinstwasser gegeben wurden. Zusätzlich wurde 1 ml Tween 20 hinzugefügt.

Herstellung der Blockierlösung (Westernblot) nach Nübling et al. (157)

Zum Blockieren von Membranen wurden in 50 ml 1x TBS-T Lösung 2,5 g Milchpulver (Westernblot grade) gelöst. Die Lösung wurde vor der Verwendung frisch zubereitet.

Transferpuffer

Zur Herstellung des Transferpuffers wurden in 800 ml Ultra-Reinstwasser Tris, Glycin und SDS gelöst. Anschließend wurde mit 200 ml Methanol auf 1 L aufgefüllt. Nach dem Autoklavieren wurde der Puffer bei Raumtemperatur gelagert.

Zusammensetzung:

6.06 g	Tris	50 mM
3.0 g	Glycine	40 mM
400 mg	SDS	0.04 % (w/v)
200 mL	Methanol	20 % (v/v)

Herstellung der ECL-Lösung nach Nübling et al. (157)

Zur Entwicklung von PVDF-Membranen wurde eine ECL-Lösung hergestellt. Diese besteht aus den drei separaten Lösungen A, B und C, welche vor Verwendung frisch angesetzt wurden.

Tabelle 9: Zusammensetzung der ECL-Lösung für die Entwicklung des Westernblots

	Zusammensetzung:	Eingesetzte Menge für die ECL-Lösung:
Lösung A	In 200 ml Ultra-Reinstwasser gelöste 2,4 g Tris (100 mM) und 50 mg Luminol (1,4 M), pH 8,6	2 ml
Lösung B	In 10 ml DMSO wurden 11 mg p-Coumarinsäure (67 mM) gelöst	100 µl
Lösung C	30 % H ₂ O ₂	0,6 µl

Ampicillin-Stocklösung (100 mg/ml)

Zur Herstellung einer 100 mg/ml Stocklösung wurden zuerst in 7 ml Ultra-Reinstwasser 1,062 g Ampicillin-Salz gelöst, anschließend das Gesamtvolumen auf

10 ml mit Ultra-Reinstwasser aufgefüllt. Nach Sterilfiltration wurde die Lösung in 500 µl Aliquots bei -20 °C gelagert.

NaCl-Lösung

In 950 ml Ultra-Reinstwasser wurden 9 g NaCl gelöst, anschließend das Volumen auf 1 L aufgefüllt. Die Lösung wurde anschließend autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

50 x TAE-Puffer

Zur Herstellung von 1 L 50x TAE-Puffer wurden folgende Substanzen eingewogen und zuerst in 700 ml Ultra-Reinstwasser gelöst:

242,0 g	Tris	2 M
14,6 g	EDTA	50 mM
57,1 mL	Essigsäure	17.5 % (v/v)

Der Puffer wurde mittels Ultra-Reinstwasser auf ein Volumen von 1 L aufgefüllt und anschließend bei Raumtemperatur gelagert. Für die Elektrophorese wurde der Puffer vor Verwendung 1:50 mit Ultra-Reinstwasser verdünnt.

10 % APS

Zur Herstellung einer 10% APS-Stocklösung wurden in 7 ml Ultra-Reinstwasser 1 g APS gelöst, das Volumen mittels Ultra-Reinstwasser auf 10 ml aufgefüllt und anschließend je 200 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Diese wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

25 % SDS

Zur Herstellung einer 25 % SDS-Stocklösung wurden zuerst in 7 ml Ultra-Reinstwasser 2,5 g SDS gelöst, anschließend das Volumen mit Ultra-Reinstwasser auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert.

12 % Polyacrylamidgele für die SDS-PAGE:

Polyacrylamidgele bestehen aus einem Trenn- und Sammelgel. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 10 aufgelistet. Grundsätzlich wurden zwei Gele mit einer Größe von jeweils 12 x 8 cm gleichzeitig hergestellt. Zuerst wurde das Trenngel hergestellt, indem die benötigten Substanzen (Tab. 10) in einem 50 ml Reaktionsgefäß gemischt wurden. Dabei wurde darauf geachtet, dass APS und TEMED zuletzt hinzugegeben wurden, da diese die Polymerisierung auslösen. Mittels einer 10 ml serologischen Pipette wurde die Gießkammer zu circa dreiviertel des Gesamtvolumens befüllt. Um Luftblasen und Austrocknen des Gels zu verhindern, wurde 1 ml Isopropanol auf das Gel in die Gießkammer pipettiert. Sobald das Gel in der Kammer auspolymerisiert war, wurde das Sammelgel zubereitet. Hierbei wurde auch darauf geachtet, dass APS und TEMED zuletzt hinzugefügt wurden. Das Isopropanol in der Kammer wurde abgossen und das Sammelgel bis zur oberen Kante mittels einer 10 ml serologischen Pipette hinzupipettiert. Ein Kamm zur Erstellen von Taschen im Gel wurde in die Kammer eingesteckt. Nach Auspolymerisieren der Gele konnten diese aus den Gießkammern entnommen werden und in 0,1 % SDS getränkten Tüchern gewickelt bei 4 °C für wenige Tage gelagert werden.

Tabelle 10: Zusammensetzung von SDS-PAGE Gelen (2 Gele; 12cm x 8 cm)

	Substanz	Menge
Trenngel (12 %)	Monomerlösung 30 Rotiphorese	6 ml
	2 M Tris-HCl pH 8,8	2,81 ml
	25 % SDS	60 µl
	10 % APS	150 µl
	TEMED	15 µl

	Substanz	Menge
Sammelgel (4 %)	Monomerlösung 30 Rotiphorese	1,33 ml
	2 M Tris-HCl pH 6,8	1,25 ml
	25 % SDS	40 µl
	10 % APS	100 µl
	TEMED	15 µl

4.1.11. Verwendete Antikörper

Tabelle 11: Verwendete Antikörper für die Detektion von rekombinant exprimierter Proteine

Antikörper	Typ	Ursprung	Hersteller	Artikelnummer:
6x-His Tag Monoclonal Antibody (HIS.H8)	Primär-Antikörper	Maus	Thermo Fisher Scientific Inc.	MA1-21315
Goat-anti- mouse IgG (H+L)	Sekundär- Antikörper	Ziege	Thermo Fisher Scientific Inc.	31430

4.1.12. Laufmittel für die HPTLC

Das Laufmittel für die HPTLC wurde vor jedem Versuch frisch zusammengemischt und bestand aus *N*-Butanol, Essigsäure, Reinstwasser im Verhältnis 6:3:3; v/v/v.

4.2. Methoden

4.2.1. Kultivierung von Bakterien

Die verwendeten *E. coli* Stämme wurden auf LB-Agar kultiviert. Bei Bedarf wurde das entsprechende Antibiotikum hinzugefügt. Inkubiert wurden die Bakterienkulturen über Nacht bei 37 °C. Im Flüssigmedium wurden die Bakterien bei 180 rpm im Rotationsschüttler geschüttelt. Für Glycerinkonserven wurden 600 µl der Kultur und 1 ml 80 % Glycerin gemischt, in Kryo-Gefäße überführt und anschließend bei -70 °C gelagert.

4.2.2. Restriktion des Plasmides pET22b(+)

Zur Linearisierung der Plasmid-DNA pET22b(+) wurden die Restriktionsenzyme XhoI und NdeI nach Herstellerprotokoll verwendet. Dafür wurde 1 µg Plasmid-DNA mit 3 µl 10x Puffer O und 5 U NdeI sowie 10 U XhoI gemischt. Mit Reinstwasser wurde das Endvolumen auf 30 µl eingestellt und der Ansatz bei 37 °C für 16 Stunden inkubiert. Anschließend wurde zur Hitzeinaktivierung der Enzyme der Ansatz für 20 Minuten bei 80 °C erhitzt.

4.2.3. Polymerase Kettenreaktion

Das *nanS*-p15 Gen wurde mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Hierfür wurden zwei verschiedene Polymerasen verwendet. Zum Klonieren wurde die thermostabile Phusion Polymerase mit einer 3' - 5' Exonukleaseaktivität („proof-reading“) verwendet, da diese laut Anbieter (Thermo Fisher Scientific Inc.) nahezu fehlerfrei amplifiziert. Um generell die Größe des Inserts nach der Klonierung zu überprüfen, wurde die Taq Polymerase verwendet. Diese weist keine „proof reading“-Funktion auf. Des Weiteren wurde für eine erfolgreiche Amplifikation Desoxynukleotide (dNTPs) und spezifische Oligonukleotide verwendet. Als Template wurde „Koch-DNA“ der Stämme *E. coli* C600/Φ226692 und *E. coli* BL21(DE3)/pET-22b(+)/*nanS*-p15 verwendet. Dafür wurde eine Kolonie in 50 µl Reinstwasser überführt und für 10 Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Nach Zentrifugation bei 13000 rpm in der Tischzentrifuge für eine Minute befand sich die genomische und Plasmid-DNA im Überstand und konnte für die PCR eingesetzt werden. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes ist in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Zusammensetzung der PCR-Ansätze mit der Phusion und Taq Polymerase

Ansatz für Phusion Polymerase:		Ansatz für Taq Polymerase:	
5x High Fidelity Buffer	10 µl	10x Standard Taq Reaction Buffer	2,5 µl
dNTPs 10mM	1 µl	dNTPs 10mM	1 µl
Primer (forward)	1 µl	Primer (forward)	1 µl
Primer (reverse)	1 µl	Primer (reverse)	1 µl
Phusion Polymerase	0,5 µl	Taq Polymerase	0,5 µl
Template (Koch-DNA)	2 µl	Template (Koch-DNA)	2 µl
Ultra-Reinstwasser	34,5 µl	Ultra-Reinstwasser	17 µl

Als Negativkontrolle der PCR wurde einem zusätzlichen Ansatz anstatt Template 2 µl Ultra-Reinstwasser hinzugefügt. Als Positivkontrolle wurde als Template 2 µl der Plasmid-DNA pET22b(+)/*nanS*-p1 hinzugefügt. Die Proben wurden in einen PCR-Cycler gegeben und das in Tabelle 13 darlegende Programm gewählt.

Tabelle 13: Eingestelltes PCR-Programm am PCR-Cycler

Temperatur	Dauer	Schritt	Anzahl der Zyklen
98 °C	10 Min	Denaturierung	1
98 °C	1 Min	Denaturierung	
50 °C	30 Sek	Primer Hybridisierung	35
68 - 72 °C	2 Min	Extension	
68 - 72 °C	10 Min	Extension	1
8 °C	Hold	Kühlen	-

Wurde zur Amplifikation die Phusion Polymerase eingesetzt, wurde für den Schritt „Extension“ eine Temperatur von 72 °C gewählt. Wurde die Taq Polymerase verwendet, wurde eine Temperatur von 68 °C gewählt. Um eine erfolgreiche Amplifikation nachzuweisen, wurden die Ansätze elektrophoretisch analysiert. Hierfür wurden zu 50 µl PCR-Ansatz 10 µl 6x Loading Dye hinzugegeben und diese in Taschen eines 1,5 % Agarosegels in 1x TAE Puffer pipettiert. Ein 1 kb Molekulargewichtsstandard wurde verwendet. Die Elektrophorese wurde für 1,5 Stunden bei 120 V durchgeführt. Nach Beenden wurde das Gel für 30 Minuten in ein 1 % Ethidiumbromidbad gelegt, anschließend für 5 Minuten in Reinstwasser gewaschen. Danach konnte das Gel unter UV-Licht mittels eines Gel-Dokumentationssystems überprüft werden.

4.2.4. DNA-Isolierung aus Agarosegel

Um restringierte Plasmide und PCR-Fragmente aufreinigen zu können, wurde das Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System verwendet. Mit einem Skalpell wurde unter UV-Licht die zu aufreinigende DNA aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Gelstücke wurden gewogen und pro 10 mg wurden 10 µl Membrane Binding Solution hinzu pipettiert und bei 65 °C im Thermoblock unter leichtem Schütteln inkubiert, bis das Gel vollständig aufgelöst war. Anschließend wurden die Ansätze in SV Minisäulen überführt und bei 13000 rpm in der Tischzentrifuge für eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und Säulen mit je 700 µl Waschpuffer gewaschen. Um restlichen Waschpuffer zu entfernen, wurde erneut zentrifugiert. Die Säulen wurden in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und die DNA mit je 30 µl Ultra-Reinstwasser eluiert.

4.2.5. HD In-Fusion® Reaktion

Die HD In-Fusion® Reaktion basiert auf der Verwendung einer DNA Polymerase aus dem Vacciniavirus. Diese weist eine 3` - 5` Exonukleaseaktivität, wodurch Basen bei Insert und Plasmid in 3` - 5` Richtung entfernt werden. Bei der vorherigen Amplifikation des Inserts werden Primer so designt, dass am 3`- und 5`-Ende circa 15 bp homolog zur multiplen Klonierungsstelle des Plasmides entstehen. Durch die

komplementären Überhänge an Insert und Plasmid, werden diese fusioniert. Dadurch müssen für die Klonierung keine Restriktionsenzyme verwendet werden. Die Methode kommt meist dann zum Einsatz, wenn das Insert in der Sequenz die gleichen Schnittstellen enthält, wie sich in der multiplen Klonierungsstelle des Vektors vorkommen. Die Fusion des linearisierten Plasmides pET22b(+) und des amplifizierten *nanS*-p15 erfolgte nach dem Protokoll von Clontech. Die Reaktion bestand aus 50 ng pET22b(+), 75 ng *nanS*-p15, 2 µl 5x In-Fusion HD Enzyme Premix und wurde mit Ultra-Reinstwasser auf 10 µl aufgefüllt. Nach Inkubation bei 50 °C für 15 Minuten wurde anschließend der Ansatz für wenige Minuten auf Eis abgekühlt und bis zur Transformation bei -20 °C gelagert.

4.2.6. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* BL21(DE3)

Zuerst wurden 10 ml LB-Medium mit einer frischen Kolonie von *E. coli* BL21(DE3) beimpft und bei 37 °C über Nacht bei 180 rpm inkubiert. Von dieser Übernachtskultur wurde 1 ml entnommen und in 45 ml frisches LB-Medium überführt. Diese Hauptkultur wurde bis $OD_{600} = 0,6$ inkubiert und anschließend in ein 50 ml Röhrchen überführt und für 15 Minuten auf Eis gestellt. Die Kultur wurde dann in der Beckmann Zentrifuge unter der Verwendung des Ja-12 Rotors bei 4 °C und 4000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert, das Pellet in 10 ml eiskalter 0,1 M $CaCl_2$ Lösung resuspendiert und nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml eiskalter 0,1 M $CaCl_2$ + 20 % Glycerin resuspendiert und in 50 µl Aliquots auf 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Diese wurden bei -70 °C gelagert.

4.2.7. Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Um Plasmid-DNA in *E. coli* Stellar bzw. BL21(DE3) transformieren zu können, wurde zunächst ein Aliquot der chemisch kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und anschließend zu Stellar Zellen 50 ng DNA, zu BL21(DE3) circa 1000 ng DNA hinzu pipettiert, vorsichtig durchmischt und für 30 Minuten weiter auf Eis inkubiert. Anschließend folgte der Hitzeschock bei 42 °C für 45 Sekunden bei Stellar Zellen, für BL21(DE3) Zellen eine Minute. Nach Abkühlen der Transformanten auf Eis wurden 500 µl 37 °C warmes nährstoffreiches SOC Medium, welches in dem Kit In-Fusion® HD Cloning Plus enthalten ist, hinzugefügt und Proben für eine Stunde bei 37 °C

unter leichtem Schütteln im Thermoblock inkubiert. Anschließend wurde in der Tischzentrifuge bei 13000 rpm für eine Minute zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet im Rücklauf resuspendiert. Diese wurden auf LB-Agarplatten + 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

4.2.8. Plasmidisolierung aus *E. coli* (Mini Präparation)

Um Plasmid-DNA aus *E. coli* zu isolieren, wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit von QIAGEN verwendet. Die Durchführung folgte mit kleinen Änderungen nach dem entsprechenden Protokoll des Kits von QIAGEN. Von positiven Transformanten wurde eine frische Kolonie gepickt und in 10 ml LB-Medium + 100 µg/ml Ampicillin resuspendiert und bei 37 °C, 180 rpm über Nacht inkubiert. Hiervon wurden 2x 1,5 ml entnommen, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 13000 rpm für eine Minute in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und Pellets in je 250 µl P1 Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von jeweils 250 µl P2 Lysepuffer, mehrmaligem Invertieren und einer Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT), wurde die Lyse mit je 350 µl N3 Neutralisationspuffer gestoppt und Reaktionsgefäße für 10 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Eine Säule wurde mit den Überständen beladen. Hierfür wurden immer 700 µl in die Säule pipettiert, anschließend zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Danach wurde erneut die Säule mit 700 µl Überstand beladen, bis die Überstände der Proben vollständig aufgebraucht waren. Die Säule wurde mit 700 µl ethanolhaltigem Waschpuffer befüllt, für 5 Minuten bei RT inkubiert und erneut zentrifugiert. Um den Waschpuffer vollständig zu entfernen, wurde die Säule ein zweites Mal zentrifugiert. Die Säule wurde in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und 30 µl 60 °C warmes Ultra-Reinstwasser in die Mitte der Säule pipettiert. Nach 5-minütiger Inkubationszeit wurde zentrifugiert. Der Durchfluss enthält die Plasmid-DNA, welche bei -20 °C gelagert werden kann.

4.2.9. Induktion der Genexpression von *nanS*-p-His

5 ml LB-Medium + 100 µg/ml Ampicillin wurden mit einer frischen Kolonie der Bakterienkultur *E. coli* BL21 (DE3)/pET-22b(+)/*nanS*-p1 (-p2; -p4; -p15) inokuliert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit entsprechenden Volumina der Übernachtskultur

wurden 200 ml LB-Medium + 100 µg/ml Ampicillin zur $OD_{600} = 0,1$ beimpft. Die Hauptkultur wurde bis zur exponentiellen Wachstumsphase bei einer $OD_{600} = 0,6$ bei 37 °C inkubiert. Dem Medium wurden 200 µl IPTG hinzugefügt und die Kultur für weitere 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Kultur in 50 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 4000 g, 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets bei -20 °C eingefroren.

4.2.10. Protein-Aufreinigung

Um Proteine aufzureinigen, wurde nach dem Protokoll von Nübling et al. und Saile et al. (157, 148) gearbeitet. Zum Aufschließen der Zellen wurde das eingefrorene Pellet zunächst auf Eis aufgetaut und in 10 ml His-Lyse-Puffer resuspendiert. Die Ultraschall-Behandlung erfolgte für 6 x 10 Sekunden, wobei zwischen den Schritten jeweils 10 Sekunden pausiert wurde. Das Lysat wurde in Zentrifugenbecher überführt und für 25 Minuten bei 4 °C und 25000 g im Rotor JA-25 in der Beckmann Zentrifuge zentrifugiert. Eine Ni^{2+} -NTA-Beads-haltige Säule wurde mit dem Überstand des Zentrifugates beladen und anschließend im Rotationsschüttler für 4 Stunden bei 4 °C inkubiert. Nach Öffnen der Säule wurde der Durchfluss aufgefangen und bei 4 °C aufbewahrt. Die Säule wurde dreimal mit je 2 ml His-Wasch-Puffer gewaschen, wobei jede Fraktion aufbewahrt wurde. Es wurde anschließend mit 2, 1 und 0,5 ml His-Elutions-Puffer eluiert und die Fraktionen aufbewahrt. Zur Umpufferung wurden die Elutionsfraktionen vereint und in eine 3 ml Slide-A-Lyzer Dialyse Kassette überführt. Für die anschließende Dialyse wurde die Kassette in 2,5 L Na^+/K^+ -Puffer bei 4 °C und leichter Rotation über Nacht dialysiert. Der Dialysepuffer wurde erneuert und die Kassette weitere 4 Stunden inkubiert. Mit einer Spritze wurde das Eluat entnommen, in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Von jedem Durchfluss der Säule, sowie dem dialysierten Eluat wurden 50 µl für eine anschließende SDS-PAGE entnommen.

4.2.11. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zunächst wurden 12 %ige SDS-Gele hergestellt (4.1.10.) und in eine Vertikal-Elektrophoresekammer eingespannt. Die Kammer wurde mit 1x Laufpuffer befüllt. Die Taschen der Gele wurden mit einer Hamilton Pipette entweder mit 6 µl Protein

Marker oder 10 µl der zu analysierenden Proben beladen. Die Elektrophorese wurde mit 180 V für 1,2 Stunden durchgeführt. SDS-Gele wurden anschließend für 20 Minuten mit 20 ml Quick Coomassie Färbelösung unter leichtem Schwenken gefärbt. Um überschüssige Färbelösung zu entfernen wurden Gele für eine Stunde unter leichtem Schwenken in Reinstwasser teilentfärbt. Gele wurden mit einem Epson Scanner gescannt.

4.2.12. Westernblot

Zur spezifischen Proteindetektion wurde ein Westernblot durchgeführt. Zuerst wurden 4 Whatman® Filterpapiere in Transferpuffer (4.1.10.) gelegt und eine auf das SDS-Gel zugeschnittene PVDF-Membran für 5 Minuten in Methanol aktiviert. Nach Abschluss der SDS-PAGE (4.2.11.) wurde das ungefärbte Gel auf die PVDF-Membran gelegt und dieses beidseitig von Transferpuffer getränkten Whatman® Filterpapiere belegt und mittig in eine Elektrophoresekammer platziert. Das Blotten wurde für eine Stunde bei 0,8 mA/cm² der Membran durchgeführt. Anschließend wurde die Membran in 25 ml Blockierlösung gegeben und für 2 Stunden bei RT auf einem Wippschüttler blockiert. Die Blockierlösung wurde abgenommen, die Membran für wenige Minuten in 25 ml 1x TBS-T gewaschen und über Nacht in 25 ml primären 6x His-Tag-Antikörper (1:2000 Verdünnung in 1x TBS-T) bei 4 °C auf einem Wippschüttler inkubiert. Um überschüssigen Antikörper zu entfernen, wurde die Membran dreimal für je 10 Minuten mit jeweils 25 ml 1x TBS-T bei RT unter Wippen gewaschen. Nach Zugabe von 25 ml des sekundären Goat-Anti-Mouse-Antikörpers (1:10000 verdünnt in 1x TBS-T) wurde die Membran für weitere 2 Stunden inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit 1x TBS-T wurde zur Detektion der spezifischen Proteine auf die Membran eine ECL-Lösung pipettiert. Diese wurde frisch angesetzt und enthält 2 ml Lösung A, 200 µl Lösung B und 0,6 µl der Lösung C. Nach zwei minütiger Inkubation bei RT wurde die Membran in das BioRad XRS Detektionssystem gelegt und folgende Einstellungen des Programmes gewählt:

Total Exposure Time (sec)	600
Starting Exposure Time (sec)	20
Number of Exposures	20

Im Modus „Chemi 2x2 Bin Olaf“ können Antikörper-gebundene Proteine detektiert werden. Zur Aufnahme des Markers wurde der Modus „EPI White Olaf“ ausgewählt. Für letzteres wurde die Einstellung Auto Expose angewählt.

4.2.13. Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte nach Bradford und wurde mit dem BioRad Protein-Assay Dye Reagent durchgeführt. Das Prinzip des Assays beruht auf einer Komplexbildung zwischen Seitenketten der Proteine mit einem Farbstoff. Als Farbstoff fungiert im verwendeten Assay Coomassie-Brilliant-Blau, wodurch nach Bildung des Protein-Komplexes ein blauer Farbstoff entsteht. Die Intensität der Blaufärbung ist proportional zur Proteinkonzentration und kann über die optische Dichte bei 595 nm ermittelt werden. Zur Berechnung der Konzentrationen ist eine lineare Eichgerade notwendig. Hierfür wurde zunächst eine Standard-Verdünnungsreihe mit Konzentrationen von 0, 20, 30, 40, 50, 60, 80 und 100 µg/ml in Ultra-Reinstwasser des Proteins Albumin Fraktion V generiert. Das rekombinant exprimierte, aufgereinigte Protein wurde 1:10, 1:15, 1:20, 1:50, 1:100, 1:150 und 1:200 mit Ultra-Reinstwasser verdünnt. Von jeder Probe wurde als Doppelansatz 50 µl in eine 96 Wellplatte pipettiert. Den Ansätzen wurden jeweils 200 µl BioRad Protein-Assay Lösung (1:5) hinzugefügt und diese dann bei RT 5 Minuten inkubiert. Durch Bindung des Farbstoffes an Proteine entsteht eine proportionale kolorimetrische Reaktion, welche am Tecan-Reader bei OD_{595nm} gemessen werden kann. Durch die lineare Eichgerade des Standards Albumin kann die Konzentration des gereinigten Proteins ermittelt werden.

$$y = mx + n \quad (1)$$

y = Abhängige Variable

m = Steigung

n = y-Achsen- und Ordinatenabschnitt/ Verschiebungskonstante

x = Unabhängige Variable

Der ermittelte OD-Wert wird zur Berechnung als abhängige Variable y eingesetzt und die Formel nach x aufgelöst. Die berechnete Konzentration in µg/ml wird mit dem

Verdünnungsfaktor verrechnet, woraus die endgültige Konzentration des aufgereinigten Proteins resultiert.

4.2.14. Herstellen der Derivatisierungsreagenz Diphenylamin-Alanin-Phosphorsäure (DAPA)

Unter Rühren wurden 130 ml Aceton, 3 ml Anilin und 3 g Diphenylamin zugegeben. Zur Ansäuerung wurden 15 ml 85 % ortho-Phosphorsäure hinzu pipettiert und das Reagenz anschließend mit Aceton auf 150 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Das Derivatisierungsreagenz DAPA ist im Kühlschrank für einige Wochen haltbar.

4.2.15. High-Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)

Die Probenapplikation erfolgte automatisch mit dem ATS 4 von Camag und dem Program Wincats. Das Gerät enthält eine integrierte Hamilton-Spritze, wodurch Volumina von flüssigen Proben von 0,5 µl bis 10 µl aufgetragen werden können. Zu analysierende Proben wurden in die Vorrichtung des Gerätes gegeben. Um schmale Banden auf der Kieselplatte zu erzeugen, erfolgte die Probenapplikation als Sprühauftragung unter der Verwendung von N₂. Die Banden wurden mit einer Länge von 6 - 8 mm auf die Kieselgelplatte aufgetragen. Das Auftragevolumen variierte abhängig von der Konzentration des Analyten zwischen 2 und 6 µl. Die Entwicklung erfolgte in einer Entwicklungskammer von Camag, welche zuvor mit 10 bis 20 ml Laufmittel befüllt wurde, um eine Kammersättigung zu erreichen. Die Platte wurde für circa 30 - 45 Minuten senkrecht in die Kammer gestellt und nach Erreichen der gewünschten Laufhöhe mit einem Föhn einige Minuten getrocknet. Zur Detektion der getrennten Analyten wurde die Platte in eine automatische Tauchvorrichtung gegeben, für 1 Sekunde in die Derivatisierungsreagenz getaucht und anschließend bei 110 °C für 20 Minuten getrocknet. Die Banden werden durch die Derivatisierung sichtbar und können mittels des TLC Visualizer detektiert werden. Diese Photodokumentationseinheit detektiert die Banden bei Weißlicht, 254 nm und 366 nm.

4.2.16. Enzymatische de-O-Acetylierung von Neuraminsäuren

Von mono-O-acetyliertem Neu5,9Ac₂ (zur Verfügung gestellt von Wolfgang Fessner und Ning He, technische Universität Darmstadt) und mono-O-acetylierte Neu5,4Ac₂ wurden zunächst Stocklösungen mit einer Konzentration von 1 mg/ml, gelöst in 50 mM Tris-HCl pH 7,5, hergestellt. Davon wurden für enzymatische Ansätze je 100 µg mit jeweils 5 µg von NanS-His, NanS-p1-His, NanS-p2-His oder NanS-p4-His (Konzentrationen siehe 5.2.) bei 25 °C für eine Stunde inkubiert. Um eine vollständige de-O-Acetylierung von Neuraminsäuren gewährleisten zu können, wurde nach einer Stunde Inkubation erneut 5 µg des jeweiligen Enzyms hinzugefügt und für eine weitere Stunde inkubiert. Proben wurden anschließend bei 95 °C für 10 Minuten hitzeinaktiviert. Als Negativkontrolle wurden 100 µg der Neuraminsäuren (Neu5Ac, Neu5,9Ac₂, Neu5,4Ac₂) für zwei Stunden bei 25 °C inkubiert.

4.2.17. Enzymatischer Verdau von RinderdrüSENSPEICHELMUZIN

Für HPTLC Analysen wurde RinderdrüSENSPEICHELMUZIN (BSM) in einer Konzentration von 1 mg/ml in 50 mM Tris-HCl pH 7.5 gelöst. Wurden BSM Proben für nanoESI MS Analysen eingesetzt, wurde das Muzin in einer Konzentration von 1 mg/ml in Ultra-Reinstwasser gelöst. Von Muzinlösungen wurden für enzymatische Verdaus 100 µg mit je 5 µg von NanS-His, NanS-p1-His, NanS-p2-His oder NanS-p4-His (Konzentrationen siehe 5.2.) für 2 Stunden bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurden erneut 5 µg Enzym hinzugefügt und die Inkubation für weitere 2 Stunden verlängert. Für enzymatische Verdaus mit BTSA-His wurden zu Beginn 0,96 µg BTSA-His hinzugefügt und 4 Stunden bei 25 °C (co-) inkubiert. Als Negativkontrolle diente BSM ohne Enzyme. Alle Reaktionen wurden anschließend bei 95 °C für 10 Minuten hitzeinaktiviert.

4.2.18. Probenvorbereitung für nanoESI MS Analysen

Enzymatisch degradierte Muzinproben mit NanS-His oder NanS-p-His, sowie unverdautes Muzin (no enzyme control), wurden mit je 12,5 % (v/v) Essigsäure für 2 Stunden bei 95 °C inkubiert, was zu einer vollständigen Fragmentierung von Zucker- und Aminosäurenketten führt (172). Nach Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur

wurden diese *in vacuo* getrocknet und anschließend in 40 % Methanol, welches 0,5 % Ameisensäure enthält, gelöst. BTSA-His behandelte Muzinproben wurden nach Verdau direkt im Volumen 1:1 mit Methanol versetzt. Proteine werden dadurch präzipitiert und durch BTSA-His hydrolysierte Neuraminsäuren befinden sich im Überstand. Proben wurden anschließend mittels nanoESI MS analysiert. Die Probenvorbereitung für nanoESI MS Analysen wurde von Dr. Gottfried Pohlentz der Universität Münster, Institut für medizinische Mikrobiologie- und Hygiene im Labor von Prof. Dr. Johannes Müthing durchgeführt (172).

4.2.19. Massenspektrometrische Analysen mittels nanoESI MS

Massenspektrometrische Analysen wurden mit einem SYNAPT G2-S Massenspektrometer durchgeführt. Dieses ist ausgestattet mit einer Z-Spray Ionenquelle im Positiv-Modus (hohe Sensitivität gegenüber positiv geladener Ionen).

Parameter	Einstellungen am SYNAPT G2-S
Temperatur der Proben	80 °C
Kapillarspannung	0.8 kV
Kegelspannung	20 V

Die massenspektrometrischen Analysen wurden von Dr. Gottfried Pohlentz der Universität Münster, Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene vorgenommen im Labor von Professor Dr. Johannes Müthing durchgeführt (172).

4.2.20. Kultivierung und Passagieren von HT-29 und LS 180 Zellen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Darmepithelzelllinien HT-29 (Passage 4 bis 19) und LS 180 (Passage 46 bis 51) wurden in Kulturflaschen in CO₂-Inkubatoren bei 5 % CO₂ und 37 °C inkubiert. Als Kultivierungsmedium wurde DMEM verwendet, welches 10% FCS und 100 µg/ml Streptomycin sowie 100 U/ml Penicillin enthielt (4.1.9.). Als Infektionsmedium wurde DMEM ohne Zusätze verwendet. Die Zelllinien wurden bis zu einer Konfluenz von circa 85 % inkubiert und anschließend passagiert. Hierfür wurde zunächst verbrauchtes Medium abgesaugt und die adhärennten Zellen

zweimal mit je 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde zum Ablösen der Zellen 1 ml 0,05 % Trypsin hinzu pipettiert und die Kulturflasche für 5 Minuten in den Inkubator gestellt. Das Trypsin spaltet extrazelluläre Proteine, wodurch die Zellen abrunden und sich von der Plastik lösen. Um die enzymatische Reaktion zu stoppen, wurden 9 ml Kultivierungsmedium hinzugegeben. Diese Zellsuspension wurde anschließend 1:4 verdünnt, in neue Zellkulturflaschen überführt und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Wurden Zellen für Assays (4.2.23; 4.2.25) verwendet, wurde zuerst 50 µl der nach Trypsinierung unverdünnten Zellsuspension entnommen und mit 50 µl 0,4 % Tryphanblau Lösung gefärbt. Mit Hilfe einer Neubauerkammer wurde die Zellzahl pro ml ermittelt und jeweils $4 \cdot 10^5$ Zellen pro Well in eine 24 Wellplatte pipettiert. Pro Well wurde je 1 ml Kultivierungsmedium vorgelegt. Sollten Zellen nach Infektion mikroskopisch analysiert werden, wurde zusätzlich pro Well ein Glasplättchen hinzugefügt, an das Zellen adhären können. Wells wurden bis zur Infektion bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

4.2.21. Auftauen von Kryokonserven von Zellkulturen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Darmepithelzelllinie LS 180 wurde als Kryokonserven (Passage 44) freundlicherweise von Prof. Dr. Frank, Fachgebiet für Biofunktionalität der Lebensmittel (140b), bereitgestellt.

