

**Untersuchungen zur O-Acetylierung der
Sialinsäuren im Lipopolysaccharid von
Escherichia coli 21701**

Dissertation

**zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel**

vorgelegt von

Jörg Pommerencke

Kiel

2000

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Struktur und Vorkommen von Sialinsäuren | 1 |
| 1.2 | Lipopolysaccharid von <i>E. coli</i> 21701: Aufbau und Funktion | 2 |
| 1.3 | Biologische Bedeutung der Sialinsäuren | 5 |
| 1.4 | O-Acetylierung von Sialinsäuren | 6 |
| 1.4.1 | O-acetylierte Sialinsäuren bei Eucaryoten | 7 |
| 1.4.2 | O-acetylierte Sialinsäuren im Bakterienreich | 8 |
| 1.5 | Genetik der O-Acetylierung | 10 |
| 1.6 | Fragestellungen | 11 |
| | | |
| 2 | Material und Methoden | 12 |
| 2.1. | Material | 12 |
| 2.1.1 | Chemikalien und Materialien | 12 |
| 2.1.2 | Enzyme | 14 |
| 2.1.3 | Kits | 14 |
| 2.1.4 | Vektoren | 15 |
| 2.1.5 | Transposon und Insertionselement | 15 |
| 2.1.6 | Geräte und Datenverarbeitungsprogramme | 15 |
| 2.1.7 | Lösungen | 17 |
| 2.1.8 | Bakterienstämme | 19 |
| 2.1.9 | Nährmedien und Antibiotika | 20 |
| 2.1.9.1 | Nährmedien | 20 |
| 2.1.9.2 | Antibiotika | 21 |
| 2.1.10 | Bakteriophagenmaterial | 21 |
| | | |
| 2.2 | Methoden | 22 |
| 2.2.1 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 22 |
| 2.2.1.1 | Durchführung der SDS-PAGE | 23 |
| 2.2.1.2 | Färbung von Lipopolysaccharid | 24 |
| 2.2.1.3 | Färbung von Proteinen | 24 |
| 2.2.2 | Isolierung von Lipopolysaccharid | 24 |
| 2.2.2.1 | Isolierung für NMR und Mikrotiterplatten-Assays | 24 |
| 2.2.2.2 | Isolierung für SDS-PAGE | 25 |
| 2.2.3 | Isolierung von Sialinsäuren | 25 |
| 2.2.4 | Chemisch-physikalische Analytik | 26 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.2.4.1 | Abspaltung von O-Acetylgruppen | 26 |
| 2.2.4.2 | Milder-Perjodsäure-Schiffreagenz-Test | 26 |
| 2.2.4.3 | Orcinol/Fe ³⁺ -Test (Bial-Test) | 27 |
| 2.2.4.4 | High Performance Liquid Chromatographie (HPLC) | 27 |
| 2.2.4.5 | Dünnschichtchromatographie | 28 |
| 2.2.4.6 | Hydroxamat-Test | 28 |
| 2.2.4.7 | Radioaktivitätsmessungen | 28 |
| 2.2.4.8 | Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR) | 29 |
| 2.2.5 | Biologisch-Immunologische Analytik | 29 |
| 2.2.5.1 | Behandlung der Sialinsäuren mit Lyase | 29 |
| 2.2.5.2 | Herstellung und Charakterisierung von Phagemid-„Antikörpern“ | 29 |
| 2.2.5.3 | Herstellung von Antikörpern durch Immunisierungen von Tieren | 31 |
| 2.2.5.3.1 | Polyklonale Antikörper | 32 |
| 2.2.5.3.2 | Monoklonale Antikörper | 33 |
| 2.2.5.3.3 | Antikörper gegen Bakteriophagen | 35 |
| 2.2.6 | DNA-Techniken | 36 |
| 2.2.6.1 | DNA-Isolierung | 36 |
| 2.2.6.2 | DNA-Modifikation | 37 |
| 2.2.6.3 | Transformation | 39 |
| 2.2.6.4 | DNA-Sonden | 40 |
| 2.2.6.5 | DNA-Analytik | 41 |
| 2.2.6.6 | Sequenzierung | 43 |
| 2.2.6.7 | DNA-Amplifikation | 45 |
| 2.2.6.8 | Expressionsklonierung | 47 |
| 2.2.7 | Induktion zur Phagenfreisetzung | 47 |
| 2.2.8 | Mutagenese des <i>Escherichia coli</i> Stammes | 48 |
| 2.2.8.1 | Mutagenese mittels UV-Licht | 48 |
| 2.2.8.2 | Transposonmutagenese | 48 |
| 2.2.8.3 | Mutagenese mit Hilfe eines Insertionselementes | 48 |
| 2.2.8.4 | Homologe Rekombination | 48 |
| 2.2.9 | Versuchsansätze zum Aktivitätsnachweis der Sialinsäure-spezifischen O-Acetyltransferase | 49 |
| 2.2.10 | Charakterisierung der Bakteriophagenadhäsion | 51 |
| 3. | Ergebnisse | 53 |
| 3.1 | Suche nach einem Detektionssystem für <i>E. coli</i>-Mutanten, die in der O-Acetylierung der Sialinsäuren im LPS defekt sind | 53 |
| 3.1.1 | mPAS-Test im Kolonieblot | 53 |
| 3.1.2 | Verwendung des pSKAN Phagemid Display Systems | 53 |
| 3.1.2.1 | Ergebnisse der Sequenzierung | 55 |
| 3.1.2.2 | Auswertung der Mikrotiterplatten-Tests | 56 |
| 3.1.3 | Polyklonale Antikörper | 57 |
| 3.1.4 | Monoklonale Antikörper | 58 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 3.1.4.1 | Ergebnisse der ELISA-Analyse | 59 |
| 3.1.4.2 | Western Blots | 60 |
| 3.1.4.3 | Kolonie-Blots | 61 |
| 3.2 | Analyse der Mutanten nach ungerichteter Mutagenese | 61 |
| 3.2.1 | Mutanten über Transposonmutagenese | 62 |
| 3.2.2 | Mutanten durch Verwendung eines Insertionselementes | 62 |
| 3.2.3 | Mutanten durch Bestrahlung mit UV-Licht | 62 |
| 3.3 | Ergebnisse der Induktion von Prophagen | 62 |
| 3.3.1 | Induktion durch Bestrahlung mit UV-Licht | 62 |
| 3.3.2 | Induktion durch Mitomycin C | 62 |
| 3.4 | Detektion eines O-Acetyltransferase-ähnlichen Gens | 63 |
| 3.4.1 | Produkt des Alignments bekannter O-Acetyltransferasen | 63 |
| 3.4.2 | Ergebnisse der Hybridisierungen | 64 |
| 3.4.3 | Ergebnis der Datenbankrecherche | 65 |
| 3.5. | Gerichtete Mutagenese durch homologe Rekombination | 69 |
| 3.5.1 | Homologe Rekombination mit dem Vektor pG ⁺ h9:Zielsequenz | 69 |
| 3.5.2 | Auswirkungen der Insertion | 71 |
| 3.6 | Komplementation zur Rekonstitution des Lipopolysaccharides | 74 |
| 3.6.1 | Hohe Expression des transferierten Gens | 74 |
| 3.6.2 | Ergebnis der Rekonstitution des Lipopolysaccharides | 75 |
| 3.7 | Enzymatischer Nachweis der Sialinsäure-spezifischen O-Acetyltransferase | 77 |
| 3.7.1 | Abwesenheit freier, O-acetylierter Sialinsäuren in den Zellen | 77 |
| 3.7.2 | Acetyl-CoenzymA als intrazellulärer Acetyl-Donor | 79 |
| 3.7.3 | Zellhomogenat im Bio-Assay | 84 |
| 3.8 | Charakterisierung der Enzymaktivität | 86 |
| 3.8.1 | Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit | 89 |
| 3.8.2 | Untersuchungen zur Abhängigkeit vom pH-Wert | 89 |
| 3.9 | Auswirkungen der O-Acetylierung für die Bakteriophagenadhäsion | 90 |
| 4 | Diskussion | 93 |
| 4.1 | Bewertung der Techniken zum Nachweis O-acetylierter Sialinsäuren | 93 |

| | | |
|-------------|---|------------|
| 4.2 | Bedeutung der Versuche zur Induktion von Prophagen | 96 |
| 4.3 | Beurteilung der ungerichteten Mutagenese | 96 |
| 4.4 | Detektion eines O-Acetyltransferase-ähnlichen Gens | 98 |
| 4.5 | Auswirkungen der homologen Rekombination | 99 |
| 4.6 | Komplementation zur Wiederherstellung des Lipopolysaccharides | 101 |
| 4.7 | Enzymatischer Nachweis der Sialinsäure-spezifischen O-Acetyltransferase | 102 |
| 4.8 | Biosynthese des O-Antigens | 107 |
| 4.9 | Veränderung der Antigenität durch O-Acetylierung der Sialinsäuren im LPS | 108 |
| 4.10 | Bedeutung der O-Acetylierung für die Adhäsion von Bakteriophagen | 110 |
| 4.11 | Ausblick | 112 |
| 5. | Zusammenfassung | 113 |
| 6. | Literaturverzeichnis | 115 |

Abkürzungen

| | |
|------------------|--|
| A | Adenosin |
| ABTS | 2,2'-Azido-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) |
| Abb. | Abbildung |
| Amp | Ampicillin |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| a. bidest. | zweifach destilliertes Wasser |
| Bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| °C | Grad Celsius |
| C | Cytidin |
| CHAPS | 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfat |
| CMP-Neu5Ac | Cytidin-5'-Monophospho- <i>N</i> -Acetylneuraminsäure |
| DAB | 3,3 Diaminobenzidin |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| DFP | Diisopropylfluorophosphat |
| DMB | 1,2 Diamino-4,5-methylenedioxybenzol |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonucleinsäure |
| DNTP | Desoxyribonucleosidtriphosphat |
| ds-DNA | Doppelstrang-DNA |
| DTT | Dithiothreitol |
| E | Extinktion |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiaminetetraacetat |
| EtOH | Ethanol |
| FCS | Fötale Kälberserum |
| G | Guanosin |
| Gal | Galaktose |
| GalNAc | <i>N</i> -Acetylgalaktosamin |
| GD ₃ | Disialogangliosid |
| GQ _{1b} | Tetrasialogangliosid |
| GT _{1b} | Trisialogangliosid |
| h | Stunde |
| HRP | horseradish peroxidase konjugierter Antikörper |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatographie |
| IPTG | Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid |
| kB | kilobasenpaare |
| KDO | 2-Keto-3-desoxy-octonsäure |
| l | Liter |
| LB-Medium | Luria Bertani-Medium |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| M | Mol/l bzw. molar |
| mAB | monoklonaler Antikörper |
| μ | Mikro- |
| mA | Milli-Ampere |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| MOPS | 3'(N-Morpholino)propansulfonsäure |

Abkürzungen

| | |
|-------------|--|
| N | Purin oder Pyrimidin |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| OD | optische Dichte |
| PAGE | Polyacryamidgelelektrophorese |
| PBS | Phosphatgepufferte Saline |
| PCR | Polymerase Ketten Reaktion |
| pH | Pondus Hydrogenii (negativer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration) |
| RE | Restriktionsenzym |
| RNAse | Ribonuklease |
| RPMI-Medium | Roswell Park Memorial Institute-Medium |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunde |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| ssDNA | Einzelstrang-DNA |
| Tab. | Tabelle |
| TBE | Tris Borat EDTA |
| TE | Tris EDTA |
| TEMED | <i>N,N,N,N</i> -Tetramethylethylendiamin |
| Tris | Tris-(hydroxyethyl)aminomethan |
| UpM | Umdrehung pro Minute |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| Vol | Volumen |
| X-Gal | 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktosid |
| YT-Medium | Hefeextrakt-Trypton- Medium |

1 Einleitung

1.1 Struktur und Vorkommen von Sialinsäuren

Struktur. Unter dem Begriff Sialinsäuren werden die mittlerweile mehr als 40 bekannten Derivate der Neuraminsäure (systematischer Name: 5-Amino-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonsäure) zusammengefaßt. Die Neuraminsäure ist chemisch gesehen ein aus neun Kohlenstoffatomen bestehender saurer Aminozucker, der in der Natur aber nur in substituierter Form vorliegt. Dabei stellt die *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) die einfachste und am häufigsten vorkommende Form der Sialinsäuren dar. Durch Substitution einer oder mehrerer Hydroxylgruppen kommt es zu der großen strukturellen Vielfalt (SCHAUER, 1982; VARKI, 1992; SCHAUER, 1995; SCHAUER und KAMERLING, 1997). Das am häufigsten vorkommende Derivat ist die *N*-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc). Sie entsteht durch das Ersetzen der Acetylgruppe an Position C-5 durch eine Hydroxylgruppe. Eine weitere wichtige Modifikation ist die *O*-Acetylierung, die an den Positionen C-4, C-7, C-8 und C-9 (SCHAUER; 1991; Varki, 1992) erfolgen kann. Daneben kommt es in der Natur aber auch zu Sulfatierungen an C-8 und C-9, einer Methylierung an C-8 oder zu einer Laktoylierung oder Phosphorylierung an C-9, wie in Abb. 1 als Übersicht dargestellt ist (WARREN, 1964; SCHAUER, 1982 und 1987; SCHAUER und KAMERLING, 1997, TRAVING und SCHAUER, 1998).

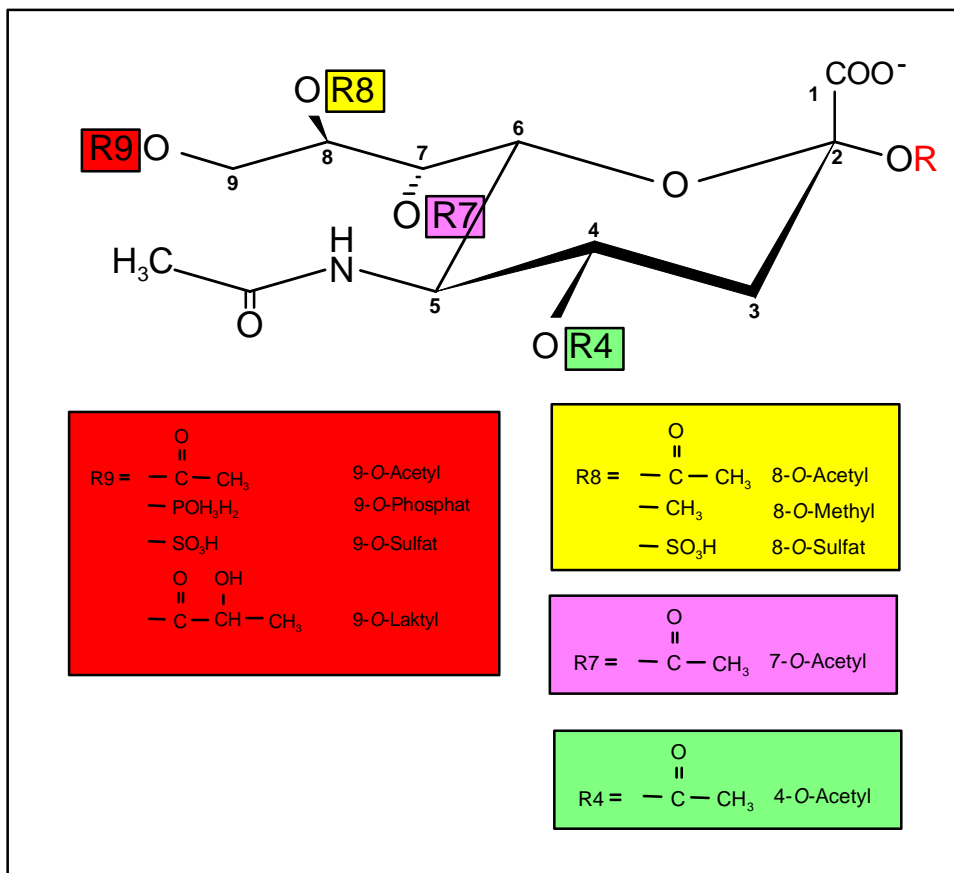


Abb. 1: Modifikationen der *N*-Acetylneuraminsäure

Die gezeigten Modifikationen können einzeln oder in Kombination auftreten.

(R) = Glykokonjugat

Eine weitere ungewöhnliche Modifikation findet sich an Position C-5, wo sich anstelle der Aminogruppe eine weitere Hydroxylgruppe befinden kann, was zu einer Bildung von 2-Keto-3-deoxy-D-glycero-D-galakto-2-nonulosonsäure (KDN) führt (NADANO et al., 1986). Diese Veränderung konnte bisher in Eiern des Lachses (IWASAKI et al., 1990) und der Regenbogenforelle (KANAMORI et al., 1990) nachgewiesen werden. Die strukturelle Vielfalt wird auch durch Kombinationen der einzelnen Modifikationen sowie durch unterschiedliche Verknüpfungen der Sialinsäuren (α -2-3, α -2-6, α -2-8 und α -2-9) mit den subterminalen Zuckern erweitert.

Die Variabilität der Sialinsäure wird noch zusätzlich durch ihre Lokalisation in Molekülen erhöht. Sie ist hauptsächlich terminaler Bestandteil von Glykokonjugaten, in denen sie über ihr C-2 Atom an den subterminalen Zucker (Galaktose oder *N*-Acetylgalaktosamin) gebunden ist (SCHAUER, 1982; SCHAUER, 1985). Weiterhin sind auch Polysialinsäuren bekannt, bei denen eine große Anzahl gleicher oder verschieden substituierter *N*-Acetylneuraminsäuremoleküle miteinander verknüpft sind (TROY, 1992 und 1995).

Vorkommen. Sialinsäuren kommen im Tierreich von den Echinodermaten bis zu den Säugetieren vor (CORFIELD und SCHAUER, 1982). Die Sialoglykokonjugate befinden sich sowohl auf Zelloberflächen (SCHAUER, 1985), als auch in intrazellulären Membranen wie zum Beispiel dem Golgi-Apparat (TRAVING und SCHAUER, 1998). Inzwischen finden sich auch immer mehr Hinweise auf das Vorhandensein von Sialinsäuren in Insekten, z.B. in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (ROTH et al., 1992), in der Großen Wachsmotte *Galleria mellonella* (KARAÇALI et al., 1997 und 1999) und in Zikadenlarven (MALYKH, pers. Mitteilung), allerdings nur in ganz bestimmten Entwicklungsstadien, was die Detektion dieser Zucker bei diesen Protostomiern bisher erschwert hat. Während bei Pflanzen bisher keine Sialinsäuren gefunden wurden, sind auch Pilze wie *Dictyostelium discoideum* (YOSHIDA et al., 1992) oder *Cryptococcus neoformans* (RODRIGUES et al., 1997) beschrieben, die an ihrer Oberfläche *N*-Acetylneuraminsäure tragen. Bei einigen Viren und Protozoen sind ebenfalls schon Sialinsäuren entdeckt worden (Varki, 1992; REUTER und GABIUS, 1996; SCHAUER und KAMERLING, 1997).

Im Reich der Bakterien wurden die ersten Sialinsäuren in *Escherichia coli* bereits 1959 von BARRY detektiert. Seitdem nimmt die Kenntnis über Sialinsäure-bildende Arten immer mehr zu. Interessanterweise sind es überwiegend pathogene Arten, die diese Zuckerspezies produzieren (siehe Tab.1). Das Vorkommen der Sialinsäuren beschränkt sich dabei auf Oberflächenstrukturen wie Kapsel (BARRY, 1959) und Lipopolysaccharid (BARRY et al., 1963).

1.2 Lipopolysaccharid von *E. coli* 21701: Aufbau und Funktion

Aufbau. Das Lipopolysaccharid (LPS) dieses Stammes ist aus zwei Komponenten, einem inneren Lipid-Anteil, der als Lipid A bezeichnet wird und den Anker des LPS in der Phospholipid-Schicht bildet, sowie einem Polysaccharidanteil zusammengesetzt (siehe Abb. 2). Das Lipid A besteht aus zwei phosphorylierten Glucosaminen, von denen jedes mit mehreren Fettsäuren verestert ist (RIETSCHEL et al., 1984). Der Polysaccharidanteil wird nochmal unterteilt in eine innere und eine äußere Kernregion (Core) und in das sich daran anschließende Sialinsäure-haltige O-Antigen. Die innere Kernregion ist bei allen Enterobacteriaceae wie *Salmonellen* oder *Escherichia coli* Stämmen nahezu identisch. Sie besteht aus 2-Keto-3-desoxy-Octonsäure (KDO), Heptosen und Ethanolamin (HÄMMERLING et al., 1971).

Tab. 1: Vorkommen von Sialinsäuren bei Bakterien

| Art | Serotyp | Vorkommen | O-acetyliert | Referenz |
|----------------------------------|----------------------|------------|--------------|--|
| <i>Bacteroides fragilis</i> | | Kapsel | | Kasper (1976) |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | O1, O2, O4, O23, O36 | | | Aspinall et al. (1992); Aspinal et al. (1993) |
| <i>Citrobacter freundii</i> | O37 | LPS | | Barry et al. (1963); Keleti et al. (1971) |
| <i>Escherichia coli</i> | K100 | Kapsel | | Barry (1959) |
| <i>Escherichia coli</i> | K1 | Kapsel | Zum Teil | Barry und Goebel (1957) |
| <i>Escherichia coli</i> | K92 | Kapsel | | Egan et al. (1977) |
| <i>Escherichia coli</i> | O9:K12:H12 | LPS | Zum Teil | Dutton (1987) |
| <i>Escherichia coli</i> | O104:K-:H12 | LPS | + | Kogan et al. (1992); Gamian et al.(1992) |
| <i>Escherichia coli</i> | O24 | LPS | | Kogan et al. (1993); Gamian et al.(1994) |
| <i>Escherichia coli</i> | O56 | LPS | | Kogan et al. (1993); Gamian et al.(1994) |
| <i>Moraxella nonliquefaciens</i> | | Kapsel | | Adlam et al. (1987) |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | | LOS | | Mandrell et al. (1990) |
| <i>Neisseria meningitidis</i> | A | Kapsel | ca 70 % | Bundle et al. (1974) |
| <i>Neisseria meningitidis</i> | B | Kapsel | | Bhattacharjee et al. (1975) |
| <i>Neisseria meningitidis</i> | C | Kapsel | + | Bhattacharjee et al. (1975) |
| <i>Neisseria meningitidis</i> | W-135 | Kapsel | + | Lemercinier und Jones (1996) |
| <i>Neisseria meningitidis</i> | Y | Kapsel | + | Bhattacharjee et al. (1976) |
| <i>Pasteurella haemolytica</i> | A2 | Kapsel | | Adlam et al. (1987) |
| <i>Rhizobium meliloti</i> | | LPS | Zum Teil | Defives et al. (1989) |
| <i>Rhodobacter capsulatus</i> | | LPS (Core) | | Krauss et al. (1988) |
| <i>Rhodobacter sphaeroides</i> | | LPS (Core) | | Krauss et al. (1988) |
| <i>Rhodobacter veldkampii</i> | | LPS (Core) | | Krauss et al. (1988) |
| <i>Salmonella arizonae</i> | O21 | LPS | | Vinogradov et al. (1993) |
| <i>Salmonella dahlea</i> | O5 | | | Kedzierska et al. (1968) |
| <i>Salmonella ngozi</i> | | | | Kedzierska et al. (1968) |
| <i>Streptococcus</i> | Group B Type III | Kapsel | | Edwards et al. (1982); Wessels et al. (1992) |
| <i>Vibrio cholerae</i> | H11 (non-O1) | LPS | | Vinogradov et al. (1992) |

LPS= Lipopolysaccharid

LOS=Lipooligosaccharid

Die daran anschließende äußere Kernregion ist strukturell variabler. Man unterscheidet bei *E. coli* zwischen 6 Kern- (Core-) Typen (R1, R2, R3, R4, K12, B), wobei die Unterschiede hauptsächlich in der Anzahl und der Art der Verknüpfungen der Komponenten Glucose, Galactose und deren *N*-Acetyl-Derivate begründet sind (JANSSON et al., 1981). Der Stamm 21701 besitzt laut GAMIAN et al. (1992) einen Core des Typs R2, der sich dadurch auszeichnet, dass das O-Antigen über eine α 1,4-Verknüpfung an Glucose gebunden ist (siehe Abb. 2). Es gibt einige Stämme von z.B. *Neisseria spec.*, bei denen die Lipopolysaccharid-synthese hier abbricht. Hier spricht man von einem Lipooligosaccharid (LOS). Diese Stämme mit „rauer“ Kolonieoberfläche werden als R-Mutan-ten bezeichnet (HOLST und BRADE, 1984). Das O-Antigen zeichnet sich im Gegensatz zum Core durch eine ungeheure strukturelle Variabilität aus. Es besteht aus einer Anzahl sich wiederholender Einheiten (engl.: repeating units), die bei *Escherichia coli* normalerweise zwischen 10 und 18 beträgt (FRANCO et al., 1998). Selbst bei Bakterien einer Art ist das O-Antigen sehr unterschiedlich aufgebaut. So unterscheidet man allein bei *E. coli* inzwischen 166 Serotypen (WANG und REEVES, 1998).

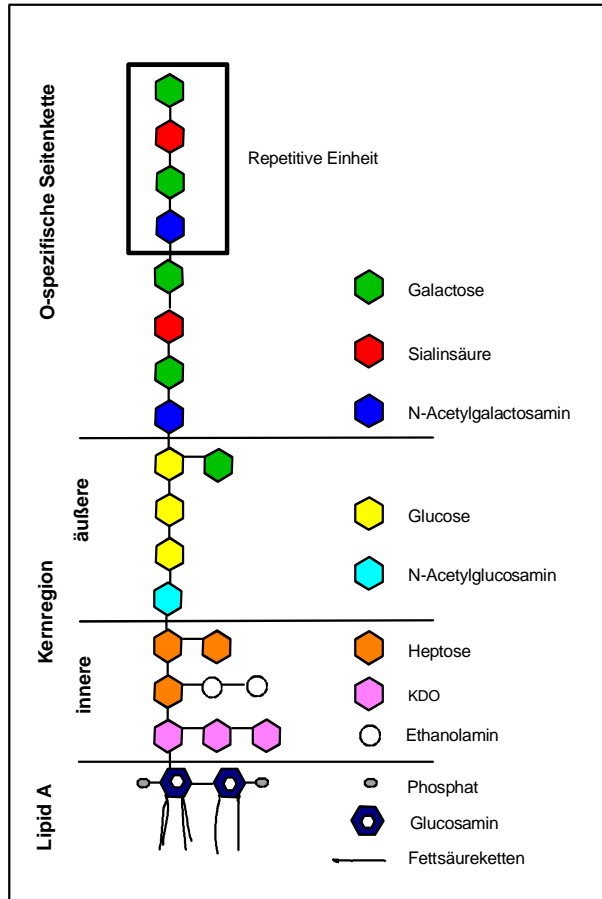


Abb. 2: Struktur des Lipopolysaccharids des *Escherichia coli* Stammes 21701

Über das O-Antigen des *E. coli* Stammes 21701 gab es bis 1994 zwei unterschiedliche Publikationen. Während KOGAN et al. (1992) eine O-Acetylierung der Sialinsäure in der repeating unit an C-9 beschrieben, postulierten GAMIAN et al. (1992) eine di-O-Acetylierung an C-7 und C-9. Die Struktur wurde von Dr. Ulrich Zähringer (Forschungszentrum Borstel, Zentrum für Medizin und Biowissenschaften) nochmals analysiert. Die sich wiederholende Einheit besteht danach aus *N*-Acetylgalactosamin, 2 Galaktoseresten und einer internen di-O-acetylierten (C-7, C-9) Sialinsäure (siehe Abb. 3).

Funktion. Das Lipopolysaccharid hat eine toxische Wirkung und wird deshalb auch als Endotoxin bezeichnet. Die toxische Komponente ist dabei das Lipid A, so dass eine der Funktionen des O-Antigens darin besteht, den Fettsäureanteil zu maskieren, um so eine heftige Immunantwort durch Makrophagen zu inhibieren (RIETSCHEL et al., 1984). Wenn sich das LPS im Blutstrom befindet, ist es ein Auslöser einer Reihe pathogener Vorgänge bis hin zum septischen Schock (BEAMER et al., 1999). Die Ausschüttung von Tumor Necrose Faktor TNF (COMSTOCK et al., 1998) oder Cytokinen (BOROWSKY et al., 1998) kann ebenfalls durch Lipopolysaccharid aktiviert werden.

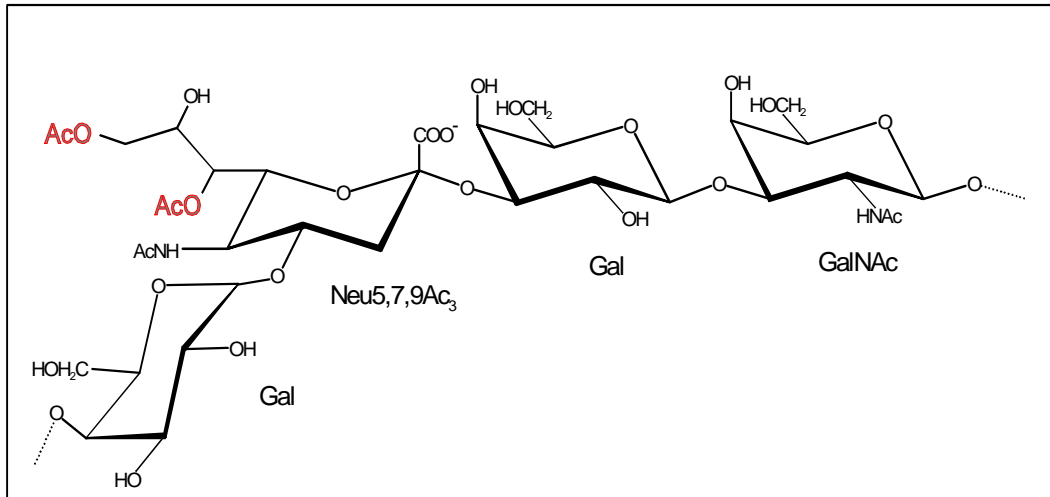


Abb. 3: Darstellung der sich wiederholenden Einheit des O-Antigens von *Escherichia coli* 21701

Andererseits ist es verständlich, dass das LPS aufgrund seiner exponierten Stellung an der Oberfläche der Zellen auch als Rezeptor für Lektine fungiert (WOLPERT und ALBERSHEIM, 1976; MANDAL et al., 1997; FRAGKIADAKIS et al., 1997). Das O-Antigen hat eine weitere wichtige Funktion als Rezeptor für Bakteriophagen. Diese Bakterien-Viren erkennen an ihren Wirten ganz spezifische Strukturen, an die sie dann binden. Sowohl für die Erkennung, als auch für die Bindung ist das LPS und speziell das O-Antigen von großer Bedeutung (STEINBACHER et al., 1996). In diesem Zusammenhang ist es möglich, dass die O-Acetylierung der Sialinsäure im O-Antigen des Stammes 21701 von Bedeutung für die Interaktionen mit Bakteriophagen ist, da sie die Struktur des Phagenrezeptors verändert. Die Rezeptoren werden anschließend bei einer Reihe von Phagen durch Rezeptorabbauende Enzyme zerstört (Lindberg, 1977), auch hierbei kann die O-Acetylierung wichtig sein, da sie den Abbau von Sialinsäuren durch Neuraminidasen erschwert.

1.3 Biologische Bedeutung der Sialinsäuren

Sialinsäuren von Eucaryoten. Die strukturelle Vielfalt der Sialinsäuren spiegelt sich auch in der Mannigfaltigkeit der Funktionen dieser Zucker wieder. (SCHAUER et al., 1995). Bedingt durch den hydrophilen Charakter und die elektronegative Ladung (pK-Wert = 2,2) sind sie in die Bindung und den Transport von positiv geladenen Ionen (z. B. Ca²⁺) involviert (JEANLOZ und CODDINGTON, 1976). Sialinsäuren haben eine zentrale Rolle bei Zellerkennungs- und Adhäsionsvorgängen, wobei sie als Liganden in einer Reihe von interzellulären und intermolekularen Erkennungsvorgängen involviert sind (KELM und SCHAUER, 1997). Dabei sind verschiedene Sialinsäure-bindende Rezeptoren wie Siglecs, Selektine und andere Lektine für Zellinteraktionen von großer Bedeutung (VARKI, 1994; KELM et al., 1998; TRAVING und SCHAUER, 1998). Aufgrund ihrer exponierten Stellung an den Oligosaccharidketten dienen sie als Schutzschild für die subterminalen Moleküle vor degradierenden Enzymen wie Proteasen (SCHAUER, 1985), sind aber daneben auch Rezeptoren für pathogene Toxine wie das Cholera-Toxin (SCHAUER und KAMERLING, 1997).

Die Anheftung von Mikroorganismen an ihre Wirtszellen ist ebenfalls oft Sialinsäure-abhängig, einerseits kann die Bindung von z.B. *Actinomyces viscosus* (HENNINGSEN et al., 1991) durch *N*-Acetylneuraminsäure inhibiert werden, andererseits binden gerade pathogene Organismen wie *Trypanosoma cruzi* (SCHAUER et al., 1983), *Helicobacter pylori* oder Influenza-Viren (VLASAK et al., 1988) über sialinsäurehaltige Rezeptoren an ihre Wirtszellen.

Sialinsäuren von Bakterien. Für Stämme, die eine Kapsel aus einem Sialinsäurehomopolymer besitzen, kann diese für die Pathogenese wichtig sein, z.B. für die Invasion und Besiedlung der Hirnhaut Neugeborener (TROY, 1992). Für *Streptococcus spec.* Gruppe B ist beschrieben, dass das Vorhandensein von Sialinsäure auf der Kapseloberfläche die Aktivierung des alternativen Komplementwegs inhibiert (WESSELS et al., 1992). Ähnliches gilt auch für *Neisseria gonorrhoeae*. Bei dieser Art sind Bakterien mit hoch sialyliertem LPS noch in der Lage, an humane Epithelzellen der Mucosa zu binden, das Eindringen in die Zelle wird aber nahezu vollständig inhibiert. Dafür werden die Bakterien aber auch nach dem Eindringen nicht vom Komplementsystem erkannt und können so überleben. Gering sialylierte Zellen hingegen können sehr effizient in die Epithelzellen eindringen, sind dort aber vom Komplementsystem angreifbar und werden vernichtet (VAN PUTTEN, 1993). Allgemein kann man sagen, dass sich die Bakterien durch Sialylierung des Lipopolysaccharids maskieren und dadurch nicht vom Immunsystem erkannt werden (PARSONS et al., 1989).

1.4 O-Acetylierung von Sialinsäuren

Vorkommen. Die O-Acetylierung kann an der Position C-4 als Ring-O-Acetylierung oder an C-7, C-8 oder C-9 als Seitenketten-O-Acetylierung erfolgen. Mehrheitlich handelt es sich lediglich um mono-O-acetylierte Derivate. Daneben sind aber auch Kombinationen von Acetylgruppen bekannt, die zur Oligo-O-Acetylierung führen. Das Auftreten dieser modifizierten Sialinsäuren ist im Tierreich häufig Gewebe-spezifisch und tritt nur in bestimmten Entwicklungsstadien auf (VARKI, 1992). Man findet sie auch bei Mikroorganismen wie der Hefeform des pathogenen Pilzes *Cryptococcus neoformans* (RODRIGUES et al., 1997) oder in Bakterien (📖 1.4.2).

Analytik. Die Analyse von O-acetylierten Sialinsäuren ist sehr diffizil, da die O-Acetylgruppen Alkali- und Säure-labil sind, was die Isolierung dieser Derivate sehr erschwert. Die mildeste Form der Hydrolyse wäre mit Hilfe von Sialidase, dies führt aber nur zu unvollständiger Freisetzung von an der Seitenkette (C-7 - C-9) modifizierten *N*-Acetylneuraminsäuren. 4-O-acetylierte Sialinsäuren werden enzymatisch nicht vom subterminalen Zucker abgespalten (SCHAUER et al., 1995). Als Alternative wird eine milde Säurehydrolyse vorgeschlagen (MAWHINNEY und CHANCE, 1994), die zwar eine komplette Abspaltung der Sialinsäuren erlaubt, aber auch einen meßbaren Verlust von O-Acetylgruppen zur Folge hat.

Für die Analyse der Sialinsäuren stehen dann eine Reihe von Methoden zur Verfügung. Freie Sialinsäuren können mit Hilfe der **HPLC** (HARA et al, 1989; MANZI et al., 1990) analysiert werden. Da die Sialinsäure bei *E. coli* 21701 aber nicht terminal, sondern intern lokalisiert ist (siehe Abb. 3), kann die HPLC-Analytik für die Untersuchungen an diesem Stamm nicht so einfach angewendet werden.

Um diese Untersuchungen durchführen zu können, wurden verschiedene Versuche unternommen, die interne Sialinsäure einmal chemisch durch Perjodatoxidation und Säurehydrolyse oder enzymatisch mit Hilfe von Exoglycosidasen zu isolieren. Auch die Laufmittelsysteme der **Dünnschichtchromatographie** waren nur für freie oder terminal gebundene Sialinsäuren ausgerichtet. Eine weitere Methode zur Sialinsäureanalytik ist die kernmagnetische Resonanzspektroskopie (**NMR**) (Vliegthart et al., 1982), die zur Bestimmung der O-Acetylierung der Sialinsäure eingesetzt wurde.

Neben diesen chemisch-physikalischen Methoden sind auch andere Nachweise wie **Lektin-Färbung** (MANDAL und BASU, 1987; Iglesias et al., 1996), oder **Influenza C Virus-Bindung** (ZIMMER et al., 1992; HARMS et al., 1996) für terminal gebundene Sialinsäuren anwendbar. Interne N-Acetylneuraminsäuren können mit diesen Methoden aber nicht nachgewiesen werden. Ebenso verhält es sich mit monoklonalen Antikörpern gegen 7- oder 9-O-acetylierte Sialinsäuren (KNIEP et al., 1995; ZANG et al., 1997; KOGA et al., 1999), die nicht gegen interne Sialinsäuren, wie sie im LPS von *E. coli* 21701 vorliegen, gerichtet sind.

Zu Beginn dieser Arbeit stand somit lediglich ein chemisches Testsystem, der milde Perjodsäure-Schiffbasen (**mPAS**)-Test zur Verfügung. Dieser Test, der ursprünglich zur selektiven Darstellung von Sialinsäurederivaten in Gewebeschnitten verwendet wurde (REID et al., 1980), war so modifiziert worden, dass er zur Unterscheidung von O-acetylierten und durch Alkali-Behandlung de-O-acetylierten Bakterienkolonien anwendbar sein sollte (BODE, 1994). Es war aber nach kurzer Zeit abzusehen, dass dieses System nicht spezifisch genug war, so dass weitere immunologische Nachweisverfahren entwickelt werden mußten. Zum einen wurde versucht, mit Hilfe eines käuflich erworbenen Phagemid Display System (Fa. MoBiTec) **Phagemid-„Antikörper“** herzustellen. Dies ist eine Methode, die in der Literatur als schnell, sensitiv und erfolgreich beschrieben wird (SCOTT und SMITH, 1990; LASONDER et al., 1993). Weitere Alternativen waren die Gewinnung **polyklonaler Antikörper** durch Immunisierungen von Kaninchen sowie die Erzeugung **monoklonaler Antikörper** durch die Hybridomatechnik (KÖHLER und MILSTEIN, 1975; POXTON 1995).

1.4.1 O-Acetylierte Sialinsäuren bei Eucaryoten

Vorkommen. 4-O-acetylierte Sialinsäuren wurden bisher in einem japanischen Weißfisch (INOUE et al., 1989), einer südamerikanischen Schlange (LOCHNIT und GEYER, 1995), dem australischem Schnabeligel (KAMERLING et al., 1982), sowie in Pferd (SCHAUER, 1978), Esel (SCHAUER und KAMERLING, 1997), Kaninchen (KLEIN und ROUSSEL, 1998) und Meerschweinchen (HANAOKA et al., 1989) nachgewiesen.

Die an den Positionen C-7 oder C-9 O-acetylierten Sialinsäuren kommen dagegen in fast allen Vertretern der Deuterostomia vor (SCHAUER et al., 1995; VARKI, 1992), wobei das Vorhandensein gewebespezifisch ist und auch nur in bestimmten Stadien der Entwicklung detektierbar sein kann. Große Mengen dieser modifizierten N-Acetylneuraminsäure findet man in Unterkieferspeicheldrüsen von Rindern (SCHAUER, 1970 a und b), Rattenleber (BUTOR et al., 1993) oder auch auf Erythrocyten von Kaninchen, Mäusen und Ratten (REUTER et al., 1988), sowie im menschlichen Colon (CORFIELD et al., 1999).

Funktion. Die Erkennung von Glykokonjugaten durch Siglecs wird durch eine O-Acetylierung verhindert (KELM et al., 1994; STRENGE et al., 1999). Für katabole Enzyme wie Sialidasen, Transsialidasen oder N-Acetylneuraminat-Pyruvat-Lyasen sind an C-4 oder C-9 O-acetylierte Sialinsäuren ein wesentlich schlechteres Substrat als die nicht O-acetylierte Form (SCHAUER, 1982; CORFIELD et al., 1986; SCHAUER et al., 1995). Dies könnte einer der Vorteile sein, die der Stamm 21701, der aus dem Stuhl eines gesunden Menschen isoliert wurde (KNIPSCHILDT, 1945) durch seine Sialinsäuremodifikation an seinem natürlichem Standort besitzt.

Für Mensch und Tier sind auch eine Reihe pathogener Prozesse bekannt, in die O-acetylierte Sialinsäuren involviert sind. So ist von einigen humanen und tierischen Krankheitserregern der Einfluß dieser modifizierten sauren Zuckerderivate untersucht worden. Es ist bekannt, dass die Bindung von Influenza A- und B-Viren sowie des Malaria-Erregers *Plasmodium falciparum* an terminale Sialinsäuren tierischer Zellen durch O-Acetylierung an Position C-9 unterbunden wird (REUTER und SCHAUER, 1987; KLOTZ et al., 1992), während Influenza C-Viren und Coronaviren eine derart modifizierte Sialinsäure zur Anheftung benötigen (ROGERS et al., 1986; VLASAK et al., 1988). Da bei vielen Tumorarten eine Zunahme des 9-O-acetylierten Gangliosids GD₃ beobachtet worden ist (MARQUINA et al., 1996; CHERESH et al., 1984; HUBL et al., 1997) wird dessen Vorhandensein als Tumormarker des Menschen betrachtet.

Anabolismus. Der Anabolismus der O-Acetylierung erfolgt bei Eucaryoten an α -glykosidisch gebundenen Sialinsäuren durch verschiedene O-Acetyltransferasen, die die Acetylgruppen von Acetyl-Coenzym A (Ac-CoA) auf die N-Acetylneuraminsäure übertragen. In der Literatur werden zwei Sialinsäure-spezifische Enzyme postuliert: Die Acetyl-CoA:Sialat 4-O-Acetyltransferase (EC 2.3.1.44) und die Acetyl-CoA:Sialat 7(9)-O-Acetyltransferase (EC 2.3.1.4) (SCHAUER, 1970a und b; IWERSEN et al., 1998). Eine Reinigung dieser Enzyme ist bisher nicht gelungen, obwohl verschiedenste Techniken zur Isolierung aus unterschiedlichen Geweben angewendet wurden. Versuche, über Expressionklonierung ein Gen für die Sialinsäure-spezifische O-Acetyltransferase zu erhalten, führten zu keinem Erfolg (OGURA et al., 1996; SHI et al., 1998). Dieses waren wesentliche Gründe dafür, die Untersuchungen zur Sialinsäure-spezifischen O-Acetyltransferase in einem weniger komplexen System zu beginnen. Da zu diesem Zeitpunkt abzusehen war, dass das komplette Genom von *Escherichia coli* bald sequenziert sein würde, erschien es als eine Möglichkeit, über das bakterielle Gen auch die Eucaryotengene zu detekieren und die Enzyme dann als rekombinante Proteine zu isolieren.

1.4.2 O-Acetylierte Sialinsäuren im Bakterienreich

Vorkommen. Bisher sind lediglich wenige Beispiele für eine derartige Modifikation bekannt (siehe Tab.1). An C-7 und C-8 O-acetylierte Sialinsäuren konnten als α 2,9-verknüpftes Homopolymer in der Kapsel der Serotypen A, C, W-135 und Y von *Neisseria meningitidis* nachgewiesen werden (LEMERCINIER und JONES, 1996). Desweiteren fanden sich Sialinsäuren auch als zum Teil O-acetyliertes, α 2,8-verknüpftes Homopolymer in der Kapsel (BARRY und GOEBEL, 1957; EGAN et al., 1977) oder dem LPS (DUTTON, 1987; KOGAN et al., 1993; GAMIAN et al., 1992) einiger *Escherichia coli* Stämme. Besonderes Augenmerk verdient dabei der Serotyp O104:K:-H12, dessen LPS eine interne, di-O-acetylierte Sialinsäure enthält (KOGAN et al., 1992; GAMIAN et al., 1992). Da es der einzige Stamm ist, dessen LPS immer eine O-Acetylierung aufweist, ist er für die Untersuchungen am besten geeignet.

Bisher wurden O-acetylierte Sialinsäure in zwei Oberflächenmolekülen von Bakterien nachgewiesen: als Kapselsubstanz und als Bestandteil des Lipopolysaccharids (Abb. 1.2, Abb. 2).

Funktion. Es ist bekannt, dass 85 % der krankheitserregenden Isolate von *Neisseria meningitidis* O-acetylierte Sialinsäuren aufweisen (ARAKERE und FRASCH, 1991). Für *Salmonella typhi*, dem Erreger des Typhus-Fiebers und *Escherichia coli* K1 sind Daten vorhanden, die auf Zusammenhänge zwischen O-Acetylierung von Kapsel-Polysacchariden und Immunogenität hindeuten (BYSTRICKY und SZU, 1994, ØRSKOV et al., 1979).

Wie oben erwähnt, behindert eine O-Acetylierung katabole Enzyme wie z.B. Sialidasen. Dieser Effekt ist möglicherweise ein Grund für derartige Modifikationen in Oberflächenmolekülen diverser *Escherichia coli* Stämme, denn an ihren natürlichen Umgebung (z.B. im Darm) sind Sialidaseaktivitäten nachweisbar.

Weitere Funktionen sind denkbar, z.B. tritt durch die Substitution von zwei Hydroxylgruppen eine Veränderung der Löslichkeit ein, da das Glykokonjugat hydrophober wird. Zusätzlich führt diese Veränderung zu einer größeren Beweglichkeit der Moleküle, da die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen nicht mehr möglich ist (SIEBERT, 1996).

Ein wichtiger Aspekt ist auch die Veränderung der Antigenität, denn es ist in der Literatur beschrieben, dass die O-Acetylierung von Sialinsäuren einen Einfluß auf die Antigenität der Oberflächen mikrobieller Infektionserreger hat (HIGA und VARKI, 1988). Durch die Immunisierungen von Mäusen und Kaninchen zur Gewinnung von Antikörpern war es in dieser Arbeit möglich, weitere Daten für diese Fragestellung zu erhalten.

Wie unter 1.2 erwähnt, ist das LPS ein häufiger Rezeptor für die Anheftung von Bakteriophagen. Darum ist es von Interesse zu erfahren, ob eine O-Acetylierung, bzw. de-O-Acetylierung zu einer Veränderung des Phagenspektrums führt.

Metabolismus. Der Mechanismus der O-Acetylierung bei Bakterien ist noch nicht beschrieben. Zur Zeit ist auch noch nicht bekannt, in welchem Stadium der Biosynthese die Zucker des O-Antigens modifiziert werden. Dies könnte bereits an der freien, möglicherweise über CMP aktivierten Zuckerkomponente oder am fertig gestellten O-Antigen erfolgen, vielleicht aber auch erst, wenn das LPS komplett synthetisiert worden ist. Hinweise zu dieser Fragestellung liefern bisher nur Daten über *Escherichia coli* K12, die darauf hindeuten, dass die O-Acetylierung zum Zeitpunkt der O-Antigen-Biosynthese erfolgt (STEVENSON et al., 1994). Um mehr darüber in Erfahrung zu bringen, wurden verschiedene Versuchsansätze konzipiert, in denen Acetyl-CoA mit ³H-markiertem Acetylrest als Acetylgruppen-Donor fungierte, da dieses als natürliches Co-Substrat in der Literatur postuliert wird (HIGA und VARKI, 1988). Als „Enzymquelle“ fungierten dabei homogenisierte Bakterien. In anderen Experimente erfolgte eine Transformation von ³H-markiertem Acetyl-CoA in lebende Zellen, so dass der Einbau der Radioaktivität am lebenden Organismus verfolgt werden konnte.

Die Lokalisation des Enzyms ist ebenfalls noch unbekannt, es könnte sich sowohl um ein lösliches, wie auch um ein membrangebundenes Protein handeln. So wurden in weiteren Versuchen Detergenzien zur Solubilisierung eines möglicherweise membrangebundenen Enzyms verwendet.

Ebensowenig ist es bisher gelungen, einen „in vitro“ Assay zum enzymatischen Nachweis der O-Acetylierung zu entwickeln. Lediglich HIGA und VARKI (1988) beschreiben einen enzymatischen Einbau von radioaktiv markierten Acetylresten in

Sialinsäuren der Kapsel von *Escherichia coli* K1 mit Acetyl-Coenzym A als Donor. Um die Spezifität des Enzyms zu testen, wurden in dieser Arbeit verschiedene Substrate wie de-O-acetyliertes LPS, de-O-acetyliertes O-Antigen, freie oder aktivierte Sialinsäure, Sialyllaktose und verschiedene Ganglioside (GD₃, GT_{1b}, GQ_{1b}) eingesetzt. Zusätzlich wurden in einigen Experimenten Esteraseinhibitoren hinzugefügt, da frühere Versuche Esteraseaktivitäten sichtbar gemacht hatten (ROGGENTIN, pers. Mitteilung). Auch bei diesen Versuchsansätzen wurden die Bakterien zur „Enzymgewinnung“ homogenisiert.

1.5 Genetik der O-Acetylierung

Die für diese Modifikationen verantwortlichen, bakteriellen Sialinsäure-spezifischen O-Acetyltransferasen sind bisher weder gereinigt noch kloniert worden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es daher, mit Hilfe von in der O-Acetylierung der Sialinsäure defekten Klonen das Gen für die Sialinsäure-spezifische O-Acetyltransferase zu finden. Für die Erzeugung dieser Defektmutanten standen mehrere Alternativen zur Verfügung. Zum einen gab es die Möglichkeit, über ungerichtete Mutagenese zum Erfolg zu kommen. Hierbei konnte einerseits eine Bestrahlung mit UV-Licht eingesetzt werden, andererseits stand ein Subklon des Stammes 21701 zur Verfügung, in dem ein konjugativ übertragendes Plasmid mit einem inserierten Transposon enthalten war (BODE, 1994). Durch Temperaturinduktion kann die Insertion des Transposons in das Genom induziert werden, das Aufspüren des defekten Genes wäre dann über Hybridisierungen möglich. Diese Transposonmutagenese ist das vielseitigste und am häufigsten benutzte Werkzeug für genetische Analysen in Bakterien (LORENZO und TIMMIS, 1994) Als weitere Alternative wurde die Insertionsmutagenese mit Hilfe eines Insertionselementes in Erwägung gezogen, da diese kleiner (zwischen 800 und 2500 Bp) als Transposons sind (GALAS und CHANDLER, 1989) und so besser in eng gefaltete Bereiche des Genoms integrieren könnten.

Es waren inzwischen Gene beschrieben worden, die für die O-Acetylierung anderer Zucker (z.B. Abequosen oder Rhamnosen) im LPS codieren. Dazu zählen das Lag 1-Gen aus *Legionella pneumophila* (ZOU et al., 1999), ein Gen von *Salmonella typhimurium* (OafA), das Oac-Gen aus *Shigella flexneri*, das interessanterweise von einem inserierten Prophagen SF6 codiert wird (CLARK et al., 1991) und Gene aus *Rhizobien*-Arten. Mit den bekannten Genen wurde von SLAUCH et al. (1996) ein Alignment durchgeführt. Basierend auf diesen Daten wurden von allen darin erwähnten bakteriellen Genen die Sequenzen aus der Datenbank „HUSAR“ (EMBL, Heidelberg) kopiert, aligned und spezifische Sonden konstruiert. Es war das Ziel, mit Hilfe dieser Oligonukleotide über Hybridisierungen homologe Bereiche des Stammes 21701 zu detektieren und diese schließlich zu klonieren und zu sequenzieren, um auf diese Weise das für die Sialinsäure-spezifische O-Acetyltransferase codierende Gen zu erhalten. Es war geplant, dieses Gen dann mit Hilfe der homologen Rekombination gezielt auszuschalten (LEENHOUTS, 1995; HAMILTON et al., 1989) und über eine Komplementation, bei der das komplette Gen dann mit einem Expressionsvektor wieder in das „Knock-out“-Bakterium eingeschleust wird, die Spezifität der homologen Rekombination zu überprüfen. Weiterhin galt es noch festzustellen, ob ähnlich wie bei *Shigella flexneri* das gesuchte Gen nicht im Bakteriengenom selbst, sondern auf dem Genom eines inserierten Prophagen lokalisiert ist (CLARK et al., 1991).

1.6 Fragestellungen

Das Ziel dieser Arbeit war es, vielfältige Informationen über die O-Acetylierung der Sialinsäuren im Lipopolysaccharid des *Escherichia coli* Stammes O104:K:H12 (21701) zu erhalten.

Einmal war geplant durch ungerichtete Mutagenese mittels UV-Licht, Transposonmutagenese oder Insertion eines IS-Elementes in der O-Acetylierung der Sialinsäure defekte Mutanten zu erzeugen, um so das Gen für die Sialinsäure-spezifische O-Acetyltransferase zu finden.

Ein alternativer Weg zur „Zufallsmutagenese“ war die gezielte Ausschaltung eines bestimmten, mit Hilfe eines Alignments detektierten Gens durch homologe Rekombination. Die Spezifität der homologen Rekombination könnte dann durch Komplementationsexperimente nachgewiesen werden.

Für die Detektion der in der O-Acetylierung defekten Klone war es erforderlich, geeignete Nachweissysteme zu entwickeln, da lediglich ein chemischer Test (mPAS) vorhanden war, von dem schnell klar wurde, dass er nicht spezifisch genug reagierte. Als zusätzliche Systeme wurden Phagemid-„Antikörper“, polyklonale und monoklonale Antikörper hergestellt und getestet.

Da bei *Shigella flexneri* das Gen für die O-Acetyltransferase von einem inserierten Prophagen codiert ist (siehe oben) war es ein weiteres Ziel, zu eruieren, ob dies auch bei *E. coli* 21701 der Fall ist.

Um die chemisch-physikalische Sialinsäure-Analytik zu vereinfachen, erfolgten Versuche zur Isolierung der intern im LPS gebundenen Sialinsäure.

Zur Zeit gibt es keinen „*in vitro*“-Enzymtest und der Mechanismus der O-Acetylierung ist ebenfalls noch ungeklärt. Deshalb wurden Experimente durchgeführt, die Daten über die Lokalisation des Enzyms sowie über dessen Spezifität liefern könnten.

In der Literatur ist beschrieben, dass die Antigenität mikrobieller Infektionserreger durch eine O-Acetylierung der Sialinsäuren beeinflusst wird (📖 1.4.2 Funktion). Aus diesem Grund wurde die Wirkung von O-acetylierten und de-O-acetylierten Bakterien auf Tiere durch Immunisierung von Kaninchen und Mäusen untersucht.

Weil das LPS häufig als Rezeptor für Bakteriophagen fungiert, war es von Interesse, die Auswirkungen einer Änderung des O-Acetylierungsmusters auf das Bakteriophagenspektrum von *E. coli* 21701 festzustellen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Materialien

Es wurden Chemikalien und Enzyme folgender Hersteller verwendet:

| Substanz | Hersteller |
|--|------------------------|
| ³² P-ATP | Hartmann, Braunschweig |
| α - ³⁵ S-dATP | Amersham, Braunschweig |
| ABTS-Tabletten | Roche, Mannheim |
| Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung, Rotiphorese Gel30 | Roth, Karlsruhe |
| Agar | Fluka, Buchs, Schweiz |
| Anionenaustauscherharz Dowex 2-X8, 200-400 mesh HCOO ⁻ -Form | Fluka |
| Ammoniumpersulfat | Merck, Darmstadt |
| Ampicillin | Serva, Heidelberg |
| Bakterienkulturpetrischalen | Sarstedt, Nümbrecht |
| Borsäure | Sigma, Deisenhofen |
| BSA | Roche |
| Butanol | Riedel-de-Haën |
| CHAPS | Sigma |
| Chloroform | Serva |
| Comassie Brilliant Blue R250 | Merck |
| DAB-Substrat | Roche |
| DC-Fertigplatten, Kieselgel auf Glas, 10 x 10 cm Schichtdicke 0,1 mm | Merck |
| DFP | Sigma |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma |
| Dithiothreitol | Biomol, Hamburg |
| DMB-Dihydrochlorid | Dojindo, Japan |
| Eisessig | Riedel-de-Haën |
| Erythromycin | Sigma |
| Ethanol, 96% | Serva |
| Ethidiumbromid | Sigma |
| Fötale Kälberserum | Sigma |
| Formaldehyd zur Analyse | Merck |
| α -Galaktosidase | Sigma |
| Galaktose | Sigma |
| Ganglioside (GD ₃ , GQ _{1b} , GT _{1b}) | ICT, Frankfurt |
| Gewebekulturpetrischalen | Sarstedt |
| Glasperlen | Polzin, Kiel |
| Glycerin | Merck |
| Goat Anti-Mouse IgG(H+L)-HRP Human absorbed | Boehringer, Ingelheim |
| Harnstoff | Riedel-de-Haën, Seelze |
| HAT-Supplement | Roche |

| | |
|--|----------------------------------|
| Hefeextrakt | Fluka |
| HRP/Anti-M13 Antikörper | Pharmacia |
| Hybond N | Amersham |
| Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG) | Serva |
| Isopropanol | Merck |
| Kanamycin | Roche |
| Kationenaustauscherharz Dowex 50W-X8 20-50 mesh, H ⁺ -Form | Fluka |
| KDO | Sigma |
| Lipid A | Sigma |
| Magermilchpulver | Heisler |
| Mass Loading Dye (6x) | Fermentas, St. Leon-Roth |
| Mass Ruler DNA Ladder high Range | Fermentas |
| Mass Ruler DNA Ladder Mix | Fermentas |
| Mercaptoethanol | Sigma |
| Mitomycin C | Sigma |
| MOPS | Serva |
| N-Acetylneuraminsäure | Snowbrand, Japan |
| N-Acetylgalaktosamin | Sigma |
| Natriumchlorid | Riedel-de-Haën |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Merck |
| Natriumperjodat | Sigma |
| Nitrozellulosefilter | Amersham |
| Perjodsäure | Merck |
| Phenol | Roth |
| Plastikküvetten 1 ml (10 x 4 x 45 mm) | Sarstedt |
| Polypropylenröhrchen (15 ml, 50 ml) | Sarstedt |
| pSKAN Phagemid Display System | MoBiTec, Göttingen |
| Pyridin | Merck |
| Quarzküvetten, 1ml (12 x 4 x 45 mm) | Hellma, Mühlheim |
| Röntgenfilmentwickler (Agfa Gevaert G-150) | Agfa, Mortsel, Belgien |
| Röntgenfilmfixierer (Agfa Gevaert G-350) | Agfa |
| RP-18 HPLC Säule, Lichrosper 100, 4 mm Ø X 250 mm, Partikelgröße 5 µm | Merck |
| RPMI-Medium | Life Technologies, Eggenstein |
| Rubidiumchlorid | Fluka |
| Röntgenfilm (Fudji Rx-100) | Fudji, Japan |
| Schiff's Reagenz | Sigma |
| Sephadex G-25 fine | Pharmacia, Freiburg |
| Sterilfilter, 0,2 µm | Sarstedt |
| Smartladder (DNA-Größenstandard) | Eurogentec, Belgien |
| TEMED | Sigma |
| Tetracyclin | Roche |
| Tris, ultra pure | ICN, USA |
| Trypton Wasser | Fluka |
| Tween 20 | Merck |
| Ultrazentrifugenröhrchen | Beckmann, München |
| Visking, Dialyseschlauch, Porengröße 8-15 kDa | Serva, Heidelberg |
| X-Gal | Serva |
| Zitronensäure | Sigma |

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Fluka (Buchs, Schweiz) oder Life Technologies (Eggenstein) bezogen. Das für die Radio-DC-Analysen verwendete Gas (Argon-Methan-Gemisch) stammt von der Firma Messer-Griesheim (Lübeck).