Die in flüssigem N₂ gelagerten LS 180 und HT-29 Zellen in Kryoröhrchen wurden aus dem Gestell entnommen, für wenige Minuten auf Eis gegeben und anschließend bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension wurde entnommen und in 5 ml Kultivierungsmedium pipettiert. Um das in Kryokonserven enthaltene DMSO entfernen zu können, wurden zunächst die Zellen bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 400 g in der Multifuge 1S-R zentrifugiert, das Pellet in 3 ml 37 °C vorgewärmten Kultivierungsmedium resuspendiert und anschließend in eine Kulturflasche überführt, welcher zuvor 9 ml Kultivierungsmedium zugeführt wurde. Die Zellen wurden durch vorsichtiges Schwenken gleichmäßig verteilt und bis zum nächsten Passagieren bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

4.2.22. Herstellung von Kryokonserven von Zellkulturen

Um Kryokonserven zu erstellen, wurden HT-29 bzw. LS 180 Zellen zunächst kultiviert, bis der Boden der Zellkulturflasche zu ~ 85 % konfluent bewachsen war. Wie in 4.2.20. beschrieben, wurden die Zellen zunächst gewaschen, trypsinisiert und mittels einer Neubauerkammer die Zellzahl ermittelt. Für Kryokonserven wurde die Zellsuspension mit Kultivierungsmedium auf $2 \cdot 10^7$ Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurde zu dieser Suspension das gleiche Volumen an Medium + 20 % DMSO hinzugefügt. Daraus resultiert eine Zellkonzentration von $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml mit 10 % DMSO. In Kryoröhrchen wurden jeweils 2 ml der Suspension hinzugefügt, Röhrchen in einen mit Isopropanol befülltem Behälter überführt und dieser bei -70 °C über Nacht gelagert. Für die dauerhafte Lagerung wurden Kryoröhrchen anschließend in ein Gestell eines N₂-Tanks gegeben.

4.2.23. Adhärenzassay

4.2.23.1. Vorbereitung der Bakteriensuspension

Am Vortag der Infektion wurde von verwendeten Stämmen eine Übernachtskultur angesetzt (siehe 4.2.1.). Am Tag der Infektion wurden 100 µl der Übernachtskultur in frische 10 ml LB Medium gegeben. Diese Hauptkultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ = 0,2 inkubiert. Anschließend wurden 7 ml entnommen und bei 4 °C, 5000 rpm für 5 Minuten in der Multifuge 1S-R zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen, das Pellet in 5 ml 4 °C kaltem PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach erneuter Entnahme des Überstandes wurde das Pellet in 7 ml kaltem PBS resuspendiert und die OD₆₀₀ gemessen. Zum Berechnen der KbE/ml wurde folgende Formel verwendet:

$$OD_{600} = 1 = 8 \times 10^8 \text{ KbE/ml} \quad (2)$$

Bis zur Infektion wurden Bakteriensuspensionen bei 4 °C gelagert.

4.2.23.2. Vorbereitung der Zellkultur

Die am Vortag in einer 24 Wellplatte vorbereiteten HT-29 Zellen wurden zunächst zweimal mit je 1 ml PBS pro Well gewaschen. Anschließend wurde je 1 ml

Infektionsmedium (DMEM ohne Zusätze) hinzugegeben. Bis zur Infektion wurden die Zellen im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

4.2.23.3. Infektion der HT-29 Zellen

Nach Vorbereiten von Bakteriensuspensionen und Zellkultur wurden Zellen mit einer MOI 10 infiziert. Die MOI errechnet sich wie folgt:

$$MOI = \frac{V_B \times C_B}{V_C \times C_C} \quad (3)$$

MOI = Multiplizität der Infektion

V_B = Volumen der einzusetzenden Bakteriensuspension

C_B = Konzentration der Bakteriensuspension

V_C = Volumen der Zellkultur pro Well

C_C = Konzentration der Zellen pro Well

Nach Zugabe der Bakteriensuspension wurde diese mit einer Pipette vorsichtig resuspendiert, um eine gleichmäßige Verteilung der Bakterien gewährleisten zu können. Um die Infektion zu synchronisieren, wurde die Wellplatte für 5 Minuten bei 2000 rpm in der Plattenzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurde die Platte für 1 Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ im Zellkultur-Brutschrank inkubiert. Nach Abklingen der Infektionszeit wurden Wells zweimal mit je 1 ml 37 °C warmen PBS gewaschen, um nicht-adhärenente Bakterien zu entfernen. Zum Lysieren der Zellen wurde 1 ml Ultra-Reinstwasser zu Wells hinzu pipettiert und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Die Lysate wurden entnommen und Verdünnungsreihen mit 4 °C kaltem 0,9 % NaCl hergestellt und diese zweifach auf LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Anzahl an Kolonien wurde gezählt und die KbE/ml errechnet.

4.2.24. Deskriptive Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Programmes OriginPro (4.1.7.). Um das Signifikanzniveau verschiedener Datensätze zu ermitteln, wurde eine einfache ANOVA durchgeführt. Voraussetzung hierfür ist, dass die Daten normal verteilt und die Fehlervarianzen zwischen den Datensätzen homogen sind. Um die Normalverteilung zu überprüfen, wurde der Shapiro-Wilk Test durchgeführt. Hierfür wurden Daten der abhängigen Proben (alle technischen Replikate) verwendet. Wurde die Nullhypothese des Tests angenommen, liegt eine Normalverteilung der Werte vor. Anschließend wurde zur Überprüfung der Varianzhomogenität der Gruppen der Levene-Test durchgeführt. Wird die Nullhypothese angenommen, liegt eine Gleichheit der Varianzen vor und es darf eine einfache ANOVA zur Analyse des Signifikanzniveaus durchgeführt werden. Zur Durchführung wurden nur unabhängige Daten, also lediglich die Werte der biologischen Replikate verwendet. Als Eingabedaten wurde „roh“ angegeben, als Mittelwertvergleich wurde der Test „Bonferroni“ ausgewählt und das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 0,05$ festgelegt. Unterscheiden sich Datensätze statistisch signifikant, also $p < 0,05$, wurde dies mit einem Sternchen (*) in Ergebnissen markiert.

War die Normalverteilung der abhängigen Proben nicht gegeben, wurde anstelle der einfachen ANOVA ein nicht-parametrischer Test durchgeführt. Mittels der Friedman-ANOVA konnte dann das Signifikanzniveau zweier Gruppen verglichen werden. Auch hier wurde das Signifikanzniveau auf $\alpha = 0,05$ festgelegt und in Ergebnissen mit einem Sternchen (*) markiert.

4.2.25. Analyse von Muzinabbau im Zellkulturversuch

Für die Analyse des Muzinabbaus durch EHEC wurden ausgesäte LS 180 Zellen in der 24 Wellplatte bis zur Konfluenz von circa 95 % bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert (4.2.20). Die Konfluenz wurde optisch unter dem Mikroskop PrimoVert bestimmt. Alle zwei Tage wurde verbrauchtes Medium abgenommen und erneuert. Die Vorbereitung der Zellen, Bakteriensuspensionen sowie die Infektion der Zellen erfolgte exakt wie in 4.2.23. beschrieben. Im 24 Well Maßstab wurden Pro Well $8 \cdot 10^6$ Bakterien eingesetzt und die Infektionsdauer betrug 4 Stunden. Anschließend

wurden Zellen zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen. Um Muzin anschließend analysieren zu können, wurde eine PAS-Färbung (4.2.26.) durchgeführt.

4.2.26. Unspezifische Färbung von Glykoproteinen mittels PAS-Färbung

Um Muzin von Zellen nach Infektion detektieren zu können, wurde eine PAS-Färbung (4.1.8.) durchgeführt. Dadurch werden unspezifisch sämtliche Glykoproteine wie Muzin gefärbt. Die einzelnen Schritte des Herstellerprotokolls wurden im unsterilen Bereich und bei Raumtemperatur durchgeführt. Zu Beginn der Färbung wurde zunächst pro Well 1 ml Reinstwasser hinzugegeben, um die Zellen zu spülen. Anschließend wurden durch Zugabe von je 250 µl Periodsäure-Lösung (4.1.8.) im Muzin unsubstituierte Glykolgruppen zu Aldehydgruppen oxidiert. Die Lösung wurde nach 5-minütiger Inkubation abgenommen und Zellen mit je 1 ml Leitungswasser, anschließend mit je 1 ml Reinstwasser gewaschen. Pro Well wurden dann je 250 µl Schiff's Reagenz (4.1.8.) hinzupipettiert und diese für 15 Minuten inkubiert. Bei dem Reagenz handelt es sich um eine fuchsinschwefelige Säure, die an die zuvor oxidierten Aldehydgruppen bindet, wodurch eine chromogene Eigenschaft entsteht, die durch die Magentafärbung sichtbar wird. Um überschüssige Säure zu entfernen, wurde dreimal mit je 1 ml Leitungswasser, anschließend mit 1 ml Reinstwasser gewaschen. Um die Zellkerne zu färben, wurde dann pro Well 250 µl Hämalaun-Lösung nach Mayer (4.1.8.) zugefügt und für 2 Minuten inkubiert. Diese Lösung enthält Hämatoxylin, welches an Nukleinsäuren bindet und im neutralen Bereich des pH-Wertes für eine blau-violette Färbung sorgt. Im sauren Bereich erscheinen diese rötlich bzw. braun. Um die PAS-Färbung mikroskopisch analysieren zu können, wurden die Glasplättchen im Well, worauf sich die gefärbten adhären Zellen befanden, herausgenommen und zwischen einem Objektträger und Deckgläschen mit Nagellack fixiert. Zwischen Zellen und Deckgläschen wurde ein Tropfen Immersionsöl verteilt.

4.2.27. Mikroskopie gefärbter LS 180 Zellen

Um PAS-gefärbte Zellen mikroskopisch analysieren zu können, wurde das verwendete Mikroskop Axiovert 200 vorab nach geköhlet, um eine optimale Beleuchtung zu erreichen. Anschließend wurde die Axio Cam ICc1-Farbkamera am

Mikroskop angeschlossen und über die Software AxioVision angewählt. Auf den zuvor hergestellten PAS-Präparaten wurde auf das Deckgläschen ein Tropfen Immersionsöl gegeben und der Objektträger in die Vorrichtung des Mikroskops gelegt. Mittels der Software des Mikroskops wurde das 100x Objektiv angewählt und der Live-Modus gestartet. Mittels der Werkzeugleiste des Programmes konnte die Beleuchtung reguliert werden, um eine Überbelichtung der Präparate zu vermeiden. Von allen Präparaten wurden mit einer 1000fachen Vergrößerung mehrere Bilder aufgenommen und abgespeichert.

4.2.28. Motilitätsassay nach Bufe et al. (173)

Um die Motilität der Bakterien in Abhängigkeit von *nanS*-p Genen analysieren zu können, wurde das Schwimmverhalten verschiedener Stämme untersucht. Hierfür wurden Übernachtskulturen der Stämme EDL933, EDL933 Δ *nanS* Δ *nanS*-p1-p5, EDL933 Δ *nanS* Δ *nanS*-p1-p7, C227-11 ϕ cu, C227-11 ϕ cu Δ *nanS*-p11-p12 und C227-11 ϕ cu Δ *nanS*-p11-p14 in je 10 ml LB angesetzt und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert (4.2.1.). Von Kulturen wurden 100 μ l entnommen und in jeweils frische 10 ml LB gegeben. Diese Hauptkulturen wurden für 6 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die OD₆₀₀ gemessen und pro Stamm in Doppelbestimmung $1 \cdot 10^7$ Bakterien in die Mitte von 0,3 % LB Bacto-Agarplatten (+ 60 bzw. 80 mM Natrium-Acetat) pipettiert. Nach Inkubation bei 30 °C für 21 Stunden wurden die Durchmesser der Schwimmhöfe gemessen.

5. Ergebnisse

Bisher wurden NanS-p aus EHEC Stämmen O157:H7 EDL933 und O104:H4 C227-11Φcu als 9-O-Acetylerasen charakterisiert, welche als Enzyme Teil des Neuramsäurestoffwechsels sind. Die durchgeführten Methoden und erzielten Ergebnisse sollten Aufschluss über die Spezifität der NanS-p aus EDL933, bezogen auf die Lokalisierung der O-Acetylgruppe am Grundgerüst der Neuraminsäuren, geben. Hierfür wurden nach Inkubation von Neuraminsäuren mit aufgereinigten NanS-p-His HPTLC und nanoESI MS Analysen durchgeführt. Zudem sollten weitere Funktionen der NanS-p aus EDL933 und C227-11Φcu, welche die Infektion von EHEC beeinflussen, analysiert werden. Hierfür wurden Zellkulturversuche durchgeführt, um die Adhärenzeigenschaften sowie den Abbau von Muzin in Abhängigkeit der NanS-p untersuchen zu können. Um Deletionen von *nanS-p* Genen komplementieren zu können, wurden NanS-p1-His und NanS-p15-His überexprimiert und aufgereinigt. Zur Expression von NanS-p15-His wurde das Gen *nanS-p15* zuerst in einen geeigneten Vektor kloniert. Zusätzlich wurde durch Motilitätsassays der Einfluss der Prophagen-kodierten O-Acetylerasen auf das Schwimmverhalten von EDL933 und C227-11Φcu analysiert. Die Ergebnisse sind in folgendem Kapitel dargelegt.

5.1. Herstellung eines Vektors zur Expression von NanS-p15-His

Zur Erstellung des Konstruktes pET22b(+)/*nanS-p15* wurde ein In-Fusion Kit (4.2.5.) verwendet. Hierfür wurde vorerst das Plasmid pET22b(+) mit Restriktionsenzymen XhoI und NdeI restringiert (4.2.2.). Damit *nanS-p15* erfolgreich in das Plasmid kloniert werden konnte, benötigte das Insert sowohl am 3' als auch am 5' Ende circa 15 bp zum Plasmid komplementäre Enden. Die konstruierten Oligonukleotide fwd-nanSp15-SF und rev-nanSp15-SF wiesen sowohl circa 15 bp homolog zu *nanS-p15*

und 15 bp homolog zur multiplen Klonierungsstelle des linearisierten Plasmids pET22b(+) auf (4.1.3.). Nach Amplifikation von *nanS*-p15 aus der „Koch-DNA“ (4.2.3.) von *E. coli* C600/Φ226692 mittels der Phusion Polymerase und anschließender Aufreinigung des Inserts (siehe 4.2.3. und 4.2.4.) wurden hiervon 50 ng und 75 ng linearisiertes Plasmid für die In-Fusion eingesetzt (4.2.5.). Der verwendete Enzym-Mix von Clontech enthielt eine DNA Polymerase mit einer 3´- 5´ Exonukleaseaktivität, die die Basen sowohl bei Insert, als auch linearisiertem Plasmid in 3´- 5´ Richtung entfernte. Die durch die Oligonukleotide entstandenen komplementären Enden wurden durch die im Enzym-Mix enthaltene Ligase ligiert und das fertige Konstrukt pET22b(+)/*nanS*-p15 konnte in *E. coli* Stellar Zellen transformiert werden. Nach Kultivierung wurde das Plasmid isoliert und in *E. coli* BL21(DE3) Zellen transformiert (4.2.7.). Zur Überprüfung der Transformation wurde eine Kolonien-PCR unter der Verwendung der Taq Polymerase und Oligonukleotiden pET22-seq-for und pET22-seq-rev durchgeführt (4.2.3.).

Die Sequenz des Konstruktes wurde mittels DNA-Sequenzierung überprüft (10.1.). Abbildung 1A zeigt Zwischenschritte der Klonierung. In Spur 1 wurde der isolierte pET22b(+) Vektor aufgetragen. Die Größe des Vektors beträgt 5493 bp. Durch das Supercoiling separiert das Plasmid bei circa 3500 bp. Spur 2 zeigt die Kontrolle des Restriktionsverdau ohne Enzym und zeigt wie in Spur 1 ungeschnittenes Plasmid bei einem Molekulargewicht von circa 3500 bp. Spur 3 zeigt den mit NdeI und XhoI restringierten Vektor. Das linearisierte Plasmid ohne *peIB* Sequenz weist eine Größe von 5366 bp auf. Das Insert für die In-Fusion Klonierung (*nanS*-p15 inklusive 15 bp Überhang) wurde in Spur 4 aufgetragen. Dieses weist 1966 bp auf und separiert auf Höhe des 2000 bp Standards. Als Positivkontrolle der PCR wurde das Plasmid pET22b(+)/*nanS*-p1 sowie die Primer 887 und 888 verwendet, welche die multiple Klonierungsstelle flankieren und dadurch eine Amplifikation des gesamten Inserts gewährleisten. Das erhaltene PCR-Produkt ist 2135 bp groß und separiert zwischen der 2000 bp und 2500 bp Bande des Standards (Spur 5). Als Negativkontrolle der PCR fungierte eine No-Template Kontrolle, welche zeigt, ob eine Kontamination mit DNA vorliegt. Anstatt des Templates wurde dem Ansatz Ultra-Reinstwasser hinzugefügt. Diese Kontrolle wurde in Spur 6 aufgetragen und weist kein Amplifikat auf. Abbildung 1B zeigt die Kolonien-PCR nach Transformation in *E. coli* BL21(DE3). Hierfür wurden die Primer 887 und 888 verwendet. In Spur 1 ist die Positivkontrolle

pET22b(+)/*nanS*-p1 mit 2135 bp aufgetragen. In Spur 2 wurde die No-Template-Kontrolle aufgetragen, welche kein Amplifikat aufweist. Spur 3 zeigt das PCR-Produkt des klonierten Konstruktes pET22b(+)/*nanS*-p15 mit den Primern 887 und 888. Das Amplifikat weist ein Molekulargewicht von 2131 bp auf. Abbildung 1C zeigt eine Plasmidkarte des rekombinanten pET22b(+)/*nanS*-p15, die in silico erzeugt wurde. Der Vektor enthält neben *nanS*-p15 in der MCS auch die T7 Promoter- sowie Terminatorsequenz. Die *lacI* Sequenz kodiert für den LacI-Repressor, der bis zur Zugabe von IPTG die Expression des Gens inhibiert. Das Plasmid enthält zusätzlich als Selektionsmarker das *bla*-Gen, dass dem Bakterium eine Ampicillin-Resistenz vermittelt. Der Stamm *E. coli* BL21(DE3) pET22b(+)/*nanS*-p15 wurde anschließend zur Expression und Aufreinigung von NanS-p15-His verwendet (4.2.9 - 4.2.12.)

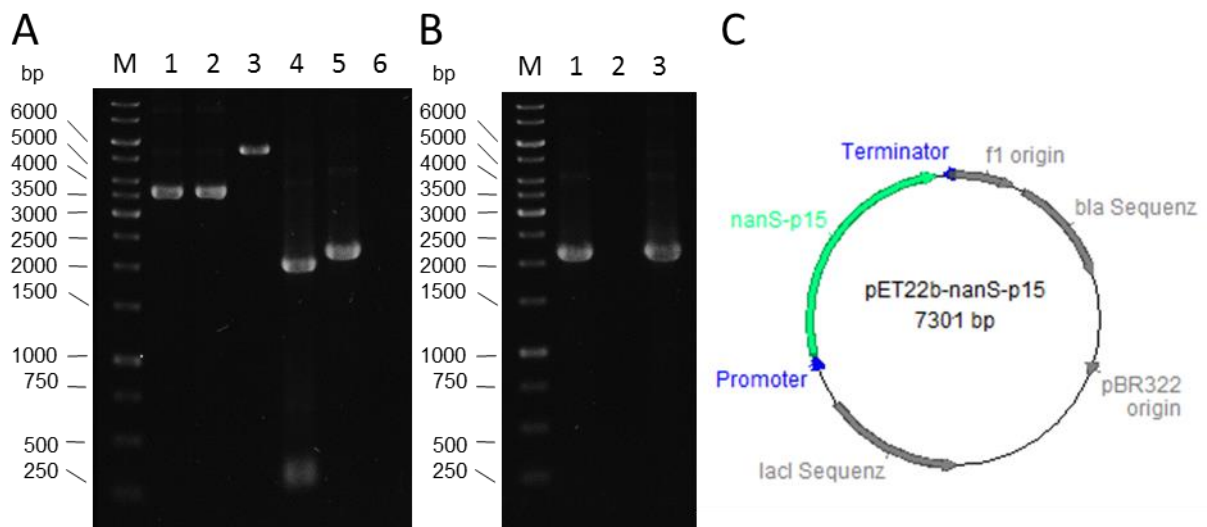


Abbildung 1A. Ergebnisse der Klonierungsschritte aufgetragen auf ein 1,5 % Agarosegel. Spur 1 zeigt den isolierten pET22b(+) bei circa 3500 bp. Spur 2 zeigt die Negativkontrolle des Restriktionsverdaus ohne Enzyme. Der Vektor wurde nicht geschnitten und separiert als supercoiled Plasmid bei circa 3500 bp. Spur 3 zeigt den restringierten und linearisierten Vektor auf Höhe des 5000 bp Standards. Spur 4 zeigt die PCR des zu klonierenden Inserts *nanS*-p15 bei circa 2000 bp. Als Positivkontrolle der PCR wurde aus pET22b(+)/*nanS*-p1 mittels der Oligonukleotide 887 und 888 *nanS*-p1 amplifiziert und aufgetragen. Die Bandenhöhe der Positivkontrolle in Spur 5 beträgt circa 2200 bp. Spur 6 zeigt die No-Template-Kontrolle der PCR. **Abbildung 1B.** Ergebnis der Colony-PCR von BL21(DE3)pET22b(+)/*nanS*-p15 aufgetragen auf ein 1,5 % Agarosegel. Das Amplifikat separiert bei circa 2200 bp (Spur 1). In Spur 2 wurde die Negativkontrolle ohne Template aufgetragen. Als Positivkontrolle wurde BL21(DE3)pET22b(+)/*nanS*-p1 verwendet. Das entstandene Fragment separiert ebenfalls bei circa 2200 bp in Spur 3. **Abbildung 1C.** Plasmidkarte des pET22b(+)/*nanS*-p15. Enthält in der MCS *nanS*-p15 sowie die Sequenz für den His-tag. Flankierend befinden sich T7 Promoter und Terminator. Zusätzlich enthält das Plasmid die Sequenz für den *lacI* Repressor sowie als Selektionsmarker eine Ampicillin Resistenzkassette.

5.2. Expression rekombinanter 9-O-Acetylerasen und Konzentrationsbestimmung

Um rekombinantes NanS-His und NanS-p1-His, NanS-p2-His, NanS-p4-His und NanS-p15-His in folgenden Assays einsetzen zu können, wurden diese zunächst im Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) durch IPTG Induktion überexprimiert (siehe 4.2.9.) und anschließend durch den gekoppelten His-Tag über eine Ni²⁺-NTA Säule aufgereinigt (4.2.10.). Eluate der Aufreinigungen wurden mittels SDS-PAGE (4.2.11.) überprüft. Hierfür wurden zwei 12 % SDS-Gele verwendet, welche identisch beladen wurden. Zur Visualisierung Sequenz-unspezifischer Proteine wurde eines der Gele mittels Coomassie gefärbt. Nach Entfärbung des überschüssigen Farbstoffs wurde das Gel eingescannt und ist in Abbildung 2A dargestellt. Die Auftragung der aufgereinigten Proteine erfolgte der Reihe nach von NanS-His (Spur 1), NanS-p1-His (erste Aufreinigung in Spur 2, zweite Aufreinigung in Spur 3), NanS-p2-His (Spur 4), NanS-p4-His (Spur 5) und NanS-p15-His in Spur 6. NanS-His mit einer Größe von 37,72 kDa separiert bei ~ 35 kDa, NanS-p1-His (69,46 kDa), NanS-p2-His (69,62 kDa), NanS-p4-His (66,44 kDa) und NanS-p15-His (69,75 kDa) weisen eine Bande bei ~ 70 kDa auf. Zusätzlich wird im Eluat der NanS-p15-His Aufreinigung eine Bande bei ~ 80 kDa sichtbar. Zur spezifischen Proteindetektion wurde das zweite SDS-Gel für einen Westernblot verwendet (4.2.12.). Die separierten Proteine im Gel wurden auf eine PVDF-Membran transferiert und diese anschließend dem 6x-His Tag monoklonalen Antikörper (HIS.H8) inkubiert. Anschließend wurde der Sekundär-Antikörper Goat-anti-mouse IgG (H+L) hinzugegeben, der an den ersten Antikörper spezifisch bindet. Dieser kann mit der Reagenz Luminol reagieren, wodurch eine Chemolumineszenz-Reaktion stattfindet. Dadurch werden spezifisch-gebundene Proteine sichtbar. Abbildung 2B zeigt die Aufnahme des Westernblots und die Detektion der His-markierten 9-O-Acetylerasen NanS-His, NanS-p1-His der ersten und zweiten Aufreinigung, NanS-p2-His, NanS-p4-His und NanS-p15-His (Spuren 1 – 6). Die Eluat der Aufreinigung von NanS-p15-His zeigt sowohl durch Coomassie-Färbung, als auch durch spezifische Detektion mittels Antikörper eine Doppelbande, wobei die niedrigere Bande bei ~ 70 kDa der Literatur entspricht (69,75 kDa). Um die aufgereinigten Proteine in Assays verwenden zu können, musste vorab deren Konzentration bestimmt werden.

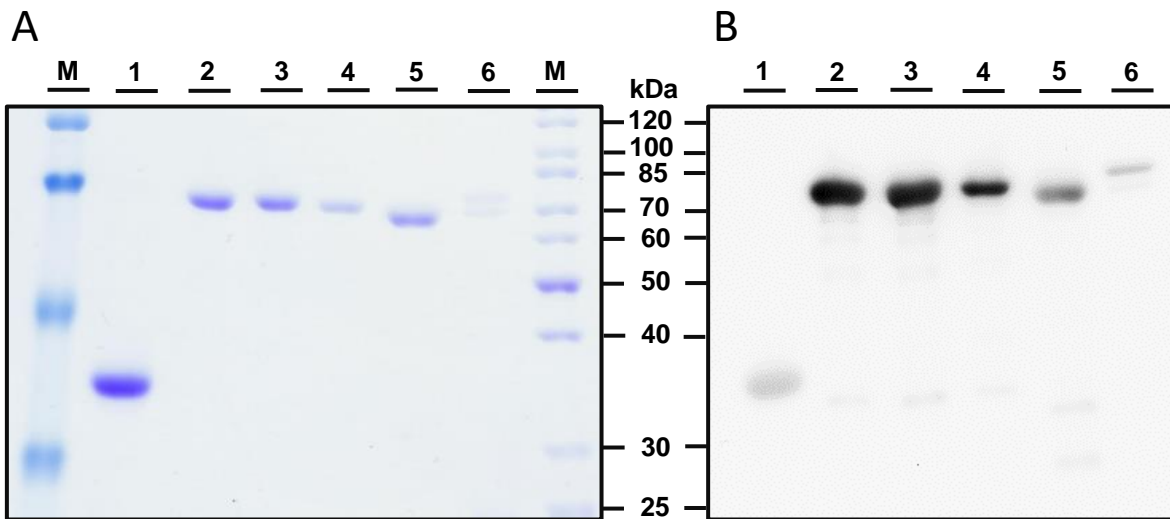


Abbildung 2A. Auftragung aller aufgereinigten 9-O-Acetylerasen aus EHEC und elektrophoretischer Auftrennung mittels SDS-PAGE. Spur 1 bis Spur 6 zeigen der Reihenfolge nach NanS-His, NanS-p1-His der ersten Aufreinigung, NanS-p1-His aus zweiter Aufreinigung, NanS-p2-His, NanS-p4-His und NanS-p15-His. NanS-His separiert bei 35 kDa, NanS-p Proteine separieren auf Höhe von circa 70 kDa. NanS-p15 zeigt eine zusätzliche Bande bei circa 80 kDa. **Abbildung 2B.** Überprüfung der aufgereinigten 9-O-Acetylerasen mittels Westernblot nach erfolgter SDS-PAGE. Durch einen spezifischen His-Antikörper sowie einem spezifischen Zweit-Antikörper werden His-getaggte Proteine detektiert. Die Auftragung erfolgte gleich der Abbildung 2A und zeigt das gleiche Bandenmuster.

Zur Bestimmung der Konzentrationen der in Puffer gelösten Proteine, wurde ein Bradford Assay (4.2.13.) durchgeführt. Hierfür wurden zur Generierung der Eichgeraden verschiedene BSA-Konzentrationen von 0 – 100 µg/ml im Assay eingesetzt. Von aufgereinigten 9-O-Acetylerasen wurden Verdünnungsreihen erstellt. Mittels den am Tecan Reader gemessenen Werten konnte zuerst die Eichgerade erstellt und anschließend die Konzentrationen der Enzyme berechnet werden, welche in Tabelle 14 aufgelistet sind.

Tabelle 14: Konzentrationen aufgereinigter 9-O-Acetylerasen

Enzym	Konzentration in mg/ml
NanS-His	0,50 mg/ml
NanS-p1-His	Erste Aufreinigung: 1,59 mg/ml Zweite Aufreinigung: 1,40 mg/ml
NanS-p2-His	0,68 mg/ml
NanS-p4-His	0,79 mg/ml
NanS-p15-His	0,15 mg/ml

5.3. Analyse der de-O-Acetylierung von Neuraminsäuren durch 9-O-Acetylerasen mittels HPTLC

Die von Simone Nübling und Nadja Saile im Rahmen ihrer Master- und Promotionsarbeiten durchgeführten Arbeiten zur 9-O-Acetylerase NanS-p1 des *E. coli* O157:H7 Stammes EDL933 belegten bereits eine Esteraseaktivität durch die Hydrolyse der O-Acetylgruppe am C-9 von Neu5,9Ac₂ (148, 157). Um die Spezifität weiterer 9-O-Acetylerasen aus EHEC in Neuraminsäuren analysieren zu können, wurden neben NanS-p1 auch NanS, NanS-p2 und NanS-p4 von *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 in enzymatischen Ansätzen verwendet. Zunächst wurde die Aktivität in Neu5,9Ac₂ und Neu5,4Ac₂ (4.2.16.) mittels HPTLC untersucht. Nach zweistündiger Inkubation beider Neuraminsäuren mit rekombinant exprimiertem NanS-His bzw. NanS-p-His wurden die Reaktionsansätze mittels HPTLC (4.2.15.) analysiert. Durch die O-Acetylgruppe der Neu5,9Ac₂ bzw. Neu5,4Ac₂ und somit polareren Substanz im Vergleich zu Neu5Ac, separieren diese näher in Richtung Lauffront. Die Bandenhöhe der Proben wurde mit den Standards Neu5Ac und Neu5,9Ac₂ bzw. Neu5,4Ac₂ verglichen und mittels des Programmes WinCats ausgewertet. Die durch WinCats ermittelten hRf-Werte ergeben sich aus der Distanz der separierten Substanz zum Auftragungspunkt des Analyten. Die vorliegenden Ergebnisse wurden bereits in

Feuerbaum et al., 2018 publiziert (172). Die hRf-Werte der Standards und zu analysierenden Proben sind in der Tabelle 15 und Tabelle 16 dargestellt. Abbildung 3A zeigt das Chromatogramm nach Entwicklung und Derivatisierung (4.2.15) der HPTLC Platte der Neu5,9Ac₂ Hydrolyse. Abbildung 3B zeigt das Ergebnis des enzymatischen Ansatzes für Neu5,4Ac₂. Neu5Ac weist einen hRf-Wert von 0,25 auf (Tabelle 15; Abbildung 3A/3B, Probennr.: 1/8). Die Referenz Neu5,9Ac₂ (Tabelle 15; Abbildung 3A, Probennr.: 2/9) zeigt nach Derivatisierung zwei Banden mit hRf-Werten von 0,25 und 0,34. Laut Hersteller enthält chemisch synthetisiertes Neu5,9Ac₂ als Nebenprodukt Neu5Ac, was der unteren Bande mit dem Wert von 0,25 entspricht. Die Referenz Neu5,4Ac₂ zeigt eine Bande mit einem hRf-Wert von 0,33 (Tabelle 16; Abbildung 3B, Probennr.: 2/9). In Abbildung 3A wird deutlich, dass Neu5,9Ac₂ nach Inkubation mit Esterasen auf Höhe des Standards Neu5Ac separiert. Somit kam es zu einer Abspaltung der O-Acetylgruppe, wodurch die unpolare Grundstruktur Neu5Ac entsteht. Sowohl die Referenz Neu5Ac als auch die enzymatischen Ansätze weisen eine Bandenhöhe mit einem hRf-Wert von 0,25 auf (Tabelle 15). Der Kontrollverdau ohne Enzym zeigt deutlich Banden mit den hRf-Werten von 0,25 und 0,34. Dabei handelt es sich um Neu5Ac und Neu5,9Ac₂. Dieser Versuch zeigt, dass die rekombinant exprimierten und aufgereinigten 9-O-Acetylerasen aus EHEC aktiv in ihrer Funktion sind und die O-Acetylgruppe am C-9 abspalten können (172).

Abbildung 3B zeigt den enzymatischen Ansatz von Neu5,4Ac₂ mit NanS-His (Spur 4) bzw. NanS-p1-His bis NanS-p4-His (Spur 5 bis 7). In Spur 3 wurde der Kontrollverdau ohne Enzym aufgetragen. Alle Ansätze weisen einen hRf-Wert von 0,32 auf (Tabelle 16), was verdeutlicht, dass die getesteten 9-O-Acetylerasen aus EHEC nicht in der Lage sind, die O-Acetylgruppe am C4 abzuspalten (172).

Tabelle 15: Ermittelte hRf-Werte von Standard Neu5,9Ac₂, Neu5Ac und der enzymatischen Ansätze von Neu5,9Ac₂ mit 9-O-Acetylerasen

Probennummer	Aufgetragene Probe	hRf-Wert
1/8	Standard Neu5Ac	0,25
2/9	Standard Neu5,9Ac ₂	0,25/ 0,34
3	Kontrollverdau ohne Enzym	0,25/ 0,34
4	Neu5,9Ac ₂ + NanS-His	0,25
5	Neu5,9Ac ₂ + NanS-p1-His	0,25
6	Neu5,9Ac ₂ + NanS-p2-His	0,25
7	Neu5,9Ac ₂ + NanS-p4-His	0,25

Tabelle 16: Ermittelte hRf-Werte von Standard Neu5,4Ac₂, Neu5Ac und nach Inkubation von Neu5,4Ac₂ mit 9-O-Acetylerasen

Probennummer	Aufgetragene Probe	hRf-Wert
1/8	Standard Neu5Ac	0,25
2/9	Standard Neu5,4Ac ₂	0,33
3	Kontrollverdau ohne Enzym	0,32
4	Neu5,4Ac ₂ + NanS-His	0,32
5	Neu5,4Ac ₂ + NanS-p1-His	0,32
6	Neu5,4Ac ₂ + NanS-p2-His	0,32
7	Neu5,4Ac ₂ + NanS-p4-His	0,32

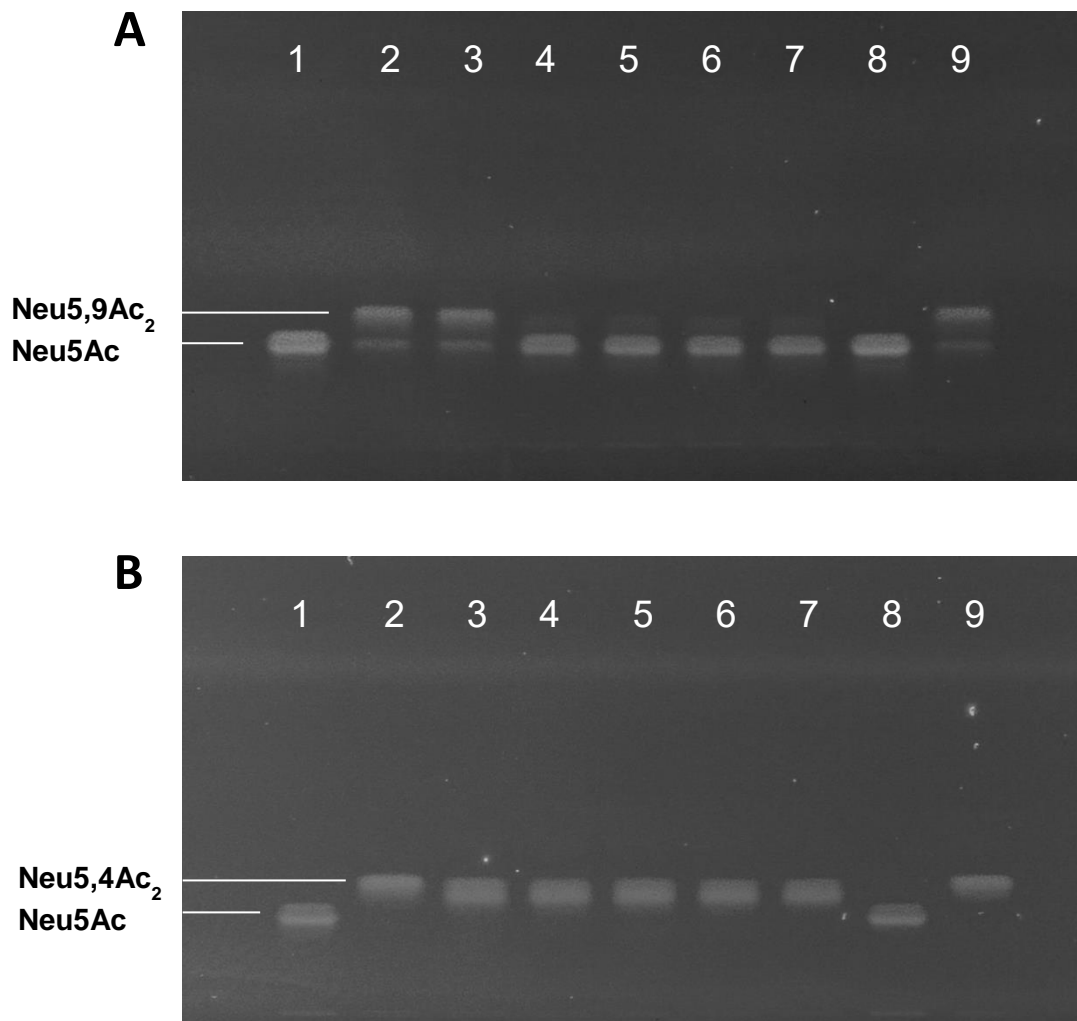


Abbildung 3. HPTLC Auftrennung von der Inkubation mono-O-acetylierter Neu5,9Ac₂ (**A**) sowie Neu5,4Ac₂ (**B**) durch NanS-p 9-O-Acetylerasen. Jeweils 3 µg Neu5Ac (Abb. 3A, 3B; Spur 1,8), Neu5,9Ac₂ (Abb. 3A, Spur 2,9) und Neu5,4Ac₂ (Abb. 3B, Spur 2,9) wurden als Referenzen auf HPTLC Platten appliziert. Zusätzlich wurden als Negativkontrolle der enzymatischen Reaktionen je 3 µg Neu5,9Ac₂ (Abb. 3A, Spur 3) und 3 µg Neu5,4Ac₂ (Abb. 3B, Spur 3) im Reaktionspuffer ohne Enzyme aufgetragen. Nach enzymatischem Verdau von Neu5,9Ac₂ mit NanS-His (Abb. 3A, Spur 4), NanS-p1-His (Abb. 3A, Spur 5), NanS-p2-His (Abb. 3A, Spur 6) und NanS-p4-His (Abb. 3A, Spur 7) zeigen aufgetragene Proben eine Migration der Banden auf Höhe von Neu5Ac. Nach enzymatischem Verdau von Neu5,4Ac₂ mit NanS-His (Abb. 3B, Spur 4), NanS-p1-His (Abb. 3B, Spur 5), NanS-p2-His (Abb. 3B, Spur 6) und NanS-p-4-His (Abb. 3B, Spur 7) zeigen aufgetragene Proben eine Migration der Banden auf Höhe von Neu5,4Ac₂. Quelle: bearbeitet nach Feuerbaum et al., 2018 (172)

5.4. Analyse der Enzymaktivität von 9-O-Acetylerasen in RinderdrüsenSpeichelmuzin mittels nanoESI MS

In humanem Muzin des Dickdarms gehören Neu5Ac und Neu5,9Ac₂ zu den häufigsten Neuraminsäuren. In geringen Mengen kommen auch Neu5,8Ac₂, Neu5,7Ac₂, zweifach O-acetylierte Neu5,8,9Ac₃ und Neu5,7,9Ac₃ vor (142). Die Detektionsgrenze der HPTLC liegt laut Gerätehersteller bei circa 10 ng. Um die Aktivität und Spezifität der 9-O-Acetylerasen aus EHEC in weiteren Neuraminsäure-Derivaten genauer untersuchen zu können, wurde die Methode nanoESI MS angewandt. Als Muzin-Quelle wurde wie auch für HPTLC-Analysen RinderdrüsenSpeichelmuzin verwendet. Dieses laut Hersteller stark O-glykosylierte Muzin weist neben Neu5Ac Varianten auch Neu5Gc Varianten auf (Merck, Darmstadt). Saile et al., 2016 demonstrierten bereits eine Aktivität von NanS-p in BSM durch die Entstehung von Essigsäure, welche durch die de-O-Acetylierung von Neuraminsäuren entsteht (148).

Um vorerst einen Überblick aller vorhandenen Neuraminsäuren zu erhalten, wurde BSM mittels Essigsäure fragmentiert und mit nanoESI MS analysiert (4.2.17. – 4.2.19.). Das Massenspektrum zeigt neben Neu5Ac auch bis zu dreifach O-acetylierte Derivate (Abb. 4A). Zusätzlich weist das verwendete Muzin die glykosylierte Neuraminsäure Neu5Gc auf. Diese wurde ebenfalls bis zu dreifach O-acetyliert detektiert. Die durch die chemische Degradierung freigesetzten Neuraminsäuren und durch nanoESI MS detektierten *m/z* Werte sind in Tabelle 17A aufgelistet. Durch die milde Säure-Behandlung wird das Muzin zwar degradiert, allerdings bleiben vorhandene O-Acetylgruppen an Neuraminsäuren erhalten (172).

Um analysieren zu können, inwiefern NanS-His bzw. NanS-p-His in der Lage sind auch die in BSM detektierten zweifach und dreifach O-acetylierten Neuraminsäuren zu de-O-acetylieren, wurde das BSM mit jeweils einem der Enzyme NanS-His, NanS-p1-His, NanS-p2-His und NanS-p4-His inkubiert und ebenfalls anschließend chemisch degradiert (4.2.17. – 4.2.19.). Die durch die nanoESI MS Analyse erhaltenen Massenspektren von NanS-His bzw. NanS-p1-His Behandlung sind in Abb. 4B und 4C. Die identifizierten Ionen der detektierten Neuraminsäuren und deren *m/z* Werte sind in Tabelle 17B und 17C aufgelistet. Die Ergebnisse wurden bereits in Feuerbaum et al., 2018 publiziert (172).

Die Spektren von degradiertem BSM nach Inkubation mit den 9-O-Acetylerasen zeigen überwiegend Ionen von Neu5Ac sowie Neu5Gc. Schwache Signale von

mono-*O*-acetylierten Neuraminsäuren Neu5Ac(OAc) und Neu5Gc(OAc), sowie von di-*O*-acetylierter Neuraminsäure Neu5Ac(OAc)₂ wurden ebenfalls detektiert. Nach Inkubation mit NanS-His bzw NanS-p-His konnten die Ionen von Neu5Ac(OAc)₃ bzw. Neu5Gc(OAc)₃ nicht mehr detektiert werden. Im Spektrum des unbehandelten BSMs befinden sich diese bei *m/z* 458,13 und 474,13.

Gleiche Ergebnisse lieferten die Analysen von NanS-p2-His bzw NanS-p4-His behandeltem Muzin (Spektren der NanS-p2-His und NanS-p4-His Analyse befinden sich im Anhang unter 10.2.). Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die 9-*O*-Acetylerasen aus EHEC nicht nur mono-*O*-acetylierte Neu5,9Ac₂ de-*O*-acetylieren können. Die Enzyme hydrolysieren sowohl von di-*O*-acetylierten, als auch von dreifach *O*-acetylierten Neuraminsäuren die Acetylgruppe. Zudem sind die Esterasen fähig, von bis zu dreifach *O*-acetylierten glykosylierten Neuraminsäuren Acetylgruppen abzuspalten. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass NanS und NanS-p auch Glykan-gebundene Neuraminsäuren de-*O*-acetylieren können und diese nicht frei vorliegen müssen (172).

Tabelle 17: Detektierte Ionen von Neuraminsäuren und korrespondierende *m/z* Werte nach chemischer Freisetzung aus Muzin, welches ohne Enzyme behandelt wurde (**A**); nach NanS-His Behandlung (**B**) bzw. Inkubation mit NanS-p1-His (**C**).

A

Nr.	Neuraminsäure	<i>m/z</i>	Nr.	Neuraminsäure	<i>m/z</i>
1	Neu5Ac ⁺ -H ₂ O	274.10	10	Neu5Gc(OAc) ⁺ -H+Na	372.09
2	Neu5Ac ⁺ -H+Na	314.09	11	Neu5Ac(OAc) [M+Na] ⁺	374.11
3	Neu5Ac(OAc) ⁺ -H ₂ O	316.11	12	Neu5Ac(OAc) ₂ ⁺	376.13
4	Neu5Gc ⁺ -H+Na	330.08	13	Neu5Gc(OAc) [M+Na] ⁺	390.10
5	Neu5Ac [M+Na] ⁺	332.10	14	Neu5Ac(OAc) ₂ ⁺ -H+Na	398.11
6	Neu5Ac(OAc) ⁺	334.12	15	Neu5Ac(OAc) ₂ [M+Na] ⁺	416.12
7	Neu5Gc [M+Na] ⁺	348.09	16	Neu5Ac(OAc) ₃ [M+Na] ⁺	458.13
8	Neu5Ac(OAc) ⁺ -H+Na	356.10	17	Neu5Gc(OAc) ₃ [M+Na] ⁺	474.13

9 Neu5Ac(OAc)₂⁺ -H₂O 358.11

B

Nr.	Neuraminsäure	m/z	Nr.	Neuraminsäure	m/z
1	Neu5Ac ⁺ -H ₂ O	274.10	9	Neu5Gc(OAc) ⁺ -H+Na	372.09
2	Neu5Ac ⁺ -H+Na	314.09	10	Neu5Ac(OAc) [M+Na] ⁺	374.11
3	Neu5Gc ⁺ -H+Na	330.08	11	Neu5Ac(OAc) ⁺ -2H+2Na	378.08
4	Neu5Ac [M+Na] ⁺	332.10	12	Neu5Gc(OAc) [M+Na] ⁺	390.10
5	Neu5Ac ⁺ -2H+2Na	336.07	13	Neu5Gc(OAc) ⁺ - 2H+2Na	394.07
6	Neu5Gc [M+Na] ⁺	348.09	14	Neu5Ac(OAc) ₂ ⁺ -H+Na	398.11
7	Neu5Gc ⁺ -2H+2Na	352.06	15	Neu5Gc(OAc) ₂ ⁺ -H+Na	414.09
8	Neu5Ac(OAc) ⁺ -H+Na	356.10	16	Neu5Ac(OAc) ₂ [M+Na] ⁺	416.12

C

Nr.	Neuraminsäure	m/z	Nr.	Neuraminsäure	m/z
1	Neu5Ac ⁺ -H ₂ O	274.10	7	Neu5Gc [M+Na] ⁺	348.09
2	Neu5Ac ⁺ -H+Na	314.09	8	Neu5Ac(OAc) ⁺ -H+Na	356.10
3	Neu5Ac(OAc) ⁺ - H ₂ O	316.11	9	Neu5Gc(OAc) ⁺ -H+Na	372.09
4	Neu5Gc ⁺ -H+Na	330.08	10	Neu5Ac(OAc) [M+Na] ⁺	374.11
5	Neu5Ac [M+Na] ⁺	332.10	11	Neu5Gc(OAc) [M+Na] ⁺	390.10
6	Neu5Ac(OAc) ⁺	334.12	12	Neu5Ac(OAc) ₂ ⁺ -H+Na	398.11

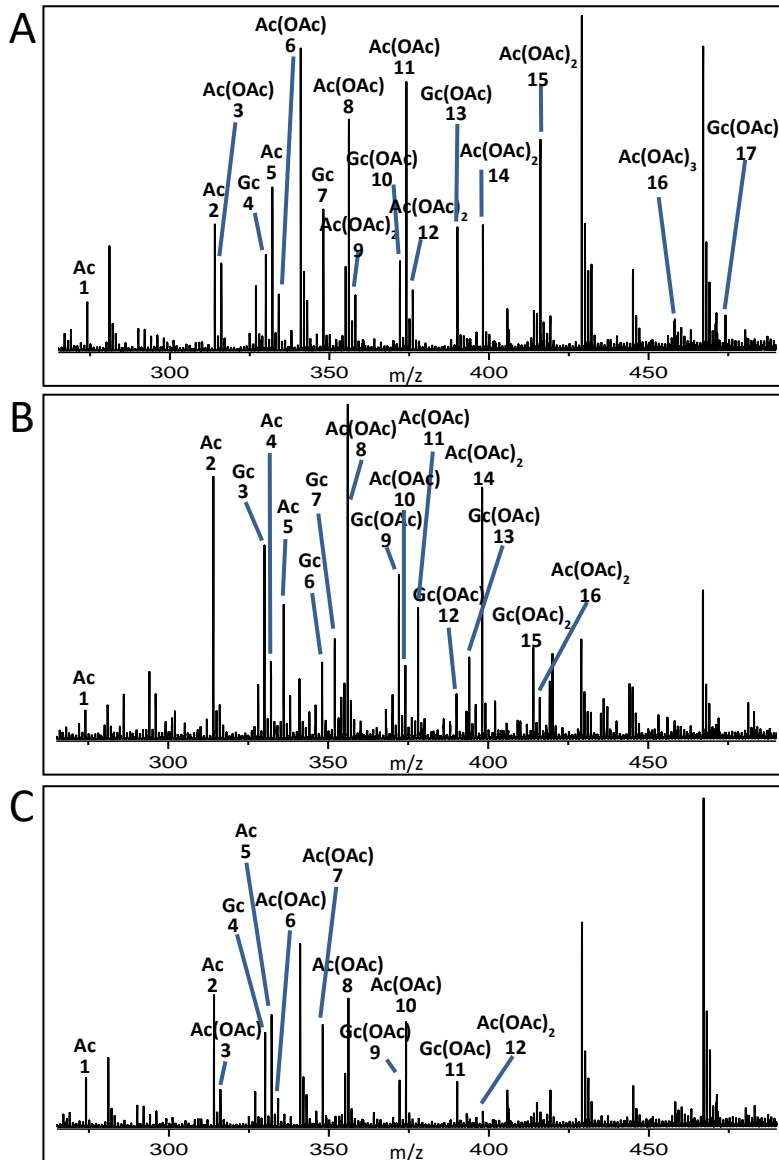


Abbildung 4. nanoESI Massenspektrum von chemisch freigesetzten Neuraminsäuren aus BSM **(A)**, nach Inkubation von BSM mit NanS-His **(B)** und NanS-p1-His **(C)**. **(A)** Übersicht des Massenspektrums von Neuraminsäuren aus BSM zeigen Präsenz von Neu5Ac, Neu5Gc, Neu5Ac(OAc), Neu5Gc(OAc), Neu5,9(OAc)₂, Neu5Ac(OAc)₃ und Neu5Gc(OAc)₃ in O-Glykanen. **(B)** Entsprechende Ionen von Neu5Ac, Neu5Gc, Neu5Ac(OAc), Neu5Gc(OAc), Neu5Ac(OAc)₂ und Neu5Gc(OAc)₂ wurden im Spektrum von NanS-His behandeltem BSM detektiert. **(C)** Das Spektrum von NanS-p1-His behandeltem BSM zeigt Ionen zugehörig zu Neu5Ac, Neu5Gc, Neu5Ac(OAc), Neu5Gc(OAc) and Neu5Ac(OAc)₂.

Ac, Neu5Ac; Ac(OAc), Neu5Ac(OAc); Ac(OAc)₂, Neu5Ac(OAc)₂; Ac(OAc)₃, Neu5Ac(OAc)₃. Gc, Neu5Gc; Gc(OAc), Neu5Gc(OAc); Gc(OAc)₂, Neu5Gc(OAc)₂; Gc(OAc)₃, Neu5Gc(OAc)₃.

Quelle: Feuerbaum et al., 2018 (172)

5.5. HPTLC und nanoESI MS Analysen von NanS-His bzw. NanS-p-His und Sialidase BTSA-His behandeltem Muzin

Die O-Acetylierung von Neuraminsäuren dient in Glykoproteinen als Schutz vor der enzymatischen Degradierung. Sialidasen werden in der Literatur als spezifisch für die Hydrolyse der de-O-acetylierten Grundstruktur Neu5Ac beschrieben (135, 136). Um die Zugänglichkeit von Muzin-gebundenen Neuraminsäuren als Substrat für Sialidasen wie BTSA von *B. thetaiotaomicron* VPI-5482 in Abhängigkeit der O-Acetylierung analysieren zu können, wurde BSM einerseits mit der rekombinant exprimierten BTSA-His inkubiert, sowie in Kombination von BSM mit BTSA-His und NanS-His bzw. NanS-p-His (4.2.17. – 4.2.19.). Nach 4-stündiger Inkubation der enzymatischen Ansätze wurden hydrolysierte Neuraminsäuren aus BSM mittels HPTLC analysiert (4.2.14; 4.2.15.). Das Ergebnis der Chromatographie in Abbildung 5 wurde bereits in Feuerbaum et al., 2018 veröffentlicht (172). Als Standards wurden Neu5Ac und Neu5,9Ac₂ verwendet. Aufgrund der höheren Polarität von Neu5,9Ac₂ im Vergleich zu Neu5Ac, separiert dieses näher in Richtung Lauffront. Dadurch kann eindeutig zwischen den Neuraminsäuren differenziert werden. In Abb. 5 Spur A wurde als Kontrolle unbehandeltes Muzin aufgetragen. Diese weist keine Banden auf Höhe der Standards auf. Somit befinden sich die Neuraminsäuren gebunden im Glykoprotein. Proteine in der Größenordnung von Muzin werden durch das Laufmittel nicht separiert. Die im Muzin gebundenen Zucker werden durch die Entwicklung der Kieselgelplatte unter UV-Licht sichtbar. Dadurch erscheint am Auftragungsort der Proben eine starke Bande. In Spur B wurde Muzin inkubiert mit BTSA-His aufgetragen. Hier wird deutlich, dass auf Höhe von sowohl Neu5Ac, als auch Neu5,9Ac₂ nach Entwicklung der Platte Banden sichtbar werden. Die rekombinant exprimierte Sialidase BTSA aus *B. thetaiotaomicron* kann somit nicht nur die Grundstruktur Neu5Ac, sondern auch die mono-O-acetylierte Variante Neu5,9Ac₂ abspalten. Im Vergleich dazu zeigen die Proben des kombinierten Verdauens von Muzin mit Sialidase und NanS-His (Spur C), bzw. NanS-p1-His (Spur D), NanS-p2-His (Spur E) und NanS-p4-His (Spur F) im Chromatogramm lediglich eine deutlich separierte Bande auf Höhe des Standards Neu5Ac (172).

Durch das Detektionslimit der HPTLC können aufgrund der geringen Konzentration in BSM keine weiteren Neuraminsäuren detektiert werden. Da die vorherigen massenspektrometrischen Analysen von BSM allerdings zeigten, dass

Neuraminsäuren bis zu dreifach O-acetyliert vorkommen und diese von 9-O-Acetylerasen aus EHEC de-O-acetyliert werden können, wurden weitere Analysen in Kombination von BTSA-His und NanS-His bzw. NanS-p-His mittels nanoESI MS durchgeführt (172). Diese sollten Aufschluss geben, inwiefern die Esterasen aus EHEC dazu beitragen können, dass die als Schutz dienenden O-Acetylgruppen durch Enzyme von kommensalen Darmbakterien hydrolysiert werden können. Die Kombination aus NanS-His bzw. NanS-p-His und BTSA-His sollte in der Theorie zu einer vollständigen de-O-Acetylierung und anschließender Hydrolyse der Glykan-gebundenen Neuraminsäuren führen. Nach Inkubation der Enzyme mit BSM wurden die Proben zuerst mit Methanol behandelt (4.2.17; 4.2.18.). Dadurch werden Proteine gefällt und im Überstand befindende Zucker wurden mittels nanoESI MS analysiert (4.2.19.).

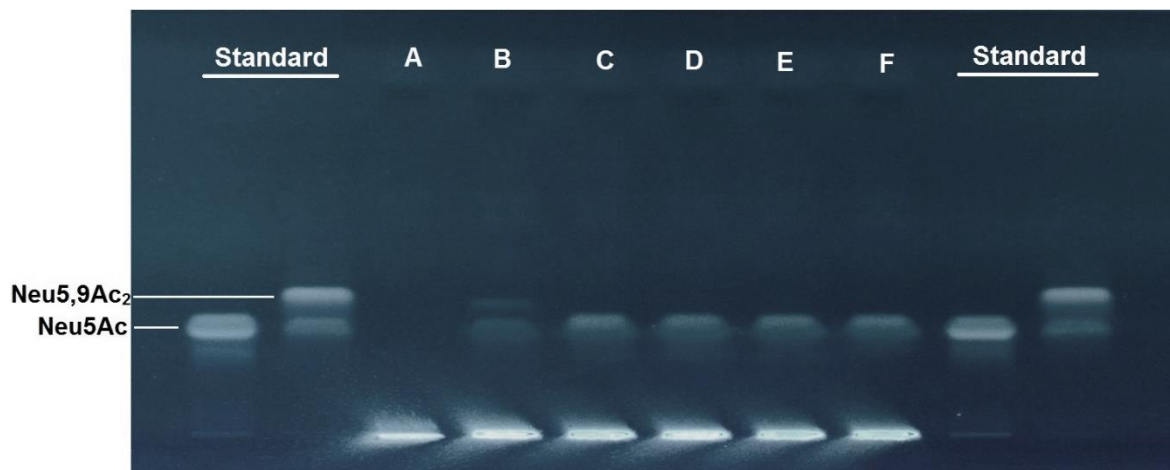


Abbildung 5. Enzymatische Hydrolyse von Muzin-gebundenen Neuraminsäuren durch BTSA-His sowie in Kombination mit 9-O-Acetylerasen NanS-His bzw. NanS-p-His. Standards und Proben des Verdaus wurden nach chromatographischer Trennung auf einer HPTLC-Platte mittels der DAPA Reagenz gefärbt und unter UV-Licht analysiert. Als Standards wurden Neu5Ac und Neu5,9Ac₂ appliziert, Spur A zeigt den Ansatz von BSM ohne Enzym, Spur B zeigt BSM nach BTSA-His Verdau, BSM + NanS+His in Spur C, BSM + NanS-p1-His in Spur D, BSM + NanS-p2-His in Spur E, BSM + NanS-p4-His in Spur F. Quelle: Feuerbaum et al., 2018 (172)

Detektierte Ionen und deren m/z Werte des enzymatischen Verdaus von BSM + BTSA-His, BSM + BTSA-His + NanS-His und BSM + BTSA-His + NanS-p1-His sind in Tabelle 18A, 18B und 18C aufgelistet. Entsprechend dazu sind die erhaltenen Massenspektren in Abbildung 6A, 6B und 6C dargestellt. Die Ergebnisse wurden bereits in Feuerbaum et al., 2018 publiziert (172). Der Verdau des BSM mit BTSA-His zeigt Ionen von de-O-acetylierten sowie mono-O-acetylierten Neuraminsäuren.

Dabei zeigen die nanoESI MS Analysen eindeutig, dass die Sialidase BTSA-His neben Neu5Ac und Neu5,9Ac₂ auch die glykosylierten Neuraminsäuren Neu5Gc und Neu5,9Gc₂ hydrolysieren kann. Somit scheint die Sialidase aus *B. thetaiotaomicron* weniger spezifisch zu sein, wie in der Literatur angenommen (135, 172). Allerdings ist das Enzym nicht fähig, zweifach oder dreifach O-acetylierte Neuraminsäuren von Glykanen abzuspalten. Nach Inkubation von BSM mit BTSA-His in Kombination mit NanS-His bzw. NanS-p-His wird ersichtlich, dass keine O-acetylierte Neuraminsäuren im Überstand detektiert wurden (Tab. 18B, 18C und Abb. 6B und 6C). Lediglich Ionen der Grundstrukturen Neu5Ac und Neu5Gc befanden sich im Überstand nach Inkubation der Sialidase mit 9-O-Acetylerasen aus EHEC. Gleiche Ergebnisse wurden für NanS-p2-His bzw. NanS-p4-His erzielt. Spektren und Ionen + *m/z* Werte befinden sich im Anhang unter 10.3. Schlussfolgernd zeigen die chromatographische und massenspektrometrischen Analysen, dass durch Kombination von 9-O-Acetylerasen aus EHEC und der Sialidase BTSA des kommensalen Darmbakteriums *B. thetaiotaomicron* die Hydrolyse Glykan-gebundener Neuraminsäuren erhöht wird, da 9-O-Acetylerasen weniger Substrat-spezifisch sind und bis zu dreifach O-acetylierte Neuraminsäuren de-O-acetylieren und diese dadurch als Substrat der Sialidase abgespalten werden (172).

Tabelle 18: Detektierte Ionen von Neuraminsäuren und korrespondierende *m/z* Werte aus BSM nach Inkubation mit BTSA-His (**A**); BTSA-His + NanS-His (**B**); und BTSA-His + NanS-p1-His (**C**); Proteine wurden mittels Methanol gefällt und hydrolysierte Neuraminsäuren im Überstand mit nanoESI MS analysiert.

A

Nr.	Neuraminsäure	<i>m/z</i>
1	Neu5Ac+ -H+Na	314.09
2	Neu5Ac [M+Na] ⁺	332.10
3	Neu5Gc [M+Na] ⁺	348.09
4	Neu5Ac(OAc) [M+Na] ⁺	374.11
5	Neu5Gc(OAc) [M+Na] ⁺	390.10

B

Nr.	Neuraminsäure	<i>m/z</i>
1	Neu5Ac+ -H+Na	314.09
2	Neu5Ac [M+Na] ⁺	332.10
3	Neu5Gc [M+Na] ⁺	348.09
4	Neu5Ac [M-H+2Na] ⁺	354.08
5	Neu5Gc [M-H+2Na] ⁺	370.07

C

Nr.	Neuraminsäure	<i>m/z</i>
1	Neu5Ac+ -H+Na	314.09
2	Neu5Ac [M+Na] ⁺	332.10
3	Neu5Gc [M+Na] ⁺	348.09
4	Neu5Ac [M-H+2Na] ⁺	354.08
5	Neu5Gc [M-H+2Na] ⁺	370.07

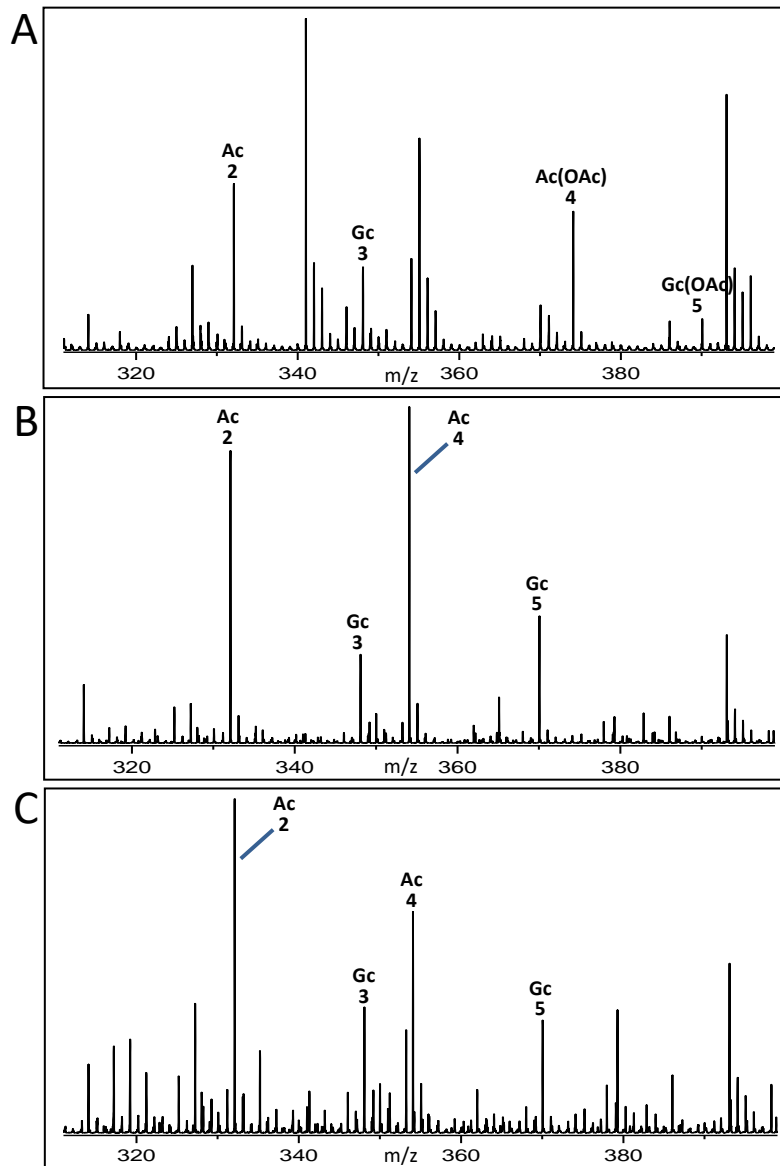


Abbildung 6. nanoESI Massenspektrum von enzymatisch hydrolysierten Neuraminsäuren aus BSM nach Inkubation mit BTSA-His **(A)**, nach Inkubation von BSM mit BTSA-His und NanS-His **(B)**, sowie von BSM mit BTSA-His und NanS-p1-His **(C)**. **(A)** Übersicht des Massenspektrums von Neuraminsäuren aus BSM zeigen Präsenz von Neu5Ac, Neu5Gc, Neu5Ac(OAc) und Neu5Gc(OAc). **(B)** Ionen von Neu5Ac und Neu5Gc wurden im Spektrum von BTSA-His und NanS-His behandeltem BSM detektiert. **(C)** Das Spektrum von NanS-p1-His und BTSA-His behandeltem BSM zeigt ebenfalls Ionen zugehörig zu Neu5Ac und Neu5Gc.

Ac, Neu5Ac; Ac(OAc), Neu5Ac(OAc); Gc, Neu5Gc; Gc(OAc), Neu5Gc(OAc); Nummerierte Ionen des Massenspektrums sind in Tabelle 18A, 18B und 18C aufgelistet.