Soweit nicht anders angegeben, handelt es sich bei den Konzentrationsangaben um Endkonzentrationen. Prozentangaben wurden als Gewichts-Volumen-Verhältnis (w/v) berechnet.

2.1.2 Enzyme

Die eingesetzten Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen:

| Enzym | Hersteller |
|------------------------|----------------------------------|
| Ligase | Life Technologies, Eggenstein |
| Lysozym | Serva, Heidelberg |
| Proteinase K | Merk, Darmstadt |
| Ribonuklease A | Qiagen, Hilden |
| T4-DNA Ligase | Life Technologies |
| T4-Polynukleotidkinase | Life Technologies |
| Taq-Polymerase | Peqlab, Erlangen |

Restriktionsendonukleasen wurden von Life Technologies (Eggenstein), Roche (Mannheim) oder New England Biolabs (Schwalbach) bezogen.

2.1.3 Kits

In der Molekularbiologie wurden folgende Kits eingesetzt:

| Kit | Hersteller |
|---|-------------------------------|
| DNA Sequencing Kit Big Dye™ Terminator Cycle sequencing Ready Reaction | PE Biosystems, Weiterstadt |
| pGEM T-Vector System | Promega, Mannheim |
| Qiagen Extraction Kit | Qiagen, Hilden |
| Qiaprep Spin Miniprep Kit | Qiagen |
| Qiaquick PCR Purification Kit | Qiagen |
| Sequenase Version 2.0-Sequenzierungs Kit | USB, Bad Homburg |

2.1.4 Vektoren

Folgende Vektoren kamen zur Anwendung:

| Vektor | Hersteller |
|--|---------------------------------|
| Bluescript (Tetracyclinresistent) | Stratagene, La Jolla, USA |
| pGEM (Ampicillinresistent) | Promega, Mannheim |
| pUC 18/19 (Ampicillinresistent) | Life Technologies |
| pKK223-3 (Expressionsvektor, IPTG-induzierbar, Ampicillinresistent) | Amersham Pharmacia, Freiburg |

Der Vektor pG⁺host9::ISS1 (Erythromycinresistent) wurde von Dr. Emmanuelle Maguin (INRA, Génétique Microbienne, Jouy-en-Josas, France) zur Verfügung gestellt.

2.1.5 Transposon und Insertionselement

Zur Transposonmutagenese wurde das Plasmid pRU 664 verwendet. Es handelt sich hierbei um ein Konstrukt aus dem Plasmid ME 305 und dem Transposon 1732, das von Christiane Bode (Institut für Biochemie, CAU Kiel) hergestellt wurde. Durch Konjugation von pRU 664 in 21701 machte sie die Versuche mit Transposon-Mutagenese erst möglich.

Als Insertionselement diente das ISS1. Es ist integriert in dem Vektor pG⁺host9::ISS1 von Dr. Emmanuelle Maguin und konnte mit dem Restriktionsenzym EcoRI (📖 2.2.6.2) herausgeschnitten werden.

2.1.6 Geräte und Datenverarbeitungsprogramme

Die Geräte und Datenverarbeitungsgeräte folgender Hersteller kamen zum Einsatz:

| Gerät | Hersteller |
|--|-------------------------------|
| Agfa-Snapscan mit Bildbearbeitungsprogramm Fotolook, Version 2,09 | Agfa, Leverkusen |
| Brutschrank B6760 | Heraeus, Hanau |
| Brutschrank B6120 | Heraeus |
| Digital-pH-Meter 646 mit Ingold Einstabmeßkette 405-S7 | Knick, Berlin |
| Eppendorf Thermostat 5320 | Eppendorf, Hamburg |
| Eppendorf Zentrifuge | Eppendorf |
| Feinwaage H20T | Mettler |
| Gelelektrophorese-System „Mini-ProteanII“ mit PowerPac 300 Supply | Bio-Rad, München |
| GeneAmp PCR System 2400 | PE Biosystems, Weiterstadt |
| Gene Pulser & Controller | BioRad |

| | |
|--|-------------------------------|
| HPLC-System bestehend aus: Programmierbare Pumpe L-6220 Fluoreszenz-Durchflußspektral Photometer F1050 Interface D-6000 Datenverarbeitungssoftware HPLC Manager Version 2.0 | Merck-Hitachi |
| Kühlzentrifuge J2-HS (Rotoren Beckmann, München JA 10 und JA 17) | |
| Laminar Flow (Sterile Werkbank) | Clanlaf, Dänemark |
| Magnetrührer Combimag RCT | IKA Werke, Staufen |
| Mikrowellengerät | Panasonic, Japan |
| Minigelanlage LKB GNA 100 | Pharmacia, Freiburg |
| Niederdruckchromatographie-System bestehend aus: Peristaltische Schlauchpumpe P-1 UV-Durchflußdetektor LKB Monitor UV-1 Fraktionssammler SuperFrac Flachbettschreiber LKB REC 102 | Pharmacia |
| Phosphor Imager FujiFilm Bas 1000 mit FujiFilm Imaging plates Datenverarbeitungsprogrammen Basread und Pcbas 20 | Fuji, Japan |
| Photometer Titertek Multiscan-MC | Flow Laboratories, U.K. |
| Radiodünnschichtscanner Tracemaster 40 mit Datenverarbeitungsprogramm Chroma, Version 7.29 | Berthold, Wildbad |
| Schüttler für Mikrotiterplatten, Titramax 100 | Heidolph, Kehlheim |
| Sequenzieranlage S2 | Life Technologies, Eggenstein |
| Spannungsquelle LKB GPS 200/400 für Minigelanlage | Pharmacia |
| Spannungsquelle PS9009 | Life Technologies |
| Vakuum Konzentrator | Bachofer, Reutlingen |
| Tischultrazentrifuge, Optima™ TLX (Rotor TLA 45) | Beckmann |
| Ultrazentrifuge L7-65 (Rotoren 45 Ti und 70 Ti) | Beckmann |
| UV-Spektralphotometer Hitachi U 2000 | Colora, Lorch |
| Vortex Genie 2 | Bender und Hobein, Schweiz |

Für die Analyse der Gensequenzen wurde das Programm „Husar“ (EMBL, Heidelberg) eingesetzt.

2.1.7 Lösungen

Lösungen und Puffer, die für molekularbiologische Arbeiten und die Zellkultur benötigt wurden, mußten vor der Anwendung durch Autoklavieren (20 min, 121 °C, 1,2 bar) oder Membranfiltration (0,2 µm Porendurchmesser) sterilisiert werden.

Auftragspuffer (Agarosegele)

| | |
|----------------|--------------|
| Glycerin | 50,0 % (w/v) |
| Bromphenolblau | 0,2 % (w/v) |
| Xylencyanol | 0,2 % (w/v) |
| EDTA | 10 mM |
| a. bidest. | ad 5 ml |

100 x Denhardts

| | |
|---------------------|-------------------------|
| BSA | 2 % (w/v) |
| Ficoll | 2 % (w/v) |
| Polyvinylpyrrolidon | 2 % (w/v) in a. bidest. |

Ehtidiumbomid-Lösung

| | |
|----------------|----------------------|
| Ehtidiumbromid | 10 mg/ml in a.bidest |
|----------------|----------------------|

Hybridisierungspuffer

| | |
|-----------------|-------------------------------|
| 20 x SSC | 30 ml |
| 100 x Denhardts | 5 ml |
| SDS | 5 ml [Stammlösung 10 % (v/v)] |
| | ad 100 ml a.bidest |

IPTG-Stammlösung

| | |
|------|---------------------|
| IPTG | 0,1 M in a. bidest. |
|------|---------------------|

10 x PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung)

| | |
|--|--------------|
| NaCl | 8,00 g |
| KCl | 0,20 g |
| Na ₂ HPO ₄ + 2H ₂ O | 1,43 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,20 g |
| a. bidest. | ad 1 l, pH 7 |

RPMI 1640 Medium

| | |
|--------------------|---------------|
| RPMI Trockenpulver | 1,039 % (w/v) |
| NaHCO ₃ | 26 mM |
| L-Glutamin | 2 mM |

SM-Puffer (Phagen-Verdünnungs- und Lagerungspuffer)

| | |
|-------------------|---------------------------------|
| NaCl | 5,8 g |
| MgSO ₄ | 2,0 g |
| Tris-HCl | 50 ml (Stammlösung 1 M, pH 7,5) |
| Gelatine | 5 ml [Stammlösung 2 % (w/v)] |
| a. bidest. | ad 1 l |

STET-Puffer

| | |
|--------------|-------------|
| Saccharose | 8,0 % (w/v) |
| Triton X-100 | 0,5 % (w/v) |
| EDTA | 50 mM |
| Tris | 10 mM |
| | pH 8 |

STETL-Puffer

| | |
|-------------|--|
| STET-Puffer | 1 ml |
| Lysozym | 50 µl (Stammlösung 10 mg/ml in a. bidest.) |

20 x SSC (Standard Saline Citrat)

| | |
|-----------|-------|
| NaCl | 3,0 M |
| Na-Citrat | 0,3 M |

10 x TBE-Puffer (Tris/Borat/EDTA)

| | |
|------------|--------------------------|
| Tris | 108 g |
| Borat | 55 g |
| EDTA | 50 ml (Stammlösung 0,5M) |
| a. bidest. | ad 1 l, pH 8,0 |

10 x TE-Puffer (Tris/EDTA)

| | |
|------------|----------------|
| Tris | 12,1 g |
| EDTA | 3,7 g |
| a. bidest. | ad 1 l, pH 7,5 |

X-Gal-Stammlösung

| | |
|------------------------|---------------------------------|
| DMF (Dimethylformamid) | 20 mg/ml, lichtgeschützt lagern |
|------------------------|---------------------------------|

2.1.8 Bakterienstämme

Es wurde mit folgenden Stämmen gearbeitet:

Escherichia coli Stamm 21701 (O104:K-:H12):

Bei diesem Stamm handelt es sich um ein Isolat aus Faeces eines gesunden Menschen (KNIPPSCHILDT, 1945). Prof. Dr. B. Jann vom Max-Planck-Institut für Immunologie in Freiburg stellte ihn zur Verfügung (Freiburger Stammnummer 21701). Dieser Stamm zeichnet sich durch O-acetylierte Sialinsäuren im O-Antigen aus (KOGAN et al., 1992 und GAMIAN et al., 1992). Die Untersuchungen zur O-Acetylierung wurden alle an ihm durchgeführt.

Escherichia coli Stamm 21701 (Mut A) (O104:K-:H12):

Dieser Stamm ist ein *E. coli*-Subklon aus 21701R und dem Plasmid pRU664, durch dessen Temperatursensitivität die Transposonmutagenese (☞ 2.2.8.2) ermöglicht wurde.

Escherichia coli Stamm K12C600 (Bezeichnung 3278):

Mit Hilfe dieses Stammes wurden einige der Phagenisolate (☞ 2.1.10) gewonnen. Er wurde von Prof. Christian Gliesche (Universität Greifswald) zur Verfügung gestellt. Weiterhin konnte er als Indikatorstamm für den Prophagen P1 (☞ 2.2.7) verwendet werden.

Escherichia coli Stamm K12 (Bezeichnung 3279):

Dieser Stamm enthält den temperatursensitiven Prophagen P1. Er diente als Kontrollstamm für die Versuche zur Induktion möglicherweise inserierter Prophagen (☞ 2.2.7). Er war ebenfalls eine Gabe von Prof. Christian Gliesche.

Escherichia coli Stamm XL1-blue MRF⁺:

In diesen Stamm wurden die Plasmide pUC 18 und pGEM transformiert, deren Inserts nach Anreicherung sequenziert (☞ 2.2.6.6) werden sollten. Hersteller dieses Stammes ist die Firma Stratagene (La Jolla, USA).

Escherichia coli Stamm K12JM101:

Dieser Stamm diente alternativ als Wirtsstamm für die Transformationen (☞ 2.2.6.3). Er wurde von Pharmacia (Freiburg) erworben.

Escherichia coli WK6 und WK6 λ mutS:

Beide Stämme gehörten zum Phagemid Display System der Firma MoBiTec. In ihnen wurden die Anreicherungen des Helferphagen M13K07 (WK6), bzw. die Anreicherungen und Titerbestimmungen (WK6 λ mutS) der verschiedenen Phagemidbanken vorgenommen (☞ 2.2.5.2). Der Stamm WK6 λ mutS produziert einen λ -Repressor, der die Einleitung der Lyse verhindert. So können sich die Phagemide in diesem Stamm zunächst vermehren und die Freisetzung erfolgt erst nach Zugabe des Helferphagen M13K07.

Escherichia coli Stamm NM522:

Für die Vermehrung des Helferphagen M13K07 wurde dieser, von der Firma Pharmacia bezogene Stamm eingesetzt.

2.1.9 Nährmedien und Antibiotika

2.1.9.1 Nährmedien

Luria-Bertani-Medium (LB)

| | |
|----------------|---------------|
| Trypton Wasser | 15 g |
| Hefeextrakt | 5 g |
| NaCl | 5 g |
| a. bidest. | ad 1l, pH 7,5 |

LB-Agarplatten enthielten zusätzlich 18 g Agar/ 1 l Medium
LB-Topagar enthielt zusätzlich 1,25 g Agarose/ 20 ml Medium

Minimalmedium

| | |
|---|--------|
| Na ₂ HPO ₄ | 10,5 g |
| KH ₂ PO ₄ | 4,5 g |
| Trinatriumzitat | 0,5 g |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1,0 g |
| a. bidest. | ad 1l |

Nach dem Autoklavieren wurden zugesetzt:

| | |
|---------------------------|---|
| Glukoselösung | 10,0 ml [sterilfiltrierte, 20 %ige (w/v) Stammlösung] |
| MgSO ₄ -Lösung | 1,0 ml [autoklavierte, 20 %ige (w/v) Stammlösung] |

NZY-Medium

| | |
|--|----------------|
| NaCl | 5 g |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 2 g |
| Hefe-Extrakt | 5 g |
| NZ Amin (Casein) | 10 g |
| a. bidest. | ad 1 l, pH 7,5 |

SOB-Medium

| | |
|--------------|-------------------|
| Bactotrypton | 20,0 g |
| Hefeextrakt | 5,0 g |
| NaCl | 0,5 g |
| KCl | 5,0 mM |
| a. bidest. | ad 500 ml, pH 7,0 |

SOC-Medium

| | |
|-------------------|-----------------------|
| SOB-Medium | 99 ml |
| Glucose | 1 ml (Stammlösung 1M) |
| MgCl ₂ | 2 µl (Stammlösung 1M) |

YT-Medium

| | |
|--------------|----------------|
| Bactotrypton | 16 g |
| Hefeextrakt | 10 g |
| NaCl | 5 g |
| a. bidest. | ad 1 l, pH 7,5 |

2.1.9.2 Antibiotika

| <u>Antibiotika</u> | <u>Stammlösung</u> | <u>Endkonzentration</u> |
|--------------------|-------------------------|-------------------------|
| Ampicillin | 100 mg/ml in a. bidest. | 100 µg/ml |
| Chloramphenicol | 25 mg/ml in a. bidest. | 25 µg/µl |
| Erythromycin | 2 mg/ml in a. bidest. | 2 µg/ml |
| Kanamycin | 50 mg/ml in a. bidest. | 25 µg/ml |
| Rifampicin | 50 mg/ml in a. bidest. | 50 mg/µl |
| Tetracyclin | 50 mg/ml in 50 % Etanol | 25 µg/ml |

Die Antibiotika wurden dem jeweiligen Medium erst nach dem Autoklavieren hinzugefügt.

2.1.10 Bakteriophagenmaterial

Der zur Isolierung der Phagemide des pSKAN-Systems benötigte Helferphage M13K07 (📖 2.2.5.2) wurde von der Firma Pharmacia erworben.

Für die Untersuchungen zum Bakteriophagenspektrum des Stammes 21701 wurden aus den Belebtschlammbecken der Klärwerke Bülk und Neumünster zu unterschiedlichen Jahreszeiten Proben entnommen und sterilfiltriert. Zu einer 20 ml-Kultur von *E. coli* 21701 und *E. coli* K12C600 wurde je 1 ml des erhaltenen Filtrats hinzugefügt und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Durch Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 1000 x g konnten die durch Lyse freigesetzten Bakteriophagen isoliert werden. Von dieser Suspension wurde dann eine Verdünnungsreihe (1:10 – 1:10⁶) in SM-Puffer angelegt und jeweils 1 µl dieser Ansätze mit 200 µl einer logarithmisch gewachsenen Kultur (OD₆₀₀ von 0,5 – 1,0) des Stammes 21701 für 15 min bei 37°C inkubiert. Nachdem zu diesem Gemisch 3 ml Top-Agar addiert waren, konnte die Flüssigkeit auf NZY-Platten verteilt, getrocknet und über Nacht bei 37°C bebrütet werden.

Die erhaltenen Einzelplaques wurden am nächsten Tag ausgestochen und im Agar enthaltene Phagen durch Schüttelinkubation bei 37°C in SM-Puffer eluiert. In diesem Puffer wurden sie für weitere Untersuchungen gelagert (📖 2.2.5.3.3 und 2.2.10).

2.2 Methoden

2.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde in leicht modifizierter Weise nach LAEMMLI (1970) durchgeführt. Sie erfolgte im Gelelektrophorese System „Mini-Protean II“ von Bio-Rad (München).

Für die Herstellung der Gele wurden folgende Lösungen benötigt:

| | | |
|-----------------------------------|--|---|
| Elektrophoresepuffer: | Tris Glycin SDS | 0,025 M 0,192 M 0,1 % (w/v) In a. bidest., pH 8,5 |
| Trenngel-Puffer: | Tris SDS | 1,5 M 0,4 % (w/v) in a. bidest., pH 8,8 |
| Sammelgelpuffer: | Tris SDS | 0,5 M 0,4 % (w/v) in a. bidest., pH 6,8 |
| Acrylamidlösung: | Acrylamid Bisacrylamid | 30,0 % (w/v) 0,8 % (w/v) in a. bidest. |
| APS-Lösung: APS | | 10,0 % (w/v) in a. bidest. |
| TEMED | | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| Probenpuffer I (für LPS) | Glycerin SDS Tris/HCl, pH 6,8 Bromphenolblau Mercaptoethanol | 10 % (w/v) 2, % (w/v) 62,5 mM 0,01 % (w/v) 5, % (w/v) |
| Probenpuffer II (für Proteine) | Glycerin SDS Bromphenolblau DTT Tris/HCl, pH 6,8 | 36 % (w/v) 8,4 % (w/v) 2 % (w/v) 4 % (w/v) 0,125 M |

2.2.1.1 Durchführung der SDS-PAGE

Herstellung der Gele: Für das Gießen von 2 Gelen mit einer Dicke von 1 mm wurde nachfolgendes Pipetierschema angewendet, wobei sich die jeweiligen Prozentangaben auf die eingesetzte Menge an Acrylamid beziehen.

Für Gele zur LPS-Auftrennung wurden nach folgendem Schema pipettiert:

| <u>Trenngel (14 %) :</u> | | <u>Sammelgel (5 %):</u> | |
|--------------------------|---------|-------------------------|---------|
| Trenngelpuffer | 2,60 ml | Sammelgelpuffer | 1,30 ml |
| Acrylamidlösung | 4,63 ml | Acrylamidlösung | 0,75 ml |
| a. bidest. | 2,56 ml | a. bidest. | 2,36 ml |
| APS | 32,5 µl | APS | 15,0 µl |
| TEMED | 5,0 µl | TEMED | 5,0 µl |

Zur Trennung von Proteinen wurden folgende Mengen benötigt:

| <u>Trenngel (11 %) :</u> | | <u>Sammelgel (5 %):</u> | |
|--------------------------|---------|-------------------------|---------|
| Trenngelpuffer | 1,95 ml | Sammelgelpuffer | 1,30 ml |
| Acrylamidlösung | 3,00 ml | Acrylamidlösung | 0,75 ml |
| a. bidest. | 2,40 ml | a. bidest. | 2,36 ml |
| APS | 25,0 µl | APS | 15,0 µl |
| TEMED | 5,0 µl | TEMED | 5,0 µl |

Nach dem Mischen des Trenngelmaterials wurde es in die nach Herstellerangaben zusammengebauten Gelkammer(n) bis ca. 2 cm unter den Rand eingefüllt und mit a. bidest. überschichtet. Die Polymerisation erfolgte bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 30-60 min. Anschließend wurde das überstehende Wasser entfernt und das Sammelgel pipetiert, vermischt und die Gelkammer damit bis kurz unter den Rand aufgefüllt sowie zum Ausbilden der Geltaschen der Kamm eingesetzt. Nach dem Auspolymerisieren des Gels bei Raumtemperatur (30-60 min) konnte der Kamm entfernt und das Gel mit den vorbereiteten Proben beladen werden.

Vorbereitung der Proben: Zu analysierendes LPS war entweder schon mit Probenpuffer (☞ 2.2.2.2) vermischt oder wurde im Verhältnis 1:1 (v/v) mit Probenpuffer I (siehe oben) versetzt. Proteine mußten ebenfalls im Verhältnis 1:1 (v/v) mit Probenpuffer (siehe oben) versetzt werden. Die Proben wurden anschließend für 3-4 min bei 95 °C inkubiert, bei Raumtemperatur abgekühlt, bei 14000 RpM 10 sec zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen.

Bei LPS-Gelen wurde als Standard das LPS des *E. coli* Serotypes O111 aufgetragen, bei Gelen zur Auftrennung von Proteinen wurde eine Spur mit einem Molekulargewichtsstandard (50 kDa-Leiter) versehen.

Durchführung der Elektrophorese: Nach der Überführung der Gelkammern in die mit Elektrophoseseppuffer gefüllte Elektrophoresekammer erfolgte die Entwicklung der Gele bei einer konstanten Spannung von 150 V bei 40 mA. Der Lauf wurde nach ca. 2 h beendet, sobald die Farbfront den unteren Gelkammerrand erreicht hatte. Im

Anschluß an die Elektrophorese erfolgten dann die Färbungen (📖 2.2.1.2 und 2.2.1.3) oder das Blotten (📖 2.2.5.3.2) des im Gel aufgetrennten LPS.

2.2.1.2 Färbung von Lipopolysaccharid

Basierend auf der Methode von TSAI und FRASCH (1982) konnte das LPS gefärbt werden. Nachdem das Sammelgel entfernt war, wurden die Lipopolysaccharide über Nacht in einer wässrigen Lösung von 40 % Ethanol und 5 % Essigsäure bei RT fixiert. Nach dem Entfernen der Flüssigkeit wurden die Zuckerkomponenten für 5 min mit 0,7 % (w/v) Perjodsäure in frischer Fixierlösung (siehe oben) oxidiert. Es folgte ein mehrmaliges Waschen der Gele für jeweils 15 min mit a. bidest. Die Färbung wurde mit einer alkalischen Silberfärbung aus 0,67 ml konzentriertem Ammoniak, 9,33 ml 0,1 N NaOH, 1,97 ml Silbernitrat [Stammlösung 20 % (w/v)] und 38,33 ml a. bidest. für 10 min durchgeführt. Daran anschließend wurde wiederum 3 x 15 min mit a. bidest. gewaschen. Das Entwickeln der Gele erfolgte mit 25 mg Zitronensäure - Trihydrat in 50 ml a. bidest. mit 25 µl Formaldehyd [Stammlösung 37 % (v/v)].

2.2.1.3 Färbung von Proteinen

Nach der Entfernung des Sammelgels wurde das Trenngel für 1 h bei RT in einer Coomassie-Färbelösung [0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 in 45 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure] geschüttelt. Das Entfärben des Hintergrundes erfolgte durch vorsichtiges Schwenken des Gels in 45 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure unter mehrfachem Wechsel der Lösungen.

2.2.2 Isolierung von Lipopolysaccharid

2.2.2.1 Isolierung für NMR und Mikrotiterplatten-Assays

Die Anzucht der Bakterien erfolgte in LB-Medium (📖 2.1.9.1). Dabei wurde 1 l Medium mit 10 ml einer über Nacht gewachsenen Kultur beimpft und bei 37 °C bebrütet. Der Methode von WESTPHAL und JANN (1965) folgend, wurden die Zellen in der späten logarithmischen Phase ($OD_{600} = 1,0 - 1,3$) (📖 2.2.6.5) durch Zentrifugation bei 1000 x g pelletiert, in 0,9 % (w/v) NaCl gewaschen und lyophilisiert. Die Isolierung des LPS erfolgte durch eine Extraktion mit 90 % (v/v) Phenol in a. bidest. für 15 min bei 65 °C. Nach Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und 10 000 x g wurde der wässrige Überstand abgenommen, aufbewahrt und mit der Phenolphase eine erneute Extraktion und Zentrifugation durchgeführt. Die Überstände wurden vereinigt und über Nacht gegen a. bidest. unter mehrmaligem Wasserwechsel dialysiert.

Das sich im Schlauchinneren befindliche Lipopolysaccharid wurde durch dreimaliges Zentrifugieren bei 105 000 x g und 4 °C für jeweils 3 h weiter aufgereinigt. Die Resuspendierung des Sedimente erfolgte dabei immer in a. bidest. Das zuletzt erhaltene Präzipitat wurde ebenfalls in a. bidest. gelöst und lyophilisiert und war so als komplettes Lipopolysaccharid in den verschiedenen ELISAs (📖 2.2.5.2, 2.2.5.3, 2.2.10) einsetzbar oder konnte auf ein SDS-PAGE aufgetragen werden (📖 2.2.1.2). Zur Abspaltung des Lipid A-Anteils wurde das Lyophilisat in 20 mM Natriumacetat (pH 4,5) aufgenommen und für 1h bei 100 °C gekocht (modifiziert nach KNIREL et al., 1996). Durch eine Ultrazentrifugation bei 105 000 x g und 4 °C für 3 h konnte der sich im Sediment befindliche lipophile Anteil separiert werden. Der Überstand

dialysierte über Nacht gegen a. bidest. und wurde lyophilisiert. Aus dem so erhaltenem Zuckeranteil konnten durch Gelfiltration über eine Sephadex G-25 Säule (Säulenvolumen 100 ml) die sialinsäurehaltigen Fraktionen des O-Antigens gereinigt werden. Dabei wurde das Säulenmaterial nach Herstellerangaben gegossen und mit a. bidest. equilibriert. Das Lyophilisat wurde in a. bidest. aufgenommen und auf die Säule aufgegeben. Die Flußrate betrug 100 µl/min, fraktioniert wurde alle 5 min für insgesamt 250 min. Mit Hilfe des Orcinol/Fe³⁺-Tests (☞ 2.2.4.3) konnten die sialinsäurehaltigen Fraktionen schließlich bestimmt werden. Diese wurden vereinigt, lyophilisiert und gewogen.

2.2.2.2 Isolierung für SDS-Page

3 ml einer über Nacht gewachsenen Kultur der Bakterien wurden für 10 min bei 3500 x g zentrifugiert in 0,9 % (w/v) NaCl resuspendiert, erneut zentrifugiert und das Sediment in 140 µl a. bidest. aufgenommen. Es erfolgte nach einer Zugabe von 140 µl 2 x Lyse-Puffer [2 M Tris, 4 % (v/v) SDS, 8 % (v/v) Mercaptoethanol, 20 % (v/v) Glycerol, 1 % (v/v) Bromphenolblau] eine 10minütige Inkubation bei 96 °C. Anschließend wurden 20 µl LFK-Puffer [0,25 M /Tris/HCl, 2 % (v/v) SDS, 4 % (v/v) Mercaptoethanol, 2,5 % (w/v) Ficoll 400, 2,5 mg/ml Proteinase K] addiert und das Gemisch für 3 h bei 60 °C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 14000 UpM (Eppendorf-Tischzentrifuge) konnte der Überstand in ein neues Gefäß überführt werden. 1-5 µl dieser Lösung wurden für 3 min bei 96 °C denaturiert und dann direkt auf ein SDS-Gel aufgetragen (☞ 2.2.1.1).

2.2.3 Isolierung von Sialinsäuren

Freie Sialinsäuren. Zur Isolierung freier Sialinsäuren wurden eine über Nacht gewachsene Kultur des Stammes 21701 durch Zentrifugation für 2 x 15 s mit Gasperlen (Ø 0,1 mm) aufgeschlossen. Das Homogenat wurde auf Eis gekühlt und zur Entfernung der Zelltrümmer 10 min bei 4°C und 3500 x g zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Ultrazentrifugation des Überstandes bei 356.000 x g für 10 min bei 4°C, um einen partikelfreien Überstand mit darin befindlicher Sialinsäure zu erhalten. Diese wurde anschließend nach dem Protokoll von SCHAUER (1982) über einen Kationenaustauscher (Dowex 50WX8/H⁺-Form) sowie einen Anionenaustauscher (Dowex 2-X8/Formiat-Form) isoliert, wobei die Elution mit 0,6 M Ameisensäure erfolgte. Das erhaltene Eluat wurde lyophilisiert (Probenkonzentrierung) und anschließend mit 2 M Essigsäure und DMB-Reagenz bei 56 °C derivatisiert. Nach einer erneuten Ultrazentrifugation bei 100.000 x g und 4 °C wurden die Reaktionsprodukte durch HPLC (☞ 2.2.4.4) oder Dünnschichtchromatographie (☞ 2.2.4.5) analysiert.

Gebundene Sialinsäuren Um die im O-Antigen zwischen 2 Galaktosen befindliche, interne Sialinsäure (☞ 1.2, Abb. 3) zu isolieren wurden folgende Versuche unternommen:

a) Es wurde versucht, sie auf einem chemischen Weg herauszulösen. Dazu wurde das getrocknete O-Antigen in 500 µl 10 mM Natriumperjodat aufgenommen und für 15 min bei RT inkubiert. Zugabe von 100 µl 1 % (v/v) Glycerin und anschließende Inkubation für 15 min bei RT stoppte diese Reaktion. Das Reaktionsgemisch wurde lyophilisiert und anschließend für 4 h bei 80 °C mit 2 M Propionsäure hydrolysiert.

b) BAHL und AGRAWAL (1969) folgend wurde in einem weiteren Experiment versucht, die Abspaltung der terminalen Galactose enzymatisch durch Inkubation bei 37 °C für 3 h mit 80 mU α -Galactosidase in Natrium-Citrat-Puffer (pH 4,5) herbeizuführen. Auch hier erfolgte nach Lyophilisation wiederum eine Propiosäurehydrolyse. Von den entstandenen Reaktionsprodukten könnten freie Sialinsäuren dann in beiden Fällen mit Hilfe von Ionenaustauschersäulen (siehe oben) gereinigt werden. Die Analyse erfolgte über eine HPLC (☞ 2.2.4.4).

2.2.4 Chemisch-physikalische Analytik

2.2.4.1 Abspaltung von O-Acetylgruppen

Die O-Acetylgruppen von Sialinsäuren sind alkalilabil. Somit ist es möglich, diese z.B. durch Ammoniakdampf abzuspalten (Verseifung). Dazu wurden die Proben oder Dünnschichtplatten (☞ 2.2.4.5) über Nacht bei Raumtemperatur in einem geschlossenen Gefäß Ammoniakdämpfen von konzentrierter NH_3 -Lösung (37 %) ausgesetzt.

2.2.4.2 Milder-Perjodsäure-Schiffreagenz-Test

(modifiziert nach VEH, 1979)

Dieser Test, der bisher nur zur selektiven Darstellung von Sialinsäurederivaten in Gewebeschnitten Verwendung fand (REID et al., 1980), wurde so modifiziert, dass er zur Unterscheidung von auf Nitrocellulose geblotteten Bakterienkolonien anwendbar sein sollte. Dieses Testsystem ist so variierbar, dass entweder die O-acetylierten Sialinsäuren im LPS angefärbt werden konnten oder die nicht modifizierte N-Acetylneuraminsäure. Letzteres war aber nur durch Verseifung imitierbar, da ein vergleichbares LPS ohne O-acetylierte Sialinsäure nicht verfügbar war.

Der Ablauf der Färbereaktion fand wie folgt statt:

| Schritt | Lösung | Konzentration | Zeit (min) | T (°C) |
|---------|-------------------|---------------|------------|--------|
| 1 | NaIO_4 | 10 mM | 10 | RT |
| 2 | Glycerin | 1 % (v/v) | 5 | RT |
| 3 | NaCl | 0,9 % (w/v) | 5 | RT |
| 4 | NaBH_4 | 0,1 % (w/v) | 30 | RT |
| 5 | NaCl | 0,9 % (w/v) | 5 | RT |
| 6 | NaCl | 0,9 % (w/v) | 5 | RT |
| 7 | NaOH | 0,1 M | 60 | 4 |
| 8 | NaCl | 0,9 % (w/v) | 5 | RT |
| 9 | NaCl | 0,9 % (w/v) | 5 | RT |
| 10 | NaIO_4 | 2,5 mM | 10 | Eis |
| 11 | Glycerin | 1 % (v/v) | 5 | RT |
| 12 | NaCl | 0,9 % (w/v) | 5 | RT |
| 13 | Schiff-Reagenz | | 30 | RT |
| 14 | Pyrosulfit-Lösung | | 8 | RT |
| 15 | Pyrosulfit-Lösung | | 8 | RT |
| 16 | a.bidest. | | 10 | RT |

Für den Nachweis von nicht modifizierter *N*-Acetylneuraminsäure mußten alle oben aufgeführten Schritte durchgeführt werden. Für den Nachweis der *O*-acetylierten Seitenketten der Sialinsäure waren lediglich die Schritte 9 – 16 auszuführen.

2.2.4.3 Orcinol/Fe³⁺-Test (Bial-Test)

Zur qualitativen Analyse von Sialinsäuren wurde die Mikroadaptation des Orcinol/Fe³⁺-Tests (BÖHM et al., 1954; SCHAUER, 1978; REUTER und SCHAUER, 1994) eingesetzt.

Das Reagenz besteht aus:

- 81,4 ml 37 % HCl
- 0,2 g Orcinol
- 2 ml (w/v) FeCl₃-Lösung

Um das Vorhandensein von Sialinsäuren zu überprüfen, wurden Aliquots der erhaltenen Fraktionen der Gelfiltration (☞ 2.2.2.1) im Verhältnis 1:1 mit dem Reagenz gemischt und für 15 min bei 96 °C inkubiert. Bei Vorhandensein von Sialinsäuren bildete sich dann je nach Konzentration des Zuckers eine rosa bis dunkelviolette Färbung aus. Daneben diente das Bial-Reagenz auch zum Nachweis von *N*-Acetylneuraminsäuren auf Dünnschichtplatten (☞ 2.2.4.5). Diese wurden eingesprüht und nach dem Entwickeln in einer Glaskammer bei 120 °C für 20-30 min zeigten violette Flecken das Vorhandensein von Sialinsäuren an.

2.2.4.4 High Performance Liquid Chromatographie (HPLC)

Mit dieser Methode läßt sich ebenfalls ein qualitativer Nachweis der Sialinsäuren erbringen. Im Unterschied zum Bial-Testsystem können hier auch Modifikationen, z. B. *O*-Acetylierungen erkannt werden. Dieses Verfahren beruht auf einer Derivatisierung der zu untersuchenden Proben mit DMB (1,2-Diamino-4,5-methylendioxybenzol) zu einem fluoreszierenden Derivat (HARA et al., 1985, 1989; REUTER und SCHAUER, 1994). Hierfür wurden 10-30 µl der Proben (☞ 2.2.3) lyophilisiert, in 10 µl Essigsäure (2M) aufgenommen und anschließend mit 49 µl DMB-Reagenz (7 mM DMB, 0,75 M β-Mercaptoethanol, 18 mM NaHSO₃) im Dunkeln für 1 h inkubiert. Die Ansätze wurden auf Eis abgekühlt und für 10 min bei 14000 UpM in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert, um einen partikelfreien Überstand zu erhalten, von dem 10-20 µl auf eine RP-18 HPLC Säule (Lichrospher 100, Partikelgröße 5 µm, 4 mm Innendurchmesser x 250 mm) aufgetragen wurden. Die Trennung erfolgte isokratisch mit einem Lösungsmittelgemisch aus Methanol, Acetonitril und Wasser im Verhältnis 7:9:84 (v/v/v) bei einer konstanten Flußrate von 1 ml/min. Die fluoreszierenden Derivate konnten über ein Durchfluß-Fluoreszenz-Spektralphotometer bei einer Anregungswellenlänge von 343 nm und einer Emissionswellenlänge von 448 nm nachgewiesen werden. Mit dem angeschlossenen Datenverarbeitungssystem (Programm HPLC Manager, Version 2.0) wurden die aufgenommenen Daten analysiert. Dabei konnten die erhaltenen Peaks durch Vergleiche der Retentionszeiten mit denen bekannter Standards bestimmten Sialinsäuren zugeordnet werden.

2.2.4.5 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die dünnschichtchromatographische Trennung der erhaltenen Proben (☞ 2.2.9) erfolgte auf 10 x 10 cm Kieselgelplatten G60 (Merck) oder Celluloseplatten in geschlossenen Chromatographietanks (Desaga, Heidelberg). Als Laufmittel für die Versuche mit Zellhomogenat diente normalerweise ein Lösungsmittelgemisch aus Ethanol, Butanol, Pyrimidin, Eisessig und Wasser im Verhältnis 50:5:5:1,5:15 (v/v/v/v/v). Nur für die Versuche mit Gangliosiden als Substrat wurde ein Gemisch aus Methanol, Chloroform, 25mM CaCl₂ im Verhältnis 40:50:10 (v/v/v) verwendet. Aufgetragen wurden jeweils 10 µl der Probe. Der Lauf wurde beendet, wenn das Laufmittel den oberen Plattenrand erreicht hatte. Zusätzlich wurden reine Proben von Neu5Ac, Neu5,9Ac₂ oder GD₃ als Standard zur Co-Migration aufgetragen. Die Sialinsäuren wurden durch Sprühen mit Orcinol/Fe³⁺ sichtbar gemacht (☞ 2.2.4.3). In weiteren Versuchen wurde Hydroxamat (siehe unten) über Dünnschichtchromatographie analysiert. Als Laufmittel fungierte dann ein Gemisch aus 5 M Ammoniak, 10 % (w/v) Ammoniumcarbonat und Propionsäure im Verhältnis 1:2:6 (v/v/v). Die Visualisierung der Banden erfolgte durch ansprühen mit 10 %igem FeCl₃.

2.2.4.6 Hydroxamat-Test

Mit dem Hydroxamat-Test (LUDOWIEG und DORFMANN, 1960, BUSCHER et al., 1974) lassen sich O-Acetylgruppen von Sialinsäuren nachweisen. Dieses Verfahren wurde angewandt, um überprüfen zu können, ob es sich bei den über Dünnschichtchromatographie erhaltenen radioaktiven Peaks wirklich um O-acetylierte Sialinsäuren handelte. Anhand der Riodünnschichtanalyse konnte die Lauflänge der eingebauten Radioaktivität genau bestimmt werden. Von der Glasplatte wurde dann die Zellulose an der entsprechenden Stelle vorsichtig mit einem Skalpell entfernt und gesammelt. Zu diesem Material wurde 50 µl Hydroxylaminlösung zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Kontrolle wurde 50 µl Essigsäureethylester sowie 100 µg gereinigtes O-acetyliertes LPS (☞ 2.2.2.1) und 100 µg an Position C-7 und C-9 O-acetylierter Sialinsäure mit je 50 µl Hydroxylamin inkubiert. Alle Proben wurden anschließend lyophilisiert, das entstandene Hydroxamat über Dünnschichtchromatographie getrennt, im Riodünnschichtscanner analysiert und mit FeCl₃ angefärbt (siehe oben).

2.2.4.7 Radioaktivitätsmessungen

Die Auswertung der Dünnschichtplatten (siehe oben) erfolgte mit einem Riodünnschichtscanner (Tracemaster 40) mit angeschlossenen Datenverarbeitungssystem Chroma 7.29, so dass der Einbau der radioaktiven Acetylreste in Inhaltsstoffe der verschiedenen Versuchsansätzen (☞ 2.2.9) direkt ablesbar war.

Weiterhin konnte der Einbau von ³H-Acetylgruppen in den Experimenten zum Aktivitätsnachweis (☞ 2.2.9) in einem β-Counter (LS6000IC, Beckmann, München) qualitativ und quantitativ analysiert werden.

Die Auswertung der Hybridisierungen von chromosomaler DNA mit radioaktiv (³²P) markierten Sonden (☞ 2.2.6.4) erfolgte über Autoradiographie, bei der Röntgenfilme auf die Nitrocellulosefilter aufgelegt, die über Nacht bei -80 °C gelagert wurden. Nach Entwicklung und Fixierung der Röntgenfilme wurden die radioaktiv markierten Fragmente sichtbar gemacht. Alternativ erfolgte die Auswertung auch mit Hilfe eines Phosphor Imagers (FujiFilm, Japan), durch den die radioaktiv markierten Klone

visualisiert werden konnten. Dabei wurden die Nitrocellulosemembranen auf eine „Imaging plate“ gelegt und für 30 min exponiert. Die Auswertung erfolgte über die Datenverarbeitungsprogramme Basread und Pcbas20, mit denen die Schwärzungen sichtbar gemacht werden konnten.

Ebenfalls über Autoradiographie wurden die Sequenzierungen mit der Dideoxymethode (☞ 2.2.6.6) ausgewertet. Hierbei konnten die ³⁵S-markierten Banden visualisiert und ausgewertet werden.

2.2.4.8 Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR)

Zur genauen Analyse der Struktur wurden an den gereinigten und gepoolten sialinsäurehaltigen Fraktionen der LPS-Isolierung (☞ 2.2.2.1) NMR-Untersuchungen durchgeführt. Dies geschah im Labor von PD Dr. Ullrich Zähringer (Forschungsanstalt Borstel, Zentrum für Medizin und Biowissenschaften, 23845 Borstel) mit einem Bruker AM-360 Spektrometer [360 MHz (1H) und 90,6 MHz (13C)] nach der von Sánchez-Carballo et al., 1999 beschriebenen Methode.

2.2.5 Biologisch-Immunologische Analytik

2.2.5.1 Behandlung der Sialinsäuren mit Lyase

Um nachweisen zu können, dass in den nach Ionenaustauschchromatographie erhaltenen Fraktionen (☞ 2.2.3) auch Sialinsäuren befanden, wurden Aliquots dieser Eluate einer Lyasebehandlung (Lyase aus *Clostridium perfringens*, Sigma) unterzogen. Hierfür wurde 1/3 der erhaltenen lyophilisierten Menge in 50 µl 250 mM Phosphatpuffer, (pH 7,3) aufgenommen und für 1 h bei 37 °C mit 25 mU *N*-Acylneuraminat-Lyase (E.C.4.1.3.3) inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion durch Inkubation für 5 min bei 96 °C wurde die Probe 10 min bei 14000 RpM in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand abgenommen, lyophilisiert und derivatisiert (☞ 2.2.4.4).

2.2.5.2 Herstellung und Charakterisierung von Phagemid-„Antikörpern“

Mit Hilfe eines käuflich erworbenen Phagemid Display Systems (Fa. MoBiTec) wurde versucht, ein Detektionssystem zur Unterscheidung von nativen, *O*-acetylierten Sialinsäuren im LPS und in der *O*-Acetylierung defekten Sialinsäuren herzustellen. Dieses System beinhaltet drei Phagenbibliotheken (HyA, HyB und HyC), d.h. Phagen mit einem hypervariablen Aminosäurebereich, so dass ca. 3×10^7 Varianten für eine Bindung zur Verfügung standen, wobei die gewünschten Phagemide über die Bindung an das Zielmolekül angereichert wurden und theoretisch wie Antikörper einsetzbar sein sollten. Als „Antigen“ wurde isoliertes LPS, sowohl in seiner nativen, wie auch in der durch Alkalibehandlung verseiften (de-*O*-acetylierten) Form gewählt. Folgende Schritte mußten zur Anreicherung spezifisch bindender Phagemide nach Herstellerangaben ausgeführt werden:

Phagemid Präparation: Die Präparation der jeweiligen Bibliotheken begann mit der Anzucht des Wirtstammes (WK6λmutS) über Nacht bei 37 °C. Mit 1 ml dieser Suspension wurden 100 ml Medium (LB, Ampicillin 100 µg/ml, Tetracyclin 20 µg/ml) beimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5 (☞ 2.2.6.5) geschüttelt und inkubiert.

Nach Zugabe von 500 µl des Helferphagen M13K07 erfolgte eine weitere Bebrütung der Kulturen für 15 min ohne Schütteln, an die sich eine Bebrütung der Kultur für 16 h bei 37 °C anschloß. Am nächsten Tag wurden die Wirtszellen bei 3500 x g sedimentiert, der Überstand abgenommen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Phagemide für 2-16 h in PEG 6000/NaCl [16,7 % (w/v)/ 3,3 M] bei -80 °C gefällt. Nach Zentrifugation für 30 min bei 12.000 x g und 4 °C wurde das Sediment schließlich in 1 ml PBS aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

Panning: Bei diesem Arbeitsschritt erfolgte die Selektion von Phagemidindividuen, die an die gewünschte Zielstruktur banden. Dazu wurden Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit nativem, bzw. verseiftem LPS beschichtet (über Nacht, 4 °C), die freien Positionen mit 2 % (w/v) Milchpulver in PBS geblockt (1 h) und 100 µl der gewonnenen Phagemidsuspension (siehe oben) für 2 h in den Vertiefungen zur Bindung belassen. Nach mehrmaligem Waschen mit 0,5 % (v/v) Tween 20 in PBS wurden die gebundenen Phagemide durch Zugabe von 0,1 M Glycin, pH 2,2, abgelöst und in 2 M Tris überführt. Um eine Vorstellung über die Zahl unspezifisch bindender Phagen zu erhalten, wurde das Panning auch in Vertiefungen ohne gebundene Liganden durchgeführt.

Mit den eluierten Phagen wurde der *E. coli*-Wirtsstamm reinfiziert (siehe unten) und daraus wiederum Phagemide isoliert (siehe oben).

Weil es sich bei den angebotenen Epitopen nur um bestimmte Teile der LPS-Struktur handelte, aber das komplette LPS als Antigen eingesetzt worden war, wurden im nächsten Schritt die erhaltenen Phagemide mit dem jeweils heterologen LPS inkubiert, d.h. das Panning für die Phagemide, die an natives LPS gebunden hatten, erfolgte jetzt mit verseiftem LPS und umgekehrt. Anschließend wurden nun die ungebundenen Phagemide mit dem Überstand abgenommen.

Um eine Kontrolle über das Vorhandensein und eine eventuelle Anreicherung der Phagemide zu bekommen, erfolgte mit ihnen nach jeder Präparation (siehe oben) eine Titerbestimmung nach Herstellerangaben. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe (10^{-1} – 10^{-7} , bzw. 10^{-3} – 10^{-10}) der Phagemide in a. bidest. hergestellt und je 20 µl dieser Suspensionen mit 100 µl einer logarithmisch wachsenden Kultur des *E. coli* Stammes WK6λmutS für 30 min bei 37 °C inkubiert. 20 µl dieser Ansätze wurden auf LB-Agarplatten (Amp 100µg/ml, Tc 20 µg/ml) ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C bebrütet und am nächsten Tag durch Auszählung der Kolonien die Konzentration der Phagemide bestimmtbestimmt.

Reinfektion: Mit den eluierten Phagen wurde jeweils eine Reinfektion der Wirtszellen durchgeführt. Hierzu wurden die gewonnenen Phagemide mit 10 ml einer logarithmisch wachsenden Kultur (siehe oben) vermischt und für 30 min bei 37 °C bebrütet. Nach Zentrifugation für 10 min bei 3500 x g wurde das Sediment in 400 µl LB-Medium (Amp 100µg/ml, Tc 20 µg/ml) resuspendiert und auf zwei LB- Agarplatten (Amp 100µg/ml, Tc 20 µg/ml) verteilt. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurde der Bakterienrasen in 20 ml LB-Medium (Amp 100µg/ml, Tc 20 µg/ml) aufgenommen und 1/10 dieser Suspension benutzt, um 50 ml LB-Medium (Amp 100µg/ml, Tc 20 µg/ml) zu beimpfen. Diese Suspension wurde leicht geschüttelt und für 1 h bei 37 °C inkubiert, bevor 100 µl des Helferphagen M13K07 addiert wurden. Es erfolgte eine weitere Inkubation für 15 min ohne Schütteln, an die sich wiederum eine Schüttelinkubation über Nacht bei 37 °C anschloß. Die Phagemide konnten dann erneut präpariert werden (siehe oben).

Da laut Hersteller nach 3-5 Runden eine erste Charakterisierung der selektierten Phagemide möglich sein sollte, wurde der oben beschriebene Zyklus für alle sechs

Ansätze fünfmal durchgeführt. Aus den drei gelieferten Bibliotheken sollten so jeweils Phagemide für beide Epitope angereichert worden sein. Es standen damit insgesamt sechs „Antikörper“-Pools zur Verfügung.

Charakterisierung der erhaltenen Phagemide: Um Phagemide mit spezifische bindenden Epitopen zu detektieren, wurden die angereicherten Phagemide mit zwei verschiedenen Methoden untersucht. Es wurden zunächst im Anschluß an die letzte Reinfektion (siehe oben) 10 Klone pro Präparation mit Hilfe steriler Zahnstocher in LB-Medium (Amp 100µg/ml, Tc 20 µg/ml) überführt, die Klone über Nacht durch Bebrütung bei 37 °C vermehrt, die Phagemide isoliert und eine Einzelstrangsequenzierung (☞ 2.2.6.6) durchgeführt. Spezifisch angereicherte Phagemide sollten auf diese Weise schnell zu erkennen sein, da in diesem Falle die Mehrzahl der Basensequenzen über den variablen Bereich der zufällig ausgewählten Klone identisch sein müßte. Weitere 10 Klone je Ansatz wurden durch Doppelstrangsequenzierung (☞ 2.2.6.6) analysiert.

Als zweite Methode zur Überprüfung der Bindungsspezifität der Phagemide diente ein ELISA, bei dem isoliertes Lipopolysaccharid als Antigen fungierte. Dieses wurde über Nacht in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte inkubiert und dadurch an die Platte gekoppelt. Nach dem Blockieren der freien Positionen mit 2 % (w/v) Milchpulver in PBS für 1 h und mehrmaligem Waschen mit 0,5 % (v/v) Tween 20 in PBS wurden 200 µl der angereicherten und isolierten Phagemide (siehe Phagemid Präparation) hinzugefügt und für 3 h geschüttelt und inkubiert. Nach wiederum wiederholtem Waschen (siehe oben) wurde zur Detektion der Phagemide ein käuflich erworbener Peroxidase-gekoppelter M13-Antikörper (Pharmacia, Freiburg) eingesetzt. Nach 1 h wurde Phenylendiamin als Substrat hinzugegeben und diese Reaktion nach 30 min durch Zugabe von 2 M H₂SO₄ gestoppt. Nachfolgend wurde die Absorption der erhaltenen Produkte bei 492 nm im Fluoreszenzphotometer gemessen. Mit jedem Phagemid wurde dabei eine Bindungsreaktion an O-acetyliertes, wie auch an de-O-acetyliertes LPS durchgeführt. Zusätzlich erfolgte eine Inkubation der Phagen an Vertiefungen, an die kein Antigen gekoppelt worden war. Dieser Wert wurde später von den erhaltenen Ergebnissen als 0-Wert subtrahiert. Folgende, weitere Negativkontrollen wurden eingesetzt, um sicherzustellen, dass die erzielten Resultate auch auf eine spezifische Interaktion zwischen LPS und Phagemid zurückzuführen waren:

- a) Well ohne Phagemide (um unspezifische Bindung des M13-Antikörpers auszuschließen)
- b) Well ohne M13-Antikörper (als Kontrolle für die Antikörper-spezifische Farbreaktion)

Weiterhin wurden verschiedene Liganden- und Phagemidkonzentrationen getestet.

2.2.5.3 Herstellung von Antikörpern durch Immunisierungen von Tieren

Zur Herstellung von Antikörpern ist es nötig, entweder Kaninchen (für polyklonale) oder Mäuse (für monoklonale) zu immunisieren. Für die LPS-Antikörper wurden die Tiere mit durch Hitze inaktivierten Bakterien immunisiert. Eine über Nacht gewachsene Kultur des Stammes 21701 wurde für 10 min bei 3000 x g zentrifugiert, das Sediment in 0,9 % (w/v) NaCl aufgenommen und für 1h bei 100 °C gekocht. Nach Zentrifugation (10 min, 3000 x g) erfolgte eine Resuspendierung der Bakterien in 0,9 (w/v) NaCl, eine erneute Zentrifugation und zum Schluß eine Resuspendierung

des Sedimentes in a. bidest. Nach Lyophilisation wurde ein Teil der gewonnenen Zellen durch Verseifung (☞ 2.2.4.1) de-O-acetyliert.

Zur Titerbestimmung und zur Charakterisierung wurden jeweils Mikrotiterplatten-Essays (ELISA) nach folgendem Schema durchgeführt:

- Kopplung von nativem und verseiftem LPS an Vertiefungen der Mikrotiterplatte (über Nacht).
- Blockieren der freien Bindungen mit 2 % (w/v) Milch in PBS (1 h) (☞ 2.1.7).
- Zugabe des Testserums in je 4 verschiedenen Verdünnungsstufen (zwischen 1:10²-1:10⁷, abhängig von der Anzahl bereits erfolgter Immunisierungen) in ein Well mit nativem und in eins mit verseiftem LPS sowie in ein Well ohne Antigen (3-4 h).
- Waschen mit 0,5 % (v/v) Tween 20 in PBS (6 x 5 min).
- Zugabe des entsprechenden sekundären, Peroxidase-gekoppelten Antikörpers (Anti-Maus oder Kaninchen) (3-4 h).
- Waschen mit 0,5 % (v/v) Tween 20 in PBS (6 x 5 min).
- Zugabe von ABTS [2,2'-Azido-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)].
- Auswertung im Fluoreszenzphotometer bei einer Wellenlänge von 405 nm.

Der Titer der erhaltenen Antikörper errechnet sich dann nach folgender Formel:

$$A = \frac{Y_1 - Y_2}{X_1 - X_2}$$

$$X_T = \frac{(Y_1 - HG) + X_1}{A}$$

HG = Hintergrund (Absorption ohne Liganden)

X₁ bzw. X₂ = Konzentration der Antikörperlösungen 1 bzw. 2 (Verdünnungsfaktor)

Y₁ bzw. Y₂ = Extinktion des Antikörperlösungen 1 bzw. 2

X_T = Titer

2.2.5.3.1 Polyklonale Antikörper

Zur Gewinnung polyklonaler Antikörper wurde je ein Kaninchen mit 500 µg nativen, bzw. verseiften, durch Hitze inaktivierten Bakterien (siehe oben) nach folgendem Schema immunisiert:

| | |
|------------|--|
| Tag 1: | 1. Immunisierung und 1. Serumgewinnung |
| 2. Woche: | 2. Serumgewinnung |
| 6. Woche: | 2. Immunisierung |
| 8. Woche: | 3. Serumgewinnung |
| 12. Woche: | 3. Immunisierung |
| 14. Woche: | 4. Serumgewinnung |

Zur Kontrolle des Antikörpertiters wurden Blutproben zur Serumgewinnung aus der Ohrvene entnommen und in verschiedenen Verdünnungen zur Titerbestimmung (siehe oben) eingesetzt. Die gebundenen Antikörper wurden mit Peroxidase-markiertem Anti-Kaninchen-Antikörpern (Sigma) und dem Peroxidasesubstrat ABTS durch Fluoreszenzmessungen bei einer Wellenlänge von 405 nm quantifiziert. Negativkontrollen, wie oben beschrieben (☞ 2.2.5.2), dienten zur Absicherung der Meßwerte.

Die erhaltenen Seren wurden mehrmals hintereinander mit dem jeweils heterologen LPS inkubiert, um ein für entweder natives oder de-O-acetyliertes LPS spezifisches Serum zu erhalten. Hierbei sollten alle die Antikörper durch anschließende Zentrifugation entfernt werden, die nicht spezifisch für das gewünschte Sialinsäure-Epitop wären. Alternativ wurden die Seren auch mehrere Male mit den jeweils heterologen, hitzefixierten Bakterien inkubiert, um nur noch solche Antikörper in den Seren zurückzulassen, die spezifisch für eine LPS-Form sind.

2.2.5.3.2 Monoklonale Antikörper

Immunisierung: Zur Gewinnung Antikörper-produzierender B-Zellen der Milz wurden vier Balb/C Mäuse mit 500 µg der hitzefixierten, nativen und 4 mit verseiften Bakterien (☞ 2.2.5.3) nach folgendem Schema immunisiert:

| | |
|---------|--|
| Tag 1: | 1. Immunisierung und 1. Serumgewinnung |
| Tag 21: | 2. Serumgewinnung |
| Tag 25: | 2. Immunisierung |
| Tag 35: | 3. Serumgewinnung |
| Tag 39: | 3. Immunisierung |
| Tag 49: | 4. Serumgewinnung |

Für Mäuse, die mit de-O-acetyliertem Material immunisiert worden waren, wurden noch drei weitere Immunisierungen in vierzehntägigem Abstand durchgeführt.

Zur Kontrolle des Antikörpertiters wurden Blutproben (ca. 100 µl) zur Serumgewinnung aus der Schwanzvene der Mäuse entnommen. Mit den gewonnenen Seren wurde eine Titerbestimmung (☞ 2.2.5.3) durchgeführt. Als der Titer hoch genug erschien (ca 1×10^6) um eine Milzentnahme zur Herstellung von Hybridomen sinnvoll erscheinen zu lassen, wurden die Tiere innerhalb von 10 Tagen noch dreimal immunisiert (boostern) und durch Überführung in eine CO₂-gesättigte Atmosphäre getötet.