Quelle: Feuerbaum et al., 2018 (172)

5.6. Einfluss von NanS-p auf die Adhärenz der EHEC O157:H7 Stamm EDL933 und O104:H4 Stamm C227-11 ϕ cu an die Darmepithelzelllinie HT-29 in vitro

9-O-Acetylerasen aus EHEC wurden bisher lediglich mit der Kohlenhydratgewinnung und Wachstum im Dickdarm assoziiert und in diesem Zusammenhang die Funktion und Enzymaktivität analysiert (157, 148, 140, 172). Virale (4-)9-O-Acetylerasen beeinflussen die Infektion, indem sie Neuraminsäuren von Glykorezeptoren de-O-acetylieren, wodurch Viren an den Zellen adhären können und dadurch weiter in das Gewebe eindringen können und die Infektion voranschreitet (164, 174, 167). Da die 9-O-Acetylerasen im Genom von EHEC Prophagen kodiert sind, sollte deren Funktion und Einfluss während der Infektion analysiert werden. Dafür wurden in vitro Adhärenzversuche mit der Darmepithelzelllinie HT-29 durchgeführt (4.2.23.). Die adhären wachsenden Zellen wurden für eine Stunde mit verschiedenen EHEC Stämmen infiziert (4.1.2.), anschließend gewaschen, um nicht-adhären Bakterien zu entfernen, und dann lysiert. Das Lysat enthielt die zuvor adhären Bakterien, welche nach Ausplattieren und Inkubation auf Nährmedium gezählt und ausgewertet wurden (4.2.23; 4.2.24.). Für die Analyse wurde neben O157:H7 Stamm EDL933 auch der O104:H4 Stamm C227-11 ϕ cu verwendet. Beide Stämme wurden jeweils mit verschiedenen *nanS*-p Mutanten EDL933 Δ *nanS* Δ *nanS*-p1-p7, EDL933 Δ *nanS* Δ *nanS*-p1-p5, C227-11 ϕ cu Δ *nanS*-p11-p14 und 227-11 ϕ cu Δ *nanS*-p11-p12 verglichen. Um die *nanS*-p Gendeletion zu komplementieren, wurde in weiteren Versuchen zur Infektion mit EDL933 Δ *nanS* Δ *nanS*-p1-p7 jeweils 10 μ g rekombinant exprimiertes aufgereinigtes NanS-p1-His und zu C227-11 ϕ cu Δ *nanS*-p11-p14 NanS-p15-His zugegeben. Die Infektionsversuche wurden jeweils mit drei biologischen Replikaten und je drei technischen Replikaten durchgeführt. Nach Berechnen der KbE/ml der einzelnen technischen Replikate wurden diese zunächst mittels des Shapiro-Wilk Tests auf Normalverteilung getestet (4.2.24.). Anschließend folgte eine einfache ANOVA mit einem Bonferroni Test, um das Signifikanzniveau der Daten zu ermitteln (4.2.24.).

Abbildung 7A zeigt die Adhärenz von EDL933 an HT-29 Zellen. Nach der einstündigen Infektion mit einer MOI von 10, was 8×10^6 KbE entsprach, adhären 6,49 $\times 10^5$ KbE des Wildtyps EDL933, 4,09 $\times 10^5$ KbE der 7-fach *nanS*-p Mutante und 7,34 $\times 10^5$ KbE der 5-fach *nanS*-p Mutante. Die 5-fach *nanS*-p Mutante wies

Deletionen von in *nanS*-p1, -p2, -p3-, p4-, p5 auf. Prophagen-kodiert enthielt dieser Stamm nur die funktionellen Gene *nanS*-p6 und *nanS*-p7. Die doppelte Ausstattung dieser Gene reichte aus, um im Adhärenzassay das Wildtyplevel zu erreichen. Es konnte kein signifikanter Unterschied zu EDL933 ermittelt werden. Der Stamm EDL933 Δ *nanS* Δ *nanS*-p1-p7 zeigte allerdings im Vergleich zum Wildtyp eine reduzierte Adhärenz an HT-29 Zellen um 36,98 %. Das Signifikanzniveau lag unter $p < 0,05$ und wurde in der Abbildung mit einem Sternchen (*) markiert. Wurde im Adhärenzassay EDL933 Δ *nanS* Δ *nanS*-p1-p7 mit insgesamt 10 μ g aufgereinigtem NanS-p1-His co-inkubiert, konnten $5,8 \times 10^5$ adhärenzte KbE ermittelt werden. Durch die Zugabe des Enzyms stieg also die Adhärenz wieder auf den Wildtyplevel an. Zwischen beiden Datensätzen war kein signifikanter Unterschied zu finden. Die Ergebnisse zeigen, dass die NanS-p die Adhärenz an Darmepithelzellen HT-29 positiv beeinflussen. Inwiefern extrazelluläre Neuraminsäuren, sowohl an Rezeptoren gebunden an HT-29 Zellen oder an den LPS bzw. Kapselproteinen der Bakterien, für eine erfolgreiche Adhärenz verantwortlich sind, wurde in weiteren Assays analysiert. Hierfür wurden vorab der Infektion und währenddessen jeweils 5 μ g aufgereinigte Sialidase BTSA-His hinzugegeben. Dieses Enzym spaltet sowohl die Grundstruktur Neu5Ac, als auch mono-O-acetylierte Neuraminsäuren ab (siehe 5.5.). Nach Co-Inkubation der Sialidase mit dem Stamm EDL933 zeigt dieser nach der einstündigen Infektion von HT-29 Zellen $2,21 \times 10^5$ adhärenzte KbE. Co-Inkubation von BTSA-His und EDL933 Δ *nanS* Δ *nanS*-p1-p7 führen ebenfalls zu einer verringerten Adhärenz mit insgesamt $1,46 \times 10^5$ KbE. EDL933 Δ *nanS* Δ *nanS*-p1-p5 weist in Kombination mit BTSA-His $1,17 \times 10^5$ adhärenzte KbE nach Infektion auf. Alle verwendeten Stämme zeigen durch die enzymatische Aktivität der Sialidase eine signifikante Reduktion der Adhärenz, welche ebenfalls mit einem Sternchen in Abbildung 7A markiert wurde. Der Wildtypstamm EDL933 zeigte durch Zugabe der BTSA-His eine Reduktion der Adhärenz um 65,95 %, die 7-fach Mutante um 64,3 % und die 5-fach Mutante um 84,06 %. Die Datensätze der Co-Inkubationen zeigen untereinander keinen signifikanten Unterschied.

Um zu analysieren, ob diese Ergebnisse auch mit anderen Serotypen reproduzierbar sind, wurden sämtliche Infektionen zusätzlich mit dem Stamm O104:H4 C227-11 Φ cu durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 7B dargestellt. Nach einstündiger Infektion von HT-29 Zellen mit insgesamt 8×10^6 KbE (MOI = 10) der jeweiligen verwendeten Stämme adhärten $1,51 \times 10^6$ KbE des Wildtyps, $6,52 \times 10^5$ KbE der

nanS-p Mutante O104:H4 C227-11 Φ cu Δ *nanS*-p11-p14 und $1,08 \times 10^6$ KbE von O104:H4 C227-11 Φ cu Δ *nanS*-p11-p12. Der verwendete Stamm enthält aufgrund der Deletion des Stx2 Phagen noch Prophagen-kodiert vier *nanS*-p Gene. O104:H4 C227-11 Φ cu Δ *nanS*-p11-p12 enthält somit noch zwei Gene *nanS*-p13 und *nanS*-p14. Anders als beim EDL933 zeigt diese Mutante kein Wildtyplevel. Die Adhärenz ist um 28,48 % reduziert. Trotz des verringerten Wertes ist der Unterschied nicht signifikant. Erst durch die Deletion aller *nanS*-p Gene ist auch beim Serotyp O104:H4 eine signifikante Reduktion der Adhärenz zu erkennen. Die Adhärenz der Mutante O104:H4 C227-11 Φ cu Δ *nanS*-p11-p14 ist im Vergleich zum Wildtyp um 58,61 % verringert. Wurde zur Komplementierung der Deletion zur Infektion der HT-29 Zellen mit der 4-fach *nanS*-p Deletionsmutante 10 μ g aufgereinigtes NanS-p15-His hinzugegeben, konnte eine signifikant erhöhte Adhärenz mit $2,72 \times 10^6$ KbE ermittelt werden. Somit adhärert im Assay die *nanS*-p Mutante O104:H4 C227-11 Φ cu Δ *nanS*-p11-p14 durch Zugabe von NanS-p15-His 1,8-mal verstärkt als der Wildtyp C227-11 Φ cu. Im Vergleich zum Stamm EDL933 konnte die Mutante EDL933 Δ *nanS* Δ *nanS*-p1-p7 durch Zugabe von 10 μ g NanS-p1-His im Assay circa den Wildtyplevel von EDL933 erreicht werden. Grundsätzlich zeigen auch hier die Ergebnisse des Assays mit dem Stamm C227-11 Φ cu, dass auch im Serotyp O104:H4 die 9-O-Acetylerasen eine wichtige Rolle während der Adhärenz an Darmepithelzellen spielen.

Des Weiteren wurde ebenfalls überprüft, ob durch Zugabe der Sialidase BTSA-His im Assay, wodurch extrazelluläre Neuraminsäuren hydrolysiert werden, die Adhärenz der verwendeten C227-11 Φ cu Stämme negativ beeinflusst wird. Nach einstündiger Infektion von HT-29 Zellen in Co-Inkubation der einzelnen Stämme mit BTSA-His konnten $4,88 \times 10^5$ KbE des Wildtyps C227-11 Φ cu, $2,7 \times 10^5$ KbE von C227-11 Φ cu Δ *nanS*-p11-p14 und $4,48 \times 10^5$ KbE von C227-11 Φ cu Δ *nanS*-p11-p12 ermittelt werden. Die analysierten Stämme des Serotyps O104:H4 zeigen durch die enzymatische Aktivität der Sialidase BTSA-His im Adhärenzassay eine signifikante Reduktion der Adhärenz, welche im Diagramm 7B mit einem Sternchen markiert wurde. Im Vergleich zur Infektion ohne BTSA-His zeigt der Wildtyp C227-11 Φ cu co-inkubiert mit der Sialidase eine Reduktion der Adhärenz von 67,68 %. Die Stämme C227-11 Φ cu Δ *nanS*-p11-p12 und C227-11 Φ cu Δ *nanS*-p11-p14 sind um jeweils circa 58 % reduziert. Somit konnte auch für den Serotyp O104:H4 bewiesen werden, dass die Bakterien Neuraminsäuren für eine erfolgreiche Adhärenz an das Darmepithel

benötigen, welche zuvor durch 9-O-Acetylerasen de-O-acetyliert werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine höhere Anzahl an KbE der verwendeten C227-11 Φ cu Stämme während der einstündigen Infektion im Assay adhäreren im Vergleich zu verwendeten EDL933 Stämmen. Dabei ist die Anzahl an deletierten *nanS-p* Genen unabhängig. Die Mutante C227-11 Φ cu Δ *nanS-p11-p14* zeigt im Assay das gleiche Level der Adhärenz im Vergleich zum Wildtypstamm EDL933.

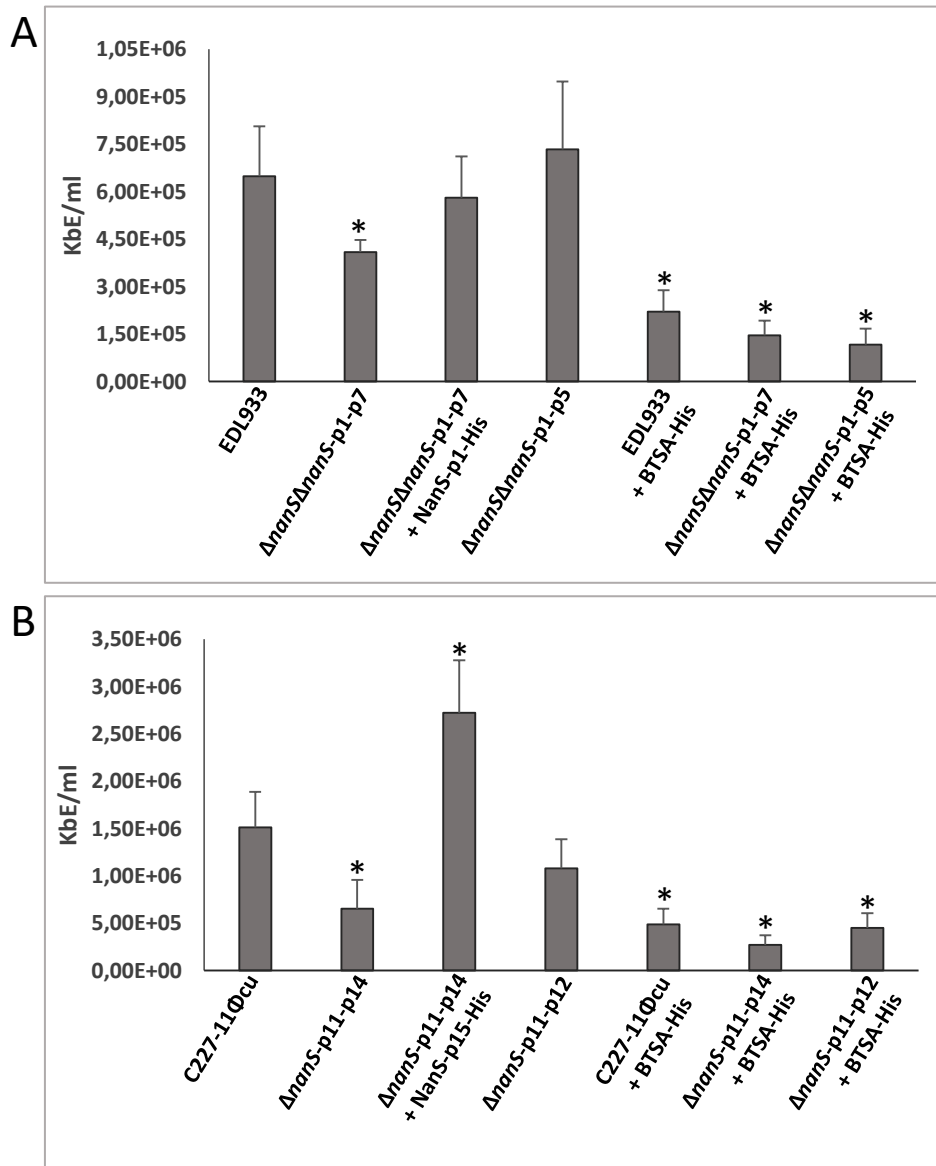


Abbildung 7. Ermittelte KbE/ml adhärenter Stämme nach einstündiger Infektion von HT-29 Epithelzellen. **(A)** Vergleich der Adhärenz von EDL933 an HT-29 Zellen mit EDL933 $\Delta nanS \Delta nanS$ -p1-p7, EDL933 $\Delta nanS \Delta nanS$ -p1-p7 + NanS-p1-His und EDL933 $\Delta nanS \Delta nanS$ -p1-p5. Mittels des Bonferroni Tests wurde das Signifikanzniveau ermittelt. EDL933 $\Delta nanS \Delta nanS$ -p1-p7 adhärert signifikant weniger an HT-29 Zellen als der Wildtyp EDL933. Die Adhärenz der verwendeten Stämme wurde zusätzlich in weiteren Infektionsversuchen in Co-Inkubation mit BTSA-His analysiert. Alle Stämme zeigen signifikant schwächere Adhärenz, wenn die Sialidase dem Ansatz hinzugefügt wurde. **(B)** Vergleich der Adhärenz von C227-11Φcu an HT-29 Zellen mit C227-11Φcu $\Delta nanS$ -p11-p14, C227-11Φcu $\Delta nanS$ -p11-p14 + NanS-p15-His und C227-11Φcu $\Delta nanS$ -p11-p12. C227-11Φcu $\Delta nanS$ -p11-p14 adhärert signifikant weniger an Zellen als der Wildtyp C227-11Φcu. Durch komplementieren der Gendelektionen mit rekombinant exprimiertem NanS-p15-His adhärert die Mutante C227-11Φcu $\Delta nanS$ -p11-p14 signifikant stärker als der Wildtyp C227-11Φcu. Wurden alle drei verwendeten Stämme während der Infektion mit BTSA-His co-inkubiert, adhärerten diese signifikant schwächer an Zellen.

5.7. Abbau des Muzins von Darmepithelzellen LS 180 durch O157:H7 Stamm EDL933 und *nanS*-p Deletionsmutanten

Die an Glykanen endständig gebundenen Neuraminsäuren dienen Glykoproteinen wie Muzinen eigentlich als Schutz vor Degradierung durch Hydrolasen (135, 144). Das im Dickdarm vorherrschende Muzin 2 ist stark O-glykosyliert und weist endständig bis zu dreifach O-acetylierte Neuraminsäuren auf (124). Dadurch stellt es für Bakterien eine Hürde dar, die mukusale Barriere zu durchbrechen (124). Dass EHEC fähig ist, diese zu durchbrechen, ist bereits bekannt. In vorherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass 9-O-Acetylerasen aus EDL933 auch Muzin-gebundene Neuraminsäuren de-O-acetylieren können und die Position der O-Acetylgruppe, bis auf C4, keine Rolle spielt (5.5.). Neben NanS-p produziert EHEC weitere Enzyme wie StcE, welches unter anderem MUC2 abbauen kann (65, 94). StcE rekombinant exprimiert ist allerdings nicht fähig, MUC2 zu degradieren (65, 64). Endständige Neuraminsäuren können die Aktivität von Glykosyl-Hydrolasen beeinträchtigen. Inwieweit die O-Acetylierung von Neu5Ac die Aktivität von StcE beeinflusst, ist bisher nicht bekannt.

Im Rahmen dieses Versuches sollte analysiert werden, ob 9-O-Acetylerasen aus EDL933 an der Degradierung von Muzin beteiligt sind. Hierfür wurden Infektionsassays mit LS 180 Zellen durchgeführt (4.2.23; 4.2.25.). LS 180 sind Zellen des Dickdarms, welche neben MUC5AC auch MUC2 produzieren (4.1.4.). Zuerst wurden Kryokonserven aufgetaut und Zellen bis zur Konfluenz von circa 85 % kultiviert und anschließend passagiert (4.2.21; 4.2.20). Um die Zellen im Assay einsetzen zu können, wurden diese wie in 4.2.23.2 vorbereitet. Wichtig war hierbei, dass vor Zugabe der Zellen pro Well, ein steriles Glasplättchen eingelegt wurde. Die Zellen wurden anschließend im 24 Well bis zu einer Konfluenz von circa 95 % kultiviert. Die Infektion der Zellen erfolgte wie in 4.2.25. beschrieben. Als Stämme wurden EDL933, *nanS*-p Mutanten EDL933 Δ *nanS* Δ *nanS*-p1-p5 und EDL933 Δ *nanS* Δ *nanS*-p1-p7 jeweils im Duplikat eingesetzt. Nach der 4-stündigen Infektion wurden LS 180 Zellen gewaschen und vorhandene Glykoproteine mittels der PAS-Färbung sichtbar gemacht (4.2.26.). Die in den Wells zuvor eingelegten Glasplättchen, auf welchen sich die adhären Zellen befinden, wurden vorsichtig entnommen und auf Objektträger übertragen. Am Mikroskop wurden anschließend die PAS-gefärbten Strukturen ausgewertet (4.2.27.)

Mittels der am Mikroskop angeschlossenen Kamera konnten Aufnahmen der Färbungen aufgenommen werden. Durch die PAS-Färbung erscheinen Glykoproteine wie Muzine rosa, Zellkerne werden durch das im Kit verwendete Hämatoxylin lila gefärbt. Abbildung 8 zeigt jeweils einen Ausschnitt A bzw. B der angefertigten Präparate. Die nicht infizierten LS 180 Zellen zeigen um die gefärbten Zellkerne deutlich rosafarbene Strukturen, welche beispielhaft in Bild A und B mit einem schwarzen Pfeil markiert wurden. Die Präparate waren in ihrer Beschaffenheit sehr gleichmäßig. Es befanden sich wenige Zellen in den Präparaten, die kaum Muzin produzierten. Abbildung 8A der nicht infizierten Zellen zeigt einer dieser wenigen Stellen. Der schwarze Pfeil markiert einen Zellkern, welcher kaum von rosa-gefärbten Strukturen umgeben ist. Hingegen hat die in Ausschnitt B markierte Zelle deutlich Glykoproteine produziert. Des Weiteren wurden in diesen Präparaten stark dunkelrosa-gefärbte Strukturen gefunden, welche mit einem hellblauen Pfeil in Ausschnitt A markiert wurden. LS 180 Zellen, welche mit EDL933 infiziert wurden, zeigen eine deutliche Reduktion des Muzins. Abbildung 8 Präparat A zeigt eine vorangeschrittene Infektion. Obwohl LS 180 Zellen gleichmäßig im Well verteilt wurde und die Konfluenz circa 95 % betrug, sind hier nur noch wenige Zellen sichtbar. Die Zellkerne sind kaum von Muzin umgeben. Die adhärenen Bakterien sind deutlich sichtbar (rote Pfeile). Abbildung 8B der EDL933 Infektion zeigt einen Ausschnitt von infizierten Zellen, welche ebenfalls eine Reduktion des Muzins aufweisen, allerdings sind rosa-lila-gefärbte Strukturen vorhanden. Lilagefärbte Strukturen entstehen, wenn der pH-Wert im sauren Bereich liegt. Die adhärenen Bakterien sind in Ausschnitt B ebenfalls gut sichtbar (roter Pfeil). In beiden erstellten Präparaten waren häufiger Bereiche wie in Ausschnitt A zu finden. Nach Infektion der LS 180 Zellen mit EDL933 Δ *nanS* Δ *nanS*-p1-p5 wurden in Präparaten lediglich eine minimale Reduktion des Muzins festgestellt. Die Präparate waren sehr gleichmäßig, wie in Ausschnitt A und B dargestellt. Adhärenente Bakterien waren sichtbar (rote Pfeile) und PAS-gefärbte Strukturen erscheinen rosa-lila, was auf einen sauren pH-Wert hindeutet. Auffällig war, dass manche LS 180 Zellen eine größere Menge an Glykoproteinen produziert haben (hellblauer Pfeil in Abbildung 8A, EDL933 Δ *nanS* Δ *nanS*-p1-p5 Infektion). Diese intensiv gefärbten Strukturen erschienen häufiger im Vergleich zu nicht-infizierten Proben. Wurden LS 180 Zellen mit dem Stamm EDL933 Δ *nanS* Δ *nanS*-p1-p7 infiziert, konnte durch die mikroskopische Analyse der PAS-gefärbten Strukturen, keine Reduktion von

Glykoproteinen festgestellt werden. Die Präparate A und B waren sehr gleichmäßig und adhärente Bakterien können gut gesehen werden (rote Pfeile). Die Häufigkeit von stark gefärbten Glykoproteinen (hellblaue Pfeile) nahm im Vergleich zur Kontrollfärbung enorm zu. Die Infektionen mit anschließender PAS-Färbung zeigen deutlich, dass der Wildtyp EDL933 Muzin von LS 180 Zellen degradieren kann, während die *nanS-p* Mutanten EDL933 Δ *nanS* Δ *nanS-p1-p5* und EDL933 Δ *nanS* Δ *nanS-p1-p7* nicht fähig waren, das Muzin während der 4-stündigen Infektion abzubauen. Es scheint zudem, dass während der Infektion mit EDL933 Δ *nanS* Δ *nanS-p1-p7*, die LS 180 Zellen, als Abwehr gegenüber der Pathogenen, eine erhöhte Muzinproduktion aufweisen.

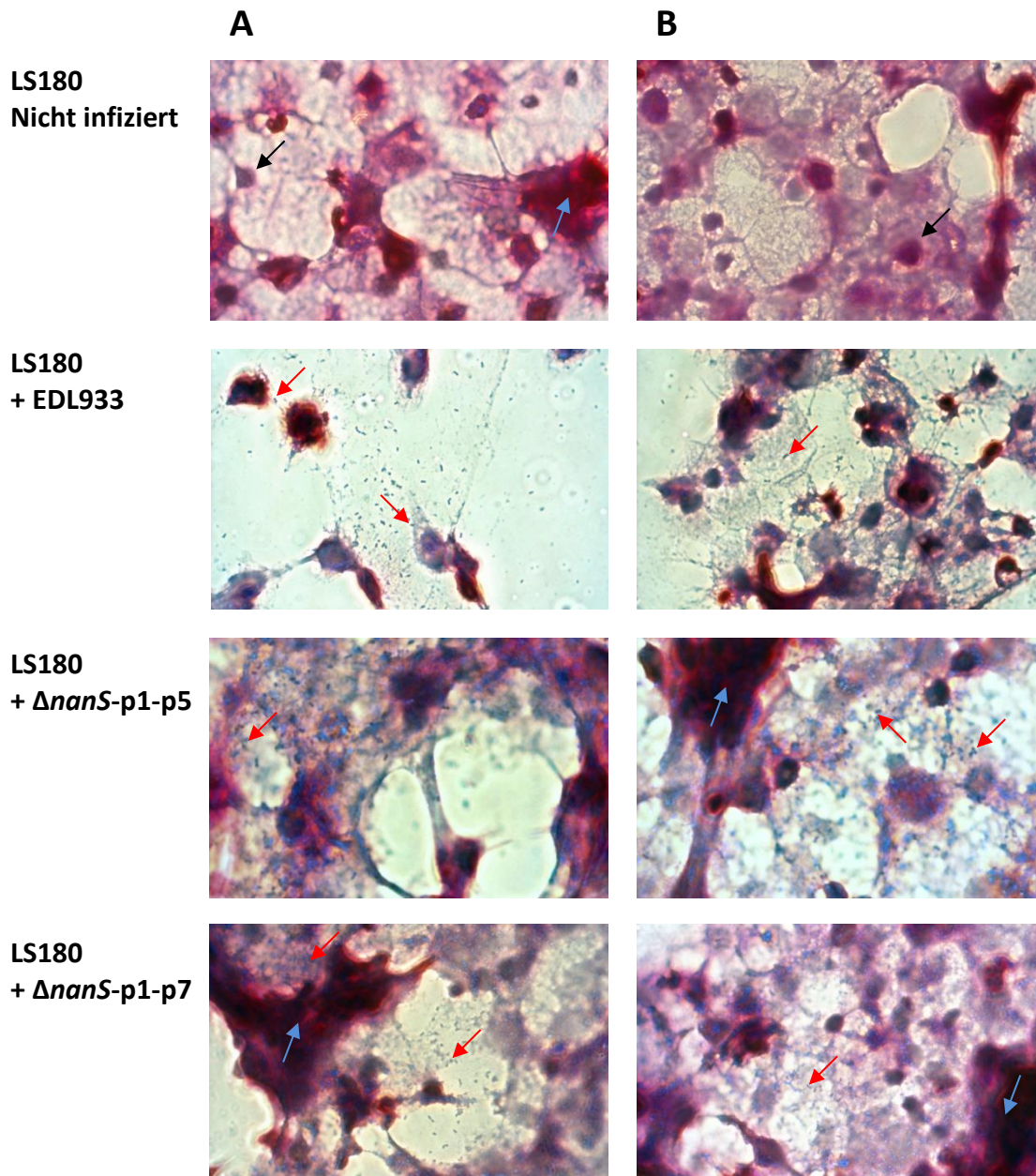


Abbildung 8. Qualitative Analyse des Mukusabbaus auf LS 180 Zellen in Abhängigkeit von NanS-p. Jeweils zwei Ausschnitte A und B der PAS-Färbung von nicht infizierten LS 180 Zellen und nach 4-stündiger Infektion mit EDL933, EDL933 Δ nanS Δ nanS-p1-p5 bzw. EDL933 Δ nanS Δ nanS-p1-p7. Durch die PAS-Färbung wurden Glykoproteine wie Muzine rosa-violett gefärbt. Zellkerne wurden mit Hämatoxylin gefärbt und erscheinen lila. Bis zur Infektion wurden LS 180 Zellen bis zur Konfluenz von circa 95 % kultiviert. Bei nicht infizierten Zellen ist deutlich eine rosa Färbung des Muzins erkennbar. Jeweils ein Zellkern in Bild A und B wurden beispielhaft mit schwarzen Pfeilen markiert. Abbildung A der Infektion von LS 180 Zellen mit EDL933 zeigen eine fast vollständige Reduktion des Muzins. Deutlich zu erkennen sind die Bakterien (rote Pfeile), welche adhären an Zellen haften. Abbildung B zeigt einen weiteren Ausschnitt der Infektion mit EDL933. Die Reduktion des Muzins war nicht vollständig, allerdings schon weit fortgeschritten. Nach Infektion der LS 180 Zellen mit EDL933 Δ nanS Δ nanS-p1-p5 zeigten beide Proben A und B eine geringe Reduktion des Muzins. Obwohl adhärenente Bakterien (rote Pfeile) sichtbar waren, konnte während der 4-stündigen Infektion kaum Muzin abgebaut werden. Ähnlich verlief die Infektion der LS 180 Zellen mit EDL933 Δ nanS Δ nanS-p1-p7. Die Mutante ist nicht fähig das Muzin abzubauen. Stellenweise befand sich konfluenter rosa-lila gefärbter Mukus, stärker im Vergleich zur nicht-infizierten Proben.

5.8. Motilität von EHEC Stämmen in Schwimmversuchen

In den UPEC Stämmen EC958, CFT073 und UTI89 konnten bereits 9-O-Acetylerasen identifiziert werden, welche die Expression des Masterregulators *flhD* und von *fliC* positiv beeinflussen, woraus eine verstärkte Produktion von Flagellen resultiert, das wiederum die Motilität der Bakterien erhöht (163). Durch die Aktivität der 9-O-Acetylerasen wird neben der Grundstruktur Neu5Ac auch Acetat gebildet. Im EPEC Stamm O127:H6 konnte gezeigt werden, dass Acetat die Expression von sowohl LEE Genen, als auch *fliC* positiv reguliert und somit an der Adhärenz und der Motilität der Bakterien beteiligt ist (175). Um weitere Funktionen der 9-O-Acetylerasen aus EHEC charakterisieren zu können, wurde deshalb deren Einfluss auf die Motilität der Bakterien beleuchtet und außerdem überprüft, inwiefern Acetat dabei eine Rolle spielt. Für die Analyse wurden vom Serotyp O157:H7 die Stämme EDL933, EDL933 Δ *nanS* Δ *nanS*-p1-p5 und EDL933 Δ *nanS* Δ *nanS*-p1-p7 verwendet. Vom Serotyp O104:H4 wurden die Stämme C227-11 Φ cu, C227-11 Φ cu Δ *nanS*-p11-p12 und C227-11 Φ cu Δ *nanS*-p11-p14 herangezogen. Die Durchführung erfolgte wie in 4.2.28. beschrieben. Von Kulturen wurden je 1×10^7 KbE auf die Mitte von 0,3 % LB-Bacto-Agarplatten pipettiert und bei 30 °C für 21 Stunden inkubiert. Durch die geringe Konzentration im Agar und der Temperatur bei 30 °C wird das Schwärmen der Bakterien ausgeschlossen, wodurch diese lediglich ein Schwimmverhalten zeigen können. Nach der Inkubation wurden die Durchmesser der Schwimmhöfe gemessen und Mittelwerte gebildet. Alle Motilitätsassays wurden in zwei biologischen Replikaten mit jeweils zwei technischen Replikaten durchgeführt. Von den erhaltenen Werten wurde anschließend das Signifikanzniveau zweier Gruppen mittels der Friedman-ANOVA analysiert (4.2.24.).

Das Ergebnis der Motilitätsassays ist in Abbildung 9 zu sehen. Abb. 9A zeigt die Mittelwerte der gemessenen Schwimmhöfe der EDL933 Stämme. Nach der Inkubationszeit von 21 Stunden konnte der Wildtyp EDL933 einen Durchmesser von durchschnittlich 5,23 cm erreichen. In derselben Zeit erreichten die *nanS*-p Mutanten EDL933 Δ *nanS* Δ *nanS*-p1-p5 und EDL933 Δ *nanS* Δ *nanS*-p1-p7 Schwimmhöfe mit Durchmesser von 7,18 cm bzw. 7,25 cm. Nach Durchführung der Friedman-ANOVA konnte bestätigt werden, dass sowohl der um 37,3 % vergrößerte Schwimmhof der Mutante EDL933 Δ *nanS* Δ *nanS*-p1-p5, als auch der um 38,6 % vergrößerte Schwimmhof der Mutante EDL933 Δ *nanS* Δ *nanS*-p1-p7 einen signifikanten

Unterschied zum Wildtyp EDL933 aufweisen. Liegt das Signifikanzniveau unter dem Wert von $\alpha = 0,05$, wurde dies in der Abb. 9 mit einem Sternchen markiert. Um zu überprüfen, inwiefern das durch die 9-O-Acetyltransferasen produzierte Acetat an der verringerten Motilität des Wildtypes EDL933 beteiligt ist, wurden für weitere Assays den 0,3 % LB-Bacto-Agarplatten 60 mM bzw. 80 mM Natrium-Acetat hinzugefügt. Der pH-Wert wurde dadurch nicht beeinflusst. Anschließend wurde mit diesen Agarplatten erneut in biologischen Duplikaten mit jeweils zwei technischen Replikaten das Schwimmverhalten der *nanS-p* Mutante EDL933 Δ *nanS* Δ *nanS-p1-p7* analysiert. Abb. 9A zeigt, dass bereits bei der Zugabe von 60 mM Acetat deutlich eine signifikante Verringerung des Schwimmhofes um 14,8 % auf 6,18 cm entsteht, verglichen mit dem Durchmesser der 7-fach *nanS-p* Mutante ohne Zugabe des Acetates (7,25 cm). Durch die im Agar vorhandene Acetat-Konzentration von 80 mM konnte sogar eine signifikante Reduktion des Schwimmhofes um 28,6 % auf 5,18 cm erreicht werden, welcher dem wildtypischen Schwimmverhalten von EDL933 gleicht. Zwischen EDL933 und EDL933 Δ *nanS* Δ *nanS-p1-p7* + 80 mM Acetat konnte im durchgeführten Assay kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Des Weiteren wurde das Schwimmverhalten des Stammes O104:H4 C227-11 Φ cu analysiert, welches in Abb. 9B zu sehen ist. Der wildtypische Stamm erreicht nach der Inkubationszeit von 21 Stunden auf 0,3 % LB-Bacto-Agarplatten einen Schwimmhof mit einem Durchmesser von 4,05 cm. Die *nanS-p* Mutanten C227-11 Φ cu Δ *nanS-p11-p12* und C227-11 Φ cu Δ *nanS-p11-p14* zeigen im Assay ein gleiches Schwimmverhalten und erreichen einen Durchmesser von 5,3 cm und 5,04 cm. Dies entspricht einer erhöhten Motilität von 30,9 % für C227-11 Φ cu Δ *nanS-p11-p12* und 24,4 % für C227-11 Φ cu Δ *nanS-p11-p14*. Durch die Friedman-ANOVA konnte ein signifikanter Unterschied von einem Signifikanzniveau unter $p < 0,05$ der Mutanten zum Wildtypstamm C227-11 Φ cu im Schwimmverhalten bestätigt werden. Zur Überprüfung, ob auch die Motilität des Serotyps O104:H4 durch die Zugabe von Acetat verringert wird, wurden erneut 0,3 % LB-Bacto-Agarplatten mit 60 mM und 80 mM Natriumacetat hergestellt und im Assay mit dem Stamm C227-11 Φ cu Δ *nanS-p11-p14* verwendet (4.2.28.). Von diesem wurden jeweils 1×10^7 KbE auf die Mitte des Agars pipettiert und Durchmesser der Schwimmhöfe nach 21 Stunden Inkubation bei 30 °C gemessen. Abbildung 9B zeigt den Mittelwert der zwei biologischen Replikate mit jeweils zwei technischen Replikaten. Sowohl durch die Zugabe von 60 mM, als auch 80 mM Acetat, konnte die Motilität der *nanS-p* Mutante C227-

11ΦcuΔ*nanS*-p11-p14 signifikant verringert werden, welche Schwimmhöhe von 3,6 cm (60 mM) und 3,0 cm (80 mM) erreichte. Bezogen auf C227-11ΦcuΔ*nanS*-p11-p14 ohne die Zugabe von Acetat, entspricht dies einer Reduktion von 28,6 % durch 60 mM, und 40,5 % durch 80 mM zugeführtem Acetat. Unabhängig von der eingesetzten Acetat-Konzentration, konnten bei beiden Ansätzen kleinere Schwimmhöhe als der Wildtyp C227-11Φcu (4,05 cm) erreicht werden. Dies war, auch bei der höheren Konzentration von 80 mM Acetat bei EDL933Δ*nanS*Δ*nanS*-p1-p7 nicht der Fall.