Zellfusion: Um eine Zelllinie zu erhalten, die den gewünschten Antikörper produziert, erfolgte eine Zellfusion, bei der die Antikörper-produzierenden Zellen der Maus (Milzzellen) mit einer stabilen Zelllinie (Ag8) aus der Zellkultur fusioniert wurden. Diese Hybridomzelllinien vereinen dann die Vorteile beider Zellarten: von der Milzzelle die Fähigkeit zur Antikörperproduktion und von der Myelomzelle die Fähigkeit, „in vitro“ zu überleben. Bei dieser Prozedur nach KÖHLER und MILSTEIN (1975) wurde den Mäusen zuerst die Milz entnommen, das Organ eines Tieres in eine Petrischale mit 10 ml RPMI-Medium (☞ 2.1.7) überführt und in möglichst kleine Stücke zerlegt. Nachdem die Gewebestücke für 1 min sedimentiert hatten, wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, in ein steriles Röhrchen überführt und dort mit RPMI-Medium auf 40 ml aufgefüllt. Ein zweites steriles Röhrchen wurde mit 50 ml Suspension einer stabilen, sich bereits in Kultur befindlichen Myelomzelllinie befüllt. Beide Gefäße wurden 10 min bei 1000 x g zentrifugiert und die erhaltenen

Sedimente mit RPMI durch dreimaliges Zentrifugieren gewaschen. Dann wurden beide Zellsedimente vereinigt, zentrifugiert und der Überstand vollständig abgesaugt. Durch vorsichtiges „Klopfen“ wurden die Zellen ohne Zugabe von Medium resuspendiert. Über einen Zeitraum von 1 min wurde dabei langsam 1 ml vorher auf 37 °C erwärmtes PEG 8000 unter ständigem Schütteln addiert. In den nächsten 3 min folgten 5 ml RPMI und in den darauf folgenden 5 min noch einmal 30 ml RPMI-Medium. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 1000 x g für 10 min wurde das Sediment in 300 ml Fusionsmedium [10 % (v/v) FCS (fötales Kälberserum), 1 ml HAT-Supplement (Hypoxanthin, Aminopterin, Thymin), 50 ml Kulturüberstand einer Makrophagenzelllinie (J774)] resuspendiert und in Aliquots von 1,5 ml in die Vertiefungen von Fusionsplatten (24 Well-Platten, Greiner, Nürtingen) pipettiert.

Charakterisierung der erhaltenen Antikörper: Nach 10 Tagen wurden die in den Kulturüberständen enthaltenen Antikörper der entstandenen Hybridom-Zellhaufen in einem ELISA auf ihre Antigen-Spezifität getestet. Dieser Test funktionierte in gleicher Weise wie die Titerbestimmungen (☞ 2.2.5.3).

Um sicherzustellen, dass es sich um Nachkommen einer Hybridomlinie und nicht um Mischkulturen handelte, wurden von allen Zellhaufen, die eine spezifische Reaktion zeigten, über zwei Stufen Subklone erzeugt. Diese Subklone wurden erneut im ELISA auf ihre Antigen-Spezifität geprüft und schließlich in Gewebekulturpetrischalen (Ø 10 cm) kultiviert. Bei den ELISA-Tests wurden jetzt neben LPS noch gereinigtes natives oder verseiftes O-Antigen (☞ 2.2.4.1) als Zielstruktur eingesetzt, um sicherzustellen, dass auch das O-Antigen für die Bindung des Antikörpers verantwortlich ist und nicht andere LPS-Komponenten.

Um die Spezifität noch genauer charakterisieren zu können, wurden mit den erhaltenen Antikörpern zusätzlich Konkurrenzexperimente durchgeführt. Dabei wurden die Antikörper mit jeweils einer oder mehreren anderen im LPS vorhandenen Komponenten, die dabei in verschiedenen Konzentrationen stets im Überschuss vorhanden waren, inkubiert. Erst anschließend wurde das Antikörper/Kompetitor-Gemisch dem ELISA zugefügt. Sollten die Antikörper spezifisch an diese Komponenten binden, wäre der Antikörpertiter signifikant reduziert gegenüber der Kontrolle, also dem ELISA ohne Zugabe von Kompetitor.

Folgende LPS-Komponenten wurden bei diesen Experimenten verwendet.

- Galaktose (als O-Antigenkomponente)
- *N*-Acetyl-Galaktosamin (als O-Antigenkomponente)
- Galaktose und *N*-Acetyl-Galaktosamin (beide O-Antigenkomponenten vorhanden)
- Kdo (als ein Hauptbestandteil vom Core-Anteils des LPS, von dem bekannt ist, dass er O-acetyliert sein kann)
- Lipid A (dort können O-Acetylgruppen vorhanden sein)
- Freie 9-O-acetylierte Sialinsäure (im Idealfall wäre dies ein spezifischer Kompetitor)
- Ein Gemisch aus verschiedenen O-acetylierten freien Sialinsäuren (möglicher Kompetitor)
- GD₃ und BSA (andere sialinsäurehaltige Verbindungen)

Als weiterer Test wurden **Western-Blots** durchgeführt. Dazu wurde LPS isoliert (☞ 2.2.2.1), eine Hälfte davon verseift (☞ 2.2.4.1) und beide Formen in verschiedenen Konzentrationen (2, 5, 10 µg) durch SDS-Page (☞ 2.2.1) aufgetrennt. Der Transfer aus dem Polyacrylamid-Gelen erfolgte nach der von TOWBIN et al. (1979)

beschriebenen Methode im Tank-Blot-Verfahren bei konstant 150 V für 2,5 h unter Eiskühlung. Die Membran wurde anschließend für eine Stunde bei 37°C getrocknet, 10 min bei RT in 10 % (v/v) Essigsäure und 10 % (v/v) Isopropanol in a. bidest. fixiert sowie zweimal 30 s und zweimal 5 min in a. bidest. gewaschen. Die fertigen Filter wurden dann in 10 % (w/v) Milchpulver in PBS für 2 h geblockt und über Nacht in Antikörperlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein mehrmaliges Waschen in 0,5 % (v/v) Tween 20 in PBS und eine Inkubation mit käuflich erworbenem Peroxidase-markiertem Anti-Maus-Antikörper (Goat Anti-Mouse IgG(H+L)-HRP) für 4 h. Nach erneutem, mehrmaligem Waschen wurde die Färbung mit DAB-Reagenz durchgeführt.

Abschließend wurde mittels **Kolonie-Blotting** überprüft, ob eine Bindung der Antikörper auch an komplette Bakterien stattfand. Dazu wurde eine Bakteriensuspension auf LB-Platten so ausgespatelt, dass Einzelkolonien erhalten wurden. Diese wurden durch Blotting auf Nitrocellulosefilter überführt. Die Filter wurden dann zur Anheftung der Bakterien für 2 h bei 43 °C gebacken. Nachdem ein Filter zur Kontrolle verseift worden war (☞ 2.2.4.1), wurden die Filter geblockt (siehe oben), mit dem Anti-Maus-Antikörper (siehe oben) inkubiert, wiederum gewaschen und mit DAB-Substrat angefärbt.

2.2.5.3.3 Antikörper gegen Bakteriophagen

Gewinnung: Zur Gewinnung von Antikörpern gegen Bakteriophagen für die Untersuchung des Phagenspektrums (☞ 2.2.10) wurden von jedem Isolat (☞ 2.1.10) 10 µl entnommen und diese Aliquots vereinigt. Nach Zentrifugation mit 100.000 x g für 10 min wurde das Sediment in 500 µl PBS resuspendiert. 1 µl der Suspension wurde mit 1 ml logarithmisch wachsender Bakterien des Stammes 21701 für 30 min bei 37 °C bebrütet, zusammen mit 3 ml Top-Agar auf eine LB-Platte verteilt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die erhaltenen Plaques wurden ausgezählt und anhand dieser Titerbestimmung wurde die Konzentration der Bakteriophagen so eingestellt, dass sie 2×10^8 Phagen/ml betrug. Die Immunisierung der Mäuse mit 500 µl dieser Suspension folgte dem oben beschriebenen Schema (☞ 2.2.5.3.1) zur Gewinnung monoklonaler Antikörper.

Charakterisierung: Von den aus dem Schwanzvenenblut der Mäuse gewonnenen Seren wurde zunächst getestet, ob im Blut Antikörper gegen die Bakteriophagen enthalten waren. Hierzu wurden zunächst die auch zur Immunisierung eingesetzte Suspension über Nacht an die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gekoppelt, die freien Bindungsstellen blockiert, das aus der Maus erhaltene Serum zugegeben und für 4 h inkubiert. Nach mehreren Waschschritten mit Tween 20 (0,5 % in PBS) wurde der sekundäre Peroxidase-gelabelte Anti-Maus-Antikörper addiert, nach weiteren 3 h wiederum mit Tween 20 in PBS mehrfach gewaschen und ABTS als Substrat hinzugefügt. Die Auswertung erfolgte bei einer Wellenlänge von 405 nm im Fluoreszenzphotometer. Als Kontrolle wurde das Serum auch in eine Vertiefung pipettiert, in dem sich keine gekoppelten Phagen befanden (Negativkontrolle). Später wurde in einem ELISA untersucht, ob sich auch Antikörper gegen einzelne Phagenisolate im Blut der Maus befanden. Hierzu wurden je 100 µl der Phagen-Einzelisolate (☞ 2.1.10) an die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gekoppelt und der ELISA anschließend wie oben beschrieben durchgeführt.

2.2.6 DNA-Techniken

2.2.6.1 DNA-Isolierung

Chromosomale DNA: Für die Hybridisierungstechniken mit radioaktiv markierten Sonden ([☞ 2.2.6.4](#)) mußte in großer Menge chromosomale DNA des Stammes 21701 isoliert werden. Dies geschah in folgenden Arbeitsschritten:

- 50 ml einer Übernachtskultur der Zellen 10 min bei 3500 x g zentrifugieren.
- Das Sediment in 8 ml Lysozym-Puffer lösen und für 2 h bei RT inkubieren.
- Zu 4 ml des Ansatzes 1,2 ml 10 % (v/v) SDS addieren und für 20 min im Wasserbad bei 60 °C schwenken.
- Zugabe von 1,2 ml 5 M Na-Perchlorat und 2/3 Vol Chloroform-Isoamylalkohol (24:1), danach 30 min schwenken.
- 20 min bei 9000 xg zentrifugieren.
- Die wässrige Phase in neues Gefäß überführen und mit 2 Vol. 96 %igem Ethanol überschichten.
- Die DNA mit einem Glasstab aufwickeln und trocknen.
- Den Stab mit der DNA in 5 ml 0,1 x SSC überführen und in dieser Lösung bei 4 °C über Nacht belassen.
- Zu der in Lösung gegangenen DNA 50 µl RNase A –Lösung (50mg/ml) geben und 30 min bei RT inkubieren.
- Die Lösung mit 10 x SSC auf 1 x SSC aufkonzentrieren.
- Nach Zugabe von 3 ml Phenol für 30 min schwenken, anschließend zentrifugieren.
- Überstand abnehmen und mit 2 Vol 96 %igem Ethanol überschichten.
- DNA mit Glasstab aufwickeln, für 30 min in Ethanol (70 %) waschen und
- 30 min trocknen.
- Stab mit DNA in 2 ml 0,1 x SSC geben und über Nacht lösen lassen.

Die erhaltene DNA wurde in Portionen zu je 500 µg gefällt und bei –20°C aufbewahrt.

Plasmid-DNA: Von einer LB-Platte wurde mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers eine Einzelkolonie in 3 ml LB überimpft und diese Kultur unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums ([☞ 2.1.4](#)) über Nacht bei 37 °C angezüchtet. Die Isolierung der Plasmide erfolgte mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit nach Herstellerangaben. Die Elution der Plasmide erfolgte in 30 µl des Elutionspuffers (Tris/HCl, pH 8,0). Die so erhaltenen Plasmide wurden quantifiziert ([☞ 2.2.6.5](#)) und konnten direkt zur Sequenzierung ([☞ 2.2.6.6](#)), PCR ([☞ 2.2.6.7](#)), Transformation ([☞ 2.2.6.3](#)) oder zur Analyse durch Restriktionsendonukleasen ([☞ 2.2.6.5](#)) verwendet werden.

Phagemid-DNA: Die Isolierung der Phagemide erfolgte auf zwei verschiedenen Wegen, je nachdem, ob eine Einzelstrang- oder eine Doppelstrangsequenzierung ([☞ 2.2.6.6](#)) durchgeführt werden sollte.

Zur Isolierung der DNA-Einzelstränge wurden 1 µl der Phagemidlösung ([☞ 2.2.5.2](#)) zu 200 µl logarithmisch wachsenden Zellen des *E. coli* Stammes NM522 ([☞ 2.1.8](#)) pipettiert, für 1 h bei RT geschüttelt, in 3 ml Top-Agar überführt, auf NZY-Agarplatten ([☞ 2.1.9.1](#)) verteilt und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Am nächsten Morgen wurden Einzelplaques mit einem sterilen Zahnstocher in 2 ml YT-Medium ([☞ 2.1.9.1](#)) überführt, dem vorher 100 µl einer logarithmisch wachsenden Kultur des Stammes

NM522 zugefügt worden war, überimpft und für 6 h leicht geschüttelt und inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 3500 x g sedimentiert und 7,5 ml des Überstandes wurde dekantiert. Diesem wurden 2,5 ml 5 M NaCl sowie 2,5 ml 50 % (v/v) PEG 6000 zugefügt und die Phagemide für 2 h auf Eis gefällt. Nach Zentrifugation für 30 min bei 12000 x g wurde der Überstand vollständig entfernt und das Sediment in 100 µl TE-Puffer (☞ 2.1.7) resuspendiert. Um störende Proteine zu beseitigen, wurden 100 µl Phenol, Chloroform, Isoamylalkohol (25:24:1; v/v/v) addiert, mit der Suspension vermischt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 14000 UpM in einer Eppendorf Tischzentrifuge. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und eine Chloroformextraktion durch Zugabe von 50 µl reinem Chloroform und einer Zentrifugation für 5 min bei 14000 RpM durchgeführt. Nach Abnehmen der wässrigen Phase wurden die darin enthaltenen Phagemide mit 10 µl 3 M Na-Acetat und 250 µl 96 % Ethanol (unvergällt) bei -20 °C über Nacht gefällt. Am nächsten Tag wurde die Präparation mit 14000 UpM (Tischzentrifuge) zentrifugiert und das Sediment mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Das Sediment trocknete unter der sterilen Werkbank und wurde in 15 µl TE-Puffer aufgenommen. Nach Kontrolle auf das Vorhandensein der Phagemide sowie zur Mengenabschätzung durch Agarosegelelektrophorese (☞ 2.2.6.5) wurde die gereinigte ssDNA sequenziert (☞ 2.2.6.6).

Für die Isolierung doppelsträngiger DNA wurden Einzelkolonien der Phagemid-enthaltenden Bakterien in jeweils 2 ml LB-Medium (Amp 100 µg/ml, Tc 20 µg/ml) überimpft und über Nacht bei 37 °C angezüchtet. Für den Aufschluß der Bakterien mit Lysozym wurden 1 ml der Zellsuspension in 1,5 ml-Reagiergefäße überführt, bei 14000 RpM zentrifugiert und das Sediment in 100 µl STETL-Puffer (☞ 2.1.7) resuspendiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei RT, einer 2-minütigen Erhitzung auf 96 °C und 10 min bei -20 °C wurde die Suspension nochmals wie oben zentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit einem sterilem Zahnstocher entfernt, der Überstand in ein neues Gefäß überführt und die RNA nach Zugabe von 1 µl RNase A-Lösung (50 mg/ml) für 30 min bei 37 °C abgebaut. Zur Fällung der Phagemid-DNA wurden 100 µl Isopropanol zugefügt, die Lösung gemischt und bei RT für 15 min mit 14000 UpM in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert. Die DNA wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 15 µl a. bidest. gelöst.

DNA-Isolierung aus Agarosegelen: DNA, die durch Restriktionsendonukleasen gespalten worden war (☞ 2.2.6.2), wurde zur Auftrennung der erhaltenen Fragmente auf ein Agarosegel (☞ 2.2.6.5) aufgetragen. Ebenso wurde mit entstandenen Produkten der PCR (☞ 2.2.6.7) verfahren. Für diese Gelelution kam das Qiagen Extraction Kit (Qiagen, Hilden) zum Einsatz, wobei die einzelnen Arbeitsschritte nach Herstellerangaben ausgeführt wurden. Die so gereinigte DNA wurde in 30 µl a. bidest. aufgenommen, photometrisch quantifiziert (☞ 2.2.6.5) und zur Ligation (☞ 2.2.6.2) eingesetzt.

2.2.6.2 DNA-Modifikation

DNA-Fragmentierung: Mit Hilfe von Restriktionsenzymen kann DNA in definierte Fragmente zerlegt werden. So können z. B. bestimmte DNA-Bereiche wie ein Insertionselement (☞ 2.1.5) oder ein vorher ligiertes (☞ 2.2.6.2) DNA-Fragment wieder herausgeschnitten werden.

Für solche Spaltungen wurde folgender Reaktionsansatz gewählt:

1 µl 10 x Puffer (Enzymspezifisch, nach Herstellerangaben)
1 µl Enzym
1 – 8 µl DNA (Plasmid, Phagemid)
ad 10 µl a. bidest.

Diese Reaktionsansätze wurden, wenn nicht anders beschrieben für 1 h bei 37 °C inkubiert und auf einem 1 %igen Agarosegel (☞ 2.2.6.5) aufgetrennt und analysiert.

Dephosphorylierung: Eine Dephosphorylierung war erforderlich, um bei einem Vektor, der nur mit einem Restriktionsenzym linearisiert und zur Ligation (siehe unten) vorbereitet wurde, eine Re-Ligation zu verhindern. Der Reaktionsansatz zur Spaltung des Vektors (siehe oben) wurde mit a. bidest. auf 44,5 µl aufgefüllt und 0,5 µl CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, Roche, Mannheim) sowie 5 µl 10 x CIAP-Puffer wurden addiert. Nach einer Inkubation für 1 h bei 37 °C sorgte eine Zugabe von 1,25 µl 200 mM EDTA und eine Erwärmung für 10 min auf 75 °C für eine Termination der Dephosphorylierungsreaktion. Das Gemisch wurde abgekühlt, 50 µl Phenol zugefügt, geschüttelt und 4 min bei 14000 RpM in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen, in ein neues Gefäß mit 5 µl 3 M Na-Acetat und 150 µl 96 % unvergällten Ethanol überführt und die DNA für 30 min bei 4 °C gefällt. Anschließend wurde 10 min zentrifugiert (14000 RpM, Tischzentrifuge). Und das Sediment mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 15 µl a. bidest. gelöst. Über photometrische Messungen (☞ 2.2.6.5) wurde eine Mengenabschätzung vorgenommen.

Ligation: Um die Produkte der PCR (☞ 2.2.6.7) zu sequenzieren (☞ 2.2.6.6) oder sie für die homologe Rekombination (☞ 2.2.8.4) oder Expressionsklonierung (☞ 2.2.5.4) einsetzen zu können, war es zunächst erforderlich, sie zu klonieren, d. h. sie in das für die jeweilige Anwendung erforderliche Plasmid zu integrieren. Für diese Ligation wurde das Verhältnis von Vektor zu Insert nach folgender Formel bestimmt:

$$\frac{\text{Menge des Vektors [ng]} \times \text{Größe des Inserts [kB]}}{\text{Größe des Vektors [kB]}} \times 3 = \text{Menge des Inserts [ng]}$$

Die Reaktionsansätze wurden folgendermaßen pipettiert:

1 µl Vektor
1 µl 10 x Ligasepuffer
1 µl T4-DNA Ligase
1-7 µl Insert
ad 10 µl mit a. bidest.

Die Ligationsansätze wurden bei 15 °C über Nacht inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.2.6.3 Transformation

Durch Transformation wurden entweder Plasmide (☞ 2.2.4.5; 2.2.6.6 und 2.2.8.4) oder Acetyl-CoA (☞ 2.2.9) in die lebenden Bakterien eingeschleust.

Elektroporation: Die Transformation von Plasmiden wurden mittels Elektroporation durchgeführt. Die dafür notwendigen elektrokompenten Zellen wurden wie folgt hergestellt:

Mit 10 ml einer Vorkultur des für die Anwendung erforderlichen Stammes [JM101, XL-1 blue, 21701] wurde 1 l LB-Medium inklusive dem für den jeweiligen Stamm erforderlichem Antibiotikum (☞ 2.1.9.2) beimpft und kultiviert, bis bei 600 nm eine OD von 0,5 – 0,8 (☞ 2.2.6.5) gemessen wurde. Die Bakterien befanden sich zu diesem Zeitpunkt in der logarithmischen Wachstumsphase. Die Zellen wurden für 15 min in Eiswasser geschwenkt, in vorgekühlte 500 ml-Zentrifugenbecher gefüllt und für 10 min und 4 °C bei 3500 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde noch zweimal in eiskaltem a. bidest. gewaschen und wie oben zentrifugiert. Die Bakterien wurden dann in 100 ml 10 % (v/v) Glycerin in a. bidest. resuspendiert und wiederum wie oben zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Resuspendierung der Zellen in 1 ml 10 % (v/v) Glycerin in a. bidest. Die Bakterien wurden in Aliquots zu 50 µl portioniert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C gelagert.

Für die eigentliche Transformation wurde 1µl DNA und ein 50 µl Aliquot elektrokompenter Zellen benötigt. Der BioRad Gene Pulser wurde auf 2,5 kV, der Pulse Controller auf 200 Ohm eingestellt. Die Bakterien wurden aufgetaut, zu der DNA pipettiert, das Gemisch in eine Elektroporationsküvette (BioRad, München) überführt und der Impuls von 2,5 kV appliziert. Sofort danach erfolgte die Zugabe von 1 ml SOC-Medium (☞ 2.1.7). In diesem Medium rekonstituierten die Zellen für 1 h bei 37 °C. Die Transformanden wurden auf LB-Platten mit den jeweils entsprechenden Antibiotika (☞ 2.1.9.2) ausgespatelt und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Die Überprüfung der Transformation erfolgte über eine PCR (☞ 2.2.6.7) oder über eine Plasmidisolierung (☞ 2.2.6.1) mit anschließender Spaltung durch Restriktionsendonukleasen (☞ 2.2.6.2). Dabei konnte überprüft werden, ob die Ligation (☞ 2.2.6.2) des unbekanntes DNA-Fragmentes oder PCR-Produktes in den Vektor auch funktioniert hatte.

CaCl₂/RbCl₂-Transformation: Für die Aufnahme von Acetyl-CoA wurden MOPS-[3'(N-Morpholino)propansulfonsäure] kompetente Zellen hergestellt. Mit 1 ml einer über Nacht gewachsenen Vorkultur des Stammes 21701 wurden 100 ml LB-Medium mit 2 µg/ml Erythromycin beimpft und bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (☞ 2.2.6.5) von 0,5-0,8 inkubiert. Je 4 ml dieser Kultur wurden durch Zentrifugation in 15 ml Corexröhrchen für 10 min und 4 °C bei 3500 x g sedimentiert. Dieses Sediment wurde in 1 ml MOPS 1-Puffer (10mM MOPS, 10 mM RbCl₂) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das erhaltene Sediment wurde in 1 ml MOPS 2-Puffer (100 mM MOPS, 50 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂) aufgenommen, 15 min auf Eis gekühlt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Sediment in 50 µl MOPS 2-Puffer resuspendiert.

Zur Transformation wurde je 0,25 µCi ³H-AcCoA zu 100 µl MOPS-kompetenten Zellen gegeben und auf Eis für mehrere Stunden inkubiert, bevor geprüft wurde, wieviel Radioaktivität von den Bakterien aufgenommen worden war (☞ 2.2.4.6 und 2.2.9).

2.2.6.4 DNA-Sonden

PCR-Primer: Um zu überprüfen, ob das durch Datenbanksuche (📖 2.2.6.5 und 2.2.6.6) gefundene Gen auch in dem *E. coli* Stamm 21701 enthalten ist, wurden für die PCR Oligonukleotide (= Primer) konstruiert, die sich direkt hinter dem Start- bzw. am Stopcodon anlagern. Zu beachten ist, dass der zweite Primer revers zum offenen Leserahmen sein muß, damit die DNA in die richtige Richtung (also hin zum Startcodon) verlängert wird.

Primer für das Startcodon: 5'-AAG GGA ATA TTT GCG CTA TGT C-3' (Hin1)
 $T_M = 62\text{ °C}$

Primer für das Stopcodon: 5'-TTA GTG GTA GCC CAT CAA CTG-3' (Rück1)
 $T_M = 62\text{ °C}$

Um die DNA, die als Zielsequenz bei der homologen Rekombination (📖 2.2.8.4) eingesetzt werden sollte, zu erhalten, wurden Primer direkt aus der bekannten Sequenz in der Datenbank abgeleitet. Zusätzlich wurde ihnen am 5'-Ende eine Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym vorangestellt, um die spätere Ligation (siehe oben) zu erleichtern. Damit diese Enzyme auch schneiden konnten, mußten dieser Basenabfolge wiederum 1 (bei Eco RI) oder 4 (Bei HindIII) Nukleotide vorangestellt werden. Der Primer für das 3'-Ende wurde wieder revers konstruiert.

Hin-Primer: 5'-GGTG **AAGCTT** GTA TCA GGT TGA TGG TCA AAC-3' (HindH2)
 $T_M = 60\text{ °C}$

Rück-Primer: 5'-C **GAATTC** GGT ATT TAA CAC GCT GGC ATC-3' (EcoR2)
 $T_M = 62\text{ °C}$

Die Erkennungssequenzen für die Enzyme sind **fett** gedruckt.

Sonden: Es bestand die Möglichkeit, das Gen für die Sialinsäure-spezifische O-Acetyltransferase mittels möglicher O-Acetyltransferase-ähnlicher DNA-Bereiche zu detektieren. Für die Ermittlung möglicher homologer Sequenzbereiche stand zunächst ein Alignment bisher bekannter O-Acetyltransferasen (SLAUCH et al., 1996) zur Verfügung. Darauf basierend wurden die Sequenzen der darin erwähnten Procaryoten mit Hilfe der Datenbank HUSAR (EMBL, Heidelberg) zusammengestellt und ein Alignment zur Detektion möglicher homologer Sequenzbereiche durchgeführt (📖 3.4.1, Abb. 10).

Aus den für diese Aminosäuren codierenden Nukleotidsequenzen wurden vier verschiedene Sonden konstruiert, von denen zwei mehr an den vorderen und zwei an den hinteren Bereich der detektierten konservierten Region binden sollten.

- | | | |
|----|---------------------------------|----------------------|
| 1) | GCA GTA A/TCG ATT TTC TTT | $T_M = 48\text{ °C}$ |
| 2) | GGT GTC GAT GTC TTC TTC | $T_M = 54\text{ °C}$ |
| 3) | TAC TA/T TCA GGA/T TTT GTA/T AT | $T_M = 48\text{ °C}$ |
| 4) | TG TAC AGC GGC TTC CTC/G CT | $T_M = 60\text{ °C}$ |

Radioaktive Markierung von Sonden: Damit die oben genannten Oligonukleotide auch zur Detektion homologer Bereiche in Hybridisierungen (☞ 2.2.6.5) eingesetzt werden konnten, mußten sie radioaktiv markiert werden.

Für diese 5'-Endmarkierung nach SAMBROOK et al. (1989) mit ^{32}P - γ -ATP wurden 50 μCi des in wässriger Lösung gelieferten ^{32}P - γ -ATP bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren und lyophilisiert (Vakuum Konzentrator Savant SC 110). Zum Lyophilisat wurden folgende Reaktionspartner gegeben:

| | |
|--------------------|--|
| 10,0 μl | Oligonukleotid-Lösung (40 μM) |
| 2,0 μl | 10 x T4-Polynukleotidkinase-Puffer |
| 2,0 μl | T4-Polynukleotidkinase-Lösung (10 U/ μl) |
| 6,0 μl | a. bidest. |

Der Ansatz wurde 1 h bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert, bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren und direkt für die Hybridisierungen benutzt.

2.2.6.5 DNA-Analytik

Agarosegelelektrophorese: Für die Analyse der durch Restriktionsenzyme fragmentierten DNA und der PCR-Produkte wurde eine Agarosegelelektrophorese verwendet. Bei dieser Methode wird die DNA ihrer Größe entsprechend aufgetrennt, wobei die Auflösung bei ca. 50 Bp lag. Es wurden Elektrophoresen mit 1 %igen Agarosegelen mit 1 x TBE (☞ 2.1.7) als Laufpuffer bei 100 V für ca. 1 h bei RT in Minigelanlagen (Pharmacia, LKB) durchgeführt. Die Detektion der Moleküle im Gel wurde durch die Zugabe von Ethidiumbromid (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zum Gel gewährleistet. Dabei handelt es sich um ein interkalierendes Molekül, das sich während des Elektrophoresevorgangs in die DNA einlagert. Da Ethidiumbromid im UV-Licht orange fluoresziert, kann die DNA auf diesem Weg indirekt sichtbar gemacht werden. Für die Dokumentation der Ergebnisse wurden Polaroidfotographien im UV-Durchlicht aufgenommen. Als Molekulargewichtsstandard wurde die mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII geschnittene DNA des Phagen Lambda oder käuflich erworbene DNA-Leitern [SMART-Ladder (Eurogentec) oder Mass Ruler DNA Ladder (Fermentas)] eingesetzt.

Photometrische Bestimmung: Mit der Photometrie können sowohl Bakterien, wie auch Nukleinsäuren quantifiziert werden. Anhand der optischen Dichte bei 600 nm kann das Wachstum einer Bakterienkultur verfolgt werden, so dass bestimmt werden kann, wann sich eine Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase befindet. Dazu wurde zunächst mit einer Referenzküvette, in der sich das unbeimpfte Kultur-Medium befand, der Nullwert abgeglichen. Anschließend wurde die optische Dichte von 1 ml Kultursuspension gegen 1 ml Medium gemessen.

Ebenso erfolgte die Quantifizierung von DNA. Nach dem Abgleichen der Referenz- und Probenküvetten wurde von der DNA eine 1:100 Verdünnung (5 μl in 495 μl a. bidest.) hergestellt und dann bei 260 nm und 280 nm gemessen. Bei 260 nm haben Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum, wogegen das von Proteinen bei 280 nm liegt. Der Quotient der Meßwerte liegt bei reinen Nukleinsäuren etwa bei 2,0. Deutlich niedrigere Werte (<1,6) zeigen Verunreinigungen mit Proteinen an. Die Konzentration der DNA kann aus der Absorption bei 260 nm direkt gefolgert werden, da eine Extinktion von 1,0 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNA entspricht.

Hybridisierung: Durch Hybridisierungen wurde ermittelt, ob der Stamm 21701 Genbereiche aufweist, die zu den ermittelten, homologen Bereichen (☞ 2.2.6.4) passen.

Zunächst wurde die chromosomale DNA des Stammes isoliert (☞ 2.2.6.1) und mit verschiedenen Restriktionsenzymen (ClaI, BclI, PstI, RsaI, CfoI, ApaI, KpnI, Sau3a, MluI, BglII und einer Kombination von EcoRI und HindIII) fragmentiert (☞ 2.2.6.2). Die erhaltenen Spalt-Produkte wurden auf einem Agarosegel für 1h bei 100 V aufgetrennt (siehe oben).

Die DNA wurde dann der Methode von REED und MANN (1985) folgend durch einen **Southern-Blot** auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Bei dem gewählten Kapillarblotverfahren wurde das Gel zunächst zur hydrolytischen Spaltung großer DNA-Fragmente in 0,25 M HCl für 5-10 min inkubiert, bevor die DNA durch eine Inkubation für 2 x 30 min in 0,5 M NaOH + 1,5 M NaCl denaturiert wurde. Nach einer Spülung in a. bidest., erfolgte die Neutralisation in einer Lösung aus 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris + 1 mM EDTA (pH 7,2) für weitere 2 x 30 min. Für den Transfer der DNA vom Gel auf die Membran wird über eine Glasplatte ein Streifen Filterpapier gelegt, der mit beiden Enden in ein Pufferreservoir (20 x SSC) (☞ 2.1.7) eintauchte. Das Agarosegel wurde auf das Filterpapier und die nach Gelgröße zurechtgeschnittene Membran auf das Gel gelegt. Es folgten zwei Lagen feuchtes Filterpapier und ein großer Stapel Zellstoff, der mit einem Gewicht (ca. 1 kg) beschwert wurde, um die Kapillarwirkung noch zu erhöhen. Die Übertragung war nach ca. 12 h abgeschlossen, die Membran wurde in 2 x SSC gespült und bei der Hybridisierung eingesetzt.

Basierend auf den Methoden von WALLACE et al. (1981) sowie HAMES und HIGGINS (1985) erfolgte die Hybridisierung in einem Wasserbad.

Die Temperatur zur Prä- und zur eigentlichen Hybridisierung wurde durch folgende Formel ermittelt:

$$T_M (°C) = (\text{Summe der AT-Paare}) \times 2 + (\text{Summe der GC-Paare}) \times 4$$

Mit den aus dem Alignment abgeleiteten (☞ 2.2.6.4), radioaktiv markierten (☞ 2.2.6.4) Sonden wurde jeweils eine Hybridisierung durchgeführt. Als erstes wurde die Membran (siehe oben) für 1 h bei $T_M - 10$ °C im Hybridisierungspuffer (☞ 2.1.7) prähybridisiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der radioaktiv markierten Sonde. Die Hybridisierung fand bei $T_M - 10$ °C über Nacht statt.

Die Membranen wurden anschließend 3 x mit 6 x SSC (☞ 2.1.7) gewaschen, getrocknet, in Frischhaltefolie gewickelt, ein Röntgenfilm aufgelegt und die Membranen für 4 h bei -80 °C exponiert (Autoradiographie). Nach der Entwicklung und Fixierung konnten anhand der durch die Radioaktivität verursachten Schwärzung des Filmes DNA-Bereiche detektiert werden, an die die Sonden gebunden hatten. Da es sich bei dem Southern-Blot und der anschließenden Autoradiographie jeweils um einen 1:1 Blot handelte, konnte die Laufstrecke der detektierten Fragmente errechnet werden und aus einem zweiten Gel, das mit identisch behandelten Proben (siehe oben) beladen wurde, konnte der hybridisierende Fragmentbereich eluiert (☞ 2.2.6.1), in den Vektor pUC19 (☞ 2.1.4) ligiert (☞ 2.2.6.2) und in *E. coli* JM101 transformiert (☞ 2.6.6.3) werden. Die erhaltenen Klone wurden auf Agarplatten ausplattiert und geblottet, um eine **Koloniehybridisierung** durchzuführen. Die Klone, die das gewünschte Insert trugen, wurden dadurch detektiert. Zum Blotten der Kolonien wurden Nitrocellulose-Membranen (Amersham, Braunschweig) auf die Kolonien gelegt und nachdem sie mit Feuchtigkeit durchtränkt waren, wieder vorsichtig abgenommen. Die Membranen wurden zunächst für 5 min auf mit 0,5 M

NaOH getränktes Filterpapier gelegt. Danach erfolgte eine Überführung der Membranen auf Filterpapier, das mit 1,5 M NaCl + 0,5 M Tris (pH 7,4) getränkt war. Nach 5 min wurden die Membranen dann auf ein weiteres Stück mit 1,5 M NaCl + 2 x SSC getränktes Filterpapier überführt und für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Membranen unter der sterilen Werkbank getrocknet und für 2 h bei 80 °C gebacken. Die fertigen Filter wurden wie oben beschrieben mit der Sonde 1 hybridisiert. Die Auswertung erfolgte hier mittels eines Phosphor Imagers, der an die Sonden gebundene Kolonien detektieren konnte (☞ 2.2.4.6).

Von den ausgewählten Kolonien wurden Plasmidisolierungen (☞ 2.2.6.1) durchgeführt und die enthaltenen unbekanntes Fragment sequenziert (☞ 2.2.6.6).

2.2.6.6 Sequenzierung

Für die Sequenzaufklärung der Phagemide wurde nach der Didesoxymethode von SANGER et al. (1977) vorgegangen, wobei sowohl eine Einzelstrang-, wie auch eine Doppelstrangsequenzierung zur Anwendung kam.

PCR-Produkte (☞ 2.2.5.4, 2.2.6.5 und 2.2.8.4) wurden dagegen durch cycle sequencing sequenziert und in einem automatischen Sequencer (ABI PRISM, Perkin Elmer) durch Kapillarelektrophorese ausgewertet.

Didesoxymethode: Während bei Einzelsträngen (☞ 2.2.6.1) die Anbindung der Sequenzierungsprimer an die isolierte DNA direkt möglich war, mußte bei der Doppelstrangsequenzierung vorher eine Denaturierung der isolierten Doppelstränge (☞ 2.2.6.1) erfolgen. Hierfür wurden 12,0 µl der DNA-Lösung zu 2,4 µl 1 M NaOH und 2,4 µl 1 mM EDTA pipettiert und dieser Ansatz 30 min bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 1,7 µl 3 M Na-Acetat und 42 µl 96 % Ethanol wurde die DNA für 1h bei -80 °C gefällt und 10 min bei 14000 UpM (Tischzentrifuge) sedimentiert. Das Sediment wurde getrocknet, in 3 µl eiskaltem a. bidest. gelöst und konnte direkt für die Doppelstrangsequenzierung benutzt werden.

Als Primer diente das von der Firma MoBiTec zur Sequenzierung vorgeschlagene Oligonukleotid mit der Baseabfolge:

Primer # 1255: 5'-GGGATTTTGCTAAACAAC-3'

Beide Reaktionen wurden mit dem Sequenase Sequenzierungs-Kit (Version 2.0, USB, Bad Homburg) durchgeführt, wobei jeweils mit dem halben Ansatz der Vorschrift gearbeitet wurde. Das einzusetzende (α -S³⁵)dATP wurde hierfür mit a. bidest. 1:2 verdünnt.

Für die Anlagerung der Primer wurde folgendes pipettiert:

| | |
|------------|--------------------------------------|
| 3 µl | gelöste DNA (1 µg) |
| 1 µl | Primer (0,5 pmol/µl) |
| <u>1µl</u> | <u>5 x Sequenase-Reaktionspuffer</u> |
| 5 µl | Sequenzierungsansatz |

Dieser Ansatz wurde zuerst für 20 min bei 37 °C und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daran schlossen sich Markierungsreaktion und Primerverlängerung an.

| | |
|--------|--|
| 5,0 µl | Sequenzierungsansatz |
| 0,5 µl | DTT (0,1 M) |
| 0,5 µl | (α -S ³⁵)dATP (10 µCi/µl) |
| 1,0 µl | <u>Sequenase (1:7 in Sequenase-Verdünnungspuffer verdünnt)</u> |
| 7,0 µl | Reaktionsansatz |

Dieser Ansatz wurde für 2-5 min bei 37 °C inkubiert.

Vorher waren je 2,5 µl der vier Terminationsgemische (dNTPs je 80 µM, ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP 8 µM) in ein Reagiergefäß pipettiert und auf 37 °C vorgewärmt worden. Es wurden nach der Primerverlängerung 3,5 µl des Reaktionsansatzes zu jedem Terminationsgemisch gegeben. Die Terminationsreaktion wurde nach 15 min durch Zugabe von 4 µl Stopplösung beendet.

Vor der elektrophoretischen Auftrennung mußten die Ansätze für 2 min bei 96 °C denaturiert werden.

Für die Auftrennung wurde ein denaturierendes 8 %iges Polyacrylamidgel (210 ml Acrylamid-Stammlösung, 420 g Harnstoff, 800 ml 10 %iges APS, 72 µl TEMED, ad 1 l a. bidest.) mit einer Dicke von 0,2 mm verwendet. Als Laufpuffer diente 1 x TBE (☞ 2.1.7). Die Elektrophoresen erfolgten in einer Sequenzierungsanlage (Life Technologies, früher Gibco BRL) bei 60-75 W und einer konstanten Temperatur von 50 °C. Die Auftrennung wurde abgeschlossen, wenn der obere Farbmarker bis 1 cm vor den Rand gelaufen war. Das Gel wurde dann auf 2 mm Whatman-Papier (GB003) übertragen, für 2 h mit einem Fön vollständig getrocknet und mit einem Röntgenfilm über Nacht in einer Kassette mit Verstärkerfolie (Rast) exponiert (☞ 2.2.4.6), so dass nach Entwicklung und Fixierung des Films die Sequenzen ablesbar waren.

Cycle sequencing: Für diese Methode wurde mit dem „ABIPRISM™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ von ABI (Perkin Elmer) mit AmpliTaq DNA-Polymerase gearbeitet, wobei stets der halbe Ansatz der Vorschrift verwendet wurde. Die erhaltenen PCR-Produkte (☞ 2.2.6.7) wurden in den Vektor pGEM mit Hilfe des pGEM T-Vector System (Promega) nach Herstellerangaben ligiert (☞ 2.2.6.2) und in *E. coli* JM101 transformiert (☞ 2.2.6.3). Nach Vermehrung der Bakterien über Nacht bei 37 °C wurden die Plasmide wieder isoliert (☞ 2.2.6.1) und nach einer quantitativen Bestimmung (☞ 2.2.6.5) sequenziert. Aus Agarosegelen eluierte Fragmente (☞ 2.2.6.1) wurden in den Vektor pUC 18 (☞ 2.1.4) ligiert (☞ 2.2.6.2) und nach Transformation, Amplifikation, Isolierung und Quantifizierung zur Sequenzierung eingesetzt.

Als Primer wurden folgende Oligonukleotide benutzt:

| | |
|-------------|--------------------------------------|
| T7-Promoter | 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3' |
| M13 revers | 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GA-3' |

Für die Sequenzierung der in pKK223-3 (☞ 2.2.45.4) klonierten Fragmente wurden aus der bekannten Plasmid-Sequenz folgende Oligonukleotide abgeleitet und als Primer verwendet:

PKKH1: 5'-TGA AAA TCT TCT CTC ATC CGC-3'
PKKR1: 5'-GAG CTG TTG ACA ATT AAT CAT C_3'

Somit konnten die unbekanntes DNA-Fragmente in beiden Vektoren von zwei Seiten sequenziert werden.

Folgender Reaktionsansatz wurde pipettiert:

| | |
|--------------------|----------|
| Template-dsDNA | 800 ng |
| Primer | 3,2 pmol |
| Sequenzierungs-Mix | 4 µl |
| a. bidest. | ad 20 µl |

Für einen Thermo-Cycler (Perkin Elmer 9600) wurde folgendes Programm entworfen, wobei der Zyklus 25 x wiederholt wurde.

| | | |
|-------|-------|------------------------|
| 2 min | 96 °C | initiale Denaturierung |
| 10 s | 96 °C | Denaturierung |
| 5 s | 50 °C | Annealing |
| 4 min | 60 °C | Extension |

unendlich 4 °C

Nach dem Ende des Programms wurde der Sequenzierungsansatz mit a. bidest. auf 39 µl aufgefüllt, 6 µl Dextran Blue (Sigma), 5 µl Na-Acetat, pH 5,2 und 120 µl 96 % Ethanol addiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 14000 UpM in einer Tischzentrifuge wurde der Überstand abgenommen, das Sediment mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, in der Vakuum Konzentratoren getrocknet und in 25 µl TSR (Template **S**uppression **R**eagent) resuspendiert. Die Probe wurde für 2 min bei 96 °C denaturiert und der automatische Sequencer damit beladen. Nach ca. 50 min war die Sequenzierung abgeschlossen und die Sequenz konnte in Datenbanken analysiert werden.

2.2.6.7 DNA-Amplifikation

Als Technik zur Amplifikation von Gensegmenten wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. **P**olymerase **C**hain **R**eaction) angewandt. Es wurden aus Sequenzen, die über Datendankrecherche ermittelt wurden, Oligonukleotide abgeleitet (☞ 2.2.6.4), die als Primer für die DNA-Polymerase fungierten. Dieses Enzym synthetisiert vom 3'-OH des Primers ausgehend einen Einzelstrang komplementär zum Template. Hier kann sowohl genomische, chromosomale DNA als auch Plasmid-DNA genutzt werden. Beide DNAs liegen als Doppelstrang vor, der denaturiert werden muß (96 °C). Diese Phase dauert 2 min. Wurden als Template mit sterilen Zahnstochern gepickte, ganze Bakterienzellen verwendet, wurde die

initiale Denaturierungsphase auf 10 min erhöht, um sicherzustellen, dass die Zellwände auch vollständig denaturiert und die DNA damit zugänglich gemacht worden war. Anschließend erfolgte die Primeranlagerung (engl. Annealing) bei einer Temperatur in Abhängigkeit vom Schmelzpunkt der Oligonukleotide (☞ 2.2.6.4) und die Verlängerung (engl. Elongation) der Primer mit in der Lösung befindlichen dNTPs durch eine thermostabile Taq-Polymerase bei 72 °C für unterschiedliche Zeiten. Als Standard galt, dass innerhalb 1 min ein Produkt in einer Größe von 1kB vom Enzym produziert werden kann. Ein Standardprotokoll einer PCR ist in Abb. 5 dargestellt.

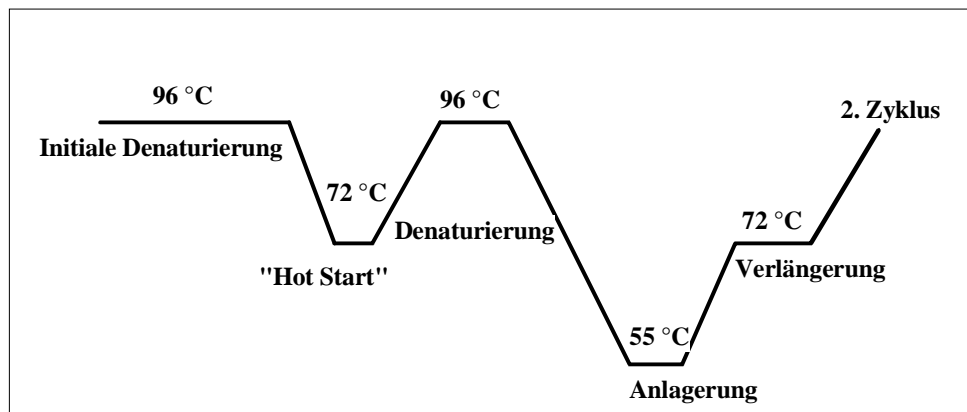


Abb. 5: Temperaturprofil für eine PCR

Folgende Kombination der Reagenzien wurde gewählt:

| | |
|--------|--|
| 5,0 µl | 10 x Reaktionspuffer (komplett mit MgCl ₂ , PeqLab) |
| 1,0 µl | dNTPs (je 10 mM) |
| 2,5 µl | Primer A (10 pmol/µl) |
| 2,5 µl | Primer B (10 pmol/µl) |
| 1,0 µl | Template in unterschiedliche Konzentrationen (x ng) |
| 1,0 µl | Enzym (4 U/µl) |
| 37 µl | a. bidest. |

Um unspezifische Bindung der Primer vor der ersten Denaturierungsphase zu vermeiden, wurde ein sogenannter „Hot-start“ durchgeführt, bei dem die Polymerase erst nach der ersten Denaturierungsphase bei einer Temperatur von 72 °C zugefügt wurde.

Mit Hilfe dieser Methode wurde überprüft, ob das über Hybridisierungen und Datenbankanalyse (☞ 2.2.6.5) ermittelte Gen auch im Stamm 21701 vorhanden ist. Dazu wurden die Primer Hin1 und Rück1 (☞ 2.2.6.4) bei einer Temperatur von 55 °C angelagert. Da das Gen 1,5 kB groß sein sollte, erfolgte die Verlängerung für 2 min.

Die Zielsequenz für die homologe Rekombination (☞ 2.2.8.4) wurde in gleicher Weise amplifiziert. Als Primer fungierten HindH2 sowie EcoR2. Als Annealing-Temperatur wurde 55 °C gewählt, die Elongation erfolgte in 1 min. Die Produkte wurden über Agarosegelelektrophorese analysiert (☞ 2.2.6.5).

2.2.6.8 Expressionsklonierung

Mit Hilfe der Expressionsklonierung wurde der Erfolg der homologen Rekombination (☞ 2.2.8.4) überprüft werden. Wenn es sich bei dem neu in die Defektmutante transformierten Gen um eine Kopie des vorher zerstörten handelte, würde dadurch das LPS wieder rekonstituiert werden können. Dazu wurde das über Hybridisierungen (☞ 2.2.6.5) detektierte Gen durch PCR (☞ 2.2.6.7) amplifiziert. 5 µl des Reaktionsansatzes wurden zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen (☞ 2.2.6.5) und mit Hilfe eines Standards die Größe bestimmt. Weiterhin konnte auch die Spezifität der Primer kontrolliert werden, im Idealfall sollte nur ein Produkt entstehen. Dieses Produkt wurde dann aus einem präparativen Gel eluiert (☞ 2.2.6.1) und in den Expressionsvektor pKK223-3 (☞ 2.1.4) ligiert (☞ 2.2.6.2). Nach Überprüfung der richtigen Orientierung mittels Sequenzierung (☞ 2.2.6.6) wurde das Vektorkonstrukt in die durch homologe Rekombination defekte Mutante transformiert (☞ 2.2.6.3). Mit einer über Nacht gewachsenen Kultur dieses neu entstandenen Subklons wurden 20 ml LB-Medium mit Ampicillin und Erythromycin (☞ 2.1.9.2) bis zu einer $OD_{600} = 0,5-0,7$ bebrütet, anschließend IPTG (2,5 mM) addiert und für zwei weitere Stunden inkubiert. Dadurch wurde das im Vektor enthaltene Gen zur Expression angeregt und das entsprechende Protein exprimiert. Nach Aufschluß eines Teils der Bakterien durch Lysozym (☞ 2.2.9) folgte eine 10minütige Zentrifugation bei 14000 UpM (Tischzentrifuge). Der Überstand wurde abgenommen und im SDS-PAGE (☞ 2.2.1) analysiert. Ein weiterer Teil der Bakterien wurde auf IPTG- und Antibiotikum-(siehe oben) enthaltenden Agarplatten ausplattiert, über Nacht bei 37 °C bebrütet und geblottet. Anschließend wurde mit Hilfe (☞ 2.2.5.3.2) der Antikörper festgestellt, ob das LPS wieder rekonstituiert worden war. Zusätzlich wurde das LPS isoliert (☞ 2.2.2.1) und über NMR (☞ 2.2.4.7) und SDS-PAGE (☞ 2.2.1) analysiert.

2.2.7 Induktion zur Phagenfreisetzung

Es wurden zwei Methoden angewendet, um möglicherweise im Genom des *E. coli* Stammes 21701 inserierte Prophagen zu induzieren.

UV-Bestrahlung: Aliquots einer über Nacht gewachsenen Kultur von *E. coli* 21701 wurden unter einer Sterilarbeitsbank Bestrahlungen mit UV-Licht unterschiedlicher Dauer (5 sec, 10 sec, 30 sec, 1min und 5 min) ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen wieder 5 h bebrütet, und für 10 min bei 3500 x g zentrifugiert. Von den Überständen wurden Aliquots (10 µl, 20 µl, 50 µl, 100 µl) abgenommen, mit 200 µl einer logarithmisch gewachsenen Kultur der Stämme 21701 und 3278 (☞ 2.1.9.1) vermischt, 30 min bei 37 °C bebrütet und nach Zugabe von 3 ml Top-Agar auf LB-Platten verteilt. Phagen sollten hierdurch am nächsten Tag als Plaques im „Rasen“ des *E. coli*-Stammes nachzuweisen sein.

Behandlung mit Mitomycin C: Zur Induktion von Prophagen wurden Bakterienkulturen (20 ml) in der logarithmischen Wachstumsphase mit Mitomycin C in unterschiedlichen Konzentrationen (1 µg, 2 µg, 2,5 µg, 5 µg, 7,5 µg, 10 µg, 25 µg und 50 µg) inkubiert (BUXTON, 1980; FOSTER, 1993), zentrifugiert und die erhaltenen Kulturüberstände wiederum auf möglicherweise enthaltene Phagen getestet (siehe oben).

Beide Behandlungen wurden zur Kontrolle parallel mit den Stamm 3279 (☞ 2.1.8) und dessen inseriertem Prophagen 1 durchgeführt.

2.2.8 Mutagenese des *Escherichia coli* Stammes

Mit 4 verschiedenen Methoden wurde versucht, die postulierte Sialinsäure-spezifische O-Acetyltransferase auf DNA-Ebene auszuschalten. Bei den ersten drei Methoden handelt es sich um ungerichtete Mutagenesen, d.h. die Gene wurden zufällig zerstört. Während bei der homologen Rekombination ein konkret ausgewähltes Gen (☞ 2.2.6.5 und 2.2.6.6) das Ziel war.

Folgende Verfahren wurden angewendet:

2.2.8.1 Mutagenese mittels UV-Licht

Für die Bestrahlung mit UV-Licht wurden 5 ml einer Übernachtskultur des *E. coli*-Stammes 21701 in eine Petrischale überführt und für 10 min mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt, so dass lediglich etwa 0,1 % der Zellen überlebte. Diese vorbehandelten Kultursuspensionen wurden dann mit Nährlösung so verdünnt, dass 400-500 Kolonien pro Agarplatte erhalten wurden. Nach Bebrütung über Nacht wurden die Kolonien auf Nitrocellulose geblottet, für 2 h bei 43 °C getrocknet und die Filter dann direkt zum Screening mit den verschiedenen Testsystemen (☞ 2.2.4.2 und 2.2.5.3) eingesetzt.

2.2.8.2 Transposonmutagenese

Durch die Bebrütung einer Kultur des *E. coli*-Subklons 21701R+pRU664 (Mut A) für 16 h bei 43 °C erfolgte eine Translokation des Plasmid-kodierten Transposons in das Genom des Wirtsstammes. Diese Kulturen wurden ebenfalls verdünnt, ausgespatelt, über Nacht bebrütet, geblottet, getrocknet und analysiert (siehe oben).

2.2.8.3 Mutagenese mit Hilfe eines Insertionselementes

Es wurde durch Transformation (☞ 2.2.6.3) des Vektors pG⁺host9::ISS1 (☞ 2.1.4.) in den *E. coli* Stamm der Subklon 21701+ pG⁺host9::ISS1 hergestellt. Bei diesem Klon erfolgt die Translokation des IS-Elementes ebenfalls durch eine Temperaturinduktion bei 43 °C, wie von MAGUIN et al. (1996) beschrieben. Die Bebrütungsdauer betrug wiederum 16 h. Auch diese Klone mußten nach Verdünnung ausgespatelt, bebrütet, geblottet und überprüft werden.

2.2.8.4 Homologe Rekombination

Anders als bei den oben beschriebenen Methoden wurde hier ein Gen ganz gezielt ausgeschaltet. Dieses wurde durch oben beschriebene Methoden (☞ 2.2.6.5 und 2.2.6.6) ausgewählt. Für eine gezielte Mutagenese ist das Vorhandensein einer Zielsequenz im Vektor erforderlich (TRIPODI et al., 1990). Dieses DNA-Fragment muß homolog zu dem Gen sein, das ausgeschaltet werden soll. Der so konstruierte Vektor plaziert sich dann in der chromosomalen DNA exakt in dem Gen, das die Homologie zur Zielsequenz aufweist. Der offene Leserahmen dieses Gens wird so unterbrochen und das entsprechende Protein nicht mehr exprimiert. Zuerst einmal

wurde durch PCR (☞ 2.2.6.7) ein Stück des zu zerstörenden Gens als Zielsequenz amplifiziert. Es handelte sich hierbei um ein 1 kB langes Fragment, beginnend ca 300 Bp hinter dem Startcodon. Somit war sichergestellt, dass kein funktionsfähiges Protein von diesem Genfragment translatiert werden konnte. Zusätzlich wurden die PCR-Primer so konstruiert (☞ 2.2.6.4), dass Erkennungsstellen am 5'-Ende des offenen Leserahmens für das Restriktionsenzym HindIII und am 3'-Ende für das Restriktionsenzym EcoRI vorhanden waren. Die DNA wurde gereinigt (☞ 2.2.6.1) und in einen Vektor ligiert (☞ 2.2.6.2). Als Vektor diente erneut pG⁺host9::ISS1 (☞ 2.1.4), aus dem vorher das IS-Element S1 mit Hilfe derselben Restriktionsenzyme herausgeschnitten (☞ 2.2.6.2) wurde.

Nach der Ligation (☞ 2.2.6.2) wurde das entstandene Konstrukt in den *E. coli* Stamm JM101 transformiert (☞ 2.2.6.3), die Plasmide wieder isoliert (☞ 2.2.6.1) und zur Kontrolle Sequenzierungen durchgeführt (☞ 2.2.6.6) sowie mit Hilfe von Restriktionsenzymen das klonierte DNA-Fragment wieder aus dem Plasmid isoliert (☞ 2.2.6.2). Der Vektor mit der korrekt inserierten Zielsequenz wurde dann in den *E. coli* Stamm 21701 transformiert und auch dort durch Plasmidisolierung und anschließende Spaltung mit Restriktionsenzymen auf seine Korrektheit überprüft.

Der erhaltene Subklon 21701 + pG⁺host9::Zielsequenz wurde zunächst HAMILTON et al. (1989) folgend für ca 5 h bei 30 °C bebrütet, bevor durch eine Erhöhung der Temperatur auf 43 °C eine Translokation des gesamten Vektors in das Genom erfolgte. Die Inkubation betrug wiederum 16 h. Dabei sollte die Insertion zielgerichtet in dem Gen erfolgen, dessen Genabschnitt als Zielsequenz vorgegeben worden war.

Alle derart vorbehandelten Kultursuspensionen wurden dann mit Nährlösung so verdünnt, dass 400-500 Zellen pro Agarplatte ausgespatelt wurden. Nach der Bebrütung über Nacht wurden die Kolonien auf Nitrocellulose geblottet und für 2 h bei 43 °C getrocknet. Die Filter waren jetzt direkt zum Screening mit den verschiedenen Methoden (☞ 2.2.4.2 und 2.2.5.3.2) einsetzbar.

2.2.9 Versuchsansätze zum Aktivitätsnachweis der Sialinsäure-spezifischen O-Acetyltransferase

Zur Entwicklung eines Enzymtests für Sialinsäure-spezifische O-Acetyltransferase wurden 21 verschiedene Versuchsansätze konzipiert. Dabei wurde jeweils Acetyl-CoA mit ³H-markiertem Acetylrest als Acetylgruppen-Donor eingesetzt.

Versuche mit Zellhomogenat: Die Bakterien wurden für die folgenden Experimente durch **Glasperlenaufschluß** homogenisiert (☞ 2.2.3) und das Homogenat mit dem ³H-AcetylCoA in Parallelansätzen bei 37°C inkubiert. Als Acetylgruppen-Akzeptor diente in den meisten Fällen isoliertes, verseiftes LPS. Zu den Zeitpunkten 0 min, 10 min, 30 min, 2 h und 16 h wurden die Reaktionen gestoppt, durch drei Ultrazentrifugationen bei 100.000 x g das zugegebene LPS reisoliert und der Einbau der radioaktiv markierten C2-Verbindung durch Autoradiographie und im β -Counter (☞ 2.2.4.6) gemessen. Zusätzlich wurden alle Versuche parallel mit durch Hitze abgetöteten Bakterien gemacht (Enzymatischer Nullwert).

Um die Spezifität des Enzyms zu testen wurden 10 Versuchsreihen 5 andere Substrate als Akzeptoren angeboten. Dabei handelte es sich um aktivierte Sialinsäure (CMP-Neu5Ac), Sialyllaktose oder 3 verschiedene, verseifte (☞ 2.2.4.1) Ganglioside und zwar ein Disialinsäure-Gangliosid (GD₃), ein Trisialinsäure-Gangliosid (GT_{1b}) und ein Tetrasialinsäure-Gangliosid (GQ_{1b}). Da es sich um ein

membrangebundenes Enzym handeln konnte, wurde in 4 weiteren Versuchsreihen ein ionisches Detergenz (CHAPS) und ein nicht ionisches Detergenz (Triton X-100) eingesetzt, um das Enzym zu solubilisieren. Die Konzentration dieser Detergenzien wurde so gewählt, dass sie oberhalb der kritischen Mycellarkonzentration (CHAPS: 6-19 mM, Triton X-100: 0,2-0,9 mM) lag. Als zusätzlicher Versuch zur Lokalisation des Enzyms wurde neben den Versuchen mit den oben erwähnten Detergenzien das Zellhomogenat bei 100.000 x g ultrazentrifugiert. Das erhaltene Sediment und der Überstand dienten dann als mögliche Enzymquelle. Weiterhin wurden 2 Versuche mit einem Esteraseinhibitor (DFP) durchgeführt, da frühere Versuche mit Methylumbelliferyl-Acetat Esteraseaktivitäten der *E. coli*-Zellen sichtbar gemacht hatten.

Folgende Versuche wurden durchgeführt:

- Zellhomogenat + Ac-CoA
- Zellhomogenat + Ac-CoA + de-O-acetyliertes LPS
- Zellhomogenat + Ac-CoA + de-O-acetyliertes LPS + 1 mM DFP
- Zellhomogenat + Ac-CoA + de-O-acetyliertes LPS + 20 mM CHAPS
- Zellhomogenat + Ac-CoA + de-O-acetyliertes LPS + 0,1 % (w/v) Triton X-100
- Zellhomogenat: 100.000 x g:
Überstand + Ac-CoA + de-O-acetyliertes LPS (Enzymaktivität löslich?)
- Zellhomogenat: 100.000 x g:
Sediment + Ac-CoA + de-O-acetyliertes LPS (Enzymaktivität membran-
gebunden?)
- Zellhomogenat + Ac-CoA + de-O-acetyliertes GD₃
- Zellhomogenat + AcCoA + de-O-acetyliertes GT_{1b}
- Zellhomogenat + AcCoA + de-O-acetyliertes GQ_{1b}
- Zellhomogenat + AcCoA + 1 mM Sialyllaktose
- Zellhomogenat + AcCoA + CMP-Neu5Ac (Enzymspezifität; O-Acetylierung erfolgt vor dem Einbau in das O-Antigen?)

In anderen Versuchen wurden die Zellen durch **Lysozym** behandelt. Dazu wurden 10 ml einer logarithmisch wachsenden Kultur 10 min bei 3500 x g zentrifugiert, das Sediment in 1 ml GTE-Lösung (Glucose 50 mM, Tris 25 mM, 10 mM EDTA, pH 6,8) aufgenommen, 1 mg Lysozym hinzugefügt und der Ansatz für 2 h bei RT geschüttelt. Nach Zentrifugation (siehe oben) wurde der Überstand abgenommen und als Enzymquelle verwendet (22 µl/Ansatz).

Auch hier wurden 8 verschiedene Versuchsansätze konzipiert, um die Enzymaktivität näher charakterisieren zu können. Alle Versuche wurden bei 30 °C durchgeführt, da diese Temperatur sich für die Sialinsäure-spezifische 4-O-Acetyltransferase aus Meerschweinchen als die geeignetste herauskristallisiert hatte (IWERSEN, persönliche Mitteilung). Die Inkubationszeit betrug immer 20 min und das Volumen immer 30 µl. Als Acetylgruppen-Donor diente wiederum Acetyl-CoA mit ³H-markiertem Acetylrest, wobei je Ansatz 3 µl (= 0,75 µCi) verwendet wurden. Je 10 µl/Ansatz wurden dann auf eine Cellulose- oder Kieselgelplatte aufgetragen, dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt (☞ 2.2.4.5) und analysiert (☞ 2.2.4.6). Anschließend wurden die Platten noch verseift (☞ 2.2.4.1) und nach einer erneuten Analyse ein Bial-Test durchgeführt (☞ 2.2.4.3).

Folgende Versuche wurden durchgeführt:

- Zellhomogenat + ^3H -Ac-CoA
- Zellhomogenat + ^3H -Ac-CoA + kaltes AcCoA (spezifischer Kompetitor)
- Zellhomogenat + ^3H -Ac-CoA + de-O-acetyliertes GD₃ (Enzymspezifität)
- Zellhomogenat + ^3H -Ac-CoA + Neu5Ac (Enzymspezifität)
- Zellhomogenat + ^3H -Ac-CoA + de-O-acetyliertes LPS (Enzymspezifität)
- Zellhomogenat + ^3H -Ac-CoA + de-O-acetyliertes O-Antigen (Enzymspezifität)
- Zellhomogenat (vorher durch Zugabe von SDS [10 % (v/v) 10 min bei 96 °C denaturiert] + ^3H -AcCoA
- Zellhomogenat + AcCoA+ nicht radioaktiv markiertes AcCoA (spezifischer Kompetitor) im einhundertfachen Überschuß

Bei den Versuchen mit Neu5Ac als Substrat erfolgte anschließend mit 20 µl des Ansatzes noch eine Reinigung der Sialinsäuren (☞ 2.2.3) und eine erneute Dünnschichtchromatographie (☞ 2.2.4.5).

Zusätzlich wurden in einer Versuchsreihe die Ansätze mit Homogenat und AcCoA bei verschiedenen Temperaturen (20 °C, 30 °C, 45 °C, 56 °C und 80 °C) für 20 min inkubiert sowie in einem weiteren Experiment getestet, wie sich die Enzymaktivität bei verschiedenen pH-Werten (3-10) verhält. Dazu wurden dem Zellhomogenat Puffer mit verschiedenen pH-Werten zugefügt, der entstandene pH-Wert gemessen, das Gemisch mit a. bidest. auf 30 µl aufgefüllt und die Inkubation für 20 min bei 30 °C durchgeführt.

Ebenso erfolgte eine Inkubation des Zellhomogenats der durch homologe Rekombination (☞ 2.2.8.4) erzeugten Mutante mit Acetyl-CoA.

Native Zellen: Bei diesem Experiment wurde radioaktiv markiertes Acetyl-CoA durch CaCl₂-Transformation in die lebenden Bakterienzellen eingeschleust (☞ 2.2.6.3) und diese Ansätze bei 4 °C unterschiedlich lange inkubiert ausgesetzt. Zu bestimmten Zeitpunkten (2 h, 10 h, 16 h, 24 h, 36 h und 48 h) wurde die Bakteriensuspension dann in LB-Medium überführt und bei 37°C inkubiert. Alle 15 min (0-195 min) wurden Proben entnommen, um zu messen, ob die Zellen noch teilungsaktiv waren, was durch einen entsprechenden Anstieg der optischen Dichte bei 600 nm (☞ 2.2.6.5) nachgewiesen wurde.

Die Bakterien wurden für die LPS-Isolierung in LB-Medium bei 37 °C inkubiert, anschließend geerntet und das LPS isoliert (☞ 2.2.2.1). Vom gereinigten LPS wurde der Lipid A-Anteil abgespalten (☞ 2.2.2.1) und nach der Ultrazentrifugation der Überstand (Zucker) und das Pellet (Lipid A) auf eingebaute Radioaktivität überprüft (☞ 2.2.4.6), wobei ein Teil der Präparationen vorher de-O-acetyliert (☞ 2.2.4.1) worden war.

2.2.10 Charakterisierung der Bakteriophagenadhäsion

Mit Hilfe des gegen die Phagen gerichteten Serums (☞ 2.2.5.3.3) wurde ein ELISA entwickelt, um die Unterschiede im Bindungsverhalten der einzelnen Isolate zu detektieren.

Dieser lief folgendermaßen ab:

- Kopplung von nativem und verseiftem (☞ 2.2.4.1) LPS an Vertiefungen der Mikrotiterplatte (über Nacht).
- Blockieren der freien Bindungen mit 2 % (w/v) Milch in PBS (1 h).
- Zugabe der Einzelisolate in die Vertiefungen mit nativem und in eins mit verseiftem LPS sowie in ein Well ohne Antigen (3-4 h).
- Waschen mit 0,5 % (v/v) Tween20 in PBS (6 x 5 min).
- Zugabe des Serums der Maus in die Vertiefungen mit den enthaltenen Liganden und in die eine Vertiefung ohne Antigen (3-4 h).
- Waschen mit 0,5 % (v/v) Tween 20 in PBS (6 x 5 min).
- Zugabe des sekundären Antikörpers gerichtet gegen Maus-Antikörper.
- Zugabe von ABTS.
- Auswertung bei einer Wellenlänge von 405 nm.

3 Ergebnisse

3.1 Suche nach einem Detektionssystem für *E. coli*-Mutanten, die in der *O*-Acetylierung der Sialinsäuren im LPS defekt sind

Um feststellen zu können, ob die erzeugten Mutanten (☞ 2.2.8) defekt in der *O*-Acetylierung der Sialinsäuren im Lipopolysaccharid sind, mußte zunächst ein geeignetes Detektionssystem zur Unterscheidung zwischen *O*-acetylierten und de-*O*-acetylierten Bakterien entwickelt werden.

3.1.1 mPAS-Test im Kolonieblot

Es wurde mit Hilfe von auf Nitrocellulose geblotteten Kolonien (☞ 2.2.5.3.2) getestet, ob der mPAS-Test (☞ 2.2.4.2) zwischen *O*-acetylierten und durch Verseifung (☞ 2.2.4.1) de-*O*-acetylierten Kolonien unterscheiden konnte. Abb. 5 zeigt einen deutlichen Unterschied im Färbeverhalten zwischen nativen und verseiften Bakterienkolonien.

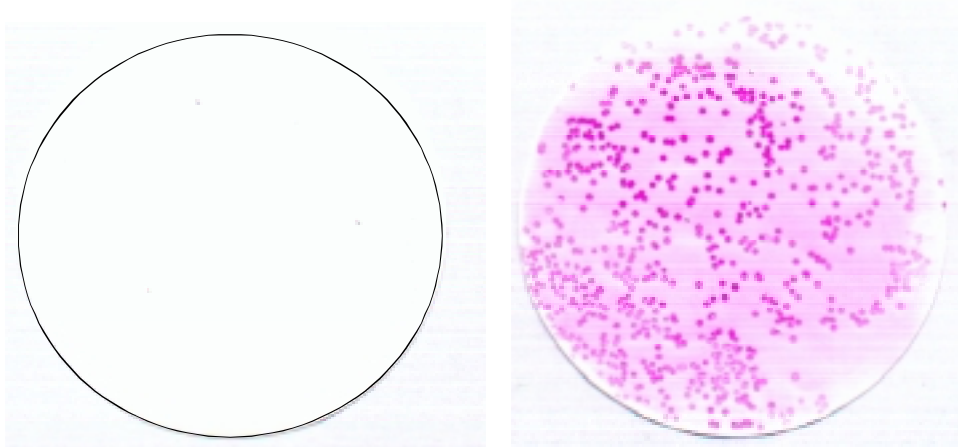


Abb. 5: Unterschiede im Färbeverhalten von *O*-acetylierten und de-*O*-acetylierten Kolonien beim mPAS-Test

Die Kolonien auf der rechten Nitrocellulosemembran sind im nativen, *O*-acetylierten Zustand belassen, während die Kolonien auf dem linken Filter nach dem Blotten durch Verseifung de-*O*-acetyliert (☞ 2.2.4.1) wurden.

3.1.2 Verwendung des pSKAN Phagemid Display Systems

Mit Hilfe dieses Systems wurde versucht, Phagemide mit Epitopen anzureichern, die ähnlich wie aus Tieren gewonnene Antikörper in der Lage sind, bestimmte Strukturen zu erkennen und daran zu binden. Zuerst einmal galt es zu eruieren, ob über mehrere Runden des Pannings (☞ 2.2.5.2) eine Anreicherung von spezifisch bindenden Phagemiden erreicht werden konnte. So erfolgte nach jeder Präparation eine Titerbestimmung (☞ 2.2.5.2). Dazu wurden verschiedene Konzentrationen der Phagemide hergestellt, diese Lösungen mit einer logarithmisch gewachsenen Kultur des Wirtstammes inkubiert und 20 µl dieser Ansätze auf LB-Agarplatten mit Amp 100µg/ml sowie Tc 20 µg/ml ausplattiert. Weitere 20 µl wurden auf LB-Platten mit Kanamycin (50 µg/ml) und Tetracyclin (20 µg/ml) zur Titerbestimmung des Helferphagen M13K07 ausgespatelt. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C

bebrütet und am nächsten Tag durch Auszählung der Kolonien der Titer bestimmt. Die Ergebnisse für die drei verschiedenen Phagenbanken sind in den nachfolgenden sechs Tabellen zusammengefasst, wobei jede Bank einmal auf vorhandene Epitope für *O*-acetyliertes LPS und einmal auf Bindungspartner für de-*O*-acetyliertes Lipopolysaccharid untersucht wurde.

Tab. 2: Phagemid-Titer der Banken während der Panning-Prozedur

In allen 6 Tabellen ist einmal die Konzentration der Phagemide, die zum Panning (☞ 2.2.5.2) eingesetzt wurden sowie die Anzahl der Phagen, die nach dem Panning eluiert werden konnten, dargestellt. In den unteren beiden Zeilen ist die Anzahl der eluierten, unspezifisch bindenden Phagemide aufgeführt.

(a) HyA mit *O*-acetyliertem Lipopolysaccharid als Antigen

| | | Runde 1 | Runde 2 | Runde 3 | Runde 4 | Runde 5 |
|-------------------------|-----|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Eingesetzt: | | $1,0 \times 10^{11}$ | $2,8 \times 10^{11}$ | $3,0 \times 10^{11}$ | $2,9 \times 10^{11}$ | $1,7 \times 10^{11}$ |
| Eluierte Phagen: | | | | | | |
| An Ligand gebunden | Amp | $3,6 \times 10^4$ | $3,9 \times 10^4$ | $4,6 \times 10^5$ | $1,0 \times 10^6$ | $3,8 \times 10^6$ |
| | Km | $1,0 \times 10^4$ | $4,6 \times 10^4$ | $4,6 \times 10^5$ | $7,0 \times 10^5$ | $1,0 \times 10^6$ |
| Kein Ligand verwendet | Amp | $2,6 \times 10^4$ | $4,2 \times 10^5$ | $5,6 \times 10^5$ | $7,6 \times 10^5$ | $6,1 \times 10^5$ |
| | Km | $5,5 \times 10^5$ | $4,4 \times 10^5$ | $1,6 \times 10^5$ | $3,8 \times 10^5$ | $4,5 \times 10^5$ |

(b) HyA mit de-*O*-acetyliertem Lipopolysaccharid als Antigen

| | | Runde 1 | Runde 2 | Runde 3 | Runde 4 | Runde 5 |
|-------------------------|-----|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Eingesetzt: | | $1,0 \times 10^{11}$ | $2,4 \times 10^{11}$ | $2,7 \times 10^{11}$ | $1,2 \times 10^{11}$ | $1,5 \times 10^{11}$ |
| Eluierte Phagen: | | | | | | |
| An Ligand gebunden | Amp | $1,6 \times 10^4$ | $1,0 \times 10^4$ | $1,3 \times 10^5$ | $2,1 \times 10^6$ | $5,1 \times 10^7$ |
| | Km | | $4,6 \times 10^4$ | $2,0 \times 10^5$ | $7,9 \times 10^5$ | $1,5 \times 10^6$ |
| Kein Ligand verwendet | Amp | $2,6 \times 10^4$ | $4,2 \times 10^5$ | $5,6 \times 10^5$ | $7,6 \times 10^5$ | $6,1 \times 10^5$ |
| | Km | | $5,4 \times 10^5$ | $3,8 \times 10^5$ | $9,0 \times 10^5$ | $3,5 \times 10^5$ |

(c) HyB mit *O*-acetyliertem Lipopolysaccharid als Antigen

| | | Runde 1 | Runde 2 | Runde 3 | Runde 4 | Runde 5 |
|------------------------|-----|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Eingesetzt: | | $2,6 \times 10^{11}$ | $2,4 \times 10^{11}$ | $2,2 \times 10^{11}$ | $2,2 \times 10^{11}$ | $6,2 \times 10^{11}$ |
| Eluiert Phagen: | | | | | | |
| An Ligand gebunden | Amp | $5,0 \times 10^4$ | $3,9 \times 10^4$ | $1,3 \times 10^6$ | $2,1 \times 10^7$ | $2,6 \times 10^7$ |
| | Km | $1,0 \times 10^4$ | $3,4 \times 10^4$ | $2,9 \times 10^5$ | $5,3 \times 10^6$ | $2,3 \times 10^7$ |
| Kein Ligand verwendet | Amp | $2,2 \times 10^4$ | $5,3 \times 10^5$ | $7,8 \times 10^5$ | $7,2 \times 10^5$ | $8,1 \times 10^5$ |
| | Km | $4,7 \times 10^4$ | $1,5 \times 10^5$ | $4,6 \times 10^5$ | $5,8 \times 10^5$ | $7,9 \times 10^5$ |

(d) HyB mit de-*O*-acetyliertem Lipopolysaccharid als Antigen

| | | Runde 1 | Runde 2 | Runde 3 | Runde 4 | Runde 5 |
|------------------------|-----|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Eingesetzt: | | $2,6 \times 10^{11}$ | $3,0 \times 10^{11}$ | $2,6 \times 10^{11}$ | $1,4 \times 10^{11}$ | $1,6 \times 10^{11}$ |
| Eluiert Phagen: | | | | | | |
| An Ligand gebunden | Amp | $5,0 \times 10^4$ | $1,0 \times 10^6$ | $1,8 \times 10^6$ | $2,4 \times 10^7$ | $2,6 \times 10^7$ |
| | Km | | $2,6 \times 10^5$ | $2,0 \times 10^6$ | $4,6 \times 10^6$ | $7,5 \times 10^6$ |
| Kein Ligand verwendet | Amp | $3,1 \times 10^4$ | $2,8 \times 10^4$ | $5,6 \times 10^4$ | $7,6 \times 10^4$ | $6,1 \times 10^4$ |
| | Km | | $1,4 \times 10^5$ | $2,4 \times 10^4$ | $1,3 \times 10^5$ | $3,2 \times 10^5$ |

(e) HyC mit *O*-acetyliertem Lipopolysaccharid als Antigen

| | | Runde 1 | Runde 2 | Runde 3 | Runde 4 | Runde 5 |
|-------------------------|-----|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Eingesetzt: | | $1,9 \times 10^{11}$ | $2,3 \times 10^{11}$ | $2,4 \times 10^{11}$ | $2,0 \times 10^{11}$ | $2,7 \times 10^{11}$ |
| Eluierte Phagen: | | | | | | |
| An Ligand gebunden | Amp | $5,5 \times 10^5$ | $6,8 \times 10^5$ | $1,1 \times 10^6$ | $1,8 \times 10^6$ | $2,1 \times 10^7$ |
| | Km | $2,4 \times 10^4$ | $3,3 \times 10^4$ | $5,1 \times 10^5$ | $7,0 \times 10^5$ | $3,0 \times 10^6$ |
| Kein Ligand verwendet | Amp | $2,6 \times 10^4$ | $4,2 \times 10^5$ | $5,6 \times 10^5$ | $7,6 \times 10^5$ | $6,1 \times 10^5$ |
| | Km | $5,5 \times 10^5$ | $4,4 \times 10^5$ | $1,6 \times 10^5$ | $3,8 \times 10^5$ | $4,5 \times 10^5$ |

(f) HyC mit de-*O*-acetyliertem Lipopolysaccharid als Antigen

| | | Runde 1 | Runde 2 | Runde 3 | Runde 4 | Runde 5 |
|-------------------------|-----|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Eingesetzt: | | $1,9 \times 10^{11}$ | $5,0 \times 10^{11}$ | $2,0 \times 10^{11}$ | $6,9 \times 10^{11}$ | $4,8 \times 10^{11}$ |
| Eluierte Phagen: | | | | | | |
| An Ligand gebunden | Amp | $5,5 \times 10^5$ | $1,0 \times 10^6$ | $1,8 \times 10^6$ | $3,5 \times 10^7$ | $5,0 \times 10^7$ |
| | Km | | $3,0 \times 10^5$ | $8,1 \times 10^5$ | $7,9 \times 10^5$ | $1,4 \times 10^7$ |
| Kein Ligand verwendet | Amp | $2,6 \times 10^4$ | $4,2 \times 10^5$ | $5,7 \times 10^5$ | $4,4 \times 10^5$ | $7,3 \times 10^6$ |
| | Km | | $5,9 \times 10^5$ | $4,5 \times 10^5$ | $8,0 \times 10^5$ | $3,3 \times 10^5$ |

Es ist zu erkennen, dass die Zahl der an Liganden bindenden Phagemide bei allen Versuchsreihen mehr oder weniger stark ansteigt (fett gedruckten Zeilen), so dass von einer Anreicherung spezifisch an die angebotenen Epitope bindender Phagemide ausgegangen werden mußte. Der Hintergrund an unspezifisch bindenden Phagen steigt aber während des Pannings ebenfalls an.

3.1.2.1 Ergebnisse der Sequenzierung

Um zu überprüfen, ob bei den eluierten Phagen auch wirklich eine Anreicherung spezifisch bindender Phagemide stattgefunden hatte, wurden pro Versuchsansatz 10 Klone gepickt, die einzelsträngige DNA (☞ 2.2.6.1) daraus isoliert und sequenziert (☞ 2.2.6.6). Mit 10 weiteren Klonen wurde eine Doppelstrangsequenzierung

durchgeführt. Ein dreistündiger Lauf des Gels war nötig, um die Bereiche der Phagen, die von Interesse waren, lesen zu können. Dabei zeigte sich, dass alle sequenzierten Klone sich in dem hypervariablen Bereichen deutlich unterschieden, also war eine Anreicherung von spezifisch bindenden Phagemiden nicht erfolgt.

3.1.2.2 Auswertung der Mikrotiterplatten-Tests

Obwohl die Ergebnisse der Sequenzierungen nicht darauf hindeuteten, wurde getestet, ob einer oder mehrere der nach dem fünften Panning (2.2.5.2) eluierten Phagemide spezifisch an das jeweilig eingesetzte Antigen binden konnte. Dazu wurde ein ELISA (2.2.5.2) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab.3 dargestellt. Zusätzlich erfolgte noch eine Inkubation der Phagen an Vertiefungen ohne Antigen, die dort erreichte Absorption wurde später von den erhaltenen Ergebnissen als 0-Wert subtrahiert.

Tab. 3: Darstellung der Bindungsspezifität ausgewählter Phagemide an das jeweils verwendete Substrat und das jeweils heterologe Substrat

Als Liganden für die Phagemide wurde einmal *O*-acetyliertes LPS (**O**) und zweitens de-*O*-acetyliertes Lipopolysaccharid (**DO**) verwendet.

A(O): Bibliothek HyA, angereichert auf *O*-acetyliertem LPS

A(DO): Bibliothek HyA, angereichert auf de-*O*-acetyliertem LPS

B(O): Bibliothek HyB, angereichert auf *O*-acetyliertem LPS

B(DO): Bibliothek HyB, angereichert auf de-*O*-acetyliertem LPS

C(O): Bibliothek HyC, angereichert auf *O*-acetyliertem LPS

C(DO): Bibliothek HyC, angereichert auf de-*O*-acetyliertem LPS

| | Klon Nr.: | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-------------------------|----------------------|------|-------------|------|------|-------------|------|------|------|------|------|
| Biblio- thek | Anti- gen | | | | | | | | | | |
| A(O) | O | 0,00 | 0,07 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,02 | 0,05 | 0,04 | 0,00 |
| | DO | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,02 | 0,00 |
| A(DO) | O | 0,00 | 0,00 | 0,03 | 0,01 | 0,03 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,02 | 0,00 |
| | DO | 0,00 | 0,01 | 0,03 | 0,01 | 0,49 | 0,00 | 0,02 | 0,03 | 0,04 | 0,02 |
| B(O) | O | 0,00 | 0,07 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,02 | 0,05 | 0,04 | 0,00 |
| | DO | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,02 | 0,00 |
| B(DO) | O | 0,08 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,02 |
| | DO | 0,08 | 0,03 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,03 | 0,03 | 0,00 | 0,04 |
| C(O) | O | 0,00 | 0,00 | 0,03 | 0,00 | 0,03 | 0,02 | 0,02 | 0,00 | 0,01 | 0,00 |
| | DO | 0,00 | 0,00 | 0,03 | 0,00 | 0,00 | 0,05 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| C(DO) | O | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,06 | 0,02 | 0,03 | 0,00 | 0,00 |
| | DO | 0,00 | 0,10 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,02 | 0,00 |

Die Tabelle zeigt, dass lediglich bei zwei Phagemiden eine, wenn auch geringe spezifische Bindung an den Liganden erfolgt war. Es handelte sich um das Isolat Nr. 5 mit einer Absorption von 0,49 aus der Bank HyA sowie das Isolat Nr. 2 der Bank HyC mit einer Absorption von 0,1. In beiden Fällen sollten Phagemide angereichert werden, deren hypervariablen Bereiche spezifisch an de-*O*-acetyliertes LPS binden konnten. Um diese Ergebnisse zu verifizieren wurden für beide drei weitere identische ELISAs durchgeführt, die Ergebnisse lauteten in allen Fällen aber **0,00**. Dies zeigte, dass es nicht möglich war, mit Hilfe des Phagemid Display Systems

spezifisch an O-acetylierte oder de-O-acetylierte Bakterien bindende „Antikörper“ zu detektieren.

3.1.3 Polyklonale Antikörper

Für die Gewinnung von Seren, die polyklonale Antikörper gegen eine bestimmte LPS-Modifikation enthalten, wurden zwei Kaninchen mit hitzefixierten Bakterien (2.2.5.3) immunisiert, wobei ein Tier mit O-acetyliertem (**Kaninchen O**) und eines mit de-O-acetyliertem (2.2.4.1) Material (**Kaninchen DO**) gespritzt wurde. Nach den Immunisierungen wurde den Tieren zu bestimmten Zeiten (2.2.5.3.1) Blut entnommen und mit den im Serum enthaltenen Antikörpern eine Titerbestimmung durchgeführt (2.2.5.3). Um eine Aussage über die Spezifität der gewonnenen Antikörper machen zu können, wurde der Titer sowohl bei O-acetyliertem, wie auch bei de-O-acetylierte LPS bestimmt. Es zeigte sich, dass das Tier, das mit nativen Bakterien immunisiert worden war, einen wesentlich höheren Titer erzeugte, als das Kaninchen, das mit verseiften Bakterien immunisiert worden war (Abb. 6).

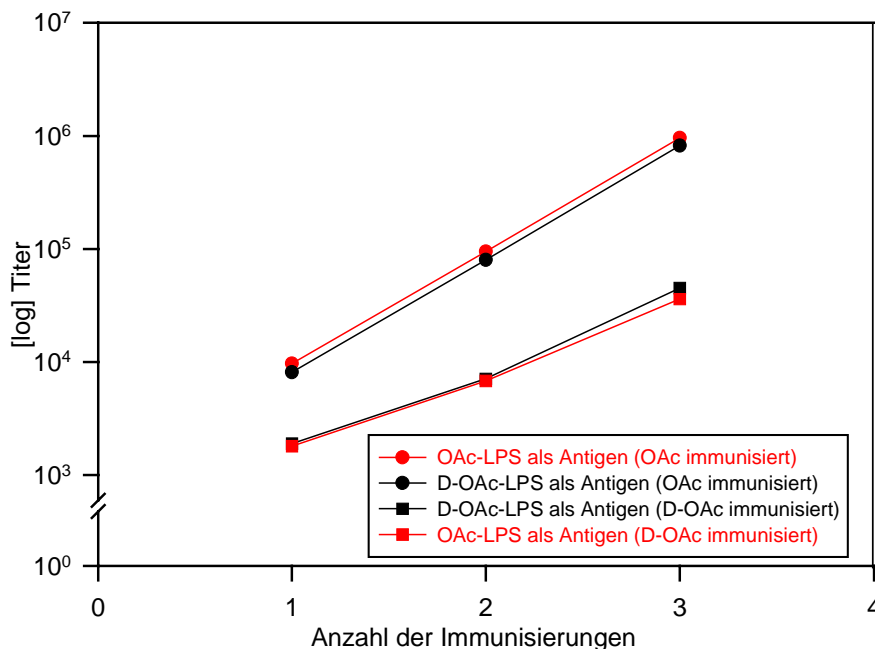


Abb. 6: Ergebnisse der Titerbestimmungen der aus Kaninchen gewonnenen Seren

Dargestellt sind die Titer der im Blut vorkommenden, polyklonalen Antikörper der beiden Kaninchen, wobei die runden Symbole die Werte des mit O-acetyliertem Material immunisierten Tieres zeigen und die eckigen Symbole die Werte des mit de-O-acetylierten Bakterien immunisierten. Die Grafik zeigt die Unterschiede in den Bindungsaffinitäten der jeweils erhaltenen Antikörper zu O-acetyliertem (rote Kurven) und zu durch Verseifung (2.2.4.1) de-O-acetyliertem LPS (schwarze Meßpunkte). Es wurden immer Doppelbestimmungen durchgeführt.

Anhand der Titerbestimmungen wird deutlich, dass die Antikörper beider Seren nicht spezifisch an lediglich eines der angebotenen Antigene binden, sondern im Blut des Kaninchens auch Antikörper gegen das jeweils heterologe Antigen vorhanden sind, wenn auch in geringfügig niedrigerer Konzentration.

Um die an den „richtigen“ Liganden bindenden Antikörper aus dem Gemisch zu isolieren, wurden die erhaltenen Seren mit dem jeweils heterologen Antigen gewaschen (☞ 2.2.5.3.1). Nach mehrmaligem Waschen des Blutes vom Tier, das mit *O*-acetylierten Bakterien immunisiert worden war, mit de-*O*-acetyliertem LPS oder mit de-*O*-acetylierten, hitzeinaktivierten Bakterien konnte im nachfolgendem ELISA keinerlei Bindungsaktivität mehr detektiert werden. Es war nicht möglich, aus der Menge der im Blut vorhandenen Antikörper ausschließlich an *O*-acetyliertes LPS bindende Antikörper zu isolieren.

3.1.4 Monoklonale Antikörper

Zur Gewinnung von Zelllinien, die spezifisch bindende, monoklonale Antikörper produzieren, wurden 4 Mäuse mit hitzefixierten (☞ 2.2.5.3), nativen und 4 Tiere mit hitzefixierten verseiften (2.2.4.1) Bakterien immunisiert (☞ 2.2.5.3.2). Um feststellen zu können, ob die Tiere Antikörper gegen die entsprechenden injizierten Antigene erzeugten, wurde aus der Schwanzvene Blut entnommen und mit den erhaltenen Seren Titerbestimmungen durchgeführt (☞ 2.2.5.3). Dabei wurde, wie bei den Kaninchen der Titer sowohl mit *O*-acetyliertem Lipopolysaccharid, wie auch mit de-*O*-acetyliertem LPS als Antigen bestimmt (Abb. 7).

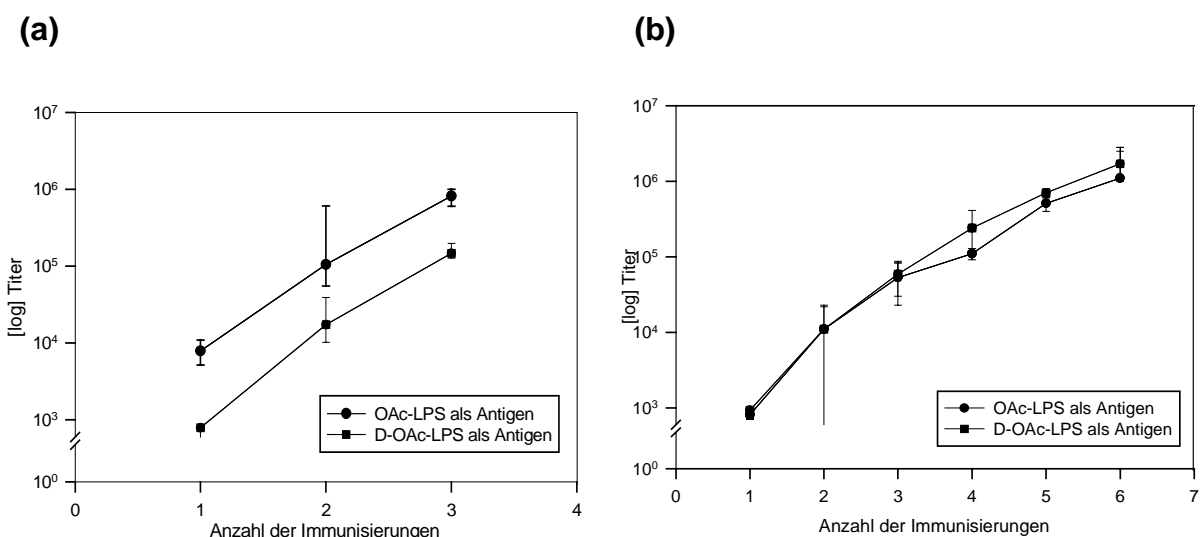


Abb. 7: Ergebnisse der Titerbestimmungen von aus Mäusen gewonnenen Seren

Der Titer der im Blut enthaltenen Antikörper wurde sowohl für *O*-acetyliertes (OAc-LPS), wie auch für de-*O*-acetyliertes Lipopolysaccharid (D-OAc-LPS) bestimmt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte der Extinktionen vom Blut aller Mäuse.

(a) Titer der Mäuse, die mit *O*-acetylierten Bakterien immunisiert wurden.

(b) Titer der Mäuse, die mit de-*O*-acetylierten Bakterien immunisiert wurden.

Da die Mäuse, die mit *O*-acetyliertem Material immunisiert worden waren, schon nach drei Injektionen einen hohen Titer (8×10^5) aufwiesen (Abb. 7a), wurden zunächst 2 Tiere geboostert (☞ 2.2.5.3.2) und schließlich die Milz entnommen. Der Titer der Mäuse zum Zeitpunkt der Organentnahme betrug $8,7 \times 10^6$ bzw. $7,5 \times 10^6$ mit *O*-acetyliertem Lipopolysaccharid als Antigen und 1×10^6 bzw. $1,5 \times 10^6$ mit de-*O*-acetyliertem LPS als Antigen. Mit den entnommenen Milzzellen wurde eine Zellfusion (☞ 2.2.5.3.2) vorgenommen, um Antikörper produzierende Hybridome zu erzeugen.

3.1.4.1 Ergebnisse der ELISA-Analyse

Um Hybridomzelllinien (☞ 2.2.5.3.2) zu detektieren, die lediglich an O-acetyliertes LPS bindende, monoklonale Antikörper produzierten, wurden Mikrotiterplatten-Essays durchgeführt. Nachdem in den einzelnen Vertiefungen der Fusionsplatten Zellhaufen sichtbar waren, wurde pro Well 500 µl Kulturüberstand abgenommen und im ELISA getestet. Es zeigte sich, dass bei der Maus Nr. 1 lediglich die Antikörper im Kulturüberstand eines einzigen Wells eine signifikante Bindung an O-acetyliertes Lipopolysaccharid aufwiesen. An de-O-acetyliertes LPS fand keine Bindung statt. Aus dieser Vertiefung wurden 28 Subklone isoliert und nach einer Wachstumsphase ein zweites Mal getestet. Dabei kristallisierten sich 4 Subklone heraus, die ausschließlich eine Bindung an natives, nicht aber an verseiftes LPS zeigten. Diese Klone wurden weiteren Tests (siehe unten) unterzogen.

Bei der zweiten Maus reagierten weitere 10 in den Kulturüberständen enthaltene Antikörper mit O-acetyliertem LPS. Insgesamt wurden 185 Subklone erzeugt und diese wiederum getestet. Letztendlich blieben davon 9 Hybridomzelllinien übrig, die spezifisch an O-acetyliertes LPS bindende Antikörper produzierten.

Die 13 aus beiden Fusionen stammenden Klone wurden zusätzlich weiteren Experimenten zur Charakterisierung der Spezifität unterzogen (☞ 2.2.5.3.2). Dabei wurde getestet, ob die Antikörper auch an O-Antigen oder an andere LPS-Komponenten (Lipid A, KDO) binden konnten. Es zeigte sich, dass die Antikörper von zwei Klonen zwar an O-Antigen banden, nicht aber an Lipid A oder KDO. Auch die weiteren O-Antigenbestandteile wie Galaktose, N-Acetyl-Galaktosamin oder eine Kombination aus beiden wurde von den Antikörpern nicht erkannt (Extinktion bei 405 nm: 0,00). Andere sialinsäurehaltige Materialien wie GD₃ oder BSA führten weder als Kompetitoren zu einer Reduktion in der Bindung, noch wurden sie von den Antikörpern erkannt, wenn sie als Antigen an die Mikrotiterplatten gekoppelt worden waren.

Freie 9-O-acetylierte Sialinsäuren oder ein Gemisch aus verschiedenen O-acetylierten Sialinsäuren konnten die Bindung der Antikörper ebenfalls nicht inhibieren oder reduzieren.

Aus diesen Experimenten wird deutlich, dass die O-acetylierte Sialinsäuren im LPS für eine Bindung der gewonnenen Antikörper (OAC12 und OAC20) zwingend erforderlich ist, daneben aber ein zweites, im O-Antigen vorhandenes Epitop für die Adhäsion erforderlich ist.

Die Mäuse, die mit verseiftem Material immunisiert wurden, mußten noch drei weitere Male immunisiert werden, bevor der Titer hoch genug war, um eine Milzentnahme erfolgversprechend erscheinen zu lassen (siehe Abb. 7). Auch bei diesen Tieren beschränkte sich die Immunantwort nicht auf eine LPS-Form, sondern die Antikörper banden sowohl an O-acetyliertes Lipopolysaccharid, wie auch an de-O-acetyliertes (siehe Abb. 7b). Nach der sechsten Immunisierung wurden schließlich zwei Tiere geboostert und für die Zellfusion die Milz entnommen. Der Titer der Tiere betrug zum Zeitpunkt der Organentnahme 6×10^6 , bzw. 4×10^6 bei de-O-acetyliertem LPS als Antigen sowie jeweils 1×10^6 mit O-acetyliertem Lipopolysaccharid als Antigen.

Wie beschrieben (☞ 2.2.5.3.2) wurden die Kulturüberstände im ELISA getestet. Da bei der Maus 1 kein einziges positives Signal erhalten wurde, wurde der Test noch einmal wiederholt, aber auch hier konnte keine Antikörperbindung an de-O-acetyliertes LPS detektiert werden. Bei der Maus Nr. 2 zeigten einige Kulturüberstände eine Bindung, aber nie ausschließlich an das gewünschte Epitop, wie in Tab. 4 dargestellt ist.

Tab. 4: Titer der Kulturüberstände von Hybridomazellen, die aus Milzzellen einer mit de-O-acetylierten Bakterien immunisierten Maus fusioniert wurden

Es sind nur die Kulturüberstände aufgeführt und nummeriert, die eine Bindung mit den dargebotenen Antigenen eingehen konnten. Die Titerbestimmung wurde wie unter 2.2.5.3.2 beschrieben durchgeführt. OAc-LPS steht für O-acetyliertes LPS, De-OAc-LPS für de-O-acetyliertes Lipopolysaccharid.

| Kulturüberstand | Extinktion | |
|-----------------|--------------|------------------------|
| | De-OAc-LPS | OAc-LPS als Antigen |
| 1 | 0,269 | 0,155 |
| 2 | 0,183 | 0,186 |
| 3 | 0,228 | 0,141 |
| 4 | 0,189 | 0,103 |
| 5 | 0,278 | 0,140 |
| 6 | 0,427 | 0,083 |
| 7 | 0,186 | 0,119 |
| 8 | 0,219 | 0,428 |
| 9 | 0,149 | 0,319 |
| 10 | 0,233 | 0,158 |
| 11 | 0,237 | 0,095 |

Mit Ausnahme des Kulturüberstandes Nr. 6 binden alle anderen wenig spezifisch an das gewünschte Antigen. Es wurden trotzdem insgesamt 230 Subklone gepickt und diese nach erfolgter Vermehrung noch einmal im ELISA getestet. Dabei wurde deutlich, dass kein einziger Klon fähig war, Antikörper zu bilden, die spezifisch nur an de-O-acetyliertes LPS oder geblottete Bakterien binden konnten.

3.1.4.2 Western-Blots

Nachdem anhand der ELISAs festgestellt worden war, dass es Hybridome gab, die spezifisch an O-acetyliertes LPS bindende Antikörper produzieren konnten, sollte dieses Ergebnis anhand von Western-Blots noch zusätzlich verifiziert werden. Dazu wurde ein SDS-Gel (Abb. 8a) geblottet (☞ 2.2.5.3.2) und der Blot mit Kulturüberstand, in dem sich die Antikörper befanden inkubiert. Abb. 8b macht deutlich, dass die Antikörper nur an die linken Spuren, also an natives, O-acetyliertes LPS binden konnten.

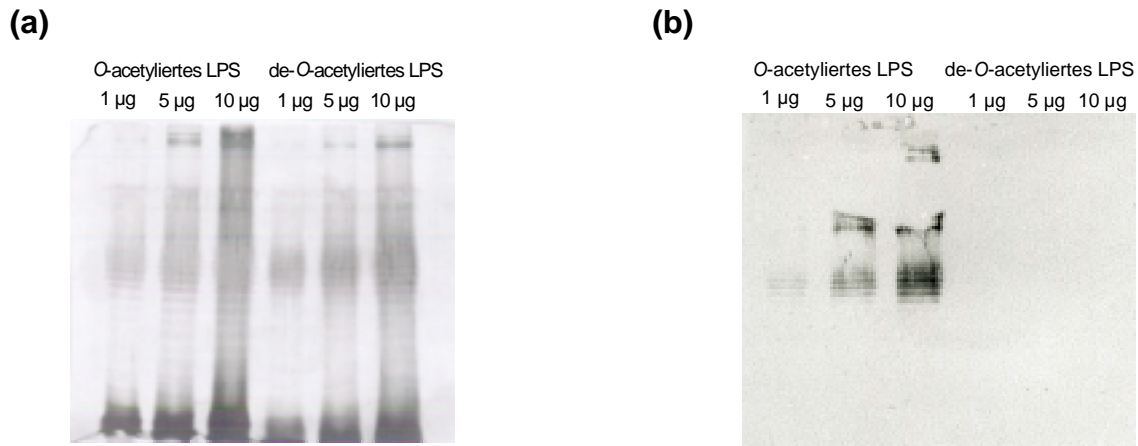


Abb. 8: LPS im SDS-PAGE (a) und anschließende Antikörperfärbung des Western-Blots (b)

Es wurden 2 µl, 5 µl und 10 µl vom *O*-acetyliertem LPS und vom de-*O*-acetyliertem LPS aufgetragen, elektrophoretisch getrennt (2.2.1.1) und geblottet (2.2.5.3.2). Die Bindungs- und Färbereaktion fand wie unter 2.2.5.3.2 beschrieben statt.

(a) SDS-Gel nach Silberfärbung

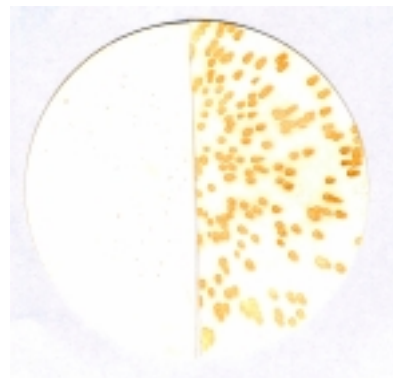
(b) Antikörper-Färbung des Western-Blots

3.1.4.3 Kolonie-Blots

Auch wenn alle vorherigen Ergebnisse darauf hindeuteten, dass die erhaltenen Antikörper spezifisch an *O*-acetyliertes LPS banden, so war es doch essentiell zu überprüfen, ob diese Bindung auch an auf Nitrocellulose geblottete, komplette Bakterien (2.2.5.3.2) erfolgen konnte, da nur mit dieser Variante ein Screening der hergestellten Mutanten (2.2.8) erfolgreich durchzuführen wäre. Da die Antikörper auch hier ein spezifisches Bindungsverhalten zeigten (siehe Abb. 9), konnten die erzeugten Klone auf einen möglichen Defekt in der LPS-Modifikation überprüft werden.

Abb. 9: Bindungsverhalten des Antikörpers OAC12 am Kolonieblot mit *O*-acetylierten (rechter Teil) und de-*O*-acetylierten Bakterien (linke Hälfte)

Der Filter, auf den die Bakterien geblottet waren, wurde geteilt und vor der Inkubation mit der Antikörperlösung eine Hälfte verseift. Die Reaktion erfolgte wie unter 2.2.5.3.2. beschrieben mit einem zweiten Peroxidase-konjugiertem Anti-Maus-Antikörper und DAB als Substrat.



3.2 Analyse der Mutanten nach ungerichteter Mutagenese

Mit Hilfe der spezifischen, gegen *O*-acetyliertes O-Antigen gerichteten monoklonalen Antikörper wurden nun die auf verschiedene Arten (2.2.8) erzeugten Mutanten untersucht.

3.2.1 Mutanten über Transposonmutagenese

Durch Transposonmutagenese wurden etwa 5×10^6 Klone erzeugt. Es war aber kein einziger Klon dabei, der ein verändertes Bindungsverhalten zum Antikörper aufwies. Ebenso zeigten alle mit dem mPAS-Test (☞ 2.2.4.2) untersuchten Klone ein Färbeverhalten, dass auf O-acetyliertes LPS hindeutete.

3.2.2 Mutanten durch Verwendung eines Insertionselementes

Mit Hilfe eines Insertionselementes (ISS1) erfolgte die Herstellung von ca. 5×10^4 Klonen. Auch unter diesen konnte keine einzige in der O-Acetylierung defekte Mutante mit Hilfe des Antikörpers OAc12 oder des mPAS-Tests (☞ 2.2.4.2) detektiert werden.

3.2.3 Mutanten durch Bestrahlung mit UV-Licht

Durch UV-Licht wurde eine ähnlich große Anzahl der Bakterien behandelt. Hierbei zeigten sich 38 Klone, die im Sialinsäure-detektierenden mPAS-Test eine signifikantere Rotfärbung aufwiesen. Änderte man diesen Test so, dass O-acetyliertes LPS erkannt werden müsste (☞ 2.2.4.2), so bestätigten sich diese Ergebnisse aber nicht. Die Bakterien erwiesen sich als nach wie vor O-acetyliert.

3.3 Ergebnisse der Induktion von Prophagen

Mit diesen Experimenten sollten möglicherweise ins Genom integrierte Prophagen induziert werden. Dazu standen zwei verschiedene Möglichkeiten (☞ 2.2.7) zur Verfügung. Um sicherzustellen, dass die angewandten Methoden auch wirksam waren, wurde in Parallelversuchen der Stamm 3279 induziert, von dem bekannt ist, dass der Prophage P1 im Genom inseriert ist (☞ 2.1.8).

3.3.1 Induktion durch Bestrahlung mit UV-Licht

Nach Bestrahlungen unterschiedlicher Dauer mit UV-Licht und anschließender Weiterbebrütung konnten in der Kultur des Stammes 21701 durch visuelle Kontrolle keinerlei durch Phagenlyse entstandenes „fädiges“ Material festgestellt werden. Eine Inkubation des Zentrifugationsüberstandes mit logarithmisch gewachsenen Zellen von *E. coli* 21701, 3278 und NM522 (☞ 2.1.8) zeigte am nächsten Tag keinerlei Plaques im „Rasen“ der Wirtszellen.

Dagegen fanden sich schon in der Kultur des Kontrollstammes nach Bestrahlung und weiterer Bebrütung sehr viele fädig aussehende Zelltrümmer und die Lösung selbst war sehr klar. Am nächsten Tag war auf dem Rasen von *E. coli* 3278 eine Vielzahl von durch Phagenlyse hervorgerufene Plaques zu erkennen.

3.3.2 Induktion durch Mytomycin C

Die visuelle Kontrolle der Kultur ergab nach der Induktion durch Mitomycin C ebenfalls eine sehr homogen aussehende Lösung des Stammes 21701, während der Stamm 3279 komplett lysierte, was durch das Zelltrümmermaterial und den schon ohne Zentrifugation klar aussehenden Überstand belegt wurde. In der anschließenden Kontrolle durch Inkubation der Überstände mit logarithmisch wachsenden Wirtskulturen konnte auf den Agarplatten im Fall des Stammes 21701 keinerlei Phagentätigkeit beobachtet werden, während sich im „Rasen“ des Indikatorstammes zahlreiche Plaques befanden.

3.4 Detektion eines O-Acetyltransferase-ähnlichen Gens

Es wurde versucht, mit Hilfe schon bekannter O-Acetyltransferasen das Gen für die Sialinsäure-spezifische O-Acetyltransferase zu finden. Dabei standen die Aminosäure-Sequenzen einiger bakterieller, Zucker-acetylierender Enzyme zur Verfügung. Mit Ihnen wurde ein Alignment durchgeführt, um mögliche konservierte Bereiche innerhalb der Sequenz detektieren zu können (📖 2.2.6.4).

3.4.1 Produkt des Alignments bekannter O-Acetyltransferasen

Im Alignment wurde ein Bereich entdeckt, in dem mehrere Aminosäuren bei nahezu allen für das Alignment verwendeten Organismen (📖 2.2.6.4) identisch waren (Abb. 10).

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|----------|----------|-----|-----|----------|----------|-----|-----|----------|----------|-----|-----|-----|-----|
| Legionella pneumophila | Q | S | L | A | V | N | A | F | F | W | L | S | G | F | L | I | |
| | CAA | TCC | TTG | GCA | GTA | AAT | GCT | TTT | TTT | TGG | CTC | TCA | GGA | TTT | TTA | ATT | |
| SF6 (Shigella) | G | G | I | A | V | I | I | F | F | S | I | S | G | Y | L | I | |
| | GGC | GGC | ATT | GCA | GTT | ATC | ATA | TTC | TTT | TCA | ATA | TCA | GGA | TAT | CTG | ATT | |
| Streptomyces mycarofac. (MdmB, 3-O-Ac) | G | S | I | A | V | S | V | F | F | L | L | S | G | F | V | L | |
| | GGT | TCG | ATC | GCG | GTC | TCG | GTC | TTC | TTC | CTG | CTC | AGC | GGT | TTT | GTT | CTG | |
| Streptomyces mycarofac. (Mpt, 4-O-Ac) | G | P | V | A | V | | | F | F | M | L | S | G | F | V | L | |
| | GGA | CCG | GTG | GCG | GTC | | | TTC | TTC | TTC | ATG | CTC | AGC | GGA | TTC | GTC | CTC |
| Streptomyces thermotol. (AcyA, 3-O-Ac) | G | S | L | A | V | S | L | F | F | V | L | S | G | Y | V | L | |
| | GGC | TCG | CTC | GCG | GTC | TCC | CTC | TTC | TTC | GTG | CTG | AGC | GGC | TAT | GTG | GTG | |
| Streptomyces thermotol. (CarE, 4-O-Ac) | G | S | L | A | V | S | L | F | F | V | L | S | G | Y | V | L | |
| | GGC | CCG | CTG | ACG | GTC | TCG | TTC | TTC | TTC | ATG | CTC | AGC | GGT | TTC | GTC | CTC | |
| Salmonella typhimurium | G | F | I | G | V | D | V | F | F | V | I | S | G | F | L | M | |
| | GGC | TTT | ATA | GGT | GTA | GAT | GTT | TTC | TTT | GTA | ATT | TCT | GGT | TTT | CTT | ATG | |
| Rhizobium meliloti | G | A | A | G | V | D | V | F | F | V | I | S | G | F | I | M | |
| | GGA | GCC | GCC | GGC | GTC | GAT | GTC | TTC | TTC | GTC | ATC | AGC | GGC | TTC | ATC | ATG | |
| Rhizobium leguminos: | S | A | P | G | V | A | I | F | F | L | I | S | G | F | L | V | |
| | TCG | GCG | CCG | GGT | GTT | GCG | ATC | TTC | TTT | TTA | ATC | AGC | GGC | TTT | CTA | GTA | |
| Xanthomonas campestris | Y | S | F | H | V | P | L | F | F | L | V | S | G | W | L | A | |
| | TAC | AGC | TTT | CAC | GTT | CCG | CTT | TTC | TTC | CTC | GTG | TCG | GGT | TGG | CTG | GCT | |
| Agrobacter. tumefaciens | S | Y | L | A | V | D | L | F | F | A | L | S | G | F | V | L | |
| | AGC | TAT | CTT | GCC | GTG | GAC | CTG | TTT | TTT | GCG | CTC | AGC | GGC | TTC | GTG | CTG | |

Abb. 10: Alignment von Genen verschiedener Organismen, kodierend für O-Acetyltransferasen

Oben ist die Sequenz der Aminosäuren im 1-Buchstabencode dargestellt. Darunterliegend sind Nukleotide aufgeführt. Die konservierten Aminosäuren sind rot unterlegt.

Die Abfolge der konservierten Aminosäuren lautete:

AVxxFFxxSG

Anhand der für diese Aminosäuren kodierenden Nukleinsäure-Sequenzen wurden vier Sonden konstruiert, radioaktiv markiert (☞ 2.2.6.4) und zu Hybridisierungen (☞ 2.2.6.4) eingesetzt. Die dafür benötigte DNA wurde vorher isoliert (☞ 2.2.6.1), mit verschiedenen Restriktionsenzymen fragmentiert (☞ 2.2.6.2), auf einem Agarosegel aufgetrennt (☞ 2.2.6.5) und geblottet (☞ 2.2.6.4).

3.4.2 Ergebnisse der Hybridisierungen

Drei der vier hergestellten Sonden (☞ 2.2.6.4) hybridisierten nur an sehr große DNA-Fragmente über 5 kB. DNA dieser Größe lässt sich aber nur sehr schlecht klonieren und die Detektion des eigentlich hybridisierenden Bereiches ist ebenfalls sehr schwierig. Bei der Sonde 1 waren hingegen mehrere Signale zu erkennen, die auf Hybridisierungen mit kleineren Fragmenten hindeuteten (siehe Abb. 11). Es gab deutliche Signale in der Bahnen 5 (DNA mit RsaI geschnitten) und 12 (DNA mit EcoRI und HindIII geschnitten).

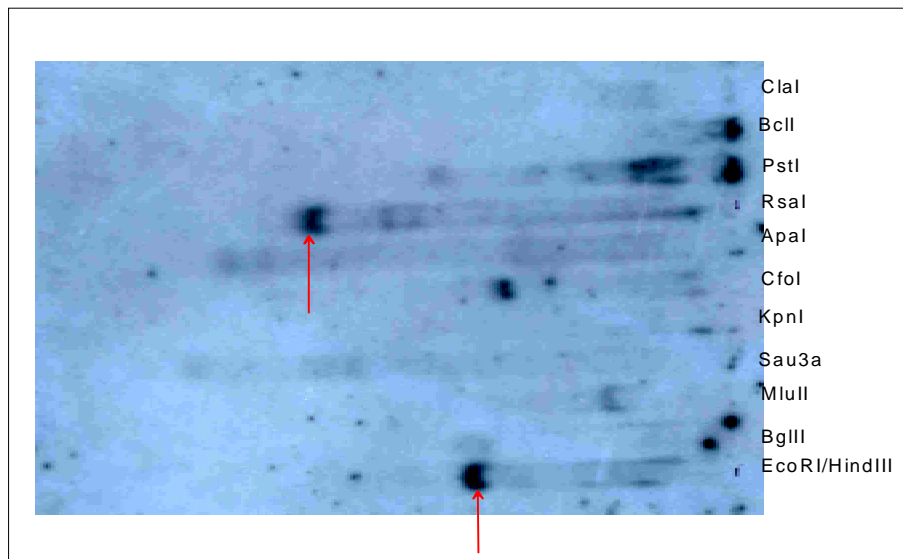


Abb. 11: Autoradiographie der Hybridisierung von Sonde 1 mit chromosomaler DNA
Die DNA wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen fragmentiert (☞ 2.2.6.2), auf einem Agarosegel aufgetrennt (☞ 2.2.6.5), geblottet und mit der radioaktiv markierten Sonde 1 hybridisiert (☞ 2.2.6.5). Die Autoradiographie (☞ 2.2.4.6) erfolgte über Nacht. Die deutlich positiven Signale sind markiert.

Anhand des auf dem Agarosegel (☞ 2.2.6.5) eingesetzten Molekulargewichtsstandards (mit EcoRI und HindIII geschnittene λ -DNA) konnte die Größe dieser Fragmente bestimmt werden. Das RsaI-Fragment hat eine Größe von ca. 560 kB, während das EcoRI/HindIII-Fragment eine ungefähre Länge von 2000 Basen aufwies. Um diese Fragmente genauer analysieren zu können, wurde chromosomale DNA mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII bzw. RsaI erneut fragmentiert (☞ 2.2.6.2), auf einem neuen Agarosegel getrennt und die Bereiche von Interesse aus diesem Gel eluiert (☞ 2.2.6.1). Nach einer Ligation (☞ 2.2.6.2) in den mit dem jeweiligen Restriktionsenzym(en) linearisierten Vektor pUC19 (☞ 2.1.4) wurden die erzeugten Plasmide in *Escherichia coli* JM101 (☞ 2.1.8) transformiert (☞ 2.2.6.3). Die erhaltenen Klone wurden auf Agarplatten ausgespatelt, geblottet und erneut hybridisiert (☞ 2.2.6.5). Die Detektion der

Radioaktivität erfolgte durch einen Phosphor Imager (FujiFilm, Japan). Ein Beispiel der Ergebnisse dieser Koloniehybridisierungen ist in Abb. 12 dargestellt.

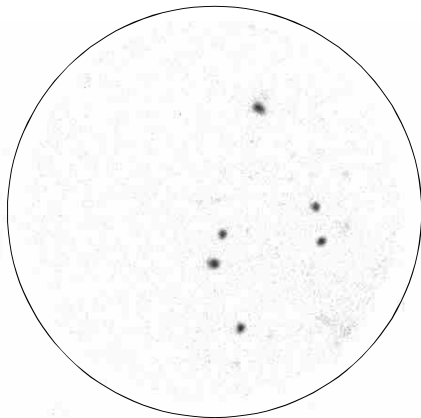


Abb. 12: Detektion der Klone, die mit der Sonde 1 hybridisierten

Die Klone, in die der Vektor pUC19 mit den unbekanntem DNA-Fragmenten kloniert worden war (☞ 2.2.6.2 und 2.2.6.3), wurden auf LB-Agarplatten ausgespatelt und über nacht bebrütet. Anschließend erfolgte ein Southern-Blot (☞ 2.2.6.5) und die auf den Filtern befindliche DNA wurde mit der radioaktiv markierten Sonde 1 hybridisiert (☞ 2.2.6.5). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Phosphor Imagers. Klone, deren im Vektor enthaltene DNA-Fragmente an die radioaktiv markierte Sonde 1 (siehe oben) banden, sind auf der Phosphor Imager-Platte als schwarze Punkte sichtbar.

Von den Klonen, die ein positives Signal zeigten, wurden die enthaltenen Plasmide isoliert (☞ 2.2.6.1) und die im Vektor integrierten, unbekanntem DNA-Fragmente konnten dann sequenziert (☞ 2.2.6.6) werden. Eine der erhaltenen Sequenzen ist in Abb. 14b dargestellt.