Abschließend konnten beide Versuche, sowohl mit EDL933 als auch mit C227-11Φcu, zeigen, dass die 9-O-Acetylerasen das Schwimmverhalten der Stämme beeinflussen. Durch deren Expression zeigen die Wildtypen eine verringerte Motilität im Vergleich zu *nanS*-p Mutanten. Dabei spielt es keine Rolle, ob alle vorhandenen *nanS*-p Gene deletiert waren, oder im Genom noch zwei *nanS*-p vorhanden waren. Durch die Zugabe von Acetat zeigen *nanS*-p Mutanten trotz der fehlenden Aktivität von 9-O-Acetylerasen einen verringerten Schwimmhof, was darauf hindeutet, dass die NanS-p durch die Hydrolyse der O-Acetylgruppe von Neuraminsäuren die Motilität von EHEC verringern.

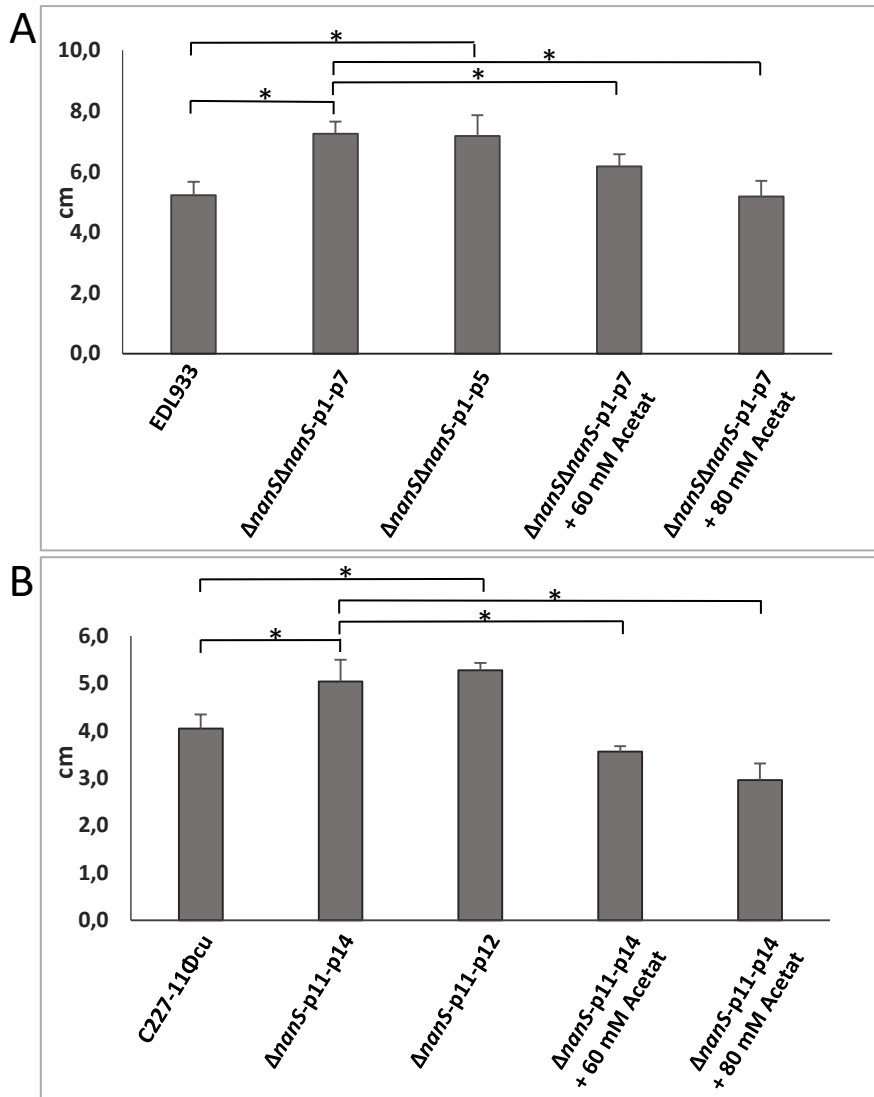


Abbildung 10. Vergleich der Motilität von EDL933 und C227-11Φcu im Schwimmversuch mit 0,3 % LB-Bacto-Agarplatten. Von Stämmen in der stationären Phase wurden je $1 \cdot 10^7$ KBE in die Mitte der Agarplatten pipettiert und diese für 21 Stunden bei 30 °C inkubiert. Ergebnisse zeigen Durchmesser der Schwimmhöfe. Darstellung von zwei biologischen mit jeweils zwei technischen Replikaten. Statistische Auswertung erfolgte mittels der Friedman-ANOVA; ($p < 0,05$). **(A)** Vergleich der Motilität von EDL933 und EDL933 $\Delta nanS \Delta nanS-p1-p7$ bzw. EDL933 $\Delta nanS \Delta nanS-p1-p5$. Die Mutanten zeigen eine signifikant erhöhte Motilität. Nach Zugabe von sowohl 60 mM als auch 80 mM Natriumacetat zu 0,3 % LB-Bacto-Agarplatten zeigt die Mutante EDL933 $\Delta nanS \Delta nanS-p1-p7$ eine signifikant verringerte Motilität. **(B)** Vergleich der Motilität von C227-11Φcu mit C227-11Φcu $\Delta nanS-p11-p14$ bzw. C227-11Φcu $\Delta nanS-p11-p12$. Mutanten zeigen eine signifikant erhöhte Motilität zum Wildtyp. Durch Zugabe von 60 mM bzw. 80 mM Natriumacetat wurde der Durchmesser der Schwimmhöfe signifikant verringert.

6. Diskussion

6.1. Breiteres Substratspektrum der analysierten NanS-p aus O157:H7

Der EHEC Stamm O157:H7 EDL933 enthält neben dem chromosomal kodierten Gen *nanS* noch 7 weitere homologe Gene, die allerdings Prophagen-kodiert und von *nanS-p1* bis *nanS-p7* nummeriert sind (148). Diese kodieren für 9-O-Acetylerasen, welche wichtige Enzyme im Neuraminsäurestoffwechsel sind, indem sie an C9 die O-Acetylgruppe abspalten (157, 148). O-Acetylerasen aus anderen Organismen und Viren wurden stellenweise als sehr spezifisch beschrieben und können nur an einem Kohlenstoffatom der Neuraminsäure de-O-acetylieren (164, 136). Andere O-Acetylerasen, von z.B. Influenzavirus wiederum, zeigen ein unspezifisches breiteres Spektrum und de-O-acetylieren auch mehrfach O-acetylierte Neuraminsäuren (164). In der vorliegenden Arbeit kann mittels HPTLC Analysen keine de-O-Acetylierung von Neu5,4Ac₂ durch NanS, NanS-p1, NanS-p2 und NanS-p4 aus O157:H7 EDL933 gezeigt werden. Die Aktivität der rekombinant exprimierten Enzyme konnte allerdings unter der Verwendung von Neu5,9Ac₂ als Substrat bestätigt werden (5.3.). Vergleicht man die Sequenzen der NanS-p mit 4-O-Acetylerasen aus Viren, findet man keine homologen Bereiche. NanS und NanS-p gehören zur SGNH-Familie (148). Spezifisch für diese Enzymgruppe sind die Aminosäuren Serin (**S**), Glycin (**G**), Asparagin (**N**) und Histidin (**H**), welche in konservierten Regionen der Sequenz enthalten sind. Serin und Histidin sind Teil der katalytischen Triade (147, 143). Weder die konservierten Bereiche von SGNH Proteasen, noch die katalytische Triade von NanS/NanS-p, zeigen Homologien zu 4-O-Acetylerasen.

Um zu analysieren, ob das Substratspektrum lediglich auf C9 in Neuraminsäuren beschränkt ist, wurden nanoESI MS Analysen durchgeführt (4.2.17. - 4.2.19). Für enzymatische Ansätze wurde als Neuraminsäurequelle RinderdrüsenSpeichelmuzin (BSM) verwendet. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass BSM bis zu dreifach O-acetylierte Neuraminsäuren Neu5Ac(OAc)₃ und Neu5Gc(OAc)₃ enthält. Nach Inkubation des Muzins mit NanS-His bzw. NanS-p-His zeigten Spektren hauptsächlich Ionen der Grundstrukturen Neu5Ac und Neu5Gc sowie eine geringe Mengen an einfach O-acetylierten Neuraminsäuren. Die drastische Reduzierung der O-Acetylgruppen zeigt deutlich ein erweitertes Substratspektrum der Enzyme. Vor allem die de-O-Acetylierung von dreifach O-acetylierten Neuraminsäuren gibt einen

deutlichen Hinweis, dass die Esterasen an weiteren Kohlenstoffen im Grundgerüst hydrolysieren können. O-Acetylgruppen an Neu5Ac und Neu5Gc können an C4, C7, C8 und C9 vorkommen (142). Natürlich vorkommende Neuraminsäuren mit einer O-Acetylgruppe sind Neu5,9Ac₂, Neu5,8Ac₂, Neu5,7Ac₂ und Neu5,4Ac₂ (142). Die HPTLC Analysen zeigten bereits, dass Neu5,4Ac₂ nicht hydrolysiert werden kann, während an C9 die Acetylgruppe abgespalten wird (5.3.). Liegt ein neutraler pH-Wert vor, kann die O-Acetylgruppe von C7 zu C8 und C9 migrieren (176). Für nanoESI MS Analysen wurde BSM in Reinstwasser gelöst. Sobald die Esterasen an C9 die O-Acetylgruppe abspalten, entsteht Essigsäure. Demnach müsste der pH-Wert durch die Aktivität der Enzyme im sauren Bereich liegen, da das gelöste Muzin sich in keinem Puffersystem befindet. Ein saurer pH-Wert würde die Migration von C7 zu C8 und C9 verhindern (176). Könnte NanS-p1-His an C7 und C8 nicht de-O-acetylieren, hätte man im Spektrum stärkere Signale von Ionen zweifach O-acetylierter Neuraminsäuren detektieren müssen, da NanS-p1-His sonst Neu4,5,7(8),9Ac₄ zu Neu4,5,7(8)Ac₃ hydrolysiert hätte. Das lässt darauf schließen, dass die Esterase an C7 und C8 de-O-acetylieren kann und bei detektieren Neu5Ac(OAc) es sich wahrscheinlich um Neu5,4Ac₂ handelt. Durch die stark reduzierten detektierten Ionen von einfach und zweifach O-acetylierten Neuraminsäuren in Spektren von NanS/NanS-p2/p4-His behandeltem Muzin, lässt sich ebenfalls daraus schließen, dass das gleiche Substratspektrum wie von NanS-p1-His vorliegt. Die rekombinant exprimierten Enzyme wurden nacheinander aufgereinigt und wurden dadurch vor Verwendung im Assay unterschiedlich lang gelagert. Eventuell könnten dadurch die Enzyme unterschiedlich aktiv sein. Um dieses Ergebnis zu optimieren und Ionen von zweifach O-acetylierten Neuraminsäuren auch in Spektren von NanS/NanS-p2/-p4 behandeltem Muzin zu reduzieren, hätte man entweder frisch aufgereinigte Enzyme direkt im Assay verwenden, oder mehr Enzym einsetzen sollen. Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass sowohl NanS als auch NanS-p mehrfach O-acetylierte Neuraminsäuren sowie die glykosylierten Derivate de-O-acetylieren können. Die Aktivität wird weder verringert, wenn zusätzlich zur O-Acetylgruppe an C9 weitere O-Acetylgruppen am Grundgerüst gebunden sind, noch wenn die Neuraminsäuren grundsätzlich an Glykanen gebunden sind. NanS befindet sich im periplasmatischen Raum (147). Die Lokalisierung von NanS-p ist bisher unbekannt. Sollten die Enzyme ins extrazelluläre Milieu gelangen, könnten diese im Darm sämtliche Neuraminsäuren de-O-acetylieren, bevor sie ins Bakterium aufgenommen werden. Durch eine

extrazelluläre enzymatische Aktivität könnten NanS-p durch die de-O-Acetylierung von Neuraminsäuren den von kommensalen Darmbakterien produzierten Sialidasen eine größere Menge an Substrat liefern. Analysen der O-Acetylsterase EstA aus *B. fragilis* konnte diese Hypothese bereits bestätigen. Durch die Zugabe von EstA zu BSM konnten Sialidasen aus *B. thetaiotaomicron* mehr Neuraminsäuren hydrolysieren (136). In der vorliegenden Arbeit konnte mittels nanoESI MS Analysen gezeigt werden, dass die Sialidase BTSA von *B. Thetaiotaomicron* in Muzin-haltigem Medium lediglich einfach O-acetylierte Neuraminsäuren und die Grundstrukturen Neu5Ac und Neu5Gc abspalten kann (5.5.). Wurde die Sialidase mit NanS-His oder NanS-p-His co-inkubiert, konnte eine starke Zunahme von Neu5Ac und Neu5Gc detektiert werden (4.2.17. – 4.2.19; 5.5. (172)). Keine Ionen von O-acetylierten Neuraminsäuren wurden detektiert. Die O-Acetylgruppen endständig-gebundener Neuraminsäuren in Muzin dienen eigentlich dem Schutz vor Degradierung, wodurch Bakterien die intestinale Barriere nicht durchbrechen können, da die Muzinschicht nicht abgebaut werden kann (135). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass EHEC im Darm durch die Expression der 9-O-Acetylsterasen sämtliche Neuraminsäuren de-O-acetylieren, sodass die Grundstrukturen Neu5Ac bzw. Neu5Gc, oder maximal einfach O-acetylierte Neuraminsäuren entstehen. In beiden Fällen können Sialidasen von kommensalen Darmbakterien diese abspalten. Nadja Saile konnte dies in weiterführenden Experimenten bestätigen (172). Die Kombination aus NanS-p und BTSA liefert dem Stamm EDL933 in BSM-haltigem Medium mehr Substrat, wodurch die Bakterien ein stärkeres Wachstum erzielten im Vergleich zum Ansatz ohne BTSA (172). Durch den Gendosiseffekt und vor allem das erweiterte Substratspektrum, kann EHEC schneller an C- und N-Quellen im Darm gelangen und überwächst damit den kommensalen *E. coli* (148, 140, 138). Inwiefern die 9-O-Acetylsterasen lediglich für den Kohlehydratmetabolismus im Darm nützlich sind, oder schon als Virulenzfaktor fungieren, da sie die Degradierung der mukosalen Schicht initiieren, muss weiter geklärt werden.

6.2. Prophagenkodierte 9-O-Acetylerasen aus EHEC als potentielle Virulenzfaktoren

6.2.1. Einfluss der 9-O-Acetylerasen auf den Abbau von Glykoproteinen von Muzin-produzierenden Darmepithelzellen in vitro

EHEC kolonisieren bevorzugt im Dickdarm, wo die Bakterien die intestinale Barriere durchbrechen und bis zum Epithel gelangen (146, 25). Diese Barriere besteht zum größten Teil aus Muzin 2 (MUC2), welches stark O-glykosyliert und endständig Neuraminsäuren mit unterschiedlichen Graden an O-Acetylierungen aufweist (129, 144). Da in vorherigen Ergebnissen gezeigt wurde, dass die 9-O-Acetylerasen aus O157:H7 EDL933 Glykan-gebundene Neuraminsäuren an C7, C8 und C9 de-O-acetylieren können, wurde in Zellkulturversuchen, unter der Verwendung der humanen MUC2 produzierenden Darmepithelzelllinie LS 180, der mukosale Abbau in Abhängigkeit der NanS-p analysiert. Die Muzinproduktion der LS 180 Zellen wurde mittels der PAS-Färbung bestätigt, welche unspezifisch Glykoproteine der Zellen rosa-lila anfärbt (4.2.25; 4.2.26; 4.2.27; 5.7.). Nach Infektion der Zellen mit dem Stamm EDL933 war nach mikroskopischer Analyse eine deutliche Reduktion PAS-gefärbter Strukturen im Präparat erkennbar. Nach der 4-stündigen Infektion war das Muzin der Zellen fast vollständig abgebaut. Nach Infektion der LS 180 Zellen mit EDL933 Δ nanS Δ nanS-p1-p5 und anschließender PAS-Färbung konnte lediglich eine geringe Reduktion der rosa-lila Färbung von Glykoproteinen beobachtet werden. Wurden Zellen mit EDL933 Δ nanS Δ nanS-p1-p7 infiziert, zeigten Präparate nach PAS-Färbung vermehrt Strukturen mit starker rosa-lila Färbung. Im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle von LS 180 Zellen waren diese stark gefärbten Bereiche im Präparat der Infektion mit EDL933 Δ nanS Δ nanS-p1-p7 häufiger zu finden, was auf eine höhere Muzinmenge hinweisen könnte. Durch die PAS-Färbung werden sämtliche Glykoproteine angefärbt. Um zu bestätigen, dass der Abbau des durch LS 180 Zellen produzierte MUC2 abhängig von NanS-p ist, müsste man in weiterführenden Experimenten mittels spezifischem Antikörper das Muzin detektieren. Hierfür kommt ein primärer MUC2-Antikörper in Frage. Dieser könnte in einem ELISA eingesetzt werden, wodurch die NanS-p abhängige Degradierung des MUC2 bestätigt werden könnte. Trotzdem zeigen die durchgeführten Experimente, dass NanS-p notwendig sind, um grundsätzlich Glykoproteine der LS 180 Zellen abzubauen zu können. Erwähnenswert ist, dass die eingesetzten Stämme alle das Gen *stcE* kodierten. Studien von Deletionsmutanten in Zellkulturversuchen zeigten, dass

StcE aus O157:H7 EDL933 notwendig ist, um MUC2 degradieren zu können (126). Andere Studien zeigten allerdings, dass das Enzym rekombinant exprimiert und aufgereinigt nicht fähig ist, das Glykoprotein zu spalten (65). Die unterschiedlichen Ergebnisse in Studien lassen darauf schließen, dass die Aktivität von StcE abhängig von weiteren Enzymen aus EHEC ist. Grundsätzlich können Hydrolasen in ihrer Aktivität durch Neuraminsäuren an Glykanen sowie deren O-Acetylierung inhibiert werden (162, 172) Eventuell müssen endständige Neuraminsäuren durch NanS-p de-O-acetyliert werden, damit die Muzinase StcE das Glykoprotein spalten kann. Um diese Hypothese überprüfen zu können, könnte man rekombinant exprimiertes NanS-p und StcE zu LS 180 Zellen geben und den Abbau der Glykoproteine entweder mittels PAS-Färbung überprüfen, oder mittels spezifischer Antikörper. Zusätzlich sollte man ebenfalls die Versuche mit dem Stamm O104:H4 C227-11Φcu sowie Deletionsmutanten O104:H4 C227-11ΦcuΔ*nanS*-p11-p12 und O104:H4 C227-11ΦcuΔ*nanS*-p11-p14 durchführen und analysieren, inwiefern der Abbau der Glykoproteine von LS 180 Zellen auch in diesem Stamm abhängig von NanS-p ist. Der Stamm C227-11Φcu exprimiert kein StcE, allerdings die Muzinase Pic, welche stark abhängig von Neuraminsäuren Muzin bindet und dieses spaltet (96). Der Versuch könnte zusätzlich zeigen, inwiefern bei dieser Bindung eine O-Acetylierung der Neuraminsäuren eine Rolle spielt.

Das Präparat der EDL933Δ*nanS*Δ*nanS*-p1-p7 infizierten LS 180 Zellen zeigte, im Vergleich zur Kontrolle, häufiger stark rosa-lila gefärbte Strukturen, was auf eine höhere Konzentration an Glykoproteinen hinweist. Im Dickdarm werden durch die Gobletzellen des Epitheliums antimikrobielle Substanzen und Antikörper sekretiert, welche in der äußeren Schicht die Mikrobiota und intestinale Pathogene wie EHEC wahrnehmen und wodurch Gobletzellen mit einer erhöhten Expression an MUC2 reagieren (177, 119, 120). Eine Studie belegt, dass auch LS 180 Zellen über sekretierte Antikörper EHEC detektieren können und mit einer erhöhten Produktion von MUC2 reagieren (177). Trotz erhöhter Muzinproduktion kann EHEC das Muzin abbauen und die Zellen infizieren (177). Eventuell haben auch in durchgeführten Zellkulturversuchen die LS 180 Zellen durch die Infektion mit erhöhter Mukusproduktion reagiert. Während der Wildtyp EDL933 die Glykoproteine abbauen konnte, waren die Deletionsmutanten durch die fehlenden *nanS*-p Gene dazu nicht mehr in der Lage. Die erhöhte Muzinexpression könnte erklären, weshalb in Präparaten mit EDL933Δ*nanS*Δ*nanS*-p1-p7 infizierten LS 180 Zellen vermehrt stark

rosa-lila gefärbte Bereiche vorhanden waren. Im Infektionsassay reichten die noch zwei vorhandenen *nanS*-p Gene im EDL933 Δ *nanS* Δ *nanS*-p1-p5 gerade so nicht aus, um den Mukus der LS 180 Zellen vollständig abzubauen, was den Gendosiseffekt bestätigt. Es wird deutlich, dass der Stamm EDL933 alle *nanS*-p Gene benötigt, um während der Infektion im Zellkulturversuch Muzin soweit abbauen zu können, um die Epithelzellen infizieren zu können. Die Zellen erkennen die Infektion auch mit der 7-fach *nanS*-p Mutante. Diese hat vermutlich überhaupt keine Chance zu infizieren, da durch die fehlende de-O-Acetylierung der Glykan-gebundenen Neuraminsäuren keine Glykosidasen den Mukus degradieren können. Im Gegenteil, die mukosale Barriere wird verstärkt. Deshalb sind wahrscheinlich kommensale *E. coli* mit einem *nanS* im Genom auch nicht fähig, die mukosale Schicht zu durchbrechen und befinden sich im Dickdarm im Lumen bzw. der äußeren losen Muzinschicht, während EDL933 durch seine 7 *nanS*-p Gene die Muzinschicht abbauen kann (178, 153). In durchgeführten Versuchen mit LS 180 Zellen wurde keine Sialidase verwendet, weshalb Neuraminsäuren in Glykoproteinen der Zellen Glykan-gebunden vorliegen müssen. Obwohl die Neuraminsäuren nicht hydrolysiert wurden, zeigten die 9-O-Acetylerasen dennoch deutlich einen Einfluss auf den Abbau von Glykoproteinen. Das könnte einen Hinweis geben, dass die 9-O-Acetylerasen extrazellulär vorliegen müssen. Wären sie wie NanS im periplasmatischen Raum, könnten sie die Glykan-gebundenen Neuraminsäuren nicht de-O-acetylieren und hätten keinen Effekt auf das Muzin (147). Eventuell werden aber auch während der Infektion bei einigen Stämmen Phagen gebildet. Die Enzyme könnten dann durch Phagenlyse frei werden (148, 179). Virale O-Acetylerasen können zudem direkt an der Virushülle gebunden sein (180, 164). Desweiteren ist an Bakteriophagen aus *Salmonella enterica* Serovar Typhi an der Membran eine Acetylerase gebunden (181). Durch die Lokalisierung der Gene auf Prophagen könnten NanS-p ebenfalls an Bakteriophagen gebunden sein und dadurch ins äußere Milieu gelangen. Schlussfolgernd verdeutlicht der Versuch in vitro den immensen Einfluss der 9-O-Acetylerasen während der Infektion von EHEC und zeigt, dass diese nicht nur am Metabolismus von Neuraminsäuren im Darm beteiligt sind, sondern mit der de-O-Acetylierung von Glykoproteinen wie Muzin die Infektion beginnen und dadurch die intestinale Barriere durchbrechen können. Durch eine höhere Anzahl exprimierter 9-O-Acetylerasen wird das Gleichgewicht zwischen Muzinproduktion und Abbau gestört. Das Muzin wird degradiert, wodurch EHEC nicht nur schneller an C- und N-

Quellen gelangen, sondern auch bis zu Epithelzellen gelangen und diese infizieren können.

6.2.2. Einfluss der 9-O-Acetylerasen auf die Adhärenz von EHEC an Darmepithelzellen *in vitro*

Virale O-Acetylerasen, gebunden an der Hülle, binden an Neuraminsäuren der extrazellulär vorliegenden Glykankette von Glykorezeptoren, wodurch Viren die Adhärenz an die Wirtsmembran vermittelt wird (164, 182, 174). Gleichzeitig zerstören O-Acetylerasen durch ihre enzymatische Aktivität den Rezeptor, woraus dieser inaktiviert wird und die Signalkaskade ins Zellinnere unterbunden wird (174). Dadurch umgehen Viren das Immunsystem und können ungehindert weitere Zellen infizieren. Die Bindung an Glykorezeptoren geht einher mit der de-O-Acetylierung von Neu5,9Ac₂ (182, 174, 183). In der vorliegenden Arbeit sollte das Potential der NanS-p aus EHEC als Virulenzfaktor analysiert werden. Da die Bindung von Viren an Wirtsmembranen über die enzymatische Aktivität von 9-O-Acetylerasen erfolgt, wurde analysiert, inwiefern die Prophagen-kodierten NanS-p die Adhärenz von EHEC beeinflussen. Hierfür wurden Adhärenzassays durchgeführt (4.2.23). Als Zelllinie wurden Darmepithelzellen HT-29 verwendet, welche kein Muzin produzieren (4.1.4.). Damit auch weitere Glykoproteine den Assay nicht beeinflussen, wurde während der Infektion auf FCS im Zellkulturmedium verzichtet. Die vorkommenden Neuraminsäuren im Assay sind entweder von Glykorezeptoren der HT-29 Zellen, bakteriellen Kapselproteinen oder im Falle vom Serotyp O104:H4Φcu das LPS, welches endständig Neuraminsäuren aufweist (184, 143, 185). Die Ergebnisse zeigen einen deutlichen Einfluss der 9-O-Acetylerasen auf die Adhärenzfähigkeit der Bakterien *in vitro* (5.6). Beide Stämme, O157:H7 EDL933 und O104:H4 C227-11Φcu, zeigen eine signifikant reduzierte Anzahl adhärenter Bakterien, wenn *nanS-p* Gene deletiert sind. Um zu bestätigen, dass EHEC de-O-acetylierte Neuraminsäuren zum adhären an Epithelzellen braucht, wurden in weiteren Versuchen HT-29 Zellen mit der Sialidase BTSA-His co-inkubiert, welche Neu5Ac, sowie einfach-O-acetylierte Neuraminsäuren von Rezeptoren abspaltet (5.5.). Hier konnte die Notwendigkeit der Neuraminsäuren für eine erfolgreiche Adhärenz bestätigt werden. Alle, während der Infektion eingesetzten Stämme, zeigten durch die enzymatische Aktivität der Sialidase eine signifikante Reduzierung adhärenter Bakterien (5.6).

Durch die de-O-Acetylierung von Neuraminsäuren entsteht neben der Grundstruktur Neu5Ac auch Acetat. Beides kann in Bakterien Signalwege und dadurch veränderte Expressionen von Genen auslösen (186, 79, 175). Neu5Ac zeigt einen Einfluss auf Fimbrien. Das Gen *fimB* wird durch den Repressor NanR reguliert. Liegt der Zucker in der Zelle vor, wird die Expression von *fimB* eingeleitet, woraus eine Reduzierung der Fimbrien resultiert (186, 187). Freies Neu5Ac kam im Zellkulturversuch allerdings nur dann vor, wenn die Sialidase eingesetzt wurde. Die *nanS-p* Deletionsmutanten zeigten aber auch ohne Co-Inkubation mit dem Enzym eine reduzierte Adhärenz. Von daher scheint Acetat das Signalmolekül zu sein. Acetat kommt grundsätzlich im Dickdarm in höheren Konzentrationen vor und zählt zu den SCFAs (116). In EPEC O127:H6 konnte bereits eine positive Regulierung der LEE Gene durch Acetat gezeigt werden (175). Andere Studien belegen, dass auch in EHEC O157:H7 EDL933 die kurzkettige Fettsäure einen positiven Einfluss auf die Virulenz zeigt (79). Unter anderem reguliert Acetat die Expression von Flagellen negativ, während das Adhäsins Iha vermehrt exprimiert wird (117, 77, 78). Iha kommt sowohl im Serotyp O157:H7, als auch im O104:H4 vor und wird für die Adhärenz am Darmepithel benötigt. Unabhängig von SCFAs produziert EHEC selbst durch die enzymatische Aktivität der *NanS-p* Acetat. Es wird vermutet, dass die Bakterien am Darmepithel an Glykorezeptoren gebundene Neuraminsäuren binden, anschließend durch die 9-O-Acetylerasen Acetat produzieren, woraus unter anderem die Produktion des Adhäsins Iha resultiert (117, 77, 79, 80). Die *nanS-p* Mutanten adhäreren schlechter, da diese durch das fehlende Acetat keine erhöhte Expression des Adhäsins aufweisen. Die Vermutung könnte durch weiterführende Versuche wie rtPCR Analysen des Gens *iha* in wildtypischen Stämmen und *nanS-p* Mutanten bestätigt werden. Da in EPEC zudem die LEE Gene durch Acetat reguliert werden, könnte dies in EHEC auch der Fall sein, was einen zusätzlichen Effekt auf die Adhärenz hätte. Inwiefern Virulenzgene des LEE-negativen Serotyps O104:H4 durch Acetat reguliert werden, ist bisher unbekannt. Allerdings adhärert der Stamm C227-11Φcu stärker als der Stamm EDL933, weshalb sich eine regulierende Expression von Virulenzfaktoren durch Acetat nicht ausschließen lässt und weiter analysiert werden sollte. Die Deletionen der *nanS-p* Gene ließ sich im Zellkulturversuch durch die Zugabe von rekombinant exprimierten und aufgereinigten *NanS-p1-His* bzw. *NanS-p15-His* komplementieren. Während durch die Gesamtmenge von 10 µg *NanS-p1-His* die Mutante EDL933Δ*nanS*Δ*nanS-p1-p7* das Level von EDL933 erreicht, zeigt

die Mutante C227-11 Φ cu Δ nanS-p11-p14 durch die Zugabe von 10 μ g NanS-p15-His eine signifikant höhere Adhärenz als der Wildtyp C227-11 Φ cu. Inwiefern dieser Unterschied zustande kommt, ist bisher unklar. Die Aminosäuresequenzen der Enzyme sind zu 98,91 % identisch. Alignment der Sequenzen ist im Anhang unter 10.5. zu finden. Das Gen *nanS-p15* wurde wie auch *nanS-p1* in den Expressionsvektor pET22b(+) kloniert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die im Vektor enthaltene Signalsequenz *pelB* zuvor entfernt wurde (4.2.2; 5.1.). Nach Expression und Aufreinigung von NanS-p15-His wurde sowohl durch SDS-PAGE, als auch im Westernblot eine Doppelbande detektiert (5.2.). Dabei weist die untere Bande die eigentliche Größe des Proteins von 68,6 kDa auf. Eventuell handelt es sich bei der höheren Bande um eine modifizierte Variante der Esterase. Virale O-Acetylerasen können zum Teil stark N-glykosyliert sein (188, 164). Glykosylierte Proteine können eine höhere Stabilität aufweisen (189). Eine N-Glykosylierung erfolgt durch die kovalente Bindung zwischen einer Glykosylgruppe und der Seitenkette eines Asparagins (N), das sich in der Erkennungssequenz N-X-T (T = Threonin) oder N-X-S (S = Serin) befindet. X kann dabei jede Aminosäure außer Prolin, Serin oder Threonin sein (190). Die Aminosäuresequenzen von NanS-p1 und NanS-p15 unterscheiden sich in 7 Aminosäuren. NanS-p15 weist an Position 624 anstelle eines Glycins (G) ein Asparagin (N) auf. Dadurch entsteht von Position 624 bis 626 die Konsensussequenz NAT, an der eine N-Glykosylierung möglich wäre. Um zu überprüfen, ob NanS-p15 tatsächlich N-glykosyliert ist, könnte man das Enzym mit der PGNase F inkubieren. Dieses spaltet N-Glykosylierungen ab. Nach Analyse mittels SDS-PAGE sollte dann nur noch die untere der beiden Banden zu sehen sein. Eine mögliche Glykosylierung von NanS-p15 könnte zu einer längeren und/oder verstärkten Aktivität führen. Das könnte erklären, weshalb die Mutante durch Zugabe von NanS-p15-His im Zellkulturversuch eine derart signifikant erhöhte Adhärenz im Vergleich zum Wildtyp zeigt und die gleiche Menge an NanS-p1-His dieses Ergebnis nicht erreichen kann. Die Komplementierung der Deletion erfolgte durch die Zugabe der His-getaggten NanS-p in das Zellkulturmedium. Die Enzyme befanden sich also extrazellulär. Die Adhärenz der Deletionsmutanten wurde dadurch bis mindestens zum Wildtypellevel erhöht. Das lässt erneut auf die Lokalisierung der NanS-p schließen und weist darauf hin, dass die im Wildtyp exprimierten 9-O-Acetylerasen extrazellulär enzymatisch aktiv sind. Schlussfolgernd bestätigen die Ergebnisse weiter die Vermutung, dass

phagenkodierte 9-O-Acetylerasen aus EHEC nicht nur für den Neuraminsäure-Stoffwechsel notwendig sind, sondern zur Virulenz der Bakterien beitragen und an der Adhärenz an das Darmepithel beteiligt sind.