3.4.3 Ergebnis der Datenbankrecherche

Mit den erhaltenen Sequenzen wurde eine Datenbankrecherche durchgeführt, um eventuelle Homologien der unbekanntem Fragmente zu bereits bekannten Genen aufzuzeigen. Die Suche nach diesen homologen Sequenzen erfolgte in der Datenbank (HUSAR, EMBL, Heidelberg), ebenso wie die Übersetzung der Nukleinsäureabfolge in eine Aminosäuresequenz. Das Ergebnis der Datenbankrecherche ist für eines der detektierten Fragmente in Abb. 13 dargestellt.


```
(a)
>>>empro1:ECAE319      Ae000319 Escherichia coli K-12 MG165...  1082  2.8e-92
>>>emhtg2:AC010535    Ac010535 Homo sapiens chromosome 16 ...  1082  4.8e-91
>>>emhtg4:AC018638    Ac018638 Homo sapiens chromosome 7, ...  1073  1.1e-88

(b)
>>>>empro1:ECAE319 Ae000319 Escherichia coli K-12 MG1655 section 209 of 400

Query:      36  TGGCCGGCGCGGTATTTGGTATGGGAGAAGAGGCCGTCGCCTTTGCCATTATCATCGCAC
          | | |||||
Sbjct:     2880 TTGGCGGGCGCGGTATTTGGTATGGGAGAAGAGGCCGTCGCCTTTGCCATTATCATCGCAC

Query:      96  CGCTAATGGTCCGGCTGGGCTATGACAGTATTACCACCGTCCTGGTGACCTATATTGCCA
          |||||
Sbjct:     2940 CGCTAATGGTCCGGCTGGGCTATGACAGTATTACCACCGTCCTGGTGACCTATATTGCCA

Query:     156  CGCAAATCGGTTTTGCCAGTTCGTGGATGAACCCGTTTTGTGTGGTTCGTTGCTCAGGGGA
          |||||
Sbjct:     3000 CGCAAATCGGTTTTGCCAGTTCGTGGATGAACCCGTTTTGTGTGGTTCGTTGCTCAGGGGA

Query:     216  TTGCCGGCGTTCCGGTGCTTTCTGGCTCCGGGTTGCGCAT 255
          |||||
Sbjct:     3060 TTGCCGGCGTTCCGGTGCTTTCTGGCTCCGGGTTGCGCAT 3099
```

Abb. 13: Ergebnis der Suche nach homologen Sequenzen für eines der über Hybridisierung detektierten Fragmente

Die Abbildung ist in zwei Teile gegliedert. Im ersten Teil (a) sind drei Gene, deren Sequenzen zumindest teilweise mit der unbekanntem Sequenz übereinstimmen namentlich aufgeführt. Dabei handelt es sich um ein Gen von *Escherichia coli* (oben) und um zwei Gene von *Homo sapiens*.

Im unteren Abschnitt (b) ist dann als Beispiel das Alignment des analysierten Genfragmentes mit der am höchsten übereinstimmenden Sequenz von *Escherichia coli* K 12 MG 1655 aus der Datenbank gezeigt.

Das bei der Datenbankrecherche verwendete DNA-Fragment wurde über Hybridisierung (2.2.6.5 und Abb. 11) detektiert, in *E. coli* JM101 kloniert (2.2.6.2 und 2.2.6.3), erneut hybridisiert (Abb. 13), sequenziert (2.2.6.6) und mit der erhaltenen Sequenz eine Datenbankrecherche („HUSAR“, EMBL, Heidelberg) durchgeführt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass eine nahezu 100 %ige Übereinstimmung mit einem schon in der Datenbank bekannten Gen vorliegt. Daneben gibt es noch geringere Homologien zu anderen bereits in der Datenbank veröffentlichten Genen.

Das Gen mit der höchsten Homologie kodiert für das von BLATTNER et al, 1997 identifizierte Protein b2298, dass in den Datenbanken als **P44023** aufgeführt wird. Die anderen Gene mit geringeren Übereinstimmungen sind interessanterweise größtenteils humane Gene, die aber noch nicht weiter identifiziert wurden. Das Protein P44023 besteht aus einem offenen Leserahmen von 513 Aminosäuren (siehe Abb.14a). Die komplette DNA-Sequenz von 1,5 kB ist ebenfalls in der Datenbank beschrieben (siehe Abb. 14b).

(a)

MQGNICAMSAITESKPTRRWAMPDTLVI IFFVAILTSLATWVVPVGMFDSQEVQYQVD
 GQTKTRKVVDPHSFRILTNEAGEPEYHRVQLFTTGDERPGLMNFPEGLTSGSKYGTA
 VGIIMFMLVIGGAFGIVMRTGTIDNGILALIRHTRGNEILFIPALFILFSLGGAVFGM
 GEEAVAFAI I IAPLMVRLGYDSITTVLVTYIATQIGFASSWMNPFVVAQGIAGVPV
 LSGSGLRIVVWVIATLIGLIFTMVIYASRVKKNPLLSRVHESDRFFREKQADVEQRPFT
 FGDWLVLVLTAVMVWVIWGVIVNAWFIPEIASQFFTMGLVIGIIGVVFRNLNGMTVNT
 MASSFTEGARMMIAPALLVGFAGKILLLVNGEAGDASVLNTILNSIANAI SGLDNAV
 AAWFMLLFQAVFNFFVTSGSGQAALTMPLLAPLGLDVGVNRQVTVLAFQFGDGFSHII
 YPTSASLMATLGVCRVDFRNWLKVGATLLGLLFISSVVVIGAQLMGYH

(b)

gtgcaagga atatttgcgc tatgtccgca atcactgaat ccaaaccaac aagaagatgg
 gcaatgccc atacgttggg gattatcttt tttgttgcta ttttaaccag ccttgccacc
 tgggtagttc cgggtggggat gtttgacagt caggaagtgc agtatcaggt tgatgggtaa
 acaaaaacac gcaaagtcgt agatccacac tcatttcgca tctgactaac gaagcaggcg
 aacctgagta tcaccgcgta cagctgttca cgacgggcca tgaacgccc ggcctgatga
 acttcccgtt tgaaggatta acctcaggat cgaatacgg gacagccgtt ggcattcatca
 tgtttatgct ggtgattggc ggcgcgtttg gcattgtgat gcgtacagga accattgata
 acggtatcct ggcgcttatt cgccataccc gcgggaatga aattctcttt attcctgcgc
 tgtttattct gttttcactt ggcgggcggg tatttggtat gggagaagag gcgctcgect
 ttgccattat catcgcaccg ctaatgggcc ggctgggcta tgacagtatt accaccgtcc
 tgggtgacct tattgccacg caaatcgggt ttgccagttc gtggatgaac ccgttttgtg
 tggctcgttc tcaggggatt gccggcgctc cgggtgcttc tggctccggg ttgcgcacgc
 tgggtgtggg tatcgccact ctgattggcc tgatctttac catgggtgtac gcctcacgag
 tgaaaaagaa tcctcttctg tcacgcgtgc atgagtcgca ccgcttctt cgtgaaaagc
 aggctgatgt tgaacaacgt ccgtttacct ttgggtgactg gctgggtattg attgtcctga
 ccgcccgaat ggtctgggtg atttggggcg tgatcgttaa tgcctgggtt attccagaaa
 ttgccagcca gttcttcacc atgggtctgg tgattggcat catcggcgtt gttttccgcc
 ttaacggcat gacgggtaat accatggctt catcctttac cgaagggggc cgaatgatga
 tcgcccctgc cctgctgggt ggtttcgcca aagggatttt gctgctggtc ggtaatgggtg
 aagcgggtga tgccagcgtg ttaaatacca tcctcaacag cattgccaat gccattagcg
 gtctggacaa cgcggtcgcg gcctgggtta tgttgctctt ccaggcggtta ttaatttct
 tcgtgacgtc cggttctggg caggcggcgt taaccatgcc gttactggca ccgcttggcg
 atctggtcgg tgtaaccgt caggttaccg tgctggcgtt ccagtttggg gatggcttca
 gtcacatcat ttaccaacc tcagcgtcgt taatggcaac gctcgggtgtg tgcagggtgg
 acttccgtaa ctggctgaag gtgggcgcca ccctacttgg actgctggtt attatgtcca
 gcgctcgtag gatcggcgt cagttgatgg gctaccacta a

Abb. 14: Sequenz des aus der Datenbank recherchierten Proteins (a) und der kodierenden Basenabfolge (b)

- (a) Aminosäuresequenz. Die unter 3.4.1 ermittelte Consensus-Sequenz ist rot unterlegt.
- (b) Nukleotidsequenz. Die Sequenz des durch Hybridisierung (3.4.2) erhaltenen Genfragments ist hervorgehoben.

Um zu überprüfen, ob der gesamte offene Leserahmen von 1,5 kB auch in *E. coli* 21701 vorhanden war, wurden anhand der oben aufgeführten Sequenz Primer konstruiert und eine PCR (2.2.6.7) durchgeführt. Als Matrize diente dabei chromosomale DNA des Stammes 21701 in drei verschiedenen Konzentrationen (1 ng, 10 ng, 100 ng). Die Primer wurden so gewählt, dass die Anlagerung einmal am Beginn (5') und einmal am Ende (3') des Gens erfolgte. Die Produkte der PCR wurden auf zur Analyse ein Agarosegel aufgetragen (siehe Abb. 15).

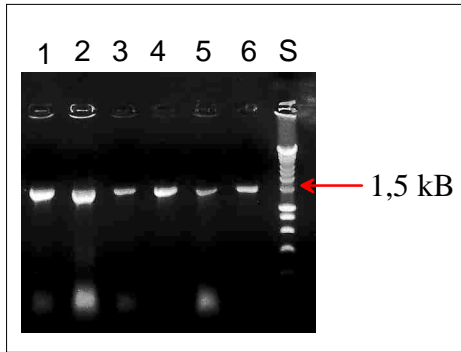


Abb. 15: Ergebnis der PCR zur Amplifikation eines aus der Datenbank bekannten Gens aus *Escherichia coli* 21701

Bahn 1 und 2: 10 ng Template-DNA

Bahn 3 und 4: 1 ng Template-DNA

Bahn 5 und 6: 100 ng Template-DNA

Bahn S: SMART-LADDER (DNA-Größenstandard)

Die chromosomale DNA des Stammes 21701 wurde in drei verschiedenen Konzentrationen als Matrize für die Amplifikation eingesetzt. 5 µl der entstandenen Reaktionsprodukte wurden auf einem Agarosegel (2.2.6.5) aufgetrennt. Anhand des mit aufgetragenen Standards konnte die Größe der erhaltenen Produkte bestimmt werden.

Das Agarosegel verdeutlicht, dass egal in welcher Konzentration das Template vorhanden war, nur ein Produkt amplifiziert worden war, dessen Größe bei 1,5 kB lag. Die erhaltene DNA wurde aus dem Gel eluiert (2.2.6.1), mit Hilfe des pGEM T-Vector Systems (2.1.3) kloniert, transformiert (2.2.6.3) und sequenziert (2.2.6.6). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem aus der Datenbank bekannten Gen verglichen und es zeigte sich, dass sowohl vom 5'-Ende als auch vom 3'-Ende eine **100 %ige** Übereinstimmung zwischen dem aus *E. coli* 21701 amplifizierten Gen und der aus der Datenbank bekannten Sequenz vorlag. Es handelte sich hier also um das gleiche Gen.

Um zusätzliche Informationen über das detektierte Protein zu erhalten wurde mit Hilfe des Programms „Husar“ ein Hydrophobizitätsplot durchgeführt (Abb. 16).

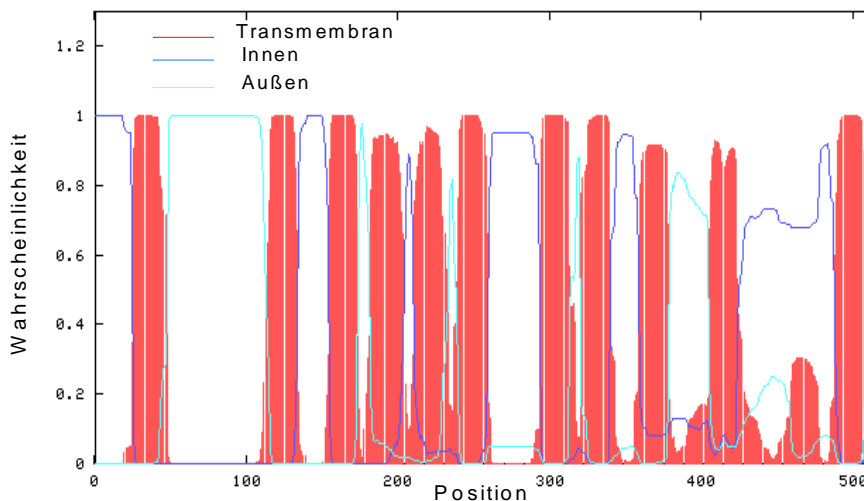


Abb.16: Hydrophobizitätsplot des aus der Datenbank recherchierten Proteins

Mit Hilfe des Programms „Husar“ (EMBL) wurde mit dem aus der Datenbank recherchierten Protein ein Hydrophobizitätsplot durchgeführt

Die Abbildung zeigt, dass in diesem Protein 11 Regionen vorhanden sind, die aufgrund ihrer Hydrophobizität Transmembrandomänen sein könnten.

3.5 Gerichtete Mutagenese durch homologe Rekombination

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem detektierten Gen um das für die Sialinsäure-spezifische O-Acetyltransferase handelte, wurde es durch homologe Rekombination (📖 2.2.8.4) ausgeschaltet. Bei dieser Methode wurde der Vektor pG⁺h9, in den ein Teil des auszuschaltenden Gens als Zielsequenz kloniert worden war, durch eine Induktion veranlaßt, in das Genom zu integrieren. Die Insertion erfolgte an der Stelle, an der sich der der Zielsequenz homologe DNA-Bereich befand. Dadurch wurde der offene Leserahmen unterbrochen und das Protein konnte nicht mehr exprimiert werden.

3.5.1 Homologe Rekombination mit dem Vektor pG⁺h9::Zielsequenz

Als Zielsequenz fungierte ein 1kB großes DNA-Fragment, das durch PCR (📖 2.2.6.7) hergestellt wurde. Die Primer für diese Reaktion wurden so gewählt, dass ein Bereich aus der Mitte des zu zerstörenden Gens amplifiziert werden konnte (📖 2.2.8.4). Als Matrize für die Amplifikation diente chromosomale DNA von *E. coli* 21701. Da dem erhaltenen Fragment sowohl die ersten ca 300 Bp, wie auch die letzten 200 Bp des kompletten Gens fehlten, wurde ausgeschlossen, dass ein Protein exprimiert werden konnte. Das als Zielsequenz verwendete DNA-Fragment ist in Abb. 17 dargestellt.

```

gtatcaggtt gatggtcaaa caaaaacacg caaagtcgta gatccacact catttcgcat
ctgactaacg aagcaggcga acctgagtat caccgcgtac agctgttcac gacgggcat
gaacgcccgg gcctgatgaa cttcccgttt gaaggattaa cctcaggatc gaaatacggg
acagccgttg gcatcatcat gtttatgctg gtgattggcg gcgctttgg catttgtgatg
cgtacaggaa ccattgataa cggtatcctg gcgcttattc gccatacccg cgggaatgaa
attctcttta ttctgctgct gtttattctg ttttacttgg gcggcgcggt atttggtatg
ggagaagagg ccgctgcctt tgccattatc atcgcaccgc taatgggtccg gctgggctat
gacagtatta ccaccgtcct ggtgacctat attgccacgc aaatcggttt tgccagtctg
tggatgaacc cgttttgtgt ggtcgttgcg caggggattg ccggcgcttc ggtgctttct
ggctccgggt tgcgcatcgt ggtgtgggtt atcgccactc tgattggcct gatctttacc
atggtgtacg cctcacgagt gaaaaagaat cctcttctgt cacgcgtgca tgagtccgac
cgcttctttc gtgaaaagca ggctgatggt gaacaacgctc cgtttacctt tggtgactgg
ctggtattga ttgtcctgac cgccgtaatg gtctgggtga tttggggcgt gatcgttaat
gcctggttta ttccagaaat tgccagccag ttcttcacca tgggtctggt gattggcatc
atcggcgttg ttttccgcct taacggcatg acggttaata ccatggcttc atcctttacc
gaaggggccc gaatgatgat cgcccctgcc ctgctggtgg gtttcgccaagg gggatcttg
ctgctggtcgg taatggtga agcgggtgat gccagcgtg ttaaatacc

```

Abb. 17: DNA-Fragment, das zur Herstellung des Vektorkonstruktes für die homologe Rekombination verwendet wurde

Dieses ca. 1kB große DNA-Stück wurde in den Vektor pG⁺h9 ligiert, nachdem das Insertionselement herausgeschnitten worden war (📖 2.2.8.4). Die Amplifikation des Fragments erfolgte über PCR (📖 2.2.6.7), wobei chromosomale DNA des Stammes 21701 als Template fungierte. Die Primer-Sequenzen sind fett gedruckt.

Nach der PCR wurden 5 µl des Reaktionsansatzes zur Kontrolle auf ein Agarosegel (☞ 2.2.6.5) aufgetragen. Abb. 18 zeigt, dass ein Produkt von ca. 1 kB amplifiziert worden war.

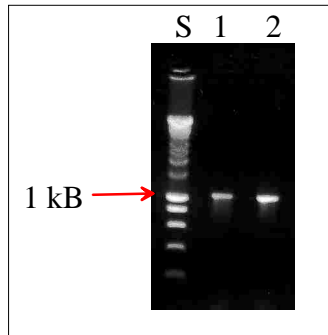


Abb. 18: Agarosegel der PCR-Produkte zur Amplifizierung der Zielsequenz für die homologe Rekombination

Bahn S: SMART-Ladder (Größenstandard)

Bahn 1: 1 ng chromosomale DNA als Template eingesetzt

Bahn 2: 10 ng chromosomale DNA als Template eingesetzt

Die erhaltenen Produkte wurden aus dem Gel eluiert (☞ 2.2.6.1) und in den Vektor pUC 19 ligiert (☞ 2.2.6.2 und 2.2.6.3). Nach einer Vermehrung des Plasmides in *E. coli* JM101 wurde der Vektor wieder isoliert und sequenziert (☞ 2.2.6.6). Die Sequenz des aus dem Gel eluierten DNA-Fragmentes stimmte mit der Sequenz aus Abb. 16 vollständig überein. Um sicher zu stellen, daß dieses Fragment nicht auch zu anderen DNA-Bereichen von *E. coli* Homologien aufwies, wurde in der Datenbank „HUSAR“ erneut ein Alignment durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass unter den bekannten Genen von *E. coli* keines war, dass zu der als Zielsequenz verwendeten DNA größere Homologien zeigte.

Um die homologe Rekombination durchführen zu können, wurde aus dem Vektor das Insertionselement ISS1 herausgeschnitten (☞ 2.2.6.2). und die Zielsequenz in den Vektor ligiert (☞ 2.2.6.2). Das neu entstandene Plasmid pG⁺h9::Zielsequenz wurde zunächst in *E. coli* JM101 transformiert (☞ 2.2.6.3), vermehrt, isoliert (☞ 2.2.6.1) und ein Restriktionsverdau (☞ 2.2.6.2) durchgeführt, um sicherzustellen, dass das Insert auch in das Plasmid integriert worden war. Zusätzlich wurde auch der Ursprungsvektor pG⁺h9::ISS1 fragmentiert. Aliquots dieser beiden Reaktionen wurde auf ein Agarosegel aufgetragen, dessen Foto in der Abb. 19 gezeigt ist.

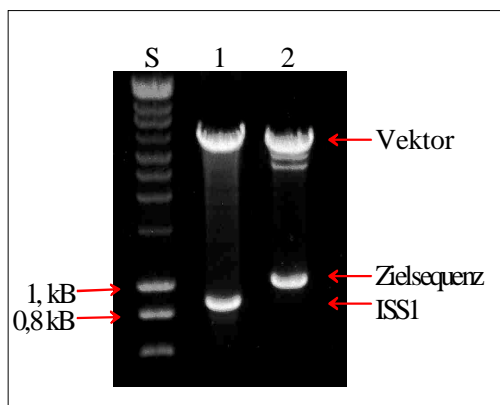


Abb. 19:

Agarosegel mit den durch Restriktionsenzyme isolierten Vektorinserts

Bahn S: SMART-Ladder (DNA-Größenstandard)

Bahn 1: pG⁺h9::ISS1-Fragmentierung

Bahn 2: pG⁺h9::Zielsequenz-Fragmentierung

Die Vektoren pG⁺h9::Zielsequenz und pG⁺h9::ISS1 wurden mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII inkubiert (☞ 2.2.6.2), 5 µl dieser Reaktionsansätze auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt (☞ 2.2.6.5).

3.5.2 Auswirkungen der Insertion

Nachdem durch eine Erhöhung der Temperatur eine Translokation des Vektors in das Genom erfolgt war (Abb. 2.2.8.4), wurden die erhaltenen Subklone über Nacht bebrütet und anschließend auf LB-Agarplatten mit Erythromycin (2 µg/ml) ausgespatelt. Zur Kontrolle für die erfolgreiche Integration des Vektors in das Genom wurde eine PCR durchgeführt (Abb. 2.2.6.7). Dabei fungierten mit Zahnstochern gepickte, ganze Bakterien als Template. Als Primer wurden die unter 3.4.3 aufgeführten Oligonukleotide verwendet. Die Zeit für die Kettenverlängerung betrug 2 min, so dass lediglich Fragmente von ca 2 kB amplifiziert wurden. Da das auszuschaltende Gen 1,5 kB groß war (siehe Abb. 15) und der konstruierte Vektor pG⁺h9::Zielsequenz ungefähr 4,8 kB aufwies, sollte bei einer Integration des Vektors in das gewünschte Gen die Amplifikation eines PCR-Produktes von dann 6,3 kB nicht möglich sein. Als Kontrolle wurde parallel eine PCR mit *E. coli* 21701 ohne enthaltenen Vektor als Template durchgeführt. 5 µl der Versuchsansätze wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und die entstandenen Produkte elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abb. 20).

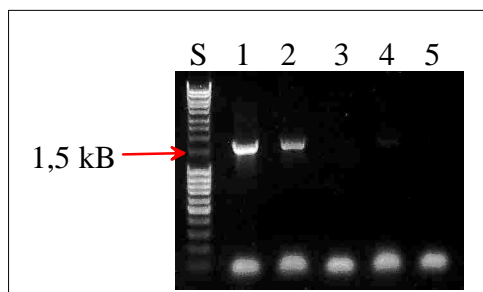


Abb. 20: Agarosegel nach der PCR zur Kontrolle der Translokation von pG⁺h9::Zielsequenz

Bahn S: SMART-Ladder (DNA-Größenstandard)

Bahn 1: PCR mit *E. coli* 21701-DNA ohne transformierten Vektor als Template

Bahn 2-5: PCR mit *E. coli* 21701-DNA von 4 verschiedenen Klonen nach Temperaturinduktion zur Translokation des Vektors als Template

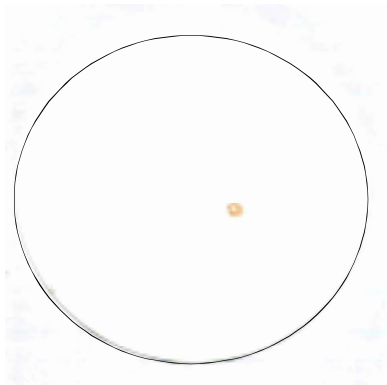
Die PCR (Abb. 2.2.6.7) wurde mit den unter 3.4.3 dargestellten Primern durchgeführt. Als Matrizen fungierten mit Zahnstochern gepickte ganze Bakterien. Die Zeit für die Kettenverlängerung betrug 2 min. 5 µl der Reaktionsgemische wurden auf dem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 2.2.6.5).

Das Bild zeigt, dass außer bei der Kontrolle (Bahn 1) lediglich in der Bahn 2 ein Produkt von 1,5 kB amplifiziert werden konnte. Diese Größe entspricht der des Gens, das ausgeschaltet werden sollte (siehe Bahn 1). Das Vorhandensein bedeutete, dass bei diesem Klon der Vektor entweder überhaupt nicht in das Genom integriert war oder an einer anderen Position. In den Bahnen 3-5 kam es dagegen zu keiner Produktbildung, also konnte hier der Vektor zu einer zielgerichteten Translokation in das Genom induziert werden. Das Ergebnis der Positivkontrolle (Bahn1), bei der *E. coli* 21701 ohne vorher transformierten Vektor als Matrize verwendet worden war zeigt, dass die Bedingungen für die PCR korrekt gewählt waren und diese also bei einer nicht-Translokation zu einem Produkt hätte führen müssen (siehe Bahn 2). Um sicherzugehen, dass kein mechanischer Fehler vorlag, wurde diese PCR mit den gleichen Klonen noch einmal wiederholt: das Ergebnis war identisch mit dem oben aufgeführten. Zur weiteren Kontrolle wurden alle vier in der PCR (siehe oben) verwendeten Klone noch einmal über Nacht angezchtet und eine Plasmidisolierung durchgeführt (Abb. 2.2.6.1). Dabei konnte lediglich aus dem Klon 1 (Bahn 2, Abb. 20)

Plasmide isoliert werden. Somit war sichergestellt, dass die Translokation in das Genom erfolgt war.

Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers OAC12 (☞ 3.1.4.1) wurde getestet, ob ein Defekt in der O-Acetylierung der Sialinsäure im Lipopolysaccharid vorlag. Dazu wurden die Klone 2-4 (Abb20., Bahn 3-5) nun über Nacht vermehrt, mit Medium verdünnt und auf Agarplatten ausplattiert (☞ 2.2.8.4). Nachdem dort über Nacht die Kolonien gewachsen waren, wurden diese auf Nitrocellulose geblottet, mit Milchpulver geblockt und über Nacht in den Antikörper enthaltenden Kulturüberstand inkubiert. An diesen Antikörper konnte ein zweiter Peroxidase gekoppelter-Anti-Maus-Antikörper (☞ 2.2.5.3.2) binden und mit Hilfe des Substrats DAB wurde die Bindung des monoklonalen Antikörpers an die Bakterien visualisiert. Das Ergebnis dieses Kolonieblots ist in Abb. 21a dargestellt. In einem weiteren Versuch wurde an den geblotteten Kolonien zur Detektion von de-O-acetylierten Sialinsäuren ein mPAS-Test (☞ 2.2.4.2) durchgeführt (siehe Abb. 21b).

(a)



(b)



Abb. 21: Detektion von O-acetylierten Sialinsäuren auf kompletten, geblotteten Bakterien

(a) Untersuchung der Bakterien mit dem Antikörper OAC12

(b) Untersuchung der Bakterien mit dem mPAS-Test

Die über homologe Rekombination erhaltenen Klone wurden geblottet (☞ 2.2.5.3.2) und mit dem Antikörper OAC12 und dem mPAS-Test auf das Vorkommen von de-O-acetylierten Sialinsäuren untersucht. Während mit dem Antikörper lediglich O-acetylierte Sialinsäuren nachgewiesen werden konnten (☞ 3.1.4.3), wurden mit dem Schiffbasen-Test de-O-acetylierte detektiert.

Der Antikörper OAC12, der lediglich O-acetylierte Sialinsäuren im LPS von *E. coli* 21701 erkennt, konnte lediglich an eine Kolonie binden (siehe Abb. 21a). Dies bedeutete, dass alle anderen auf der Platte befindlichen und geblotteten Klone einen Defekt in der O-Acetylierung aufwiesen. Der zur Kontrolle durchgeführte mPAS-Test (Abb. 21b) zur Detektion von de-O-acetylierten Sialinsäuren bestätigte das Resultat des Antikörper-Tests. Alle Klone mit Ausnahme eines einzigen wurden mit dem Schiff-Reagenz angefärbt.

Von einem dieser „Knock-out“-Mutanten (KO1) wurde zur endgültigen Analyse des O-Antigens das Lipopolysaccharid isoliert (☞ 2.2.2.1) und der gereinigte Zuckeranteil nach Abspaltung des Lipid-Anteiles zu Dr. Ulrich Zähringer (Borstel) geschickt. Dieser führte eine NMR-Analyse (☞ 2.2.4.7) durch, um das O-Acetylierungsmuster der Sialinsäure bestimmen zu können (siehe Abb. 22). Parallel dazu wurde das gereinigte LPS auf ein SDS-Gel aufgetragen (☞ 2.2.1.1) und das

Lipopolysaccharid nach elektrophoretischer Auftrennung durch Färbung visualisiert (📖 2.2.1.2). Das Ergebnis ist in Abb. 23 dargestellt.

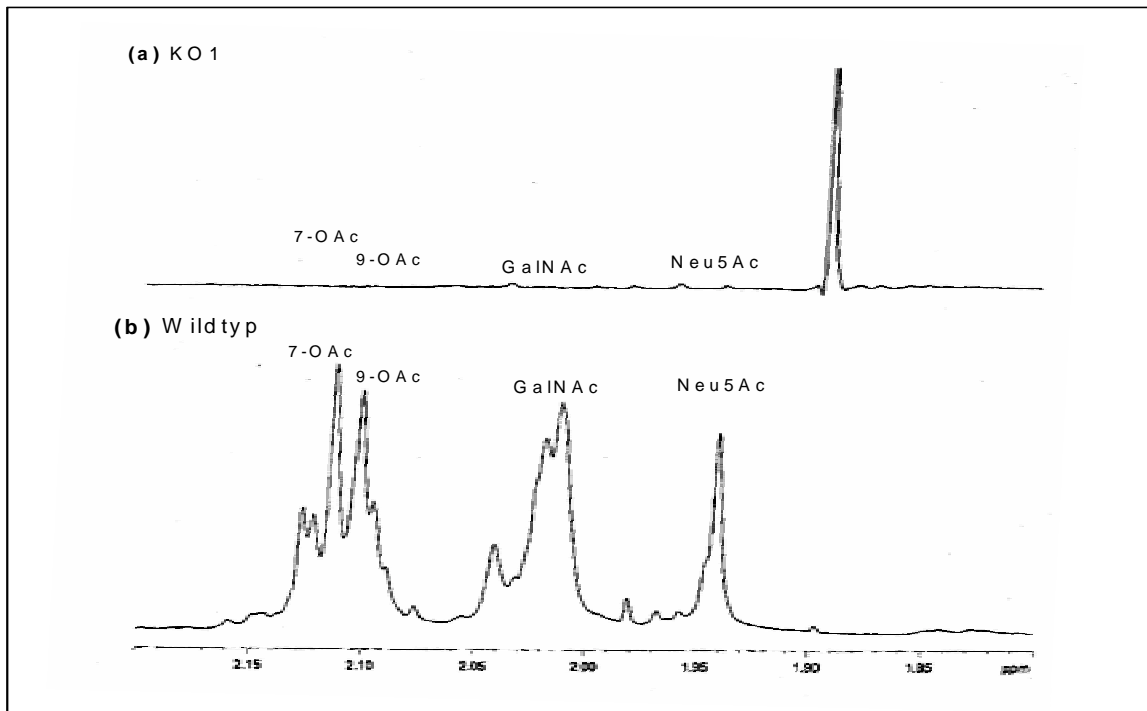


Abb. 22: Ergebnisse der NMR-Analyse des LPS von Wildtyp und „Knock-out“-Mutante KO1 von *E. coli* 21701

- (a) NMR-Analyse der Mutante
- (b) NMR-Analyse des Wildtyp

Das LPS der beiden Klone wurde wie unter 2.2.2.1 beschrieben isoliert und durch NMR-Spektroskopie von Dr. Ulrich Zähringer (Borstel) analysiert.

Der oben dargestellte Vergleich der Spektren von Wildtyp und Mutante beweist, dass durch die homologe Rekombination nicht nur ein Defekt in der O-Acetylierung der Sialinsäuren erzeugt wurde, sondern dass die Biosynthese des gesamten O-Antigens inhibiert wurde, da weder ein Signal für Galaktose, noch für *N*-Acetyl-Galaktosamin oder Sialinsäure (O-acetyliert oder de-O-acetyliert) vorhanden war. Dieses Ergebnis wird zusätzlich gestützt durch die LPS-Analyse mittels SDS-PAGE (Abb. 23).

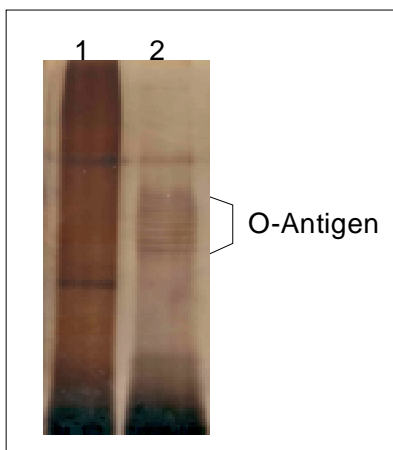


Abb. 23: Ergebnis der Analyse des Lipopolysaccharides der Mutante KO1 im SDS-PAGE

Bahn1: LPS der Mutante

Bahn2: LPS vom Wildtyp

Das LPS der Mutante und des Wildtyps wurde isoliert (📖 2.2.2.2) und nach der elektrophoretischen Trennung angefärbt (📖 2.2.1.2).

Die Abbildung zeigt ein unterschiedliches Bandenmuster zwischen Wildtyp und Mutante. Sämtliche Banden, die normalerweise auf das Vorhandensein des O-Antigens hindeuten fehlen Letzterer.

3.6 Komplementation zur Rekonstitution des Lipopolysaccharides

Um sicherzustellen, dass bei der homologen Rekombination auch das gewünschte Gen zerstört worden war (☞ 2.2.8.4 und 3.4) wurden Versuche zur Komplementation des defekten Genes durchgeführt. Durch diese Expressionsklonierung mußte, wenn das neu transformierte und das ausgeschaltete Gen identisch wären, das Lipopolysaccharid wieder rekonstituiert werden können. Wie unter 2.2.5.4 beschrieben wurde das komplette Gen (siehe Abb. 14) mit Hilfe der PCR amplifiziert (☞ 2.2.6.7) und in den Expressionsvektor pKK223-3 (☞ 2.1.4) kloniert. Das Konstrukt wurde in *E. coli* JM101 transformiert (☞ 2.2.6.3) nach Vermehrung in den Zellen isoliert (☞ 2.2.6.1) und sequenziert (☞ 2.2.6.6). Nachdem die Sequenzierung gezeigt hatte, dass das Gen in dem Vektor vollständig und in der korrekten Orientierung vorlag, wurde das Plasmid mit dem enthaltenen Gen in die Defektmutante KO1 (☞ 3.5) transformiert.

3.6.1 Hohe Expression des transformierten Gens

Für die Expression wurde eine Kultur des Klons KO1/pkk223-3+Insert (Klon CKO1) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bebrütet (☞ 2.2.6.5), dann der Kultur zur Induktion des Gens IPTG (2,5 mM) zugefügt und für weitere 2 h bebrütet. Die Zellwand der Bakterien wurde mit Lysozym aufgeschlossen (☞ 2.2.9) und nach Zentrifugation der Überstand abgenommen. Aliquots dieser Lösung wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und nach elektrophoretischer Trennung mit Coomassie-Blau gefärbt (☞ 2.2.1). Das Ergebnis ist in Abb. 24 dargestellt.

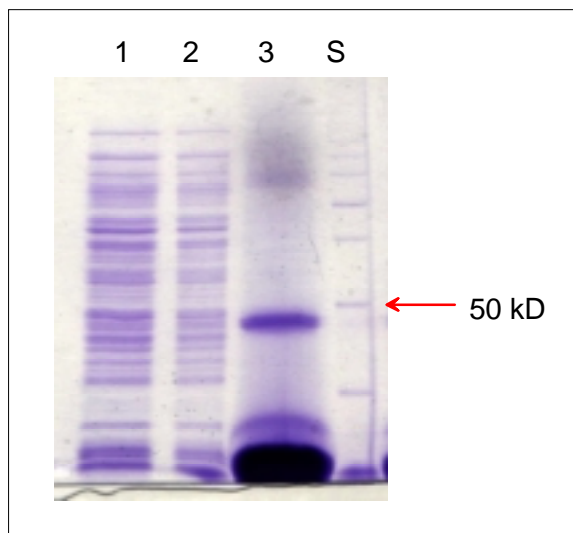


Abb. 24: SDS-PAGE der Zellhomogenate von *E. coli* 21701, *E. coli* KO1 und *E. coli* CKO1

Bahn1: *E. coli* 21701

Bahn2: *E. coli* KO1

Bahn3: *E. coli* CKO1

BahnS: 50 kD-Standard

Die Bakterien wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert, mit IPTG induziert und mit Lysozym aufgeschlossen und zentrifugiert. Der Überstand der Zentrifugation wurde auf ein SDS-Page aufgetragen und mit Coomassie-Blau gefärbt (☞ 2.2.1). Die Behandlung war bei allen drei Stämmen identisch.

Aus der Abbildung geht hervor, dass durch die Expression des Gens eine Anreicherung eines Proteins erzielt werden konnte. Dieses Protein hat eine Größe von ungefähr 50 kD, was auch der erwarteten Größe entspricht, wenn das kodierende Gen ca. 1500 Basen lang ist. Weder im Wildtyp 21701 noch in der Mutante KO1 ist ein ähnlich hohes Vorkommen dieses Proteins zu detektieren. Dadurch wird deutlich, dass dieses Protein Plasmid-kodiert ist und sich darum hoch angereichert hat.

3.6.2 Ergebnis der Rekonstitution des Lipopolysaccharides

Einer der erhaltenen Subklone von CKO1 wurde über Nacht in Flüssigkultur angezogen und auf IPTG-enhaltene Agarplatten (☞ 2.2.5.4) ausplattiert. Nach einer weiteren Bebrütung über Nacht wurden die entstandenen Kolonien geblottet (☞ 2.2.8.4) und mit Hilfe des Antikörpers OAC12 (☞ 3.1.4.1) getestet, ob eine Bindung der Antikörper an das Lipopolysaccharid wieder erfolgen konnte. Abb. 25 zeugt, dass diese Bindung mit DAB-Reagenz visualisiert (☞ 3.5.2) werden konnte.

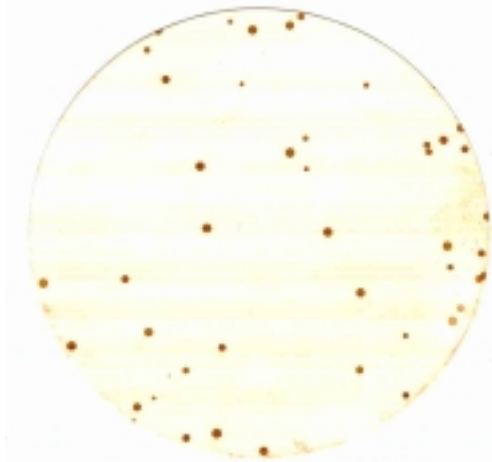


Abb. 25: Reaktion des Antikörpers mit dem Klon CKO1 nach Induktion der Genexpression

Die Bakterien wurden bebrütet und auf IPTG-enhaltenden Agarplatten ausgespatelt. Am nächsten Tag wurden die Kolonien geblottet und mit Antikörper-Lösung inkubiert. Dieser Antikörper wurde von einem zweiten Peroxidasegekoppelten Antikörper erkannt (☞ 2.2.5.3.2) und die Bindung mit DAB-Reagenz sichtbar gemacht.

Vergleicht man diese Abbildung mit der Abb. 21a stellt man fest, dass die Bindung des Antikörpers an die Bakterien wieder hergestellt werden konnte. Ein parallel durchgeführter mPAS-Test (☞ 2.2.4.2) lieferte ein identisches Resultat. Die Kolonien wurden nicht mehr angefärbt.

Um diese Ergebnisse noch weiter zu verifizieren wurde das LPS dieses Klones isoliert (☞ 2.2.2) und eine SDS-Gelelektrophorese (☞ 2.2.1) durchgeführt (siehe Abb. 26). Zweitens wurde das gereinigte O-Antigen (☞ 2.2.2.1) zur NMR-Analyse (☞ 2.2.4.8) zu Dr. Ulrich Zähringer (Borstel) gesandt (Abb. 27).

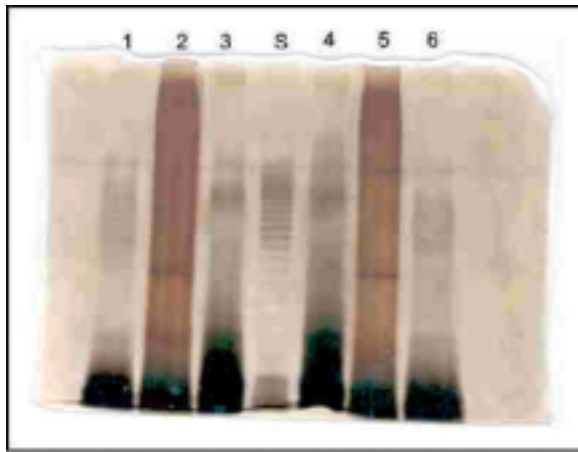


Abb. 26: SDS-PAGE und Silberfärbung des durch Expressionsklonierung rekonstituierten LPS

Bahn 1 und 6: LPS von *E. coli* CKO1 (Mutante mit Expressionsvektor)

Bahn 2 und 5: LPS von *E. coli* KO1 (Knock-out Mutante)

Bahn 3 und 4: LPS von *E. coli* 21701 (Wildtyp)

Bahn S: LPS vom *E. coli* Serotyp O111 (Standard)

Das Lipopolysaccharid wurde wie unter 2.2.2.2 beschrieben isoliert, elektrophoretisch aufgetrennt und gefärbt (📖 2.2.1.2).

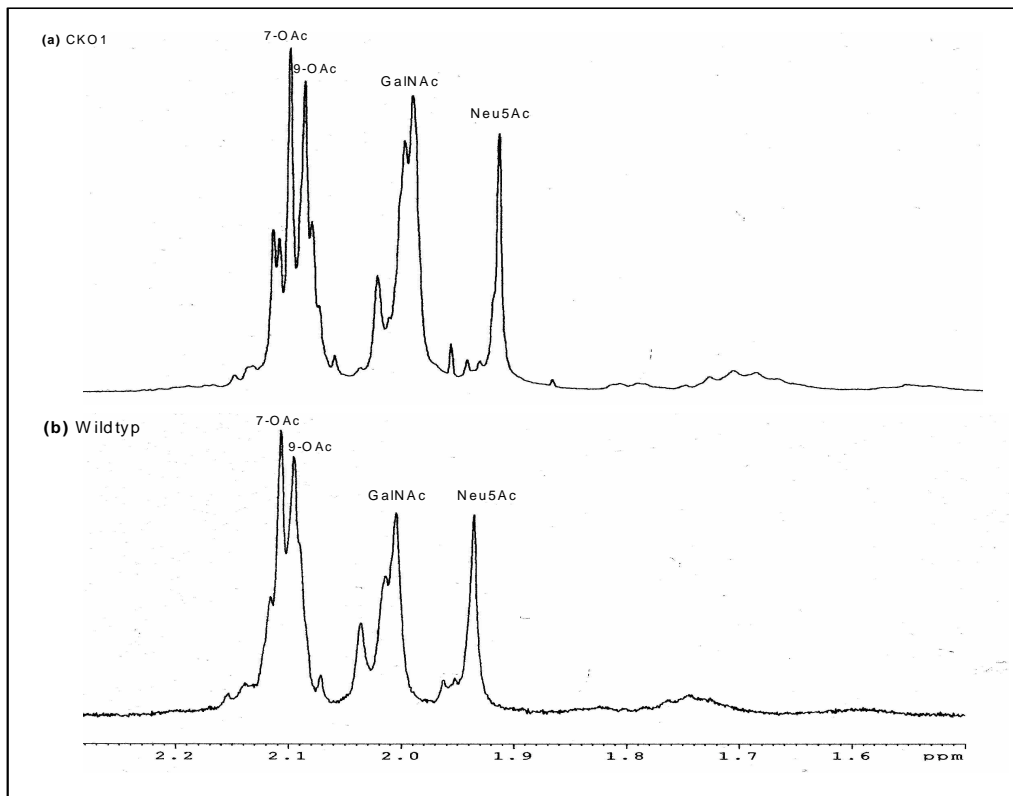


Abb. 27: Ergebnisse der NMR-Analyse des LPS der rekonstituierten Mutante CKO1 und vom Wildtyp *E. coli* 21701

(a) NMR-Analyse des LPS' der rekonstituierten Mutante CKO1

(b) NMR-Analyse des LPS' vom Wildtyp

Das isolierte und gereinigte O-Antigen (📖 2.2.2.1) wurde mittels NMR-Spektroskopie (📖 2.2.4.8) von Dr. Ulrich Zähringer analysiert.

Abb. 27 zeigt, dass die Rekonstitution des Lipopolysaccharids durch die Expressionsklonierung zu 100 % gelungen ist. Das bei der Mutante KO1 fehlende komplette O-Antigen (siehe Abb. 21b) konnte über NMR und über SDS-PAGE (siehe Abb. 26) wieder nachgewiesen werden.

Damit ist bewiesen, dass das durch homologe Rekombination (📖 2.2.8.4) ausgeschaltete Gen identisch mit dem durch Expressionsklonierung wieder eingeführten ist.

3.7 Enzymatischer Nachweis der Sialinsäure-spezifischen O-Acetyltransferase

Da über den Mechanismus und auch über den Ort der O-Acetylierung bei Bakterien bisher bis auf einige Daten von *E. coli* K12 (STEVENSON et al., 1994) nichts bekannt ist, wurden Experimente konzipiert, die weitere Daten zu diesen Fragestellungen liefern konnten.

3.7.1 Abwesenheit freier, O-acetylierter Sialinsäuren in den Zellen

Es bestand die Möglichkeit, dass die O-Acetylierung bereits an freien Sialinsäuren stattfindet. Darum wurde versucht, diese möglicherweise vorkommenden, bereits O-acetylierten Zuckermoleküle zu isolieren. Die Isolierung erfolgte wie unter 2.2.3 beschrieben. Das nach Ionenaustauschchromatographie erhaltene Eluat wurde in drei Teile aufgeteilt. Während ein Teil über Nacht zur Abspaltung möglicherweise vorhandener O-Acetylgruppen verseift wurde (📖 2.2.4.1), erfolgte mit dem zweiten Teil eine Lyasebehandlung (📖 2.2.5.1). Der dritte Teil wurde in seinem Zustand belassen. Nach Lyophilisation wurde alles Material derivatisiert (📖 2.2.3) und mittels fluorimetrischer HPLC (📖 2.2.4.4) analysiert. Diese Versuche wurden mehrere Male durchgeführt. Die erhaltenen Daten waren bei allen Versuchen nahezu identisch. Repräsentativ sind für alle Versuche die Ergebnisse einer Versuchsreihe in Abb. 28 dargestellt.

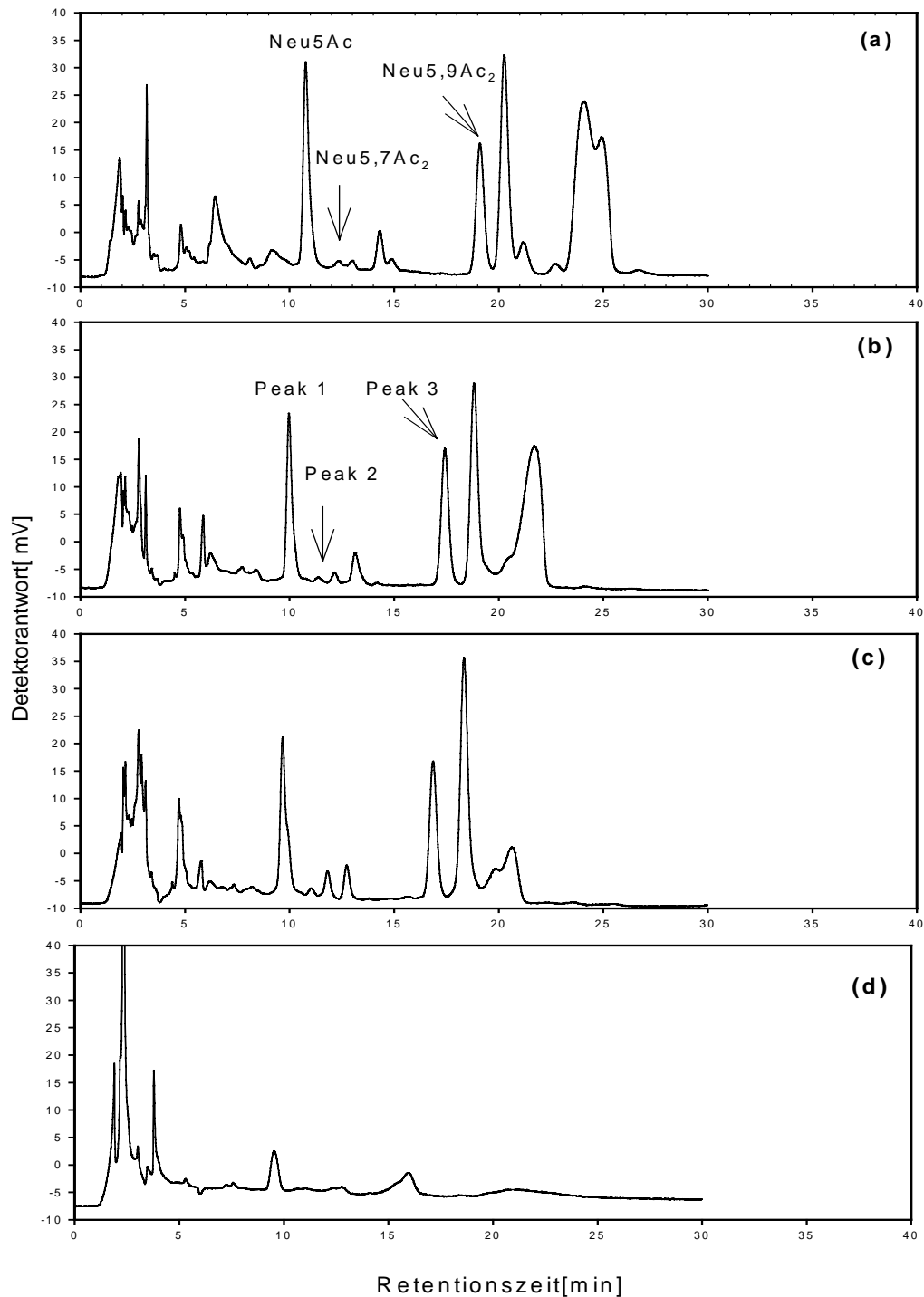


Abb. 28: HPLC-Analyse der isolierten Sialinsäuren aus *Escherichia coli* 21701

Dargestellt sind die Chromatogramme eines Sialinsäurestandards (a), eines unbehandelten Eluats (b) nach Ionenaustauschchromatographie, einer zusätzlich nach Chromatographie verseiften (2.2.4.1) (c) und einer nach Chromatographie mit *N*-Acetylneuraminat-Lyase (2.2.5.1) inkubierten Probe (d).

Die aus dem LPS isolierte Fraktion (Abb. 2.2.3) wies nach Derivatisierung mit DMB (Abb. 2.2.4.4) in der HPLC-Analyse mehrere fluoreszierende Peaks auf. Ein Vergleich der dabei ermittelten Retentionszeiten mit denen des Sialinsäurestandards (Abb. 28a) erlaubte eine Zuordnung des Peaks 1 zu Neu5Ac. Dies bestätigte auch die Inkubation mit *N*-Acylneuraminat-Lyase, die zu einer partiellen Degradation dieses Peaks führte (Abb. 28d). Aufgrund der relativen Retentionszeiten konnte zunächst für Peak 2 davon ausgegangen werden, dass es sich um Neu5,7Ac₂ handelte. Der Peak drei ließ sich aus dem gleichen Grund Neu5,9Ac₂ zuordnen. Zum Nachweis dieser O-Acetylierung wurde eine Verseifung durchgeführt (Abb. 2.2.4.1), die zu einer Verringerung der Peaks 2 und 3 sowie zu einem Anstieg des Peaks Nr. 1 führen müßte. Wie jedoch aus Abb. 28c zu erkennen ist, veränderte sich der prozentuale Anteil der erwähnten Peaks nicht signifikant, was darauf hindeutet, dass es sich um andere Modifikationen der Sialinsäure oder vielleicht sogar um andere Zucker handeln muß. Auch die anderen in Abb. 28b detektierten Peaks konnten mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht genauer analysiert und zugeordnet werden.

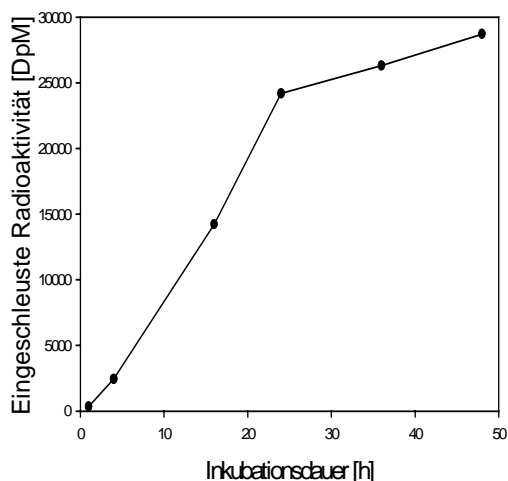
3.7.2 Acetyl-Coenzym A als intrazellulärer Acetyl-Donor

Bisher wird in der Literatur Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) als Acetylgruppendonor für die O-Acetylierung der Sialinsäuren postuliert (HIGA und VARKI, 1988). Um zu überprüfen, ob dieses auch für den Stamm 21701 zutrifft, wurde radioaktiv markiertes Acetyl-CoA durch CaCl₂/RbCl₂-Transformation in die Zellen geschleust (Abb. 2.2.6.3) und versucht, die Radioaktivität im LPS zu detektieren. Zunächst war es notwendig zu überprüfen, ob und wieviel Radioaktivität in die Zellen transformiert werden konnte. Die Inkubation des Bakterien/³H-Acetyl-CoA-Gemisches wurde zu unterschiedlichen Zeiten gestoppt und die Zellen wurden mehrmals mit Medium gewaschen, um außen anhaftendes radioaktives Material zu entfernen. Im β -Counter wurde dann die noch vorhandene Radioaktivität gezählt (Abb. 2.2.4.7). Die Resultate sind in der folgenden Abb. 29 dargestellt.

Abb. 29:

In Bakterien nach unterschiedlicher Inkubationsdauer durch CaCl₂/RbCl₂-Transformation eingeschleuste Radioaktivität

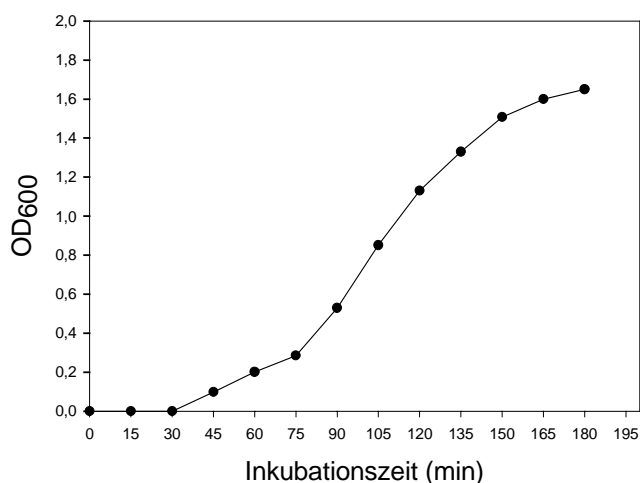
Die Bakterien wurden wie unter 2.2.6.3 beschrieben in MOPS-Puffer aufgenommen und mit ³H-Acetyl-CoA auf Eis inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen der Zellen wurde die transformierte Radioaktivität im β -Counter bestimmt (Abb. 2.2.4.7). Bei den gezeigten Werten handelt es sich um Mittelwerte von Doppelbestimmungen.



Die Grafik macht deutlich, dass eine längere Inkubation einen deutlichen Anstieg in der von den Bakterien aufgenommenen Radioaktivität bewirkt. Die Frage war, ob die Bakterien dieses eingeschleuste Material auch zur Biosynthese ihres Lipopolysaccharids verwenden würden. Um die Radioaktivität im O-Antigen detektieren zu können, mußte den Bakterien vor der LPS-Isolierung die Möglichkeit zur Biosynthese und Zellteilung gegeben werden. So wurden die in MOPS-Puffer befindlichen Zellen (Abb. 2.2.6.3) zuerst einmal in LB-Medium (Abb. 2.1.9.1) überführt und bei 37 °C inkubiert. In 15minütigen Zeitintervallen wurde ein Aliquot der Suspension entnommen und durch

Messung der optischen Dichte bei 600 nm (☞ 2.2.6.5) der Wachstumsverlauf der Kultur bestimmt. Abb. 30 zeigt eine Wachstumskurve einer solchen Kultur.

Abb. 30:
Verlauf einer Wachstumskurve von Bakterien nach $\text{CaCl}_2/\text{RbCl}_2$ -Transformation
 Die Bakterien wurden nach der Transformation auf Eis in LB-Medium überführt und bei 37 °C inkubiert. Im Abstand von 15 min wurde ein Aliquot entnommen und durch eine Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm (☞ 2.2.6.5) der Wachstumsverlauf verfolgt.



Der Verlauf der Kurve zeigt, dass sich die Bakterien nach 30 min Inkubation bei 37 °C regeneriert haben und die Phase der Zellteilung beginnen. So wurden nach einer Bebrütung von 90 min die Bakterien geerntet, da zu diesem Zeitpunkt ein vollständig durchlaufender Lebenszyklus inklusive LPS-Biosynthese gewährleistet war. Das LPS wurde isoliert (☞ 2.2.2.1), anschließend geteilt und die eine Hälfte zu Abspaltung der O-Acetylgruppen verseift (☞ 2.2.4.1). Beide Formen wurden dann im β -Counter auf vorhandene Radioaktivität untersucht. Dabei wurde deutlich, dass diese tatsächlich in das LPS eingebaut worden war, da **420 DpM** gemessen werden konnten. Weiterhin zeigte es sich, dass diese Radioaktivität zum Teil verseifbar war, denn die de-O-acetylierte Probe wies lediglich **270 DpM** auf. Mehrmalige Wiederholungen dieses Versuches bestätigten diese Relationen, nach denen ca. **36 %** der in das Lipopolysaccharid eingebauten Radioaktivität durch Verseifung entfernt werden konnten.

Anschließend wurde in einer weiteren Präparation der Lipid-Anteil hydrolytisch von dem Zuckeranteil abgetrennt (☞ 2.2.2.1) und nach der Ultrazentrifugation die eingebaute Radioaktivität sowohl im erhaltenen Sediment (enthielt das Lipid A), wie auch im Überstand (enthielt die Sialinsäure-haltigen Komponenten) gemessen. Dabei zeigte es sich, dass ein Einbau der ^3H -Acetylgruppen in beide Komponenten stattgefunden hatte. Im Lipid-Anteil konnten durchschnittlich **283 DpM** nachgewiesen werden und in der Zuckerkomponente **198 DpM**. Nach Verseifung blieben im Lipid-Anteil noch **190 DpM** und im O-Antigen **135 DpM** erhalten. Diese Resultate verdeutlichen, dass zur LPS-Biosynthese Acetyl-Coenzym A als Acetylgruppen-Donor vom Bakterium verwendet werden kann. Diese Gruppe wird dabei unter anderem auch als O-Acetylgruppe in das O-Antigen eingebaut, da nur so der Verlust an Radioaktivität durch Verseifung plausibel zu erklären ist.

Um den Ort der eingebauten Radioaktivität noch genauer bestimmen zu können, wurden Versuche unternommen, die im O-Antigen intern lokalisierte Sialinsäure zu isolieren, um vollständig sicher sein zu können, dass die Radioaktivität auch tatsächlich als O-Acetylgruppe an die Sialinsäure transferiert wurde. Zuerst wurde versucht, die Isolierung auf chemischen Wege mittels Propionsäurehydrolyse und Natriumperjodatoxidation durchzuführen. Das nach Ionenaustauschchromatographie erhaltene Eluat (☞ 2.2.3) wurde vor der Lyophilisation in drei gleiche Teile geteilt. Während einer davon verseift wurde (☞ 2.2.4.1), wurde der zweite einer

Lyasebehandlung unterzogen (☞ 2.2.5.1) und die dritte Fraktion blieb unverändert. Alle drei Proben wurden derivatisiert und durch HPLC analysiert (☞ 2.2.4.4). Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abb. 31 dargestellt.