6.2.3. 9-O-Acetylerasen reduzieren die Motilität von EHEC

In der vorliegenden Arbeit konnte bereits bestätigt werden, dass die Phagenkodierte 9-O-Acetylerase aus O157:H7 EDL933 und O104:H4 C227/11Φcu nicht nur den Bakterien eine C- und N-Quelle sichern, sondern den weiteren Infektionsverlauf steuern, indem sie an der Degradierung von Muzin beteiligt sind und die Adhärenz an Epithelzellen über die de-O-Acetylierung von Neuraminsäuren vermitteln (53. – 5.7.). Durch die enzymatische Aktivität von NanS-p entsteht Neu5Ac und Acetat (148, 157). In der Literatur wurde bereits der Einfluss von Neu5Ac und Acetat auf Fimbrien und Flagellen beschrieben (187, 175), weshalb im Rahmen dieser Arbeit ein möglicher Einfluss der NanS-p auf die Motilität von EHEC untersucht wurde. Fimbrien und Flagellen sind entscheidend für die Motilität von EHEC. Während der Infektion spielen sie eine wichtige Rolle, damit die Bakterien am richtigen Ort infizieren. Die Motilität wird dabei durch sensorische Wahrnehmung vieler Umwelteinflüsse reguliert. Das Ergebnis der durchgeführten Assays zeigt, dass Wildtypen O157:H7 EDL933 und O104:H4 C227/11Φcu eine geringere Motilität aufweisen, verglichen mit *nanS-p* Deletionsmutanten. Dabei spielt es keine Rolle, ob alle *nanS-p* Gene deletiert, oder noch zwei *nanS-p* vorhanden waren. Die verwendeten Schwimmplatten enthielten LB-Medium, welches geringe Mengen an Neuraminsäuren enthält (191, 192). Inwiefern diese O-Acetylierungen aufweisen, ist in der Literatur nicht beschrieben. Sollten diese Neuraminsäuren O-acetyliert sein, können im Motilitätsassay die *nanS-p* kodierenden Stämme O157:H7 EDL933 und O104:H4 C227-11Φcu diese durch die enzymatische Aktivität der NanS-p de-O-acetylieren, wodurch Neu5Ac und Acetat entstehen, welche die Motilität regulieren können. In *E. coli* kann durch die Anwesenheit von Neu5Ac die Repression des Gens *fimB* durch den Repressor NanR aufgehoben werden, woraus eine verringerte Fimbrienproduktion, sowie verringerte Motilität resultiert (187). Demnach könnte das Neu5Ac im Medium die Expression der Fimbrien in Stämmen O157:H7 EDL933 und O104:H4 C227-11Φcu inhibieren, weshalb die Motilität verringert ist. Des Weiteren konnte in EPEC O127:H6 gezeigt werden, dass Acetat die Expression von Flagellen

erhöht (175). Durch die Acetat-vermittelte Expression des RNA Polymerase σ -Faktors FliA werden Flagellengene positiv reguliert, woraus die veränderte Motilität resultiert (175). In einer Studie über UPEC-Stämme EC958, CFT073 und UTI89 konnte eine 9-O-Acetylerase identifiziert werden, die die Expression von *flhD* und *fliC* beeinflusst, wodurch die Stämme eine erhöhte Motilität aufwiesen (163). In durchgeführten Experimenten sind die Ergebnisse zu beiden Studien gegensätzlich, da durch NanS-p die Motilität in EHEC verringert wird, und nicht erhöht. Dennoch zeigen die Studien, dass sowohl 9-O-Acetylerasen, als auch Acetat, die Expression von Flagellengenen regulieren (163, 175). Zudem wird in der Literatur ein verändertes Schwimmverhalten mit veränderter Flagellenexpression bzw. veränderter Rotorbewegung der Flagellen beschrieben (193). Um zu analysieren, ob das gebildete Acetat im Schwimmassay die Motilität der Wildtypen verringert hat, wurden in weiteren Versuchen zu Schwimmschälchen entweder 60 mM oder 80 mM Natriumacetat supplementiert. Beide eingesetzten Deletionsmutanten EDL933 Δ *nanS* Δ *nanS-p1-p7* und C227-11 Φ *cu* Δ *nanS-p11-p14* zeigten durch das Acetat einen kleineren Schwimmschhof. Dabei wird deutlich, dass der Durchmesser des Hofes mit höherer Konzentration an Acetat kleiner wurde. Trotz fehlender Aktivität von 9-O-Acetylerasen in *nanS-p* Deletionsmutanten konnte die Motilität durch Acetat dem Wildtypenlevel angeglichen werden. Das zeigt deutlich, dass das durch NanS-p produzierte Acetat als Signalmolekül fungiert. Hier wird der Unterschied zum EPEC Stamm O127:H6 erneut deutlich, welcher durch Acetat eine höhere Motilität zeigt (175). EPEC kolonisiert bevorzugt im Dünndarm, wo auch im Vergleich zum Dickdarm grundsätzlich Acetat in geringerer Konzentration vorliegt (116, 175). Eventuell werden 9-O-Acetylerasen in pathogenen *E. coli* unterschiedlich reguliert, damit die Bakterien in der bevorzugten Nische kolonisieren und infizieren können. Im Dickdarm kommen neben höherer Acetatkonzentrationen auch vermehrt O-acetylierte Neuraminsäuren vor (142, 84). Durch die Aktivität der Esterasen würde die Acetatkonzentration nochmals höher werden. Die daraus resultierende verringerte Motilität in EHEC sorgt für die bevorzugte Kolonisierung im Dickdarm (84). Um den Einfluss der 9-O-Acetylerasen auf Fimbrien und/oder Flagellen bestätigen zu können, sollten Genexpressionsanalysen der Fimbrien- und Flagellengene im wildtypischen EHEC Stamm EDL933 mit *nanS-p* Deletionsmutanten verglichen werden. Durch den Einsatz von Medium im Versuch, welches eine höhere Konzentration an Neuraminsäuren aufweist, könnte zudem ein

erhöhter Unterschied der Motilität erreicht werden. Um zu bestätigen, dass tatsächlich Acetat und nicht Neu5Ac das Signalmolekül ist, könnte man vor Gießen der LB-Bacto-Agarplatten Neu5Ac supplementieren. Zusätzlich sollte man auch analysieren, inwiefern das Schwärmverhalten von EHEC durch NanS-p beeinflusst wird. Dieses wird ebenfalls über Flagellen reguliert und findet bei einer Agar-Konzentration höher als 0,5 % statt (193). Abschließend kann gesagt werden, dass eine weitere Funktion den 9-O-Acetylerasen aus EHEC zugeteilt werden kann, da sie durch die enzymatische Aktivität die Motilität beeinflussen und dadurch dem Bakterium die Nischen-Kolonisierung gewährleisten.

6.3. Gendosiseffekt durch Mehrfachausstattung der *nanS*-p Gene in EHEC

In Versuchen zur Motilität von EHEC Stämmen in Abhängigkeit von *nanS*-p Genen wurde der Gendosiseffekt sowohl bei EDL933 als auch C227-11Φcu nicht sichtbar (5.8.). Das könnte bedeuten, dass die *nanS*-p Gene unter verschiedenen Bedingungen exprimiert werden. Der Gendosiseffekt war mit Stämmen EDL933 und C227-11Φcu sowohl in Wachstumsversuchen in Minimalmedium mit Neuraminsäuren (148, 140), als auch in Adhärenzassays sichtbar (5.6.). Demnach waren mindestens zwei Gene im Genom ausreichend, sodass kein signifikanter Unterschied zum Wildtyplevel entstand. Der Stamm EDL933 zeigte zusätzlich bei der Degradierung von Muzin im Zellkulturversuch den *nanS*-p Gendosiseffekt (5.7.). Während Wachstumsversuche und Zellkulturassays bei 37 °C durchgeführt worden sind, wurde das Schwimmverhalten bei 30 °C analysiert. Eventuell wäre der Gendosiseffekt sichtbar, wenn man die Schwimmassays bei 37 °C wiederholen würde. Andernfalls würde es sonst auf eine unterschiedliche Expression der Gene unter verschiedenen Bedingungen hinweisen. In einer Studie über 9-O-Acetylerasen aus EDL933 wurde mittels rtPCR bereits die Gene *nanS*-p1 und *nanS*-p2 analysiert, welche konstitutiv exprimiert werden (160). Das Gen *nanS*-p1 zeigte zudem eine erhöhte Expressionsrate während des Wachstums in Darm-simulierendem Medium (159). Zudem werden *nanS*-p1 und *nanS*-p2, welche die Gene *stx*_{2a} und *stx*_{1a} flankieren, nach Phageninduktion co-transkribiert (158). Über die Expression weiterer *nanS*-p ist bisher nichts bekannt. Das Gen *nanS* in EDL933 wird durch den Repressor NanR reguliert (143, 147). Liegt Neu5Ac vor, wird *nanS*

exprimiert (160). Durch das Vorhandensein von Neuraminsäuren wurden die Gene *nanS-p1* und *nanS-p2* nicht exprimiert. Die *nanS-p* Gene werden demnach nicht, wie Gene des *nan*-Operons, durch NanR reguliert (160). Trotzdem kann eine *nanS* Deletion durch die *nanS-p* Gene kompensiert und der Neuraminsäurestoffwechsel aufrecht gehalten werden (148, 160). Durch die unabhängige Expression vom Neuraminsäurestoffwechsel, die erhöhte Expression von *nanS-p1* in Darm-simulierendem Medium und nach Phageninduktion, sowie durch die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse, scheinen NanS-p in EHEC eine weitere Rolle während der Infektion zu haben (158, 159, 148, 140). Nadja Saile konnte bereits zeigen, dass durch den Gendosiseffekt der *nanS-p* Gene es zu einer kürzeren Generationszeit in O104:H4 C227-11Φcu in Neuraminsäure-haltigem Medium führt, verglichen mit apathogenen *E. coli* (140). Eventuell benötigen EHEC die Mehrfachausstattung der *nanS-p* Gene, um nicht nur im Neuraminsäurestoffwechsel eine höhere Fitness zu erlangen, sondern auch bei der Nischen-Kolonisierung im Dickdarm, zum Abbau des Mukus, sowie der Adhärenz und Infektion der Epithelzellen. Im Vergleich zu *nanS* weisen *nanS-p* zusätzlich die unbekannte Domäne DUF1737 auf (148, 140, 160). Inwiefern diese Domäne eine enzymatische Funktion aufweist, müsste geklärt werden. Das könnte weiter zum Verständnis beitragen, weshalb EHEC neben dem chromosomal kodiertem *nanS* mehrere Prophagen-kodierte *nanS* Homologe kodiert.

6.4. Ausblick

Die Phagen-kodierten 9-O-Acetylerasen aus EHEC wurden bisher mit dem Metabolismus von O-acetylierten Neuraminsäuren assoziiert (148, 140). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben den Hinweis auf weitere Funktionen der Enzyme während der Infektion. Dabei beeinflussen die 9-O-Acetylerasen die Motilität, den Abbau von sekretiertem Muzin von Darmepithelzellen und die Adhärenz der Bakterien in vitro. Weitere Versuche sind notwendig, um die erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen und die Hypothese weiter zu belegen, ob NanS-p aus EHEC als mögliche Virulenzfaktoren fungieren, oder das durch die de-O-Acetylierung entstandene Neu5Ac bzw. Acetat als Signalmolekül zur Virulenz beitragen.

Zur weiteren Analyse der Motilität der Bakterien könnte man Genexpressionsanalysen durchführen. Der Vergleich von Fimbrien- und Flagellen-Genen der wildtypischen Stämme mit *nanS*-p Deletionsmutanten mittels rtPCR würde grundsätzlich zeigen, ob die 9-O-Acetylerasen tatsächlich die Expression von Flagellen und Fimbrien beeinflussen. Liegt ein Unterschied zwischen den Stämmen vor, könnte man durch Zugabe von entweder Neu5Ac oder Acetat zur *nanS*-p Deletionsmutante zeigen, welches der Moleküle als Signal fungiert. Da in Schwimmversuchen ein Unterschied festgestellt wurde, könnte man zudem das Schwärmverhalten analysieren. Bakteriell Schwärmen findet auf Agarplatten statt, wenn die Agarkonzentration bei 0,5 % oder höher liegt (194).

Der Abbau von sekretiertem Muzin im Zellkulturversuch mit LS 180 Zellen fand ebenfalls im O157:H7 Stamm EDL933 abhängig der phagenkodierte 9-O-Acetylerasen ab. Die endständig-gebundenen Neuraminsäuren, und vor allem deren O-Acetylierung, dienen in Glykanen eigentlich als Schutz vor Degradierung durch Glykosidasen. Der Serotyp O157:H7 kodiert für die Muzinase StcE (126). Studien zeigten einen StcE abhängigen MUC2-Abbau (126). Allerdings war das Enzym aufgereinigt nicht fähig, das Glykoprotein zu spalten (65). Das schließt auf die Notwendigkeit weiterer Enzyme aus EHEC. Eventuell ist StcE durch O-Acetylierungen der Neuraminsäuren in ihrer Aktivität inhibiert, was bestätigen würde, weshalb die *nanS*-p Mutanten die Muzinschicht der LS 180 Zellen nicht degradieren konnten, obwohl das Gen *stcE* in Bakterien kodiert war. Die Abhängigkeit von StcE durch 9-O-Acetylerasen könnte bestätigt werden, indem MUC2 mit StcE und NanS-p co-inkubiert wird. Mittels SDS-PAGE müsste man die Degradierung erkennen. Zusätzlich könnte man den Einfluss der 9-O-Acetylerasen des Serotyps O104:H4 auf den Abbau von Muzin analysieren. Der Serotyp kodiert nicht für die Muzinase StcE, allerdings für die Serinprotease Pic, welche Muzin binden und degradieren kann (94). Da die Bindung stark von Neuraminsäuren abhängig ist, könnten die 9-O-Acetylerasen die Aktivität von Pic ebenfalls beeinflussen (96).

Die Adhärenz in Abhängigkeit der 9-O-Acetylerasen konnte bestätigt werden. In Viren sind die Enzyme nicht nur für die de-O-Acetylierung der Rezeptor-gebundenen Neuraminsäuren verantwortlich, sondern vermitteln dem Virus auch die Bindung an den Rezeptor (164). Inwiefern NanS-p diese Rezeptorbindende Eigenschaft aufweist, sollte ebenfalls analysiert werden. In diesem Zusammenhang könnte auch die

unbekannte Domäne DUF1737 untersucht werden. Hierfür können verschiedene Mutanten eingesetzt werden. Mittels der Datsenko und Wanner Methode könnte man verschiedene Teilsequenzen im *nanS*-p Gen deletieren (195). Setzt man diese Stämme in Adhärenzassays ein, so kann man die entscheidende Sequenz für die Bindung am Rezeptor identifizieren. Die Notwendigkeit der unbekanntes Domäne DUF1737 würde dadurch auch aufgeklärt werden.

Im Adhärenzassay war die erhöhte Aktivität von NanS-p15-His auffällig. Dieses weist nach Expression und Aufreinigung eine Doppelbande auf, wobei die untere Bande der eigentlichen Größe des Proteins entspricht. In vorherigen Arbeiten (Masterarbeit Lisa Schwarz; 2017) konnte keine eindeutige Modifikation mittels massenspektrometrischen Analysen gezeigt werden. Virale O-Acetyltransferasen weisen häufig N-Glykosylierungen auf. Sollte NanS-p15-His ebenfalls N-glykosyliert sein, könnte man dieses mit der PNGase F inkubiert werden. Dieses sollte die Modifikation abspalten, wodurch nach Analyse mittels SDS-PAGE nur noch eine Bande zu sehen sein sollte.

NanS kann Neuraminsäuren im periplasmatischen Raum des Bakteriums de-O-acetylieren, wodurch die Grundstruktur ins Cytoplasma gelangen kann (147). Sollten NanS-p ebenfalls intrazellulär vorliegen, könnten sie keine Glykan-gebundenen Neuraminsäuren de-O-acetylieren. Der Abbau von Muzin und die Adhärenz an Epithelzellen erfolgten in Abhängigkeit der 9-O-Acetyltransferasen. Demnach müssten die Enzyme extrazellulär aktiv sein, da die Neuraminsäuren sowohl im Muzin der LS 180 Zellen, als auch an Rezeptoren der HT-29 Zellen gebunden waren. Eine Analyse mittels Proteinase K und der Herstellung von Sphäroblasten könnte Aufschluss über die Lokalisierung von NanS-p geben. Nach und nach wird mittels der Methode die Zellwand und extrazelluläre Membran-gebundene Proteine entfernt. Die Entfernung wird mittels SDS-PAGE und der Verwendung spezifischer Antikörper im Westernblot analysiert. Eine weitere mögliche Lokalisierung der Esterasen ist am Bakteriophagen. Virale O-Acetyltransferasen sind an der Phagenhülle gebunden. Durch die Gen-Lokalisierung der *nanS*-p auf Prophagen könnten auch NanS-p an Bakteriophagen gebunden sein. Um das zu analysieren könnte man in einer EHEC Kultur die Phagenexpression induzieren, diese anschließend isolieren und mittels MALDI-TOF analysieren.

Sollten NanS-p während der Infektion extrazellulär vorliegen, könnten sie eventuell wie Shiga Toxin 2 in den Blutkreislauf gelangen. Erythrozyten enthalten an der Membran gebunden Glykane, die endständig die O-acetylierte Neuraminsäure Neu5,9Ac₂ aufweisen (196). Die dadurch entstandene Ladung verhindert eine Agglutination der Blutzellen. Die O-Acetylerase aus Viren de-O-acetyliert die Neuraminsäuren und verursacht dadurch die Verklumpung der Zellen (196). Befinden sich NanS-p im Blut, könnten sie ebenfalls eine Agglutination auslösen. Hierfür könnte man wenige Tropfen Blut mit rekombinant exprimierten und aufgereinigten NanS-p inkubieren und eine mögliche Gerinnung feststellen.

Sollten tatsächlich Prophagen-kodierte 9-O-Acetylerasen aus EHEC als Virulenzfaktor fungieren, kann man zudem analysieren, inwiefern sie zur Zytotoxizität beitragen und im Zellkulturversuch einen Zytotoxizitätstest mit Wildtypen und *nanS-p* Deletionsmutanten durchführen.

Obwohl noch einige Experimente durchzuführen sind, um die exakte Funktion von NanS-p aus EHEC während der Infektion definieren zu können, zeigt die vorliegende Arbeit dennoch bereits deutlich, dass die Enzyme entscheidend für wichtige Vorgänge während des Infektionsprozesses sind und die Mehrfachausstattung an *nanS-p* Genen zur Fitness der Bakterien während der Infektion beitragen.

7. Literaturverzeichnis

1. Secher T, Brehin C, Oswald E. 2016. Early settlers: which *E. coli* strains do you not want at birth? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 311:G123-9. doi:10.1152/ajpgi.00091.2016.
2. Jacobi CA, Malfertheiner P. 2011. *Escherichia coli* Nissle 1917 (Mutaflor): new insights into an old probiotic bacterium. *Dig Dis* 29:600–607. doi:10.1159/000333307.
3. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2:123–140. doi:10.1038/nrmicro818.
4. Croxen MA, Finlay BB. 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 8:26–38. doi:10.1038/nrmicro2265.
5. Torres AG. 2017. *Escherichia coli* diseases in Latin America-a 'One Health' multidisciplinary approach. *Pathog Dis* 75. doi:10.1093/femspd/ftx012.
6. Pianciola L, D'Astek BA, Mazzeo M, Chinen I, Masana M, Rivas M. 2016. Genetic features of human and bovine *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated in Argentina. *Int J Med Microbiol* 306:123–130. doi:10.1016/j.ijmm.2016.02.005.
7. Page AV, Liles WC. 2013. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections and the Hemolytic-Uremic Syndrome. *Med Clin North Am* 97:681-95, xi. doi:10.1016/j.mcna.2013.04.001.
8. Nataro JP, Kaper JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:142–201. doi:10.1128/CMR.11.1.142.
9. Brzuszkiewicz E, Thürmer A, Schuldes J, Leimbach A, Liesegang H, Meyer F-D, Boelter J, Petersen H, Gottschalk G, Daniel R. 2011. Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Entero-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). *Arch Microbiol* 193:883–891. doi:10.1007/s00203-011-0725-6.
10. Foster MA, Iqbal J, Zhang C, McHenry R, Cleveland BE, Romero-Herazo Y, Fannesbeck C, Payne DC, Chappell JD, Halasa N, Gómez-Duarte OG. 2015. Enteropathogenic and enteroaggregative *E. coli* in stools of children with acute gastroenteritis in Davidson County, Tennessee. *Diagn Microbiol Infect Dis* 83:319–324. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2015.07.016.
11. Frank C, Werber D, Cramer JP, Askar M, Faber M, der Heiden M an, Bernard H, Fruth A, Prager R, Spode A, Wadl M, Zoufaly A, Jordan S, Kemper MJ, Follin P, Müller L, King LA, Rosner B, Buchholz U, Stark K, Krause G. 2011. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N Engl J Med* 365:1771–1780. doi:10.1056/NEJMoa1106483.
12. Hussein HS, Bollinger LM. 2005. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle. *J Food Prot* 68:2224–2241.
13. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* 308:681–685. doi:10.1056/NEJM198303243081203.
14. O'Brien AD, Melton AR, Schmitt CK, McKee ML, Batts ML, Griffin DE. 1993. Profile of *Escherichia coli* O157:H7 pathogen responsible for hamburger-borne outbreak of hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome in Washington. *J Clin Microbiol* 31:2799–2801.

15. Saxena T, Kaushik P, Krishna Mohan M. 2015. Prevalence of *E. coli* O157:H7 in water sources: an overview on associated diseases, outbreaks and detection methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 82:249–264. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2015.03.015.
16. Crump JA, Sulka AC, Langer AJ, Schaben C, Crielly AS, Gage R, Baysinger M, Moll M, Withers G, Toney DM, Hunter SB, Hoekstra RM, Wong SK, Griffin PM, van Gilder TJ. 2002. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm. *N Engl J Med* 347:555–560. doi:10.1056/NEJMoa020524.
17. Tilden J, Young W, McNamara AM, Custer C, Boesel B, Lambert-Fair MA, Majkowski J, Vugia D, Werner SB, Hollingsworth J, Morris JG. 1996. A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *Am J Public Health* 86:1142–1145.
18. Kintz E, Brainard J, Hooper L, Hunter P. 2017. Transmission pathways for sporadic Shiga-toxin producing *E. coli* infections: A systematic review and meta-analysis. *Int J Hyg Environ Health* 220:57–67. doi:10.1016/j.ijheh.2016.10.011.
19. Tuttle J, Gomez T, Doyle MP, Wells JG, Zhao T, Tauxe R v., Griffin PM. 1999. Lessons from a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections: insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties. *Epidemiol Infect* 122:185–192.
20. Griffin PM, Ostroff SM, Tauxe R v., Greene KD, Wells JG, Lewis JH, Blake PA. 1988. Illnesses associated with *Escherichia coli* O157:H7 infections. A broad clinical spectrum. *Ann Intern Med* 109:705–712.
21. Ochoa TJ, Cleary TG. 2003. Epidemiology and spectrum of disease of *Escherichia coli* O157. *Curr Opin Infect Dis* 16:259–263. doi:10.1097/01.qco.0000073777.11390.f2.
22. Gould LH, Demma L, Jones TF, Hurd S, Vugia DJ, Smith K, Shiferaw B, Segler S, Palmer A, Zansky S, Griffin PM. 2009. Hemolytic uremic syndrome and death in persons with *Escherichia coli* O157:H7 infection, foodborne diseases active surveillance network sites, 2000-2006. *Clin Infect Dis* 49:1480–1485. doi:10.1086/644621.
23. Yoshioka K, Moriguchi KYAN. 1999. Clinical features and treatment of children with hemolytic uremic syndrome caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection: Experience of an outbreak in Sakai City, 1996. *Pediatr Int* 41:223–227. doi:10.1046/j.1442-200X.1999.4121039.x.
24. Karch H, Janetzki-Mittmann C, Aleksic S, Datz M. 1996. Isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains from patients with hemolytic-uremic syndrome by using immunomagnetic separation, DNA-based methods, and direct culture. *J Clin Microbiol* 34:516–519.
25. Verweyen HM, Karch H, Brandis M, Zimmerhackl LB. 2000. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: following transmission routes. *Pediatr Nephrol* 14:73–83.
26. Robert Koch-Institut. Jahresstatistik meldepflichtiger Krankheiten nach Bundesland, Deutschland, 2016 und 2017.
27. Robert Koch-Institut. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2017.

28. Robert Koch-Institut. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2016.
29. Robert Koch-Institut. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2011.
30. Kampmeier S, Berger M, Mellmann A, Karch H, Berger P. 2018. The 2011 German Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak-The Danger Is Still Out There. *Curr Top Microbiol Immunol* 416:117–148. doi:10.1007/82_2018_107.
31. Hebbelstrup Jensen B, Olsen KEP, Struve C, Krogfelt KA, Petersen AM. 2014. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 27:614–630. doi:10.1128/CMR.00112-13.
32. Perna NT, Plunkett G, Burland V, Mau B, Glasner JD, Rose DJ, Mayhew GF, Evans PS, Gregor J, Kirkpatrick HA, Pósfai G, Hackett J, Klink S, Boutin A, Shao Y, Miller L, Grotbeck EJ, Davis NW, Lim A, Dimalanta ET, Potamouisis KD, Apodaca J, Anantharaman TS, Lin J, Yen G, Schwartz DC, Welch RA, Blattner FR. 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 409:529–533. doi:10.1038/35054089.
33. Putonti C, Luo Y, Katili C, Chumakov S, Fox GE, Graur D, Fofanov Y. 2006. A computational tool for the genomic identification of regions of unusual compositional properties and its utilization in the detection of horizontally transferred sequences. *Mol Biol Evol* 23:1863–1868. doi:10.1093/molbev/msl053.
34. Wick LM, Qi W, Lacher DW, Whittam TS. 2005. Evolution of Genomic Content in the Stepwise Emergence of *Escherichia coli* O157:H7⁺. *J Bacteriol* 187:1783–1791. doi:10.1128/JB.187.5.1783-1791.2005.
35. Burland V, Shao Y, Perna NT, Plunkett G, Sofia HJ, Blattner FR. 1998. The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic Acids Res* 26:4196–4204. doi:10.1093/nar/26.18.4196.
36. Stein PE, Boodhoo A, Tyrrell GJ, Brunton JL, Read RJ. 1992. Crystal structure of the cell-binding B oligomer of verotoxin-1 from *E. coli*. *Nature* 355:748–750. doi:10.1038/355748a0.
37. Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Piérard D, Buvens G, Karch H, Mellmann A, Caprioli A, Tozzoli R, Morabito S, Strockbine NA, Melton-Celsa AR, Sanchez M, Persson S, O'Brien AD. 2012. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J Clin Microbiol* 50:2951–2963. doi:10.1128/JCM.00860-12.
38. Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang W-L, Pulz M, Kuczius T, Ammon A, Karch H. 2002. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis* 185:74–84. doi:10.1086/338115.
39. Bielaszewska M, Friedrich AW, Aldick T, Schürk-Bulgrin R, Karch H. 2006. Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: predictor for a severe clinical outcome. *Clin Infect Dis* 43:1160–1167. doi:10.1086/508195.
40. Ostroff SM, Tarr PI, Neill MA, Lewis JH, Hargrett-Bean N, Kobayashi JM. 1989. Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157:H7 infections. *J Infect Dis* 160:994–998.

41. Pina DG, Johannes L, Castanho MARB. 2007. Shiga toxin B-subunit sequential binding to its natural receptor in lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* 1768:628–636. doi:10.1016/j.bbamem.2006.12.011.
42. Ling H, Boodhoo A, Hazes B, Cummings MD, Armstrong GD, Brunton JL, Read RJ. 1998. Structure of the shiga-like toxin I B-pentamer complexed with an analogue of its receptor Gb3. *Biochemistry* 37:1777–1788. doi:10.1021/bi971806n.
43. Sandvig K, van Deurs B. 2000. Entry of ricin and Shiga toxin into cells: molecular mechanisms and medical perspectives. *EMBO J* 19:5943–5950. doi:10.1093/emboj/19.22.5943.
44. Saxena SK, O'Brien AD, Ackerman EJ. 1989. Shiga toxin, Shiga-like toxin II variant, and ricin are all single-site RNA N-glycosidases of 28 S RNA when microinjected into *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 264:596–601.
45. Hehnly H, Longhini KM, Chen J-L, Stamnes M. 2009. Retrograde Shiga toxin trafficking is regulated by ARHGAP21 and Cdc42. *Mol Biol Cell* 20:4303–4312. doi:10.1091/mbc.e09-02-0155.
46. Battle SE, Brady MJ, Vanaja SK, Leong JM, Hecht GA. 2014. Actin pedestal formation by enterohemorrhagic *Escherichia coli* enhances bacterial host cell attachment and concomitant type III translocation. *Infect Immun* 82:3713–3722. doi:10.1128/IAI.01523-13.
47. Knutton S, Baldwin T, Williams PH, McNeish AS. 1989. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 57:1290–1298.
48. Brady MJ, Radhakrishnan P, Liu H, Magoun L, Murphy KC, Mukherjee J, Donohue-Rolfe A, Tzipori S, Leong JM. 2011. Enhanced Actin Pedestal Formation by Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Adapted to the Mammalian Host. *Front Microbiol* 2:226. doi:10.3389/fmicb.2011.00226.
49. Jarvis KG, Kaper JB. 1996. Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system. *Infect Immun* 64:4826–4829.
50. Perna NT, Mayhew GF, Pósfai G, Elliott S, Sonnenberg MS, Kaper JB, Blattner FR. 1998. Molecular Evolution of a Pathogenicity Island from Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7⁺. *Infect Immun* 66:3810–3817.
51. McDaniel TK, Jarvis KG, Sonnenberg MS, Kaper JB. 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1664–1668. doi:10.1073/pnas.92.5.1664.
52. Tobe T, Beatson SA, Taniguchi H, Abe H, Bailey CM, Fivian A, Younis R, Matthews S, Marches O, Frankel G, Hayashi T, Pallen MJ. 2006. An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdaoid phages in their dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:14941–14946. doi:10.1073/pnas.0604891103.
53. Karch H, Heesemann J, Laufs R, O'Brien AD, Tacket CO, Levine MM. 1987. A plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for expression of a new fimbrial antigen and for adhesion to epithelial cells. *Infect Immun* 55:455–461.
54. Tatsuno I, Horie M, Abe H, Miki T, Makino K, Shinagawa H, Taguchi H, Kamiya S, Hayashi T, Sasakawa C. 2001. *tox*B gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is

- required for full epithelial cell adherence phenotype. *Infect Immun* 69:6660–6669. doi:10.1128/IAI.69.11.6660-6669.2001.
55. Zhao H, Chen C, Xiong Y, Xu X, Lan R, Wang H, Yao X, Bai X, Liu X, Meng Q, Zhang X, Sun H, Zhao A, Bai X, Cheng Y, Chen Q, Ye C, Xu J. 2013. Global transcriptional and phenotypic analyses of *Escherichia coli* O157:H7 strain Xuzhou21 and its pO157_Sal cured mutant. *PLoS ONE* 8:e65466. doi:10.1371/journal.pone.0065466.
 56. Wang R, Luedtke BE, Bosilevac JM, Schmidt JW, Kalchayanand N, Arthur TM. 2016. *Escherichia coli* O157:H7 Strains Isolated from High-Event Period Beef Contamination Have Strong Biofilm-Forming Ability and Low Sanitizer Susceptibility, Which Are Associated with High pO157 Plasmid Copy Number. *J Food Prot* 79:1875–1883. doi:10.4315/0362-028X.JFP-16-113.
 57. Schmidt H, Karch H, Beutin L. 1994. The large-sized plasmids of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains encode hemolysins which are presumably members of the *E. coli* alpha-hemolysin family. *FEMS Microbiol Lett* 117:189–196. doi:10.1111/j.1574-6968.1994.tb06763.x.
 58. Schmidt H, Kernbach C, Karch H. 1996. Analysis of the EHEC hly operon and its location in the physical map of the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:h7. *Microbiology (Reading, Engl)* 142 (Pt 4):907–914. doi:10.1099/00221287-142-4-907.
 59. Schmidt H, Beutin L, Karch H. 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun* 63:1055–1061.
 60. Brunder W, Schmidt H, Karch H. 1996. KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology (Reading, Engl)* 142 (Pt 11):3305–3315. doi:10.1099/13500872-142-11-3305.
 61. Brunder W, Schmidt H, Karch H. 1997. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Mol Microbiol* 24:767–778.
 62. Khan AB, Naim A, Orth D, Grif K, Mohsin M, Prager R, Dierich MP, Würzner R. 2009. Serine protease espP subtype alpha, but not beta or gamma, of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* is associated with highly pathogenic serogroups. *Int J Med Microbiol* 299:247–254. doi:10.1016/j.ijmm.2008.08.006.
 63. Lathem WW, Grys TE, Witowski SE, Torres AG, Kaper JB, Tarr PI, Welch RA. 2002. StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7, specifically cleaves C1 esterase inhibitor. *Mol Microbiol* 45:277–288.
 64. Grys TE, Siegel MB, Lathem WW, Welch RA. 2005. The StcE protease contributes to intimate adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to host cells. *Infect Immun* 73:1295–1303. doi:10.1128/IAI.73.3.1295-1303.2005.
 65. Grys TE, Walters LL, Welch RA. 2006. Characterization of the StcE protease activity of *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* 188:4646–4653. doi:10.1128/JB.01806-05.
 66. Abreu AG, Barbosa AS. 2017. How *Escherichia coli* Circumvent Complement-Mediated Killing. *Front Immunol* 8:452. doi:10.3389/fimmu.2017.00452.

67. Yu ACY, Worrall LJ, Strynadka NCJ. 2012. Structural insight into the bacterial mucinase StcE essential to adhesion and immune evasion during enterohemorrhagic *E. coli* infection. *Structure* 20:707–717. doi:10.1016/j.str.2012.02.015.
68. Schmidt H, Henkel B, Karch H. 1997. A gene cluster closely related to type II secretion pathway operons of gram-negative bacteria is located on the large plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. *FEMS Microbiol Lett* 148:265–272. doi:10.1111/j.1574-6968.1997.tb10299.x.
69. Sandkvist M. 2001. Type II secretion and pathogenesis. *Infect Immun* 69:3523–3535. doi:10.1128/IAI.69.6.3523-3535.2001.
70. Ho TD, Davis BM, Ritchie JM, Waldor MK. 2008. Type 2 secretion promotes enterohemorrhagic *Escherichia coli* adherence and intestinal colonization. *Infect Immun* 76:1858–1865. doi:10.1128/IAI.01688-07.
71. Mahajan A, Currie CG, Mackie S, Tree J, McAteer S, McKendrick I, McNeilly TN, Roe A, La Ragione RM, Woodward MJ, Gally DL, Smith DGE. 2009. An investigation of the expression and adhesin function of H7 flagella in the interaction of *Escherichia coli* O157 : H7 with bovine intestinal epithelium. *Cell Microbiol* 11:121–137. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01244.x.
72. Chilcott GS, Hughes KT. 2000. Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:694–708. doi:10.1128/membr.64.4.694-708.2000.
73. Liu X, Matsumura P. 1994. The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons. *J Bacteriol* 176:7345–7351. doi:10.1128/jb.176.23.7345-7351.1994.
74. Clarke MB, Sperandio V. 2005. Transcriptional regulation of *flhDC* by QseBC and sigma (FliA) in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 57:1734–1749. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04792.x.
75. Sperandio V, Torres AG, Kaper JB. 2002. Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. *Mol Microbiol* 43:809–821. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.02803.x.
76. Bansal T, Englert D, Lee J, Hegde M, Wood TK, Jayaraman A. 2007. Differential effects of epinephrine, norepinephrine, and indole on *Escherichia coli* O157:H7 chemotaxis, colonization, and gene expression. *Infect Immun* 75:4597–4607. doi:10.1128/IAI.00630-07.
77. Lackraj T, Kim J in, Tran S-L, Barnett Foster DE. 2016. Differential modulation of flagella expression in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 by intestinal short-chain fatty acid mixes. *Microbiology (Reading, Engl)* 162:1761–1772. doi:10.1099/mic.0.000357.
78. Kim JC, Yoon JW, Kim C-H, Park M-S, Cho S-H. 2012. Repression of flagella motility in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 by mucin components. *Biochem Biophys Res Commun* 423:789–792. doi:10.1016/j.bbrc.2012.06.041.
79. Herold S, Paton JC, Srimanote P, Paton AW. 2009. Differential effects of short-chain fatty acids and iron on expression of *iha* in Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *Microbiology (Reading, Engl)* 155:3554–3563. doi:10.1099/mic.0.029454-0.

80. Tarr PI, Bilge SS, Vary JC, Jelacic S, Habeeb RL, Ward TR, Baylor MR, Besser TE. 2000. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect Immun* 68:1400–1407. doi:10.1128/iai.68.3.1400-1407.2000.
81. Toma C, Martínez Espinosa E, Song T, Miliwebsky E, Chinen I, Iyoda S, Iwanaga M, Rivas M. 2004. Distribution of putative adhesins in different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 42:4937–4946. doi:10.1128/JCM.42.11.4937-4946.2004.
82. Jordan DM, Cornick N, Torres AG, Dean-Nystrom EA, Kaper JB, Moon HW. 2004. Long polar fimbriae contribute to colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in vivo. *Infect Immun* 72:6168–6171. doi:10.1128/IAI.72.10.6168-6171.2004.
83. Farfan MJ, Cantero L, Vidal R, Botkin DJ, Torres AG. 2011. Long polar fimbriae of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 bind to extracellular matrix proteins. *Infect Immun* 79:3744–3750. doi:10.1128/IAI.05317-11.
84. Torres AG, Milflores-Flores L, Garcia-Gallegos JG, Patel SD, Best A, La Ragione RM, Martinez-Laguna Y, Woodward MJ. 2007. Environmental regulation and colonization attributes of the long polar fimbriae (LPF) of *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Med Microbiol* 297:177–185. doi:10.1016/j.ijmm.2007.01.005.
85. Navarro-Garcia F. 2014. *Escherichia coli* O104:H4 Pathogenesis: an Enterohemorrhagic *E. coli*/Shiga Toxin-Producing *E. coli* Explosive Cocktail of High Virulence. *Microbiol Spectr* 2. doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0008-2013.
86. Giles M, Cawthraw SA, AbuOun M, Thomas CM, Munera D, Waldor MK, La Ragione RM, Ritchie JM. 2018. Host-specific differences in the contribution of an ESBL IncI1 plasmid to intestinal colonization by *Escherichia coli* O104:H4. *J Antimicrob Chemother* 73:1579–1585. doi:10.1093/jac/dky037.
87. Nataro JP, Yikang D, Yingkang D, Walker K. 1994. AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 176:4691–4699. doi:10.1128/jb.176.15.4691-4699.1994.
88. Nataro JP, Deng Y, Maneval DR, German AL, Martin WC, Levine MM. 1992. Aggregative adherence fimbriae I of enterohemorrhagic *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infect Immun* 60:2297–2304.
89. Nataro JP, Yikang D, Giron JA, Savarino SJ, Kothary MH, Hall R. 1993. Aggregative adherence fimbria I expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* requires two unlinked plasmid regions. *Infect Immun* 61:1126–1131.
90. Velarde JJ, Varney KM, Inman KG, Farfan M, Dudley E, Fletcher J, Weber DJ, Nataro JP. 2007. Solution structure of the novel dispersin protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 66:1123–1135. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05985.x.
91. Dautin N, Bernstein HD. 2007. Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. *Annu Rev Microbiol* 61:89–112. doi:10.1146/annurev.micro.61.080706.093233.

92. Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D. 2004. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:692–744. doi:10.1128/MMBR.68.4.692-744.2004.
93. Dautin N. 2010. Serine Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs): Biogenesis and Function. *Toxins* 2:1179–1206. doi:10.3390/toxins2061179.
94. Harrington SM, Sheikh J, Henderson IR, Ruiz-Perez F, Cohen PS, Nataro JP. 2009. The Pic protease of enteroaggregative *Escherichia coli* promotes intestinal colonization and growth in the presence of mucin. *Infect Immun* 77:2465–2473. doi:10.1128/IAI.01494-08.
95. Henderson IR, Czczulin J, Eslava C, Noriega F, Nataro JP. 1999. Characterization of Pic, a Secreted Protease of *Shigella flexneri* and Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 67:5587–5596.
96. Gutiérrez-Jiménez J, Arciniega I, Navarro-García F. 2008. The serine protease motif of Pic mediates a dose-dependent mucolytic activity after binding to sugar constituents of the mucin substrate. *Microb Pathog* 45:115–123. doi:10.1016/j.micpath.2008.04.006.
97. Benjelloun-Touimi Z, Sansonetti PJ, Parsot C. 1995. SepA, the major extracellular protein of *Shigella flexneri*: autonomous secretion and involvement in tissue invasion. *Mol Microbiol* 17:123–135. doi:10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17010123.x.
98. Benjelloun-Touimi Z, Si Tahar M, Montecucco C, Sansonetti PJ, Parsot C. 1998. SepA, the 110 kDa protein secreted by *Shigella flexneri*: two-domain structure and proteolytic activity. *Microbiology (Reading, Engl)* 144 (Pt 7):1815–1822. doi:10.1099/00221287-144-7-1815.
99. Al-Hasani K, Navarro-Garcia F, Huerta J, Sakellaris H, Adler B. 2009. The immunogenic SigA enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a binds to HEp-2 cells and induces fodrin redistribution in intoxicated epithelial cells. *PLoS ONE* 4:e8223. doi:10.1371/journal.pone.0008223.
100. Al-Hasani K, Henderson IR, Sakellaris H, Rajakumar K, Grant T, Nataro JP, Robins-Browne R, Adler B. 2000. The *sigA* gene which is borne on the she pathogenicity island of *Shigella flexneri* 2a encodes an exported cytopathic protease involved in intestinal fluid accumulation. *Infect Immun* 68:2457–2463. doi:10.1128/iai.68.5.2457-2463.2000.
101. Yamaichi Y, Chao MC, Sasabe J, Clark L, Davis BM, Yamamoto N, Mori H, Kurokawa K, Waldor MK. 2015. High-resolution genetic analysis of the requirements for horizontal transmission of the ESBL plasmid from *Escherichia coli* O104:H4. *Nucleic Acids Res* 43:348–360. doi:10.1093/nar/gku1262.
102. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 13:42–51. doi:10.1038/nrmicro3380.
103. Peterson WL, Mackowiak PA, Barnett CC, Marling-Cason M, Haley ML. 1989. The human gastric bactericidal barrier: mechanisms of action, relative antibacterial activity, and dietary influences. *J Infect Dis* 159:979–983. doi:10.1093/infdis/159.5.979.
104. van Elsas JD, Semenov AV, Costa R, Trevors JT. 2011. Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *ISME J* 5:173–183. doi:10.1038/ismej.2010.80.

105. Yang J, Russell TW, Hocking DM, Bender JK, Srikhanta YN, Tauschek M, Robins-Browne RM. 2015. Control of acid resistance pathways of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strain EDL933 by PsrB, a prophage-encoded AraC-like regulator. *Infect Immun* 83:346–353. doi:10.1128/IAI.02758-14.
106. Carter MQ, Brandl MT, Louie JW, Kyle JL, Carychao DK, Cooley MB, Parker CT, Bates AH, Mandrell RE. 2011. Distinct acid resistance and survival fitness displayed by Curli variants of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* 77:3685–3695. doi:10.1128/AEM.02315-10.
107. Castanie-Cornet M-P, Penfound TA, Smith D, Elliott JF, Foster JW. 1999. Control of Acid Resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181:3525–3535.
108. Ma D, Lu P, Yan C, Fan C, Yin P, Wang J, Shi Y. 2012. Structure and mechanism of a glutamate-GABA antiporter. *Nature* 483:632–636. doi:10.1038/nature10917.
109. Yang B, Feng L, Wang F, Wang L. 2015. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* senses low biotin status in the large intestine for colonization and infection. *Nat Commun* 6. doi:10.1038/ncomms7592.
110. Stalb S, Barth SA, Sobotta K, Liebner-Tenorio E, Geue L, Menge C. 2018. Pro-inflammatory capacity of *Escherichia coli* O104:H4 outbreak strain during colonization of intestinal epithelial cells from human and cattle. *Int J Med Microbiol* 308:899–911. doi:10.1016/j.ijmm.2018.06.003.
111. Tran S-L, Billoud L, Lewis SB, Phillips AD, Schüller S. 2014. Shiga toxin production and translocation during microaerobic human colonic infection with Shiga toxin-producing *E. coli* O157:H7 and O104:H4. *Cell Microbiol* 16:1255–1266. doi:10.1111/cmi.12281.
112. Mellies JL, Lorenzen E. 2014. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Virulence Gene Regulation. *Microbiol Spectr* 2:EHEC-0004-2013. doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0004-2013.
113. Beckett D. 2009. Biotin sensing at the molecular level. *J Nutr* 139:167–170. doi:10.3945/jn.108.095760.
114. Han R, Xu L, Wang T, Liu B, Wang L. 2017. A Small Regulatory RNA Contributes to the Preferential Colonization of *Escherichia coli* O157:H7 in the Large Intestine in Response to a Low DNA Concentration. *Front Microbiol* 8:274. doi:10.3389/fmicb.2017.00274.
115. Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, Macfarlane GT. 1987. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28:1221–1227. doi:10.1136/gut.28.10.1221.
116. Topping DL, Clifton PM. 2001. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* 81:1031–1064. doi:10.1152/physrev.2001.81.3.1031.
117. Tobe T, Nakanishi N, Sugimoto N. 2011. Activation of motility by sensing short-chain fatty acids via two steps in a flagellar gene regulatory cascade in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 79:1016–1024. doi:10.1128/IAI.00927-10.
118. Barnett Foster D. 2013. Modulation of the enterohemorrhagic *E. coli* virulence program through the human gastrointestinal tract. *Virulence* 4:315–323. doi:10.4161/viru.24318.

119. Rogier EW, Frantz AL, Bruno MEC, Kaetzel CS. 2014. Secretory IgA is Concentrated in the Outer Layer of Colonic Mucus along with Gut Bacteria. *Pathogens* 3:390–403. doi:10.3390/pathogens3020390.
120. Liévin-Le Moal V, Servin AL. 2006. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clin. Microbiol. Rev.* 19:315–337. doi:10.1128/CMR.19.2.315-337.2006.
121. Tailford LE, Crost EH, Kavanaugh D, Juge N. 2015. Mucin glycan foraging in the human gut microbiome. *Front Genet* 6. doi:10.3389/fgene.2015.00081.
122. McGuckin MA, Lindén SK, Sutton P, Florin TH. 2011. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat Rev Microbiol* 9:265–278. doi:10.1038/nrmicro2538.
123. Johansson ME v., Larsson JMH, Hansson GC. 2010. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host–microbial interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:4659–4665. doi:10.1073/pnas.1006451107.
124. Johansson ME v., Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L, Hansson GC. 2008. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:15064–15069. doi:10.1073/pnas.0803124105.
125. Dharmani P, Srivastava V, Kisoosn-Singh V, Chadee K. 2009. Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens. *J Innate Immun* 1:123–135. doi:10.1159/000163037.
126. Hews CL, Tran S-L, Wegmann U, Brett B, Walsham ADS, Kavanaugh D, Ward NJ, Juge N, Schüller S. 2017. The StcE metalloprotease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* reduces the inner mucus layer and promotes adherence to human colonic epithelium ex vivo. *Cell Microbiol* 19. doi:10.1111/cmi.12717.
127. Nilsson HE, Ambort D, Bäckström M, Thomsson E, Koeck PJB, Hansson GC, Hebert H. 2014. Intestinal MUC2 mucin supramolecular topology by packing and release resting on D3 domain assembly. *J Mol Biol* 426:2567–2579. doi:10.1016/j.jmb.2014.04.027.
128. Bennett EP, Mandel U, Clausen H, Gerken TA, Fritz TA, Tabak LA. 2012. Control of mucin-type O-glycosylation: a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Glycobiology* 22:736–756. doi:10.1093/glycob/cwr182.
129. Ye J, Song L, Liu Y, Pan Q, Zhong X, Li S, Shang Y, Tian Y, He Y, Chen L, Chen W, Peng Z, Wang R. 2015. Core 2 Mucin-Type O-Glycan Is Related to EPEC and EHEC O157:H7 Adherence to Human Colon Carcinoma HT-29 Epithelial Cells. *Dig Dis Sci* 60:1977–1990. doi:10.1007/s10620-015-3548-5.
130. Le Bihan G, Sicard J-F, Garneau P, Bernalier-Donadille A, Gobert AP, Garrivier A, Martin C, Hay AG, Beaudry F, Harel J, Jubelin G. 2017. The NAG Sensor NagC Regulates LEE Gene Expression and Contributes to Gut Colonization by *Escherichia coli* O157:H7. *Front Cell Infect Microbiol* 7:134. doi:10.3389/fcimb.2017.00134.
131. Pacheco AR, Curtis MM, Ritchie JM, Munera D, Waldor MK, Moreira CG, Sperandio V. 2012. Fucose sensing regulates bacterial intestinal colonization. *Nature* 492:113–117. doi:10.1038/nature11623.

132. Snider TA, Fabich AJ, Conway T, Clinkenbeard KD. 2009. *E. coli* O157:H7 catabolism of intestinal mucin-derived carbohydrates and colonization. *Vet Microbiol* 136:150–154. doi:10.1016/j.vetmic.2008.10.033.
133. Conway T, Krogfelt KA, Cohen PS. 2004. The Life of Commensal *Escherichia coli* in the Mammalian Intestine. *EcoSal Plus* 1. doi:10.1128/ecosalplus.8.3.1.2.
134. Png CW, Lindén SK, Gilshenan KS, Zoetendal EG, McSweeney CS, Sly LI, McGuckin MA, Florin THJ. 2010. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *Am J Gastroenterol* 105:2420–2428. doi:10.1038/ajg.2010.281.
135. Hoskins LC, Agustines M, McKee WB, Boulding ET, Kriaris M, Niedermeyer G. 1985. Mucin degradation in human colon ecosystems. Isolation and properties of fecal strains that degrade ABH blood group antigens and oligosaccharides from mucin glycoproteins. *J Clin Invest* 75:944–953. doi:10.1172/JCI111795.
136. Robinson LS, Lewis WG, Lewis AL. 2017. The sialate *O*-acetyltransferase EstA from gut Bacteroidetes species enables sialidase-mediated cross-species foraging of 9-*O*-acetylated sialoglycans. *J Biol Chem* 292:11861–11872. doi:10.1074/jbc.M116.769232.
137. Juge N, Tailford L, Owen CD. 2016. Sialidases from gut bacteria: a mini-review. *Biochem Soc Trans* 44:166–175. doi:10.1042/BST20150226.
138. Freter R, Brickner H, Botney M, Cleven D, Aranki A. 1983. Mechanisms That Control Bacterial Populations in Continuous-Flow Culture Models of Mouse Large Intestinal Flora. *Infect Immun* 39:676–685.
139. Durso LM, Smith D, Hutkins RW. 2004. Measurements of fitness and competition in commensal *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 strains. *Appl Environ Microbiol* 70:6466–6472. doi:10.1128/AEM.70.11.6466-6472.2004.
140. Saile N, Schwarz L, Eißenberg K, Klumpp J, Fricke FW, Schmidt H. 2018. Growth advantage of *Escherichia coli* O104:H4 strains on 5-*N*-acetyl-9-*O*-acetyl neuraminic acid as a carbon source is dependent on heterogeneous phage-borne *nanS*-p esterases. *Int J Med Microbiol* 308:459–468. doi:10.1016/j.ijmm.2018.03.006.
141. Bertin Y, Chaucheyras-Durand F, Robbe-Masselot C, Durand A, La Foye A de, Harel J, Cohen PS, Conway T, Forano E, Martin C. 2013. Carbohydrate utilization by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine intestinal content. *Environ Microbiol* 15:610–622. doi:10.1111/1462-2920.12019.
142. Robbe C, Capon C, Maes E, Rousset M, Zweibaum A, Zanetta J-P, Michalski J-C. 2003. Evidence of regio-specific glycosylation in human intestinal mucins: presence of an acidic gradient along the intestinal tract. *J Biol Chem* 278:46337–46348. doi:10.1074/jbc.M302529200.
143. Vimr ER. 2013. Unified theory of bacterial sialometabolism: how and why bacteria metabolize host sialic acids. *ISRN Microbiol* 2013:816713. doi:10.1155/2013/816713.
144. Varki A, Schauer R. 2009. *Essentials of Glycobiology. Sialic Acids*, 2nd, Cold Spring Harbor (NY).

145. Peri S, Kulkarni A, Feyertag F, Berninsone PM, Alvarez-Ponce D. 2018. Phylogenetic Distribution of CMP-Neu5Ac Hydroxylase (CMAH), the Enzyme Synthetizing the Proinflammatory Human Xenoantigen Neu5Gc. *Genome Biol Evol* 10:207–219. doi:10.1093/gbe/evx251.
146. Torres AG, Zhou X, Kaper JB. 2005. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infect Immun* 73:18–29. doi:10.1128/IAI.73.1.18-29.2005.
147. Rangarajan ES, Ruane KM, Proteau A, Schrag JD, Valladares R, Gonzalez CF, Gilbert M, Yakunin AF, Cygler M. 2011. Structural and enzymatic characterization of NanS (Yjhs), a 9-*O*-Acetyl *N*-acetylneuraminic acid esterase from *Escherichia coli* O157:H7. *Protein Sci* 20:1208–1219. doi:10.1002/pro.649.
148. Saile N, Voigt A, Kessler S, Stressler T, Klumpp J, Fischer L, Schmidt H. 2016. *Escherichia coli* O157:H7 Strain EDL933 Harbors Multiple Functional Prophage-Associated Genes Necessary for the Utilization of 5-*N*-Acetyl-9-*O*-Acetyl Neuraminic Acid as a Growth Substrate. *Appl Environ Microbiol* 82:5940–5950. doi:10.1128/AEM.01671-16.
149. Kalivoda KA, Steenbergen SM, Vimr ER, Plumbridge J. 2003. Regulation of sialic acid catabolism by the DNA binding protein NanR in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 185:4806–4815. doi:10.1128/jb.185.16.4806-4815.2003.
150. Steenbergen SM, Jirik JL, Vimr ER. 2009. Yjhs (NanS) is required for *Escherichia coli* to grow on 9-*O*-acetylated *N*-acetylneuraminic acid. *J Bacteriol* 191:7134–7139. doi:10.1128/JB.01000-09.
151. Condemine G, Berrier C, Plumbridge J, Ghazi A. 2005. Function and expression of an *N*-acetylneuraminic acid-inducible outer membrane channel in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187:1959–1965. doi:10.1128/JB.187.6.1959-1965.2005.
152. Martinez J, Steenbergen S, Vimr E. 1995. Derived structure of the putative sialic acid transporter from *Escherichia coli* predicts a novel sugar permease domain. *J Bacteriol* 177:6005–6010. doi:10.1128/jb.177.20.6005-6010.1995.
153. Vimr ER, Troy FA. 1985. Regulation of sialic acid metabolism in *Escherichia coli*: role of *N*-acetylneuraminic acid pyruvate-lyase. *J Bacteriol* 164:854–860.
154. Latif H, Li HJ, Charusanti P, Palsson BØ, Aziz RK. 2014. A Gapless, Unambiguous Genome Sequence of the Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Strain EDL933. *Genome Announc* 2. doi:10.1128/genomeA.00821-14.
155. Fellner L, Huptas C, Simon S, Mühlhig A, Scherer S, Neuhaus K. 2016. Draft Genome Sequences of Three European Laboratory Derivatives from Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Strain EDL933, Including Two Plasmids. *Genome Announc* 4. doi:10.1128/genomeA.01331-15.
156. Plunkett G, Rose DJ, Durfee TJ, Blattner FR. 1999. Sequence of Shiga toxin 2 phage 933W from *Escherichia coli* O157:H7: Shiga toxin as a phage late-gene product. *J Bacteriol* 181:1767–1778.
157. Nübling S, Eisele T, Stöber H, Funk J, Polzin S, Fischer L, Schmidt H. 2014. Bacteriophage 933W encodes a functional esterase downstream of the Shiga toxin 2a operon. *Int J Med Microbiol* 304:269–274. doi:10.1016/j.ijmm.2013.10.008.
158. Herold S, Siebert J, Huber A, Schmidt H. 2005. Global expression of prophage genes in *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933 in response to norfloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 49:931–944. doi:10.1128/AAC.49.3.931-944.2005.

159. Polzin S, Huber C, Eylert E, Elsenhans I, Eisenreich W, Schmidt H. 2013. Growth media simulating ileal and colonic environments affect the intracellular proteome and carbon fluxes of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933. *Appl Environ Microbiol* 79:3703–3715. doi:10.1128/AEM.00062-13.
160. Rangel A, Steenbergen SM, Vimr ER. 2016. Unexpected Diversity of *Escherichia coli* Sialate *O*-Acetyl Esterase NanS. *J Bacteriol* 198:2803–2809. doi:10.1128/JB.00189-16.
161. Corfield AP, Wagner SA, Clamp JR, Kriaris MS, Hoskins LC. 1992. Mucin degradation in the human colon: production of sialidase, sialate *O*-acetyl esterase, *N*-acetylneuraminidase, arylesterase, and glycosulfatase activities by strains of fecal bacteria. *Infect Immun* 60:3971–3978.
162. Phansopa C, Kozak RP, Liew LP, Frey AM, Farmilo T, Parker JL, Kelly DJ, Emery RJ, Thomson RI, Royle L, Gardner RA, Spencer DIR, Stafford GP. 2015. Characterization of a sialate-*O*-acetyl esterase (NanS) from the oral pathogen *Tannerella forsythia* that enhances sialic acid release by NanH, its cognate sialidase. *Biochem J* 472:157–167. doi:10.1042/BJ20150388.
163. Kakkanat A, Phan M-D, Lo AW, Beatson SA, Schembri MA. 2017. Novel genes associated with enhanced motility of *Escherichia coli* ST131. *PLoS ONE* 12:e0176290. doi:10.1371/journal.pone.0176290.
164. Strasser P, Unger U, Strobl B, Vilas U, Vlasak R. 2004. Recombinant viral sialate-*O*-acetyl esterases. *Glycoconj J* 20:551–561. doi:10.1023/B:GLYC.0000043292.64358.f1.
165. Ayora-Talavera G. 2018. Sialic acid receptors: focus on their role in influenza infection. *JRLCR Volume* 10:1–11. doi:10.2147/JRLCR.S140624.
166. Byrd-Leotis L, Cummings RD, Steinhauer DA. 2017. The Interplay between the Host Receptor and Influenza Virus Hemagglutinin and Neuraminidase. *Int J Mol Sci* 18. doi:10.3390/ijms18071541.
167. Matrosovich M, Herrler G, Klenk HD. 2015. Sialic Acid Receptors of Viruses. *Top Curr Chem* 367:1–28. doi:10.1007/128_2013_466.
168. Grant SG, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D. 1990. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:4645–4649. doi:10.1073/pnas.87.12.4645.
169. Studier FW, Moffatt BA. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189:113–130.
170. Zangari T, Melton-Celsa AR, Panda A, Boisen N, Smith MA, Tatarov I, Tolla LJ de, Nataro JP, O'Brien AD. 2013. Virulence of the Shiga toxin type 2-expressing *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak isolate in two animal models. *Infect Immun* 81:1562–1574. doi:10.1128/IAI.01310-12.
171. Sambrook J. 1989. *Molecular cloning*, 2. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
172. Feuerbaum S, Saile N, Pohlentz G, Müthing J, Schmidt H. 2018. De-*O*-Acetylation of mucin-derived sialic acids by recombinant NanS-p esterases of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933. *Int J Med Microbiol*. doi:10.1016/j.ijmm.2018.10.001.

173. Bufe T, Hennig A, Klumpp J, Weiss A, Nieselt K, Schmidt H. 2019. Differential transcriptome analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains reveals differences in response to plant-derived compounds. *BMC Microbiol* 19:212. doi:10.1186/s12866-019-1578-4.
174. Suzuki Y. 1997. The receptor destroying enzyme of influenza viruses. The role of the receptor destroying enzyme on the budding and the release of influenza viruses from the host cells. *Nippon Rinsho* 55:2660–2665.
175. Yang F, Yang L, Chang Z, Chang L, Yang B. 2018. Regulation of virulence and motility by acetate in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* 308:840–847. doi:10.1016/j.ijmm.2018.07.010.
176. Kamerling JP, Schauer R, Shukla AK, Stoll S, van Halbeek H, Vliegenthart JF. 1987. Migration of *O*-acetyl groups in *N,O*-acetylneuraminic acids. *Eur J Biochem* 162:601–607. doi:10.1111/j.1432-1033.1987.tb10681.x.
177. Xue Y, Zhang H, Wang H, Hu J, Du M, Zhu M-J. 2014. Host inflammatory response inhibits *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to gut epithelium through augmentation of mucin expression. *Infect Immun* 82:1921–1930. doi:10.1128/IAI.01589-13.
178. Conway T, Cohen PS. 2015. Commensal and Pathogenic *Escherichia coli* Metabolism in the Gut. *Microbiol Spectr* 3. doi:10.1128/microbiolspec.MBP-0006-2014.
179. Fagerquist CK, Zaragoza WJ. 2016. Bacteriophage cell lysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* for top-down proteomic identification of Shiga toxins 1 & 2 using matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 30:671–680. doi:10.1002/rcm.7507.
180. Wang M, Veit M. 2016. Hemagglutinin-esterase-fusion (HEF) protein of influenza C virus. *Protein Cell* 7:28–45. doi:10.1007/s13238-015-0193-x.
181. Pickard D, Toribio AL, Petty NK, van Tonder A, Yu L, Goulding D, Barrell B, Rance R, Harris D, Wetter M, Wain J, Choudhary J, Thomson N, Dougan G. 2010. A conserved acetyl esterase domain targets diverse bacteriophages to the Vi capsular receptor of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *J Bacteriol* 192:5746–5754. doi:10.1128/JB.00659-10.
182. Herrler G, Szepanski S, Schultze B. 1991. 9-*O*-acetylated sialic acid, a receptor determinant for influenza C virus and coronaviruses. *Behring Inst Mitt*:177–184.
183. Herrler G, Rott R, Klenk HD, Müller HP, Shukla AK, Schauer R. 1985. The receptor-destroying enzyme of influenza C virus is neuraminidase-*O*-acetyl esterase. *EMBO J* 4:1503–1506.
184. Czuchry D, Desormeaux P, Stuart M, Jarvis DL, Matta KL, Szarek WA, Brockhausen I. 2015. Identification and Biochemical Characterization of the Novel α 2,3-Sialyltransferase Wbwa from Pathogenic *Escherichia coli* Serotype O104. *J Bacteriol* 197:3760–3768. doi:10.1128/JB.00521-15.
185. Amon R, Reuven EM, Leviatan Ben-Arye S, Padler-Karavani V. 2014. Glycans in immune recognition and response. *Carbohydr Res* 389:115–122. doi:10.1016/j.carres.2014.02.004.
186. Sohanpal BK, Friar S, Roobol J, Plumbridge JA, Blomfield IC. 2007. Multiple co-regulatory elements and IHF are necessary for the control of *fimB* expression in response to sialic acid and

- N*-acetylglucosamine in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* 63:1223–1236. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05583.x.
187. Blomfield IC. 2015. Sialic acid and *N*-acetylglucosamine Regulate type 1 Fimbriae Synthesis. *Microbiol Spectr* 3. doi:10.1128/microbiolspec.MBP-0015-2014.
188. Groot RJ de. 2006. Structure, function and evolution of the hemagglutinin-esterase proteins of corona- and toroviruses. *Glycoconj J* 23:59–72. doi:10.1007/s10719-006-5438-8.
189. Côté J-P, Charbonneau M-È, Mourez M. 2013. Glycosylation of the *Escherichia coli* TibA self-associating autotransporter influences the conformation and the functionality of the protein. *PLoS ONE* 8:e80739. doi:10.1371/journal.pone.0080739.
190. Nothaft H, Szymanski CM. 2013. Bacterial protein *N*-glycosylation: new perspectives and applications. *J Biol Chem* 288:6912–6920. doi:10.1074/jbc.R112.417857.
191. Vimr ER, Bergstrom R, Steenbergen SM, Boulnois G, Roberts I. 1992. Homology among *Escherichia coli* K1 and K92 polysialyltransferases. *J Bacteriol* 174:5127–5131. doi:10.1128/jb.174.15.5127-5131.1992.
192. Steenbergen SM, Wrona TJ, Vimr ER. 1992. Functional analysis of the sialyltransferase complexes in *Escherichia coli* K1 and K92. *J Bacteriol* 174:1099–1108. doi:10.1128/jb.174.4.1099-1108.1992.
193. Turner L, Ping L, Neubauer M, Berg HC. 2016. Visualizing Flagella while Tracking Bacteria. *Biophys J* 111:630–639. doi:10.1016/j.bpj.2016.05.053.
194. Murray TS, Kazmierczak BI. 2006. FlhF is required for swimming and swarming in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 188:6995–7004. doi:10.1128/JB.00790-06.
195. Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6640–6645. doi:10.1073/pnas.120163297.
196. Schultze B, Gross HJ, Klenk HD, Brossmer R, Herrler G. 1990. Differential reactivity of bovine coronavirus (BCV) and influenza C virus with *N*-acetyl-9-*O*-acetylneuraminic acid (Neu5,9Ac2)-containing receptors. *Adv Exp Med Biol* 276:115–119.