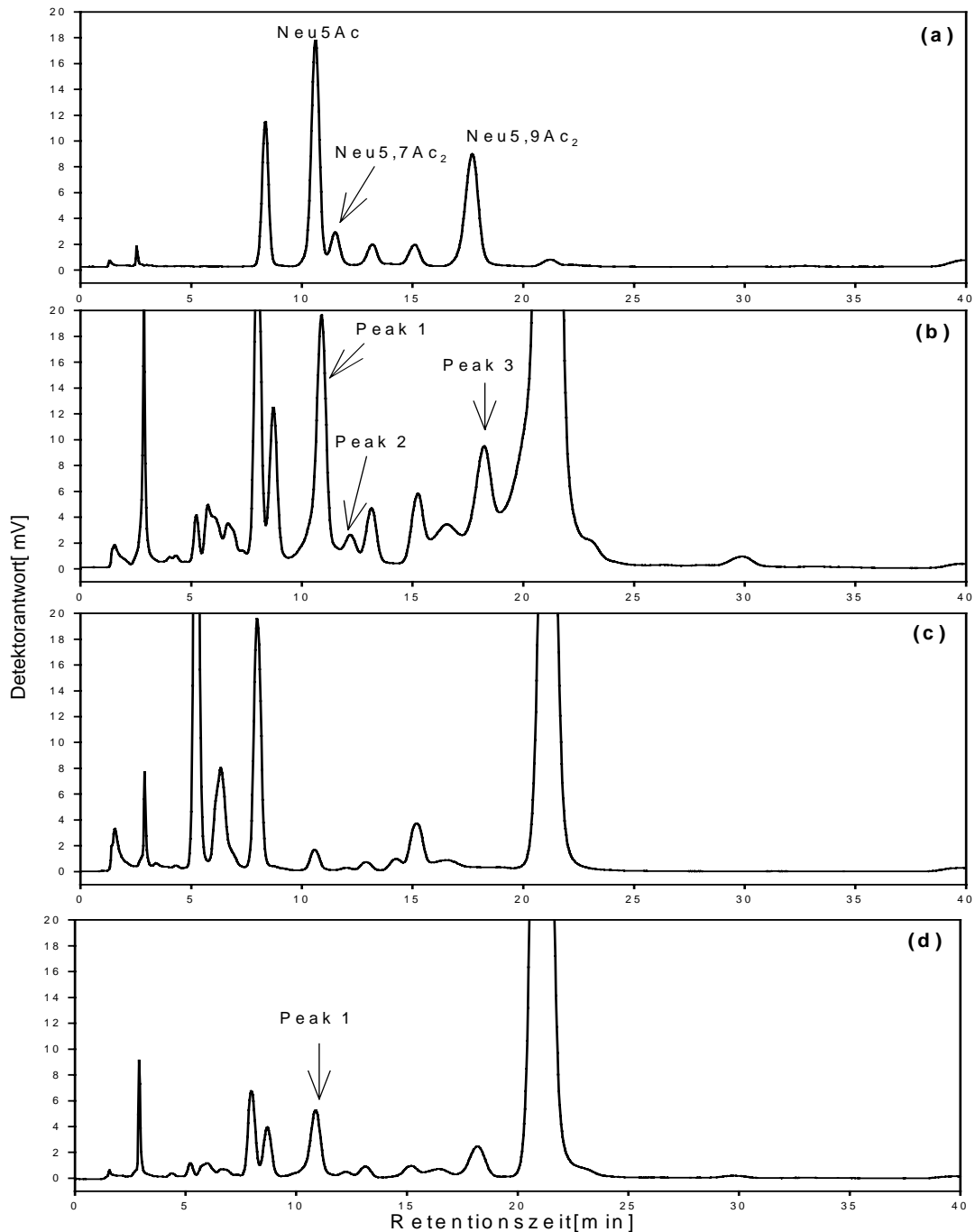


Abb. 31: HPLC-Analyse der mittels Natriumperjodat und Propionsäurehydrolyse aus dem Zuckeranteil des LPS isolierten Komponenten

Dargestellt sind die Chromatogramme eines Sialinsäurestandards (a), einer unbehandelten Probe (b), einer verseiften Probe (c) (☞ 2.2.4.1) und einer mit Lyase (☞ 2.2.5.1) behandelten Probe (d).

Die Abbildung 31b zeigt, dass in der unbehandelten Probe noch sehr viele Komponenten von der HPLC detektiert werden können. Eine Zuordnung dieser Peaks ist aber kaum möglich. Lediglich die *N*-Acetylneuraminsäure könnte dem Peak 1 zugeordnet werden, da dieser Peak nach Lyasebehandlung (siehe Abb. 31d) partiell degradiert wird.

Eine Verseifung führt zwar dazu, dass die Peaks, die anhand der relativen Retentionszeiten als Neu5,7Ac₂ (Peak Nr. 2) bzw. Neu5,9Ac₂ (Peak Nr. 3) angesprochen werden könnten, nicht mehr zu detektieren sind, was darauf hinweisen könnte, dass es sich um *O*-acetylierte Sialinsäuren handelt. Im Gegenzug steigt aber der Gehalt an Neu5Ac nicht an, sondern wird ebenfalls geringer. Weiterhin findet scheinbar eine Verschiebung der Peaks mit kleineren Retentionszeiten statt (siehe Abb. 31c). Somit kann es sich bei den Peaks 2 und 3 nicht um die *O*-acetylierten Formen einer Sialinsäure, sondern um unbekannte Neu5Ac-Derivate handeln. Auch mit weiteren Experimenten, bei denen durch chemische Methoden die Sialinsäure aus dem *O*-Antigen isoliert werden sollte, wurden keine anderen Ergebnisse erzielt.

In einem zweiten Ansatz wurde versucht, im Anschluß an eine Propionsäurehydrolyse, durch die die glykosidische Bindung zwischen *N*-Acetyl-Galaktosamin und Galaktose gespalten wird, die terminale Galaktose des verbliebenen Tetrasaccharids (Abb. 1.2, siehe Abb. 3) mit Galaktosidase abzuspalten (Abb. 2.2.3). Auch hier erfolgte nach der Ionenaustauschchromatographie (Abb. 2.2.3) wieder eine Aufteilung der erhaltenen Fraktion, um einen Teil verseifen und einen weiteren mit Lyase behandeln zu können. Abb. 32 zeigt stellvertretend für alle durchgeführten Versuche das Resultat eines dieser Experimente.

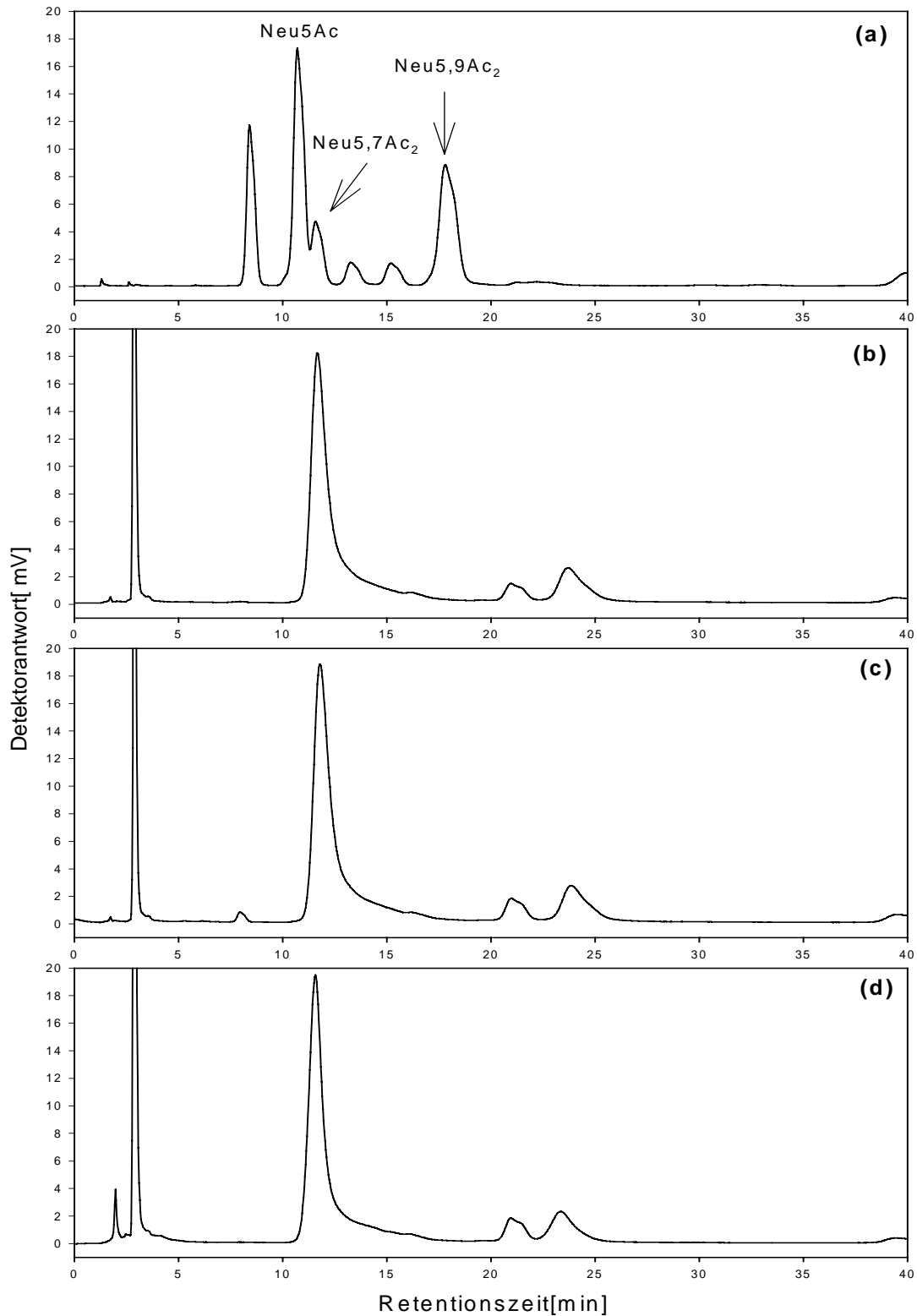


Abb. 32: HPLC-Analyse der mittels Propionsäurehydrolyse und Galaktosidase-Behandlung aus dem Zuckeranteil des LPS isolierten Komponenten
 Dargestellt sind die Chromatogramme eines Sialinsäurestandards (a), einer unbehandelten Probe (b), einer verseiften Probe (2.2.4.1) (c) und einer mit Lyase (2.2.5.1) behandelte Probe (d).

Das Peakmuster dieser Chromatogramme unterscheidet sich grundlegend von denen in Abb. 31 dargestellten, allerdings ist es auch hier nicht möglich, O-acetylierte Sialinsäuren zu detektieren. Es bestände zwar die Möglichkeit, dass es sich bei dem einen Peak des Chromatogramms der nativen Probe um Neu5Ac handelt und das durch die Reinigungsschritte ein Verlust der O-Acetylierung eingetreten ist, aber dieser Peak müßte dann nach einer Inkubation mit Lyase zumindest stark degradiert sein. Da dies nicht der Fall ist und weitere Wiederholungen dieser Experimente zu keinen anderen Ergebnissen führten, muß davon ausgegangen werden, dass eine Isolierung der internen di-O-acetylierten Sialinsäure des O-Antigens mit den beiden oben beschriebenen Methoden nicht möglich ist.

3.7.3 Zellhomogenat im Bio-Assay

Es ist bisher noch kein Enzym-Assay für die Sialinsäure-spezifische O-Acetyltransferase entwickelt worden. Darum wurden Versuche konzipiert, die das Ziel hatten, einen Test zu etablieren. Da aufgrund der oben aufgeführten Untersuchungen deutlich war, dass Acetyl-CoA als Spender für die Acetylgruppe dienen kann, wurde es in den folgenden Versuchen auch als solcher verwendet.

Glasperlenaufschluß. Für diese Experimente wurde zunächst durch Glasperlenaufschluß ein Zellhomogenat hergestellt. Zu diesem wurde wie unter 2.2.9 erläutert, radioaktives Acetyl-CoA als Acetylgruppen-Donor hinzugefügt sowie verschiedenste Substrate als mögliche Akzeptoren für die O-Acetylierung addiert (☞ 2.2.9). Nach Abstoppen der Reaktionen wurden diese Substrate wieder isoliert und der Einbau der Radioaktivität im β -Counter gemessen (☞ 2.2.4.7). Es zeigte sich, dass in keines der angebotenen Substrate (de-O-acetyliertes LPS, freie Sialinsäure, CMP-Neu5Ac, Sialyllaktose, verschieden sialylierte, de-O-acetylierte Ganglioside) ein Einbau von Radioaktivität nachgewiesen werden konnte.

In einem weiteren Versuch, in dem zum Zellhomogenat neben radioaktivem Material und de-O-acetyliertem LPS ein Esteraseinhibitor hinzugefügt wurde, konnte ebenfalls in dem exogenen Substrat keinerlei Radioaktivität detektiert werden.

Detergenzien wie Triton X-100 oder CHAPS führten auch zu keinerlei Inkorporation von radioaktiven O-Acetylgruppen.

Bei einem Experiment wurde neben dem Homogenat und dem Acetyl-CoA kein zusätzliches exogenes Substrat verwendet, sondern das im Homogenat befindliche Lipopolysaccharid wurde wie unter 2.2.2.1 beschrieben isoliert. Aber auch in diesem endogenen Substrat konnte keine Radioaktivität nachgewiesen werden.

Zusätzlich wurde versucht, die Lokalisation des Enzyms zu eruieren. Dazu wurde das Zellhomogenat ultrazentrifugiert und der erhaltene Überstand (Enzymaktivität wäre löslich) und das Sediment (Enzymaktivität wäre membrangebunden) fungierten in zwei weiteren Experimenten als mögliche Enzymquelle. In beiden Fällen ließ sich aber kein Einbau von radioaktiven Acetylgruppen in exogenes Substrat feststellen. Auch in endogenem Substrat (LPS) ließ sich bei dem Versuch, das nach Ultrazentrifugation erhaltene Sediment als Enzymquelle zu verwenden, keinerlei inkorporierte Radioaktivität detektieren.

Behandlung mit Lysozym. In anderen Versuchen wurde ein Extrakt durch die Behandlung der Bakterien mit Lysozym hergestellt (☞ 2.2.5.2). Der Ansatz wurde zentrifugiert und der Überstand als „Enzymquelle“ verwendet. Als Acetylgruppen-Donor fungierte wiederum ^3H -Acetyl-CoA, als Akzeptoren wurden verschiedene Substrate eingesetzt und die Ansätze für jeweils 20 min bei 30 °C inkubiert. Ein Aliquot der Reaktionsansätze wurde anschließend über Dünnschichtchromatographie (☞ 2.2.4.5) getrennt und durch einen Radiodünnschichtscanner analysiert (☞ 2.2.4.7). Es zeigte

sich, dass radioaktive Peaks detekiert werden konnten (siehe Abb. 33). Um zu überprüfen, ob es sich bei der eingebauten Radioaktivität um O-Acetylgruppen handelt, wurde die Dünnschichtplatte über Nacht in einem geschlossenen Tank mit NH_3 -Atmosphäre aufbewahrt und dadurch verseift (☞ 2.2.4.1). Da die Radioaktivität am nächsten Tag stark degradiert war (siehe Abb. 34), kann von einem Einbau der ^3H -Acetyl-Gruppe als O-Acetyl-Modifikation ausgegangen werden.

Diese Versuche wurden parallel auch mit der Mutante CKO1 (☞ 3.6) durchgeführt. Diese Experimente dienten dazu, herauszufinden, ob das in diesem Stamm exprimierte Protein vielleicht doch eine zusätzliche O-Acetyltransferaseaktivität besitzen würde. Es wurden zwischen Wildtyp und Mutante aber keine nennenswerten Unterschiede bei der Inkorporation von Radioaktivität festgestellt.

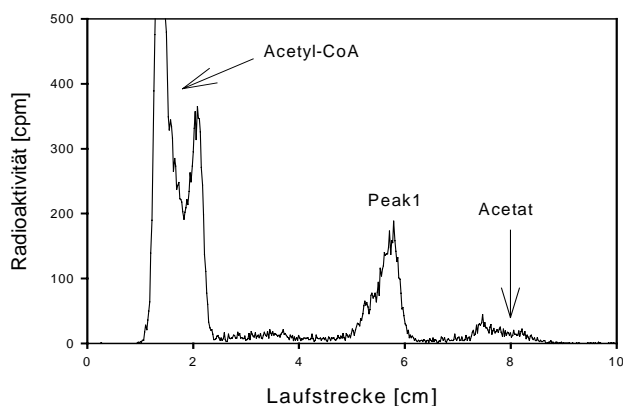


Abb. 33: Dünnschichtchromatographischer Nachweis einer Acetyltransferase-Enzymaktivität

Aufgetragen wurden $10\ \mu\text{l}$ eines Reaktionsproduktes aus Zellhomogenat + ^3H -AcCoA. Als Laufmittel wurde ein Lösungsmittelgemisch aus Ethanol, Butanol, Pyrimidin, Eisessig und Wasser im Verhältnis 50:5:5:1,5:15 (v/v/v/v/v) verwendet. Die Radioaktivität wurde durch einen Dünnschichtscanner analysiert (☞ 2.2.4.5)

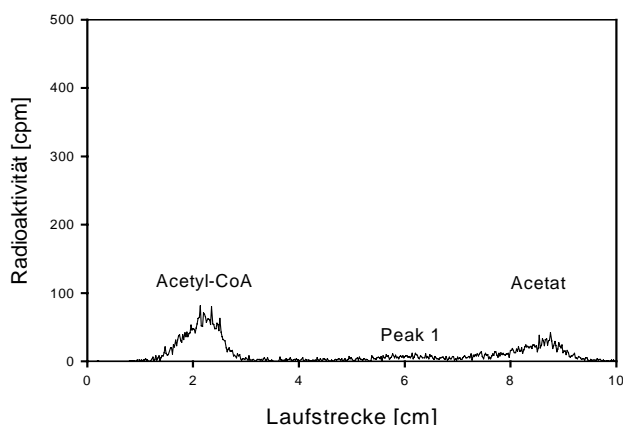


Abb. 34: Chromatogramm nach Verseifung der auf der DC-Platte aufgetragenen Proben

Die Dünnschichtplatte wurde nach der Analyse über Nacht in einer NH_3 -gesättigten Atmosphäre belassen, wodurch eine de-O-Acetylierung der aufgetragenen Proben erfolgte (☞ 2.2.4.1). Die Platten wurden dann im Radiodünnschichtscanner (☞ 2.2.4.5) analysiert.

3.8 Charakterisierung der Enzymaktivität

Für alle diese Versuche wurden, wie oben dargestellt, die Bakterien mit Lysozym behandelt, die Suspension kurz zentrifugiert und der Überstand als „Enzymquelle“ verwendet. Als Donor für die Acetylgruppe fungierte ^3H -Acetyl-CoA, von dem 0,75 μCi pro Versuch eingesetzt wurden. Dass es sich bei der eingebauten Radioaktivität um eine *O*-Acetylierung handelt, konnte neben dem Verseifungsexperiment (siehe Abb. 34) noch in einem weiteren Versuch nachgewiesen werden. Dazu wurde das in der Zellulose enthaltene, radioaktive Material in Höhe des gemessenen Peaks von der Glasplatte gekratzt und mit Hydroxylamin inkubiert (☞ 2.2.4.6). Zur Kontrolle wurde Hydroxamat, entstanden aus einer Inkubation von Essigsäureethylester mit Hydroxylamin verwendet. Als weitere Kontrollen diente Hydroxamat, das aus Inkubationen von Hydroxylamin mit *O*-acetyliertem LPS sowie mit *O*-acetylierten Sialinsäuren erhalten wurde. Das entstandene Hydroxamat wurde auf eine Zelluloseplatte aufgetragen, getrennt und mit FeCl_3 angefärbt. (☞ 2.2.4.6). Das Ergebnis ist in Abb. 35 dargestellt.

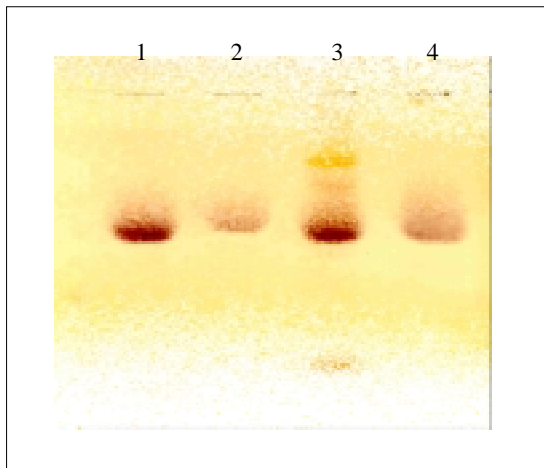


Abb. 35: Nachweis von Hydroxamat auf einer Dünnschichtplatte

- Bahn 1: Hydroxamat entstanden aus Inkubation von Essigsäureethylester des Hydroxylamin
- Bahn 2: Hydroxamat entstanden aus Inkubation von *O*-acetylierter Sialinsäure mit Hydroxylamin
- Bahn 3: Hydroxamat entstanden aus Inkubation von *O*-acetyliertem LPS mit Hydroxylamin
- Bahn 4: Hydroxamat entstanden aus Inkubation des Zellulosematerials mit Hydroxylamin

Die Abbildung macht deutlich, dass in allen Fällen das Hydroxylamin in Hydroxamat umgewandelt wurde. Dies bedeutet, dass prinzipiell sowohl die *O*-Acetylgruppen des LPS (Bahn 3) wie auch die der Sialinsäure als Donor verwendet werden können. Weiterhin wird deutlich, dass es sich bei dem in der Zellulose enthaltenem Material um *O*-acetyliertes handeln muß, denn *N*-Acetylgruppen können durch diesen Test nicht nachgewiesen werden. Weil dieser Test als Sialinsäure-spezifisch beschrieben wird, kann davon ausgegangen werden, dass die Inkorporation der ^3H -Acetylgruppe durch Bindung als *O*-Acetylgruppe an die Sialinsäure erfolgt ist.

Um einen weiteren Hinweis darauf zu erhalten, dass Acetyl-CoA als Acetylgruppen-Donor fungieren kann, wurde in einem Experiment zusätzlich nicht radioaktives, kaltes Acetyl-CoA als spezifischer Competitor im 100fachen Überschuß addiert (☞ 2.2.9). Dabei wurde deutlich, dass der in Abb. 33 bei ungefähr 6 cm vorhandene

Peak verschwunden ist (siehe Abb. 36), was beweist, dass Acetyl-CoA tatsächlich als Acetylgruppen-Donor bei der O-Acetylierung fungieren kann.

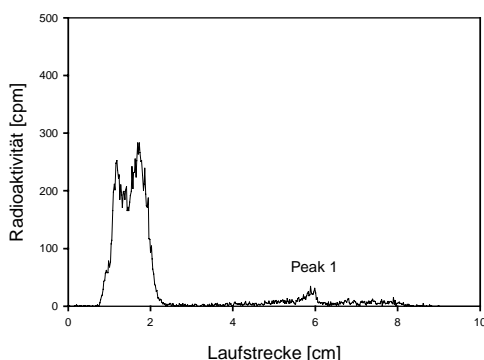


Abb. 36: Dünnschichtchromatogramm einer Reaktion mit kaltem AcCoA als spezifischem Competitor

Aufgetragen wurden 10 μl eines Reaktionsproduktes aus Zellhomogenat + ^3H -AcCoA + AcCoA im 100fachen Überschuß. Als Laufmittel wurde ein Lösungsmittelgemisch aus Ethanol, Butanol, Pyrimidin, Eisessig und Wasser im Verhältnis 50:5:5:1,5:15 (v/v/v/v/v) verwendet. Die Analyse erfolgte im Radiodünnschichtscanner (☞ 2.2.4.5).

Um zu testen, ob der Einbau von Radioaktivität wirklich auch auf eine enzymatische und nicht auf eine rein chemische Reaktion zurückzuführen ist, wurde die eingesetzte Enzymprobe vorher durch Zugabe von SDS [10 % (v/v)] und Erhitzung für 10 min auf 96 °C denaturiert. Abb. 37 zeugt, dass durch diese Behandlung ein Einbau von Radioaktivität vollständig inhibiert werden kann.

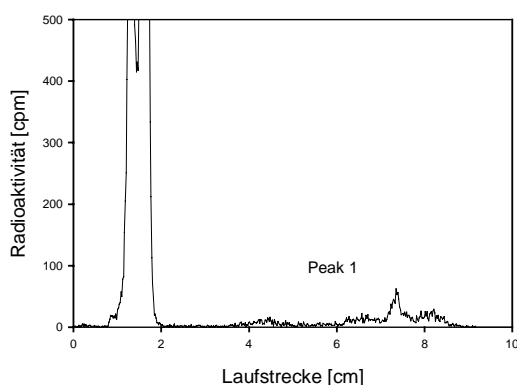


Abb. 37: Chromatogramm einer Reaktion mit denaturierter Enzymprobe

Das als Enzymquelle eingesetzte Zellhomogenat wurde vor der Inkubation mit ^3H -Acetyl-CoA durch 10 minütiges Erhitzen auf 96 °C bei gleichzeitiger Zugabe von SDS denaturiert. Aufgetragen wurden 10 μl des Gemisches aus Zellhomogenat + ^3H -AcCoA. Als Laufmittel wurde ein Lösungsmittelgemisch aus Ethanol, Butanol, Pyrimidin, Eisessig und Wasser im Verhältnis 50:5:5:1,5:15 (v/v/v/v/v) verwendet. Die Analyse erfolgte im Radiodünnschichtscanner (☞ 2.2.4.5).

Auch die Stabilität der Enzymaktivität wurde untersucht. So wurde von dem erhaltenen Homogenat sofort ein Test mit ^3H -Acetyl-CoA (siehe oben) durchgeführt, die restliche Suspension wurde 4 Tage bei 4 °C gelagert und mit dieser Lösung wiederum eine Inkubation mit ^3H -Acetyl-CoA durchgeführt. Die Radiodünnschicht-Analyse zeigte, dass im zweiten Ansatz keinerlei Radioaktivität mehr eingebaut wurde. In zusätzlichen Experimenten wurde das Zellhomogenat bei -20 °C eingefroren, aufgetaut, wieder eingefroren und wieder aufgetaut. Nach jedem Auftauen wurde ein Aliquot entnommen und mit ^3H -Acetyl-CoA inkubiert. Die in Abb. 38 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die eingebaute Radioaktivität nach jedem Auftauen geringer wurde. Aus diesen Resultaten wird deutlich, dass die Aktivität des Enzyms schnell verloren geht.

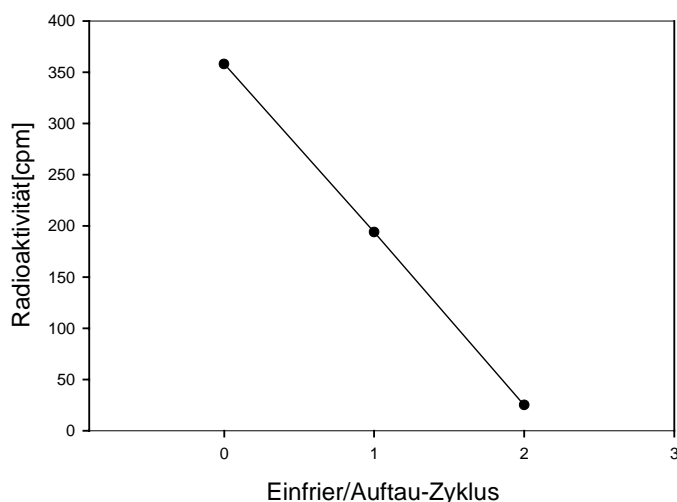


Abb. 38: Abnahme des Einbaus von Radioaktivität durch mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Enzymprobe

Das Reaktionsgemisch wurde wie unter 2.2.9. erläutert, gemischt und inkubiert. Neben einem frisch präparierten Homogenat (Einfrier/Auftau-Zyklus 0) wurde Homogenat verwendet, das einmal und welches, das zweimal eingefroren und wieder aufgetaut worden war. Aufgetragen wurden 10 μl des jeweiligen Versuchsansatzes aus Zellhomogenat + ^3H -AcCoA. Als Laufmittel wurde ein Lösungsmittelgemisch aus Ethanol, Butanol, Pyrimidin, Eisessig und Wasser im Verhältnis 50:5:5:1,5:15 (v/v/v/v/v) verwendet. Die Analyse erfolgte im Radiodünnschichtscanner (☞ 2.2.4.5).

Weitere Versuche dienen zur Analyse des geeigneten Substrates. Hier zeigte sich, dass weder de-O-acetyliertes LPS, noch de-O-acetyliertes O-Antigen, freie Sialinsäuren oder de-O-acetyliertes GD₃ als exogene Substrate für die Reaktion fungieren konnten. In allen Fällen erhöhte sich die Inkorporation der Radioaktivität in keiner Weise. Bei einer Co-Migration und anschließender Bial-Färbung (☞ 2.2.4.3) der erwähnten Substanzen zeigte es sich auch, dass Laufstrecke der anfärbbaren Substanzen und Lauflänge der radioaktiven Peaks nicht miteinander korrelierten.

3.8.1 Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit

Um die Abhängigkeit des Enzyms von der Temperatur zu bestimmen, wurde in mehreren Versuchsreihen die Inkubation des Homogenats mit ^3H -Acetyl-CoA bei verschiedenen Temperaturen (20 °C, , 30 °C, 37 °C, 45 °C, 56 °C und 80 °C) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 39 dargestellt.

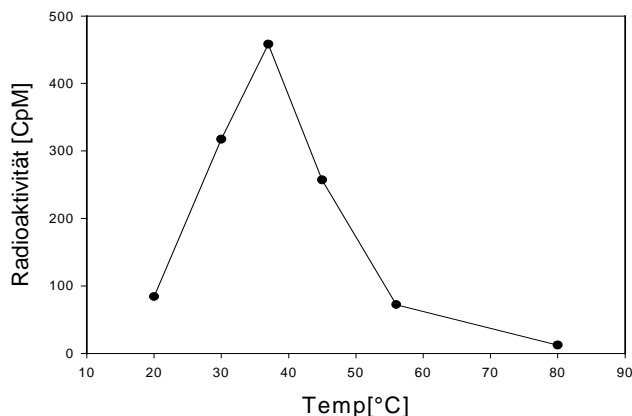


Abb. 39: Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Temperatur

Das Gemisch aus Zellhomogenat und ^3H -Acetyl-CoA wurde für 20 min bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. 10 μl jedes Ansatzes wurden dann auf eine Zelluloseplatte aufgetragen und dünn-schichtchromatographisch getrennt (2.2.4.5). Als Laufmittel wurde ein Lösungsmittelgemisch aus Ethanol, Butanol, Pyrimidin, Eisessig und Wasser im Verhältnis 50:5:5:1,5:15 (v/v/v/v/v) verwendet. Die Auswertung erfolgte durch einen Radiodünn-schichtscanner (2.2.4.5). Bei den dargestellten Werten handelt es sich um Mittelwerte aus drei Versuchen.

Aus der Abbildung geht hervor, dass das Temperaturoptimum der gezeigten Enzymaktivität bei 37 °C liegt. Höhere Temperaturen führen zu einem Aktivitätsverlust, bei 80 °C ist keinerlei Aktivität mehr detektierbar. Bei niedrigeren Temperaturen (20 °C) ist die Aktivität ebenfalls deutlich geringer. 30 °C- 45 °C sind hingegen Temperaturen, bei denen die Aktivität deutlich vorhanden ist.

3.8.2 Untersuchungen zur Abhängigkeit vom pH-Wert

Ein weiterer wichtiger Parameter für die Charakterisierung einer Enzymaktivität ist die Abhängigkeit vom pH-Wert. Bei diesen Experimenten wurde der Reaktionsansatz aus Zellhomogenat und ^3H -Acetyl-CoA bei verschiedenen pH-Werten für 20 min bei 30 °C inkubiert (2.2.9). Anschließend wurden wieder Aliquots der Ansätze durch Dünn-schichtchromatographie analysiert und ausgewertet (siehe Abb. 40). Der pH-Wert des Zellhomogenats ohne Zugabe weiterer Säure oder Base betrug dabei 6,5.

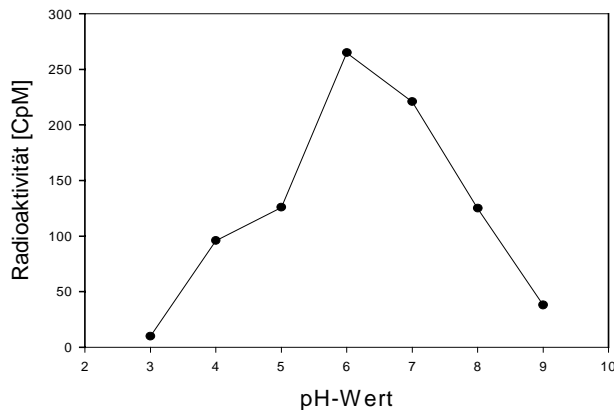


Abb. 40: Enzymaktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert

Das Gemisch aus Zellhomogenat und ^3H -Acetyl-CoA wurde mit Hilfe verschiedener Puffer auf 7 unterschiedliche pH-Werte eingestellt und für 20 min bei 30 °C inkubiert. 10 μl jedes Ansatzes wurden auf eine Zelluloseplatte aufgetragen und dünnschichtchromatographisch getrennt (2.2.4.5). Die Auswertung erfolgte durch einen Radiodünnschichtscanner (2.2.4.5). Bei den dargestellten Werten handelt es sich um Mittelwerte aus drei Versuchen.

Anhand der Abbildung wird deutlich, dass bei pH-Werten zwischen 6 und 7 die Inkorporation von Radioaktivität am höchsten ist. pH-Werte im stark sauren (pH=3) oder basischen Bereich (pH=9) führten zu einer Verminderung des Einbaus.

3.9 Auswirkungen der O-Acetylierung für die Bakteriophagenadhäsion

Das LPS ist oft ein Rezeptor für Bakteriophagen. In diesem Zusammenhang ist es von großen Interesse herauszufinden, ob eine Veränderung der Sialinsäuremodifikationen im LPS zu einer Änderung des Bakteriophagenspektrums führt. Für diese Untersuchungen wurde Bakteriophagenmaterial isoliert (2.1.10). Mit Aliquots der insgesamt 40 Einzelisolate wurde ein Phagengemisch hergestellt und mit diesem Mäuse immunisiert (2.2.5.3.3). Für die Untersuchungen zur Spezifität der erhaltenen Antikörper wurden ELISA-Tests durchgeführt (2.2.5.3.3). Dabei zeigte sich, dass bei einer eingesetzten Verdünnung von 10^{-3} eine Extinktion von 1,12 erhalten wurde. Von diesem Wert ist die Negativkontrolle (Bindung der Antikörper an eine Vertiefung ohne Liganden) bereits subtrahiert. Da nicht genügend Serum für alle Isolate vorhanden war, wurden 10 Bakteriophagen zufällig ausgewählt und mit ihnen als Liganden ein ELISA durchgeführt, um zu überprüfen, ob die im Serum enthaltenen Antikörper auch an einzelne Isolate der Phagen binden konnten. Auch hier zeigte sich bei allen ausgewählten Isolaten eine Bindung der Antikörper an die Bakteriophagen. Da nun bewiesen war, dass im Blut der Maus Antikörper gegen die einzelnen Bakteriophagenisolate vorlagen, konnte mittels eines ELISAs das Bindungsverhalten der einzelnen Isolate an O-acetyliertes und de-O-acetyliertes LPS untersucht werden (2.2.10). Dazu wurde natives und verseiftes Lipopolysaccharid an die Mikrotiterplatte gekoppelt, anschließend die Einzelisolate hinzugefügt und mit Hilfe des Serums und des sekundären Antikörpers Unterschiede in der Bindung detektiert (Tab. 5).

Tab. 5: Bindung der einzelnen Bakteriophagenisolate an *O*-acetyliertes und de-*O*-acetyliertes Lipopolysaccharid

Das Bakteriophagenmaterial wurde wie unter 2.1.10 beschrieben isoliert. Die Durchführung des Bindungstests erfolgte nach 2.2.10, wobei sowohl *O*-acetyliertes, wie auch durch Verseifung (☞ 2.2.4.1) de-*O*-acetyliertes LPS als Ligand verwendet wurde. Dargestellt ist die erhaltene Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm.

| Isolat-Nr.: | Ligand | |
|-------------|----------------------------|--------------------------------|
| | <i>O</i> -acetyliertes LPS | de- <i>O</i> -acetyliertes LPS |
| | Extinktion | |
| 1 | 0,12 | 0,10 |
| 2 | 0,15 | 0,15 |
| 3 | 0,19 | 0,21 |
| 4 | 0,17 | 0,16 |
| 5 | 0,16 | 0,17 |
| 6 | 0,29 | 0,25 |
| 7 | 0,21 | 0,20 |
| 8 | 0,01 | 0,00 |
| 9 | 0,29 | 0,61 |
| 10 | 0,15 | 0,00 |
| 11 | 0,01 | 0,00 |
| 12 | 0,84 | 0,56 |
| 13 | 0,31 | 0,28 |
| 14 | 0,26 | 0,26 |
| 15 | 0,46 | 0,46 |
| 16 | 0,58 | 0,68 |
| 17 | 0,33 | 0,66 |
| 18 | 0,58 | 0,69 |
| 19 | 0,11 | 0,04 |
| 20 | 0,65 | 0,73 |
| 21 | 0,45 | 0,77 |
| 22 | 0,57 | 0,74 |
| 23 | 0,50 | 0,79 |
| 24 | 0,60 | 0,83 |
| 25 | 0,47 | 0,45 |
| 26 | 0,23 | 0,20 |
| 27 | 0,18 | 0,12 |
| 28 | 0,20 | 0,03 |
| 29 | 0,21 | 0,23 |
| 30 | 0,34 | 0,54 |
| 31 | 0,00 | 0,00 |
| 32 | 0,54 | 0,70 |
| 33 | 0,41 | 0,64 |
| 34 | 0,34 | 0,71 |
| 35 | 0,33 | 0,56 |
| 36 | 0,63 | 0,71 |
| 37 | 0,44 | 0,44 |
| 38 | 0,37 | 0,32 |
| 39 | 0,38 | 0,21 |
| 40 | 0,51 | 0,40 |

Die Tabelle zeigt, dass es teilweise große Unterschiede im Bindungsverhalten der einzelnen Isolate an das unterschiedlich modifizierte Lipopolysaccharid gibt. Während die Isolate Nr. 12 und 39 besser an O-acetyliertes LPS binden, ist bei den meisten Phagen (z.B. Nr. 9, 17, 24 und 34) die relative Adhäsion an verseiftes LPS größer. Weiterhin gibt es auch Isolate, die an beide LPS-Formen mit gleicher Intensität binden (z.B. Nr.15, 18, 25 und 36), bei diesen Phagen befindet sich die Erkennungs- und Bindungsstelle zwar im LPS, allerdings sind die O-Acetylgruppen nicht direkt beteiligt.

4 Diskussion

4.1 Bewertung der Techniken zum Nachweis O-acetylierter Sialinsäuren

Es war für diese Arbeit von essentieller Bedeutung, einen Test zur Erkennung in der O-Acetylierung der Sialinsäuren defekten *E. coli* Mutanten zu etablieren. Ein chemischer Test stand zu Beginn der Arbeit zur Verfügung. Drei immunologische Verfahren wurden entwickelt. Die Tests werden nachfolgend bewertet.

mPAS-Test. Der chemische milde-Periodsäure-Schiffbasen-Test (☞ 2.2.4.2) beruht darauf, dass Hydroxylgruppen von *N*-Acetylneuraminsäuren mit niedrigen Periodatkonzentrationen gespalten und zu Aldehyden oxidiert werden. Diese können mit dem Schiff-Reagenz nachgewiesen werden. Substituenten wie O-Acetylgruppen an der Seitenkette verlangsamen oder unterbinden diese Oxidation fast vollständig, so daß der Aldehydnachweis negativ ausfällt. Imitiert man mit Hilfe einer Verseifung (☞ 2.2.4.1) den Verlust der O-Acetylgruppen an beiden Positionen (C-7 und C-9), erhält man *N*-Acetylneuraminsäure. Das Färbeverhalten verseifter Kolonien unterschied sich deutlich von dem der nativen, di-O-acetylierten Kolonien (☞ 3.1.1, Abb. 5). Da laut CULLING und REID (1980) Ringdiol anderer Zucker langsamer oder fast gar nicht Period in geringer Konzentration oxidiert werden, schien dieser Test zur Unterscheidung verschieden substituierter Sialinsäuren einsetzbar. In der Histochemie ist noch eine weitere Kontrolle möglich, denn dort werden die angefertigten Schnitte mit Sialidase inkubiert. Dieses war für die *E. coli*-Kolonien nicht möglich, da es sich um interne Sialinsäuren handelte.

Ein weiteres Problem bei diesem Test ist die Frage, wie sich das Färbeverhalten ändert, wenn lediglich die O-Acetylierung an einer Position durch Mutagenese verhindert wird. Dieses könnte der Fall sein, wenn statt eines Enzyms doch zwei O-Acetyltransferasen in den Bakterien vorhanden wären. Beim Ausfall der 9-O-Acetylierung würde sich das verbliebene Neu5,7Ac₂-Molekül nach VEH (1979) wie Neu5Ac verhalten, da an den Positionen C-8 und C-9 freie Hydroxylgruppen vorhanden wären. Somit wäre eine Detektion des defekten Klones wohl möglich. Bei einem verbliebenen Neu5,9Ac₂-Molekül hingegen wäre kein Unterschied zu Neu5,7,9Ac₃ zu erwarten. Die defekte Mutante würde also unentdeckt bleiben.

Aus den oben erwähnten Gründen erschien es sinnvoll, diesen Test zwar als ergänzendes Werkzeug einzusetzen, daneben aber noch andere Detektionssysteme zu entwickeln. Dies wurde auch durch die späteren Ergebnisse bestätigt. So konnten mit Hilfe des Tests zwar 38 durch Bestrahlung mit UV-Licht scheinbar in der O-Acetylierung defekte Mutanten detektiert werden (☞ 3.2.3), Kontrollversuche widerlegten diese Ergebnisse aber. Betrachtet man weiterhin die Abb. 21 (☞ 3.5.2), deutet die starke Anfärbung der Kolonien auf an C-7 und C-9 unsubstituierte *N*-Acetylneuraminsäure hin, was durch die fehlende Antikörperbindung auch bestätigt wurde. Die weiteren Analysen über SDS-Page (☞ 3.5.2, Abb. 23) und NMR (☞ 3.5.2, Abb. 22) zeigen aber, daß Sialinsäuren weder in unsubstituierter noch in substituierter Form vorlagen, da das komplette O-Antigen nicht mehr vorhanden war. Die starke Anfärbung beruhte also auf einer Reaktion des Schiff-Reagenz mit anderen Zuckern, möglicherweise mit denen in der nun freier zugänglichen Kern-Region. Dieses Ergebnis machte auf jeden Fall deutlich, daß der mPAS-Test nicht für das Screening der in der O-Acetylierung der Sialinsäuren im LPS defekten Mutanten geeignet ist.

Phagemid Display System. Dieses System wird in der Literatur als sehr effizient beschrieben (SCOTT und SMITH, 1990; SCOTT, 1992), um an spezifische Liganden bindende Phagenepitope anzureichern, die dann wie Antikörper zu verwenden wären. Als Vorteile dieser Methode gelten, dass auch sehr kleine Epitope detektiert werden und dass es sich um eine sehr schnelle Methode handelt (SZARDENINGS und COLLINS, 1990). Da es sich bei der vorliegenden Arbeit auch nur um ein sehr kleines Zielmolekül, nämlich die Sialinsäure (O-acetyliert oder de-O-acetyliert) im O-Antigen des Lipopolysaccharides handelte, schien diese Methode zur Herstellung des für die Mutageneseversuche erforderlichen Screening-Systems hervorragend geeignet. Weil das komplette LPS als Zielstruktur verwendet werden mußte, war es allerdings erforderlich, einen zweiten, zusätzlichen Schritt einzufügen, bei dem die eluierten Phagemide mit dem jeweils heterologen Antigen gewaschen wurden, um die spezifisch bindenden herauszufiltern. Eine solche zusätzliche Prozedur war aber schon mit Erfolg durchgeführt worden (DYBWAD et al., 1993) und schien somit kein Hinderungsgrund für die Anreicherung zu sein.

Nach den ersten Runden des Pannings konnte dann auch, wie erwartet, eine Anreicherung von scheinbar spezifisch bindenden Phagen erreicht werden (☞ 3.1.2, Tab. 2). Allerdings stieg auch immer der Titer solcher Phagen, bei denen zur Kontrolle gar kein Ligand verwendet worden war. Dieses stand im Widerspruch zu aus der Literatur bekannten Daten (RÖTTGEN und COLLINS, 1995) und deutete darauf hin, dass die Anreicherung eluierter Phagen lediglich auf unspezifische Bindungen zurückzuführen war, was sich auch bei den durchgeführten Sequenzierungen bestätigte (☞ 3.1.2.1), bei denen zwanzig verschiedene Sequenzbereiche ermittelt wurden. Durch weitere Runden des Pannings doch noch eine Anreicherung spezifisch bindender Phagemide zu erhalten, schien wenig erfolgversprechend, da eine Anreicherung normalerweise schon nach 1 – 3 Runden erreicht wird (OLDENBURG et al., 1992; FELICI et al., 1993). Trotz der Variabilität der erhaltenen Phagemid-Epitope wurden einige Phagemide auf ihre Bindungsspezifität getestet, da ja die Möglichkeit bestand, dass sich unter ihnen ein Phage befinden könnte, der spezifisch an O-acetyliertes oder de-O-acetyliertes LPS bindet. Bei diesen Tests konnten auch tatsächlich zwei Phagemide detektiert werden, die im ELISA eine Bindung zeigten (☞ 3.1.2.2., Tab. 3). Diese Bindungsspezifität konnte aber in einem weiteren Kontrollexperiment nicht bestätigt werden.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass es nicht gelungen war, Phagemide mit spezifisch an O-acetylierte oder de-O-acetylierte Sialinsäuren im LPS des Stammes 21701 bindenden Epitope anzureichern. Möglicherweise war das zu differenzierende Epitop auch für Phagemide zu klein. Vielleicht funktioniert die eingesetzte Epitop-Bibliothek auch bei Kohlehydraten nicht so effizient, denn bisher sind diese Moleküle laut Literatur noch nicht als Liganden eingesetzt worden.

Polyklonale Antikörper Eine weitere Möglichkeit, ein Testsystem zum Screening der erzeugten Klone (☞ 3.2 und 3.5) zu entwickeln, bestand in der Herstellung von polyklonalen Antikörpern durch Immunisierungen von Kaninchen. Die Tiere wurden dabei mit hitzefixierten Bakterien mehrfach immunisiert (☞ 2.2.5.3), wobei jeweils einem Kaninchen O-acetyliertes und einem Tier de-O-acetyliertes Material injiziert wurde. Nach jeder Immunisierung wurde der Titer gegen beide LPS-Formen bestimmt. Die Ergebnisse zeigten (☞ 3.1.3), dass in den erhaltenen Seren Antikörper sowohl gegen O-acetyliertes, wie auch gegen de-O-acetyliertes LPS vorhanden waren. Da komplette Bakterien zur Immunisierung eingesetzt worden waren, ist dies auch nicht verwunderlich. So mußte versucht werden, die polyklonale Antikörper-enthaltenden Seren aus den Kaninchen mit dem jeweils heterologen

Antigen zu waschen, um nur solche Antikörper zurückzuhalten, die spezifisch an eine LPS-Form binden konnten (☞ 2.2.5.3.1). Es zeigte sich aber, daß nach den Waschschritten in den Seren keinerlei spezifisch bindende Antikörper mehr vorhanden waren. Da bisher wenig darüber bekannt ist, wie LPS-Epitope überhaupt dem Immunsystem präsentiert werden (POXTON, 1995), bestand die Möglichkeit, dass überhaupt keine spezifisch an die O-acetylierte oder de-O-acetylierte Sialinsäuren bindenden Antikörper von den Kaninchen erzeugt worden waren, sondern dass alle im Serum enthaltenen Antikörper nur größere Bestandteile des LPS' wie komplettes O-Antigen oder die Core-Struktur erkennen konnten. Es ist auch in der Literatur beschrieben, dass eine „Kreuz-Reaktivität“ von polyklonalen Antikörpern stattfinden kann. So reagieren polyklonale Antikörper gegen den *E. coli* Serotyp O157 auch mit den Serotypen O7 und O116 (PERRY et al., 1988). Weiterhin sind auch „Kreuz-Reaktionen“ zwischen unterschiedlichen Arten wie *Brucella abortus* und *Escherichia coli* bekannt (STUART et al., 1982). Eine solche „Kreuz-Reaktion“ erscheint bei den eingesetzten, strukturell sehr ähnlichen Bakterienvarianten als nicht unwahrscheinlich.

Monoklonale Antikörper. Da es auf der anderen Seite aber möglich war, monoklonale Antikörper zu erzeugen, die sehr spezifisch z.B. an ein aus C-7 und C-8 di-O-acetyliertes Homopolymer von α -2,9 verknüpften Sialinsäuren bestehendes Kapselpolysaccharid von *Neisseria meningitidis* banden (ARAKERE und FRASCH, 1991), bestand auch die Möglichkeit, spezifisch bindende, monoklonale Antikörper gegen O-acetylierte oder de-O-acetylierte Sialinsäuren im LPS von *E. coli* 21701 zu erhalten. Für die Herstellung dieser Antikörper wurden jeweils vier Mäuse mit hitzefixierten, nativen und 4 Tiere mit verseiften Bakterien immunisiert. Nach jeder Immunisierung wurde der Titer sowohl gegen O-acetyliertes, wie auch gegen de-O-acetyliertes LPS bestimmt. Bei Betrachtung der Titerbestimmungen der Mäuseseren ist dann auch festzustellen, dass im Serum wiederum Antikörper gegen beide LPS-Formen vorhanden waren (☞ 3.1.4). In den ELISA-Tests zeigte sich, dass es nicht gelungen war, spezifisch an de-O-acetyliertes LPS bindende monoklonale Antikörper herzustellen (☞ 3.1.4.1), da sämtliche detektierten Antikörper auch eine Bindung an natives LPS zeigten (☞ 3.1.4.1, Tab. 4). Gründe hierfür können in der schlechten Verfügbarkeit dieses Epitops liegen. Ohne die zusätzlichen Modifikationen handelt es sich um eine „normale“ Sialinsäure, die im O-Antigen zwischen zwei Galaktosen integriert ist (☞ 1.2, Abb. 3). Das Neu5Ac-Molekül ist dabei wahrscheinlich kein ausreichendes Epitop für die Bindung von Antikörpern, wie auch aus den sehr geringen Unterschieden bei der Titerbestimmung deutlich wird. Ähnliche Erfahrungen wurden auch bei *Staphylococcus aureus* Typ 5 und Typ 8 beschrieben. Dort konnten bei der Herstellung von Antikörpern gegen das de-O-acetylierte Kapselpolysaccharid auch nur Antikörper gegen die gesamte Kapselstruktur erzeugt werden. Eine Immunisierung mit der nativen, O-acetylierten Form lieferte dagegen Antikörper sowohl gegen die gesamte Zuckerkette, wie auch gegen die O-Acetylgruppe (FATTOM et al., 1998).

Ebenso ist es in der vorliegenden Arbeit gelungen, monoklonale Antikörper zu erzeugen, die spezifisch an O-acetyliertes Sialinsäuren im LPS von *Escherichia coli* 21701 banden. Dies konnte mit Hilfe von ELISA-Tests (☞ 3.1.4.1) verifiziert werden. Letztendlich blieben allerdings von ursprünglich 13 LPS-Antikörper-produzierenden Hybridoma-Klonen nur zwei übrig, die tatsächlich die gewünschte Bindungsspezifität hatten. Betrachtet man aber die geringe Größe des gewünschten Liganden (O-Acetyl-Gruppe), ist diese Ausbeute als sehr gut zu bezeichnen. Auch andere Antikörper gegen O-acetylierte Sialinsäuren z.B. auf Gangliosiden konnten nur unter

großen Schwierigkeiten und in sehr geringer Menge hergestellt werden (KNIEP, 1995).

Die durchgeführte Epitop-Analyse ergab, dass die anderen LPS-Komponenten (Lipid A, Kernregion) nicht in die Bindung der Antikörper involviert waren, sondern dass der Ligand für die Bindung beider Antikörper (OAc12 und OAc20) im O-Antigen zu finden war. Anhand von Konkurrenzexperimenten konnte gezeigt werden, dass die anderen O-Antigen-Komponenten ohne die Sialinsäure die Bindung nicht beeinflussten. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die O-Acetylgruppe(n) von essentieller Bedeutung für die Bindung sind (☞ 3.1.4.1). Dabei war die modifizierte Sialinsäure aber nur ein Teil des Epitops, wie die Versuche mit freien, O-acetylierten Sialinsäuren zeigten. Für die Verwendbarkeit in einem Screening-System zur Überprüfung von in der O-Acetylierung defekten Mutanten sollte es auch keine Rolle spielen, dass außer der O-acetylierten Sialinsäure noch weitere Komponenten zur Adhäsion des Antikörpers benötigt wurden. Entscheidend war lediglich, dass ein Verlust der O-Acetylgruppe zu einem Verlust der Bindung führte und dies konnte anhand des durchgeführten Western-Blots (☞ 3.1.4.2, Abb. 8) sowie der Kolonie-Blots (☞ 3.1.4.3, Abb. 9) dargestellt werden. Damit stand für die nachfolgenden Mutagenese-Experimente ein funktionierendes, leicht und schnell zu verwendendes Testsystem in unbegrenzter Menge zur Verfügung.

4.2 Bedeutung der Versuche zur Induktion von Prophagen

Es gibt viele Bakterienstämme, in deren Genom ein Prophage inseriert ist. Dazu zählen z.B. so verschiedene Arten wie *Desulfovibrio vulgaris* (SEYEDIRASHTI et al., 1991), *Bacillus subtilis* (FOSTER, 1993) oder auch *Escherichia coli* (BÄCHI und ARBER, 1977; PIERSON UND KAHN., 1987). Diese Phagen verändern natürlich auch die genetischen Eigenschaften der Wirte. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang der temperente Bakteriophage SF6, der in das *Shigella flexneri*-Genom integriert ist (GEMSKI et al., 1975). Er ist verantwortlich für eine Umwandlung der Serotypen, bei der eine O-Acetylierung einer Rhamnose im O-Antigen erfolgt (CLARK et al., 1991). Um zu untersuchen, ob auch in *E. coli* 21701 ein temperenter Prophage in das Genom integriert ist, wurde mit Hilfe von UV-Licht Bestrahlung und alternativ durch Zugabe von Mitomycin C eine Induktion dieses Prophagen versucht (☞ 2.2.7). Bei beiden Versuchsansätzen gelang es nicht, Prophagen zu induzieren (☞ 3.3). Da in Parallelversuchen der in das Genom von *Escherichia coli* 3279 inserierte Phagen P1 induziert werden konnte, war sichergestellt, dass die angewandten Methoden wirksam waren. So ist das Gen für die O-Acetyltransferase wohl nicht von einem intakten Phagen kodiert, was die Suche nach dem Gen erleichtert hätte, wenn natürlich auch weiterhin die Möglichkeit besteht, dass das Phagenom schon soweit degeneriert ist, dass eine Ausbildung eines kompletten Bakteriophagen (Hüllproteine + DNA) gar nicht mehr möglich ist.

4.3 Beurteilung der ungerichteten Mutagenese

Mit der ungerichteten Mutagenese wurde angestrebt, die postulierte Sialinsäure-spezifische O-Acetyltransferase auszuschalten. Dabei kamen drei verschiedene Methoden zur Anwendung.

Es wurde ein Transposon verwendet, da diese als das am häufigsten verwendete und vielseitigste Werkzeug für die genetische Analyse von Bakterien gelten (LORENZO und TIMMIS, 1994). Sollte durch die vorhandenen Screeningsysteme

(siehe oben) ein Defekt in der O-Acetylierung der Sialinsäuren detektiert werden können, wäre ein Auffinden des eingesetzten Transposons über Hybridisierungsexperimente sehr leicht möglich gewesen, da dessen Sequenzen bekannt waren. Durch Sequenzierungen der flankierenden Bereiche hätte zunächst eine Teilsequenz des ausgeschalteten Gens ermittelt werden können, deren vollständige Aufklärung dann über Datenbankanalyse und weitere Hybridisierungsexperimente relativ einfach gewesen wäre. Durch Verwendung des Transposons wurden 5×10^6 erzeugt. Obwohl eine Transposonmutagenese zur Ausschaltung von LPS-Biosynthesgenen durchaus möglich ist, wie z.B. von WARD und MANNING (1989) oder STROEHER et al. (1997) gezeigt werden konnte, war es durch Transposonmutagenese nicht möglich, in der O-Acetylierung der Sialinsäuren defekte Klone zu erzeugen (☞ 3.2.1). Weiterhin wurde auch mit einem Insertionselement (ISS1) gearbeitet, das ebenfalls wie ein Transposon seine Transpositionsfunktionen selbst kodiert (GALAS und CHANDLER, 1989). Ein Vorteil dieser IS-Elemente ist ihre geringe Größe, die sie in die Lage versetzen, auch in schwerer zugängliche DNA-Bereiche integrieren zu können. Mit Hilfe des IS-Elementes wurden 5×10^4 Klone hergestellt. Es gelang aber auch mit dieser Methode nicht, in der O-Acetylierung der Sialinsäure defekte Klone zu erzeugen (☞ 3.2.2).

Berücksichtigt man die ca 5000 Protein-codierenden Gene, die in einem *Escherichia coli* K 12 vorhanden sind (BLATTNER et al., 1997), kann davon ausgegangen werden, dass rein statistisch gesehen, bei beiden Methoden jedes Gen mehrmals hätte ausgeschaltet werden müssen.

Als dritte Alternative wurde eine Bestrahlung der Bakterien mit UV-Licht durchgeführt, da bekannt ist, dass diese Behandlung zu einer partiellen Zerstörung der DNA führt (KELLEHER und RALEIGH, 1995). Mit Hilfe dieser Methode wurden ebenfalls mehr als 10^4 Klone erzeugt und es gelang tatsächlich mit dem mPAS-Test Mutanten zu detektieren, die in der O-Acetylierung scheinbar defekt waren (☞ 3.2.3). Diese Ergebnisse konnten aber in den weiteren Tests nicht verifiziert werden. Dieser Befund war ein weiteres Indiz dafür, dass der milde Schiffbasen-Test für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit nicht geeignet war (☞ 4.2).

Es besteht nach wie vor die Möglichkeit, dass es sich nicht um ein Enzym, sondern um zwei Enzyme handelt, die für die di-O-Acetylierung der N-Acetylneuraminsäure verantwortlich sind. Somit könnte ein Ausfall eines Enzyms von dem anderen Enzym kompensiert werden und es könnte dann z.B. zu einer Migration der O-Acetylgruppe von C-7 nach C-9 kommen, wie es für eucaryotische Systeme auch beschrieben wird (KAMERLING et al., 1987). Anschließend würde an C-7 erneut eine O-Acetylgruppe ligiert werden. Da mittels einer Translokation eines springenden Gens wie Transposon oder IS-Element lediglich ein Gen ausgeschaltet werden kann, ist es beim Vorhandensein zweier Enzyme nicht möglich, die O-Acetylierung zu inhibieren. Gleiches gilt für den Fall eines vorhandenen „schlafenden Gens“, dass bei Verlust des normalerweise aktiven Gens dieses ersetzen könnte.