8. Anhang

8.1. Cap-Contig Sequenz von pET22b(+)/nanS-p15

Das Insert des Plasmides pET22b(+)/nanS-p15 wurde mittels den Oligonukleotiden Nr. 887, 888, 1703, 1892, 1893 und 1894 sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm Bio Edit analysiert und aligniert. Zusätzlich wurde mittels des Programmes die cap-contig Sequenz mit der In-Silico Sequenz abgeglichen, welche zu 100 % identisch sind. Folgend die erhaltene cap-contig Sequenz:

```
1 GTGAGCGGAT AACAAATCCC CTCTAGAAAT AATTTTGTTC AACTTTAAGA
51 AGGAGATATA CAATGGCATT TAAACACTAT GACGTGGTCA GGGCGGCGTC
101 GCCGTCAGAC CTTGCGGAAC GAATAACTCA AAAACTGAAG GAAGGGTGGC
151 AGCCTTATGG TAGTGCGCTG ATTTTCGACAG CTGGTTATGG TGCGGAGTTC
201 ATCCAGCCAG TTGTGAGTGA GGGGAGCATC TCATCACCAG AGGAGCCAGG
251 CAACCGTCCG ACGACCTCAG CGCCTTCTGT TGCGCCAGAA TATTACTATG
301 TGATCGCGCT TGCTGGTCAG TCCAATGGTA TGTCATACGG TGAGGGACTG
351 CCATTACCGG ATACATTCGA CAGTCCTGAT CCACGAATTA AACAGTTAGC
401 GCGTCGCAGT ACGGTGACAC CGGGAGGTGC CGCCTGTAAG TATAACGACA
451 TCATTCCGGC GGACCATTGT CTGCATGATG TGCAGGACAT GAGCCGCCTT
501 AACCATCCGA AAGCGGACCT GTCAAAGGGG CAGTACGGAA CCGTGGGGCA
551 AGGGCTGCAT ATCGCCAAAA AATTGCTGCC GTTTATACCG GCGAATGCGG
601 GCATTCTGCT GGTTCCTGTC TGTCGTGGTG GTTCAGCGTT CACCACCGGA
651 GCCGATGGCA CATAAGTGA CGCGAGTGGT GCCTCGGAGA ATTCAACCCG
701 CTGGGGTGTG GACAAGCCGC TGTATAAGGA CCTTATCGGT CGAACAAAAG
751 CAGCACTGAA GAAGAATCCG AAAAATGTGC TGTTTGCCGT GGTGTGGATG
801 CAGGGGGAAT TTGATTTTGG CGGTACGCCG GTAAATCACG CAGCACAGTT
851 TGGTGCCTG GTTGATAAAT TCCGTGCAGA CCTGGCGGAT ATGGCAGGTC
901 AGTGCCTCGG TGCTCTGCT GCGGTGTTC CCTGGATATG CGGGGACACG
```

951 ACGTATTTCT GGAAGCAGAA GAACGAATCC ACGTACCAGA CGGTGTACGG
 1001 CAGCTACAAA AACAAAACGG AAAAGAATAT CCATTTTCGTA CCGTTCATGA
 1051 CGGATGAGAA CGGGGTGAAT GTGCCGACGA ACAAACCGGA AGAAGACCCG
 1101 GACATTCCGG GTATCGGATA TTACGGTTCG AAATGGCGTG ACAGCTCAGC
 1151 CACCTGGACG TCACAGGACA GGGCGAGCCA TTTCAGTTCA TGGGCTCGCC
 1201 GCGGGATTAT TTCCGACCGT CTGGCAACGG CGATTTTGCG CCATGCGGGA
 1251 AGAGTGGCGC TAAACGCGGG GGCATCATCG ACAGTATCAG AGGTGCGCCC
 1301 GTCATCGCCT TCCGGTGCAG AAGCCACAGG CGTCACAACA CTGCTCTCTT
 1351 ACCTTGCCAG CGAGTCAGAG GGAAGCCTGA AAGTACAGGG ATGGTCAGCC
 1401 AGTGGCGGCA GGGCAGAAGT GGTGAGCGAT GCGGAGGGAA CCGGAGGTAA
 1451 GGCAGTGAAG CTGACCAAGG AAGCCGGTAA AAGCAGCTGG GTGCTGGAGT
 1501 ACGCCGCGGG CAACGGTGCG GCTCTGTTAC AGAAAGGGGG GCAGATTTCG
 1551 TGCCGCTTTA AGGTTTCGGG AGCGCTGGCT GCGAACCAGT ATGTTATGGC
 1601 GTTTTACTGG CCGGTATCTT CACTGCCACA GGGCGTTGCC CTGACCGGAG
 1651 ACGGGGGGAA TAACCTGCTG GCAGCGTTCT ACATCCAGAC AGATGCAAAA
 1701 GACCTGAATG TGATGTACCA CAATGCGAAA GTAGCGACAA ACAACCTGAA
 1751 ACTGGGAACC TTTGGCGCAT TTGATAACGA ATGGCATATG CTGGCTTTCC
 1801 GCTTTGCCGG GAATAACAGC CTTGAGGTGA CGCCGTTAT TGATGGTCAG
 1851 GATGGCACAC CGTTCACGCT GACGCAGTCA CCGGTCAGTG CATTGCGGC
 1901 GGATAAACTG CATGTGACAG ACATTACCAG GAATGCGACT TACCCGGTGC
 1951 TGATTGACAG CATTGCGGTG GAAGTGAACA ACGCGGATGC CGCGGCATTC
 2001 GAGCACCAACC ACCACCACCA CTGAGATCCG GCTGCTAACA AAGCCCCGAAA
 2051 GGAAGCTGAG TTGGCTGCTG CCACCGCTGA GCAATAACTA GCATAACCC

ATG = Startcodon von *nanS*-p15

CAC... = His-kodierende Sequenz

TGA = Stoppcodon

8.2. Massenspektrometrische Analyse der de-O-Acetylierung von Glykan-gebundenen Neuraminsäuren durch NanS-p2-His und NanS-p4-His

Abbildung 10 zeigt die Massenspektren von detektierten Neuraminsäuren nach chemischer Freisetzung aus BSM nach Inkubation mit NanS-p4-His (Abb. 10A) bzw. NanS-p2-His (Abb. 10B). Die zugehörigen Ionen sowie deren m/z Werte sind in Tabelle 19 aufgelistet.

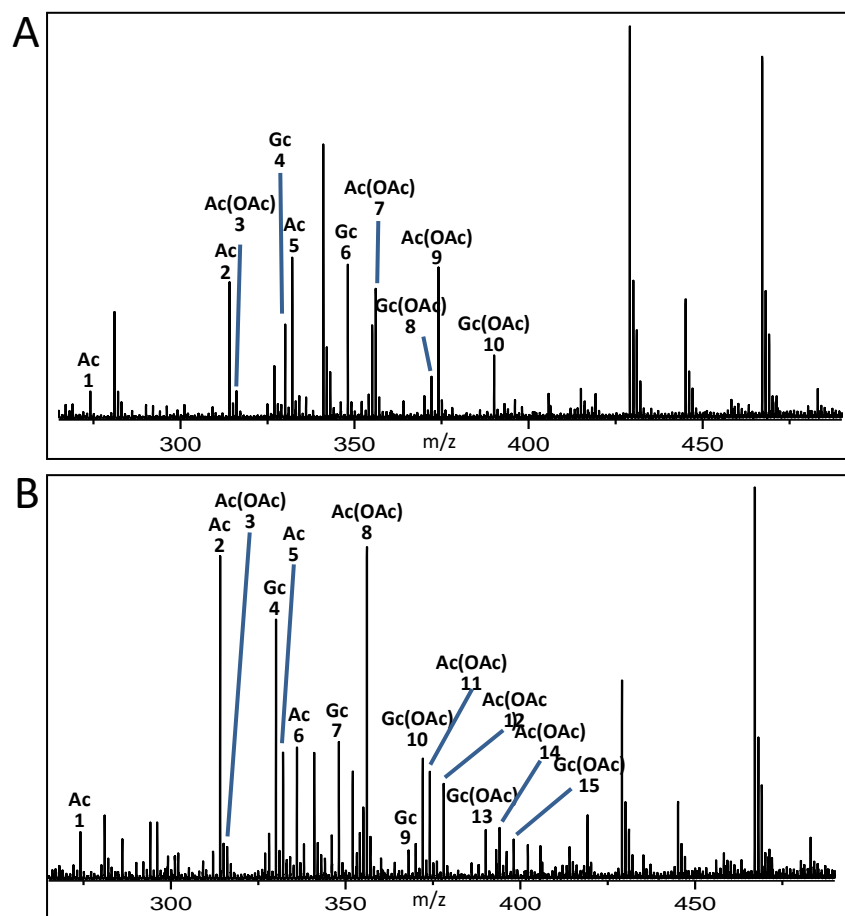


Abbildung 11. nanoESI Massenspektrum von chemisch freigesetzten Neuraminsäuren aus BSM nach Inkubation mit NanS-p4-His **(A)** und NanS-p2-His **(B)**. **(A)** Das Spektrum von NanS-p4-His behandeltem BSM zeigt Ionen zugehörig zu Neu5Ac, Neu5Gc, Neu5Ac(OAc) und Neu5Gc(OAc). **(B)** Entsprechende Ionen wurden ebenfalls im Spektrum von NanS-p2-His behandeltem BSM detektiert.

Ac, Neu5Ac; Ac(OAc), Neu5Ac(OAc); Gc, Neu5Gc; Gc(OAc), Neu5Gc(OAc). Nummerierte Ionen des Massenspektrums sind in Tabelle 19A und 19B aufgelistet.

Tabelle 19: Detektierte Ionen von Neuraminsäuren und korrespondierende m/z Werte nach chemischer Freisetzung aus BSM nach NanS-p4-His Behandlung **(A)** bzw. Inkubation mit NanS-p2-His **(B)**.

A

Nr.	Neuraminsäure	m/z	Nr.	Neuraminsäure	m/z
1	Neu5Ac ⁺ -H ₂ O	274.10	6	Neu5Gc [M+Na] ⁺	348.09
2	Neu5Ac ⁺ -H+Na	314.09	7	Neu5Ac(OAc) ⁺ -H+Na	356.10
3	Neu5Ac(OAc) ⁺ -H ₂ O	316.11	8	Neu5Gc(OAc) ⁺ -H+Na	372.09
4	Neu5Gc ⁺ -H+Na	330.08	9	Neu5Ac(OAc) [M+Na] ⁺	374.11
5	Neu5Ac [M+Na] ⁺	332.10	10	Neu5Gc(OAc) [M+Na] ⁺	390.10

B

Nr.	Neuraminsäure	m/z	Nr.	Neuraminsäure	m/z
1	Neu5Ac ⁺ -H ₂ O	274.10	9	Neu5Gc [M-H+2Na] ⁺	370.07
2	Neu5Ac ⁺ -H+Na	314.09	10	Neu5Gc(OAc) ⁺ -H+Na	372.09
3	Neu5Ac(OAc) ⁺ -H ₂ O	316.11	11	Neu5Ac(OAc) [M+Na] ⁺	374.11
4	Neu5Gc ⁺ -H+Na	330.08	12	Neu5Ac(OAc) ⁺ -2H+2Na	378.08
5	Neu5Ac [M+Na] ⁺	332.10	13	Neu5Gc(OAc) [M+Na] ⁺	390.10
6	Neu5Ac ⁺ -2H+2Na	336.07	14	Neu5Gc(OAc) ⁺ -2H+2Na	394.07
7	Neu5Gc [M+Na] ⁺	348.09	15	Neu5Ac(OAc) ₂ ⁺ -H+Na	398.11
8	Neu5Ac(OAc) ⁺ -H+Na	356.10			

8.3. Hydrolyse de-O-acetylierter Neuraminsäure nach Inkubation von BSM mit Sialidase BTSA-His und NanS-p2-His bzw. NanS-p4-His

Abbildung 11 zeigt die Massenspektren von detektierten Neuraminsäuren nach Hydrolyse aus BSM nach Inkubation mit BSTA-His und NanS-p4-His (Abb. 11A) bzw. NanS-p2-His (Abb. 11B). Die zugehörigen Ionen sowie deren m/z Werte sind in Tabelle 20 aufgelistet.

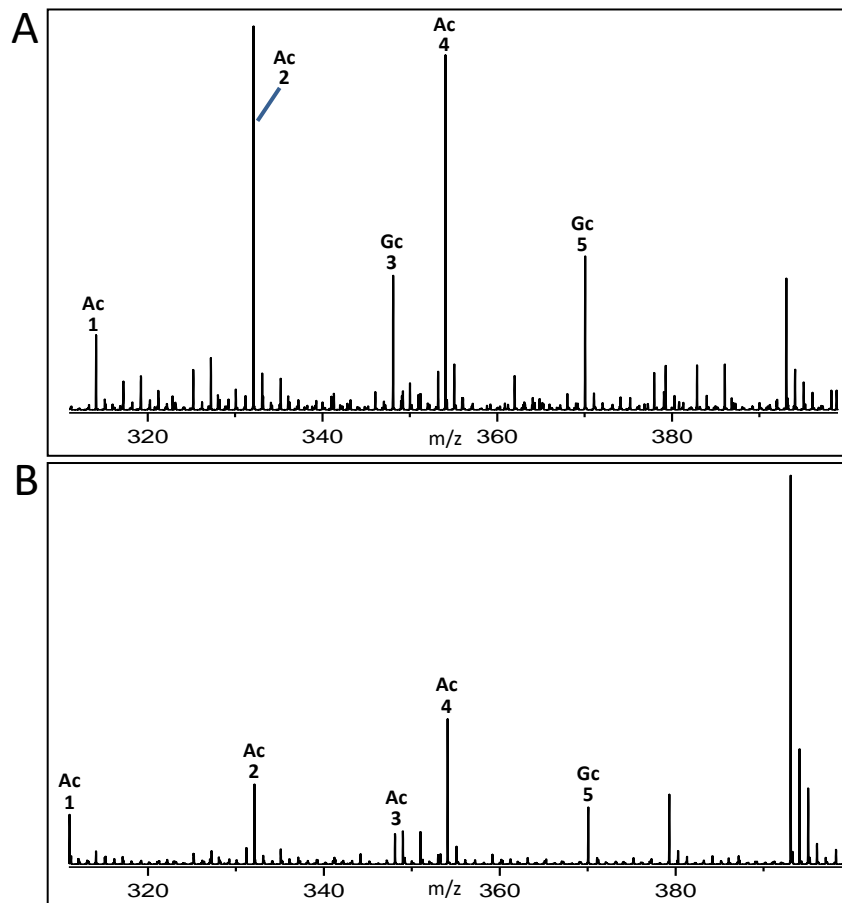


Abbildung 12: nanoESI Massenspektrum von hydrolysierten Neuraminsäuren aus BSM nach Inkubation mit BTSA-His und NanS-p4-His **(A)** bzw. NanS-p2-His **(B)**. **(A)** Das Spektrum von BTSA-His und NanS-p4-His behandeltem BSM zeigt Ionen zugehörig zu Neu5Ac und Neu5Gc. **(B)** Entsprechende Ionen wurden ebenfalls im Spektrum von BTSA-His und NanS-p2-His behandeltem BSM detektiert.

Ac, Neu5Ac; Gc, Neu5Gc. Nummerierte Ionen des Massenspektrums sind in Tabelle 20A und 20B aufgelistet.

Tabelle 20: Detektierte Ionen von Neuraminsäuren und korrespondierende m/z Werte aus BSM nach Inkubation mit BSTA-His + NanS-p4-His (**A**) bzw. BTSA-His + NanS-p2-His (**B**). Proteine wurden mittels Methanol gefällt und hydrolysierte Neuraminsäuren im Überstand mit nanoESI MS analysiert.

A

Nr.	Neuraminsäure	m/z
1	Neu5Ac+ -H+Na	314.09
2	Neu5Ac [M+Na] ⁺	332.10
3	Neu5Gc [M+Na] ⁺	348.09
4	Neu5Ac [M-H+2Na] ⁺	354.08
5	Neu5Gc [M-H+2Na] ⁺	370.07

B

Nr.	Neuraminsäure	m/z
1	Neu5Ac+ -H+Na	314.09
2	Neu5Ac [M+Na] ⁺	332.10
3	Neu5Gc [M+Na] ⁺	348.09
4	Neu5Ac [M-H+2Na] ⁺	354.08
5	Neu5Gc [M-H+2Na] ⁺	370.07

8.4. Ergebnisse des Bonferroni-Tests

8.4.1. Vergleich von EDL933 mit Mutanten und Zugabe der BTSA-His

In Tab. 21 weist Sig gleich 1,00 darauf hin, dass die Differenz der Mittelwerte auf 0,05-Niveau signifikant ist. Sig gleich 0,00 weist darauf hin, dass die Differenz der Mittelwerte auf 0,05-Niveau nicht signifikant ist.

Tabelle 21: Ergebnis des Bonferroni-Tests von EDL933 und Mutanten, sowie der Vergleich zwischen Mittelwerten der Adhärenz in Kombination mit der Sialidase BTSA-His.

	MeanDiff	SEM	t-Wert	Wahrsch.	Alpha	Sig	UEG	OEG
EDL933 + BTSA-His EDL933	-427777,78	49408,85	-8,66	0,00	0,05	1,00	-810552,43	-245003,12
EDL933ΔnanSΔnanS-p1-p7 EDL933	-239777,78	49408,85	-4,85	0,01	0,05	1,00	-422552,43	-57003,12
EDL933ΔnanSΔnanS-p1-p7 EDL933 + BTSA-His	188000,00	49408,85	3,80	0,04	0,05	1,00	5225,35	370774,65
EDL933ΔnanSΔnanS-p1-p7 + BTSA-His EDL933	-502555,56	49408,85	-10,17	0,00	0,05	1,00	-685330,21	-319780,90
EDL933ΔnanSΔnanS-p1-p7 + BTSA-His EDL933 + BTSA-His	-74777,78	49408,85	-1,51	1,00	0,05	0,00	-257552,43	107996,88
EDL933ΔnanSΔnanS-p1-p7 + BTSA-His EDL933ΔnanSΔnanS-p1-p7	-262777,78	49408,85	-5,32	0,00	0,05	1,00	-445552,43	-80003,12
EDL933ΔnanSΔnanS-p1-p5 EDL933	85000,00	49408,85	1,72	1,00	0,05	0,00	-97774,65	267774,65
EDL933ΔnanSΔnanS-p1-p5 EDL933 + BTSA-His	512777,78	49408,85	10,38	0,00	0,05	1,00	330003,12	695552,43
EDL933ΔnanSΔnanS-p1-p5 EDL933ΔnanSΔnanS-p1-p7	324777,78	49408,85	6,57	0,00	0,05	1,00	142003,12	507552,43
EDL933ΔnanSΔnanS-p1-p5 EDL933ΔnanSΔnanS-p1-p7 + BTSA-His	587555,56	49408,85	11,89	0,00	0,05	1,00	404780,90	770330,21
EDL933ΔnanSΔnanS-p1-p5 + BTSA-His EDL933	-531888,89	49408,85	-10,77	0,00	0,05	1,00	-714663,54	-349114,24
EDL933ΔnanSΔnanS-p1-p5 + BTSA-His EDL933 + BTSA-His	-104111,11	49408,85	-2,11	1,00	0,05	0,00	-286885,76	78663,54
EDL933ΔnanSΔnanS-p1-p5 + BTSA-His EDL933ΔnanSΔnanS-p1-p7	-292111,11	49408,85	-5,91	0,00	0,05	1,00	-474885,76	-109336,46
EDL933ΔnanSΔnanS-p1-p5 + BTSA-His EDL933ΔnanSΔnanS-p1-p7 + BTSA-His	-29333,33	49408,85	-0,59	1,00	0,05	0,00	-212107,99	153441,32
EDL933ΔnanSΔnanS-p1-p5 + BTSA-His EDL933ΔnanSΔnanS-p1-p5	-616888,89	49408,85	-12,49	0,00	0,05	1,00	-799663,54	-434114,24
EDL933ΔnanSΔnanS-p1-p7 + NanS-p1-His EDL933	-68444,44	49408,85	-1,39	1,00	0,05	0,00	-251219,10	114330,21
EDL933ΔnanSΔnanS-p1-p7 + NanS-p1-His EDL933 + BTSA-His	359333,33	49408,85	7,27	0,00	0,05	1,00	176558,68	542107,99
EDL933ΔnanSΔnanS-p1-p7 + NanS-p1-His EDL933ΔnanSΔnanS-p1-p7	171333,33	49408,85	3,47	0,08	0,05	0,00	-11441,32	354107,99
EDL933ΔnanSΔnanS-p1-p7 + NanS-p1-His EDL933ΔnanSΔnanS-p1-p7 + BTSA-His	434111,11	49408,85	8,79	0,00	0,05	1,00	251336,46	616885,76
EDL933ΔnanSΔnanS-p1-p7 + NanS-p1-His EDL933ΔnanSΔnanS-p1-p5	-153444,44	49408,85	-3,11	0,16	0,05	0,00	-336219,10	29330,21
EDL933ΔnanSΔnanS-p1-p7 + NanS-p1-His EDL933ΔnanSΔnanS-p1-p5 + BTSA-His	463444,44	49408,85	9,38	0,00	0,05	1,00	280669,79	646219,10

8.4.2. Vergleich von C227-11Φcu mit Mutanten und Zugabe der BTSA-His

In Tab. 22 weist Sig gleich 1,00 darauf hin, dass die Differenz der Mittelwerte auf 0,05-Niveau signifikant ist. Sig gleich 0,00 weist darauf hin, dass die Differenz der Mittelwerte auf 0,05-Niveau nicht signifikant ist.

Tabelle 22: Ergebnis des Bonferroni-Tests von C227-11Φcu und Mutanten, sowie der Vergleich zwischen Mittelwerten der Adhärenz in Kombination mit der Sialidase BTSA-His.

	MeanDiff	SEM	t-Wert	Wahrsch.	Alpha	Sig	UEG	OEG
C227/11 ΦcuΔnanS-p11-p14 C227/11 Φcu	-858888,89	209415,40	-4,10	0,02	0,05	1,00	-1633564,42	-84213,38
C227/11ΦcuΔnanS-p11-p14 + NanS-p15-His C227/11 Φcu	1211111,11	209415,40	5,78	0,00	0,05	1,00	436435,58	1985786,64
C227/11ΦcuΔnanS-p11-p14 + NanS-p15-His C227/11 ΦcuΔnanS-p11-p14	2070000,00	209415,40	9,88	0,00	0,05	1,00	1295324,47	2844675,53
C227/11 ΦcuΔnanS-p11-p12 C227/11 Φcu	-431111,11	209415,40	-2,06	1,00	0,05	0,00	-1205786,64	343564,42
C227/11 ΦcuΔnanS-p11-p12 C227/11 ΦcuΔnanS-p11-p14	427777,78	209415,40	2,04	1,00	0,05	0,00	-346897,75	1202453,31
C227/11 ΦcuΔnanS-p11-p12 C227/11ΦcuΔnanS-p11-p14 + NanS-p15-His	-1642222,22	209415,40	-7,84	0,00	0,05	1,00	-2416897,75	-867546,69
C227/11Φcu + BTSA-His C227/11 Φcu	-1023111,11	209415,40	-4,89	0,01	0,05	1,00	-1797786,64	-248435,58
C227/11Φcu + BTSA-His C227/11 ΦcuΔnanS-p11-p14	-164222,22	209415,40	-0,78	1,00	0,05	0,00	-938897,75	610453,31
C227/11Φcu + BTSA-His C227/11ΦcuΔnanS-p11-p14 + NanS-p15-His	-2234222,22	209415,40	-10,67	0,00	0,05	1,00	-3008897,75	-1459546,69
C227/11Φcu + BTSA-His C227/11 ΦcuΔnanS-p11-p12	-592000,00	209415,40	-2,83	0,28	0,05	0,00	-1366675,53	182675,53
C227/11ΦcuΔnanS-p11-p14 + BTSA-His C227/11 Φcu	-1241333,33	209415,40	-5,93	0,00	0,05	1,00	-2016008,86	-466657,80
C227/11ΦcuΔnanS-p11-p14 + BTSA-His C227/11 ΦcuΔnanS-p11-p14	-382444,44	209415,40	-1,83	1,00	0,05	0,00	-1157119,97	392231,09
C227/11ΦcuΔnanS-p11-p14 + BTSA-His C227/11ΦcuΔnanS-p11-p14 + NanS-p15-His	-2452444,44	209415,40	-11,71	0,00	0,05	1,00	-3227119,97	-1677768,91
C227/11ΦcuΔnanS-p11-p14 + BTSA-His C227/11 ΦcuΔnanS-p11-p12	-810222,22	209415,40	-3,87	0,04	0,05	1,00	-1584897,75	-35546,69
C227/11ΦcuΔnanS-p11-p14 + BTSA-His C227/11Φcu + BTSA-His	-218222,22	209415,40	-1,04	1,00	0,05	0,00	-992897,75	556453,31
C227/11ΦcuΔnanS-p11-p12 + BTSA-His C227/11 Φcu	-1062888,89	209415,40	-5,08	0,00	0,05	1,00	-1837564,42	-288213,38
C227/11ΦcuΔnanS-p11-p12 + BTSA-His C227/11 ΦcuΔnanS-p11-p14	-204000,00	209415,40	-0,97	1,00	0,05	0,00	-978675,53	570675,53
C227/11ΦcuΔnanS-p11-p12 + BTSA-His C227/11ΦcuΔnanS-p11-p14 + NanS-p15-His	-2274000,00	209415,40	-10,86	0,00	0,05	1,00	-3048675,53	-1499324,47
C227/11ΦcuΔnanS-p11-p12 + BTSA-His C227/11 ΦcuΔnanS-p11-p12	-631777,78	209415,40	-3,02	0,19	0,05	0,00	-1406453,31	142897,75
C227/11ΦcuΔnanS-p11-p12 + BTSA-His C227/11Φcu + BTSA-His	-39777,78	209415,40	-0,19	1,00	0,05	0,00	-814453,31	734897,75
C227/11ΦcuΔnanS-p11-p12 + BTSA-His C227/11ΦcuΔnanS-p11-p14 + BTSA-His	178444,44	209415,40	0,85	1,00	0,05	0,00	-596231,09	953119,97

8.5. Aminosäuresequenz-Alignment von NanS-p1 und NanS-p15

Vergleich der Aminosäuresequenz von NanS-p1 aus O157:H7 EDL933 (NCBI Referenz-Sequenz: NZ_CP008957.1) und NanS-p15 aus O104:H4 LB226692 (NCBI Referenz-Sequenz: NZ_CP024992.1). Unterschiede in der Sequenz sind rot markiert. Die Proteinsequenzen mit jeweils 645 Aminosäuren sind zu 98,91 % identisch.

Query 1 = NanS-p1

Query 2 = NanS-p15

Query 1	1	MAFKHYDVVRAASPSDLA K RITQKLKEGWQPYGSALISTAGYGAEFIQPVVSEGSISSPE	60
Query 2	1	MAFKHYDVVRAASPSDLA E RITQKLKEGWQPYGSALISTAGYGAEFIQPVVSEGSISSPE	60
Query 1	61	EPGNRPTTSAPSVAPEYYYYVIALAGQSNGMSYGEGLPLPDTFDSPPRIKQLARRSTVTP	120
Query 2	61	EPGNRPTTSAPSVAPEYYYYVIALAGQSNGMSYGEGLPLPDTFDSPPRIKQLARRSTVTP	120
Query 1	121	GGA V CKYNDIIPADHCLHDVQDMSRLNHPKADLSKGQYGTVGQGLHIAKLLPFIPANAG	180
Query 2	121	GGA A CKYNDIIPADHCLHDVQDMSRLNHPKADLSKGQYGTVGQGLHIAKLLPFIPANAG	180
Query 1	181	ILLVPCCRGGSFAFTTGADGTYSDasGASENSTRWGVDPKPLYKDLIGRTKAALKKNPKNVL	240
Query 2	181	ILLVPCCRGGSFAFTTGADGTYSDasGASENSTRWGVDPKPLYKDLIGRTKAALKKNPKNVL	240
Query 1	241	FAVWWMQGEFDFGGTPVNHAAQFGALVDKFRADLADMAGQCVGGSAGGVPWICGDTTYFW	300
Query 2	241	FAVWWMQGEFDFGGTPVNHAAQFGALVDKFRADLADMAGQCVGGSAGGVPWICGDTTYFW	300
Query 1	301	KQKNESTYQTVYGSYKNKTEKNIHFVPFMTDENGVNVPNTKPEEDPDIPIGIYYGSKWRD	360
Query 2	301	KQKNESTYQTVYGSYKNKTEKNIHFVPFMTDENGVNVPNTKPEEDPDIPIGIYYGSKWRD	360
Query 1	361	SSATWTSQDRASHFSSWARRGIISDRLATAILRHAGRVALNAGASSTVSEVRPSSPSGAE	420
Query 2	361	SSATWTSQDRASHFSSWARRGIISDRLATAILRHAGRVALNAGASSTVSEVRPSSPSGAE	420
Query 1	421	ATGVTTLLSYLASESEGSLKVQGWSASGGRAEVVSDAEGTGGKAVKLTKEAGKSSWVLEY	480
Query 2	421	ATGVTTLLSYLASESEGSLKVQGWSASGGRAEVVSDAEGTGGKAVKLTKEAGKSSWVLEY	480
Query 1	481	AAGNGAALLQKGGQIRCRFKVSGALANQYVMAFYWPVSSLPQGVALTGDGGNNLLAAFY	540

Query 2	481	AAGNGAALLQKGGQIRCFKVS GALAANQYVMAFYWPVSSLPQGVALTGDGGNNLLAAFY	540
Query 1	541	IQTDAKDLNVMYHNAKVATNNLKLGTFGAFDNEWHTLAFRFAGNNSLQVTPVIDGQDGTP	600
Query 2	541	IQTDAKDLNVMYHNAKVATNNLKLGTFGAFDNEWHMLAFRFAGNNSLQVTPVIDGQDGTP	600
Query 1	601	FTLTQSPVSAFAADKLHVTDITRGATYPVLIDSIAVEVNSTDTAA	645
Query 2	601	FTLTQSPVSAFAADKLHVTDITRNATYPVLIDSIAVEVNNADAAA	645

9. Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung über die eigenständig erbrachte Leistung

gemäß § 18 Absatz 3 Satz 5 der Promotionsordnung der Universität Hohenheim für die Fakultäten Agrar-, Natur- sowie Wirtschafts- und Sozialwissenschaften

1. Bei der eingereichten Dissertation zum Thema

„Funktionelle Charakterisierung von 9-O-Acetylerasen enterohämorrhagischer *Escherichia coli*“

handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.
3. Ich habe nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung oder -beratung in Anspruch genommen.
4. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und der strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärung bestätige ich. Ich versichere an Eides Statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Ort, Datum

Unterschrift

10. Lebenslauf

Name: Stefanie Feuerbaum

Anschrift: Rötestraße 5
70197 Stuttgart

Geboren am: 25.01.1990

Geburtsort: Offenbach am Main

Schulische Ausbildung

2001 bis 2007 Staatliche Realschule für Mädchen

2007 bis 2010 Bachgaugymnasium Babenhausen

Akademische Ausbildung

2010 bis 2011 Studium der Chemie (Bachelor of Science) an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

2011 bis 2013 Studium der Biologie (Bachelor of Science) an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Studienschwerpunkte: Biotechnologie, Pharmakologie

Thema der Bachelorarbeit: Identifikation von Interaktoren von LPHN3 mittels eines Yeast Two-Hybrid Verfahrens

2013 bis 2015 Studium der Biologie (Master of Science) an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Studienschwerpunkte: Mikrobiologie, molekulare Biotechnologie/Biophysik

Masterarbeit: Untersuchung der Promoteraktivität des Virulenzregulators Rsp in *Staphylococcus aureus*

2016 bis 2019 Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Universität
Hohenheim mit dem Ziel der Promotion
Thema der Dissertation:
Funktionelle Charakterisierung von 9-O-Acetylerasen
enterohämorrhagischer *Escherichia coli*

11. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Schmidt, für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung bei der Dissertation, sowie der kritischen Durchsicht meines Manuskriptes.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Fricke für die Übernahme des Zweitgutachters bedanken.

Danke an Herrn Prof. Dr. Müthing und Herrn Dr. Pohlentz für die erfolgreiche Kooperation und Durchführung der nanoESI MS Experimente.

Danke an Dr. Claudia Öllig des Institutes für Lebensmittelchemie für die Einweisung in HPTLC Analysen und der Hilfsbereitschaft bei Fragen.

Zudem möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Fachgebietes 150a bedanken. Besonderer Dank gilt Thorsten Bufe, Benjamin Forler und Annette Bruckbauer, die einem auch am grauesten Tag ein Lächeln ins Gesicht zaubern.

Vielen Dank auch an Anki und Maximilian für jedes aufmunternde Wort und die Unterstützung!

Liebste Kaddi, auch dir gilt ein besonderer Dank! Nicht nur für das Korrekturlesen meiner Arbeit, sondern für jede einzelne Aufmunterung, kreative und witzige Nachrichten, die mich immer zum Lachen bringen! Dein Antlitz allein spaltet den Phosphatrest vom sonst farblosen Nitrophenylphosphat ab!

Der größte Dank gilt meinen Eltern! Ohne eure unendlich große Hilfsbereitschaft und Unterstützung wäre ich nie so weit gekommen! Jedes offene Ohr und ermutigende Worte haben dazu beigetragen, dass ich durchgehalten habe und immer wieder Motivation gefunden habe, um weiter voranzukommen!