Weiterhin wäre es zumindest denkbar, dass das für die O-Acetylierung verantwortliche Gen für die Bakterien so essentiell ist, dass eine Zerstörung dieses Gens zu einer nahezu vollständigen Inhibition des Wachstums der Zelle führt. Wenn diese also gar nicht erst wachsen, könnten sie auch nicht als Defekt-Mutanten erkannt werden.

Bei DNA-Zerstörungen, die durch UV-Licht hervorgerufen werden, besteht auch die Möglichkeit, dass die sogenannte „SOS-DNA-Reparaturantwort“ angeschaltet wird und dadurch das ausgeschaltete Gen wieder repariert werden kann (THOMS und WACKERNAGEL, 1982; HIOM et al., 1991; KELLEHER und RALEIGH, 1995).

Da alle bisherigen Strategien nicht zu der erhofften Defektmutante geführt hatten, wurde im Folgenden eine zielgerichtete Mutagenese durchgeführt.

4.4 Detektion eines O-Acetyltransferase ähnlichen Gens

Für die gerichtete Mutagenese war es zunächst erforderlich, ein O-Acetyltransferase-ähnliches Gen zu detektieren, das ausgeschaltet werden sollte. Dazu stand in der Literatur ein Alignment von bereits bekannten O-Acetyltransferasen zur Verfügung (SLAUCH et al., 1996). In diesem Alignment wurden die Enzyme verschiedenster Organismen wie *Legionella pneumophila*, *Salmonella typhimurium*, der *Shigella flexneri*-Phage SF6, *Rhizobium leguminosarum*, *Streptomyces*-Arten und *Caenorhabditis elegans* verglichen, um homologe Abschnitte in den Proteinen zu detektieren. Ausgehend von diesen Daten wurden die Protein- und DNA-Sequenzen der im Alignment enthaltenen Bakterien aus Datenbanken zusammengestellt und auf homologe Bereiche untersucht (☞ 2.2.6.4). Dadurch konnte nur eine konservierte Region mit 6 Aminosäuren detektiert (☞ 2.2.6.4 und 3.4.1). Mit Hilfe dieser Sequenz wurde zuerst ein Genfragment und über Datenbanken ein vollständiges Gen in *E. coli* 21701 ermittelt, das diese homologe Sequenz besitzt (☞ 3.4.3, Abb. 13 und Abb. 14). Dieses Gen ist zu 100 % homolog zu einem bereits in der Datenbank beschriebenen Gen des Stammes K12 MG1655 (BLATTNER et al., 1997). Überraschenderweise besitzt das identifizierte Protein P44023 in Teilbereichen sogar große Homologien zu menschlichen Genen (☞ 3.4.3, Abb. 13). Da über deren Funktion aber noch nichts bekannt ist, kann über die Gründe für die Ähnlichkeiten auch keinerlei Aussagen getroffen werden.

Zu den im Alignment verwendeten Genen zeigt das detektierte Gen dagegen außer der Consensus-Sequenz keinerlei außergewöhnliche Übereinstimmungen. Auch bei den anderen bekannten O-acetylierenden Enzymen sind ansonsten keine weiteren größeren homologen Bereiche beschrieben (SLAUCH et al., 1996). So ist eine mögliche konservierte Region, nämlich die Bindungsstelle für Acetyl-Coenzym A bisher nicht bekannt. Einige Autoren beschreiben zwar ein mögliches Acetyl-Bindungsmotiv (LIU et al., 1995), dieses Motiv ist aber bei anderen Enzymen trotzdem nicht wiederzufinden. Hier berichten die Autoren zwar ebenfalls von einer konservierten Acetyl-Coenzym A-Erkennungssequenz, diese stimmt aber nicht mit der von LIU überein (DUNN et al., 1996). Somit kann die gefundene, nur geringe Übereinstimmung nicht als ungewöhnlich gewertet werden. Außerdem ist bei den bisher bekannten Genen auch noch keines beschrieben, das für eine Sialinsäure-spezifische O-Acetyltransferase kodiert, sondern es sind jedesmal andere Zucker, die O-acetyliert werden. So kommt als mögliche konservierte Region neben der erwähnten Bindungsstelle des Acetylgruppen-Donors eigentlich nur ein möglicherweise vorhandener Membrananker in Frage, wenn es sich denn um ein Transmembranprotein handeln sollte (SLAUCH et al., 1996). Bei dem aus der Datenbank identifizierten Protein aus *E. coli* K12 MG1655 handelt es sich tatsächlich laut BLATTNER et al. (1997) um ein möglicherweise membrangebundenes. Der durchgeführte Hydrophobizitätsplot deutete ebenfalls darauf hin, dass es sich um ein Transmembranprotein handelte, denn im gesamten Protein konnten 11 Abschnitte aufgrund ihrer hohen Hydrophobizität als mögliche Transmembrandomänen detektiert werden (☞ 3.4.3, Abb. 16). Über die Funktion des Proteins war bisher noch nichts bekannt. Da der Stamm MG1655 weder Sialinsäuren noch O-Acetylgruppen im O-Antigen besitzt, sondern im Gegenteil aufgrund einer Mutation eines O-Antigen-Biosynthesegens nicht einmal ein O-Antigen synthetisiert, war es durchaus möglich, dass dieses Gen in *E. coli* 21701 für eine Sialinsäure-spezifische

O-Acetyltransferase kodiert, denn in diesem Stamm sind ja die Voraussetzungen für eine Modifikation gegeben (O-Antigen mit integrierter Sialinsäure vorhanden). Es gibt in der Literatur gerade bei *E. coli* K12 zwei Beispiele dafür, dass die für die O-Acetylierung verantwortlichen Gene vorhanden sind, aber aufgrund des fehlenden Substrates keinerlei Funktion haben. So konnte für zwei Stämme gezeigt werden, dass nachdem in *E. coli* K12 die O-Antigen-Biosynthesegene anderer Bakterien kloniert worden waren, die Rhamnose des neu entstandenen O-Antigens auch O-acetyliert wurde, wobei das Gen für diese Modifikation mit Sicherheit aus *E. coli* selbst stammte (YAO et al., 1992; STEVENSON et al., 1994).

Um zu überprüfen, welche Funktion das Protein letztendlich in *E. coli* 21701 hatte, wurde es mit Hilfe der homologen Rekombination ausgeschaltet (☞ 2.2.8.4).

4.5 Auswirkungen der homologen Rekombination

Bei der homologen Rekombination wird ein Gen zielgerichtet mit Hilfe eines temperatursensitiven Plasmids mit einer darin enthaltenen, zu diesem Gen homologen Sequenz ausgeschaltet (☞ 2.2.8.4). In der Literatur sind einige Werkzeuge wie Cosmide, Bakteriophagen oder Plasmide für die homologe Rekombination beschrieben (GUTTERSON und KOSHLAND, 1983; HAMILTON et al., 1989; MURPHY, 1998), allerdings sind für viele dieser Vektoren bestimmte genetische Voraussetzungen, wie z.B. ein Defekt in der DNA Polymerase I nötig. Da es sich bei *E. coli* 21701 um keinen typischen „Laborstamm“ handelte, ist über die genetischen Voraussetzungen nichts bekannt. Darum wurde entschieden, den Vektor pG⁺h9 zu verwenden, da der zu mutierende Stamm dann keinerlei besondere genetische Voraussetzungen erfüllen mußte. Von diesem Plasmid war bekannt, dass es zwar hauptsächlich bei *Lactococcus spec.* verwendet wurde, in *Escherichia coli* aber ebenfalls replizieren konnte (KOK et al., 1984). Durch eine Erhöhung der Temperatur kann er zu einer Translokation in das Genom induziert werden (MAGUIN et al., 1996).

Um zu verhindern, dass aufgrund von Homologien des gewählten Zielfragmentes (☞ 2.8.4 und 3.5.1) zu anderen *E. coli* Genen eine Insertion des Plasmides an einer ganz anderen Stelle als der gewünschten erfolgte, wurde in der Datenbank nach Homologien der eingesetzten Zielsequenz zu anderen Genen gesucht. Dabei zeigte sich, dass die ausgewählte Sequenz wirklich nur zu dem einen auszuschaltenden Gen homolog war (☞ 3.5.1).

Nach der Translokation wurden mit einigen ausgewählten Klonen zur Kontrolle eine PCR durchgeführt. Die Ergebnisse machen deutlich, dass die Insertion in das Genom zu 80 % erfolgreich verlaufen war (☞ 3.5.2, Abb. 20). Aufgrund der gewählten Bedingungen der PCR konnte eine Amplifikation nur erfolgreich verlaufen, wenn keine Translokation stattgefunden hatte, denn das Produkt aus Gen und Vektor pG⁺h9::Zielsequenz konnte aufgrund seiner Größe bei einer Kettenverlängerungszeit von 2 min nicht amplifiziert worden sein. Solch eine hohe Zahl an erfolgreichen Translokationen sind bei diesen Experimenten nicht außergewöhnlich, sondern eher die Regel (GUTTERSON und KOSHLAND, 1983; TRIPODI et al., 1990; MULKS und BUYSSE, 1995).

Für die Untersuchungen auf einen Defekt in der O-Acetylierung wurden die erhaltenen Klone dann ausplattiert und mit dem Antikörper OAc12 Bindungstests durchgeführt. Anhand der dargestellten Ergebnisse wird deutlich, dass der Antikörper zu über 95 % nicht mehr an die erhaltenen Klone binden konnte (☞ 3.5.2, Abb. 21a). Da eine Mutante vermehrt und ausplattiert wurde, von der sicher war, dass eine Translokation erfolgt war, mußte davon ausgegangen werden, dass bei dem einen

Klon, der an den Antikörper band, das Plasmid wieder aus dem Genom herausgelöst worden war.

Um die Ergebnisse der Antikörper-Bindungstests zu verifizieren, wurden die erhaltenen Klone mit Hilfe des mPAS-Tests (☞ 2.2.4.2) untersucht. Die Rotfärbung war bei allen Klonen, die nicht vom Antikörper erkannt worden waren, sehr deutlich. Da der Test so gewählt worden war, dass nur Neu5Ac angefärbt werden sollte, war das Ergebnis eine Bestätigung der Antikörper-Bindungstests. Zusätzlich verdeutlichte der eine Klon, der eine Antikörperbindung aufwies, den Unterschied im Färbeverhalten des Schiffbasen-Tests. Er war viel schwächer erkennbar, als alle anderen Klone (☞ 3.5.2; Abb. 21b). Somit schien bewiesen, dass es sich bei den Klonen um in der O-Acetylierung der Sialinsäuren defekte Mutanten handelte. Eine endgültige Gewissheit sollten Untersuchungen mit NMR geben. Die NMR-Analyse ergab aber, dass nicht nur die O-Acetylgruppe, sondern auch die anderen Komponenten des O-Antigens nicht mehr vorhanden waren (☞ 3.5.2, Abb. 22). Vergleicht man die Daten des Wildtyps (Abb. 22b) mit denen der Mutante KO1 (Abb. 22a), erkennt man ein vollständiges Fehlen aller vorher vorhandenen Signale des O-Antigens. Das Signal bei 1,89 ppm ist lediglich eine bei der Präparation aufgetretene Verunreinigung. Diese Resultate konnten auch mittels eines SDS-PAGE bestätigt werden. Die Abb. 23 lieferte das typische Bandenmuster einer R-Mutante, der das komplette O-Antigen fehlt, wie es in der Literatur beschrieben ist (PALVA und MÄKELÄ, 1980; ALEXANDER und VLAVANO, 1994).

Die Ausschaltung der kompletten O-Antigen Biosynthese ist gerade bei *E. coli* nicht unbekannt. Schon bei *E. coli* K12 konnte gezeigt werden, dass durch die Insertion des IS-Elementes IS5 kein O-Antigen mehr gebildet wird (LIU und REEVES, 1994). Wie in diesem Fall, muß auch durch die Ausschaltung des Gens von *E. coli* 21701 ein für die Biosynthese essentielles Gen zerstört worden sein. Betrachtet man diese Biosynthese und die des kompletten Lipopolysaccharides, kommen einige Gene dafür in Frage:

- 1) Die Biosynthese des O-Antigens beginnt durch einen enzymkatalysierten Transfer des ersten Zuckers (bei *E. coli* 21701 *N*-Acetyl-Galaktosamin) auf Undecaprenol Phosphat (JANN und JANN, 1984; RICK et al., 1985; MEIER-DIETER et al., 1990). Bei *E. coli* 21701 wäre dieser Transfer katalysiert durch eine UDP-GalNAc:undecaprenyl phosphat GalNAc-1-Phosphat Transferase. Ist das für dieses Enzym katalysierende Gen ausgeschaltet, kommt es wie z.B. bei *E. coli* O7 zu einem Verlust des O-Antigens, während die Biosynthese des Kernbereiches davon unberührt bleibt (ALEXANDER und VALVANO, 1994).
- 2) Anschließend wird durch verschiedene Glykosyl-Transferasen die O-Antigen-Untereinheit (= repeating unit) an der cytoplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran synthetisiert. Sollte eines der dafür codierenden Enzyme ausgeschaltet worden sein, wäre die Synthese des O-Antigens ebenfalls inhibiert.
- 3) Das vollständig synthetisierte Tetrasaccharid wird dann durch die Cytoplasmamembran zur periplasmatische Seite transferiert. Für diesen Transport wird inzwischen ein bestimmtes Enzym, die Flippase postuliert (LIU et al. 1996). Ein Defekt in dem für dieses Protein codierenden Gens würde ebenfalls zu einem Verlust des O-Antigens führen.
- 4) Im Periplasma erfolgt dann die Polymerisation der „repeating units“ durch eine O-Antigen-Polymerase, kodiert vom Gen *rfc* oder nach der neuen Nomenklatur von REEVES et al. (1996) von *wzy*. Es ist nicht ausgeschlossen, dass eine Inhibition dieses Gens ebenfalls in der NMR-Analyse wie eine R-

Mutante wirkt, da ja lediglich ein Tetrasaccharid vorhanden sein kann. Dieses zu detektieren wäre sehr schwierig.

- 5) Bei der LPS-Synthese wird jetzt als letzter Schritt die fertige O-Antigen-Kette an den ebenfalls fertig synthetisierten Lipid A-Kernregion-Anteil ligiert. Das Gen *rfaL* (neu: *waal*) der dafür verantwortlichen Ligase ist ebenfalls ein potentielles Ziel, wenn man versuchen würde, eine R-Mutante zu erzeugen.

Welches dieser Gene tatsächlich durch die homologe Rekombination mit dem Vektor pG+h9::Zielsequenz ausgeschaltet worden war, ist in dieser Arbeit nicht zu eruieren, weil es keinerlei homologe Bereiche zu den bereits bekannten O-Antigenbiosynthesegenen aufweist. Somit handelt es sich um ein bisher unbekanntes Gen.

Aufgrund der Tatsache, dass mit dem Homogenat der Mutante CKO1, die ja das entsprechende Gen überexprimiert (☞ 3.6), keine erhöhte Inkorporation von Ac-CoA gegenüber dem Wildtyp detektiert werden konnte (☞ 3.7.3), kann nahezu ausgeschlossen werden, dass das ausgeschaltete Gen auch zusätzlich für eine O-Acetyltransferase-Aktivität kodierte.

4.6 Komplementation zur Wiederherstellung des Lipopolysaccharides

Für diese Arbeit war es wichtig, sicherzustellen, dass auch das gewünschte Gen (☞ 3.4.3, Abb. 14b) ausgeschaltet wurde. Um diesen Beweis antreten zu können, wurden Komplementationsexperimente durchgeführt. Dabei sollte durch Expressionsklonierung das zerstörte Gen wieder in die Mutante KO1 (☞ 3.4.3) eingeschleust und nach der Translation durch das exprimierte Protein das Lipopolysaccharid wieder rekonstituiert werden (☞ 2.2.5.4). Expressionsklonierung ist ein sowohl in eucaryotischen wie auch in procaryotischen Systemen häufig verwendetes Verfahren, um die Funktionen bestimmter Gene zu detektieren (ECKHARDT et al., 1996; SHI et al., 1998; ZOU et al., 1999).

Bei der Expressionsklonierung wurde das Gen in den Vektor pKK223-3 kloniert. Nachdem der Vektor mit integriertem Insert in die Mutante KO1 transformiert worden war, wurde durch Zugabe von IPTG die Expression induziert. Bereits eine Stunde später war in einem SDS-PAGE vom Zellhomogenat des Klonen CKO1 eine außergewöhnlich deutliche Bande zu detektieren, die in dieser Stärke weder beim Wildtyp noch bei der Mutante KO1 vorhanden war (☞ 3.6.1, Abb. 24). Da die Größe von ungefähr 50 kDa der erwarteten Größe eines aus 513 Aminosäuren bestehenden Proteins entspricht, konnte davon ausgegangen werden, dass es sich hier um das gewünschte Protein handelte.

Nachdem sicher war, dass das Protein exprimiert wurde, galt es zu untersuchen, ob auch das LPS wieder rekonstituiert wurde. Da solche LPS-Rekonstitutionen schon mehrfach bei verschiedenen Bakterien mit Erfolg durchgeführt werden konnten (HEUZENROEDER et al., 1989; KLENA und SCHNAITMAN, 1993; MORONA et al., 1995, STROEHER et al., 1997), bestand die Möglichkeit, dass das O-Antigen wieder synthetisiert werden würde, obwohl das eingeführte Gen nicht zusammen mit den anderen O-Antigen Biosynthesegenen im *rfb*- (neu: *wb**) Gencluster lokalisiert war (VERMA et al., 1988; MAROLDA und VALVANO, 1993; JAYARATNE et al., 1994).

Bindungstests mit dem Antikörper OAc20 (☞ 3.1.4.3) an auf Nitrocellulose geblottete Kolonien zeigten auch wieder eine Bindungsaktivität des Antikörpers an (☞ 3.6.2 Abb. 25), die bei der Mutante KO1 nicht mehr vorhanden war (☞ 3.5.2 Abb. 21a).

Auf einen zusätzlichen Test durch die Schiffbasen Reaktion wurde verzichtet, da inzwischen klar war, dass durch dieses System keine klare Aussage getroffen werden konnte (☞ 4.2).

So wurde das LPS des erhaltenen Klons CKO1 zunächst über ein SDS-PAGE analysiert (☞ 3.6.2, Abb. 26). Aus der Abbildung geht deutlich hervor, dass das für das O-Antigen des Wildtyps (Bahn 3 und 4) typische Bandenmuster bei *E. coli* CKO1 wieder vorhanden war (Bahn 1 und 6). Die Mutante KO1 lieferte dagegen ein stark verändertes Muster (Bahn 2 und 5). Dies deutete wie der Antikörpertest auf eine erfolgreiche Komplementation hin.

Letztendlich konnte aber nur mit einer NMR-Analyse aufgeklärt werden, ob die Rekonstitution des LPS' erfolgreich war. Die Abb. 27 (☞ 3.6.2) beweist, dass die O-Antigen-Struktur vollständig wiederhergestellt werden konnte. Betrachtet man die erhaltenen Peaks, ist kein Unterschied zwischen Wildtyp (Abb. 27b) und Mutante CKO1 (Abb. 27a) festzustellen. *N*-Acetylgalaktosamin ist ebenso wie Sialinsäure, sowie deren 7-, und 9-*O*-acetylierte Form, zu detektieren.

Damit war bewiesen, dass das über konservierte Bereiche detektierte Gen (☞ 3.4) durch homologe Rekombination ausgeschaltet werden konnte. Allerdings handelte es sich bei diesem Gen nicht nur um das für die Sialinsäure-spezifische *O*-Acetyltransferase, sondern um ein anderes Gen, das aber zumindest in die Biosynthese des O-Antigens involviert sein muß, wie durch die oben dargestellten Experimente gezeigt werden konnte.

4.7 Enzymatischer Nachweis der Sialinsäure-spezifischen *O*-Acetyltransferase

Der Mechanismus der *O*-Acetylierung von Sialinsäuren im LPS von Bakterien ist ebenso wie die Lokalisation des Enzyms noch ungeklärt. Aus diesem Grund wurden Versuche konzipiert, um über die „Enzymatik“ der *O*-Acetylierung mehr Informationen zu erhalten. In den Experimenten wurden entweder native Zellen verwendet oder es wurde Zellhomogenat eingesetzt. Zur Gewinnung des Homogenats wurden die Bakterien zunächst mit Glasperlen aufgeschlossen, später erfolgte die Zerstörung der Zellwand mit Lysozym (☞ 2.2.9).

Freie, *O*-acetylierte Sialinsäuren. Da die Möglichkeit bestand, dass die Modifikationen bereits in einem sehr frühen Stadium der O-Antigen-Biosynthese stattfand, wurde versucht, freie, bereits *O*-acetylierte Sialinsäuren in den Bakterien zu detektieren. Für die Isolierung wurden die Bakterien homogenisiert und das über Ionenaustauschchromatographie erhaltene Eluat (☞ 2.2.3) über HPLC analysiert (☞ 2.2.4.4). Zur Kontrolle wurde ein Teil der Probe verseift (☞ 2.2.4.1) und ein weiterer Teil mit zum Abbau von Neu5Ac mit Lyase inkubiert (☞ 2.2.5.1). Sollte es sich bei den detektierten Peaks um Neu5AC handeln, müßten diese durch die Lyasebehandlung zumindest degradiert, wenn nicht sogar komplett entfernt werden können. Modifizierte Sialinsäuren sind für Lyasen ein schlechteres Substrat, so dass sie nur in einem geringeren Maße degradiert werden würden. Peaks, die anhand des Standards als *O*-acetylierte Sialinsäuren identifiziert würden, müßten nach einer Verseifung der Proben vollständig abgebaut werden. In diesem Fall müßte zusätzlich die Menge an Neu5Ac proportional zum Abbau der *O*-Acetylierung zunehmen.

Die Ergebnisse (☞ 3.7.1 Abb. 28) zeigten, dass es möglich war, Neu5Ac zu detektieren und diese Sialinsäure auch durch Lyase abzubauen (Abb. 28 b,d). *O*-acetylierte Sialinsäuren konnten hingegen nicht detektiert werden, obwohl es

zunächst den Anschein hatte, da anhand der Retentionszeiten Peaks Neu5,7Ac₂ bzw. Neu5,9Ac₂ zugeordnet werden konnten (Abb. 28 a,b). Durch eine Alkali-Behandlung der Proben konnten diese Peaks nicht degradiert werden (Abb. 28 b,c). Dies läßt nur den Schluß zu, dass es sich hier entweder um unbekannte Sialinsäuremodifikationen oder um gänzlich andere Moleküle handelte. Weil auch der Peak 1 nur partiell degradiert werden konnte, ist es auch hier möglich, dass hier noch eine weitere, in der HPLC nicht von Sialinsäure zu unterscheidende Komponente enthalten ist. Da für eine di-O-acetylierte Sialinsäure kein Standard zur Verfügung stand, ist die Detektion dieses Zuckers nicht möglich. Die Retentionszeit dieser Neu5,7,9Ac₃ ist aber auf jeden Fall größer als die von Neu5,9Ac₂. Zumindest müßte eine Identifizierung aber über die Verseifung indirekt möglich sein. Bei der durchgeführten Alkali-Behandlung nahm aber der Gehalt an Neu5Ac nicht zu, somit gibt es für das Vorhandensein einer freien, bereits di-O-acetylierten Sialinsäure keinerlei Hinweise.

Acetyl-CoA als intrazellulärer Acetyl-Donor. Zu Beginn dieser Arbeit war nicht bekannt, welches Substrat als Acetylgruppen-Donor bei Bakterien fungieren konnte. Es gab lediglich eine Arbeit zur O-Acetylierung von Kapselpolysacchariden bei *E. coli* K1, in der Acetyl-Coenzym A als Substrat postuliert wurde (HIGA und VARKI, 1988). SLAUCH et al. (1996) postulierten dann zwar ebenfalls Acetyl-CoA als Donor für eine O-Acetylierung des O-Antigens von *Salmonella typhimurium*, gaben aber an, dass es für diese Hypothese keinerlei direkte Beweise gab.

Um zu überprüfen, ob Acetyl-CoA tatsächlich als Substrat verwendet werden kann, wurde radioaktiv markiertes Acetyl-CoA in die Bakterien transformiert (☞ 2.2.6.3) und versucht, die Radioaktivität im LPS zu detektieren. Die Ergebnisse zeigten zunächst, dass es möglich war, durch CaCl₂/RbCl₂-Transformation das radioaktive Material in die Zellen einzuschleusen, wobei die Menge des transformierten Acetyl-CoAs abhängig war von der Zeit, für die die Zellen zusammen mit dem radioaktiven Material inkubierten. Letztendlich war eine Inkubationsdauer von 36-48 h nötig, um genügend radioaktiv markiertes Acetyl-CoA einzuschleusen. Dieses Ergebnis läßt sich wahrscheinlich auf die Größe des zu transformierenden Moleküls zurückführen. Noch längere Inkubationszeiten führten erstens zu keiner weiteren Erhöhung der Aufnahme, da die Aufnahme des radioaktiven Materials einer Sättigungskurve folgte (☞ 3.7.2, Abb. 29) und zweitens war es für die Bakterien nach mehr als zweitägiger Inkubation in sehr hoher Zelldichte auf Eis kaum mehr möglich zu regenerieren und wieder die für die Versuche erforderliche Biosynthese zu betreiben. Auch nach einer Inkubation von 48 h dauerte es ca. 30 min, bis die Bakterienpopulation überhaupt wieder zu wachsen begann (☞ 3.7.2, Abb. 30).

Nachdem das LPS isoliert worden war, zeigte es sich, dass die Radioaktivität sowohl im Lipid-Anteil, wie auch im O-Antigen detektiert werden konnte (☞ 3.7.2). Durch Verseifung konnten 31 % von der im O-Antigen gemessenen Radioaktivität entfernt werden, was darauf hindeutet, dass es sich hier um einen Einbau der Acetyl-Gruppe in Form einer O-Acetylgruppe handeln mußte, denn N-Acetylgruppen können durch Alkali-Behandlung nicht entfernt werden.

Um die eingebaute Radioaktivität noch genauer lokalisieren zu können, wurde die interne Sialinsäure isoliert (☞ 2.2.3). Zuerst wurde die Isolierung mittels einer Säurehydrolyse und einer Perjodatoxidation versucht. Die Ergebnisse (☞ 3.7.2, Abb. 31) ergaben aber, dass eine eindeutige Zuordnung der erhaltenen Peaks zu O-acetylierten Sialinsäuren des Standards nicht möglich war. Es konnten zwar zwei Peaks aufgrund der Retentionszeiten als Neu5,7Ac₂ bzw. Neu5,9Ac₂ angesprochen werden (Abb. 31 a,b), ein Peak, der das Vorhandensein einer di-O-acetylierten

Sialinsäure anzeigte, war aber nicht zu detektieren. Die weiteren Versuche bewiesen dann auch, dass die Peaks nicht Neu5,7Ac₂ oder Neu5,9Ac₂ zugeordnet werden konnten, da sie durch Verseifung nicht degradierbar waren (Abb. 31 b,c). Da Peak 1 zumindest partiell durch Lyase-Behandlung abbaubar war (Abb. 31 b,d), konnte dieser Peak als Neu5Ac angesprochen werden. Diese Sialinsäure konnte aber nur entstehen, wenn durch die Aufarbeitung die O-Acetylgruppen abgespalten worden waren. Da es für die Versuche aber von essentieller Wichtigkeit war, dass gerade diese Gruppen erhalten blieben, schien eine Isolierung der Sialinsäure mit Hilfe dieser chemischen Methoden nicht praktikabel. Hinzu kam erschwerend, dass sehr viele weitere Peaks im Chromatogramm der HPLC-Analyse vorhanden waren (Abb. 31b), deren Zuordnung nicht getroffen werden konnte, was eine korrekte Auswertung nahezu unmöglich machte.

In einem zweiten Ansatz wurde versucht, die interne Sialinsäure mit Hilfe einer Galactosidase und einer Propionsäurehydrolyse zu isolieren. Die in Abb. 32 dargestellten Ergebnisse belegen, dass auch mit dieser Methode keine Isolierung der di-O-acetylierten Sialinsäure zu erreichen war. Das Peakmuster unterscheidet sich zwar grundlegend von dem in Abb. 31 gezeigten, eine Deutung dieser reproduzierbaren Resultate ist aber nicht möglich.

Da eine Isolierung der internen Sialinsäure mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht durchführbar war, wurde in anderen Experimenten Zellhomogenat als „Enzymquelle“ verwendet, um weitere Informationen über die Enzymaktivität zu erhalten.

Glasperlensaufschluß. Bei diesen Versuchen wurden die Zellen zunächst durch Glasperlen aufgeschlossen (☞ 2.2.9) und das erhaltene Homogenat in den verschiedenen Assays eingesetzt. Als Donor für die Acetylgruppe wurde immer ³H-Acetyl-CoA verwendet, da die oben aufgeführten Versuche belegen, dass dieses Substrat prinzipiell als Acetylgruppen-Donor fungieren konnte. Diese Erkenntnisse wurden durch Untersuchungen an *Salmonella enterica* unterstützt, bei denen ebenfalls radioaktiv markiertes Acetyl-Coenzym A für Messungen von Transferaseaktivitäten verwendet wurde (LIU et al., 1995). Um die Spezifität der Enzymaktivität zu testen, wurden verschiedene Substrate als exogene Acetyl-Akzeptoren benutzt (☞ 2.2.9). Die Ergebnisse zeigten aber, dass weder im de-O-acetylierten LPS, noch im de-O-acetylierten O-Antigen oder in verschiedenen sialylierten Gangliosiden, Sialyllactose oder freier Sialinsäure nach der Isolierung ein Einbau von Radioaktivität nachgewiesen werden konnte (☞ 3.7.3). Versuche, die Radioaktivität im endogen vorhandenem LPS nachzuweisen ergaben, dass auch in diesem natürlich vorkommenden Akzeptor keinerlei Inkorporation stattgefunden hatte.

Um zu überprüfen, ob diese Ergebnisse vielleicht darauf zurückzuführen waren, dass eine im Homogenat vorhandene Esteraseaktivität die transferierten O-Acetylgruppen sofort wieder abspaltete, wurde in einem Versuch mit einem Esteraseinhibitor (DFP) gearbeitet. Auch hiernach wurde keinerlei Radioaktivität in den exogenen Substraten nachgewiesen. Damit konnte eine Esteraseaktivität als Ursache für den nicht-Einbau ausgeschlossen werden.

Versuche zur Lokalisation des Enzyms lieferten auch keine auswertbaren Daten, da weder die Verwendung eines nach Ultrazentrifugation erhaltenen Sediments noch die Verwendung des Überstandes als Enzymquelle oder der Einsatz von Detergenzien zur Solubilisierung eines möglicherweise membrangebundenen Enzyms zu einer Inkorporation von Radiokativität führte.

Ein möglicher Grund könnte die Spezifität der verwendeten, exogenen Substraten sein, da durchaus die Möglichkeit besteht, dass keines der angebotenen Substrate das „in vivo“ verwendete ist und das Enzym aufgrund einer hohen Spezialisierung nicht in der Lage ist, andere Substrate zu erkennen, wie es bereits für *E. coli* K12 und *Salmonella enterica* gezeigt wurde (STEVENSON et al., 1994; LIU et al., 1995).

Behandlung der Bakterien mit Lysozym. Bei diesen Versuchen wurden die Zellen statt mechanisch mit Glasperlen enzymatisch mit Lysozym behandelt (☞ 2.2.9). Bei den folgenden Experimenten wurde dann der nach Zentrifugation erhaltene Überstand als „Enzymquelle“ verwendet. Als Acetylgruppen-Donor fungierte wiederum ³H-Acetyl-CoA. Die Ansätze wurden jeweils für 20 min bei 30 °C inkubiert, da Versuche zur 4-O-Acetyltransferase aus Meerschweinchenleber diese Bedingungen als optimal für dieses Enzym erwiesen hatten (IWERSEN, pers. Mitteilung). Bei der Auswertung mittels DC-Analyse (☞ 2.2.4.5 und 2.2.4.6) zeigte sich nur ein Radioaktivitäts-Peak bei einer Laufstrecke von 5,8 cm (☞ 3.7.3, Abb. 33).

Charakterisierung der Enzymaktivität. Zunächst war es wichtig herauszufinden, ob sich dieser radioaktive Peak durch eine Alkali-Behandlung abbauen ließ. Da diese Degradierung erfolgreich war (☞ 3.7.3, Abb. 34), konnte davon ausgegangen werden, dass die Acetylgruppe als O-Acetylgruppe an das unbekannte Substrat ligiert worden war, da N-Acetylgruppen durch Verseifung nicht entfernt werden können. Dies konnte auch durch Versuche mit Hydroxylamin verifiziert werden. Das aus Inkubation von Hydroxylamin mit dem Zellulosematerial (☞ 2.2.4.6) entstandene Hydroxamat konnte durch FeCl₃ nachgewiesen werden (☞ 3.8, Abb. 35, Bahn 4). Weil dieser Test als spezifischer Nachweis für O-acetylierte Sialinsäuren gilt und sogar zur quantitativen Analyse der O-Acetylierung verwendet wird (LUDOWIEG und DORFMAN, 1960; BUSCHER et al., 1974; BODE, 1994), kann er als wichtiges Indiz für eine tatsächlich erfolgte O-Acetylierung gewertet werden. N-Acetylgruppen können durch diesen Test nicht nachgewiesen werden. Durch die Kontrolle konnte zusätzlich belegt werden, dass sowohl O-acetylierte Sialinsäure, wie auch O-acetyliertes LPS prinzipiell als Donor-Substrat für die Synthese von Hydroxamat fungieren konnten.

In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass zusätzlich im Reaktionsansatz im Überschuß vorhandenes „kaltes“ Acetyl-Coenzym A als spezifischer Kompetitor fungierte, d.h. den Einbau radioaktiver Acetylgruppen kompetitierte (☞ 3.8, Abb. 35). Dies diente zusammen mit den oben schon erwähnten Ergebnissen als ein weiterer Hinweis darauf, dass *E. coli* 21701 in der Lage ist, exogenes Acetyl-CoA zu verstoffwechseln und als Donor für den Einbau von O-Acetylgruppen zu verwenden, wie es auch für eucaryotische Systeme beschrieben ist (Ogura et al., 1996; VANDAMME-FELDHAUS und SCHAUER, 1998; IWERSEN et al., 1998).

Nach einem Erhitzen des Homogenats bei gleichzeitiger Zugabe von SDS konnte keinerlei Einbau von Radioaktivität mehr detektiert werden (☞ 3.8, Abb. 34). Wenn es sich um eine rein chemische Modifikation handeln würde, hätte ein Erhitzen des Homogenats keinerlei Auswirkungen gehabt, also kann davon ausgegangen werden, dass es sich um eine enzymatische Reaktion handelt. Ein ähnliches Ergebnis lieferte ein Versuch, bei dem Homogenat verwendet wurde, das vorher für 4 Tage bei 4 °C aufbewahrt worden war. Auch in diesem Fall konnte keinerlei Inkorporation von Radioaktivität gemessen werden. Dies deutete darauf hin, dass diese Enzymaktivität doch sehr labil war, was durch Versuche mit mehrfach eingefrorenem und wieder

aufgetautem Homogenat auch bestätigt werden konnte. Bei einem zweimaligen Einfrier/Auftau -Zyklus tendierte der Einbau der Radioaktivität im Essay gegen 0 (☞ 3.8, Abb. 38).

Mit Hilfe weiterer Experimente wurde deutlich, dass sowohl der pH-Wert im Versuchsansatz wie auch die Inkubationstemperatur einen Einfluß auf die Menge an eingebautem, radioaktiv markiertem Acetylrest hatte. Diese war in einem pH-Bereich zwischen pH 6 und pH 7 am höchsten (☞ 3.8.2, Abb. 40), was sich auch mit den Befunden über die 4-O-Acetyltransferase aus Meerschweinchenleber deckt (IWERSEN, pers. Mitteilung). Für die Enzymaktivität erwies sich eine Temperatur von 37 °C als optimal (☞ 3.8.1, Abb. 39). Im folgenden sind die bisher ermittelten Eigenschaften der gefundenen Enzymaktivität noch einmal zusammengefaßt.

- 1) Durch Hitze (96 °C) und SDS (10 %) denaturierbar.
- 2) Instabil bei längerer Lagerung bei 4 °C.
- 3) Abnahme der Aktivität durch mehrfaches einfrieren und auftauen.
- 4) Temperaturabhängig (Optimum bei 37 °C)
- 5) pH-Wert abhängig (Optimum zwischen pH 6 und pH 7).
- 6) Acetyl-Coenzym A kann als Acetylgruppen-Donor fungieren.

Diese Daten müßten natürlich durch ein gereinigtes, vielleicht rekombinant hergestelltes Enzym verifiziert werden. Vielleicht wäre es dann auch möglich, zu klären, welche(s) Substrat(e) zumindest „in vitro“ als Acetylgruppen-Akzeptor fungieren können. Bei den oben beschriebenen Versuchen wurde dem Reaktionsgemisch kein exogenes Substrat zugefügt, somit mußte es sich hier um eine Inkorporation von radioaktiv markiertem Material in einen endogen vorhandenen Akzeptor handeln. Weder de-O-acetyliertes LPS, noch de-O-acetyliertes O-Antigen, GD₃ oder Neu5Ac können als Substrat angesehen werden, denn eine Zugabe dieser Substanzen zum Reaktionsansatz erhöhte den Einbau nicht (☞ 3.8). Eine Co-Migration dieser Komponenten bewies dann auch, dass die Lauflänge der radioaktiv markierten Komponente nicht mit den Lauflängen der erwähnten Substanzen korrelierte. Dies bedeutet, dass die Radioaktivität in irgendein, im Homogenat vorhandenes, endogenes Substrat inkorporierte, wobei es sich um ein Intermediat der Biosynthese des O-Antigens handeln kann, denn Experimente mit anderen Enzymen, die O-Antigenkomponenten O-acetylieren, haben gezeigt, dass nur ganz bestimmte Zwischenprodukte des O-Antigens vom Enzym erkannt und modifiziert werden können (STEVENSON et al., 1994). Somit konnten die Endprodukte der Biosynthese (O-Antigen, LPS) auch nicht als Substrat von der O-Acetyltransferase erkannt werden. Ebensowenig wird z.B. bei *Salmonella enterica* die zu modifizierende Rhamnose erkannt, wenn sie nicht an der richtigen Position der Zuckerkette eingebaut wird (LIU et al., 1995). Dies würde erklären, warum isoliertes Neu5Ac oder auch an andere Komponenten gebundene Sialinsäure (z.B. Sialyllactose, GD₃, GQ_{1b}, GT_{1b}) nicht O-acetyliert würden. Da Intermediate der O-Antigen-Biosynthese nicht zur Verfügung standen, können Aussagen über den Wahrheitsgehalt dieser Hypothese nicht gemacht werden.

Lokalisation. Die Lokalisation des Enzyms ist ebenfalls nach wie vor ungeklärt. Bei bereits bekannten Enzymen wird postuliert, dass es sich um Transmembranproteine handelt (SLAUCH et al., 1996; ZOU et al., 1999), bewiesen ist dies aber noch nicht. Die Daten, die insbesondere durch die Versuche mit durch Glasperlen aufgeschlossene Bakterien gemacht wurden, unterstützen diese Theorie, denn es

wäre neben anderen eine gute Erklärung für den nicht erfolgten Einbau von radioaktiv markierten Acetylresten. Wenn das Enzym membrangebunden ist, kann es durch den Glasperlenaufschluß geschert und zerstört worden sein. Weiterhin ist es möglich, dass für die Funktionsfähigkeit der O-Acetyltransferase ein Membrangradient (z.B. Protonen- oder Salzgradient) erforderlich ist, der sich nur bei einer intakten Membran bilden kann. Durch Lysozym wird zwar eigentlich nur die Zellwand zerstört, die Versuche zur Rekonstitution des Lipopolysaccharids zeigten aber, dass zumindest teilweise auch die Membran zerstört wird, denn sonst hätte in dem verwendeten Überstand der rekonsituierten Mutante CKO1 das überexprimierte Protein ohne Signalpeptid nicht detektiert werden können (☞ 3.6, Abb. 24). Somit kann der nachgewiesene Einbau von Radioaktivität auch durch ein Transmembranprotein katalysiert worden sein. Da auch immer noch nicht ausgeschlossen ist, dass das über die konservierte Region detektierte Protein (☞ 3.4.3, Abb. 14a) neben anderen Funktionen auch für die O-Acetylierung verantwortlich ist, lieferte der Hydrophobizitätsplot des Proteins (☞ 3.4.3, Abb. 16) weitere Hinweise. Aufgrund der hohen Anzahl möglicher Transmembrandomänen (11), ist eine Lokalisation dieses Proteins in der Membran sehr gut möglich. Auch die Tatsache, dass keine freien Sialinsäuren umgesetzt werden können, spricht gegen ein im Cytosol lokalisiertes Enzym.

4.8 Biosynthese des O-Antigens

Für die Biosynthese des O-Antigens sind bei Enterobacteriaceen zwei verschiedene Wege beschrieben, wobei der Mechanismus abhängig von der Struktur der Zuckerkette ist (SHIBAEV, 1986). Besteht das O-Antigen lediglich aus einem Homopolymer, wird die Kette durch Transfer von aktivierten Monosacchariden zum nicht-reduzierenden Kettenende verlängert. Die fertige Kette wird dann mit Hilfe eines ABC-Transporters durch die Cytoplasmamembran geschleust, mit dem Lipid A/Kernregion-Anteil ligiert und dann durch die äußere Membran zur Zellwand translociert. Dieser Biosyntheseweg gilt z.B. für die *E. coli* Serotypen O8 und O9 sowie für *Klebsiella pneumoniae* O1 und *Serratia marcescens* (KIDO et al., 1995; SZABO et al., 1995).

Ein alternativer Weg ist z.B. bekannt bei *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *E. coli* O111 und O157 (MCGRATH und OSBORNE, 1991; CURD et al., 1998; WANG et al., 1998; WANG und REEVES, 1998). Da diese Form der Biosynthese bei Bakterien beschrieben ist, deren Zucker im O-Antigen verschieden sind, kann davon ausgegangen werden, dass diese Form der Biosynthese auch bei *E. coli* 21701 (Serotyp O104) stattfindet. Hier wird, nachdem eine O-Antigen Untereinheit synthetisiert worden ist, diese mit Hilfe der Flippase durch die Cytoplasmamembran geschleust und erst im Periplasma wird die O-Unit durch eine Polymerase vom nicht-reduzierenden Ende aus vervielfältigt. Anschließend wird das fertige O-Antigen mit dem Lipid/Core-Anteil ligiert und zur Zellwand transportiert (LIU et al., 1996). Bei bereits bekannten O-Acetyltransferasen wird dabei postuliert, dass die O-Acetylierung des jeweiligen Zuckers bereits während des Aufbaus der ersten repeating unit an der Innenseite der Cytoplasmamembran erfolgt. Für *Salmonella enterica* ist sogar beschrieben, dass diese O-Acetylgruppe an einer Rhamnose wichtig für den erfolgreichen Transfer des nächsten Zuckers (Abequose) an die O-Unit ist. Somit erscheint es nur konsequent, wenn das Gen der O-Acetyltransferase direkt im für die Biosynthese des O-Antigens codierenden Gencluster lokalisiert ist (STEVENSON et al., 1994; LIU et al., 1995; SLAUCH et al., 1996). Die bisherigen

Ergebnisse weisen darauf hin, dass auch die Sialinsäure-spezifische O-Acetylierung bei *Escherichia coli* 21701 während der O-Antigen-Biosynthese stattfindet. In der folgenden Abbildung 41 ist schematisch dargestellt, wie die Biosynthese des LPS von *Escherichia coli* 21701 höchstwahrscheinlich abläuft.

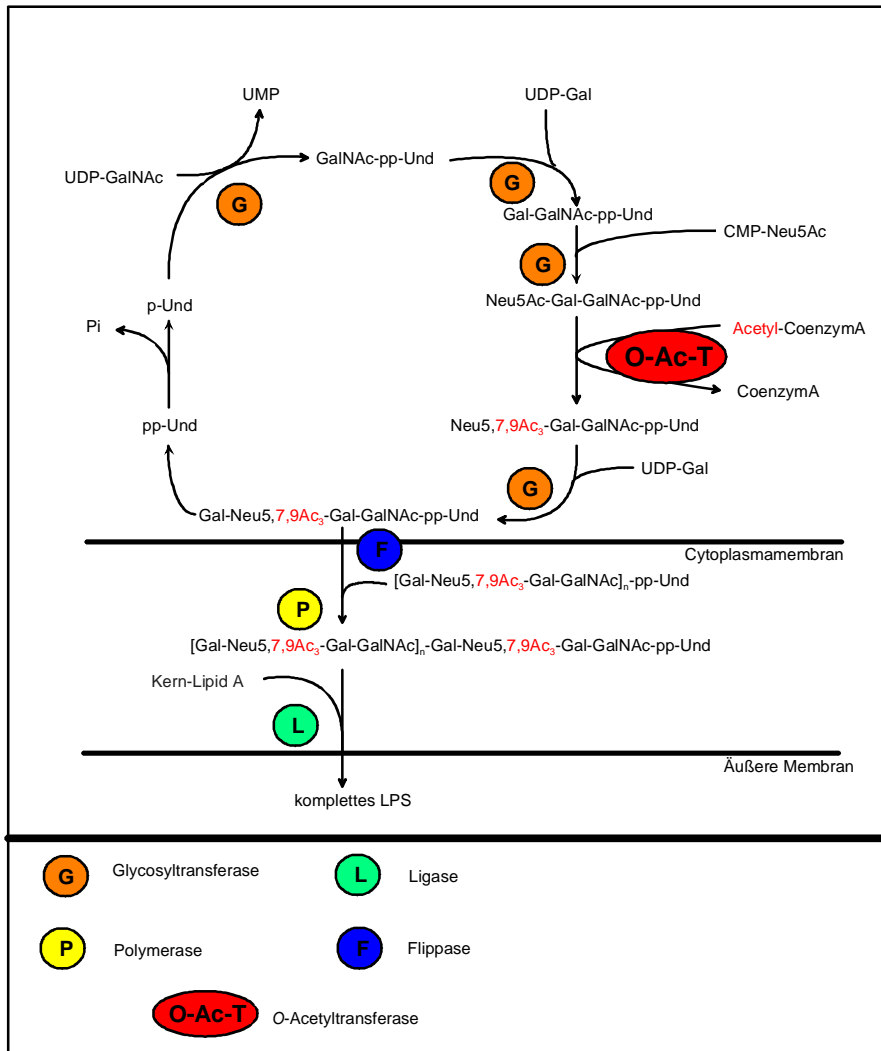


Abb. 41: Postulierter Ablauf der Biosynthese vom O-Antigen des LPS von *E. coli* 21701 (Modifiziert nach LIU et al., 1996)

4.9 Veränderung der Antigenität durch O-Acetylierung der Sialinsäuren im LPS

Das O-Antigen des Lipopolysaccharids gilt aufgrund seiner exponierten Stellung und seiner hohen Variabilität als die Struktur, die die immunologische Spezifität des Bakteriums determiniert (KEENLEYSIDE et al., 1994; XIANG et al., 1994; BYSTRICKY und SZU, 1994). Es wird sogar postuliert, dass ein Zusammenhang zwischen dem O-Serotyp und der vom Organismus verursachten Krankheit besteht (LEVINE, 1987). Die Auswirkungen der O-Acetylierung von Sialinsäuren im LPS werden aber noch kontrovers diskutiert (ØRSKOV et al., 1979; PICHICHERO et al., 1985; HIGA und VARKI, 1988; FRASA et al., 1993). Für die Untersuchungen über Veränderungen der Antigenität durch einen Verlust der O-Acetylierung der

Sialinsäuren im LPS von *E. coli* 21701 konnten die Daten herangezogen werden, die durch die Immunisierungen von Tieren zur Herstellung von Antikörpern erzeugt wurden. Zur Erzeugung polyklonaler Antikörper wurde ein Kaninchen mit O-acetylierten Bakterien und eines mit de-O-acetylierten Zellen immunisiert (2.2.5.3.1). Die Ergebnisse der Titerbestimmungen der beiden Tieren sind noch einmal in Abb. 42 gegenübergestellt.

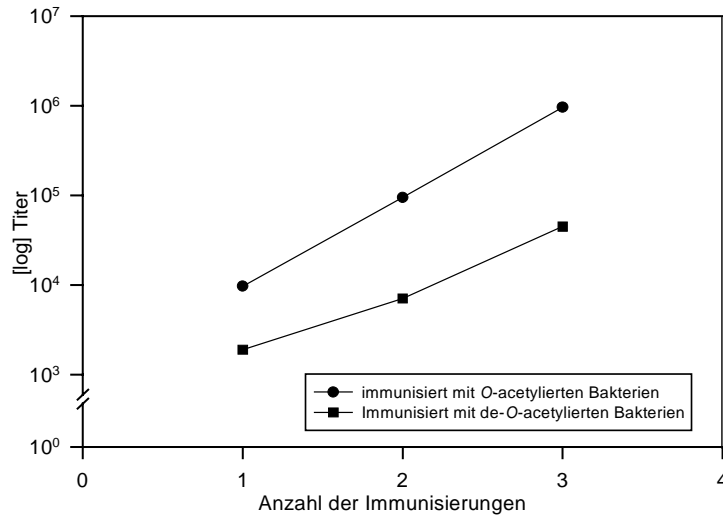


Abb. 42: Vergleich der Immunantworten der Kaninchen auf natives und de-O-acetylierte Bakterien

Aus der Abbildung wird deutlich, dass das Tier, das mit nativen Zellen immunisiert wurde, eine wesentlich stärkere Immunantwort zeigte, als das Tier, das mit verseiften (2.2.4.1) Bakterien immunisiert wurde. Während der Titer im erstgenannten Fall bereits $1 : 9,6 \times 10^5$ betrug, hatte das zweite Tier lediglich einen Titer von $1 : 4,5 \times 10^4$. Diese Ergebnisse wurden auch durch die Titerbestimmungen der Mäuse bestätigt, die zur Gewinnung monoklonaler Antikörper ebenfalls entweder mit O-acetylierten oder mit de-O-acetylierten Bakterien immunisiert worden waren (2.2.5.3.2). Die Immunantworten der Mäuse (3.1.4 Abb. 7) sind in der Abb. 43 noch einmal zusammengefaßt.

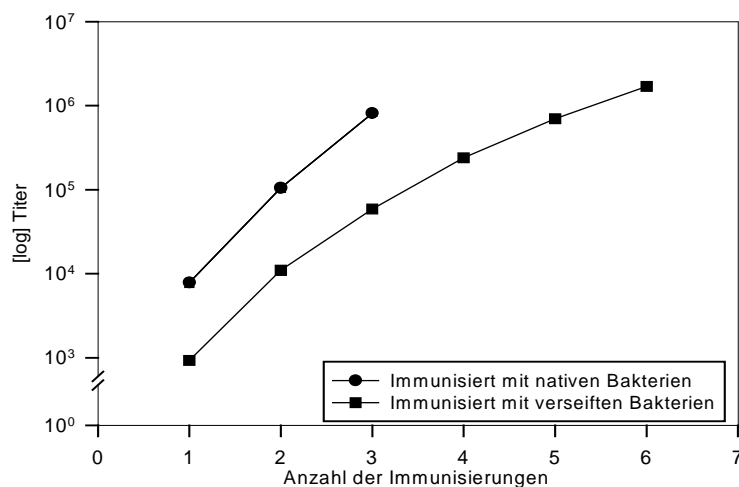


Abb. 43: Vergleich der Immunantworten der Mäuse auf native und de-O-acetylierte Bakterien

Diese Abbildung zeigt, dass die Mäuse, denen O-acetyliertes Material injiziert wurde, bereits nach drei Immunisierungen einen Titer von $1:8,1 \times 10^5$ aufwiesen, während er bei den Tieren, die mit de-O-acetylierten Zellen immunisiert wurden, lediglich bei $1:5,9 \times 10^4$ lag. Es waren hier drei zusätzliche Immunisierungen nötig, bis ein ähnlich hoher Titer ($1: 1,7 \times 10^6$) wie bei den ersteren Mäusen erreicht werden konnte.

Die Ergebnisse der Titerbestimmungen von Tieren, die mit de-O-acetyliertem Material immunisiert worden waren, verifizierten diese Ergebnisse (☞ 3.1.3, Abb. 6 und 3.1.4, Abb. 7b). Sie zeigten, dass die Titer mit O-acetyliertem und mit de-O-acetyliertem LPS als Antigen bei diesen Tieren nahezu identisch waren, was darauf hindeutet, dass gegen Neu5Ac ohne Acetylgruppen gar keine Antikörper entwickelt wurden.

Die erzielten Ergebnisse verdeutlichen, dass die O-Acetylierung der Sialinsäuren im LPS einen erheblichen Einfluß auf die Antigenität hat. Im Gegensatz zu *Neisseria meningitidis* Gruppe C, bei der festgestellt wurde, dass 85 % aller krankheitserregenden Isolate eine O-Acetylierung an C-9 der die Kapsel bildenden Sialinsäuren aufweisen (ARAKERE und FRASCH, 1991), konnte ein Einfluß auf die Virulenz von *E. coli* nicht nachgewiesen werden, denn alle Mäuse, die immunisiert worden waren, zeigten keinerlei Krankheitserscheinungen. Diese Erkenntnisse decken sich mit Daten von *Salmonella typhimurium*. Eine O-Acetylierung der im LPS vorkommenden ABequose hat bei diesem Stamm ebenfalls keinerlei Einfluß auf die Virulenz (SLAUCH et al., 1995). Allerdings wird auch hier ein großer Einfluß der O-Acetylgruppe auf die Immunantwort beschrieben.

Es bleibt festzuhalten, dass die O-Acetylgruppe von *E. coli* 21701 zwar eine große Rolle als antigene Determinante spielt, für die Pathogenität allerdings ohne Auswirkungen bleibt. Dabei ist allerdings auch zu bedenken, dass es sich hier nicht um einen potentiell pathogenen Stamm handelt, sondern er aus dem Stuhl eines gesunden Menschen isoliert wurde (KNIPSCHILDT, 1945). Somit kann eine Aussage über die Pathogenität von O-Acetylgruppen an Sialinsäuren in dieser Arbeit nicht gemacht werden.

4.10 Bedeutung der O-Acetylierung für die Adhäsion von Bakteriophagen

Das Lipopolysaccharid, und dabei speziell das sehr exponierte O-Antigen, hat bei Bakterien eine sehr wichtige Funktion als Rezeptor, z.B. von Lektinen (WOLPERT und ALBERSHEIM, 1976; MANDAL et al., 1997; FRAGKIADAKIS et al., 1997). Bakteriophagen nutzen diese Rezeptorfunktion und verwenden das LPS als Erkennungs- und Anheftungsmolekül. Dabei können schon kleine Unterschiede in der Struktur des O-Antigens von den Phagen erkannt oder eben nicht erkannt werden (GOLDMAN und LEIVE, 1980). Da die O-Acetylierung der Sialinsäuren im Lipopolysaccharid von *E. coli* 21701 auch eine Veränderung der von Phagen erkannten Struktur darstellt, war es von Interesse, herauszufinden, ob eine de-O-Acetylierung zu einer Veränderung des Bakteriophagenspektrums führt.

Für diese Versuche wurde aus Klärwerken Bakteriophagenmaterial gesammelt und in einzelne Isolate getrennt (☞ 2.1.10). Mit einem Gemisch dieser Phagen wurden Mäuse immunisiert und Antikörper gegen die einzelnen Isolate erzeugt (☞ 2.2.5.3.3).

Die Ergebnisse zeigten, dass es gelungen war, sowohl Antikörper gegen das Bakteriophagengemisch, wie auch gegen einzelne Phagen zu gewinnen (☞ 3.9). Mit Hilfe dieser Antikörper wurden dann Bindungstests durchgeführt, um zu prüfen, ob die verschiedenen Isolate in der Bindung an O-acetyliertes oder de-O-acetyliertes LPS differierten (☞ 2.2.10).

Durch die ELISAs konnte bewiesen werden, dass es unter den vierzig getesteten Isolaten tatsächlich zu unterschiedlichen Bindungsspezifitäten an die LPS-Formen gekommen war (☞ 3.9, Tab. 5). Zur Verdeutlichung ist eine Auswahl der Phagen mit unterschiedlicher Bindungsaktivität in Abb. 44 dargestellt.

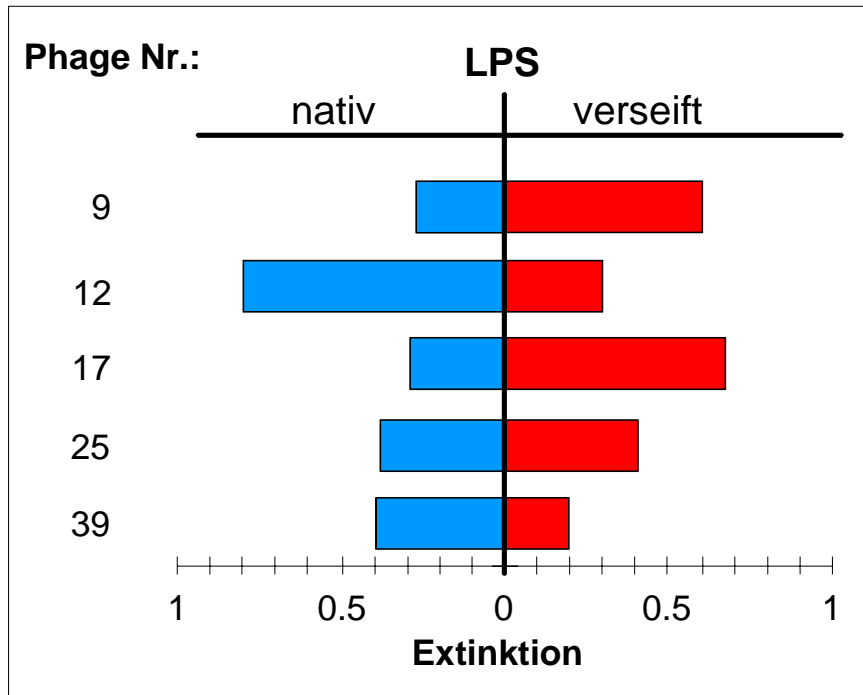


Abb. 44: Relative Bakteriophagenadhäsion an natives und verseiftes LPS

Das Bakteriophagenmaterial wurde aus Belebtschlammbecken verschiedener Klärwerke isoliert (☞ 2.2.1.10). In einem ELISA wurden O-acetyliertes und durch Verseifung de-O-acetyliertes LPS (☞ 2.2.4.1) als Ligand verwendet. Die Bindung wurde mit einem gegen die Phagen gerichteten Antikörper-Serum (☞ 2.2.5.3.3), einem sekundärem Anti-Maus-Antikörper und dem Substrat ABTS bei einer Wellenlänge von 405 nm detektiert. Zu beachten ist, dass es sich bei den angezeigten Werten lediglich um eine relative Adhäsion handelt und nicht um absolute Werte.

Interessant bei diesen Ergebnissen ist die Tatsache, dass 22,5 % der Isolate stärker an de-O-acetyliertes LPS binden konnten, während nur 10 % stärker an natives LPS banden. Wenn man auch zugestehen muß, dass diese Untersuchungen noch durch weitere Daten verifiziert werden müssen, so läßt sich doch anhand dieser Ergebnisse ablesen, dass das native und damit O-acetylierte Bakterium scheinbar durch diese spezielle Modifikation der Sialinsäure im LPS relativ gut vor „Angriffen“ von Bakteriophagen geschützt ist. Dies würde natürlich auch einen Sinn ergeben, denn es scheint kaum vorstellbar, dass so ein kleiner Organismus, der mit seinen Energiereserven sicherlich sparsam umgehen muß, zusätzliche Arbeit verrichtet, indem er seine LPS-Struktur modifiziert, ohne davon einen Vorteil zu erhalten.

Da Bakteriophagen in der Regel lytisch sind, d.h. ihren Wirt nach erfolgter Vermehrung lysieren und damit töten, hat der Stamm 21701 mit der Sialinsäuremodifikation eine gute Verteidigungsstrategie entwickelt. Auf der anderen Seite kann die Zelle aber auch von temperenten Phagen schlechter erkannt werden. Damit verhindern die Bakterien den über diese Phagen stattfindenden Gentransfer, was eigentlich ein Selektionsnachteil ist.

4.11 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit führten zu neuen Erkenntnissen über die bakterielle Sialinsäure-spezifische O-Acetylierung und stellen eine Grundlage für weitere Untersuchungen an diesem Enzym dar. Zum ersten ist es gelungen, nachzuweisen, dass es sich bei der O-Acetylierung um eine enzymatische Reaktion und nicht um einen rein chemischen Prozeß handelt. Denn ein pH-Optimum, sowie die Empfindlichkeit gegenüber höheren Temperaturen, SDS und mehrfachem Einfrieren weisen auf die enzymatische Natur der Reaktion hin. Die Grundbedingungen für einen „in vitro“-Enzym-Essay sind jetzt ebenfalls bekannt. Als Donor für die Acetylgruppe kann Acetyl-Coenzym A verwendet werden und der Nachweis der entstandenen Produkte ist über Dünnschichtchromatographie möglich. Mit Hilfe dieses Testsystems sowie der spezifisch an das O-acetylierte O-Antigen bindenden Antikörper, die in dieser Arbeit vorgestellt wurden, stehen gute Werkzeuge zum Nachweis der O-Acetylierung zur Verfügung.

Sicherlich wäre es notwendig oder zumindest hilfreich, wenn für den Enzymtest die Intermediate der Biosynthese vom O-Antigen (Und-PP-GalNAc-Gal-Neu5Ac und Und-PP-GalNAc-Gal-Neu5Ac-Gal) zur Verfügung stehen würden. Damit wäre es möglich, die Enzymspezifität und -aktivität noch genauer zu charakterisieren.

Auf der anderen Seite ist zwar das Gen für die Sialinsäure-spezifische O-Acetyltransferase noch nicht identifiziert, für dessen Lokalisation im *wb** (*rfb*)-Gencluster sprechen aber sehr viele Argumente. Wenn es mit Hilfe von Consensus-Sequenzen, wie hier gezeigt, nicht möglich ist, das gesuchte Gen zu detektieren, bleibt noch die Möglichkeit, das komplette Gencluster zu sequenzieren. Da mit hoher Wahrscheinlichkeit im Rahmen dieser Arbeit ein Gen der O-Antigen-Biosynthese identifiziert ist, ist der Einstieg für weitere Sequenzierungsarbeiten bereits erfolgt. Dabei sollte es möglich sein, ähnlich wie bei *E. coli* O111 (WANG et al., 1998), einige Gene zu detektieren, die spezifisch für den hier untersuchten Stamm sind, während der überwiegenden Zahl der Sequenzen aufgrund von Homologien bereits eine Funktion zugeordnet werden könnte. Die unbekanntenen Gene könnten dann durch die in dieser Arbeit etablierte homologe Rekombination ausgeschaltet und mit Hilfe der oben beschriebenen Systeme analysiert werden.

Bei den Untersuchungen zur ökologischen Bedeutung zeigten 10 % der aus Klärwerken isolierten *E. coli*-Phagen eine signifikantere Bindung an natives LPS, während 22,5 % die verseifte Form preferierten. Diese Untersuchungen speziell zum Bakteriophagenspektrum sollten natürlich mit einer Defektmutante fortgesetzt werden, um die Ergebnisse zu verifizieren. Mit dem in dieser Arbeit etablierten Assay sind diese Untersuchungen sehr schnell und effektiv durchzuführen.

Mit Hilfe des letztendlich erhaltenen bakteriellen Gens für die Sialinsäure-spezifische O-Acetyltransferase könnte dann auch versucht werden, die langersehnten eucaryotischen Gene zu finden, von denen nach wie vor keines gezielt kloniert werden konnte. Darum sollte der Schwerpunkt der nachfolgenden Arbeiten in der Aufklärung des LPS-Synthese-Genclusters liegen.

5 Zusammenfassung

Die wichtigste Voraussetzung für diese Arbeit war es, ein zum Screening der zu erzeugenden Defekt-Mutanten geeignetes System zu etablieren. Dabei erwies sich das ursprünglich zur Verfügung stehende Verfahren (mPAS-Test), bei dem chemisch eine Anfärbung von de-O-acetylierten Klonen erfolgen sollte, als nicht geeignet. Darum wurde versucht, mit Hilfe einer Phagemid-Epitop-Bibliothek spezifisch an O-acetyliertes oder de-O-acetyliertes LPS bindende Phagen anzureichern und diese dann wie Antikörper einzusetzen. Obwohl dieses System als schnell, effizient und besonders für die Detektion kleiner Epitope geeignet beschrieben ist, gelang es nicht, Phagemide zu isolieren, deren Epitope eine spezifische Bindung an eines der angebotenen Antigene aufwiesen. Als weitere Möglichkeit wurde die klassische Methode zur Herstellung von Antikörpern durch Immunisierung von Tieren gewählt. Hier zeigte es sich, dass es zwar nicht möglich war, aus Kaninchenserum polyklonale Antikörper zu isolieren, die lediglich an O-acetylierte oder de-O-acetylierte Bakterien adhärten, dafür gelang es aber, Hybridomazellen zu erzeugen, die spezifisch bindende, monoklonale Antikörper produzierten. Untersuchungen dieser Antikörper ergaben, dass sie lediglich an O-acetylierte, nicht aber an verseifte Strukturen banden, wobei es unerheblich war, ob es sich um native Bakterien, LPS oder lediglich um das O-Antigen handelte. Da in weiteren Analysen bewiesen wurde, dass speziell die native und damit O-acetylierte Sialinsäure für die Bindung des monoklonalen Antikörpers OAc20 essentiell war, wenn sie auch nicht das alleinige Bindungsepitop repräsentierte, konnte mit diesem System ein systematisches Screening der erhaltenen Mutanten in die Tat umgesetzt werden.

Die Analyse sämtlicher mit verschiedenen Methoden wie Transposonmutagenese, Bestrahlung mit UV-Licht oder Insertion eines IS-Elementes erzeugten Klone ergab, dass unter den ca. $5,1 \times 10^6$ erzeugten Klonen kein einziger war, der in der O-Acetylierung der Sialinsäure im LPS einen Defekt aufwies.

Da es nicht möglich war, über eine ungerichtete Mutagenese das gesuchte Gen zu detektieren, wurde alternativ versucht, es zielgerichtet auszuschalten. Anhand eines Alignments verschiedener O-Acetyltransferasen konnte ein homologer Bereich ermittelt werden, dessen Aminosäuresequenz AvxxFFxxSG lautete. Anhand daraus konstruierter Sonden gelang es, diese Consensus-Sequenz in *E. coli* 21701 zu detektieren. Ein ca. 1 kb großes Fragment aus der Mitte des dazugehörigen Gens wurde in einen temperatursensitiven Vektor kloniert. Durch homologe Rekombination erfolgte ein zielgerichtetes Ausschalten des vorher detektierten Gens. Antikörperbindungstests ergaben, dass diese Mutante KO1 in der O-Acetylierung der Sialinsäure defekt sein mußte. Weitere Analysen durch SDS-PAGE und NMR bewiesen, dass die O-Acetylgruppen zwar nicht mehr vorhanden waren, allerdings fehlte auch das komplette O-Antigen. Also wurde durch die gerichtete Mutagenese ein für die O-Antigen-Biosynthese essentielles Gen ausgeschaltet. Da im vollständig in der Datenbank veröffentlichten Genom von *E. coli* K12 MG1655 kein weiteres Protein die oben dargestellte homologe Region besaß, konnte davon ausgegangen werden, dass diese in der Literatur beschriebene Consensus-Sequenz in *E. coli* nicht in einer O-Acetyltransferase enthalten ist.

Durch eine Expressionsklonierung des aus dem Stamm 21701 amplifizierten, intakten Gens gelang es, das in der Mutante KO1 verkürzte Lipopolysaccharid vollständig zu rekonstituieren. Somit war bewiesen, dass tatsächlich der Leserahmen des gewünschten Gens mittels homologer Rekombination unterbrochen worden war.

In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass sich weder durch UV-Licht noch durch Zugabe von Mitomycin C in das Genom inserierte Prophagen induzieren ließen. Damit wird höchstwahrscheinlich das Gen für die O-Acetyltransferase vom Bakterium selbst und nicht von integrierten Phagen codiert.

Unter Anwendung verschiedenster Verfahren ist es gelungen, mehr über die Enzymatik der O-Acetylierung in Erfahrung zu bringen. So konnte ermittelt werden, dass Acetyl-Coenzym A als Donor für die Acetylgruppe fungieren kann, wobei die Acetylgruppe als O-Acetylgruppe und nicht über eine N-Verknüpfung eingebaut wird. In mit Homogenat durchgeführten Assays zeigte sich, dass die gefundene Aktivität durch SDS und Hitze denaturierbar und ansonsten auch relativ labil ist, da zweimaliges Einfrieren und Auftauen sowie eine Inkubation für einige Tage bereits einen deutlichen Aktivitätsverlust bewirkten. Für die Enzymaktivität sind Temperaturen um 37 °C und pH-Bereiche zwischen pH 6 und pH 7 am geeignetsten.

Es ist davon auszugehen, dass das Enzym eine hohe Substratspezifität besitzt, da sämtliche exogen angebotenen Substrate wie z.B. freie Sialinsäure, LPS oder isoliertes O-Antigen nicht als Acetylgruppen-Akzeptoren verwendet wurden. Die durch die Experimente erhaltenen Daten lassen mit hoher Wahrscheinlichkeit darauf schließen, dass die O-Acetylierung der Sialinsäure während der Biosynthese des O-Antigens an der Innenseite der Cytoplasmamembran erfolgt.

Hinsichtlich der ökologischen Bedeutung der O-Acetylierung von Sialinsäuren im LPS erwiesen sich die nativen Bakterien aufgrund der Modifikation als wesentlich immunogener als de-O-acetylierte Zellen.

Versuche mit verschiedenen Isolaten von Bakteriophagen zeigten, dass sich das Phagenspektrum durch eine O-Acetylierung der Sialinsäuren zwar nicht absolut, aber doch relativ gesehen verschiebt. In den durchgeführten Experimenten wurde de-O-acetyliertes LPS von mehr Phagenisolaten erkannt als das native. Dies deutet darauf hin, dass diese Sialinsäuremodifikation im LPS eine Art Schutzvorrichtung vor diesen Bakteriophagen darstellt, wenn dadurch auch andererseits ein über lysogene Phagen erfolgender Gentransfer durch die O-Acetylierung inhibiert wird.

Mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen wurden wichtige Grundlagen geschaffen, um das Fernziel, die Klonierung einer bakteriellen und letztendlich einer eucaryotischen Sialinsäure-spezifischen O-Acetyltransferase zu erreichen, da jetzt verschiedene Assays zur Verfügung stehen und auch wesentliche Erkenntnisse über den Mechanismus der O-Acetylierung gewonnen wurden.

6 Literaturverzeichnis

- Adlam, C., Knight, J.M., Mugridge, A., Williams, J.M. und Lindon, J.C. (1987): Production of colominic acid by *Pasteurella haemolytica* serotype A2 organisms. *FEMS Microbiol Lett* **42**:23-25.
- Alexander, D.C. und Valvano, M.A. (1994): Role of the rfe gene in the biosynthesis of the *Escherichia coli* O7-specific lipopolysaccharide and other O-specific polysaccharides containing N-acetylglucosamine. *J Bacteriol* **176**:7079-7084.
- Arakere, G. und Frasch, C.E. (1991): Specificity of antibodies to O-acetyl-positive and O-acetyl-negative group C meningococcal polysaccharides in sera from vaccinees and carriers. *Infect Immun* **59**:4349-4356.
- Aspinall, G.O., McDonald, A.G. und Pang, H. (1992): Structures of the O chains from lipopolysaccharides of *Campylobacter jejuni* serotypes O:23 and O:36. *Carbohydr Res* **231**:13-30.
- Aspinall, G.O., McDonald, A.G., Raju, T.S., Pang, H., Moran, A.P. und Penner, J.L. (1993): Chemical structures of the core regions of *Campylobacter jejuni* serotypes O:1, O:4, O:23, and O:36 lipopolysaccharides. *Eur J Biochem* **216**:880-880.
- Bahl, O.P. und Agrawal, K.M. (1969): Glycosidases of *Aspergillus niger*. I. Purification and characterization of alpha- and beta-galactosidases and beta-N-acetylglucosaminidase. *J Biol Chem* **244**:2970-2978.
- Barry, G.T. (1959): Detection of sialic acids in various *Escherichia coli* strains and in other species of bacteria. *Nature* 117-118.
- Barry, G.T., Chen, F. und Roark, E. (1963): Isolation of N-acetylneuraminic acid and 4-oxo-norleucine from a polysaccharide obtained from *Citrobacter freundii*. *J.Gen.Microbiol.* **33**:114-
- Barry, G.T. und Goebel, W. (1957): Colominic acid, a substance of bacterial origin related to sialic acid. *Nature* **179**:206
- Bächi, B. und Arber, W. (1977): Physical mapping of BglIII, BamHI, EcoRI, HindIII and PstI restriction fragments of bacteriophage P1 DNA. *Mol Gen Genet* **153**:311-324.
- Beamer, L.J., Carroll, S.F. und Eisenberg, D. (1999): The three-dimensional structure of human bactericidal permeability-increasing protein - Implications for understanding protein-lipopolysaccharide interactions. *BIOCHEM. PHARMACOL.* **57**:225-229.
- Bhattacharjee, A.K., Jennings, H.J., Kenny, C.P., Martin, A. und Smith, I.C. (1976): Structural determination of the polysaccharide antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups Y, W-135, and BO1. *Can J Biochem* **54**:1-8.

- Bhattacharjee, A.K., Jennings, H.J., Kenny, C.P., Martin, A. und Smith, I.C.P. (1975): Structural determination of the sialic acid polysaccharide antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups B and C with carbon 13 nuclear magnetic resonance. *J Biol Chem* **250**:1926-1932.
- Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B. und Shao, Y. (1997): The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**:1453-1474.
- Borowski, T., Kokkinidis, E., Merali, Z. und Anisman, H. (1998): Lipopolysaccharide, central in vivo biogenic amine variations, and anhedonia. *NEUROREPORT*. **9**:3797-3802.
- Böhm, P., Dauber, S. und Baumeister, L. (1954): Über Neuraminsäure, ihr Vorkommen und ihre Bestimmung im Serum. *Klin.Wochenschr.* **32**:289-292.
- Brade, L., Grimmecke, H.D., Holst, O., Brabetz, W., Zamojski, A. und Brade, H. (1996): Specificity of monoclonal antibodies against *Escherichia coli* K-12 lipopolysaccharide. *J End.Res.* **3**:39-47.
- Bundle, D.R., Smith, I.C. und Jennings, H.J. (1974): Determination of the structure and conformation of bacterial polysaccharides by carbon 13 nuclear magnetic resonance. Studies on the group-specific antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups A and X. *J Biol Chem* **249**:2275-2281.
- Buscher, H.P., Casals-Stenzel, J. und Schauer, R. (1974): New sialic acids. Identification of *N*-glycoloyl-*O*-acetylneuraminic acids and *N*-acetyl-*O*-glycoloylneuraminic acids by improved methods for detection of *N*-acyl and *O*-acyl groups and by gas-liquid chromatography. *Eur J Biochem* **50**:71-82.
- Butor, C., Diaz, S. und Varki, A. (1993): High level *O*-acetylation of sialic acids on *N*-linked oligosaccharides of rat liver membranes. Differential subcellular distribution of 7- and 9-*O*-acetyl groups and of enzymes involved in their regulation. *J Biol Chem* **268**:10197-10206.
- Buxton, R.S. (1980): Selection of *Bacillus subtilis* 168 mutants with deletions of the PBSX prophage. *J Gen Virol* **46**:427-437.
- Bystricky, S. und Szu, S.C. (1994): *O*-acetylation affects the binding properties of the carboxyl groups on the Vi bacterial polysaccharide. *Biophys Chem* **51**:1-7.
- Cheresh, D.A., Reisfeld, R.A. und Varki, A.P. (1984): *O*-acetylation of disialoganglioside GD3 by human melanoma cells creates a unique antigenic determinant. *Science* **225**:844-846.
- Clark, C.A., Beltrame, J. und Manning, P.A. (1991): The *oac* gene encoding a lipopolysaccharide *O*-antigen acetylase maps adjacent to the integrase-encoding gene on the genome of *Shigella flexneri* bacteriophage Sf6. *Gene* **107**:43-52.

- Comstock, K.L., Krown, K.A., Page, M.T., Martin, D., Ho, P., Pedraza, M., Castro, E.N., Nakajima, N., Glembotski, C.C., Quintana, P.J.E. und Sabbadini, R.A. (1998): LPS-Induced TNF-alpha release from and apoptosis in rat cardiomyocytes: Obligatory role for CD14 in mediating the LPS response. *J.MOL.CELL CARDIOL.* **30**:2761-2775.
- Corfield, A.P., Sander-Wewer, M., Veh, R.W., Wember, M. und Schauer, R. (1986): The action of sialidases on substrates containing O-acetylsialic acids. *Biol Chem Hoppe Seyler* **367**:433-439.
- Corfield, A.P. und Schauer, R. (1982): Occurrence of sialic acids., In: *Sialic Acids-Chemistry, Metabolism and Function* (Hrsg. Schauer, R.). Springer, Wien, New York, 5-50
- Culling, C.F.und Reid, P.E. (1980): Specific techniques for the identification of O-acetylated sialic acids in colonic mucins. *J Microsc* **119**:415-425.
- Curd, H., Liu, D. und Reeves, P.R. (1998): Relationships among the O-antigen gene clusters of *Salmonella enterica* groups B, D1, D2, and D3. *J Bacteriol* **180**:1002-1007.
- De Lorenzo, V. und Timmis, K.N. (1994): Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol* **235**:386-405.
- Defives, C., Bouslamti, R., Derieux, J.C., Kol, O. und Fournet, B. (1989): Characterization of sialic acid containing lipopolysaccharide from *Rhizobium meliloti* M11S. *FEMS Microbiol Lett* **57**:416-421.
- Dutton, G.G., Parolis, H. und Parolis, L.A. (1987): The structure of the neuraminic acid-containing capsular polysaccharide of *Escherichia coli* serotype K9. *Carbohydr Res* **170**:193-206.
- Dybwad, A., Forre, O., Kjeldsen-Kragh, J., Natvig, J.B. und Sioud, M. (1993): Identification of new B cell epitopes in the sera of rheumatoid arthritis patients using a random nanopeptide phage library. *Eur J Immunol* **23**:3189-3193.
- Eckhardt, M., Mühlenhoff, M., Bethe, A. und Gerardy-Schahn, R. (1996): Expression cloning of the Golgi CMP-sialic acid transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:7572-7576.
- Edwards, M.S., Kasper, D.L., Jennings, H.J., Baker, C.J. und Nicholson-Weller, A. (1982): Capsular sialic acid prevents activation of the alternative complement pathway by type III, group B *Streptococci*. *J Immunol* **128**:1278-1283.
- Egan, W., Liu, T.Y., Dorow, D., Cohen, J.S., Robbins, J.D., Gotschlich, E.C. und Robbins, J.B. (1977): Structural studies on the sialic acid polysaccharide antigen of *Escherichia coli* strain Bos-12. *Biochemistry* **16**:3687-3692.
- Fattom, A.I., Sarwar, J., Basham, L., Ennifar, S. und Naso, R. (1998): Antigenic determinants of *Staphylococcus aureus* type 5 and type 8 capsular polysaccharide vaccines. *Infect Immun* **66**:4588-4592.

- Felici, F., Luzzago, A., Folgori, A. und Cortese, R. (1993): Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides, II. Selection of clones recognized by a protective monoclonal antibody against the *Bordetella pertussis* toxin from phage peptide libraries. *Gene* **128**:21-27.
- Foster, S.J. (1993): Analysis of *Bacillus subtilis* 168 prophage-associated lytic enzymes; identification and characterization of CWLA-related prophage proteins. *J Gen Microbiol* **139 (Pt 12)**:3177-3184.
- Fragkiadakis, G.A. und Stratakis, E.K. (1997): The lectin from the crustacean *Liocarcinus depurator* recognizes O-acetyl sialic acids. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **117**:545-552.
- Franco, A.V., Liu, D. und Reeves, P.R. (1998): The wzz (cld) protein in *Escherichia coli*: amino acid sequence variation determines O-antigen chain length specificity. *J Bacteriol* **180**:2670-2675.
- Frasa, H., Procee, J., Torensma, R., Verbruggen, A., Algra, A., Rozenberg-Arska, M., Kraaijeveld, K. und Verhoef, J. (1993): *Escherichia coli* in bacteremia: O-acetylated K1 strains appear to be more virulent than non-O-acetylated K1 strains. *J Clin Microbiol* **31**:3174-3178.
- Galas, D.J. und Chandler, M. (1989): Bacterial insertion sequences, in: Mobile DNA, (Hrsg. Berg, D.E., Howe). American Society for Microbiology, Washington, DC, 109-162
- Gamian, A., Kenne, L., Mieszala, M., Ulrich, J. und Defaye, J. (1994): Structure of the *Escherichia coli* O24 and O56 O-specific sialic-acid-containing polysaccharides and linkage of these structures to the core region in lipopolysaccharides. *Eur J Biochem* **225**:1211-1220.
- Gamian, A., Romanowska, E., Ulrich, J. und Defaye, J. (1992): The structure of the sialic acid-containing *Escherichia coli* O104 O-specific polysaccharide and its linkage to the core region in lipopolysaccharide. *Carbohydr Res* **236**:195-208.
- Gemski, P.J., Koeltzow, D.E. und Formal, S.B. (1975): Phage conversion of *Shigella flexneri* group antigens. *Infect Immun* **11**:685-691.
- Goldman, R.C. und Leive, L. (1980): Heterogeneity of antigenic-side-chain length in lipopolysaccharide from *Escherichia coli* 0111 and *Salmonella typhimurium* LT2. *Eur J Biochem* **107**:145-153.
- Gutterson, N.I. und Koshland, D.E.J. (1983): Replacement and amplification of bacterial genes with sequences altered in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**:4894-4898.
- Hames B. und Higgins S: Nucleic acid hybridization - a practical approach. IRL Press Oxford, 1985
- Hamilton, C.M., Aldea, M., Washburn, B.K., Babitzke, P. und Kushner, S.R. (1989): New method for generating deletions and gene replacements in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **171**:4617-4622.

- Hanaoka, K., Pritchett, T.J., Takasaki, S., Kochibe, N., Sabesan, S., Paulson, J.C. und Kobata, A. (1989): 4-O-acetyl-N-acetylneuraminic acid in the N-linked carbohydrate structures of equine and guinea pig α_2 -macroglobulins, potent inhibitors of influenza virus infection. *J Biol Chem* **264**:9842-9849.
- Hara, S., Takemori, Y., Yamaguchi, M., Nakamura, M. und Ohkura, Y. (1985): Determination of alpha-keto acids in serum and urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr* **344**:33-39.
- Hara, S., Yamaguchi, M., Takemori, Y., Furuhata, K., Ogura, H. und Nakamura, M. (1989): Determination of mono-O-acetylated N-acetylneuraminic acids in human and rat sera by fluorometric high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* **179**:162-166.
- Harms, G., Reuter, G., Corfield, A.P. und Schauer, R. (1996): Binding specificity of influenza C virus to variably O-acetylated glycoconjugates and its use for histochemical detection of N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid in mammalian tissues. *Glycoconj J* **13**:621-630.
- Hämmerling, G., Lüderitz, O., Westphal, O. und Mäkelä, P.H. (1971): Structural investigations on the core polysaccharide of *Escherichia coli* 0100. *Eur J Biochem* **22**:331-344.
- Henningsen, M., Roggentin, P. und Schauer, R. (1991): Cloning, sequencing and expression of the sialidase gene from *Actinomyces viscosus* DSM 43798. *Biol Chem Hoppe Seyler* **372**:1065-1072.
- Heuzenroeder, M.W., Beger, D.W., Thomas, C.J. und Manning, P.A. (1989): Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* K-12 of the O101 rfb region from *E. coli* B41 (O101:K99/F41) and the genetic relationship to other O101 rfb loci. *Mol Microbiol* **3**:295-302.
- Higa, H.H. und Varki, A. (1988): Acetyl-coenzyme A:polysialic acid O-acetyltransferase from K1-positive *Escherichia coli*. The enzyme responsible for the O-acetyl plus phenotype and for O-acetyl form variation. *J Biol Chem* **263**:8872-8878.
- Hiom, K., Thomas, S.M. und Sedgwick, S.G. (1991): Different mechanisms for SOS induced alleviation of DNA restriction in *Escherichia coli*. *Biochimie* **73**:399-405.
- Holst, O., Brade, H. (1984). Chemicalstructure of the core region of lipopolysaccharides, in: Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides, (Hrsg. Morrison, D.C., Ryan, J.L). CRC Press Florida, 135-151
- Hubl, U., Fahr, C., Proksch, E. und Schauer, R. (1997): Nachweis O-acetylierter Ganglioside mit Influenza Viren in Melanomen und Basaliomen. *Z.Hautkrankheiten* **72**:258-264.
- Iglesias, M.M., Cymes, G.D. und Wolfenstein-Todel, C. (1996): A sialic acid-binding lectin from ovine placenta: purification, specificity and interaction with actin. *Glycoconj J* **13**:967-976.

- Inoue, S., Iwasaki, M., Ishii, K., Kitajima, K. und Inoue, Y. (1989): Isolation and structures of glycoprotein-derived free sialooligosaccharides from the unfertilized eggs of *Tribolodon hakonensis*, a dace. Intracellular accumulation of a novel class of biantennary disialooligosaccharides. *J Biol Chem* **264**:18520-18526.
- Iwasaki, M., Inoue, S. und Troy, F.A. (1990): A new sialic acid analogue, 9-O-acetyl-deaminated neuraminic acid, and alpha -2,8-linked O-acetylated poly(N-glycolylneuraminy) chains in a novel polysialoglycoprotein from salmon eggs. *J Biol Chem* **265**:2596-2602.
- Iwersen, M., Vandamme-Feldhaus, V. und Schauer, R. (1998): Enzymatic 4-O-acetylation of N-acetylneuraminic acid in guinea-pig liver. *Glycoconj J* **15**:895-904.
- Jansson, P.E., Lindberg, A.A., Lindberg, B. und Wollin, R. (1981): Structural studies on the hexose region of the core in lipopolysaccharides from Enterobacteriaceae. *Eur J Biochem* **115**:571-577.
- Jayaratne, P., Bronner, D., MacLachlan, P.R., Dodgson, C., Kido, N. und Whitfield, C. (1994): Cloning and analysis of duplicated rfbM and rfbK genes involved in the formation of GDP-mannose in *Escherichia coli* O9:K30 and participation of rfb genes in the synthesis of the group I K30 capsular polysaccharide. *J Bacteriol* **176**:3126-3139.
- Jeanloz, R.W. und Coddington, J.F. (1976). The biological role of sialic acid at the cell surface, in: *Biological Roles of Sialic Acid*, (Hrsg. Rosenberg, A., Schengrund, C.L). Plenum Press, New York. 201-238
- Kamerling, J.P., Dorland, L., van Halbeek, H., Vliegthart, J.F., Messer, M. und Schauer, R. (1982): Structural studies of 4-O -acetyl- α -N-acetylneuraminy-(2 goes to 3)-lactose, the main oligosaccharide in echidna milk. *Carbohydr Res* **100**:331-340.
- Kamerling, J.P., Schauer, R., Shukla, A.K., Stoll, S., van Halbeek, H. und Vliegthart, J.F. (1987): Migration of O-acetyl groups in N,O-acetylneuraminic acids. *Eur J Biochem* **162**:601-607.
- Kanamori, A., Inoue, S., Iwasaki, M., Kitajima, K., Kawai, G., Yokoyama, S. und Inoue, Y. (1990): Deaminated neuraminic acid-rich glycoprotein of rainbow trout egg vitelline envelope. Occurrence of a novel alpha-2,8-linked oligo(deaminated neuraminic acid) structure in O-linked glycan chains. *J Biol Chem* **265**:21811-21819.
- Karacali, S., Kirmizigül, S., Deveci, Ö., Onat, T. und Gürcü, B. (1997): Presence of sialic acids in developing testis of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *Tissue & Cell* **29**:315-321.
- Karacali, S., Kirmizigül, S. und Deveci, R. (1999): sialic acids in developoing testis of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *Invertbr.Reprod.Dev.* **35**:225-229.

- Kasper, D.L. (1976): The polysaccharide capsule of *Bacteroides fragilis* subspecies *fragilis*: immunochemical and morphologic definition. *J Infect Dis* **133**:79-87.
- Kedzierska, B., Mikulaszek, E. und Pogonowska-Goldhar, J. (1968): Immunochemical studies on *Salmonella* serogroup 48. 3. *N*-acetylneuraminic acid as an immunodominant sugar in *S. dahlem*. *Bull Acad Pol Sci [Biol]* **16**:673-676.
- Keenleyside, W.J., Perry, M., Maclean, L., Poppe, C. und Whitfield, C. (1994): A plasmid-encoded *rfbO*:54 gene cluster is required for biosynthesis of the O:54 antigen in *Salmonella enterica* serovar Borreze. *Mol Microbiol* **11**:437-448.
- Keleti, J. und Lüderitz, O. (1971): Immunochemical studies on *Citrobacter* O-antigens (lipopolysaccharides). *Eur J Biochem* **20**:237-244.
- Kelleher, J.E. und Raleigh, E.A. (1995): On the regulation and diversity of restriction in *Escherichia coli*. *Gene* **157**:229-230.
- Kelm, S., Brossmer, R., Isecke, R., Gross, H.J., Streng, K. und Schauer, R. (1998): Functional groups of sialic acids involved in binding to siglecs (sialoadhesins) deduced from interactions with synthetic analogues. *Eur J Biochem* **255**:663-672.
- Kelm, S. und Schauer, R. (1997): Sialic acids in molecular and cellular interactions. *Int Rev Cytol* **175**:137-240.
- Kelm, S., Schauer, R., Manuguerra, J.C., Gross, H.J. und Crocker, P.R. (1994): Modifications of cell surface sialic acids modulate cell adhesion mediated by sialoadhesin and CD22. *Glycoconj J* **11**:576-585.
- Kido, N., Torgov, V.I., Sugiyama, T., Uchiya, K., Sugihara, H., Komatsu, T., Kato, N. und Jann, K. (1995): Expression of the O9 polysaccharide of *Escherichia coli*: sequencing of the *E. coli* O9 *rfb* gene cluster, characterization of mannosyl transferases, and evidence for an ATP-binding cassette transport system. *J Bacteriol* **177**:2178-2187.
- Klein, A. und Roussel, P. (1998): O-acetylation of sialic acids. *Biochimie* **80**:49-57.
- Klena, J.D. und Schnaitman, C.A. (1993): Function of the *rfb* gene cluster and the *rfe* gene in the synthesis of O antigen by *Shigella dysenteriae* 1. *Mol Microbiol* **9**:393-402.
- Klotz, F.W., Orlandi, P.A., Reuter, G., Cohen, S.J., Haynes, J.D., Schauer, R., Howard, R.J., Palese, P. und Miller, L.H. (1992): Binding of *Plasmodium falciparum* 175-kilodalton erythrocyte binding antigen and invasion of murine erythrocytes requires *N*-acetylneuraminic acid but not its O-acetylated form. *Mol Biochem Parasitol* **51**:49-54.
- Kniep, B., Claus, C., Peterkatalinic, J., Monner, D.A., Dippold, W. und Nimtz, M. (1995): 7-O-acetyl-GD3 in human T-lymphocytes is detected by a specific T-cell-activating monoclonal antibody. *J Biol Chem* **270**:30173-30180.

- Knipschildt, H. (1945): Undersogelser over Coligruppens Serologi. Nyt Nordisk Forlag, Arnold Busck, Kobenhavn.
- Knirel, Y.A., Moll, H. und Zähringer, U. (1996): Structural study of a highly O-acetylated core of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. *Carbohydr Res* **293**:223-234.
- Koga, M., Yuki, N., Ariga, T. und Hirata, K. (1999): Antibodies to GD3, GT3, and O-acetylated species in Guillain-Barré and Fisher's syndromes: their association with cranial nerve dysfunction. *J Neurol Sci* **164**:50-55.
- Kogan, G., Jann, B. und Jann, K. (1992): Structure of the *Escherichia coli* 0104 polysaccharide and its identity with the capsular K9 polysaccharide. *FEMS Microbiol Lett* **70**:135-140.
- Kogan, G., Jann, B. und Jann, K. (1993a): Structure of the O24 antigen of *Escherichia coli*, a neuraminic acid-containing polysaccharide. *Carbohydr Res* **238**:335-338.
- Kogan, G., Shashkov, A.S., Jann, B. und Jann, K. (1993b): Structure of the O56 antigen of *Escherichia coli*, a polysaccharide containing 7-substituted alpha-N-acetylneuraminic acid. *Carbohydr Res* **238**:261-270.
- Kok, J., van der Vossen, J.M. und Venema, G. (1984): Construction of plasmid cloning vectors for lactic streptococci which also replicate in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **48**:726-731.
- Köhler, G. und Milstein, C. (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**:495-497.
- Krauss, J.H., Reuter, G., Schauer, R., Weckesser, J. und Mayer, H. (1988): Sialic acid-containing lipopolysaccharides in purple nonsulfur bacteria. *Arch. Microbiol.* **150**:381-387.
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Lasonder, E., Schellekens, G.A. und Welling, G.W. (1994): A fast and sensitive method for the evaluation of binding of phage clones selected from a surface displayed library. *Nucleic Acids Res* **22**:545-546.
- Lemercinier, X. und Jones, C. (1996): Full ¹H NMR assignment and detailed O-acetylation patterns of capsular polysaccharides from *Neisseria meningitidis* used in vaccine production. *Carbohydr Res* **296**:83-96.
- Levine, M.M. (1987): *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis* **155**:377-389.
- Lindberg, A.A. 1977 Surface Carbohydrates of the Procaryotic Cell, (Hrsg. Sutherland, I.W.). Academic Press, New York. 289-356

- Liu, D., Cole, R.A. und Reeves, P. (1996): An O-Antigen Processing Function for Wzx (RfbX): a Promising Candidate for O-Unit Flippase. *J Bacteriol* **178**:2102-2107.
- Liu, D., Lindqvist, L. und Reeves, P.R. (1995): Transferases of O-antigen biosynthesis in *Salmonella enterica*: dideoxyhexosyltransferases of groups B and C2 and acetyltransferase of group C2. *J Bacteriol* **177**:4084-4088.
- Liu, D. und Reeves, P.R. (1994): *Escherichia coli* K12 regains its O antigen. *Microbiology* **140 (Pt 1)**:49-57.
- Lochnit, G. und Geyer, R. (1995): Carbohydrate structure analysis of batroxobin, a thrombin-like serine protease from *Bothrops moojeni* venom. *Eur J Biochem* **228**:805-816.
- Ludowieg, J. und Dorfman, A. (1960): a micromethod for the colorimetric determination of N-acetyl groups in acid mucopolysaccharides. *Biochem Biophys Acta* **38**:212-218.
- Maguin, E., Prevost, H., Ehrlich, S.D. und Gruss, A. (1989). Efficient insertional mutagenesis in *lactococci* and other gram-positive bacteria.
- Mandal, C. und Basu, S. (1987): An unique specificity of a sialic acid binding lectin AchatininH, from the hemolymph of *Achatina fulica* snail. *Biochem Biophys Res Commun* **148**:795-801.
- Mandal, C., Sinha, D., Sharma, V. und Bhattacharya, D.K. (1997): O-acetyl sialic acid binding lectin as a probe for detection of subtle change on cell surface induced during acute lymphoblastic leukemia (ALL) and its clinical application. *Indian J Biochem Biophys* **34**:82-86.
- Mandrell, R.E., Lesse, A.J., Sugai, J.V., Shero, M., Griffiss, J.M., Cole, J.A., Parsons, N.J., Smith, H., Morse, S.A. und Apicella, M.A. (1990): In vitro and in vivo modification of *Neisseria gonorrhoeae* lipooligosaccharide epitope structure by sialylation. *J Exp Med* **171**:1649-1664.
- Manzi, A.E., Dell, A., Azadi, P. und Varki, A. (1990): Studies of naturally occurring modifications of sialic acids by fast-atom bombardment-mass spectrometry. Analysis of positional isomers by periodate cleavage. *J Biol Chem* **265**:8094-8107.
- Marolda, C.L. und Valvano, M.A. (1993): Identification, expression, and DNA sequence of the GDP-mannose biosynthesis genes encoded by the O7 rfb gene cluster of strain VW187 (*Escherichia coli* O7:K1). *J Bacteriol* **175**:148-158.
- Marquina, G., Waki, H., Fernandez, L.E., Kon, K., Carr, A., Valiente, O., Perez, R. und Ando, S. (1996): Gangliosides expressed in human breast cancer. *Cancer Res.* **56**:5165-5171.
- Mawhinney, T.P. und Chance, D.L. (1994): Hydrolysis of sialic acids and O-acetylated sialic acids with propionic acid. *Anal Biochem* **223**:164-167.

- McGrath, B.C. und Osborn, M.J. (1991): Localization of the terminal steps of O-antigen synthesis in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **173**:649-654.
- Meier-Dieter, U., Starman, R., Barr, K., Mayer, H. und Rick, P.D. (1990): Biosynthesis of enterobacterial common antigen in *Escherichia coli*. Biochemical characterization of Tn10 insertion mutants defective in enterobacterial common antigen synthesis. *J Biol Chem* **265**:13490-13497.
- Morona, R., Macpherson, D.F., Van Den Bosch, L., Carlin, N.I. und Manning, P.A. (1995): Lipopolysaccharide with an altered O-antigen produced in *Escherichia coli* K-12 harbouring mutated, cloned *Shigella flexneri* rfb genes. *Mol Microbiol* **18**:209-223.
- Mulks, M.H. und Buysse, J.M. (1995): A targeted mutagenesis system for *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Gene* **165**:61-66.
- Murphy, K.C. (1998): Use of bacteriophage lambda recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**:2063-2071.
- Nadano, D., Iwasaki, M., Endo, S., Kitajima, K., Inoue, S. und Inoue, Y. (1986): A naturally occurring deaminated neuraminic acid, 3-deoxy-D-glycero-D-galactonulosonic acid (KDN). Its unique occurrence at the nonreducing ends of oligosialyl chains in polysialoglycoprotein of rainbow trout eggs. *J Biol Chem* **261**:11550-11557.
- Ogura, K., Nara, K., Watanabe, Y., Kohno, K., Tai, T. und Sanai, Y. (1996): Cloning and expression of cDNA for O-acetylation of GD3 ganglioside. *Biochem Biophys Res Commun* **225**:932-938.
- Oldenburg, K.R., Loganathan, D., Goldstein, I.J., Schultz, P.G. und Gallop, M.A. (1992): Peptide ligands for a sugar-binding protein isolated from a random peptide library. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:5393-5397.
- Orskov, F., Orskov, I., Sutton, A., Schneerson, R., Lin, W., Egan, W., Hoff, G.E. und Robbins, J.B. (1979): Form variation in *Escherichia coli* K1: determined by O-acetylation of the capsular polysaccharide. *J Exp Med* **149**:669-685.
- Orskov, I., Orskov, F., Jann, B. und Jann, K. (1977): Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. *Bacteriol Rev* **41**:667-710.
- Osborn, M.J., Gander, J.E. und Parisi, E. (1972): Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Site of synthesis of lipopolysaccharide. *J Biol Chem* **247**:3973-3986.
- Palva, E.T. und Mäkelä, P.H. (1980): Lipopolysaccharide heterogeneity in *Salmonella typhimurium* analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Eur J Biochem* **107**:137-143.
- Parsons, N.J., Andrade, J.R., Patel, P.V., Cole, J.A. und Smith, H. (1989): Sialylation of lipopolysaccharide and loss of absorption of bactericidal antibody during conversion of gonococci to serum resistance by cytidine 5'-monophospho-N-acetyl neuraminic acid. *Microb Pathog* **7**:63-72.

- Perry, M.B., Bundle, D.R., Gidney, M.A. und Lior, H. (1988): Identification of *Escherichia coli* serotype O157 strains by using a monoclonal antibody. *J Clin Microbiol* **26**:2391-2394.
- Pichichero, M., Anderson, P., Gotschlich, E., Kamm, J., McMullen, A. und Nielsen, S. (1985): Immunogenicity of O-acetyl-negative and -positive polysaccharide vaccines for infections with *Neisseria meningitidis* group C in infants. *J Infect Dis* **152**:850-851.
- Pierson, L.S. und Kahn, M.L. (1987): Integration of satellite bacteriophage P4 in *Escherichia coli*. DNA sequences of the phage and host regions involved in site-specific recombination. *J Mol Biol* **196**:487-496.
- Poxton, I.R. (1995): Antibodies to lipopolysaccharide. *J Immunol Methods* **186**:1-15.
- Reed, K.C. und Mann, D.A. (1985): Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *Nucleic Acids Res* **13**:7207-7221.
- Reeves, P.R., Hobbs, M., Valvano, M.A., Skurnik, M., Whitfield, C., Coplin, D., Kido, N., Klena, J., Maskell, D., Raetz, C.R. und Rick, P.D. (1996): Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends Microbiol* **4**:495-503.
- Reid, P.E., Culling, C.F., Dunn, W.L., Ramey, C.W., Magil, A.B. und Clay, M.G. (1980): Differences between the O-acetylated sialic acids of the epithelial mucins of human colonic tumors and normal controls: a correlative chemical and histochemical study. *J Histochem Cytochem* **28**:217-222.
- Reuter, G. und Gabius, H.J. (1996): Sialic acids structure-analysis-metabolism-occurrence-recognition. *Biol Chem Hoppe Seyler* **377**:325-342.
- Reuter, G. und Schauer, R. (1987). Isolation and analysis of gangliosides with O-acetylated sialic acids., in: *Gangliosides and Modulation of Neuronal Functions* (Hrsg. Rahman, H.). Springer, Berlin, 155-165
- Reuter, G. und Schauer, R. (1994): Determination of sialic acids. *Methods Enzymol* **230**:168-199.
- Reuter, G., Stoll, S., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F. und Schauer, R. (1988). Sialic acids on erythrocytes and in blood plasma of mammals, in: *Sialic Acids. 1988 - Proceedings of the Japanese-German Symposium on Sialic Acids* (Hrsg. Schauer, R., Yamakawa, T.). Verlag Wissenschaft und Bildung. Kiel. 88-89
- Rick, P.D., Mayer, H., Neumeyer, B.A., Wolski, S. und Bitter-Surmann, D. (1985): Biosynthesis of enterobacterial common antigen. *J Bacteriol* **162**:494-503.
- Rietschel, E.T., Brade, L., Lindner, B. und Zähringer, U. (1984) Biochemistry of lipopolysaccharides, in: *Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides* (Hrsg. Morrison, D.C., Ryan, J.L.). CRC Press Florida, 3-41

- Rodrigues, M.L., Rozental, S., Couceiro, J.N.S.S., Angluster, J., Alviano, C.S. und Travassos, L.R. (1997): Identification of *N*-acetylneuraminic acid and its 9-*O*-acetylated derivative on the cell surface of *Cryptococcus neoformans*: Influence on fungal phagocytosis. *Infection and Immunity* **65**:4937-4942.
- Rogers, G.N., Herrler, G., Paulson, J.C. und Klenk, H.D. (1986): Influenza C virus uses 9-*O*-acetyl-*N*-acetylneuraminic acid as a high affinity receptor determinant for attachment to cells. *J Biol Chem* **261**:5947-5951.
- Roth, J., Kempf, A., Reuter, G., Schauer, R. und Gehring, W.J. (1992): Occurrence of sialic acids in *Drosophila melanogaster*. *Science* **256**:673-675.
- Röttgen, P. und Collins, J. (1995): A human pancreatic secretory trypsin inhibitor presenting a hypervariable highly constrained epitope via monovalent phagemid display. *Gene* **164**:243-250.
- Sambrook J, Fritsch E.F. und Maniatis T. (1989): Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**:5463-5467.
- Sánchez, C., Rietschel, E.T., Kosma, P. und Zähringer, U. (1999): Elucidation of the structure of an alanine-lacking core tetrasaccharide trisphosphate from the lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* mutant H4. *Eur J Biochem* **261**:500-508.
- Schauer, R. und Kamerling, J.P. (1997) Chemistry, biochemistry and biology of sialic acids, in: *Glycoproteins II* (Hrsg. Montreuil, J., Vliegthart, J.F.G., Schachter, H.). Elsevier, Amsterdam, 243-402
- Schauer, R., Kelm, S., Reuter, G., Roggentin, P. und Shaw, L. (1995). Biochemistry and role of sialic acids, in: *Biology of the Sialic Acids* (Hrsg. Rosenberg, A.). Plenum Press. New York. 7-67.
- Schauer, R. (1970): Biosynthesis of *N*-acetyl-*O*-acetylneuraminic acids. I. Incorporation of [¹⁴C] acetate into sections of the submaxillary salivary gland of ox and horse. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **351**:595-602.
- Schauer, R: (1970): Biosynthesis of *N*-acetyl-*O*-acetylneuraminic acids. II. Substrate and intracellular localization of bovine acetyl-coenzyme A: *N*-acetylneuraminate-7- and 8-*O*-acetyltransferase. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **351**:749-758.
- Schauer, R. (1978): Characterization of sialic acids. *Methods Enzymol* **50**:64-89.
- Schauer, R. (1982): Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids. *Adv Carbohydr Chem Biochem* **40**:131-234.
- Schauer, R. (1987): Analysis of sialic acids. *Methods Enzymol* **138**:132-161.

- Schauer, R., Reuter, G., Mühlpfordt, H., Andrade, A.F. und Pereira, M.E. (1983): The occurrence of N-acetyl- and N-glycoloylneuraminic acid in *Trypanosoma cruzi*. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **364**:1053-1057.
- Schauer, R. (1985): Sialic acids and their role as biological masks. *Trends Biochem Sci* **10**:357-360
- Scott, J.K. (1992): Discovering peptide ligands using epitope libraries. *Trends Biochem Sci* **17**:241-245.
- Scott, J.K. und Smith, G.P. (1990): Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* **249**:386-390.
- Seyedirashti, S., Wood, C. und Akagi, J.M. (1991): Induction and partial purification of bacteriophages from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough) and *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 13541. *J Gen Microbiol* **137 (Pt 7)**:1545-1549.
- Shashkov, A.S., Vinogradov, E.V., Knirel, Y.A., Nifant'ev, N.E., Kochetkov, N.K., Dabrowski, J., Kholodkova, E.V. und Stanislavsky, E.S. (1993): Structure of the O-specific polysaccharide of *Salmonella arizonae* O45. *Carbohydr Res* **241**:177-188.
- Shi, W.X., Chammas, R. und Varki, A. (1998): Induction of sialic acid 9-O-acetylation by diverse gene products: implications for the expression cloning of sialic acid O-acetyltransferases. *Glycobiology* **8**:199-205.
- Shibaev, V.N. (1986): Biosynthesis of bacterial polysaccharide chains composed of repeating units. *Adv Carbohydr Chem Biochem* **44**:277-339.
- Slauch, J.M., Lee, A.A., Mahan, M.J. und Mekalanos, J.J. (1996): Molecular characterization of the *oafA* locus responsible for acetylation of *Salmonella typhimurium* O-antigen: *oafA* is a member of a family of integral membrane trans-acylases. *J Bacteriol* **178**:5904-5909.
- Slauch, J.M., Mahan, M.J., Michetti, P., Neutra, M.R. und Mekalanos, J.J. (1995): Acetylation (O-factor 5) affects the structural and immunological properties of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide O antigen. *Infect Immun* **63**:437-441.
- Stevenson, G., Neal, B., Liu, D., Hobbs, M., Packer, N.H., Batley, M., Redmond, J.W., Lindquist, L. und Reeves, P. (1994): Structure of the O-antigen of *Escherichia coli* K-12 and the sequence of its *rfb* gene cluster. *J Bacteriol* **176**:4144-4156.
- Streng, K., Schauer, R. und Kelm, S. (1999): Binding partners for the myelin-associated glycoprotein of N(2)A neuroblastoma cells. *FEBS Lett.* **444**:59-64.
- Stroeher, U.H., Parasivam, G., Dredge, B.K. und Manning, P.A. (1997): Novel *Vibrio cholerae* O139 genes involved in lipopolysaccharide biosynthesis. *J Bacteriol* **179**:2740-2747.

- Stuart, F.A. und Corbel, M.J. (1982): Identification of a serological cross-reaction between *Brucella abortus* and *Escherichia coli* 0:157. *Vet Rec* **110**:202-203.
- Szabo, M., Bronner, D. und Whitfield, C. (1995): Relationships between rfb gene clusters required for biosynthesis of identical D-galactose-containing O antigens in *Klebsiella pneumoniae* serotype O1 and *Serratia marcescens* serotype O16. *J Bacteriol* **177**:1544-1553.
- Szardenings, M. und Collins, J. (1990): A phasmid optimised for protein design projects: pMAMPF. *Gene* **94**:1-7.
- Thoms, B. und Wackernagel, W. (1984): Genetic control of damage-inducible restriction alleviation in *Escherichia coli* K12: an SOS function not repressed by *lexA*. *Mol Gen Genet* **197**:297-303.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:4350-4354.
- Traving, C. und Schauer, R. (1998): Structure, function and metabolism of sialic acids. *Cell Mol.Life Sci.* **54**:1330-1349.
- Tripodi, M., Perfumo, S., Ali, R., Amicone, L., Abbott, C. und Cortese, R. (1990): Generation of small mutation in large genomic fragments by homologous recombination: description of the technique and examples of its use. *Nucleic Acids Res* **18**:6247-6251.
- Troy, F.A. (1992): Polysialylation: from bacteria to brains. *Glycobiology* **2**:5-23.
- Troy, F.A. (1995) Sialobiology and the polysialic acid glycotype: occurrence, structure, function, synthesis and glycopathology, in: *Biology of the Sialic Acids*, (Hrsg. Rosenberg, A.). Plenum Press, New York, 95-133
- Tsai, C.M. und Frasch, C.E. (1982): A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **119**:115-119.
- Tsuji, H., Mukaida, N., Harada, A., Kaneko, S., Matsushita, E., Nakanuma, Y., Tsutsui, H., Okamura, H., Nakanishi, K., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Kobayashi, K. und Matsushima, K. (1999): Alleviation of lipopolysaccharide-induced acute liver injury in *Propionibacterium acnes*-primed IFN-gamma- deficient mice by a concomitant reduction of TNF-alpha, IL- 12, and IL-18 production. *J.IMMUNOL.* **162**:1049-1055.
- van Putten, J.P. (1993): Phase variation of lipopolysaccharide directs interconversion of invasive and immuno-resistant phenotypes of *Neisseria gonorrhoeae*. *EMBO J* **12**:4043-4051.
- Vandamme-Feldhaus, V. und Schauer, R. (1998): Characterization of the enzymatic 7-O-acetylation of sialic acids and evidence for enzymatic O-acetyl migration from C-7 to C-9 in bovine submandibular gland. *J Biochem (Tokyo)* **124**:111-121.

- Varki, A. (1992): Diversity in the sialic acids [published erratum appears in *Glycobiology* 1992 Apr;2(2):following 168]. *Glycobiology* **2**:25-40.
- Varki, A. (1994): Selectin ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:7390-7397.
- Veh, R.W. (1979): morphologische und histochemische Untersuchungen an der Glandula submandibularis des Hausrindes unter besonderer Berücksichtigung von unterschiedlich O-acetyl-substituierten N-Acylneuraminsäuren. Dissertation Ruhr-Universität, Bochum
- Verma, N.K., Quigley, N.B. und Reeves, P.R. (1988): O-antigen variation in *Salmonella* spp. rfb gene clusters of three strains. *J Bacteriol* **170**:103-107.
- Vinogradov, E.V., Holst, O., Thomas-Oates, J.E., Broady, K.W. und Brade, H. (1992): The structure of the O-antigenic polysaccharide from lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* strain H11 (non-O1). *Eur J Biochem* **210**:491-498.
- Vlasak, R., Luytjes, W., Spaan, W. und Palese, P. (1988): Human and bovine coronaviruses recognize sialic acid-containing receptors similar to those of influenza C viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:4526-4529.
- Vliegthart, J.F., Dorland, L., van Halbeek, H. und Haverkamp, J. (1982). NMR Spectroscopy of sialic acids, in: *Sialic Acids* (Hrsg. Schauer, R.). Springer-Verlag. Wien. 127-172.
- Wallace, R.B., Johnson, M.J., Hirose, T., Miyake, T., Kawashima, E.H. und Itakura, K. (1981): The use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes. II. Hybridization of oligonucleotides of mixed sequence to rabbit beta-globin DNA. *Nucleic Acids Res* **9**:879-894.
- Wang, L., Curd, H., Qu, W. und Reeves, P.R. (1998): Sequencing of *Escherichia coli* O111 O-antigen gene cluster and identification of O111-specific genes. *J Clin Microbiol* **36**:3182-3187.
- Wang, L. und Reeves, P.R. (1998): Organization of *Escherichia coli* O157 O antigen gene cluster and identification of its specific genes. *Infect Immun* **66**:3545-3551.
- Ward, H.M. und Manning, P.A. (1989): Mapping of chromosomal loci associated with lipopolysaccharide synthesis and serotype specificity in *Vibrio cholerae* O1 by transposon mutagenesis using Tn5 and Tn2680. *Mol Gen Genet* **218**:367-370.
- Warren, L. (1964): N-glycolyl-8-O-methylneuraminic acid; a new form of sialic acid in the starfish *Asterias forbesi*. *Biochem Biophys Acta* **83**:129-131.
- Wessels, M.R., Haft, R.F., Heggen, L.M. und Rubens, C.E. (1992): Identification of a genetic locus essential for capsule sialylation in type III group B *Streptococci*. *Infect Immun* **60**:392-400.
- Westphal, O. und Jann, K. (1965): Bacterial lipopolysaccharides: Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Meth Carbohydr.Chem* **5**:83-91.

- Wolpert, J.S. und Albersheim, P. (1976): Host-symbiont interactions. I. The lectins of legumes interact with the o-antigen-containing lipopolysaccharides of their symbiont *Rhizobia*. *Biochem Biophys Res Commun* **70**:729-737.
- Xiang, S.H., Hobbs, M. und Reeves, P.R. (1994): Molecular analysis of the rfb gene cluster of a group D2 *Salmonella enterica* strain: evidence for its origin from an insertion sequence-mediated recombination event between group E and D1 strains. *J Bacteriol* **176**:4357-4365.
- Yoshida, M., Fuse, G., Matsui, T. und Ouchi, S. (1992): Identification of sialic acids in cell adhesion molecule, contact site A from *Dictyostelium discoideum*. *Biochem Biophys Res Commun* **188**:794-798.
- Zhang, G., Ji, L., Kurono, S., Fujita, S.C., Furuya, S. und Hirabayashi, Y. (1997): Developmentally regulated O-acetylated sialoglycans in the central nervous system revealed by a new monoclonal antibody 493D4 recognizing a wide range of O-acetylated glycoconjugates. *Glycoconj J* **14**:847-857.
- Zimmer, G., Reuter, G. und Schauer, R. (1992): Use of influenza C virus for detection of 9-O-acetylated sialic acids on immobilized glycoconjugates by esterase activity. *Eur J Biochem* **204**:209-215.
- Zou, C.H., Knirel, Y.A., Helbig, J.H., Zähringer, U. und Mintz, C.S. (1999): Molecular cloning and characterization of a locus responsible for O-acetylation of the O-polysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. *J Bacteriol* **181**:4137-4141.

Danksagung

Herrn **Prof. Dr. Roland Schauer** danke ich ganz besonders für die Ermöglichung dieser Dissertation und seine Bemühungen für meine finanzielle Unterstützung. Weiterhin danke ich ihm sehr herzlich für sein in vielen anregenden Gesprächen sichtbar gewordenen großes Interesse an meiner Arbeit und seine vielen, nützlichen Tipps besonders hinsichtlich der „Enzymatik“ dieser Arbeit.

Bei Herrn **Prof. Dr. Knut Heller** bedanke ich mich für die Übernahme des Hauptreferates sowie für seine Anregungen zu allen Bakteriophagen-Versuchen.

Herrn **Prof. Dr. Imhoff** möchte ich für seine Bereitschaft danken, kurzfristig das Koreferat zu übernehmen.

Mein ganz besonders herzlicher Dank gebührt **Priv. Doz. Dr. Peter Roggentin** für sein Engagement, seine vielen Tipps, seine Anteilnahme und seine ständige Bereitschaft, mir zuzuhören. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Seiner Frau **Dr. Telse Roggentin** gebührt ebenfalls ein herzlicher Dank für ihre Unterstützung und Anteilnahme.

Bei **Dr. Marcus Gollub** bedanke ich mich aus ganzem Herzen für seine vielen Hilfestellungen, die weit über den „normalen“ Laboralltag hinausgingen und seine freundschaftliche Unterstützung in allen Lebenslagen.

Ein besonderes „Danke schön“ geht an **Dr. Guido Kohla** und **Dipl. Chem. Matthias Iwersen** für ihre große Hilfsbereitschaft und ihre Geduld mit mir, wenn es um Fragen der Analytik und der Enzymatik ging.

Frau **Nicole Pinnow** und Frau **Alice Schneider** danke ich für die technische Hilfe bei der Durchführung meiner Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt natürlich auch allen meinen weiteren **Kollegen** im Biochemischen Institut für die vielen kleinen und großen Hilfestellungen und die tolle Atmosphäre.

Herrn **Priv. Doz. Dr. Ulrich Zähringer** und seinen Mitarbeitern danke ich ganz besonders für die prompte NMR-Analyse meiner vielen Proben.

Vielen Dank auch an **Dr. Christiane Bode**, die den *E. coli*-Subklon aus 21701R und dem Plasmid pRU664 hergestellt und mir zur Verfügung gestellt hat.

Herrn **Prof. Dr. Christian Gliesche** (Universität Greifswald) danke ich für die Überlassung der *Escherichia coli* Stämme 3278 und 3279.

Bei **Dr. Emmanuelle Maguin** (INRA, Génétique Microbienne; Jouy-en-Josas, Frankreich) bedanke ich mich für die Überlassung des Vektors pG⁺host9::ISS1.

Mein Dank gilt auch den **Mitarbeitern des Tierstalles** der CAU, die mir bei der Haltung der benötigten Tiere sowie bei der Immunisierung und Blutabnahme hilfreich zur Seite standen. Für die finanzielle Unterstützung danke ich der **Deutschen Forschungsgemeinschaft** und der **Gesellschaft zur Erforschung von Sialinsäuren**.